



## Kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof

IRNA050

REF

**CE** **IVD** *in vitro* dispositivo médico de diagnóstico

El kit ha sido fabricado de acuerdo con la Directiva CE 98/79/CE como producto sanitario de diagnóstico in vitro y ha sido diseñado para uso profesional en laboratorios clínicos y de investigación especializados.

## CONTENIDO

CONTENIDO DEL KIT .....	3
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO .....	4
ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS .....	5
OBSERVACIONES SOBRE LA CALIDAD Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	5
OBSERVACIONES SOBRE LA ELUCIÓN.....	5
OBSERVACIONES SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD.....	5
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO. ....	5
INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD - FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD.....	6
FRASES DE PELIGRO.....	6
FRASES DE PRECAUCIÓN.....	6
AISLAMIENTO DE ARN VIRAL DE FLUIDOS BIOLÓGICOS LIBRES DE CÉLULAS.....	7
PROTOCOLO ABREVIADO.....	9
SOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	10
VARIANTES DEL PRODUCTO .....	11
ADVERTENCIA .....	11
SERVICIO AL CLIENTE .....	12
CONTACTO.....	12

## CONTENIDO DEL KIT

Kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof	
Contenido del kit	IRNA050 50 preparaciones
Tampón de lisis RAV1	35ml
Tampón de lavado CRUDO	30ml
Tampón de lavado RAV3 (Concentrado) *	12ml
agua libre de ARNasa	13ml
Tampón de elución RE **	13ml
ARN transportador (líoilizado)	1 mg
Columnas de virus de ARN (anillos azul oscuro, más tubos de recolección)	50
Tubos de recogida (2 ml)	4x50

### Reactivos, consumibles y equipos a ser suministrados por el usuario

#### reactivos

- 96-100% etanol

#### Consumibles

- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- puntas desechables

#### Equipo

- pipetas manuales
- centrífuga para microtubos de centrífuga
- mezclador Vortex
- bloque calefactor o baño maría para incubación a 70 °C
- equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes, goggles)

\* Para la preparación de las soluciones de trabajo y las condiciones de almacenamiento, consulte la Sección 3.

\*\* Composición del tampón de elución RE: 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

### El principio básico

Con el método GeneProof PathogenFree RNA Isolation Kit, los virus de ARN se lisan de forma rápida y eficiente mediante Lysis Buffer RAV1, que es una solución altamente concentrada de GITC (tiocianato de guanidina). El tampón de lisis y el etanol crean las condiciones adecuadas para la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílice de las columnas de virus de ARN. El ARN transportador mejora la unión y la recuperación del ARN viral de baja concentración. Las contaminaciones (inhibidores potenciales de la PCR) como sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares solubles se eliminan en sencillos pasos de lavado con tampones etanólicos RAW y RAV3. Los ácidos nucleicos se pueden eluir en tampón bajo en sal o agua y están listos para usar en reacciones posteriores.

### Especificaciones del equipo

- El kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof está diseñado para la preparación rápida de ácidos nucleicos virales de alta pureza (por ejemplo, VHC, VIH) a partir de muestras biológicas fluidas, por ejemplo, plasma, suero, pero no sangre.
- Sin contaminación cruzada debido a los sistemas cerrados.
- Los ácidos nucleicos preparados son adecuados para aplicaciones como secuenciación fluorescente automatizada, RT-PCR o cualquier tipo de reacción enzimática.

Parámetros	Kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof
Tamaño de la muestra	Hasta 150 µl
Tasas típicas de recuperación	> 90%
Límite de análisis típico	30-60 cp/ml
Volumen de elución	50 µl
Capacidad de encuadernación	40 µg
Tiempo / preparación	30 min / 4-6 preparaciones

## Almacenamiento de muestras

Recomendamos transportar y almacenar el ARN purificado congelado entre -85 y -10 °C.

## Observaciones sobre la calidad y preparación de la muestra

Se pueden procesar todo tipo de fluidos biológicos o muestras semifluidas, por ejemplo, suero. Para una purificación satisfactoria de ácidos nucleicos, es importante obtener una muestra homogénea, clara y no viscosa antes de cargarla en las columnas de virus de ARN correspondientes. Por lo tanto, revise todas las muestras (especialmente las viejas o congeladas) en busca de precipitados. Evite limpiar las muestras mediante centrifugación/filtración antes del paso de lisis RAV1, ya que los virus pueden estar asociados con partículas o agregados. La incubación con el tampón RAV1 puede prolongarse para disolver y digerir estructuras celulares residuales, precipitados y partículas de virus. Sin embargo, el ARN es sensible a la autólisis y la incubación prolongada puede causar degradación y disminución de los rendimientos.

## Observaciones sobre la elución

- Los ácidos nucleicos puros finalmente se eluyen en condiciones de baja fuerza iónica con H<sub>2</sub>O libre de RNasa (pH aproximadamente 7 - 8) o tampón RE ligeramente alcalino (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5).
- La elución se puede realizar en un solo paso con agua/tampón de elución como se indica en el protocolo, obteniendo al menos el 80% de los ácidos nucleicos unidos. Para mejorar la sensibilidad, este eluido se puede usar en un segundo paso de elución aumentando ligeramente la eficiencia de elución y la concentración de ácidos nucleicos virales. Alternativamente, se puede realizar un segundo paso de elución con un volumen adicional de agua/tampón de elución que libera prácticamente todos los ácidos nucleicos unidos pero da como resultado un eluido combinado de menor concentración.
- El ARN debe ser eluido con el agua precalentada a 70°C que se suministra.

## Observaciones sobre el control de calidad

- Los tampones y las columnas de virus de ARN se han probado con ARN<sub>r</sub> y ARN de fago MS2. La ausencia de RNasas y el rendimiento y la eficiencia de la purificación se han investigado con RT-PCR.

## CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO.

**Atención:** ¡Los tampones RAV1 y RAW contienen sales caotrópicas! ¡Usa guantes y gafas!

**PRECAUCIÓN:** El tampón RAV1 contiene tiocianato de guanidinio y el tampón RAW contiene clorhidrato de guanidina que puede formar compuestos altamente reactivos cuando se combina con lejía (clorhidrato de sodio). NO agregue lejía o soluciones ácidas directamente a los desechos de preparación de muestras.

- Los componentes del kit se mantendrán estables al menos hasta la fecha de caducidad impresa en el envase, si se mantiene la temperatura de almacenamiento (15 - 25 °C)..
- ARN portador tiene una vida útil limitada en Buffer RAV1. Por este motivo, algunos kits contienen varios frascos de Carrier RNA liofilizado que deben usarse sucesivamente según sea necesario para evitar la degradación del Carrier RNA.
- Antes de usar, agregue 1 ml de Lysis Buffer RAV1 al tubo Carrier RNA. Disuelva el ARN y transféralo de nuevo a la botella RAV1.

### Almacenamiento de ARN transportador en tampón RAV1:

- Tampón de lisis RAV1 que incluye ARN portador puede almacenar a temperatura ambiente durante 1-2 semanas. El almacenamiento a temperatura ambiente evita la precipitación de sal.
- Tampón de lisis RAV1 que incluye ARN portador puede almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de 4 semanas o dividirse en alícuotas y luego almacenarse entre -85 y -10 °C durante períodos más prolongados (hasta 6 meses). El almacenamiento a 2-8 °C o menos puede provocar la precipitación de sales. Por lo tanto, la mezcla debe precalentarse a 40-60 °C durante un máximo de 5 min para que se vuelvan a disolver las sales.
- ¡No caliente más de 4 veces el tampón RAV1 que contiene ARN portador! El calentamiento frecuente, temperaturas > 80 °C y la incubación prolongada con calor acelerarán la degradación del ARN transportador. Esto conduce a una recuperación reducida del ARN viral y, finalmente, a resultados falsos negativos de la RT-PCR, en particular si se utilizan muestras de título bajo.

**Kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof**

<b>Gato. No.</b>	<b>IRNA050</b> <b>50 preparaciones</b>
Tampón de lavado RAV3 (Concentrado)	12ml Agregar 48 ml de etanol

Antes de comenzar el protocolo de aislamiento de ARN, prepare lo siguiente:

- Tampón de lavado RAV3: Agregue el volumen indicado de etanol (96-100 %) (en la tabla) al concentrado de tampón de lavado RAV3. Marque la etiqueta de la botella para indicar que se agrega el etanol. Lavado en tienda Buffer RAV3 a temperatura ambiente (15-25 ° C) por hasta un año.

## INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD - FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD

Los siguientes componentes de los kits de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof contienen contenido peligroso. Use guantes y gafas y siga las instrucciones de seguridad dadas en esta sección.

Componente	Contenido de peligro	Símbolo de peligro	Frases de peligro	Frases de precaución
RAV1	tiocianato de guanidinio 30-60%	 Advertencia	302, 412	260, 273, 301 + 312, 330
CRUDO	clorhidrato de guanidina 24-36% + etanol 35-55%	 Advertencia	226, 302	210, 233, 301 + 312, 330

### Frases de peligro

226	líquido inflamable y vapor
302	Dañino en caso de ingestión
412	Nocivo para la vida acuática con efectos duraderos.

### Frases de precaución

Pág. 210	Mantener alejado del calor/chispas/llamas abiertas/superficies calientes. - No Fumar.
pág. 233	Mantener el contenedor bien cerrado
pág. 260	No respire vapores
pág. 273	Evitar su liberación al medio ambiente
P 301 + 312 encuentra bien.	EN CASO DE INGESTIÓN: Llame a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si no se encuentra bien.
pág. 330	enjuagar la boca

## AISLAMIENTO DE ARN VIRAL DE FLUIDOS BIOLÓGICOS LIBRES DE CÉLULAS

Antes de comenzar la preparación compruebe si el Wash Buffer RAV3 se preparó de acuerdo con la sección 3. Precaliente una alícuota de Elution Buffer RE / RNase-free H<sub>2</sub>O a 70 °C. Mantenga las muestras en la rejilla de enfriamiento.

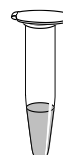
### 1 Lisis de virus

Agregue 600 µl de tampón RAV1 que contiene ARN portador a 150 µl de la muestra. Pipetear la mezcla hacia arriba y hacia abajo y agitar bien.

Incubar por 5 min a 70°C.

*El tiempo y la temperatura de incubación son fundamentales para la lisis, así como para la estabilidad del ARN (consulte la sección de solución de problemas para obtener más sugerencias).*

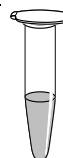
*Si la solución resultante todavía está turbia, centrifugue la mezcla durante 1 min a 11 000 xg (para sedimentar partículas y evitar la obstrucción de las columnas de virus de ARN). Retire el sobrenadante y continúe con el paso 2.*



150 muestra muestra  
+ 600 RI RAV1  
70°C 5 min

### 2 Ajustar las condiciones vinculantes

Añadir 600 µl de etanol (96–100 %) a la solución de lisis transparente y mezclar con vórtex (10-15 s).



+ 600 µl etanol mix

### 3 Unir ARN viral

Coloque columnas de virus de ARN en tubos de recogida (2 ml) y cargue 700 µl de muestra lisada.

Centrifugar durante 1 min a 8.000 xg.

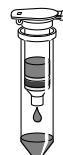
*Se recomienda el uso de tubos de recogida nuevos (2 ml).*

Cargue la solución de lisis residual en la columna de virus de ARN.

Centrifugar durante 1 min a 8.000 x g.

Deseche el tubo de recogida con el flujo continuo y coloque la columna de virus de ARN en un nuevo tubo de recogida (2 ml).

*No se recomiendan más de dos pasos de carga.*



cargar muestra paso a paso



1 min 8,000 x gramo

**4 Lavar y secar la membrana de sílice**

**1er lavado**

Agregue 500 Bul Buffer RAW a la columna de virus de ARN.

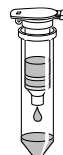
Centrifugar durante 1 min a 8.000 x g.

+ 500 RAI CRUDO

Deseche el flujo continuo.

1 min 8,000 xg

Este paso de lavado elimina los contaminantes y los inhibidores de PCR.



**segundo lavado**

+ 600 RI RAV3

Coloque la columna de virus de ARN en un tubo de recolección (2 ml), agregue 600 Bul Buffer RAV3 a la columna de virus de ARN.

1 min 8,000 xg

Centrifugar durante 1 min a 8.000 x g.

Deseche el tubo de recolección con el flujo continuo.



+ 200 RI RAV3

**3er lavado**

2-5 minutos

Coloque la columna de virus de ARN en un tubo de recolección nuevo (2 ml) y agregue 200 Bul Buffer RAV3.

11.000 xg

Centrifugar durante 2-5 min a 11 000 xg para eliminar completamente el tampón etanólico RAV3.

Deseche el tubo de recolección con el flujo continuo.

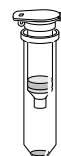
**5 Membrana de sílice seca**

Coloque la columna de virus de ARN en un tubo de recogida nuevo (2 ml).

1 minuto

Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

11.000 xg



**6 Eluir el ARN viral**

Coloque la columna de virus de ARN en un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril de 1,5 ml (no incluido).

+ 50 tampón REI RE / H2O libre de ARNasa (70 ° C)

Añadir 50 REI de tampón RE/H2O libre de ARNasa (precalentada a 70 °C) e incubar durante 1-2 min.

RT 1-2 min


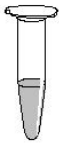
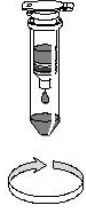
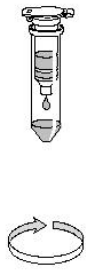


Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

1 min 11,000 xg





**PROTOCOLO ABREVIADO**

1	Sample lysis		150 µl sample + 600 µl RAV1 mix (vortex)  70 °C; 5 min
2	Adjust binding conditions		+ 600 µl ethanol mix (vortex)
3	Bind RNA		load 700 µl of lysed sample 1 min 8 000 × g  load residual sample 1 min 8 000 g
4	Wash silica membrane		+ 500 µl RAW 1 min 8 000 × g  + 600 µl RAV3 1 min 8 000 × g  + 200 µl RAV3 2-5 min 11 000 × g
5	Dry silica membrane		1 min 11 000 × g
6	Elute RNA		+ 50 µl RE buffer/RNase Free H <sub>2</sub> O (70 °C)  RT 1-2 min  1 min 11 000 × g

## SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias.
<p><b>Pequeñas cantidades o ausencia de ácidos nucleicos virales en el eluato</b></p>	<p><i>Problemas con el ARN transportador</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ARN portador no añadido.</li> <li>• Véanse los comentarios sobre el almacenamiento del tampón RAV1 con ARN portador (sección 3).</li> </ul> <p><i>Puede ser necesaria la digestión con proteinasa K</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilice y compare protocolos con y sin digestión con proteinasa K o prolongue el tiempo de incubación a 10 min.</li> </ul> <p><i>Ácidos nucleicos virales degradados</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Las muestras deben procesarse inmediatamente. Si es necesario, agregue inhibidor de RNasa a la muestra y garantice las condiciones de almacenamiento adecuadas hasta el procesamiento.</li> <li>• Compruebe que todos los tampones se hayan preparado y almacenado correctamente. En caso de duda, utilice nuevas alícuotas de Buffer RAV1, Carrier RNA y Elution Buffer RE.</li> </ul>
<p><b>Problemas con la detección posterior</b></p>	<p><i>Sensibilidad reducida</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambie el volumen de eluato agregado a la PCR/RT-PCR.</li> <li>• El tiempo y la temperatura de incubación son críticos para la lisis y la estabilidad del ARN. Para preparaciones de ARN sensibles, la incubación a temperatura ambiente es suficiente sin una pérdida significativa de sensibilidad. Para el aislamiento paralelo de ARN y ADN viral, el tiempo de incubación (5 -15 min) y la temperatura (RT / 56 ° C / 72 ° C) pueden adaptarse para obtener tasas de recuperación óptimas para ambas especies.</li> </ul> <p><i>Arrastre de etanol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolongue los pasos de centrifugado para eliminar completamente el Buffer RAV3.</li> </ul>
<p><b>Problemas generales</b></p>	<p><i>Membrana obstruida</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugar el lisado de plasma antes de agregar etanol y cargarlo posteriormente en las columnas de virus de ARN correspondientes.</li> </ul>

## VARIANTES DEL PRODUCTO

Nombre del producto	Gato. No.	Paquete
Kit de aislamiento de ARN libre de patógenos GeneProof	IRNA050	50 aislamientos

## ADVERTENCIA

En el paquete se incluye un solo prospecto válido para un kit específico o se debe solicitar al fabricante para el lote en particular. El kit debe desecharse después de su uso de acuerdo con las normas legales vigentes. El kit no contiene ningún componente peligroso, infeccioso o tóxico que esté sujeto a normas especiales de seguridad, excepto los componentes mencionados en el capítulo 4. Los materiales de embalaje son de papel y polipropileno. Si tiene alguna pregunta, póngase en contacto con nuestro Servicio de Atención al Cliente.

## SERVICIO AL CLIENTE

Agradecemos a todos nuestros clientes y, además de productos de alta calidad, brindamos un servicio al cliente superior al estándar, que incluye lo siguiente:

- Suministro de kits de PCR de demostración gratuitos
- entregas urgentes
- Solución rápida de problemas relacionados con los productos suministrados - servicio garantizado dentro de las 24 horas desde el momento del informe
- Consultas sobre interpretaciones tecnológicas y clínicas

Para asegurar la solución más rápida posible de cualquier problema, siempre solicitamos a los usuarios del kit GeneProof PCR que proporcionen la siguiente información:

- Nombre del kit
- Definición del problema
- Lote del kit: especificado en el paquete del kit
- dispositivo usado
- Archivo con el registro de examen del dispositivo utilizado

## CONTACTO

### Soporte y atención al cliente

Teléfono: +420730 176 222

Correo electrónico:  
[support@geneproof.com](mailto:support@geneproof.com)

### Pedidos

Teléfono: +420 543 211 679

Correo electrónico: [sales@geneproof.com](mailto:sales@geneproof.com)



GeneProof como  
Véaseaska 101/119 / Dolní Heršpice / CZ-619 00 Brno / +420 543 211 679 /  
info@geneproof.com  
Versión:IFU\_0082\_A01\_1.0, Fecha efectiva:17. 9. 2021