

Manual del kit QIAamp DSP Virus Spin



Versión 1



Para uso diagnóstico *in vitro*



61704



1062686ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

DEUTSCHLAND

R6



1062686ES



QIAGEN: Tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten aislar y detectar el contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad son garantía de éxito, desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar el éxito. Para más información, visite www.qiagen.com.

Índice

Uso previsto	4
Resumen y explicación	4
Principios del procedimiento	4
Purificación automatizada de ácidos nucleicos víricos en el QIAcube	4
Materiales suministrados	9
Contenido del kit	9
Materiales necesarios pero no suministrados	10
Advertencias y precauciones	11
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	13
Almacenamiento y manipulación de las muestras	13
Procedimiento	14
Cuestiones importantes antes de comenzar	14
Manipulación de las columnas QIAamp MinElute	14
Centrifugado	15
Procesamiento de las columnas QIAamp MinElute en una microcentrifugadora	15
Preparación de reactivos y tampones	16
Protocolo: purificación de ácidos nucleicos víricos plasma y suero	19
Control de calidad	22
Limitaciones	22
Características de rendimiento	22
Bibliografía	22
Símbolos	23
Información de contacto	24
Apéndice	25

Uso previsto

El kit QIAamp DSP Virus Spin es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología QIAamp) para aislar y purificar los ácidos nucleicos víricos procedentes de muestras biológicas.

El producto está destinado a ser utilizado por usuarios profesionales, como técnicos y médicos formados en técnicas de biología molecular.

El kit QIAamp DSP Virus Spin se ha diseñado para uso diagnóstico *in vitro*.

Resumen y explicación

El kit QIAamp DSP Virus Spin utiliza una tecnología consolidada para la purificación simultánea de ADN y ARN viral. El kit combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de gel de sílice con volúmenes de elución flexibles de entre 20 y 150 μ l. El procedimiento es adecuado para plasma y suero. Las muestras pueden ser frescas o congeladas, siempre y cuando no hayan sido congeladas y descongeladas más de una vez (consulte la página 13). Los ácidos nucleicos víricos se eluyen en tampón de elución AVE, listos para usarse en reacciones de amplificación o almacenarse a una temperatura de entre -25°C y -15°C .

Principios del procedimiento

El procedimiento QIAamp DSP Virus Spin consta de cuatro pasos (lisis, unión, lavado, elución) y se realiza con columnas QIAamp MinElute[®] en una microcentrifugadora estándar o de forma totalmente automatizada en el QIAcube[®]. El procedimiento ha sido diseñado para minimizar la posible contaminación cruzada entre muestras y permite la manipulación segura de muestras potencialmente infecciosas. El procedimiento sencillo QIAamp DSP Virus Spin es adecuado para el procesamiento simultáneo de múltiples muestras. El kit QIAamp DSP Virus Spin puede utilizarse para aislar ARN y ADN víricos de una amplia variedad de virus de ARN y ADN. No obstante, las características de rendimiento para cada especie de virus no se han especificado y deben ser validadas por el usuario.

Purificación automatizada de ácidos nucleicos víricos en el QIAcube

La purificación de ácidos nucleicos víricos mediante el kit QIAamp DSP Virus Spin se puede automatizar totalmente en el QIAcube. El innovador QIAcube utiliza tecnología avanzada para procesar las columnas de centrifugación QIAGEN[®] que permite integrar sin interrupciones la preparación automatizada de muestras de bajo volumen en las secuencias de trabajo de laboratorio. La preparación de muestras mediante el QIAcube se realiza siguiendo los mismos pasos que en el procedimiento manual (es decir, lisis, unión, lavado y elución),

de modo que es posible utilizar el kit QIAamp DSP Virus Spin para purificar ácidos nucleicos víricos de alta calidad.

Si se automatiza el kit QIAamp DSP Virus Spin en el instrumento QIAcube, es posible que el instrumento procese menos de 50 muestras debido a los volúmenes muertos, a la evaporación y al consumo adicional de reactivos por el pipeteo automatizado. QIAGEN solo garantiza 50 preparaciones de muestras con el uso manual del kit QIAamp DSP Virus Spin.

Para obtener más información sobre el procedimiento automatizado, consulte la hoja del protocolo correspondiente en www.qiagen.com/MyQIAcube. Las hojas de protocolo actualizadas se pueden descargar gratuitamente u obtener a través del Departamento de Servicio Técnico de QIAGEN (consulte la página 23).



Figura 1. El QIAcube.

Lisis con proteasa QIAGEN

Las muestras se lisan en condiciones altamente desnaturalizantes a temperaturas elevadas. La lisis se realiza en presencia de proteasa QIAGEN y de tampón de lisis AL, que garantizan conjuntamente la inactivación de las ARNasas.

Adsorción sobre la membrana QIAamp MinElute

Para optimizar la unión del ADN y ARN víricos a la membrana, se añade etanol a los lisados. Los lisados se transfieren a continuación a una columna QIAamp MinElute y, a medida que la atraviesan por efecto de la centrifugación, los ácidos nucleicos víricos se adsorben sobre la membrana de gel de sílice. Las sales y el pH garantizan que las proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas posteriores no se retengan en la membrana QIAamp MinElute.

Los tubos de lavado de 2 ml (suministrados) sujetan la columna QIAamp MinElute durante los pasos de carga y de lavado.

Eliminación de contaminantes residuales

Mientras que los ácidos nucleicos se mantienen unidos a la membrana, los contaminantes se eliminan eficazmente en tres pasos de lavado. En un paso

único, el ARN y ADN víricos de alta pureza se eluyen en un tampón AVE equilibrado a temperatura ambiente.

Elución de ácidos nucleicos puros

Para la elución se utiliza tampón AVE. Las columnas QIAamp MinElute permiten utilizar volúmenes de elución mínimos de tan solo 20 μ l. Este pequeño volumen de elución permite obtener eluidos de ácidos nucleicos altamente concentrados.

En las aplicaciones posteriores que requieran volúmenes iniciales reducidos (p. ej. determinados ensayos PCR y RT-PCR), un eluido más concentrado puede aumentar la sensibilidad del ensayo.

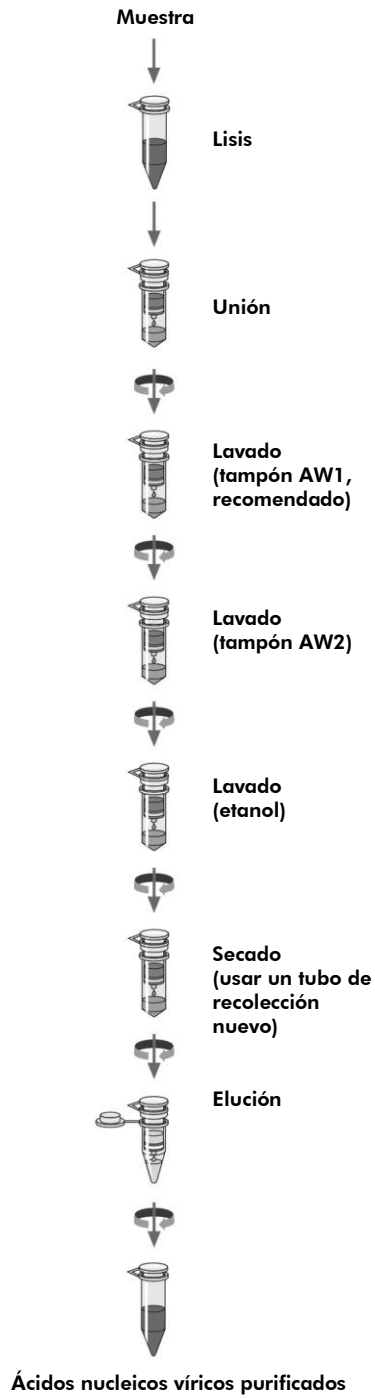
Para las aplicaciones posteriores que requieran un volumen inicial mayor, el volumen de elución se puede aumentar hasta 150 μ l. No obstante, un aumento del volumen de elución reducirá la concentración de ácidos nucleicos en el eluido.

El volumen de eluido recuperado puede ser hasta 5 μ l inferior al volumen del tampón de elución aplicado a la columna. Por ejemplo, un volumen de tampón de elución de 20 μ l producirá un eluido final de más de 15 μ l. El volumen del eluido recuperado depende de la naturaleza de la muestra.

El ácido nucleico eluido se recoge en tubos de elución de 1,5 ml (ET, suministrados). Se recomienda almacenar el ADN o el ARN a una temperatura de -20°C .

Los valores obtenidos a partir de ácido nucleico vírico aislado de muestras biológicas son normalmente inferiores a 1 μ g. Para la determinación de los valores se recomiendan métodos de amplificación cuantitativos. Si cuantifica ácidos nucleicos aislados mediante el protocolo QIAamp DSP Virus Spin, recuerde que en la muestra habrá una cantidad considerablemente mayor de ARN transportador que de ARN vírico.

Método del kit QIAamp DSP Virus



Totamente automatizable en el QIAcube

ARN transportador

El ARN transportador tiene dos funciones. En primer lugar, potencia la unión de los ácidos nucleicos víricos a la membrana QIAamp, especialmente si en la muestra hay pocas moléculas diana. En segundo lugar, la adición de grandes cantidades de ARN transportador reduce las posibilidades de degradación del ARN vírico en el caso poco frecuente de que las moléculas de ARN no se desnaturalicen por efecto de las sales caotrópicas y del detergente del tampón AL. Si no se añade ARN transportador al tampón AL, la recuperación del ARN o ADN vírico puede ser menor.

La eficacia de los diferentes sistemas de amplificación varía en función de la cantidad total de ácido nucleico presente en la reacción. Los eluidos de este kit contienen ácidos nucleicos víricos y ARN transportador y las cantidades de ARN transportador superarán ampliamente las cantidades de ácidos nucleicos víricos. Por consiguiente, la cantidad de eluido que se debe añadir a las amplificaciones posteriores debe calcularse en función de la cantidad de ARN transportador añadido. Para obtener los niveles máximos de sensibilidad en las reacciones de amplificación, puede ser necesario ajustar la cantidad de ARN transportador añadido al tampón AL.













Adición de controles internos

Si el protocolo QIAamp DSP Virus Spin se combina con un sistema de amplificación disponible en el mercado, puede ser necesario introducir un control interno en el proceso de purificación. El ARN o ADN de control interno se debe añadir junto con el ARN transportador al tampón de lisis. Para optimizar la eficacia de purificación, las moléculas de control interno deben tener una longitud superior a 200 nucleótidos, ya que las moléculas más pequeñas no se recuperan eficazmente.

Consulte las instrucciones del fabricante para determinar la concentración óptima. Si no se utiliza la concentración recomendada, la eficacia de amplificación puede ser menor.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Kit QIAamp DSP Virus Spin			
Referencia			61704
Número de preparaciones			50 [§]
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (Columnas QIAamp MinElute con tubos de lavado) (2 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lisis) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Tubos de elución) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado) (2 ml)		5 x 50
AL	Lysis Buffer* (Tampón de lisis)		33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (Tampón de lavado 1 [concentrado])		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (concentrate) (Tampón de lavado 2 [concentrado])		13 ml
AVE	Elution Buffer [†] (purple caps) (Tampón de elución [tapones púrpura])		4 x 2 ml
PS	Protease Solvent [†] (Disolvente de proteasa)		4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps) (ARN transportador [tapones rojos])		310 µg
QP	QIAGEN Protease [‡] (Proteasa QIAGEN)		1 vial
	Manual		1

*Contiene sales caotrópicas. Adopte las medidas de seguridad adecuadas y lleve guantes durante la manipulación. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Para más información, consulte la página 11.

[†] Contiene azida sódica como conservante.

[‡] Consulte "Preparación de reactivos y tapones", página 16.

[§] Si se automatiza el kit QIAamp DSP Virus Spin en el instrumento QIAcube, es posible que el instrumento procese menos de 50 muestras debido a los volúmenes muertos, a la evaporación y al consumo adicional de reactivos por el pipeteo automatizado. QIAGEN solo garantiza 50 preparaciones de muestras con el uso manual del kit QIAamp DSP Virus Spin.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (*safety data sheets*, SDS) que le facilitará el proveedor del producto.

- Etanol (96–100%)*
- Pipetas[†] y puntas de pipeta (para prevenir la contaminación cruzada, es altamente recomendable usar puntas de pipeta con filtro barrera contra aerosoles)
- Bloque calefactor[†] para lisar muestras a 56 °C
- Microcentrífuga[†] (con rotor para tubos de 1,5 ml y 2 ml)
- Agitadora vorticial
- Para muestras <200 µl: solución de NaCl al 0,9%

* No utilice alcohol desnaturalizado que contenga otras sustancias como p. ej. metanol o metiletilcetona.

[†] Para garantizar el correcto procesamiento de las muestras durante los análisis con el kit QIAamp DSP Virus Spin, se recomienda calibrar los instrumentos (p. ej., pipetas y bloques calefactores) según las recomendaciones de los fabricantes.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información consulte las hojas de datos de seguridad (*safety data sheets*, SDS) correspondientes. Dichas hojas están disponibles en línea en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, visualizar e imprimir la hoja de datos sobre seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN.



PRECAUCIÓN: NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los desechos que contengan tampón AL o tampón AW1.

El tampón AL y el tampón AW1 contienen clorhidrato de guanidina, susceptible de formar compuestos altamente reactivos cuando se combina con lejía. Si se derrama el líquido que contienen estos tampones, límpielo con detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada primero con detergente de laboratorio y agua y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1% (v/v).

Si los frascos de tampón están dañados o presentan fugas, use guantes y gafas protectoras cuando los elimine para evitar lesiones personales o a terceros.

QIAGEN no ha analizado los residuos líquidos generados por el procedimiento QIAamp DSP Virus Spin para determinar si contienen material residual infeccioso. La contaminación de los residuos líquidos con material residual infeccioso es altamente improbable, pero no se puede descartar por completo. Por consiguiente, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y manipularse y eliminarse de acuerdo con la normativa local sobre seguridad.

Las siguientes frases sobre los riesgos y la seguridad se aplican a los componentes del kit QIAamp DSP Virus Spin:

Las siguientes indicaciones de riesgo y advertencia hacen referencia a los componentes del QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Tampón AL



Contiene: clorhidrato de guanidina; ácido maleico. ¡Advertencia! Puede ser nocivo por ingestión o por inhalación. Causa irritación de la piel. Causa irritación grave de los ojos. Puede causar una reacción alérgica en la piel. Si la irritación ocular persiste: Acúdase a un médico. Quítese la ropa contaminada y lávese antes de volver a utilizarse. Úsense indumentaria/guantes protectores y protección para los ojos/la cara.

Tampón AW1



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo por ingestión o por inhalación. Causa irritación de la piel. Causa irritación grave de los ojos. Llámese a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico en caso de malestar. Elimínense el contenido y el recipiente en un centro autorizado para la eliminación de residuos. Quítese la ropa contaminada y lávese antes de volver a utilizarse. Úsense indumentaria/guantes protectores y protección para los ojos/la cara.

Proteasa QIAGEN



Contiene: Subtilisina. ¡Peligro! Causa irritación leve de la piel. Causa lesiones graves en los ojos. Puede causar síntomas alérgicos o asmáticos o dificultad para respirar si se inhala. Evítese respirar polvo/humo/gas/nebulizaciones/vapores/pulverizaciones. Elimínense el contenido y el recipiente en un centro autorizado para la eliminación de residuos. Si se presentan síntomas respiratorios: Llámese a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Lávense con cuidado con agua durante varios minutos. Si se llevan lentes de contacto, quítense si resulta fácil. Continúese lavando los ojos. EN CASO DE INHALACIÓN: En caso de dificultad para respirar, alejar a la víctima de la zona contaminada y mantenerla en reposo en una posición cómoda para respirar. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Úsense indumentaria/guantes protectores y protección para los ojos/la cara. Úsense protección respiratoria.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Las columnas QIAamp MinElute deben almacenarse a una temperatura de 2–8 °C en el momento de su recepción.

Todos los tampones pueden conservarse a temperatura ambiente (15–25 °C).

El ARN transportador liofilizado se puede guardar a temperatura ambiente (15–25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit. El ARN transportador solo puede disolverse en tampón AVE y una vez disuelto debe añadirse inmediatamente al tampón AL tal y como se describe en la página 16. Esta solución debe prepararse fresca, y a 2–8 °C es estable hasta 48 horas. Las porciones no utilizadas de ARN transportador disuelto en el tampón AVE deben congelarse en cantidades iguales a una temperatura entre –30 °C a –15 °C.

La proteasa QIAGEN (QP) liofilizada se puede conservar a temperatura ambiente (15–25 °C) hasta la fecha de caducidad del kit sin que su actividad se deteriore.

Una vez reconstituida en disolvente de proteasa (PS), la proteasa QIAGEN (QP) es estable hasta un año a 2–8 °C, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit. Evite conservar la solución madre de proteasa QIAGEN a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.

El tampón de lavado 1 (AW1) y el tampón de lavado 2 (AW2) reconstituidos son estables hasta un año si se conservan a temperatura ambiente (15–25 °C), pero solo hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

Almacenamiento y manipulación de las muestras

Una vez obtenido y centrifugado, el plasma o suero puede conservarse a 2–8 °C hasta seis horas. Para el almacenamiento a largo plazo se recomienda congelarlo en cantidades iguales a una temperatura de –20 °C o –80 °C. Las muestras de plasma o suero congeladas no deben descongelarse más de una vez. La congelación y descongelación repetidas desnaturaliza y precipita las proteínas, lo que provoca una disminución de los títulos víricos y, por consiguiente, de la cantidad de ácidos nucleicos víricos. Además, los crioprecipitados que se forman durante la congelación y descongelación obstruyen la membrana de la columna QIAamp MinElute. Si aparecen crioprecipitados, conviene eliminarlos mediante una centrifugación a aproximadamente 6800 x g durante tres minutos. El sobrenadante transparente debe aspirarse y procesarse inmediatamente sin romper el sedimento.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Después de recibir el kit, revise si los componentes presentan daños. Si los envases blíster o los frascos de tampón están dañados, póngase en contacto con el Servicio Técnico QIAGEN o con su distribuidor local. En caso de que se derrame líquido, consulte el capítulo “Advertencias y precauciones” (página 11). No utilice componentes del kit dañados, ya que esto podría perjudicar los resultados.
- Utilice siempre equipos libres de ARNasa.
- Cambie siempre las puntas de las pipetas cuando transfiera líquidos. Para minimizar la contaminación cruzada, recomendamos utilizar puntas de pipeta con filtro barrera contra aerosoles.
- Todos los pasos de centrifugado se realizarán a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Utilice siempre guantes desechables y compruebe periódicamente que no estén contaminados con material de muestra. Elimine los guantes si se contaminan.
- Para minimizar la contaminación cruzada, abra cada vez un único tubo.
- No utilice componentes de otros kit con los kit que esté usando actualmente, salvo que coincidan los números de lote.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Para garantizar la protección contra materiales potencialmente infecciosos, recomendamos que trabaje bajo condiciones de flujo de aire laminar hasta que se hayan lisado las muestras.
- Este kit solo debe ser utilizado por personas debidamente formadas en la realización de diagnósticos *in vitro* en laboratorios.

Manipulación de las columnas QIAamp MinElute

Dada la sensibilidad de las tecnologías de amplificación de los ácidos nucleicos, cuando se manipulen las columnas QIAamp MinElute deben adoptarse las siguientes medidas de precaución con el fin de evitar una posible contaminación cruzada entre las preparaciones de muestras:

- Aplique la muestra o la solución con cuidado a la columna QIAamp MinElute. Transfiera la muestra a la columna QIAamp MinElute procurando no humedecer el borde de la columna.
- Cambie las puntas de las pipetas cada vez que transfiera líquidos. Se recomienda utilizar puntas de pipeta con filtro barrera contra aerosoles.

- Evite tocar la membrana QIAamp MinElute con la punta de la pipeta.
- Tras haber realizado todos los pasos de agitación vorticial de pulsos, centrifugue brevemente los tubos para microcentrifugadora con el fin de eliminar las gotas del interior del tapón.
- Lleve guantes durante todo el procedimiento. Si los guantes entran en contacto con la muestra, cámbieselos inmediatamente.

Centrifugado

- Los tubos de lavado y de elución para todos los pasos de centrifugación se suministran junto con el kit.
- El centrifugado de las columnas QIAamp MinElute se debe realizar a aproximadamente 6000 x g para reducir el ruido de centrifugado. El centrifugado de las columnas QIAamp MinElute a velocidad máxima no afectará a los valores de ADN o ARN.
- Para el secado al final del procedimiento de lavado o para la elución, el centrifugado se deberá realizar a velocidad máxima.
- Todos los pasos de centrifugado deben realizarse a temperatura ambiente (15–25 °C).

Procesamiento de las columnas QIAamp MinElute en una microcentrifugadora

- Cierre la columna QIAamp MinElute antes de introducirla en la microcentrifugadora. Centrifugue del modo descrito.
- Extraiga la columna QIAamp MinElute y el tubo de lavado de la microcentrifugadora.
- Introduzca la columna QIAamp MinElute en un nuevo tubo de lavado. Elimine el filtrado y el tubo de lavado. Tenga en cuenta que el filtrado puede contener residuos peligrosos; elimínelo de la forma adecuada.
- Abra cada vez solo una columna QIAamp MinElute y evite generar aerosoles.

Para un procesamiento paralelo eficaz de varias muestras, recomendamos llenar una gradilla con tubos de lavado para poder transferir las columnas QIAamp MinElute después del centrifugado. Los tubos de lavado usados que contienen el filtrado se pueden eliminar y los nuevos tubos de lavado que contienen las columnas QIAamp MinElute se pueden introducir directamente en la microcentrifugadora.

Preparación de reactivos y tampones

■ Preparación del ARN

Cuando prepare ARN vírico, realice los pasos manuales del procedimiento con rapidez y lea el Apéndice en la página 25 antes de comenzar.

■ Preparación de la proteasa QIAGEN

Añada todo el contenido del vial de 4,4 ml de disolvente de proteasa (PS) al vial de proteasa QIAGEN (QP) liofilizada y mézclelo bien. Para evitar que se forme espuma, mézclelos invirtiendo el vial varias veces. Asegúrese de que la proteasa QIAGEN (QP) se haya disuelto completamente.



No añada proteasa QIAGEN (QP) directamente al tampón AL.*

Una vez reconstituida en disolvente de proteasa (PS), la proteasa QIAGEN (QP) es estable durante un año a 2–8 °C, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit. Evite conservar la solución madre de proteasa QIAGEN a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.

■ Adición del ARN transportador al tampón AL*

Añada 310 µl de tampón AVE al tubo con 310 µg de ARN transportador liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl. Disuelva bien el ARN transportador, repártalo en cantidades iguales adecuadas y guárdelas a una temperatura de entre –25 °C y –15 °C. No congele y descongele las porciones de ARN transportador más de tres veces.



Tenga en cuenta que el ARN transportador no se disuelve en el tampón AL. Debe disolverse primero en el tampón AVE y añadirse después al tampón AL.

Calcule el volumen necesario de mezcla de tampón AL–ARN transportador por lote de muestras seleccionando en la Tabla 1, página 17, el número de muestras que se van a procesar simultáneamente. Para un número de muestras mayor se pueden calcular los volúmenes mediante las fórmulas que se indican a continuación.

$$n \times 0,22 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 28 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

donde: **n** = número de muestras que se van a procesar a la vez

y = volumen calculado de tampón AL

z = volumen de ARN transportador–tampón AVE que se debe añadir al tampón AL

* Contiene sales caotrópicas. Adopte las medidas de seguridad de laboratorio adecuadas y lleve guantes durante la manipulación. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 11 para obtener información sobre la seguridad.

Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo diez veces. Para evitar la formación de espuma, no realice una agitación vorticial.

Tabla 1. Volúmenes (Vol.) de tampón AL y de mezcla de ARN transportador–tampón AVE necesarios para números específicos (N.º) de muestras para el procedimiento QIAamp DSP Virus Spin


N.º de muestras	Vol. tampón AL (ml)	Vol. ARN transportador AVE (μ l)	N.º de muestras	Vol. tampón AL (ml)	Vol. ARN transportador AVE (μ l)
1	0,22 ml	6,2 μ l	13	2,86 ml	80,1 μ l
2	0,44 ml	12,3 μ l	14	3,08 ml	86,3 μ l
3	0,66 ml	18,5 μ l	14	3,30 ml	92,4 μ l
4	0,88 ml	24,6 μ l	16	3,52 ml	98,6 μ l
5	1,10 ml	30,8 μ l	17	3,74 ml	104,7 μ l
6	1,32 ml	37,0 μ l	18	3,96 ml	110,9 μ l
7	1,54 ml	43,1 μ l	19	4,18 ml	117,0 μ l
8	1,76 ml	49,3 μ l	20	4,40 ml	123,2 μ l
9	1,98 ml	55,4 μ l	21	4,62 ml	129,4 μ l
10	2,20 ml	61,6 μ l	22	4,84 ml	135,5 μ l
11	2,42 ml	67,8 μ l	23	5,06 ml	141,7 μ l
12	2,64 ml	73,9 μ l	24	5,28 ml	147,8 μ l



El procedimiento de preparación de la muestra está optimizado para 5,6 μ g de ARN transportador por muestra. Si ha comprobado que para su sistema de amplificación es preferible una menor cantidad de ARN transportador, transfiera solo la cantidad necesaria de ARN transportador disuelto a los tubos que contienen el tampón AL. Añada por cada microgramo de ARN transportador necesario por preparación 5 μ l de ARN transportador disuelto en tampón AVE por mililitro de tampón AL. El uso de menos de 5,6 μ g de ARN transportador por muestra debe validarse para cada tipo de muestra y de ensayo posterior concreto.


Tampón AW1*

Añada 25 ml de etanol (96–100%) al frasco que contiene 19 ml de tampón AW1 concentrado, como se describe en el frasco. Marque la casilla de verificación de la etiqueta para indicar que se ha añadido etanol. Conserve el tampón AW1 reconstituido a temperatura ambiente (15–25 °C). El tampón AW1 reconstituido es estable hasta un año si se conserva a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit.

 Antes de iniciar el procedimiento, agite el frasco para mezclar el tampón AW1 reconstituido.

Tampón AW2†

Añada 30 ml de etanol (96–100%) al frasco que contiene 13 ml de tampón AW2 concentrado, como se describe en el frasco. Marque la casilla de verificación de la etiqueta para indicar que se ha añadido etanol. Conserve el tampón AW2 reconstituido a temperatura ambiente (15–25 °C). El tampón AW2 reconstituido es estable hasta un año si se conserva a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit.

 Antes de iniciar el procedimiento, agite el frasco para mezclar el tampón AW2 reconstituido.

Elución de ácidos nucleicos

Deje que el tampón de elución se equilibre a temperatura ambiente antes de aplicarlo a la columna.

* Contiene sales caotrópicas. Adopte las medidas de seguridad de laboratorio adecuadas y lleve guantes durante la manipulación. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 11 para obtener información sobre la seguridad.

† Contiene azida sódica como conservante.

Protocolo: purificación de ácidos nucleicos víricos plasma y suero

Este protocolo sirve para purificar ácidos nucleicos víricos a partir de 200 μ l de plasma o suero mediante el kit QIAamp DSP Virus Spin y una microcentrifugadora. Para la purificación automatizada mediante el kit QIAamp DSP Virus Spin y el QIAcube, consulte el manual de usuario del QIAcube (*QIAcube User Manual*) y la hoja de protocolo correspondiente.

Cuestión importante antes de comenzar


- Todos los pasos de centrifugado se realizarán a temperatura ambiente (15–25 °C).

Antes de comenzar

- Deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Para la elución en el paso 14, deje que el tampón AVE se equilibre a temperatura ambiente.
- Para el paso 4, ajuste un bloque calefactor a 56 °C \pm 3 °C.
- Asegúrese de que el tampón AW1, el tampón AW2 y la proteasa QIAGEN (QP) se han preparado según las instrucciones de las páginas 16–18.
- Añada ARN transportador reconstituido en tampón AVE al tampón AL según las instrucciones de la página 16.

Procedimiento

1. Introduzca 25 μ l de proteasa QIAGEN (QP) en un tubo de lisis (LT).

 Consulte “Preparación de reactivos y tampones” en la página 16 para obtener información sobre la resuspensión de la proteasa QIAGEN (QP) en disolvente de proteasa.

2. Añada 200 μ l de plasma o suero al tubo de lisis (LT).

Si el volumen de la muestra es inferior a 200 μ l, añada una cantidad adecuada de solución de cloruro sódico al 0,9% hasta obtener un volumen total de proteasa y de muestra de 225 μ l.

3. Añada 200 μ l de tampón AL (que contiene 28 μ g/ml de ARN transportador). Cierre el tapón y mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante un mínimo de 15 segundos.

Para que la lisis sea eficaz, es esencial que la muestra y el tampón AL se mezclen bien hasta obtener una solución homogénea.



No añada proteasa QIAGEN (QP) directamente al tampón AL.

4. **Incube a 56 °C ± 3 °C durante 15 minutos (± 1 minuto) en un bloque calefactor.**
5. **Centrifugue brevemente el tubo de lisis (LT) para eliminar las gotas del interior del tapón.**
6. **Añada 250 µl de etanol (96–100%) a la muestra, cierre el tapón y mezcle bien mediante agitación vorticial de pulsos durante un mínimo de 15 segundos. Incube el lisado junto con el etanol durante cinco minutos (± 30 segundos) a temperatura ambiente (15–25 °C).**



Si la temperatura ambiente es superior a los 25 °C, se recomienda enfriar el etanol con hielo antes de añadirlo al lisado.

7. **Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior del tapón.**
8. **Aplique con cuidado todo el lisado obtenido en el paso 7 sobre la columna QIAamp MinElute procurando no humedecer el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante un mínimo de un minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml y elimine el tubo de lavado (WT) que contiene el filtrado.**

Si el lisado todavía no ha atravesado completamente la columna tras el centrifugado, repita el centrifugado a una velocidad mayor hasta que la columna QIAamp MinElute esté vacía.

9. **Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 µl de tampón AW1 procurando no humedecer el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante un mínimo de un minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml y elimine el tubo de lavado (WT) que contiene el filtrado.**
10. **Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 µl de tampón AW2 procurando no humedecer el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante un mínimo de un minuto. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado limpio de 2 ml y elimine el tubo de lavado que contiene el filtrado.**
11. **Abra con cuidado la columna QIAamp MinElute y añada 500 µl de etanol (96–100%) procurando no humedecer el borde. Cierre el tapón y centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante un mínimo de un minuto. Elimine el tubo de lavado que contiene el filtrado.**

El arrastre de etanol hacia el eluido puede causar problemas en las aplicaciones posteriores. Algunos rotores de centrifugadora pueden vibrar

durante la deceleración y provocar que el líquido que contiene etanol entre en contacto con la columna QIAamp MinElute. También puede producirse el contacto del líquido con la columna QIAamp MinElute al retirar la columna QIAamp MinElute y el tubo de lavado del rotor.

12. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado (WT) limpio de 2 ml. Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20 000 x g) durante tres minutos (\pm 30 segundos) para secar completamente la membrana.

13. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un nuevo tubo de lavado (WT) de 2 ml, abra la tapa e incube el conjunto a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante tres minutos (\pm 30 segundos) para secar completamente la membrana.

Este paso sirve para evaporar cualquier residuo de líquido.

14. Introduzca la columna QIAamp MinElute en un tubo de elución (ET) y elimine el tubo de lavado con el filtrado. Abra con cuidado la tapa de la columna QIAamp MinElute y aplique de 20 a 150 μl de tampón AVE al centro de la membrana. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante cinco minutos. Centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20 000 x g) durante un mínimo de un minuto.



Asegúrese de que el tampón de elución esté equilibrado a temperatura ambiente. Si la elución se realiza en volúmenes pequeños ($<50\text{ }\mu\text{l}$), el tampón de elución se debe dispensar sobre el centro de la membrana para permitir la elución completa del ARN y ADN unidos.

El volumen de elución es flexible y se puede adaptar según las necesidades de la aplicación posterior. Recuerde que el volumen de eluido recuperado será aproximadamente 5 μl menor que el volumen del tampón de elución aplicado a la columna.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit QIAamp DSP Virus Spin se analiza con respecto a especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

El rendimiento del sistema se ha determinado mediante muestras de plasma y de suero para el aislamiento de ácidos nucleicos víricos.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no haya sido avalado por los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Para reducir al mínimo el riesgo de un efecto negativo sobre los resultados diagnósticos, para las aplicaciones posteriores deben utilizarse controles adecuados. Para validaciones adicionales se recomiendan las directrices de la International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) detalladas en ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros hallazgos clínicos o de laboratorio.

Características de rendimiento

Consulte www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance para informarse sobre las características de rendimiento del kit QIAamp DSP Virus Spin.

Bibliografía

QIAGEN mantiene en línea una amplia base de datos actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan productos QIAGEN. Las opciones integrales de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

Símbolos



<N>

Contiene suficientes reactivos para <N> preparaciones de muestras



Consultar instrucciones de uso



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Número de catálogo



Nota importante



Número de lote



Número de material



Componentes



Volumen



Limitación de temperatura



Fabricante



A su recepción



Abrir a la entrega; guardar las columnas QIAamp MinElute a 2–8 °C



Anotar la fecha actual tras añadir etanol al frasco



Añadir



Contiene

LYOPH	Liofilizado
RCNS	Reconstituir en
EtOH	Etanol
GuHCl	Clorhidrato de guanidina
MALEIC ACID	Acido maleico
SUBT	Subtilisina
GTIN	Número mundial de artículo comercial
→	Conduce a

Información de contacto

En QIAGEN nos enorgullecemos de la calidad y de la disponibilidad de nuestro soporte técnico. Nuestros departamentos de Servicio Técnico cuentan con científicos expertos con amplia experiencia en los aspectos prácticos y teóricos de las tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular y en el uso de los productos QIAGEN. Si desea formular cualquier pregunta o tiene dificultades con el kit QIAamp DSP Virus Spin o con los productos QIAGEN en general, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Los clientes de QIAGEN son una importante fuente de información sobre los usos avanzados o especializados de nuestros productos. Esta información es de utilidad para otros científicos además de para los investigadores de QIAGEN. Por este motivo, le animamos a ponerse en contacto con nosotros si tiene cualquier sugerencia sobre el rendimiento de nuestros productos o sobre nuevas aplicaciones y técnicas.

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visítenos en nuestro Centro de Servicio Técnico en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de servicio técnico de QIAGEN o distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Alemania

Apéndice

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que en general no requieren cofactores para funcionar. Dado que las ARNsas son difíciles de inactivar y que tan solo se necesitan minúsculas cantidades para que destruyan el ARN, no utilice ningún material de plástico ni de vidrio sin eliminar primero una posible contaminación con ARNasa. Deben tomarse precauciones para evitar introducir involuntariamente ARNasas en la muestra de ARN durante o después del procedimiento de aislamiento. Para crear y mantener un entorno libre de ARNasa, durante el tratamiento previo y el uso de los recipientes desechables y no desechables y de las soluciones deben adoptarse las siguientes medidas de precaución mientras se trabaja con el ARN.

Manipulación general

Cuando trabaje con ARN deberá utilizar siempre técnicas microbiológicas asépticas adecuadas. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más comunes de contaminación por ARNasa. Lleve siempre guantes de látex o de vinilo cuando manipule los reactivos y las muestras de ARN para evitar la contaminación por ARNasa procedente de la piel o del polvo del equipo de laboratorio. Cámbiese frecuentemente los guantes y mantenga los tubos cerrados.


Materiales plásticos no desechables

Los materiales plásticos no desechables se deben tratar antes del uso para garantizar que no presentan ARNasa. Los materiales plásticos se deben lavar meticulosamente con 0,1 M de NaOH,* 1 mM de EDTA* y enjuagar a continuación con agua sin ARNasa* (consulte "Soluciones", página 26). Alternativamente, el material plástico resistente al cloroformo puede lavarse con cloroformo* para inactivar las ARNasas.

* Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (safety data sheets, SDS) que le facilitará el proveedor del producto.

Materiales de vidrio

Antes de usarse, los materiales de vidrio deben tratarse para garantizar que están libres de ARNasa. Antes de usarse, los materiales de vidrio utilizados para trabajar con ARN deben limpiarse con detergente, enjuagarse meticulosamente y calentarse en el horno a una temperatura superior a 240 °C durante cuatro horas o más (si se prefiere, incluso durante toda la noche). Solo el autoclave no inactivará totalmente muchas ARNasas. El calentamiento en el horno inactivará las ribonucleasas y garantizará la eliminación de otros ácidos nucleicos (como el ADN plásmido) que queden en la superficie del material de vidrio. Alternativamente puede tratar los materiales de vidrio con DEPC* (dietilpirocarbonato). Cubra los materiales de vidrio con DEPC al 0,1% en agua durante toda la noche (12 horas) a una temperatura de 37 °C y a continuación introdúzcalos en un autoclave o caliéntelos a 100 °C durante 15 minutos para eliminar los posibles restos de DEPC.

 Las ARNasas deben eliminarse de los tubos Corex® mediante un tratamiento con DEPC y no calentándolos. De este modo se reducirá la tasa de fallos para este tipo de tubos durante el centrifugado.

Tanques de electroforesis

Los tanques de electroforesis se deben limpiar con una solución de detergente (p. ej. SDS al 0,5%)*, enjuagar con agua, secar con etanol*[†] y llenar a continuación con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%.* Después de 10 minutos a temperatura ambiente, los tanques de electroforesis se deben enjuagar meticulosamente con agua libre de ARNasas.

Soluciones


Las soluciones (agua y otras soluciones) se deben tratar con DEPC al 0,1%. El DEPC reaccionará con las aminas primarias y no puede utilizarse directamente para tratar los tampones Tris. El DEPC es altamente inestable en presencia de tampones Tris y se descompone rápidamente en etanol y CO₂. Cuando prepare tampones Tris, en primer lugar trate el agua con DEPC y a continuación disuelva el Tris para preparar el tampón adecuado.

* Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (safety data sheets, SDS) que le facilitará el proveedor del producto.

[†] Los plásticos utilizados para determinados tanques de electroforesis no son resistentes al etanol. Preste la atención debida y consulte las instrucciones del proveedor.

El DEPC es un inhibidor potente, pero no absoluto, de las ARNasas. Se utiliza habitualmente a una concentración del 0,1% para inactivar las ARNasas en materiales de vidrio o de plástico o para preparar soluciones y agua libres de ARNasas. El DEPC inactiva las ARNasas por medio de una modificación covalente. Las cantidades mínimas de DEPC modificarán los residuos de purinas por medio de una carbetoxilación. El ARN carbetoxilado es convertido con una eficacia muy baja en sistemas libres de células. No obstante, su capacidad de formar híbridos de ADN:ARN o ARN:ARN no se ve seriamente afectada, salvo que se haya modificado una gran fracción de residuos de purinas. El DEPC residual siempre se debe eliminar de las soluciones o de los recipientes en el autoclave o calentándolos a 100 °C (± 3 °C) durante 15 minutos (± 1 minuto).

Añada 0,1 ml de DEPC a 100 ml de la solución que desee tratar y agítela enérgicamente para disolver el DEPC o deje incubar la solución durante más de 12 horas a 37 °C (± 3 °C). Introdúzcala en el autoclave durante 15 minutos (± 1 minuto) para eliminar cualquier resto de DEPC. Puede ser recomendable analizar las fuentes de agua con respecto a la presencia de ARNasas contaminantes, dado que muchas fuentes de agua destilada no presentan actividad ARNasa.

 La ARNasa no se elimina de los tampones del kit QIAamp DSP Virus Spin mediante un tratamiento con DEPC y, por consiguiente, éstos no presentan una contaminación por DEPC.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.).

No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc. que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.

Acuerdo de licencia limitada para el kit QIAamp DSP Virus Spin

La utilización de este producto implica la aceptación de los siguientes términos por parte de cualquier comprador o usuario del kit QIAamp DSP Virus Spin:

1. El kit QIAamp DSP Virus Spin puede ser utilizado exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual del kit QIAamp DSP Virus Spin* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual del kit QIAamp DSP Virus Spin* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Al margen de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las especificadas expresamente.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de garantía limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

