

Instrucciones de uso
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

INVITEK
diagnostics



Lengua: ES



REF 1060100200
1060100300



50 preparaciones
250 preparaciones



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Germany

Notas importantes

Le agradecemos que haya comprado el **InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** de Invitek Diagnostics.

El producto se utiliza para el aislamiento manual de ARN total a partir de distintas muestras humanas, como cultivos celulares, tejidos y sangre venosa, con la tecnología de columna de centrifugación.

¡ADVERTENCIA! Una manipulación inadecuada y el uso con fines distintos del previsto pueden causar daños y situaciones peligrosas. Por este motivo, le rogamos que lea detenidamente estas instrucciones de uso y que las respete estrictamente. Téngalas siempre a mano. Cumpla las instrucciones de seguridad para evitar daños personales.

Todas las versiones de las instrucciones de uso se pueden descargar desde nuestro sitio web o se pueden solicitar a través de: www.invitek.com

Contacto:

Soporte técnico:

techsupport@invitek.com

ALEMANIA

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín, Alemania

+ 49 30 9489 2908

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6, 3460-070 Tondela, Portugal

+351 232 817 817

© 2023 Invitek Molecular. Todos los derechos reservados.

Este kit es conforme con el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Sin embargo, no puede usarse para el diagnóstico in vitro en países donde no se reconozca el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

Marcas comerciales: InviSorb®, PSP®, InviMag® y Eppendorf®. Todas las marcas registradas, marcas comerciales, etc. que se usan en este documento están protegidas por la ley, aunque no estén identificadas explícitamente como tales.

InviGenius®, InviMag®, InviSorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP® y RTP® son marcas comerciales registradas de Invitek Molecular GmbH.

Tabla de contenido

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Instrucciones de seguridad | 3 |
| 2. | Información del producto..... | 4 |
| 2.1 | Contenido del kit..... | 4 |
| 2.2 | Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario | 5 |
| 2.3 | Almacenamiento, apariencia y caducidad | 5 |
| 2.4 | Uso previsto..... | 6 |
| 2.5 | Especificaciones e información del producto..... | 6 |
| 2.6 | Principio y procedimiento | 7 |
| 3. | Extracción de ácido nucleico con el InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit..... | 8 |
| 3.1 | Antes de iniciar un protocolo | 8 |
| 3.2 | Toma de muestras y almacenamiento del material inicial..... | 9 |
| 3.3 | Preparación de los materiales iniciales..... | 10 |
| 3.3.1 | Cultivo celular..... | 10 |
| 3.3.2 | Muestras de tejido..... | 11 |
| 3.3.3 | Tejidos incluidos en parafina tratados con formalina (tiras de parafina) | 12 |
| 3.3.4 | Sangre..... | 12 |
| 3.4 | Protocolo resumido del InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit..... | 13 |
| 3.5 | Protocolo 1: Extracción de ARN total de cultivo celular | 15 |
| 3.6 | Protocolo 2: Extracción de ARN total de tejido..... | 17 |
| 3.7 | Protocolo 3: Extracción de ARN total de sangre entera..... | 18 |
| 3.8 | Protocolo complementario (solo para investigación): Aislamiento simultáneo de ADN y ARN..... | 19 |
| 3.9 | Protocolo complementario (solo para investigación): Digestión de ADN en el RNA-RTA Spin Filter | 22 |
| 3.10 | Protocolo complementario (solo para investigación): Extracción de ARN de la fase acuosa de Trizol | 23 |
| 3.11 | Protocolo complementario (solo para investigación): Extracción de ARN de muestras de líquido, como mezclas de reacción o fluidos corporales..... | 24 |
| 4. | Apéndice..... | 26 |
| 4.1 | Solución de problemas..... | 26 |
| 4.2 | Garantía..... | 27 |
| 4.3 | Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas..... | 27 |
| 4.4 | Otros documentos e información complementaria | 28 |
| 4.5 | Información para pedidos | 28 |

1. Instrucciones de seguridad

Asegúrese de que todas las personas que usen este producto hayan sido instruidas sobre la seguridad general en laboratorios y conozcan la información de seguridad que contiene el presente documento.

- Al manipular sustancias químicas se debe usar siempre vestimenta de protección, guantes desechables y gafas de seguridad.
- Cambie siempre la punta de las pipetas para transferir distintos líquidos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta de barrera para aerosoles para evitar la contaminación cruzada.
- No reutilice los productos consumibles.
- Deseche los guantes si resultan contaminados.
- No combine componentes de distintos kits, salvo que tengan el mismo número de lote.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Para minimizar el riesgo de infecciones con materiales potencialmente infecciosos, se recomienda trabajar con un flujo de aire laminar hasta que se hayan lisado las muestras.

Antes de manipular sustancias químicas, lea todas las fichas de datos de seguridad (FDS) aplicables y asegúrese de que las comprende. Puede encontrarlas en Internet, en www.invitek.com.

Deseche los residuos del kit y los fluidos residuales de conformidad con la reglamentación de su país (consulte la FDS). Invitek Molecular no ha verificado la presencia de materiales infecciosos residuales en los residuos líquidos que genera el kit. Si bien es muy improbable que los residuos líquidos se contaminen con materiales infecciosos residuales, no puede excluirse por completo. Por ese motivo, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y deben manipularse y desecharse de conformidad con el reglamento local en materia de seguridad.

A continuación se indican las frases de riesgo y seguridad de la Comunidad Europea en relación con los componentes del **InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** al que se aplican:

Lysis Solution TR



Peligro

H302-H318-H332-H412-P280-
P305+P351+P338-EUH032

Wash Buffer R1



Advertencia

H302-H332-H412-P280-
P305+P351+P338-EUH032

Buffer EL concentrate



Advertencia

H315-P280-P305+P351+P338

H302: Nocivo en caso de ingestión.

H315: Provoca irritación cutánea.

H318: Provoca lesiones oculares graves.

H332: Nocivo en caso de inhalación.

H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando

EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

Puede solicitar información médica de emergencia las 24 horas a través de infotrac, www.infotrac.net:

Fuera de EE. UU.: 1 – 352 – 323 – 3500
 En EE. UU.: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Información del producto

2.1 Contenido del kit

| | 50 purificaciones | 250 purificaciones |
|---|---|--|
| Ref. catálogo | 1060100200 | 1060100300 |
| Buffer EL concentrate (concentrado de tampón EL) | 30 ml/frasco | 4 x 30 ml/frasco |
| Lysis Solution TR (solución de lisis TR) | 50 ml/frasco | 250 ml/frasco |
| Zirconia Beads I (perlas de zirconio I) | 1 vial | 5 viales |
| Zirconia Beads II (perlas de zirconio II) | 1 vial | 5 viales |
| Wash Buffer R1 (tampón de lavado R1) | 20 ml/frasco (volumen final 40 ml) | 80 ml/frasco (volumen final 160 ml) |
| Wash Buffer R2 (tampón de lavado R2) | 2 x 12 ml/frasco (volumen final 2 x 60 ml) | 2 x 40 ml/frasco (volumen final 2 x 200 ml) |
| Elution Buffer R (tampón de elución R) | 15 ml/frasco | 30 ml/frasco |
| DNA-Binding Spin Filter (filtro de centrifugación de unión de ADN) | 50 unidades | 5 x 50 unidades |
| RNA-RTA Spin Filter Set (juego de filtros de centrifugación RTA de ARN) | 50 juegos | 5 x 50 juegos |
| 2.0 ml Receiver Tubes (tubos receptores de 2,0 ml) | 2 x 50 unidades | 10 x 50 unidades |
| RTA Receiver Tubes (tubos receptores RTA) | 50 unidades | 5 x 50 unidades |
| 1.5 ml Receiver Tubes (tubos receptores de 1,5 ml) | 50 unidades | 5 x 50 unidades |
| Short protocol | 1 folleto | 1 folleto |

2.2 Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario

Equipo de laboratorio:

- Microcentrífuga (*todos los protocolos se han validado con una centrífuga 5415 D Eppendorf*)
- Opcional: centrífuga para tubos de 15 o 50 ml
- Agitador térmico (37 °C - 95 °C)
- Probeta graduada (250 ml)
- 1 frasco vacío (1 l) para la dilución del Buffer EL (es necesario para las muestras de sangre)
- Guantes desechables
- Pipeta y puntas para pipeta, sin ARNasa
- Mezclador de vórtice
- Tubos de reacción (1,5 ml, 2,0 ml y 15 ml)

Líquidos y disolventes:

- DNase/RNase free water
- 96 - 100 % etanol (no desnaturalizado)
- Etanol al 70 % (no desnaturalizado)
- Ditioneitol (DTT)
- Opcional: β-mercaptoetanol
- Opcional (para tiras de parafina): octano o xileno, Proteinase K, RNase free TE buffer (50 mM de TrisCl pH 8 con 10 mM de EDTA)

2.3 Almacenamiento, apariencia y caducidad

Caducidad: Todos los tampones y componentes del kit deben almacenarse a temperatura ambiente (salvo que se indique lo contrario), respetando el plazo de caducidad indicado en la etiqueta del envase exterior del kit.

Una vez abiertos, tanto los componentes individuales del kit como los preparados antes del primer uso deben usarse antes de 3 meses.

Antes de cada uso, asegúrese de que todos los componentes estén a temperatura ambiente. Si en las soluciones se forman precipitados como consecuencia de la temperatura, disuélvalos con mucho cuidado aplicando calor (hasta 30 °C).

La temperatura ambiente (TA) se define como el intervalo de temperatura entre 15 y 30 °C.

Wash Buffer R1 y Wash Buffer R2: después de añadir etanol, deben cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.

Buffer EL: una vez diluido con DNase/RNase free water, el Buffer EL debe almacenarse a 2-8 °C.

1 M DTT Solution (no incluida): debe almacenarse a -20 °C para evitar daños por oxidación. En esas condiciones, la 1 M DTT Solution permanece estable durante 12 meses. Se recomienda dividir la 1 M DTT Solution en partes alícuotas para minimizar el número de ciclos de congelación y descongelación.

2.4 Uso previsto

El InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit es un kit de extracción de ácido nucleico que utiliza la tecnología de columna de centrifugación para el aislamiento y la purificación de ARN total.

El kit puede usarse para distintos tipos de muestras humanas, como cultivos celulares frescos o congelados, tejidos/materiales biopsiados frescos o congelados, tejidos incluidos en parafina tratados con formalina, sangre entera venosa fresca anticoagulada con EDTA o citrato, capa leucocitaria y leucocitos.

El producto no está diseñado para el uso con muestras de sangre heparinizada ni con muestras de sangre congelada. El producto está destinado exclusivamente a personal profesional, como técnicos de laboratorio, personal médico y biólogos formados en técnicas de biología molecular y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

2.5 Especificaciones e información del producto

| Material inicial | Rendimiento | Calidad | Tiempo |
|---|--|------------------------------------|---|
| Cultivos celulares, hasta 1×10^7 células/ml | Hasta 80 µg de ARN total P. ej. 10-15 µg de ARN total de 5×10^5 fibroblastos NIH 3T3 | A_{260} : A_{280} 1,8 – 2,3 | aprox. 20-25 min (lisis incluida) |
| Hasta 1,5 ml de sangre entera fresca (estabilizada con citrato/EDTA, pero <u>no</u> con heparina) | Hasta 1-5 µg de ARN total/ml de sangre entera (según el recuento de leucocitos) | A_{260} : A_{280} 1,8 – 2,3 | aprox. 45 min (incluido el tratamiento con Buffer EL) |
| Hasta 20 mg de tejido fresco o congelado | Hasta 80 µg de ARN total (según el tipo y la cantidad de material inicial) | A_{260} : A_{280} 1,8 – 2,3 | aprox. 15-20 min (sin la homogeneización de la muestra) |

El rendimiento y la calidad de los ácidos nucleicos purificados dependen del tipo de muestra, el origen de la muestra, el transporte, el almacenamiento, la edad y, en el caso de las muestras de sangre, también el recuento de leucocitos.

Para la purificación de ARN de muestras celulares, el recuento de células no debe superar 1×10^7 células/ml. Un recuento de células más alto puede contaminar el ADN, reducir la pureza del ARN y obstruir el RTA Spin Filter.

Para la purificación de ARN de sangre entera venosa, el kit está validado para recuentos de leucocitos desde 3×10^6 hasta 1×10^7 células/ml. La sangre entera de un adulto sano contiene aproximadamente 4×10^6 – 1×10^7 leucocitos/ml de volumen de la muestra. Un recuento celular excesivamente alto puede causar la obstrucción del RTA Spin Filter, lo que tendría efectos contraproducentes en el proceso de purificación. Por este motivo, se recomienda tener en cuenta el volumen de entrada de la muestra durante la implementación de nuestro protocolo de diagnóstico *in vitro*. Puesto que la extracción de la muestra se basa en los leucocitos intactos, no se puede usar sangre congelada, ya que el proceso de congelación daña los leucocitos.

Para la purificación de ARN de tejidos incluidos en parafina tratados con formalina, el rendimiento y la calidad dependen de varios factores, como el tipo y la edad de la muestra, su preparación y las secciones utilizadas para la extracción. Para obtener más información sobre la preparación de la muestra y el tratamiento previo, consulte los capítulos 3.2 y 3.3.

El kit contiene varios protocolos complementarios (solo para investigación) para el aislamiento simultáneo de ADN y ARN, la digestión de ADNasa en el RNA-RTA Spin Filter, la limpieza del Trizol de la muestra y la extracción de ARN a partir de muestras de líquido, como mezclas de reacción, saliva u otros fluidos corporales. Todos los protocolos complementarios son solo para investigación y no están cubiertos por la certificación IVD de la CE.

Aplicaciones posteriores:

El rendimiento y la calidad del ARN total aislado suelen ser adecuados para numerosas aplicaciones de diagnóstico molecular, como técnicas PCR, NGS y métodos de hibridación. Las aplicaciones posteriores deben realizarse siguiendo las especificaciones del fabricante relevante.

2.6 Principio y procedimiento

1. Tratamiento previo de la muestra

Como preparación para la lisis, hay que realizar un tratamiento previo específico para la muestra. En el caso de las células, por ejemplo, hay que retirar el medio de cultivo, y hay que disrupir y homogeneizar completamente las células del tejido. Para los tejidos incluidos en parafina tratados con formalina, se requiere un tratamiento previo con octano o xileno.

Para las muestras de sangre, se requiere un tratamiento con Buffer EL. La sangre de una persona sana contiene unas 1000 veces más eritrocitos que leucocitos, pero solo estos últimos contienen ARN. El Buffer EL tiene un efecto hipotónico y causa la lisis osmótica de los eritrocitos. Al añadir el tampón a la muestra de sangre, se produce un lisado selectivo de los eritrocitos, mientras que los leucocitos permanecen intactos.

2. Muestras lisadas

Para la lisis de la muestra, las muestras se mezclan con Lysis Solution TR con DTT. Tenga en cuenta que, antes de cada uso, la Lysis Solution TR debe mezclarse primero con el DTT, que no se incluye en el kit. La Lysis Solution TR contiene una suspensión con partículas portadoras minerales que unen eficazmente el ADN durante la lisis celular. El DTT se añade para inactivar las ARNasas mediante el establecimiento de puentes disulfuro intramoleculares. Debido a la fuerza desnaturadora de la lisis, las células se descomponen rápidamente y, al mismo tiempo, se inactivan las ARNasas.

3. Unión y extracción de ADN

Las partículas portadoras minerales cargadas con ADN de la Lysis Solution TR con DTT se extraen por pelletizado o por centrifugación con el DNA-Binding Spin Filter, según el material inicial y el protocolo correspondiente de extracción de ácido nucleico.

Generalmente, no es necesario digerir la ADNasa para la extracción del ADN genómico. Sin embargo, puede realizarse una digestión de ADNasa para las aplicaciones de ARN más sensibles a la contaminación por ADN. Para obtener información sobre la digestión de ADNasa durante la purificación del ARN, consulte el protocolo complementario 3.9. Como alternativa, es posible realizar una digestión tras la purificación en el eluido.

4. Unión del ARN total

Tras la extracción del ADN genómico, el ARN total se encuentra en el sobrenadante. Para ajustar las condiciones de unión del ARN, se añade etanol al 96-100 % y la mezcla se transfiere al RNA-RTA Spin Filter Set. El RNA se une a la membrana del Spin Filter.

5. Lavado para eliminar la contaminación residual

La contaminación se lava eficazmente con Wash Buffer R1 y R2, mientras que el ARN permanece unido a la membrana.

6. Elución del ARN

El ARN total se eluye del RNA-RTA Spin Filter usando 30-100 µl de Elution Buffer R.

3. Extracción de ácido nucleico con el InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

3.1 Antes de iniciar un protocolo

La primera vez que utilice el kit, asegúrese de que se preparen todos los tampones y reactivos siguiendo las indicaciones:

| |
|--|
| Preparación de los tampones antes del primer uso: 50 preparaciones |
| Lysis Solution TR; prepare siempre la cantidad fresca necesaria antes de usarla (vea también más abajo): Coloque el volumen necesario en un vial separado y añada 1/100 de volumen de 1 M DTT. |
| Wash Buffer R1: Añada 20 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. |
| Wash Buffer R2: Añada 48 ml de etanol al 96-100 % a cada frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. |
| Buffer EL concentrate: Coloque 970 ml de DNase/RNase free water en un frasco vacío y limpio. Añada la cantidad total (30 ml) de Buffer EL concentrate y mezcle bien. Etiquete el frasco como Buffer EL y almacene el Buffer EL a 2-8 °C. |
| Preparación de los tampones antes del primer uso: 250 preparaciones |
| Lysis Solution TR; prepare siempre la cantidad fresca necesaria antes de usarla (vea también más abajo): Coloque el volumen necesario en un vial separado y añada 1/100 de volumen de 1 M DTT. |
| Wash Buffer R1: Añada 80 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. |
| Wash Buffer R2: Añada 160 ml de etanol al 96-100 % a cada frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. |
| Buffer EL concentrate: Coloque 970 ml de DNase/RNase free water en un frasco vacío y limpio. Añada la cantidad total (30 ml) de un Buffer EL concentrate y mezcle bien. Etiquete el frasco como Buffer EL y almacene el Buffer EL a 2-8 °C. |

- Refrigere el Buffer EL a 2-8 °C (el Buffer EL solo es necesario para el aislamiento de ARN de muestras de sangre, pero no para los otros tipos de muestras)
- Determine el número de reacciones necesarias, incluidos los controles, y etiquete el número necesario de RTA Spin Filters (tapa) y el número necesario de 1.5 ml Receiver Tubes (por muestra: se necesita 1 Receiver Tube).

Preparación de la Lysis Solution TR

Hay que añadir DTT (o, de forma opcional, β-mercaptoetanol) a la Lysis Solution TR. Debido a la poca estabilidad del DTT disuelto, la Lysis Solution TR con DTT debe prepararse siempre fresca poco antes de usarla.

Antes de usar la Lysis Solution TR, agítela con suavidad para garantizar que la matriz portadora mineral de unión del ADN se distribuya homogéneamente en la solución. Espere un poco hasta que desaparezca la espuma que se forma.

Determine el número de reacciones requeridas que quiere añadir, incluidos los controles. Se recomienda que el volumen preparado sobrepase la cantidad total de preparaciones en un 5 %. El volumen requerido de Lysis Solution TR se puede consultar en el protocolo del material de la muestra inicial correspondiente.

Transfiera la cantidad requerida de Lysis Solution TR a un vial separado que sea adecuado para el volumen total requerido (p. ej., un tubo de 15 ml).

Añada 1/100 de volumen de DTT al volumen requerido de Lysis Solution TR. Opcionalmente, el DTT se puede sustituir por 1/100 de volumen de β-mercaptoetanol.

3.2 Toma de muestras y almacenamiento del material inicial

Para maximizar el rendimiento y la reproducibilidad, es fundamental que las muestras se almacenen correctamente. El rendimiento puede variar en función de factores como el estado de salud del donante, la edad y el tipo de la muestra, el transporte y el almacenamiento.

Debe evitarse que las muestras se sometan a varios ciclos de congelación y descongelación para evitar la degradación del ácido nucleico. En general, las muestras frescas son las que dan mejores resultados. Se recomienda utilizar asesoramiento técnico, como las normas CEN/TS e ISO sobre el proceso de análisis previo para diagnóstico molecular según el reglamento europeo de diagnóstico *in vitro* (IVDR), como señala G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Cultivo celular: Para evitar la degradación del ARN, las muestras deben usarse para la extracción del ácido nucleico directamente después de recolectarlas. Si la extracción va a realizarse en otro momento, las células deben congelarse en nitrógeno líquido inmediatamente tras la recolección, tras lo cual se podrán almacenar a -80 °C durante varios meses. El material inicial también se puede almacenar en Lysis Solution TR con DTTa -80 °C tras la lisis celular.

Muestras de tejido: Las muestras deben congelarse inmediatamente después de recogerlas y deben almacenarse a -80 °C; de lo contrario, la purificación del ARN debe realizarse de inmediato. El ARN de las muestras congeladas se mantiene estable durante meses. Hay que evitar que el tejido congelado se descongele al manipularlo. El material inicial también se puede almacenar en Lysis Solution TR con DTTa -80 °C tras la lisis celular.

Tejidos incluidos en parafina tratados con formalina: Los procedimientos de fijación con formalina e inclusión en parafina de conformidad con los protocolos estándar siempre causan degradación de los ácidos nucleicos. El ARN solo se puede aislar correctamente de las secciones si se ajusta el pH de la formalina (pH 7-8) y la muestra es fresca y se ha almacenado correctamente. Las secciones deben conservarse siempre en un lugar fresco y seco, evitando las temperaturas y niveles de humedad altos. Las secciones no se deben conservar durante más de 8 semanas, ya que el ARN que contienen es muy inestable. El ARN se conserva mejor en bloques sin cortar. También es importante asegurarse de que la muestra se haya fijado correctamente y no contenga restos de agua, por ejemplo.

Sangre: Las muestras de sangre (estabilizadas con EDTA o citrato, pero no heparinizadas) deben almacenarse en hielo inmediatamente después de recogerlas para reducir las actividades de regulación del ARN en la muestra. No utilice muestras congeladas para la purificación; use solo muestras frescas. Los leucocitos deben aislarse dentro de las 4 horas posteriores a la recogida, tras lo cual se pueden almacenar a -80 °C. Los leucocitos también se pueden almacenar en Lysis Solution TR con DTT: en hielo hasta 1 día o a -20 °C durante hasta 5 días.

3.3 Preparación de los materiales iniciales

A continuación se describe el tratamiento previo de los materiales de la muestra.

Tras la preparación de los materiales iniciales, consulte el protocolo de extracción de ácido nucleico específico de la muestra correspondiente.

3.3.1 Cultivo celular

a) Células cultivadas en suspensión

Centrifugue hasta 1×10^7 células a $240 \times g$ durante 5 minutos. El recuento de células no debe exceder 1×10^7 células; se recomienda realizar un recuento de células. Extraiga completamente el sobrenadante y continúe con la lisis de la muestra tal como se describe en el protocolo 1.

b) Células cultivadas en monocapa

En recipientes de cultivo grandes (bandejas > Ø 35 mm, matraces > 12,5 cm²) separe las células por tripsinización. Transfiera las células a un tubo de centrifugado y pelletice a $250 \times g$ durante 5 minutos. Extraiga el sobrenadante por completo.

En recipientes de cultivo pequeños (Well Plates de 96, 24, 12 y 6 cavidades, bandejas de Ø 35 mm, matraces de 12,5 cm²) deseche por completo el medio de cultivo y continúe inmediatamente con la lisis tal como se describe en el protocolo 1.

Tras la lisis, el material inicial se puede almacenar en Lysis Solution TR con DTT a -20 °C durante un máximo de 5 días, o durante más tiempo a -80 °C. Para realizar la extracción del ácido nucleico, los lisados congelados se deben incubar en un baño de agua a 37 °C hasta que se descongelen por completo, poco antes de la extracción. Debe evitarse la incubación prolongada, ya que podría poner en riesgo la integridad del ARN.

3.3.2 Muestras de tejido

Para maximizar el rendimiento del ARN total, se requiere la interrupción y homogeneización completas de las muestras de tejido.

La interrupción y homogeneización incompletas reducirán el rendimiento de forma significativa y pueden causar obstrucciones en el RNA-RTA Spin Filter. La homogeneización con un molino de perlas, etc. suele aumentar el rendimiento del ARN.

a) Homogeneización con Zirconia Beads y un molino de perlas o un mezclador de vórtice

Transfiera 1-20 mg de muestra de tejido fresco o congelado a un vial adecuado para el homogeneizador y añada Zirconia Beads. Se recomienda usar una mezcla de Zirconia Beads: 6 x Zirconia Beads I y 3 x Zirconia Beads II. Es posible que la proporción y la cantidad total de Zirconia Beads I y II deban adaptarse al tipo y la cantidad del tejido.

Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma.

Tejido con contenido de ácido nucleico de bajo a moderado: Añada 600 µl de Lysis Solution TR con DTT y homogeneice la muestra.

Tejido con contenido alto de ácido nucleico, como bazo, riñón o pulmón: Añada 900 µl de Lysis Solution TR con DTT y homogeneice la muestra.

Transfiera la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube e inicie la extracción del ARN; siga el protocolo 2. Opcionalmente, la muestra se puede almacenar a -20 °C hasta la extracción.

b) Homogeneización con mortero

Congele 1-20 mg de muestra de tejido en nitrógeno líquido y triture hasta obtener un polvo fino. Transfiera el polvo a un 2.0 ml Receiver Tube. Deje que se evapore el nitrógeno líquido, pero no permita que se descongele la muestra.

Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma.

Tejido con contenido de ácido nucleico de bajo a moderado: Añada 600 µl de Lysis Solution TR con DTT.

Tejido con contenido alto de ácido nucleico, como bazo, riñón o pulmón: Añada 900 µl de Lysis Solution TR con DTT.

Siga el protocolo 2. Opcionalmente, la muestra se puede almacenar a -20 °C hasta la extracción.

3.3.3 Tejidos incluidos en parafina tratados con formalina (tiras de parafina)

Se recomienda utilizar secciones recién cortadas de hasta 10 µm de espesor. No aplique más de 8 secciones con un área superficial de 250 mm² en un único proceso de purificación. Para los tejidos con contenido alto de ácido nucleico (p. ej. timo), utilice menos secciones por preparación para evitar que se sobrecargue la columna. Para establecer el número de secciones que se deben usar en una preparación, recomendamos empezar con una o dos secciones. Tenga en cuenta que el contenido de ARN de las tiras de parafina puede variar considerablemente y que el tratamiento con formalina degrada el ARN.

Transfiera las tiras de parafina a un tubo de reacción de 1,5 ml y añada 0,5 ml de octano o xileno. Mezcle por vórtice con cuidado para disolver la parafina.

Centrifugue a máxima velocidad durante 2 min para pelletizar el tejido. Deseche el sobrenadante con mucho cuidado. Este paso debe repetirse si se sigue observando parafina en la muestra. Cuando la muestra de tejido se vea transparente, realice un paso de lavado final con etanol al 96 –100 %.

Para secar la muestra, centrifugue brevemente y retire el etanol. Incube el tubo de reacción abierto a 52 °C hasta que se evapore el etanol restante.

Añada 10 µl de Proteinase K (40 mg/ml) y 90 µl de RNase free TE-Buffer (50 mM de TrisCl pH 8 con 10 mM de EDTA) con 10 mM de DTT a la muestra, mezcle por completo mediante absorción y expulsión con una pipeta e incube a 48 °C durante 10 minutos. Se recomienda cortar o triturar mecánicamente el material antes o durante la lisis.

Para la Proteinase K, observe también las recomendaciones del fabricante; este protocolo proporciona un ejemplo para una solución madre de 40 mg/ml.

Incube a 80 °C durante 10 minutos con agitación constante para invertir parcialmente la unión cruzada por formalina de los ácidos nucleicos liberados y para mejorar el rendimiento y la calidad del ARN.

Añada 600 µl de Lysis Solution TR con DTT y continúe con el paso 2 del protocolo 2.

3.3.4 Sangre

El tratamiento previo de las muestras de sangre entera se describe en el protocolo 3. Puesto que hay que realizar una separación celular para las células nucleadas, no se pueden usar muestras congeladas.



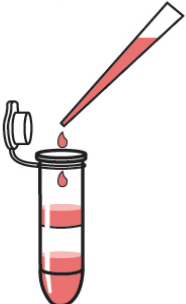

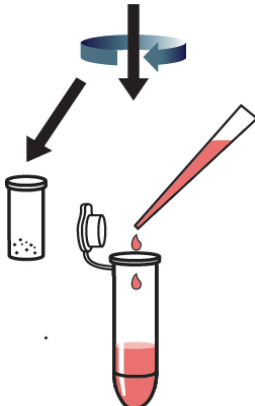

Si la muestra ya tiene los leucocitos separados (capa leucocitaria, gradiente de densidad Ficoll® y relacionados), siga el protocolo 1, donde se describe el procesamiento de cultivos celulares. Los leucocitos deben usarse frescos o congelados a -80 °C; para descongelar los pellets de leucocitos, añada Lysis Solution TR con DTT.

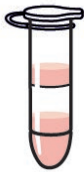
3.4 Protocolo resumido del InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

Muestras lisadas

Consulte el capítulo 3.3 de las instrucciones de uso para obtener información sobre el tratamiento previo específico de la muestra

Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma

| | | |
|---|------------------------|---|
|  | Cultivo celular | <p>1a). <u>Lisis de células pelletizadas</u> Sacuda el tubo para soltar el pellet celular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para $< 5 \times 10^6$ células: añada 350 μl de Lysis Solution TR con DTT • Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: añada 700 μl de Lysis Solution TR con DTT <p>Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.</p> <p>1b). <u>Lisis de células monocapa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Para Well Plates de 96, 24 o 12 cavidades: añada 350 μl de Lysis Solution TR con DTT. • Para Well Plates de 6 cavidades, bandejas de \varnothing 35 mm y matraces de 12,5 cm²: añada 700 μl de Lysis Solution TR con DTT <p>Recoja el lisado celular con un rascador de goma. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.</p> |
|  | Tejido | <p>1. Disrumpa y homogeneice la muestra tal como se explica en el capítulo 3.3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con contenido bajo/medio de ácido nucleico: añada 600 μl de Lysis Solution TR con DTT • Muestras con contenido alto de ácido nucleico: añada 900 μl de Lysis Solution TR con DTT <p>Transfiera la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube</p> |
|  | Sangre | <p>1. Invierta la muestra de sangre 15 veces. ¡No mezcle por vórtice! Transfiera 0,5-1,5 ml a un tubo de 15 ml y añada 10 ml de Buffer EL frío (2-8 °C). Mezcle por inversión.</p> <p>Incube en hielo durante 15 min, invirtiendo 2 veces durante la incubación. Centrifugue a 4 °C y 960 x g durante 5 minutos. Retire el sobrenadante y añada 5 ml de Buffer EL frío (2-8 °C). Resuspenda cortando con el dedo. Centrifugue a 4 °C y 960 x g durante 5 minutos. Retire el sobrenadante, de manera que quede un pellet blanco. Añada 900 μl de Lysis Solution TR con DTT. Resuspenda con una pipeta.</p> |
| Unión y extracción de ADN | | |
|  | Cultivo celular | <p>2. Coloque un DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube y transfiera todo el lisado, incluido el precipitado. Incube durante 1 minuto. Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min. Deseche el DNA-Binding Spin Filter.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para $< 5 \times 10^6$ células: añada 250 μl de etanol al 70 % • Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: añada 500 μl de etanol al 70 % <p>Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta</p> |
|  | Tejido | <p>2. Centrifugue a máxima velocidad durante 2 minutos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con contenido bajo/medio de ácido nucleico: transfiera 500 μl de sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo y añada 330 μl de etanol al 96-100 % • Muestras con contenido alto de ácido nucleico: transfiera 800 μl de sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo y añada 500 μl de etanol al 96-100 % <p>Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.</p> |
|  | Sangre | <p>2. Transfiera la mezcla de la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube y mezcle por vórtice durante 10 segundos Incube durante 5 minutos, mezclando por vórtice 3-5 veces durante la incubación. Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min. Transfiera el sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo. Añada 750 μl de etanol al 96-100 % y mezcle con una pipeta.</p> |



Unión del ARN

3. Transfiera toda la muestra (hasta 700 μ l) a un RNA-RTA Spin Filter Set
Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
Repita el proceso si el volumen de la muestra es superior a 700 μ l.

Lavado para eliminar la contaminación residual

4. Añada 600 μ l de **Wash Buffer R1** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
5. Añada 700 μ l de **Wash Buffer R2** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
6. Repita este paso de lavado (5.) una vez.
7. Centrifugue a velocidad máxima durante 4 min para eliminar los restos de etanol.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.

Elución del ARN

| | |
|------------------------|---|
| Cultivo celular | <ol style="list-style-type: none"> 8. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 30-100 μl de Elution Buffer R directamente al RNA-RTA Spin Filter. Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el RTA Spin Filter y guarde el ARN eluido en hielo |
| Tejido | <ol style="list-style-type: none"> 8. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 30-60 μl de Elution Buffer R directamente al RNA-RTA Spin Filter. Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el RTA Spin Filter y guarde el ARN eluido en hielo |
| Sangre | <ol style="list-style-type: none"> 8. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube. Añada 30-60 μl de Elution Buffer R directamente al RNA-RTA Spin Filter. Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el RTA Spin Filter y guarde el ARN eluido en hielo |

3.5 Protocolo 1: Extracción de ARN total de cultivo celular

Consulte el tratamiento previo específico de la muestra en capítulo 3.3 «Preparación del material inicial».

Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma.

1.a) Lisis de la muestra de células pelletizadas

Sacuda el tubo para soltar el pellet celular.

- Para $< 5 \times 10^6$ células: añada 350 μl de **Lysis Solution TR con DTT**.
- Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: añada 700 μl de **Lysis Solution TR con DTT**.

Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta. No se deben observar grumos celulares antes de pasar al siguiente paso.

1.b) Lisis de la muestra de células monocapa

- Para Well Plates de 96, 24 o 12 cavidades: añada 350 μl de **Lysis Solution TR con DTT**.
- Para Well Plates de 6 cavidades, bandejas de \varnothing 35 mm y matraces de 12,5 cm²: añada 700 μl de **Lysis Solution TR con DTT**.

Recoja el lisado celular con un rascador de goma. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta. No se deben observar grumos celulares antes de pasar al siguiente paso.

2. Coloque un DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube (con tapa). Transfiera todo el lisado, incluido el precipitado que se haya formado, al DNA-Binding Spin Filter. Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min.
Deseche el DNA-Binding Spin Filter.
 - Para $< 5 \times 10^6$ células: añada 250 μl de **etanol al 70 %** al lisado.
 - Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: añada 500 μl de **etanol al 70 %** al lisado.

Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.

3. Transfiera toda la muestra (hasta 700 μl) a un RNA-RTA Spin Filter Set. Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube. Si el volumen de la muestra es superior a 700 μl , divida la carga del RNA-RTA Spin Filter en dos pasos y repítalos.
4. Añada 600 μl de **Wash Buffer R1** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
5. Añada 700 μl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
6. Añada 700 μl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.

7. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
8. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube sin ARNasa.
Añada 30-100 µl de **Elution Buffer R** directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde inmediatamente el ARN eluido en hielo. Utilice directamente para el análisis o congele a -80 °C.

3.6 Protocolo 2: Extracción de ARN total de tejido

Consulte el tratamiento previo específico de la muestra en capítulo 3.3 «Preparación del material inicial».

Actúe con rapidez y realice todos los pasos a temperatura ambiente.

Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma

1. Disrumpa y homogeneice la muestra tal como se explica en el capítulo 3.3:
 - Muestras con contenido bajo/moderado de ácido nucleico: añada 600 µl de **Lysis Solution TR con DTT**
 - Muestras con contenido alto de ácido nucleico: añada 900 µl de **Lysis Solution TR con DTT**Transfiera toda la mezcla de la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube.
2. Centrifugue el 2.0 Receiver Tube con el lisado a máxima velocidad durante 2 minutos.
 - Muestras con contenido bajo/moderado de ácido nucleico: Transfiera 500 µl del sobrenadante (sin Zirconia Beads) a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo, añada 330 µl de **etanol al 96-100 %** y mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.
 - Muestras con contenido alto de ácido nucleico: Transfiera 800 µl del sobrenadante (sin Zirconia Beads) a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo, añada 500 µl de **etanol al 96-100 %** y mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.
3. Transfiera 700 µl a un RNA-RTA Spin Filter Set.
Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
Si el volumen de la muestra es superior a 700 µl, divida la carga del RNA-RTA Spin Filter en dos pasos y repítalos.
4. Añada **600 µl de Wash Buffer R1** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
5. Añada **700 µl de Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
6. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
7. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
8. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube sin ARNasa
Añada 30-60 µl de **Elution Buffer R** directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde inmediatamente el ARN eluido en hielo. Utilice directamente para el análisis o congele a -80 °C.

3.7 Protocolo 3: Extracción de ARN total de sangre entera

Consulte el tratamiento previo específico de la muestra en capítulo 3.3 «Preparación del material inicial».

1. Invierta con sumo cuidado las muestras de sangre fresca 15 veces para homogeneizar la mezcla. ¡No mezcle por vórtice!
Transfiera 0,5–1,5 ml (máx. 1×10^7 leucocitos) a un tubo de 15 ml.
Añada 10 ml de **Buffer EL** frío (2-8 °C). Mezcle cuidadosamente por inversión.
Incube en hielo durante 15 min. Mezcle por inversión dos veces durante la incubación.
Nota: *La suspensión turbia se vuelve translúcida durante la incubación, lo que indica la lisis de los eritrocitos. En caso necesario, el tiempo de incubación se puede alargar a 20 minutos.*
Centrifugue a 960 x g y 4 °C durante 5 minutos.
Retire el sobrenadante por completo y con mucho cuidado (leucocitos de un pellet visible).
Añada 5 ml de **Buffer EL** frío (2-8 °C) y resuspenda el pellet cortando con el dedo.
Centrifugue a 960 x g y 4 °C durante 5 minutos.
Retire el sobrenadante tanto como pueda, incluidos los glóbulos rojos restantes.
Nota: *Si el sobrenadante no se retira por completo, interferirá en la lisis y en la posterior unión del ARN al RNA-RTA Spin Filter, reduciendo el rendimiento y la pureza.*
Añada 900 µl de **Lysis Solution TR con DTT**. Agite con suavidad la Lysis Solution TR con DTT antes de usarla, evitando que se pipetee espuma.
Mezcle absorbiendo y expulsando varias veces con una pipeta para resuspender el pellet por completo.
2. Transfiera la mezcla de la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube y mezcle por vórtice durante 10 segundos.
Incube durante 5 minutos, mezclando por vórtice 3-5 veces durante la incubación.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto (se observará un pellet gelatinoso).
Transfiera el sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo sin transferir también el pellet.
Añada 750 µl de **etanol al 96-100 %** y mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta
(es posible que aparezca precipitado, pero no afectará al procedimiento).
3. Transfiera 700 µl de la mezcla a un RNA-RTA Spin Filter Set.
Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
Repita el mismo procedimiento para el volumen restante de muestra.
4. Añada **600 µl de Wash Buffer R1** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
5. Añada **700 µl de Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
6. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
7. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.

- Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube sin ARNasa
Añada 30-60 µl de **Elution Buffer R** directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Spin Filter. Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde inmediatamente el ARN eluido en hielo. Utilice directamente para el análisis o congele a -80 °C.

3.8 Protocolo complementario (solo para investigación): Aislamiento simultáneo de ADN y ARN

Nota: El **Wash Buffer R1** y **R2** y los **2.0 ml Receiver Tubes** y **1.5 ml Receiver Tubes** para la purificación del ARN que se incluyen en el kit están calculados para el aislamiento de ARN. La cantidad proporcionada no incluye los tampones necesarios ni el plástico para el aislamiento simultáneo de ADN y ARN.

Modificación del protocolo 1: Aislamiento de ADN de cultivo celular

- Realice la lisis de la muestra tal como se describe en el paso 1 del protocolo 1.
- Coloque un DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube (con tapa). Transfiera todo el lisado, incluido el precipitado que se haya formado, al DNA-Binding Spin Filter. Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 minutos.
Aislamiento de ARN: proceda tal como se explica en el paso 3 del protocolo 1.
Aislamiento de ADN: Transfiera el DNA-Binding Spin Filter a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo
- Añada 600 µl de **Wash Buffer R1** al DNA-Binding Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el Receiver Tube con filtrado y coloque el DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube nuevo.
- Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al DNA-Binding Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube.
- Repita el paso de lavado una vez con Wash Buffer R2.
- Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube usado. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el 2.0 ml Receiver Tube con filtrado.
- Coloque el DNA-Binding Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube.
Añada 50-100 µl de **Elution Buffer R** o **DNase/RNase free water** directamente a la superficie del DNA-Binding Spin Filter.
Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el DNA-Binding Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y utilice el ADN directamente para el análisis o almacénelo adecuadamente.

Modificación del protocolo 2: Aislamiento de ADN de muestras de tejido

1. Prepare la muestra tal como se describe en el capítulo 3.3 «Preparación del material inicial», utilizando un molino de perlas o un mortero para homogeneizar la muestra. Añada 600 µl o 900 µl de **Lysis Solution TR con DTT** de acuerdo con el tipo de tejido y las instrucciones.
2. Centrifugue el 2.0 ml Receiver Tube que contiene el lisado de tejido a máxima velocidad durante 2 minutos.

Aislamiento de ARN: Según el tipo de tejido, transfiera 500 µl del sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo y añada 330 µl de **etanol al 96-100 %** O BIEN transfiera 800 µl del sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo y añada 500 µl de **etanol al 96-100 %**. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta. Proceda tal como se detalla en el paso 3 del protocolo 2.

Aislamiento de ADN: asegúrese de retirar por completo los restos de sobrenadante y añada 600 µl de **Wash Buffer R1** al pellet. Luego, resuspenda mediante absorción y expulsión con una pipeta.

3. Coloque un DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube nuevo (con tapa). Transfiera la muestra sin las Zirconia Beads al DNA-Binding Spin Filter. Centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube.
4. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al DNA-Binding Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube.
5. Repita el paso de lavado una vez con **Wash Buffer R2**.
6. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el 2.0 ml Receiver Tube con filtrado.
7. Coloque el DNA-Binding Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube.
Añada 50-100 µl de **Elution Buffer R** o **DNase/RNase free water** directamente a la superficie del DNA-Binding Spin Filter.
Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el DNA-Binding Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y utilice el ADN directamente para el análisis o almacénelo adecuadamente.

Modificación del protocolo 3: Aislamiento de ADN de muestras de sangre

1. Realice el paso 1 que se describe en el protocolo 3.
2. Transfiera la mezcla de la muestra a un 2.0 ml Receiver Tube y mezcle por vórtice durante 10 segundos.
Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos, mezclando por vórtice 3-5 veces durante la incubación.
Transfiera la muestra a un DNA-Binding Spin Filter colocado en un 2.0 ml Receiver Tube (con tapa) e incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 minutos; el eluido contiene el ARN total.

Aislamiento de ADN: Transfiera el DNA-Binding Spin Filter a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo.

3. Añada 600 µl de **Wash Buffer R1** al DNA-Binding Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
4. Deseche el Receiver Tube con filtrado y coloque el DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube nuevo. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al DNA-Binding Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube.
5. Repita el paso de lavado una vez con **Wash Buffer R2**.
6. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el DNA-Binding Spin Filter en el 2.0 ml Receiver Tube. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el 2.0 ml Receiver Tube.
7. Coloque el DNA-Binding Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube.
Añada 50-100 µl de **Elution Buffer R** o **DNase/RNase free water** directamente a la superficie del DNA-Binding Spin Filter.
Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el DNA-Binding Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y utilice el ADN directamente para el análisis o almacénelo adecuadamente.

3.9 Protocolo complementario (solo para investigación): Digestión de ADN en el RNA-RTA Spin Filter

Se recomienda la digestión adicional de la ADNasa si es necesario para las aplicaciones posteriores, como las RT-qPCR, donde pequeñas cantidades de ADN pueden interferir. La digestión de la ADNasa se puede realizar directamente en el filtro de centrifugación y se puede integrar en el segundo paso de lavado.

Para la modificación del protocolo del tipo de muestra correspondiente, consulte el paso donde se utiliza el Wash Buffer R2 (paso 5) y proceda de la siguiente manera:

1. Añada 600 μ l de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 10 000 x g durante 30 segundos.
2. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube usado.
3. Añada 10 μ l de una mezcla de reacción de ADNasa directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Un ejemplo típico de mezcla de reacción sería 1 μ l de enzima ADNasa I (50 U) en 9 μ l de 1 x tampón de reacción de ADNasa (siga las instrucciones del fabricante relevante para la correcta aplicación de la ADNasa). ¡El volumen de mezcla de reacción no debe sobrepasar 10 μ l!
4. Incube el RNA-RTA Spin Filter a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Añada 600 μ l de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter, incube durante 1 minuto y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto. Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
6. Repita una vez más el segundo paso de lavado.
7. Siga el protocolo con la retirada del etanol y la elución del ácido nucleico.

3.10 Protocolo complementario (solo para investigación): Extracción de ARN de la fase acuosa de Trizol

1. Añada un volumen igual de **Lysis Solution TR con DTT** de hasta 350 µl de la fase acuosa de Trizol a un 2.0 ml Receiver Tube. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.
Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 minutos
2. Transfiera el sobrenadante a un 2.0 ml Receiver Tube nuevo y deseche el pellet.
3. Añada 1 volumen de **etanol al 96-100 %** y mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.
4. Transfiera toda la mezcla a un RNA-RTA Spin Filter Set.
Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.

Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.

Si el volumen de la muestra es superior a 700 µl, divida la carga del RNA-RTA Spin Filter en dos pasos y repítalos.
5. Añada 600 µl de **Wash Buffer R1** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
6. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
7. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
8. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
9. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube sin ARNasa.
Añada 30-100 µl de **Elution Buffer R** directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde inmediatamente el ARN eluido en hielo. Utilice directamente para el análisis o congele a -80 °C.

3.11 Protocolo complementario (solo para investigación): Extracción de ARN de muestras de líquido, como mezclas de reacción o fluidos corporales

1.a) Limpieza de muestras que no contienen ADN

Purificación del ARN de 100 µl de muestra de líquido

Pipetee 350 µl de **Lysis Solution TR con DTT** directamente al DNA-Binding Spin Filter colocado en un 2.0 ml Receiver Tube. Para retirar las partículas portadoras minerales de unión del ADN, centrifugue a 13 400 x g durante 2 minutos. Deseche el DNA-Binding Spin Filter. Tome el filtrado para el siguiente procedimiento de lavado: añada 100 µl de la muestra al filtrado. **Luego, continúe con el paso 4 de este protocolo.**

Purificación del ARN de 200 µl de muestra de líquido

Pipetee 700 µl de **Lysis Solution TR con DTT** directamente al DNA-Binding Spin Filter colocado en un 2.0 ml Receiver Tube. Para retirar las partículas portadoras minerales de unión del ADN, centrifugue a 13 400 x g durante 2 minutos. Deseche el DNA-Binding Spin Filter. Tome el filtrado para el siguiente procedimiento de lavado: añada 200 µl de la muestra al filtrado. **Luego, continúe con el paso 4 de este protocolo.**

1.b) Limpieza de muestras que contienen ADN

Purificación del ARN de 100 µl de muestra de líquido

Añada 350 µl de **Lysis Solution TR con DTT** a la muestra de 100 µl. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.

Purificación del ARN de 200 µl de muestra de líquido

Añada 700 µl de **Lysis Solution TR con DTT** a la muestra de 200 µl. Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.

2. Coloque un DNA-Binding Spin Filter en un 2.0 ml Receiver Tube. Transfiera todo el lisado, incluido el precipitado que se haya formado, al DNA-Binding Spin Filter. Incube durante 1 minuto.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 minutos.
Deseche el DNA-Binding Spin Filter.
3. Añada 250 µl (volumen inicial de la muestra: 100 µl) o 500 µl (volumen inicial de la muestra: 200 µl) de **etanol al 96-100 %** al lisado.
Mezcle bien mediante absorción y expulsión con una pipeta.
4. Transfiera toda la mezcla de reacción al RNA-RTA Spin Filter.
Incube durante 1 min
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 minutos.
Si el volumen de la muestra es superior a 700 µl, divida la carga del RNA-RTA Spin Filter en dos pasos.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.

Si el volumen de la muestra es superior a 700 µl, divida la carga del RNA-RTA Spin Filter en dos pasos y repítalos.
5. Añada 600 µl de **Wash Buffer R1** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y coloque el RNA-RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.

6. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
7. Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** al RNA-RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RNA-RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
8. Centrifugue a máxima velocidad durante 4 min para eliminar el etanol por completo.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
9. Coloque el RNA-RTA Spin Filter en un 1.5 ml Receiver Tube sin ARNasa.
Añada 30-100 µl de **Elution Buffer R** directamente a la superficie del RNA-RTA Spin Filter.
Incube durante 2 minutos y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
Deseche el RTA Spin Filter.
Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde inmediatamente el ARN eluido en hielo. Utilice directamente para el análisis o congele a -80 °C.

4. Apéndice

4.1 Solución de problemas

| Problema | Causa posible | Recomendación |
|---|--|--|
| Cantidad reducida de ARN | Elución incompleta | Incrementa el tiempo de incubación con Elution Buffer R a 5-10 min. Eluya dos veces con los mismos 100 µl de Elution Buffer R . |
| | Disrupción u homogeneización insuficientes | Reduzca la cantidad de material inicial; no sobrecargue el kit. |
| | Extracción incompleta del medio de cultivo celular. | Asegúrese de que el medio de cultivo celular se extraiga por completo tras recolectar las células. |
| ARN degradado | Almacenamiento incorrecto del material inicial; material viejo | Asegúrese de que la muestra se extraiga y almacene correctamente. Utilice material de muestra fresco. |
| | Manipulación incorrecta del material inicial | El protocolo de purificación debe ejecutarse sin interrupciones. Consulte las preguntas frecuentes en la página web de Invitex para obtener información general sobre la manipulación del ARN. |
| | La Lysis Solution TR no contiene DTT | Asegúrese de que se añada DTT a la Lysis Solution TR. |
| ARN impuro | Transferencia de eritrocitos en el protocolo de sangre | Alargue la incubación en hielo a 20 minutos. El pellet de leucocitos debe ser blanco y puede contener trazas de eritrocitos. Si la lisis de los eritrocitos no se realiza completamente, es posible que no se observe el pellet blanco y los eritrocitos formarán un pellet rojo. Si esto sucede, incuba en hielo durante 5–10 min más después de añadir Buffer EL . |
| Contaminación de ADN | Cantidad excesiva de material inicial | Reduzca la cantidad de material inicial. Realice una digestión de ADNasa del eluido. |
| | Matriz portadora de unión de ADN insuficiente | Agite cuidadosamente la Lysis Solution TR antes para asegurarse de que la matriz portadora de unión de ADN se distribuya correctamente |
| Rendimiento deficiente de los ácidos nucleicos en las aplicaciones posteriores | Transferencia de etanol durante la elución | Aumente la duración de la fase de secado para eliminar el etanol. |
| | Transferencia de sal durante la elución | Compruebe si hay precipitados de sal en los Wash Buffer . Si se observan precipitados, caliente a una temperatura de hasta 30 °C para eliminarlos Asegúrese de que los Wash Buffer estén a temperatura ambiente antes de usarlos. |
| Proporción A₂₆₀/A₂₈₀ baja | El ARN se ha diluido con agua | No utilice RNase free water para diluir la muestra para medir la pureza del ARN. Se recomienda utilizar un tampón neutro (10 mM de Tris/HCl pH 7.0). |

4.2 Garantía

Invitek Molecular garantiza que el kit funciona correctamente para las aplicaciones descritas en este manual y de conformidad con el uso previsto. De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de Invitek Molecular certificado por EN ISO 13485, se ha probado el rendimiento de todos los componentes del kit para garantizar la calidad del producto.

Cualquier problema, incidente o defecto se deberá notificar inmediatamente a Invitek Molecular. En cuanto reciba el producto, inspecciónelo para verificar que no falte nada y esté en buenas condiciones. Si se encuentra algún problema, informe inmediatamente a Invitek Molecular por escrito. Cualquier modificación en el kit y los protocolos, así como el uso distinto del previsto, invalidará todas las garantías.

Invitek Molecular se reserva el derecho a cambiar, alterar o modificar cualquier producto en cualquier momento para mejorar su diseño y su rendimiento.

Invitek Molecular ofrece una garantía para sus productos de conformidad con lo expuesto en los Términos y condiciones generales, que se pueden consultar en www.invitek.com. Si tiene alguna duda, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek.com.

4.3 Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas



Fabricante



Número de lote



Identificador único de un dispositivo médico



Número de catálogo



Fecha de caducidad



Consultar las instrucciones de uso



Limitación de temperatura



No reutilizar



Cantidad de preparaciones de muestra



Productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*

4.4 Otros documentos e información complementaria

Visite www.invitek.com para acceder a lo siguiente:

- Preguntas frecuentes y consejos para solucionar problemas
- Manuales en distintos idiomas
- Fichas de datos de seguridad (FDS)
- Asistencia web
- Vídeos de productos

Si sigue necesitando ayuda tras leer detenidamente las instrucciones de uso y la información adicional, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek.com o que contacte con su distribuidor.

4.5 Información para pedidos

| Producto | Tamaño del paquete | Ref. catálogo |
|---------------------------------------|--------------------|---------------|
| InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit | 50 preparaciones | 1060100200 |
| InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit | 250 preparaciones | 1060100300 |

Historial de revisiones

| Revisión | Fecha | Descripción |
|------------|------------|--|
| ES-v1-2022 | 2022-08-09 | Nuevo documento |
| ES-v2-2023 | 2023-04-18 | Actualizar los datos de contacto y el diseño corporativo para reflejar el cambio de marca de la empresa. |



INVITEK diagnostics

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 2 e 6
63460-070 Tondela
Portugal

Phone: +351 232 817 817

GERMANY

Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Germany

Phone: +49 30 9489 2908

info@invitek.com
www.invitek.com