

Kit de Extracción de ARN AMPLIZOL

PHI0034 500 reacciones

Alicuotas de Amplizol

500 unidades

NOMBRE DEL PRODUCTO:

Kit de extracción de ARN AMPLIZOL

APLICACIONES Y USO:

Amplizol es un reactivo de diagnóstico in vitro utilizado para el aislamiento de ARN (ácido ribonucleíco), el cual puede ser usado en diversas técnicas moleculares como la PCR en tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR), ensayos de hibridación o traducción in vitro, así como en el diagnóstico de enfermedades.

COMPONENTES:

- Φ Amplizol
- Φ Solución Precipitante
- Φ Solución de Lavado
- Φ Agua Libre de Nucleasas
- Φ Solución A

CONTENIDO DEL KIT

Nombre	Cantidad
Criocaja con 100 alicuotas de 800 µL de Amplizol en viales de 1,5 mL	5
Criocaja con 100 alicuotas de 700 µL de Solución Precipitante en viales de 1,5 mL	5
Frasco con 150 mL de Solución de Lavado (PHI0038)	2
Frasco con 100 mL de Solución A (PHI 0037)	1
Frasco con 100 mL de Agua Libre de Nucleasas - tratada con DEPC (PHI0029)	1

MATERIALES ADICIONALES NO SUMINISTRADOS:

EQUIPOS	MATERIALES AUXILIARES
Vórtex	Viales de 1,5 mL
Centrifuga	Marcador permanente
Ultracongelador	Elementos de protección para el operario
Micropipetas	Puntas para micropipetas de 200 µL y 1000 µL
Cabina de seguridad	Criocajas para congelador

Los equipos y materiales anteriormente descritos son necesarios para el proceso de extracción de ARN con el kit de extracción de ARN AMPLIZOL

METODOLOGÍA:

a) Principio del método.

La extracción de ARN, constituye una etapa previa para algunos análisis genéticos, los métodos de extracción cumplen una serie de pasos básicos, que son independientes del origen de la muestra. Estos son: (i) ruptura de la membrana celular, (ii) la eliminación de proteínas, (iii) concentración del ARN, (iv) lavado para garantizar la eliminación de reactivos y solventes que puedan afectar análisis posteriores, (v) y solubilización del ARN extraído (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006).

b) Criterios de desempeño y limitaciones del método.

Cada proceso de extracción debe adecuarse según el origen y naturaleza de la muestra, además de los volúmenes necesarios para cada uno de los reactivos. El kit de extracción de ARN es exclusivo para este procedimiento, no se garantiza que tenga el mismo desempeño en procesos paralelos de extracción de ADN o proteínas, además este kit ha sido probado en muestras de origen respiratorio como hisopados o aspirados nasofaringeos, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, saliva, espuma, etc.

c) Preparación de reactivos.

El kit de extracción de ARN AMPLIZOL contiene todos los reactivos listos para su uso, no se requieren preparaciones adicionales o modificaciones para ninguno de estos; sin embargo, se recomienda adicionar en el proceso un transportador de ARN como ayuda adicional en el proceso de separación y lavado, ya que este facilita la visualización del botón de ARN.

f) Procedimiento

Pasos previos al desarrollo del método

Asegúrese de revisar cuidadosamente el protocolo con el fin de conocerlo y saber que equipos y reactivos se necesitan para el desarrollo exitoso del mismo.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS RESPIRATORIAS

(tiempo de duración del protocolo 1 hora)

1. Homogenizar la muestra clínica y adicionar 400 µl de esta a un tubo de 1,5 mL que contiene 800 µl de Amplizol.
2. Realizar vortex fuerte por 15 segundos a cada tubo de la mezcla.
3. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
4. Adicionar 160 µl de Solución A y mezclar por inversión 5 veces.
5. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos (verificar que la Solución A y el Amplizol se mezclen hasta adoptar una apariencia turbia).
6. Centrifugar a 12.000 xg 15 minutos a 4°C.
7. Recuperar la fase acuosa (se pueden obtener entre 600 a 750 µl). Ver figura 1.

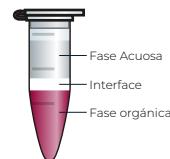


Figura 1. Separación de fases durante el protocolo de extracción de ARN viral con Amplizol

8. Transferir la fase acuosa al tubo que contiene la solución precipitante.
9. Incubar 10 minutos en hielo -20 °C.
10. Centrifugar a 12.000 xg 10 minutos a 4°C. Tener precaución de no perturbar el botón precipitado. Ver figura 2.



Figura 2. Transferencia de la fase acuosa a la solución para precipitar el ARN viral

11. Descartar el sobrenadante con pipeta verificando que el botón quede intacto en el fondo del tubo. NOTA: en algunas ocasiones no se observa botón de ARN lo cual puede estar relacionado con la cantidad de muestra suministrada, asegúrese de pipetejar del lado opuesto a la posible localización del botón de ARN.

12. Adicionar al tubo 500 µl de la solución de lavado
13. Centrifugar a 12.000 xg por 5 minutos a 4°C. Tener precaución de no perturbar el botón.
14. Descartar sobrenadante, verificando que el botón quede libre de exceso de solución de lavado.
15. Deje secar el botón 3 minutos a temperatura ambiente con el tubo abierto.
16. Adicionar 50 µl de agua libre de nucleasas y solubilizar con pipeteo suave. No realizar vortex.
17. Proceder a realizar el protocolo de RT-PCR con la muestra solubilizada, o en caso de no realizar la RT-PCR inmediatamente, almacenar la muestra a -80°C.

g) Cálculo de los resultados analíticos.

Análisis por espectrofotometría: La relación de la absorbancia a 260/280nm de la muestra debe ser entre 1,7-2.

Electroforesis: Luego de la separación de la muestra de ARN mediante electroforesis se observan 2 bandas definidas en una proporción 2:1, las cuales corresponden a la subunidad 28S y a la 18S ribosomal.

CONTRAINDICACIONES Y ADVERTENCIAS:

Información contenida en la FICHA DE SEGURIDAD (safety data sheets , SDSs) para KIT DE EXTRACCIÓN DE ARN AMPLIZOL .

REFERENCIAS

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1(2), 581-585. doi: 10.1038/nprot.2006.83