

>> Authors have provided a new version 2 with English translation here <<

Version 1

If you know part of the translation is wrong please suggest a correction (highly likely initially as this went through Google translate). Thank you.

Translation by Google Translate & Alexander James Phillips.

[Link to paper](#)

Version 1 (11/05/2020)

Protocolo de extracción de ARN viral optimizado para SARS-Cov2 en AGROSAVIA

Viral RNA extraction protocol optimized for SARS-Cov2 in AGROSAVIA

Alejandro Caro-Quintero*1, Roxana Yockteng1, Andrea Navarrete1, Johan Bernal1, Giuliana Daza1, Camilo Ruiz-Avila2

1Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Colombia. 2GR Chía, Colombia.

INTRODUCION

Aquí presentamos la primera versión de un protocolo de extracción de ARN para SARs-cov2 por medio del uso de perlas magnéticas. Este protocolo fue optimizado en los laboratorios de AGROSAVIA y se presenta como alternativa a las limitaciones de kits comerciales de extracción de ARN viral. El protocolo de extracción de ARN viral fue adaptado del protocolo titulado “SARS-CoV-2 RNA purification from nasal/throat swabs collected in Viral Transfer Media” en <https://bomb.bio/> y que se basa en métodos reportados previamente por el mismo grupo (Oberacker et al 2019). La versión optimizada aquí, logra resultados de Ct similares a los kits comerciales y reduce el costo de extracción de ARN por muestra en un 90%, es decir 2000 pesos colombianos ó 50 centavos de dólar por muestra. Compartimos este protocolo con la esperanza de que pueda asegurar la sostenibilidad del diagnóstico en Colombia y otros países donde sea difícil y costoso importar los kits comerciales.

INTRODUCTION

Here we present the first version of an RNA extraction protocol for SARs-cov2 through the use of magnetic beads. This protocol was optimized in AGROSAVIA laboratories and is presented as an alternative to the limitations of commercial viral RNA extraction kits. The viral RNA extraction protocol was adapted from the protocol entitled “SARS-CoV-2 RNA purification from nasal / throat swabs collected in Viral Transfer Media” at <https://bomb.bio/> and which is based on methods previously reported by the same group (Oberacker et al

2019). The optimized version here achieves Ct results similar to commercial kits and reduces the cost of RNA extraction per sample by 90%, that is, 2000 Colombian pesos or 50 cents per sample. We share this protocol in the hope that it can ensure the sustainability of the diagnosis in Colombia and other countries where it is difficult and expensive to import commercial kits.

DESCRIPCIÓN

A continuación se presentan los resultados y observaciones de la adaptación y optimización del protocolo en su versión 1 en el siguiente orden.

- I. Protocolo optimizado en AGROSAVIA y los costos aproximados de los reactivos asociados a este protocolo en Colombia.
- II. Comparación entre el RT-qPCR para las extracciones con kit comercial (extracción de columna) y el protocolo optimizado de perlas magnéticas para los genes RdRP y RNAsa.
- III. Observaciones en cuanto al diseño y ensamblaje de gradillas magnéticas de neodimio que permiten mejorar los lavados durante la extracción y una elución más sencilla en el paso final.

DESCRIPTION

Below are the results and observations of the adaptation and optimization of the protocol in version 1 in the following order.

- I. Optimized protocol in AGROSAVIA and the approximate costs of the reagents associated with this protocol in Colombia.
- II. Comparison between RT-qPCR for commercial kit extractions (column extraction) and optimized magnetic bead protocol for RdRP and RNase genes.
- III. Observations regarding the design and assembly of neodymium magnetic racks that allow for better washing during extraction and easier elution in the final step.

NOTA: 1. El protocolo ajustado y presentado aquí es susceptible de otras mejoras como las reportadas para detección de virus respiratorios (He et. al 2017). 2. Protocolos similares y como construir las gradillas magnéticas pueden encontrarse en la página de los Autores originales del método (<https://bomb.bio/>). 3. No nos hacemos responsables de ningún accidente, infección o implicación legal que resulte del uso de protocolos ajustados aquí o alojados en BOMB.bio.

NOTE: 1. The adjusted protocol presented here is susceptible to other improvements such as those reported for detection of respiratory viruses (He et. Al 2017). 2. Similar protocols and how to build the magnetic racks can be found on the page of the original Authors of the method (<https://bomb.bio/>). 3. We are not responsible for any accident, infection or legal implication resulting from the use of protocols adjusted here or hosted at BOMB.bio.

I. PROTOCOLO OPTIMIZADO AGROSAVIA

I. AGROSAVIA OPTIMIZED PROTOCOL

1. Preprocesamiento de muestras mucosas.

- 1.1. Diluir 100 μ l de la muestra en 300 μ l de Solución Salina [0.8%], mezclar por vortex 10 s. En el paso 2.3 agregar luego de la incubación 540 μ l de isopropanol.

1. Preprocessing of mucus samples.

- 1.1. Dilute 100 μ l of the sample in 300 μ l of Saline Solution [0.8%], vortex mix 10 s. In step 2.3 add 540 μ l isopropanol after incubation.

2. Procesamiento de Muestras (en tubos de 1.5 ml)

- 2.1. A 100 μ l de buffer GITC adicionar, 12.5 μ l de Proteinasa K [20 mg/ml], 200 μ l de la muestra y mezclar por vortex 10 s.
- 2.2. Incubar la muestra durante 10 min a 60 °C, mezclando por vortex cada 2 min.
- 2.3. Colocar el tubo en gradilla y adicionar 270 μ l de Isopropanol, y 40 μ l de perlas magnéticas (ver preparación abajo). Mezclar por volteo 8 veces.
- 2.4. Colocar el tubo(s) en el rack magnético durante 10 min sin mover.
- 2.5. Sin mover el tubo del rack magnético, extraer aproximadamente 610 μ l de la solución.
- 2.6. Sin mover el tubo del rack magnético, adicionar 150 μ l de Isopropanol y esperar 30 segundos y retirar el isopropanol del tubo.
- 2.7. Sin mover el tubo del rack magnético, adicionar 200 μ l de Etanol al 70%, y retirar del tubo.
- 2.8. Sin mover el tubo del rack magnético, repetir lavado anterior 2.7 y extraer al máximo el Etanol.
- 2.9. Sin mover el tubo del rack magnético, dejar secar por aproximadamente 5 minutos.
- 2.10. Adicionar 30 μ l de Agua grado molecular al tubo intentando descargar el líquido encima de las paredes del tubo donde se encuentran las perlas.
- 2.11. Retirar el tubo del rack magnético y hacer vortex 10 segundos para que las perlas entren en la solución e incubar 1 minuto a temperatura ambiente en una gradilla normal.
- 2.12. Colocar el tubo de nuevo en el rack magnético y durante 3 a 5 minutos, y pasar 20 a 25 μ l de la elución sin perlas a un nuevo tubo y guardar a -80 °C.

2. Sample Processing (in 1.5 ml tubes)

- 2.1. To 100 μ l of GITC buffer add 12.5 μ l of Proteinase K [20 mg / ml], 200 μ l of the sample and mix by vortex for 10 s.
- 2.2. Incubate the sample for 10 min at 60 ° C, vortexing every 2 min.
- 2.3. Place the tube in a rack and add 270 μ l of Isopropanol and 40 μ l of magnetic beads (see preparation below). Mix by inverting 8 times.
- 2.4. Place the tube (s) in the magnetic rack for 10 min without moving.
- 2.5. Without moving the tube from the magnetic rack, withdraw approximately 610 μ l of the solution.
- 2.6. Without moving the tube from the magnetic rack, add 150 μ l of Isopropanol and

- wait 30 seconds and remove the isopropanol from the tube.
- 2.7. Without moving the tube from the magnetic rack, add 200 μ l of 70% Ethanol, and remove from the tube.
 - 2.8. Without moving the tube from the magnetic rack, repeat previous washing 2.7 and extract the Ethanol to the maximum.
 - 2.9. Without moving the tube from the magnetic rack, allow to dry for approximately 5 minutes.
 - 2.10. Add 30 μ l of molecular grade water to the tube trying to discharge the liquid on top of the tube walls where the beads are located.
 - 2.11. Remove the tube from the magnetic rack and vortex 10 seconds to allow the beads to enter the solution and incubate 1 minute at room temperature in a normal rack.
 - 2.12. Place the tube back in the magnetic rack and for 3 to 5 minutes, and transfer 20 to 25 μ l of the bead-free elution to a new tube and store at -80 ° C.

3. Preparación de reactivos

3.1 Perlas paramagnéticas

- a. Tome 1 ml de perlas Sera-Mag, asegúrese de mezclar bien antes de comenzar.
- b. Lave las perlas 3 veces en 1 ml de tampón TE (esto es para eliminar el azida de sodio de la solución), use el magneto para separar las perlas de los lavados, remueva el TE.
- c. Re suspenda en 50 ml de tampón TE.

3.2 GITC Buffer de lisis

- a. 35.46 g de GITC.
- b. 2.5 mL de solución madre de 1 M de Tris HCl pH 7.6-8.0
- c. 1 g de Sarkosyl.
- d. 2 ml de solución madre de 0.5 M EDTA.
- e. Aforar a 50 ml con agua destilada estéril.

4. Precios de reactivos

El precio de los reactivos fue cotizado con proveedores nacionales y se presenta el promedio de los precios por las casas comerciales.

3. Preparation of reagents

3.1 Paramagnetic beads

- a. Take 1 ml of Sera-Mag pearls, be sure to mix well before you start.
- b. Wash the beads 3 times in 1 ml of TE buffer (this is to remove sodium azide from the solution), use the magnet to separate the beads from the washes, remove the TE.
- c. Re-suspend in 50 ml of TE buffer.

3.2 GITC Lysis Buffer

- a. 35.46 g of GITC.
- b. 2.5 mL of 1 M Tris HCl pH 7.6-8.0 stock solution
- c. 1 g of Sarkosyl.
- d. 2 ml of 0.5 M EDTA stock solution.

e. Fill to 50 ml with sterile distilled water.

4. Reagent prices

The price of the reagents was quoted with national suppliers and the average prices for the commercial houses are presented.

Table 1. Reagents and prices

Reagent	Quantity	Approximate price * (pesos)	Number of samples	Price per sample * (pesos)
Tiocianato de guanidina (GTC)	500 g	\$2 000 000	7000	\$286
Sarkosyl	25 g	\$ 1 470 000	12500	\$117
Perlas Magnéticas GE Healthcare Sera-Mag Carboxylate-Modified	15 mL	\$3 000 000	18750	\$160
Isopropanol	500 mL	\$300 000	1250	\$240
DTA	250 g	\$ 250 000	1000	\$250
Ethanol	2500 mL	\$200 000	6250	\$ 32
Proteinasa K (20 mg/mL)	6 mL	300 000	500	\$600
Total				\$1685

* price in Colombian pesos

II. COMPARACIÓN MÉTODOS

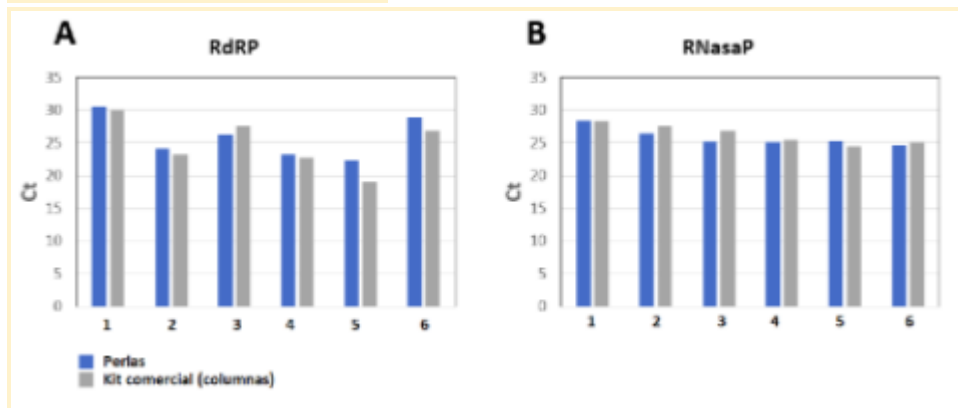


Figura 1. Evaluación de la extracción de ARN por perlas magnéticas para el diagnóstico de SARS-Cov2. Se muestra en Azul las muestras extraídas con perlas magnéticas y en Gris las mismas muestras utilizando el kit comercial. Se seleccionaron muestras positivas previamente identificadas por AGROSAVIA y con distinta concentración del virus. Los ciclos en los que aparece señal de detección se muestran para el gen del virus RdRP (Panel A) y el gen control humano RnaseP (Panel B).

II. COMPARISON OF METHODS

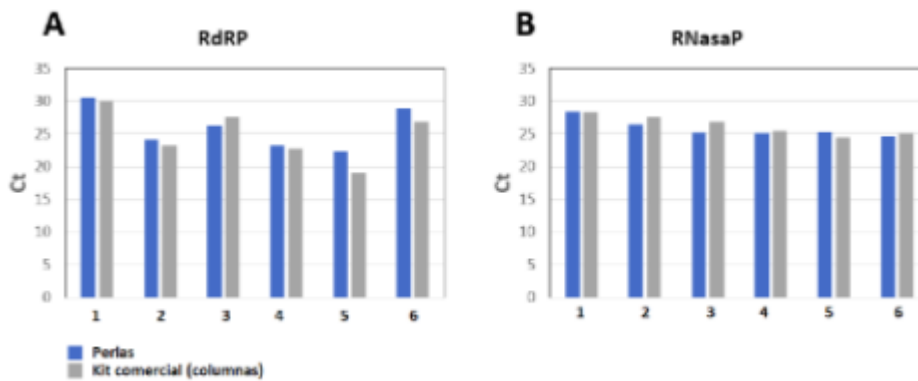


Figure 1. Evaluation of RNA extraction by magnetic beads to the diagnosis of SARS-CoV-2. In blue are the samples purified using magnetic beads and in gray are the same samples using the commercial kit. Selected samples were from known positive samples previously identified by AGROSAVIA and with different concentrations of the virus. The cycles in which the detection signal appears are shown for RdRP virus gene (Panel A) and human control gene RnasaP (Panel B).

III. CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA CONSTRUCCIÓN DE RACK MAGNÉTICOS

Las dimensiones de los imanes de neodimio utilizadas en nuestro caso son de 8 mm de diámetro interno, 12 mm de diámetro externo y 2 mm de ancho (Fig. 2A). Para el ensamblaje de los racks el imán debe situarse a la altura o debajo de la marca de 0.1 mL. Esto en nuestra experiencia facilita la suspensión de los ácidos nucleicos, debido a que el protocolo utiliza volúmenes de elución de 30 l.

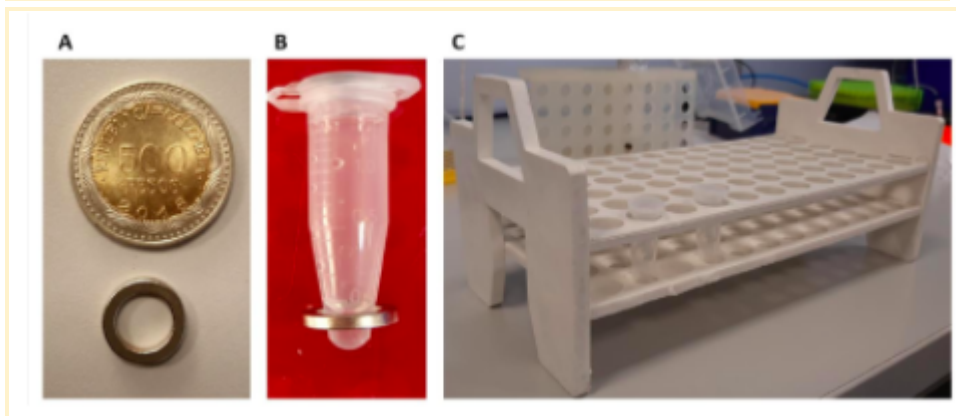


Figura 2. Construcción de gradillas con imanes de neodimio. Se muestra la dimensión relativa del imán circular de neodimio (Panel A), la altura por debajo del cuál el imán facilita la elución cuando la extracción se realiza en microtubos de 1.5 µl (Panel B), y un ejemplo de gradilla que se puede adaptar con los imanes de neodimio (Panel C).

III. TECHNICAL CONSIDERATIONS FOR CONSTRUCTION OF MAGNETIC RACK

The dimensions of the neodymium magnets used in our case are 8 mm internal diameter, 12

mm external diameter and 2 mm wide (Fig. 2A).

To assemble the racks, the magnet must be at or below the 0.1 mL mark. This in our experience facilitates the suspension of acids nucleic, because the protocol uses elution volumes of 30 μ l.

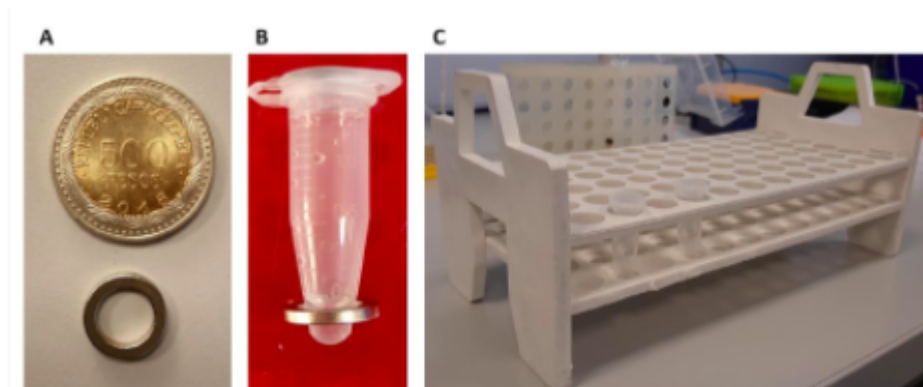


Figure 2. Construction of racks with neodymium magnets. I know shows the relative dimension of the circular neodymium magnet (Panel A), the height below which the magnet facilitates elution when the extraction is carried out in 1.5 μ l microtubes (Panel B), and an example of a rack that can be adapted with the neodymium magnets (Panel C). Neodymium magnets can be purchased from various suppliers in the international market.

Los magnetos de neodimio pueden comprarse a varios proveedores del mercado nacional. El precio en el mercado colombiano de cada magneto está entre 300 y 500 pesos colombianos (Tabla 2), por lo que ensamblar un rack para 64 muestras está en el orden de los 36 mil pesos. Finalmente, la construcción de rack magnéticos puede realizarse ajustando racks existentes en los laboratorios para tubos de 1.5 mL y se pueden seleccionar aquellos que permitan uso de pipeta multicanal para acelerar el proceso de extracción (Fig. 2C).

The price in the Colombian market for each magnet is between 300 and 500 Colombian pesos (Table 2), so assembling a rack for 64 samples is in the order of 36 thousand pesos. Finally, the magnetic rack construction can be carried out by adjusting existing racks in the laboratories for 1.5 mL tubes and can select those that allow the use of a multichannel pipette to accelerate the extraction process (Fig. 2C).

Table 2. Supplies to produce 3 magnetic racks of 36 samples

Component	Dimensions (mm)	Price (pesos)*	Quantity	Price total (pesos)*
Neodymium Magnet	id 8 mm od 12 mm thickness 2mm	\$500	108	\$54000

* price in Colombian pesos, id internal diameter, od external diameter

ACKNOWLEDGEMENTS

To Oscar Ortega-Recalde, for guiding us with his experience in standardization of this protocol and the BOMB.BIO group for sharing their experience.

REFERENCES

- Oberacker, P., Stepper, P., Bond, D. M., Höhn, S., Focken, J., Meyer, V., ... & Hore, S. R. (2019). Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS biology*, 17(1), e3000107.
- Yu, F., Qiu, T., Zeng, Y., Wang, Y., Zheng, S., Chen, X., & Chen, Y. (2018). Comparative evaluation of three Preprocessing Methods for extraction and detection of Influenza A Virus Nucleic Acids from sputum. *Frontiers in Medicine*, 5, 56.
- He, H., Li, R., Chen, Y., Pan, P., Tong, W., Dong, X., ... & Yu, D. (2017). Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Scientific reports*, 7, 45199.
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L. and Mulders, D.G., 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3).
- Kumar, M., Mazur, S., Ork, B.L., Postnikova, E., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Johnson, R. and Holbrook, M.R., 2015. Inactivation and safety testing of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virological methods*, 223, pp.13-18

