



INSTRUCCIONES PREPARACIÓN DE LA MASTER MIX

Para la realización de una PCR se necesitan los siguientes componentes:

- Muestra del paciente (que deberá ir en una torunda guardada en un tubo con o sin medio de transporte viral (UTM))
- Master Mix: lleva los componentes que se mezclan con la muestra del paciente para la detección. También contiene lo que llamamos “Control Interno”, que en nuestro caso es la RNasa P y que nos sirve para verificar que la obtención de la muestra del paciente se ha hecho correctamente (generalmente deberá aparecer SIEMPRE una curva al realizar la PCR porque indicará que la muestra se ha obtenido correctamente).
- Control Positivo: en el caso de nuestro reactivo el control positivo se proporciona aparte. Hay laboratorios que utilizan una muestra positiva del día anterior, pero nosotros lo damos y consiste en los genes que amplifica nuestro test.
- Control negativo: este no lo damos nosotros. Generalmente se utiliza agua libre de nucleasas.

Nuestros reactivos llegan al laboratorio en dos paquetes:

- A) Paquete 1: lleva dos tubos para la preparación de la Master Mix, un tubo llamado “Enzyme mix” y otro llamado “Probe Mix”.
- B) Paquete 2: lleva un tubo con el Control Positivo.

Preparación de los reactivos y la paca de PCR para el run:

1. Para preparar la reacción, lo primero que haremos será **preparar la master mix**. Para ello es importantísimo calcular el volumen total de Master Mix a preparar según cuántas muestras se quieran analizar. El volumen de Master Mix por pocillo deberá ser 16.5uL, obtenido al mezclar 12 uL del tubo llamado “Enzyme Mix” y 4.50 uL del tubo llamado “Probe Mix”.

Para reacciones N1 y N2 multiplexadas		
Componente	Volumen por muestra o control	Volumen para N muestras o controles
ENZYME MIX	12.00 µL	12.00 * [N + 1] µL
PROBE MIX	4.50 µL	4.50 * [N + 1] µL
Volumen total del Mix de Reacción	16.50 µL	-

Fórmula para calcular volumen total de Enzyme Mix = Número de muestras x 12uL x 1.1

Fórmula para calcular volumen total de Probe Mix = Número de muestras x 4.50uL x 1.1

(Nota: multiplico por 1.1 para añadir un pelín más de reactivo, ya que siempre se produce un error al pipetear)

2. Pipetear el volumen calculado de cada reactivo en el paso 1 en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Después de la adición de los reactivos, mezclar los reactivos de reacción pipeteando hacia arriba y hacia abajo con la pipeta. No utilizar el Vórtex para este paso.



3. Centrifugar durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo y luego colocar el tubo en una rejilla fría.

(Nota: ¡la rejilla fría es importantísimo! El ARN (presente tanto en nuestro reactivo como en las muestras de los pacientes) se degrada muy muy fácilmente si no se mantiene a una temperatura fría y podría alterar los resultados.)

4. ¡Ha llegado el momento de preparar la placa! Para ello vamos a instalar los tubos o placas de la tira de reacción en una rejilla de refrigeración.

El volumen total de la reacción (es decir, el volumen que deberá haber en cada pocillo) es de 20 uL. Por lo tanto, pondremos en **todos** los pocillos 16.5 uL de la Master Mix. Importante que se dispense primero la master mix en los pocillos adecuados para evitar contaminación.

- Ahora nos llevamos la rejilla a una campana de bioseguridad para añadir las muestras de pacientes. Una vez en la campana, cogemos cada tubo con muestra de paciente individualmente, lo mezclamos ligeramente en el Vórtex y tomamos 3.50 uL del fondo del tubo y se lo añadimos al pocillo correspondiente.
- 3.5 uL de nuestro reactivo de Control Positivo (aquel que venía en un pack individual) en un pocillo para el control positivo.
- 3.5uL de agua libre de nucleasas para el control negativo.

¡Ya está listo para meterlo en la PCR!