

# MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

## GUÍA DE USUARIO

Purificación automatizada de ADN y ARN de alta calidad  
procedente de muestras veterinarias

para uso con:

KingFisher™ Flex Purification System

MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor

KingFisher™ Duo Prime Purification System

KingFisher™ mL Purification System

Número de catálogo A32700, A32702

Número de publicación MAN0017829

Revisión A.0



Fabricante: Life Technologies Corporation | 2130 Woodward Street | Austin, TX 78744

Traducido a partir del número de publicación en inglés MAN0015944 Rev. C.0.

La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

**EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD :** EN LA MEDIDA DE LO ESTIPULADO POR LA LEY, LIFE TECHNOLOGIES Y/O SUS AFILIADOS NO SE HACEN RESPONSABLES POR DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSIGUIENTES EN RELACIÓN CON O DERIVADOS DE ESTE DOCUMENTO, INCLUYENDO EL USO DEL MISMO.

**Historial de revisiones:** N.º de pub. MAN0015944 (inglés)

Revisión	Fecha	Descripción
C.0	13 de diciembre de 2017	<ul style="list-style-type: none"><li>• Actualizada la declaración de uso en la portada.</li><li>• Reorganización menor del apartado de materiales necesarios por cuestiones de estilo y claridad.</li><li>• Correcciones menores de los nombres de producto.</li><li>• Ediciones menores por cuestiones de estilo y coherencia.</li></ul>
B.0	30 de junio de 2017	<ul style="list-style-type: none"><li>• Flujos de trabajo combinados y renombrados:<ul style="list-style-type: none"><li>- Simple: antes flujos de trabajo A y C</li><li>- Complejo: antes flujo de trabajo B</li><li>- Digestión: antes flujo de trabajo D</li></ul></li><li>• Añadido nuevo flujo de trabajo: Incubación de lisado.</li><li>• Añadido procesamiento de placa de muestras en el flujo de trabajo Digestión.</li><li>• Añadida lista de scripts de instrumentos.</li><li>• Reorganizado en capítulos para mejorar la navegación y la claridad.</li></ul>
A.0	22 de diciembre de 2016	Documento nuevo.

**Información importante sobre licencias:** Estos productos pueden estar cubiertos por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de estos productos, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

**Licencia de etiquetado de uso limitado n.º 569: Para uso veterinario y en investigaciones:** Aviso al comprador: La adquisición de este producto transmite al comprador el derecho limitado y no transferible de usar la cantidad adquirida del producto solo para uso veterinario y en investigaciones. No se otorga ningún otro derecho de manera explícita, por implicación o impedimentos legales mediante el presente documento. La adquisición de este producto no otorga al comprador ningún derecho adicional, incluyendo (entre otros) el derecho a transferir o revender el producto de cualquier manera o el derecho a usar el producto como agente terapéutico o componente para pruebas de diagnóstico en humanos. Para obtener información sobre la adquisición de derechos adicionales, póngase en contacto con [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com) u Licensing and Commercial Supply, Thermo Fisher Scientific, 5823 Newton Drive, Carlsbad, CA, 92008, United States.

**MARCAS COMERCIALES:** Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus subsidiarias a menos que se especifique lo contrario.

©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados.

# Índice

■	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Información sobre el producto</b>	<b>5</b>
		Descripción del producto	5
		Componentes y almacenamiento	5
		Materiales necesarios no suministrados	6
		Flujos de trabajo recomendados	8
■	<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Antes de empezar</b>	<b>9</b>
		Directrices de procedimiento	9
		Antes del primer uso del kit	9
		Determinación del ajuste máximo del agitador de placas	9
		Descarga e instalación del script	10
■	<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>Flujo de trabajo Simple</b>	<b>11</b>
		Flujo de trabajo: Simple	11
		Preparación de las placas de procesamiento	12
		Preparación de la mezcla de esferas/PK	12
		Preparación de la solución de lisis/adhesión	13
		Preparación de la muestra	14
		Combinación de la muestra con la mezcla de esferas/PK y la solución de lisis/adhesión	15
		Procesamiento de las muestras en el instrumento	15
■	<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>Flujo de trabajo Complejo</b>	<b>16</b>
		Flujo de trabajo: Complejo	16
		Preparación de las placas de procesamiento	17
		Preparación de la mezcla de esferas/PK	17
		Preparación de la solución de lisis	18
		Preparación del lisado aclarado	19
		Combinación del lisado aclarado con la mezcla de esferas/PK y la MagMAX™ CORE Binding Solution	20
		Procesamiento de las muestras en el instrumento	21

■	<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>Flujo de trabajo Digestión</b>	<b>22</b>
		Flujo de trabajo: Digestión	22
		Preparación de las placas de procesamiento	23
		Preparación de la solución de lisis/adhesión	23
		Preparación de la solución PK	24
		Tratamiento de las muestras con solución PK	25
		Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de tubo)	25
		Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de placa)	27
		Combinación de las muestras tratadas con proteinasa K con esferas y solución de lisis/adhesión	28
		Procesamiento de las muestras en el instrumento	29
■	<b>CAPÍTULO 6</b>	<b>Flujo de trabajo Incubación de lisado</b>	<b>30</b>
		Flujo de trabajo: Incubación de lisado	30
		Preparación de las placas de procesamiento	31
		Preparación de la mezcla de lisis/adhesión/esferas	31
		Preparación del lisado de muesca de oreja	32
		Combinación de lisado con mezcla de lisis/adhesión/esferas y proteinasa K	33
		Procesamiento de las muestras en el instrumento	33
■	<b>APÉNDICE A</b>	<b>Solución de problemas</b>	<b>34</b>
■	<b>APÉNDICE B</b>	<b>Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL</b>	<b>36</b>
		Materiales necesarios no suministrados	36
		Procedimiento de purificación	37
■	<b>APÉNDICE C</b>	<b>Seguridad</b>	<b>38</b>
		Seguridad química	39
		Seguridad biológica	40
		<b>Documentación y soporte</b>	<b>41</b>
		Documentación relacionada	41
		Asistencia al cliente y soporte técnico	41
		Garantía limitada del producto	41



# Información sobre el producto

**IMPORTANTE!** Antes de usar este producto, lea y entienda la información presentada en el apéndice “Seguridad” de este documento.

## Descripción del producto

El MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit está diseñado para la purificación rápida de ADN y ARN de alta calidad para análisis molecular posterior. El kit utiliza separación basada en esferas magnéticas y es compatible con los instrumentos siguientes:

- KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor
- MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor
- KingFisher™ Duo Prime Magnetic Particle Processor
- KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor

El kit está optimizado para una amplia gama de tipos de muestra. Véase “Flujos de trabajo recomendados” en la página 8.

## Componentes y almacenamiento

Tabla 1 MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

Contenido	N.º de cat. A32700 (100 reacciones)	N.º de cat. A32702 (500 reacciones)	Almacenamiento
MagMAX™ CORE Lysis Solution <sup>[1]</sup>	50 mL	275 mL	15-30 °C (temperatura ambiente)
MagMAX™ CORE Binding Solution	45 mL	220 mL	
MagMAX™ CORE Wash Solution 1	60 mL	300 mL	
MagMAX™ CORE Wash Solution 2	60 mL	300 mL	
MagMAX™ CORE Elution Buffer	12 mL	55 mL	
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	2,2 mL	11 mL	
MagMAX™ CORE Proteinase K (20 mg/mL)	1,25 mL	5 mL	

<sup>[1]</sup> Disponible para adquirirlo por separado (N.º de cat. A32837).

## Materiales necesarios no suministrados

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en **thermofisher.com**. MLS: Fisher Scientific (**fisherscientific.com**) u otro proveedor principal de productos de laboratorio.

Tabla 2 Materiales necesarios para todos los flujos de trabajo<sup>[1]</sup>

Artículo	Origen
<b>Instrumento y equipo</b>	
Uno de los instrumentos siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>KingFisher™ Flex Purification System</li> <li>MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor</li> </ul> Consulte el página 36 para ver otros instrumentos compatibles.	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.
Microcentrífuga de sobremesa con capacidad para 15 000 × g	MLS
Mezclador de laboratorio, agitador o equivalente	MLS
<b>Reactivos</b>	
PBS, pH 7.4 <sup>[2]</sup>	10010023
<b>(Opcional) Control positivo interno (IPC), uno de los siguientes:</b>	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	A29764
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	A29763
IPC suministrado con su kit PCR VetMAX™	<b>thermofisher.com</b>
<b>Tubos, placas y otros consumibles</b>	
Adhesive PCR Plate Foils o equivalente	AB0626
KingFisher™ Flex Microtiter Deepwell 96 plates, 50 placas	95040460
KingFisher™ 96 KF microplates (200 µL), 48 placas	97002540
KingFisher™ 96 tip comb for DW magnets, 100 peines	97002534

<sup>[1]</sup> Véase la Tabla 4 y la Tabla 5 para materiales adicionales necesarios para los flujos de trabajo Simple y Digestión.

<sup>[2]</sup> No requerido para el flujo de trabajo Incubación de lisado.

Tabla 3 Equipo opcional

Artículo	Origen
Biotang Inc Microplate Shaker o agitador de placas de título equivalente (para mezclar las esferas con las muestras; todos los flujos de trabajo)	Fisher Scientific™ 50-751-4965
Microcentrífuga de sobremesa con adaptadores de placas (para preparación del lisado en placas; flujos de trabajo Complejo y Digestión)	MLS

**Tabla 4** Materiales adicionales necesarios para el flujo de trabajo Simple (solo muestras de tejido)

Artículo	Origen
Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer	Fisher Scientific™ 15-340-163
PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm)	Fisher Scientific™ 11-312-10A

**Tabla 5** Materiales adicionales necesarios para el flujo de trabajo Digestión

Artículo	Origen
PK Buffer for MagMAX™ -96 DNA Multi-Sample Kit	4489111

## Flujos de trabajo recomendados

**Nota:** Para bacterias de difícil lisado, por ejemplo, *m. paratuberculosis* (MAP), utilice el MagMAX™ CORE Mechanical Lysis Module (N.º de cat. A32836, A37487).

Matriz de muestras	Ácido nucleico	Flujo de trabajo recomendado
<ul style="list-style-type: none"> <li>Muesca de oreja (forma circular, 2 a 3 mm de diámetro) en Lysis Solution</li> </ul>	Ácido nucleico viral	Incubación de lisado <sup>[1]</sup> (página 30)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Muesca de oreja (forma circular, 2 a 3 mm de diámetro) en PBS</li> <li>Muesca de oreja (forma triangular, aproximadamente 1 cm de ancho)</li> <li>Leche</li> <li>Plasma</li> <li>Suero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido nucleico viral</li> <li>ADN bacteriano</li> </ul>	Simple (página 11)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cultivo de Biomed Diagnostics InPouch™ TF (<i>trichomonas foetus</i>)</li> </ul>	ADN de <i>trichomonas foetus</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Semen</li> </ul>	Ácido nucleico viral	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hisopos: animal</li> <li>Sangre completa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido nucleico viral</li> <li>ADN genómico</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Tejido u órgano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido nucleico viral</li> <li>ADN bacteriano<sup>[2]</sup></li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Folículos pilosos</li> </ul>	ADN genómico	Digestión (página 22)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Muestras ambientales</li> <li>Heces</li> <li>Hisopos: medioambientales o fecales</li> </ul>	ADN bacteriano	Complejo (página 16)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Fluidos orales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido nucleico viral</li> <li>ADN bacteriano</li> </ul>	

<sup>[1]</sup> Recomendado si se necesita incubación durante la noche.

<sup>[2]</sup> Si no se necesita aislamiento concurrente de ácido nucleico viral y ADN bacteriano, utilice el flujo de trabajo Digestión.



# Antes de empezar

## Directrices de procedimiento

- Antes del uso, invierta las botellas de soluciones y tampones para asegurar un mezclado total.
- Mezcle las muestras con reactivos utilizando un agitador de placas o pipeteando arriba y abajo.

**Nota:** No utilice un agitador de placas con las tiras de tubos grandes necesarias para el instrumento KingFisher™ mL.

- Para evitar la contaminación cruzada:
  - Cubra la placa o tira de tubos durante los pasos de incubación y agitado, para evitar que se derrame.
  - Pipetee con cuidado los reactivos y muestras para no salpicar.
- Para evitar la contaminación de nucleasa:
  - Póngase guantes de laboratorio durante los procedimientos. Los guantes le protegen de los reactivos y protegen el ácido nucleico de las nucleasas presentes en la piel.
  - Utilice puntas de pipeta sin ácido nucleico para manipular los reactivos y evite introducir las puntas usadas en los contenedores de reactivos.
  - Descontamine las pipetas y bancos del laboratorio antes de empezar.

## Antes del primer uso del kit

### Determinación del ajuste máximo del agitador de placas

Si utiliza un agitador de placas, determine el ajuste máximo:

1. Verifique que la placa encaja con seguridad en el agitador.
2. Añada 1 mL de agua a cada pocillo de la placa y luego cubra con una lámina de sellado.
3. Determine el ajuste máximo que puede usar en su agitador sin que salpique nada de agua en la lámina de sellado.

## Descarga e instalación del script

Debe instalarse en el instrumento el script correspondiente para el MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit antes del primer uso.

1. En la página web del producto MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (en [thermofisher.com](http://thermofisher.com), busque por número de catálogo), desplácese hasta el apartado **Documentación del producto**.
2. Haga clic con el botón derecho en el archivo correspondiente para descargar la última versión del script de MagMAX\_CORE para su instrumento.

**Tabla 6** Scripts recomendados

Instrumento	Nombre del script
KingFisher™ Flex	MagMAX_CORE_Flex.bdz
KingFisher™ 96 MagMAX™ Express-96	MagMAX_CORE_KF-96.bdz
KingFisher™ Duo Prime	MagMAX_CORE_DUO.bdz
KingFisher™ mL	MagMAX_CORE_mL_no_heat.bdz

Si lo requiere su laboratorio, utilice uno de los scripts siguientes, que no calientan las muestras durante el paso de elución.

**Tabla 7** Scripts alternativos sin paso de elución calentada

Instrumento	Nombre del script
KingFisher™ Flex	MagMAX_CORE_Flex_no_heat.bdz
KingFisher™ 96 MagMAX™ Express-96	MagMAX_CORE_KF-96_no_heat.bdz
KingFisher™ Duo Prime	MagMAX_CORE_DUO_no_heat.bdz
KingFisher™ mL	MagMAX_CORE_mL_no_heat.bdz

3. Consulte la guía del usuario de su instrumento o póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica para recibir instrucciones sobre cómo instalar el script.

# 3

## Flujo de trabajo Simple

El flujo de trabajo Simple se recomienda para los siguientes tipos de muestra. El ácido nucleico para el que está optimizado este flujo de trabajo varía según el tipo de muestra; véase “Flujos de trabajo recomendados” en la página 8 para más detalles.

- Cultivo de Biomed Diagnostics InPouch™ TF (*trichomonas foetus*)
- Muesca de oreja (forma triangular, aproximadamente 1 cm de ancho)
- Muesca de oreja (forma circular, 2 a 3 mm de diámetro; incubación PBS)
- Leche
- Plasma
- Semen
- Suero
- Hisopos: animal
- Tejido u órgano
- Sangre completa

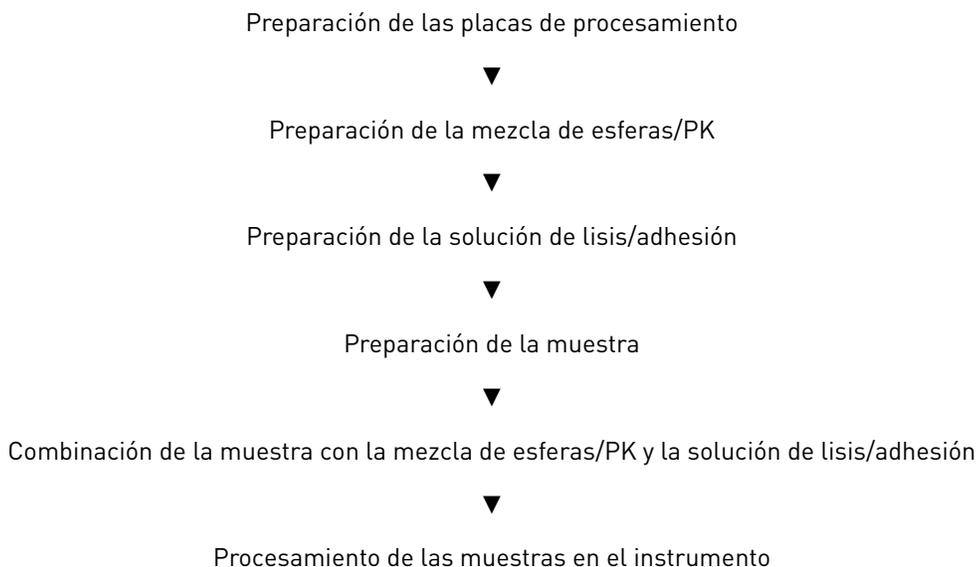
Siga este procedimiento si está utilizando los instrumentos siguientes:

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Siga el Apéndice B, “Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL” si está utilizando estos instrumentos:

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

### Flujo de trabajo: Simple



## Preparación de las placas de procesamiento

1. Prepare las placas de procesamiento.

Tabla 8 Preparación de la placa: Instrumento KingFisher™ Flex o MagMAX™ Express-96

ID de placa	Posición de la placa <sup>[1]</sup>	Tipo de placa	Reactivo	Volumen por pocillo
Placa de lavado 1	2	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Placa de lavado 2	3	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución	4	Estándar	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	5	Estándar	Coloque un peine para muestras con puntas en la placa.	

<sup>[1]</sup> Posición en el instrumento.

2. (Opcional) Para evitar la evaporación y la contaminación, cubra las placas de procesamiento preparadas con lámina de sellado hasta el momento de cargarlas en el instrumento.

## Preparación de la mezcla de esferas/PK

Recomendamos preparar una nueva mezcla de esferas/PK para cada carrera de procesamiento. Si es necesario, puede almacenar la mezcla de esferas/PK a 4 °C durante 1 semana como máximo.

1. Agite las MagMAX™ CORE Magnetic Beads exhaustivamente para garantizar que las esferas quedan totalmente resuspendidas.
2. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL
<b>Mezcla de esferas/PK total</b>	<b>30 µL</b>

## Preparación de la solución de lisis/adhesión

1. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL
<b>Solución de lisis/adhesión total (-IPC)</b>	<b>700 µL</b>
<i>(Opcional)</i> Control positivo interno (IPC), uno de los siguientes:	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Control positivo interno (IPC) suministrado con su kit PCR VetMAX™	Según se indica en las instrucciones del kit
<b>Solución de lisis/adhesión total (+IPC)</b>	<b>700 µL + volumen de IPC</b>

2. Mezcle invirtiendo el tubo o botella al menos 10 veces.

*(Opcional)* Almacene la solución de lisis/adhesión a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

## Preparación de la muestra

Prepare las muestras según el tipo de muestra.

Para...	Haga esto...
Cultivo de Biomed Diagnostics InPouch™ TF	Continúe con 300 µL del medio de cultivo previamente enriquecido.
Muesca de oreja (forma triangular, aproximadamente 1 cm de ancho)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Añada una muesca de oreja a un tubo de muestra de 5 mL.</li> <li>2. Añada 2 mL de PBS, pH 7.4 a cada muestra.</li> <li>3. Incube a temperatura ambiente con o sin agitar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin agitar: 15 minutos</li> <li>• Agitando moderadamente: 10 minutos</li> </ul> </li> <li>4. Continúe con 200 µL de sobrenadante.</li> </ol>
Muesca de oreja (forma circular, 2 a 3 mm de diámetro)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Añada una muesca de oreja a un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 200 µL de PBS, pH 7.4 a cada muestra.</li> <li>3. Incube a temperatura ambiente con o sin agitar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin agitar: 15 minutos</li> <li>• Agitando moderadamente: 10 minutos</li> </ul> </li> <li>4. Continúe con 50-200 µL de sobrenadante.</li> </ol>
Leche, plasma, suero o sangre completa	Continúe con 200 µL de muestra.
Semen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Añada 500 µL de semen a un tubo nuevo.</li> <li>2. Centrifugue a 15 000 × <i>g</i> durante 2 minutos.</li> <li>3. Continúe con 200 µL de sobrenadante.</li> </ol>
Hisopos: animal	<p>Siga el protocolo recomendado por el fabricante o siga el procedimiento siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rompa la punta del hisopo y añádala a un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 a cada muestra.</li> <li>3. Agite durante 3 minutos.</li> <li>4. Continúe con 200 µL de sobrenadante.</li> </ol>
Tejido u órgano	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Añada los componentes siguientes a un tubo de 2 mL: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tejido: 20 a 30 mg</li> <li>• PBS, pH 7.4: 1 mL</li> <li>• PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm): 2 esferas</li> </ul> </li> <li>2. Altere (batido de esferas) las muestras en un Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer a 6 m/s durante 45 segundos.</li> <li>3. Centrifugue a 1000 × <i>g</i> durante 1 minuto.</li> <li>4. Continúe con 100 µL de sobrenadante.</li> </ol>

## Combinación de la muestra con la mezcla de esferas/PK y la solución de lisis/adhesión

1. Invierta el tubo de mezcla de esferas/PK varias veces para resuspender las esferas y añada luego 30 µL de la mezcla de esferas/PK a los correspondientes pocillos de la placa o tira de tubos.
2. Transfiera el volumen adecuado de cada muestra preparada a un pocillo con mezcla de esferas/PK.

Para...	Use...
Cultivo de Biomed Diagnostics InPouch™ TF	300 µL de sobrenadante
Muesca de oreja (forma triangular, aproximadamente 1 cm de ancho) Semen Hisopos: animal	200 µL de sobrenadante
Muesca de oreja (forma circular, 2 a 3 mm de diámetro)	50-200 µL de sobrenadante
Leche, plasma, suero o sangre completa	200 µL de muestra
Tejido u órgano	100 µL de sobrenadante

3. Mezcle la muestra con Bead/PK Mix durante 2 minutos a temperatura ambiente según su método de mezclado.
  - **Utilizando un agitador de placas:** agite vigorosamente durante 2 minutos (véase “Determinación del ajuste máximo del agitador de placas” en la página 9).
  - **Pipeteando:** pipetee arriba y abajo varias veces y, a continuación, incube durante 2 minutos a temperatura ambiente. (Para procesamiento posterior en el KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, debe mezclarse mediante pipeteo).
4. Añada 700 µL de solución de lisis/adhesión a cada pocillo o tubo que contenga muestra.
5. Inmediatamente, proceda al procesamiento de las muestras en el instrumento (siguiente apartado).

## Procesamiento de las muestras en el instrumento

1. Seleccione el script apropiado en el instrumento (véase “Descarga e instalación del script” en la página 10).
2. Inicie la carrera y luego cargue las placas o tiras de tubos preparadas en las posiciones adecuadas cuando se lo indique el instrumento.

Almacene ácido nucleico purificado en hielo para su uso inmediato, a -20 °C durante 1 mes como máximo o a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

# 4

## Flujo de trabajo Complejo

El flujo de trabajo Complejo se recomienda para los siguientes tipos de muestra. El ácido nucleico para el que está optimizado este flujo de trabajo varía según el tipo de muestra; véase “Flujos de trabajo recomendados” en la página 8 para más detalles.

- Muestras ambientales
- Heces
- Fluidos orales
- Hisopos: medioambientales o fecales

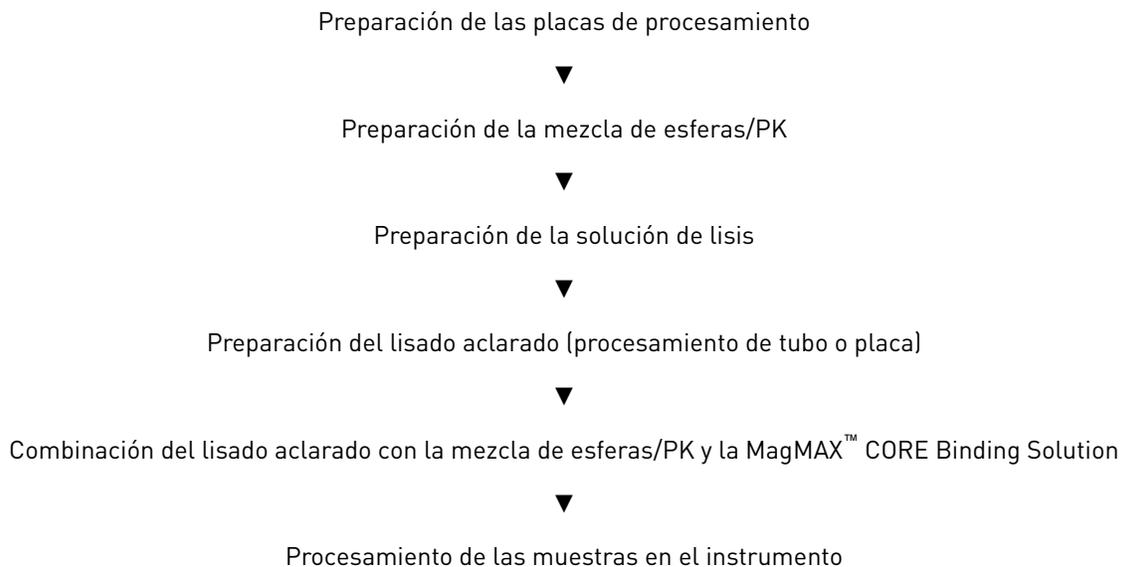
Siga este procedimiento si está utilizando los instrumentos siguientes:

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Siga el Apéndice B, “Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL” si está utilizando estos instrumentos:

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

### Flujo de trabajo: Complejo



## Preparación de las placas de procesamiento

1. Prepare las placas de procesamiento.

Tabla 9 Preparación de la placa: Instrumento KingFisher™ Flex o MagMAX™ Express-96

ID de placa	Posición de la placa <sup>[1]</sup>	Tipo de placa	Reactivo	Volumen por pocillo
Placa de lavado 1	2	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Placa de lavado 2	3	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución	4	Estándar	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	5	Estándar	Coloque un peine para muestras con puntas en la placa.	

[1] Posición en el instrumento.

2. (Opcional) Para evitar la evaporación y la contaminación, cubra las placas de procesamiento preparadas con lámina de sellado hasta el momento de cargarlas en el instrumento.

## Preparación de la mezcla de esferas/PK

Recomendamos preparar una nueva mezcla de esferas/PK para cada carrera de procesamiento. Si es necesario, puede almacenar la mezcla de esferas/PK a 4 °C durante 1 semana como máximo.

1. Agite las MagMAX™ CORE Magnetic Beads exhaustivamente para garantizar que las esferas quedan totalmente resuspendidas.
2. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL
<b>Mezcla de esferas/PK total</b>	<b>30 µL</b>

## Preparación de la solución de lisis

1. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Lysis Solution	450 µL
<i>(Opcional)</i> Control positivo interno (IPC), uno de los siguientes:	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Control positivo interno (IPC) suministrado con su kit PCR VetMAX™	Según se indica en las instrucciones del kit
<b>Solución total de lisis (+IPC)</b>	<b>450 µL + volumen de IPC</b>

2. Mezcle invirtiendo el tubo o botella al menos 10 veces.

*(Opcional)* Almacene la solución de lisis a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

## Preparación del lisado aclarado

### 1. Prepare las muestras según el tipo de muestra.

Para...	Haga esto...
Muestras ambientales Heces	<ol style="list-style-type: none"> <li>Transfiera 0,2-0,3 g de muestra a un tubo de 2 mL.</li> <li>Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 y luego agite vigorosamente durante 3 minutos.</li> <li>Centrifugue según se indica. <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Para purificación de ácido nucleico viral:</b> centrifugue a 15 000 × <i>g</i> durante 1 minuto.</li> <li><b>Para purificación bacteriana de ADN o purificación concurrente de ácidos nucleicos bacterianos y virales:</b> centrifugue a 100 × <i>g</i> durante 1 minuto.</li> </ul> </li> <li>Continúe con 200 µL de sobrenadante.</li> </ol>
Fluidos orales	<ol style="list-style-type: none"> <li>Mezcle brevemente la muestra de fluido oral.</li> <li>Continúe con 300 µL de muestra.</li> </ol>
Hisopos: medioambientales o fecales	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Muestras fecales:</b> dé vueltas a un hisopo clínico en una muestra fecal. <b>Hisopos medioambientales:</b> continúe con un hisopo ambiental.</li> <li>Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 a un tubo de 2 mL.</li> <li>Dé vueltas al hisopo en 1 mL de PBS, pH 7.4 durante 5-10 segundos, retirando la mayor cantidad posible de material de la muestra, y luego deseche el hisopo. Como alternativa, rompa la punta del hisopo y deje el hisopo en la PBS, pH 7.4.</li> <li>Agite vigorosamente durante 3 minutos o hasta que la muestra esté suspendida.</li> <li>Centrifugue según se indica. <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Para purificación de ácido nucleico viral:</b> centrifugue a 15 000 × <i>g</i> durante 1 minuto.</li> <li><b>Para purificación bacteriana de ADN o purificación concurrente de ácidos nucleicos bacterianos y virales:</b> centrifugue a 100 × <i>g</i> durante 1 minuto.</li> </ul> </li> <li>Continúe con 200 µL de sobrenadante.</li> </ol>

## 2. Añada la solución de lisis y luego aclare el lisado.

Para...	Haga esto...
Procesamiento en tubos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Para cada muestra, añada 450 µL de solución de lisis a un tubo de 2 mL nuevo.</li> <li>2. Añada el volumen de muestra indicado en el paso 1 en la página 19 a la solución de lisis.</li> <li>3. Agite vigorosamente durante 3 minutos.</li> <li>4. Centrifugue a 15 000 × <i>g</i> durante 2 minutos.</li> <li>5. Retire el sobrenadante (lisado aclarado) sin alterar el pellet.</li> </ol>
Procesamiento en placas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Para cada muestra, añada 450 µL de solución de lisis a los pocillos correspondientes de una placa de pocillos profundos.</li> <li>2. Añada el volumen de muestra indicado en el paso 1 en la página 19 a la solución de lisis.</li> <li>3. Selle la placa con lámina de sellado.</li> <li>4. Agite la placa a velocidad moderada durante 5 minutos.</li> <li>5. Centrifugue a 3000 × <i>g</i> durante 5 minutos.</li> <li>6. Retire el sobrenadante (lisado aclarado) sin alterar el pellet.</li> </ol>

## Combinación del lisado aclarado con la mezcla de esferas/PK y la MagMAX™ CORE Binding Solution

1. Invierta el tubo de mezcla de esferas/PK varias veces para resuspender las esferas y añada luego 30 µL de la mezcla de esferas/PK a los correspondientes pocillos de la placa o tira de tubos.
2. Transfiera el volumen adecuado de cada lisado aclarado (véase “Preparación del lisado aclarado” en la página 19) a un pocillo con la mezcla de esferas/PK.

Para...	Use...
Fluidos orales	600 µL
Muestras medioambientales, muestras fecales e hisopos	500 µL

3. Mezcle la muestra con Bead/PK Mix durante 2 minutos a temperatura ambiente según su método de mezclado.
  - **Utilizando un agitador de placas:** agite vigorosamente durante 2 minutos (véase “Determinación del ajuste máximo del agitador de placas” en la página 9).
  - **Pipeteando:** pipetee arriba y abajo varias veces y, a continuación, incube durante 2 minutos a temperatura ambiente. (Para procesamiento posterior en el KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, debe mezclarse mediante pipeteo).

4. Añada 350  $\mu$ L de MagMAX™ CORE Binding Solution.
5. Inmediatamente, proceda al procesamiento de las muestras en el instrumento (siguiente apartado).

## Procesamiento de las muestras en el instrumento

1. Seleccione el script apropiado en el instrumento (véase “Descarga e instalación del script” en la página 10).
2. Inicie la carrera y luego cargue las placas o tiras de tubos preparadas en las posiciones adecuadas cuando se lo indique el instrumento.

Almacene ácido nucleico purificado en hielo para su uso inmediato, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes como máximo o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para un almacenamiento a largo plazo.

# Flujo de trabajo Digestión

El flujo de trabajo Digestión se recomienda para los siguientes tipos de muestra. El ácido nucleico para el que está optimizado este flujo de trabajo varía según el tipo de muestra; véase “Flujos de trabajo recomendados” en la página 8 para más detalles. El flujo de trabajo Digestión no se recomienda para la purificación de ARN.

- Muestras ambientales
- Heces
- Folículos pilosos
- Hisopos: medioambientales o fecales
- Tejido u órgano

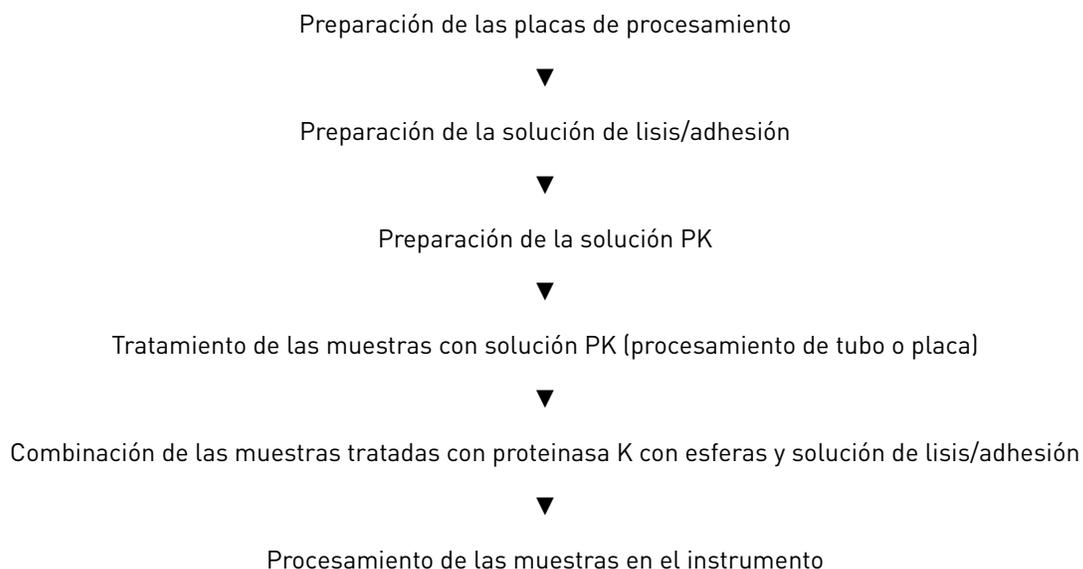
Siga este procedimiento si está utilizando los instrumentos siguientes:

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Siga el Apéndice B, “Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL” si está utilizando estos instrumentos:

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

## Flujo de trabajo: Digestión



## Preparación de las placas de procesamiento

1. Prepare las placas de procesamiento.

Tabla 10 Preparación de la placa: Instrumento KingFisher™ Flex o MagMAX™ Express-96

ID de placa	Posición de la placa <sup>[1]</sup>	Tipo de placa	Reactivo	Volumen por pocillo
Placa de lavado 1	2	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Placa de lavado 2	3	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución	4	Estándar	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	5	Estándar	Coloque un peine para muestras con puntas en la placa.	

[1] Posición en el instrumento.

2. (Opcional) Para evitar la evaporación y la contaminación, cubra las placas de procesamiento preparadas con lámina de sellado hasta el momento de cargarlas en el instrumento.

## Preparación de la solución de lisis/adhesión

1. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL
<b>Solución de lisis/adhesión total (-IPC)</b>	<b>700 µL</b>
<i>(Opcional)</i> Control positivo interno (IPC), uno de los siguientes:	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Control positivo interno (IPC) suministrado con su kit PCR VetMAX™	Según se indica en las instrucciones del kit
<b>Solución de lisis/adhesión total (+IPC)</b>	<b>700 µL + volumen de IPC</b>

2. Mezcle invirtiendo el tubo o botella al menos 10 veces.

*(Opcional)* Almacene la solución de lisis/adhesión a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

## Preparación de la solución PK

Prepare la solución PK inmediatamente antes de utilizarla.

1. Combine los siguientes componentes para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
PK Buffer for MagMAX™ -96 DNA Multi-Sample Kit	90 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL
<b>Solución PK total</b>	<b>100 µL</b>

2. Invierta el tubo varias veces para mezclar y luego centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.
3. Continúe inmediatamente con el paso siguiente:
  - **Para el procesamiento de un tubo:** pase a “Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de tubo)” en la página 25.
  - **Para el procesamiento de una placa:** pase a “Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de placa)” en la página 27.

## Tratamiento de las muestras con solución PK

### Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de tubo)

Trate las muestras con solución PK según el tipo de muestra.

Tipo de muestra	Procedimiento
Muestras ambientales Heces	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfiera 0,2-0,3 g de muestra a un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 y luego agite vigorosamente durante 3 minutos.</li> <li>3. Centrifugue a <math>100 \times g</math> durante 1 minuto.</li> <li>4. Añada 200 <math>\mu</math>L de sobrenadante a un tubo nuevo.</li> <li>5. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK al sobrenadante transferido y luego agite brevemente para mezclar.</li> <li>6. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>7. Centrifugue a <math>15\,000 \times g</math> durante 2 minutos.</li> <li>8. Continúe con 200 <math>\mu</math>L de muestra digerida.</li> </ol>
Folículos pilosos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque 10-15 folículos pilosos en un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK a la muestra.</li> <li>3. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>4. Centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.</li> <li>5. Continúe con el volumen de muestra digerida que esté disponible para pipetear. El volumen disponible será inferior a 100 <math>\mu</math>L.</li> </ol>
Hisopos: medioambientales o fecales	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Muestras fecales:</b> dé vueltas a un hisopo clínico en una muestra fecal. <b>Hisopos medioambientales:</b> continúe con un hisopo ambiental.</li> <li>2. Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 a un tubo de 2 mL.</li> <li>3. Dé vueltas al hisopo en la PBS, pH 7.4 durante 510 segundos, retirando la mayor cantidad posible de material de la muestra, y luego deseche el hisopo. Como alternativa, rompa la punta del hisopo y deje el hisopo en la PBS, pH 7.4.</li> <li>4. Agite vigorosamente durante 3 minutos o hasta que la muestra esté suspendida.</li> <li>5. Centrifugue a <math>100 \times g</math> durante 1 minuto.</li> <li>6. Añada 200 <math>\mu</math>L de sobrenadante a un tubo nuevo.</li> <li>7. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK al sobrenadante transferido y luego agite brevemente para mezclar.</li> <li>8. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>9. Centrifugue a <math>15\,000 \times g</math> durante 2 minutos.</li> <li>10. Continúe con 200 <math>\mu</math>L de muestra digerida.</li> </ol>
Tejido u órgano	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfiera 20-30 mg de tejido a un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK a la muestra.</li> </ol>

Tipo de muestra	Procedimiento
	<ol style="list-style-type: none"><li>3. Incube durante 2 horas a 55 °C.</li><li>4. Centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.</li><li>5. Continúe con el volumen de muestra digerida que esté disponible para pipetear. El volumen disponible será inferior a 100 µL. Utilice una punta de pipeta P1000 para transferir la muestra viscosa.</li></ol>

Tratamiento de las muestras con solución PK (procesamiento de placa)

Trate las muestras con solución PK según el tipo de muestra.

Tipo de muestra	Procedimiento
Muestras ambientales Heces	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfiera 0,2-0,3 g de muestra a un pocillo de un tubo de 2 mL.</li> <li>2. Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 a cada muestra y luego agite vigorosamente durante 3 minutos.</li> <li>3. Centrifugue a <math>100 \times g</math> durante 1 minuto.</li> <li>4. Transfiera 200 <math>\mu</math>L de cada sobrenadante a una placa de pocillos profundos.</li> <li>5. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK a cada sobrenadante transferido y, a continuación, pipetee arriba y abajo para mezclar.</li> <li>6. Selle la placa con lámina de sellado.</li> <li>7. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>8. Centrifugue a <math>3000 \times g</math> durante 5 minutos.</li> <li>9. Continúe con 200 <math>\mu</math>L de muestra digerida.</li> </ol>
Folículos pilosos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque 10-15 folículos pilosos en un pocillo de una placa de pocillos profundos.</li> <li>2. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK a cada muestra.</li> <li>3. Selle la placa con lámina de sellado.</li> <li>4. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>5. Centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo de la placa.</li> <li>6. Continúe con el volumen de muestra digerida que esté disponible para pipetear. El volumen disponible será inferior a 100 <math>\mu</math>L.</li> </ol>
Hisopos: medioambientales o fecales	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Muestras fecales:</b> dé vueltas a un hisopo clínico en una muestra fecal. <b>Hisopos medioambientales:</b> continúe con un hisopo ambiental.</li> <li>2. Añada 1 mL de PBS, pH 7.4 a un tubo de 2 mL.</li> <li>3. Dé vueltas al hisopo en la PBS, pH 7.4 durante 510 segundos, retirando la mayor cantidad posible de material de la muestra, y luego deseche el hisopo. Como alternativa, rompa la punta del hisopo y deje el hisopo en la PBS, pH 7.4.</li> <li>4. Agite vigorosamente durante 3 minutos o hasta que las muestras estén suspendidas.</li> <li>5. Centrifugue a <math>100 \times g</math> durante 1 minuto.</li> <li>6. Transfiera 200 <math>\mu</math>L de cada sobrenadante a una placa de pocillos profundos.</li> <li>7. Añada 100 <math>\mu</math>L de solución PK a cada sobrenadante transferido y, a continuación, pipetee arriba y abajo para mezclar.</li> <li>8. Selle la placa con lámina de sellado.</li> <li>9. Incube durante 30 minutos a 55 °C.</li> <li>10. Centrifugue a <math>3000 \times g</math> durante 2 minutos.</li> </ol>

Tipo de muestra	Procedimiento
	11. Continúe con 200 µL de muestra digerida.
Muestras de tejido u órgano	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfiera 20-30 mg de tejido a un pocillo de una placa de pocillos profundos.</li> <li>2. Añada 100 µL de solución PK a cada muestra.</li> <li>3. Selle la placa con lámina de sellado.</li> <li>4. Incube durante 2 horas a 55 °C.</li> <li>5. Centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo de la placa.</li> <li>6. Continúe con el volumen de muestra digerida que esté disponible para pipetear. El volumen disponible será inferior a 100 µL. Utilice una punta de pipeta P1000 para transferir la muestra viscosa.</li> </ol>

## Combinación de las muestras tratadas con proteinasa K con esferas y solución de lisis/adhesión

1. Agite el tubo de MagMAX™ CORE Magnetic Beads varias veces para resuspender las esferas y añada luego 20 µL de las esferas a los correspondientes pocillos de la placa o tira de tubos.

**Nota:** No utilice la Bead/PK Mix.

2. Añada el volumen adecuado de cada muestra tratada con proteinasa K a un pocillo con esferas.

Para...	Use...
Muestras medioambientales, heces Hisopos	200 µL
Folículos pilosos Muestras de tejido u órgano	Hasta 100 µL

3. Mezcle la muestra con esferas durante 2 minutos a temperatura ambiente según su método de mezclado.
  - **Utilizando un agitador de placas:** agite vigorosamente durante 2 minutos (véase “Determinación del ajuste máximo del agitador de placas” en la página 9).
  - **Pipeteando:** pipetee arriba y abajo varias veces y, a continuación, incube durante 2 minutos a temperatura ambiente. (Para procesamiento posterior en el KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, debe mezclarse mediante pipeteo).

4. Añada 700 µL de solución de lisis/adhesión a cada muestra.
5. Inmediatamente, proceda al procesamiento de las muestras en el instrumento (siguiente apartado).

## Procesamiento de las muestras en el instrumento

1. Seleccione el script apropiado en el instrumento (véase “Descarga e instalación del script” en la página 10).
2. Inicie la carrera y luego cargue las placas o tiras de tubos preparadas en las posiciones adecuadas cuando se lo indique el instrumento.

Almacene ácido nucleico purificado en hielo para su uso inmediato, a -20 °C durante 1 mes como máximo o a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

# 6

## Flujo de trabajo Incubación de lisado

El flujo de trabajo Incubación de lisado está recomendado para muescas de oreja que requieran procesamiento con:

- Un paso de lisis prolongado antes del aislamiento del ácido nucleico.
- Adición de muescas directamente a una solución de lisis.

Siga este procedimiento si está utilizando los instrumentos siguientes:

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Siga el Apéndice B, “Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL” si está utilizando estos instrumentos:

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

### Flujo de trabajo: Incubación de lisado

El flujo de trabajo Incubación de lisado se puede realizar con una incubación de 15 minutos o durante la noche en Lysis Solution. Si las muestras se incuban durante la noche, prepare las placas de procesamiento y prepare la mezcla de lisis/adhesión/esferas después de que la incubación esté completa.

#### Incubación de 15 min

Preparación de las placas de procesamiento



Preparación de la mezcla de lisis/adhesión/esferas



Preparación del lisado de muesca de oreja  
(incubación de 15 min)



Combinación de lisado con mezcla de lisis/  
adhesión/esferas y proteinasa K



Procesamiento de las muestras en el instrumento

#### Incubación durante la noche (16-18 horas)

Preparación del lisado de muesca de oreja  
(purificación durante la noche; 16-18 horas)



Preparación de las placas de procesamiento



Preparación de la mezcla de lisis/adhesión/esferas



Combinación de lisado con mezcla de lisis/  
adhesión/esferas y proteinasa K



Procesamiento de las muestras en el instrumento

## Preparación de las placas de procesamiento

1. Prepare las placas de procesamiento.

Tabla 11 Preparación de la placa: Instrumento KingFisher™ Flex o MagMAX™ Express-96

ID de placa	Posición de la placa <sup>[1]</sup>	Tipo de placa	Reactivo	Volumen por pocillo
Placa de lavado 1	2	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Placa de lavado 2	3	Pocillos profundos	MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución	4	Estándar	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	5	Estándar	Coloque un peine para muestras con puntas en la placa.	

[1] Posición en el instrumento.

2. (Opcional) Para evitar la evaporación y la contaminación, cubra las placas de procesamiento preparadas con lámina de sellado hasta el momento de cargarlas en el instrumento.

## Preparación de la mezcla de lisis/adhesión/esferas

1. Combine los siguientes componentes, en el orden indicado, para el número necesario de muestras, más un 10 % de excedente.

Componente	Volumen por muestra
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL
<b>Mezcla de lisis/adhesión/esferas total (-IPC)</b>	<b>720 µL</b>
<i>(Opcional)</i> Control positivo interno (IPC), uno de los siguientes:	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Control positivo interno (IPC) suministrado con su kit PCR VetMAX™	Según se indica en las instrucciones del kit
<b>Mezcla de lisis/adhesión/esferas total (+IPC)</b>	<b>720 µL + volumen de IPC</b>

2. Mezcle invirtiendo el tubo o botella al menos 10 veces.

## Preparación del lisado de muesca de oreja

1. Añada 300  $\mu\text{L}$  de MagMAX™ CORE Lysis Solution a cada muesca de oreja.
2. Incube sin agitar a temperatura ambiente durante el tiempo deseado.
  - 15 minutos
  - Durante la noche (16-18 horas)
3. Continúe con sobrenadantes individuales o acervados.

Para...	Haga esto...
Muestras individuales	Continúe con 250 $\mu\text{L}$ de sobrenadante.
Muestras acervadas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Combine 50 <math>\mu\text{L}</math> de sobrenadantes individuales en un tubo de microcentrifuga de 2 mL.</li> <li>2. Si el volumen de sobrenadantes acervados es menor de 250 <math>\mu\text{L}</math>, añada MagMAX™ CORE Lysis Solution para un total de 250 <math>\mu\text{L}</math>.</li> <li>3. Agite brevemente para mezclar las muestras acervadas.</li> <li>4. Continúe con 250 <math>\mu\text{L}</math> de sobrenadante acervado.</li> </ol> <p>Por ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para un acervo de 10 muestras, el volumen combinado es de 500 <math>\mu\text{L}</math> (10 <math>\times</math> 50 <math>\mu\text{L}</math>). Continúe con el siguiente paso con 250 <math>\mu\text{L}</math> del acervo.</li> <li>• Para un acervo de 4 muestras, el volumen combinado es de 200 <math>\mu\text{L}</math> (4 <math>\times</math> 50 <math>\mu\text{L}</math>). Añada 50 <math>\mu\text{L}</math> de MagMAX™ CORE Lysis Solution y continúe con el paso siguiente con el acervo de 250 <math>\mu\text{L}</math>.</li> </ul>
Análisis individual de un acervo positivo	Continúe con el sobrenadante restante de cada muestra individual en el acervo positivo. El volumen puede ser inferior a 250 $\mu\text{L}$ .

Almacene los lisados individuales y acervados para volver a analizarlos: hasta 48 horas a temperatura ambiente o a largo plazo a menos de  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Combinación de lisado con mezcla de lisis/adhesión/esferas y proteinasa K

1. Añada 10  $\mu\text{L}$  de MagMAX™ CORE Proteinase K a los pocillos correspondientes en la placa o tira de tubos.
2. Añada 250  $\mu\text{L}$  de sobrenadante individual o acervado.
3. Mezcle el sobrenadante con proteinasa K pipeteando arriba y abajo varias veces y, a continuación, incube durante 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Invierta el tubo con mezcla de lisis/adhesión/esferas varias veces para resuspender las esferas y, a continuación, añada 720  $\mu\text{L}$  de mezcla de lisis/adhesión/esferas a cada muestra.
5. Inmediatamente, proceda al procesamiento de las muestras en el instrumento (siguiente apartado).

## Procesamiento de las muestras en el instrumento

1. Seleccione el script apropiado en el instrumento (véase “Descarga e instalación del script” en la página 10).
2. Inicie la carrera y luego cargue las placas o tiras de tubos preparadas en las posiciones adecuadas cuando se lo indique el instrumento.

Almacene ácido nucleico purificado en hielo para su uso inmediato, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes como máximo o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para un almacenamiento a largo plazo.



# Solución de problemas

Observación	Posible causa	Acción recomendada
La elución es de color marrón claro.	Las esferas magnéticas se trasladaron a la elución.	Una pequeña cantidad de esferas en la muestra no inhibe las reacciones de RT-PCR o PCR.  Retire las esferas del ácido nucleico eluido colocando la placa o tira de tubos en un soporte magnético (~1 minuto) y transfiera luego la solución de ácido nucleico a una placa o tira de tubos nueva sin nucleasa.
Señal de ARN o ADN escasa o inexistente (es decir, el valor de $C_t$ es más alto de lo esperado). En las muestras de la prueba, el valor de $C_t$ de la diana del IPC está fuera del intervalo de valores validados (valor de $C_t$ de IPC no conforme; muestra no válida).	Los inhibidores están presentes en el ácido nucleico recuperado.  Estos flujos de trabajo producen ácido nucleico de alta calidad para la mayoría de las muestras. Sin embargo, las muestras que contengan cantidades excepcionalmente altas de inhibidores pueden transferir inhibidores a niveles suficientes como para afectar a la RT-PCR o PCR.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Diluya la muestra de ácido nucleico no válida al 1:10 en tampón TE 1X.</li> <li>Realice un nuevo análisis PCR con el ácido nucleico diluido. <ul style="list-style-type: none"> <li>Si el ácido nucleico diluido es positivo para la diana, o si es negativo para la diana con un valor conforme de <math>C_t</math> de IPC, se valida el resultado.</li> <li>Si el ácido nucleico diluido es negativo para la diana con un valor no conforme de <math>C_t</math> de IPC, el resultado será no validado. En este caso, diluya la muestra biológica original 1:10 en PBS 1X y repita luego la purificación y la PCR. Si el resultado sigue siendo no validado, repita la purificación y la PCR en una nueva muestra biológica.</li> </ul> </li> </ol> <p>Repita la purificación utilizando el flujo de trabajo Complejo.</p>
	Las muestras con cantidades elevadas de ácido nucleico, como tejido, sangre aviar y cultivos bacterianos, puede saturar las esferas magnéticas. La saturación de esferas reduce la recuperación de ácido nucleico.	Para las muestras que arrojen una obtención reducida de ARN o ADN de IPC, diluya las muestras 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en PBS 1X. Utilice la dilución que arroje la mejor obtención de IPC.
	El ADN o ARN de IPC no se unió bien a las esferas magnéticas a causa del material extracelular en la muestra.	Añada MagMAX™ CORE Magnetic Beads a la solución de lisis/adhesión en lugar de preparar una mezcla de esferas/PK o añadir esferas directamente a la muestra.



Observación	Posible causa	Acción recomendada
Producción pobre de ARN viral de muestras o hisopos tisulares, fecales o medioambientales.	Se utilizó el flujo de trabajo Digestión para la purificación del ácido nucleico viral.	Siga el flujo de trabajo adecuado. Véase “Flujos de trabajo recomendados” en la página 8.
Variación de pocillo a pocillo en la producción de ARN/ADN de muestras duplicadas.	Las esferas magnéticas no se resuspendieron/dispersaron totalmente.	En general, las esferas magnéticas se dispersan más fácilmente cuando la temperatura de la mezcla es > 20 °C. Asegúrese de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitar las esferas magnéticas exhaustivamente antes de preparar una mezcla de esferas.</li> <li>• Resuspender completamente la mezcla de esferas antes de añadirla a las muestras.</li> </ul>
Las muestras positivas se agrupan en la placa PCR.	Las muestras con títulos altos (con C <sub>t</sub> bajo o prematuro) han contaminado los pocillos adyacentes.	Repita la purificación de ácido nucleico de las muestras positivas o sospechosas sin las muestras con títulos altos.
	Si se utiliza la misma disposición de placa de la purificación de ácido nucleico a través de PCR, puede ser difícil determinar si se produjo contaminación durante la purificación de ácido nucleico o durante la PCR.	Evite las salpicaduras cuando pipetee los reactivos o las muestras.



# Purificación con el instrumento KingFisher™ Duo Prime o KingFisher™ mL

## Materiales necesarios no suministrados

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en **thermofisher.com**. MLS: Fisher Scientific (**fisherscientific.com**) u otro proveedor principal de productos de laboratorio.

**Tabla 12** Materiales necesarios para el procesamiento en el instrumento KingFisher™ Duo Prime

Artículo	Origen
KingFisher™ Duo Prime Purification System	5400110
KingFisher™ Duo Combi pack for Microtiter 96 Deepwell plate (tip combs, plates and elution strips for 96 samples)	97003530
KingFisher™ Duo Elution Strip, 40 pieces <sup>[1]</sup>	97003520
KingFisher™ Duo 12-tip comb, for Microtiter 96 Deepwell plate, 50 pieces <sup>[1]</sup>	97003500
KingFisher™ Flex Microtiter Deepwell 96 plates <sup>[1]</sup>	95040460

<sup>[1]</sup> Incluido en el KingFisher™ Duo Combi pack (N.º de cat. 97003530).

**Tabla 13** Materiales necesarios para el procesamiento en el instrumento KingFisher™ mL

Artículo	Origen
KingFisher™ mL Purification System	5400050
KingFisher™ mL Tubes and tip combs para 240 muestras	97002141
KingFisher™ mL Tip comb, 800 pieces	97002111
KingFisher™ mL Tube, 20 x 45 pieces	97002121

## Procedimiento de purificación

**Nota:** Cuando realice este procedimiento para el procesamiento en el instrumento KingFisher™ mL, mezcle las muestras pipeteando arriba y abajo. No utilice un agitador de placas con las tiras de tubos grandes necesarias para este instrumento.

1. Siga el flujo de trabajo para su tipo de muestra, empezando con la preparación de lisado de la muestra por medio de la combinación de las muestras con esferas y solución de lisis.

**Nota:** No prepare las placas ni los tubos de procesamiento antes de preparar las muestras.

2. Añada MagMAX™ CORE Wash Solutions y MagMAX™ CORE Elution Buffer a las posiciones indicadas, según su instrumento.

Cargue el peine para muestras con puntas y todas las placas o tiras de tubos al mismo tiempo. El instrumento no le pide cargar elementos individualmente.

**Tabla 14** Preparación de la placa: instrumento KingFisher™ Duo Prime

ID de fila	Fila en la placa	Tipo de placa	Reactivo	Volumen por pocillo
Muestra	A	Pocillos profundos	Mezcla de lisado de la muestra/esferas	Varía por muestra
Lavado 1	B		MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Lavado 2	C		MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución <sup>[1]</sup>	Tira de tubos separada <sup>[2]</sup>	Tira de elución	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	H	Pocillos profundos	Coloque un peine para muestras con puntas en la placa.	

<sup>[1]</sup> Compruebe que la tira de elución esté colocada en la dirección correcta en el bloque de elución.

<sup>[2]</sup> Colocada en el elemento de calentamiento.

**Tabla 15** Preparación de la tira de tubos: instrumento KingFisher™ mL

ID de posición	Posición de la tira de tubos	Tubo	Reactivo	Volumen por pocillo
Muestra	1	Estándar	Mezcla de lisado de la muestra/esferas	Varía por muestra
Lavado 1	2		MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Lavado 2	3		MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Elución	4		MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peine para muestras con puntas	N/A	N/A	Deslice el peine para muestras con puntas en el portapeines.	

3. Siga “Procesamiento de las muestras en el instrumento” en la página 15.



# Seguridad



**ADVERTENCIA! SEGURIDAD GENERAL.** Si este producto se utiliza de alguna forma que no se especifica en la documentación del usuario, se pueden producir lesiones personales o daños en el instrumento o el dispositivo. Asegúrese de que todo el que utilice este producto haya recibido instrucciones sobre las prácticas de seguridad generales para laboratorios y la información de seguridad facilitada en este documento.

- Antes de utilizar un instrumento o dispositivo, lea y comprenda la información de seguridad facilitada en la documentación de usuario suministrada por el fabricante del instrumento o dispositivo.
  - Antes de manipular productos químicos, lea y comprenda las hojas de datos de seguridad (HDS) y use el equipo de protección individual apropiado (guantes, batas, protección ocular, etc.). Para obtener las HDS, consulte la sección "Documentación y soporte" de este documento.
-



## Seguridad química



### **ADVERTENCIA! MANIPULACIÓN GENERAL DE PRODUCTOS**

**QUÍMICOS.** Para reducir al mínimo los riesgos, asegúrese de que el personal del laboratorio lea y ponga en práctica las directrices sobre seguridad generales para el uso, la conservación y la eliminación de productos químicos que se dan a continuación. Consulte las hojas de datos de seguridad pertinentes para conocer las precauciones e instrucciones específicas:

- Lea y comprenda las hojas de datos de seguridad (HDS o SDS) que proporciona el fabricante de los productos químicos antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso. Para obtener las HDS o SDS, consulte el apartado "Documentación y soporte" de este documento.
- Reduzca al mínimo el contacto con productos químicos. Utilice un equipo de protección individual adecuado durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, gafas de seguridad, guantes o ropa protectora).
- Reduzca al mínimo la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con una ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora de humo).
- Compruebe periódicamente la ausencia de fugas o derrames. Si se produce una fuga o un derrame, siga los procedimientos de limpieza del fabricante, tal y como se recomienda en la hoja de datos de seguridad.
- Manipule los residuos químicos bajo una campana extractora de humo.
- Asegúrese de que se utilizan los contenedores de residuos principales y secundarios. (Los contenedores principales contienen los residuos inmediatos. Los contenedores secundarios contienen cualquier derrame o fuga del contenedor principal. Ambos contenedores deben ser compatibles con el material de residuo y deben cumplir los requisitos federales, estatales y locales sobre el almacenamiento en contenedores).
- Después de vaciar el recipiente de residuos, ciérrelo bien con el tapón suministrado.
- Identifique (mediante análisis, si es necesario) los residuos generados por las aplicaciones, los reactivos y los sustratos utilizados en su laboratorio.
- Asegúrese de que los residuos se almacenan, transfieren, transportan y eliminan de acuerdo con todas las normativas locales, estatales/provinciales o nacionales.
- **¡IMPORTANTE!** Los materiales radiactivos o que impliquen un peligro biológico pueden requerir una manipulación especial, pudiéndose aplicar limitaciones en materia de eliminación.

## Seguridad biológica



**ADVERTENCIA! RIESGO BIOLÓGICO.** Las muestras biológicas como, por ejemplo, tejidos, fluidos corporales, agentes infecciosos y sangre humana o de otros animales, pueden transmitir enfermedades infecciosas. Realice todo el trabajo en instalaciones que dispongan del equipamiento adecuado y con el equipo de seguridad apropiado (por ejemplo, dispositivos de contención física). El equipo de seguridad puede incluir también artículos para protección personal, como guantes, batas, trajes, protectores de zapatos, botas, respiradores, protectores faciales, protección para los ojos o gafas de seguridad. Los trabajadores deben recibir formación de acuerdo con los requisitos de la institución o empresa y los requisitos legales aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente peligrosos. Siga todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables. Las referencias siguientes proporcionan directrices generales sobre la manipulación de muestras biológicas en un entorno de laboratorio.

- Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)* (Seguridad biológica en laboratorios microbiológicos y biomédicos [BMBL]) 5ª edición, n.º de publicación del HHS (CDC) 21-1112, revisado en diciembre de 2009; encontrado en:  
[www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf)
- Organización Mundial de la Salud, *Laboratory Biosafety Manual* (Manual de seguridad biológica en laboratorios), 3ª edición, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11; encontrado en:  
[www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf)

# Documentación y soporte

## Documentación relacionada

Documento	Número de la publicación
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex User Manual</i>	N07669
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime Technical Manual</i>	N16621
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ mL User Manual</i>	1508260
<i>Applied Biosystems™ MagMAX™ Express 96 User Manual</i>	N07849
<i>MagMAX™ CORE Mechanical Lysis Module User Guide</i>	MAN0015945

## Asistencia al cliente y soporte técnico

Visite [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support) para conocer lo último en servicios y asistencia, incluyendo lo siguiente:

- Números de teléfono de contacto de todo el mundo
- Soporte del producto, incluyendo:
  - Preguntas más frecuentes (FAQ) sobre productos
  - Software, parches y actualizaciones
  - Formación para muchas aplicaciones e instrumentos
- Pedidos y soporte web
- Documentación del producto, incluyendo lo siguiente:
  - Guías de usuario, manuales y protocolos
  - Certificados de análisis
  - Hojas de datos de seguridad (HDS) (Safety Data Sheets, SDS; también conocidas como MSDS)

**Nota:** Para conocer las HDS o SDS de los reactivos y productos químicos de otros fabricantes, póngase en contacto con el fabricante.

## Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation y/o su(s) filial(es) garantizan sus productos tal y como se establece en los términos y condiciones generales de venta de Life Technologies, que se pueden encontrar en el sitio web de Life Technologies [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). Si tiene alguna duda, póngase en contacto con Life Technologies en [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).

