



Preparación de Tiras o Tubos con Master Mix

Código	IPI.CD-04 v.00
Página	1 de 3

1. Objetivo y Alcance

En este protocolo se establecen los lineamientos para la preparación adecuada del Master Mix o mezcla necesaria para la reacción en cadena de la polimerasa junto con los primers y sonda para la detección de microorganismos y/o partículas virales obtenido de muestras clínicas en el laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular de la Universidad de Pamplona.

El propósito es la adecuada preparación del Master Mix que permita la amplificación del ácido nucleico que sirva para la detección de microorganismos y/o partículas virales.

2. Responsable

El responsable de ejecutar el presente procedimiento es un profesional en el área de Bacteriología y Laboratorio Clínico y/o Microbiología y Bioanálisis Clínico con experiencia en Biología Molecular

3. Definiciones

3.1 Placa

Recipiente utilizado para poder observar diferentes tipos de muestras biológicas

3.2 Prueba qPCR

Técnica de Laboratorio denominada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. (Fuente: <https://web.archive.org/web/20120106172047/http://www.rtpcr.co.uk/>)

3.3 Cabina de flujo laminar

Básicamente es un espacio, mediante el cual se le da un tratamiento específico al aire, permitiendo trabajar en una zona con un control estricto de partículas no viales extremando el control de contaminación.

Las demás definiciones que aplican para el presente Documento se encuentran contempladas en la **Norma NTC ISO 9001 vigente Sistema de Gestión de la Calidad. Fundamentos y vocabulario.**

Elaboró		Aprobó		Validó	
Firma Diana Patricia Bohada Lizarazo		Firma Raúl Rodríguez Martínez		Firma Mabel Johanna Coronel Acevedo	
Fecha	22 de febrero de 2023	Fecha	22 de febrero de 2023	Fecha	02 de agosto de 2023

INFORMACIÓN DOCUMENTADA NO CONTROLADA




Preparación de Tiras o Tubos con Master Mix

Código	IPI.CD-04 v.00
Página	2 de 3

4. Contenido

N° DE ACTIVIDAD	ACTIVIDADES	RESPONSABLE														
1	PREPARACIÓN															
1.1	Antes de iniciar atemperar los reactivos incluidos en el Kit a. Ponerse los elementos de protección personal antes de iniciar el trabajo. b. Desinfectar la superficie de trabajo con alcoholantiséptico al 70% c. Preparar el Master Mix de PCR como se indica a continuación	Profesional responsable del área														
1.2	Se realiza el cálculo de los volúmenes de reactivos a adicionar multiplicando por el número de muestras a procesar, de acuerdo con la tabla que se presenta a continuación: <table border="1"><tr><td>qPCR Mix 2X</td><td>10,0 µl</td></tr><tr><td>Primer-sonda</td><td>0,5 µl</td></tr><tr><td>Control reacción</td><td>0,5 µl</td></tr><tr><td>Agua libre Nucleasas</td><td>4,0 µl</td></tr><tr><td>Volumen Master Mix</td><td>15 µl</td></tr><tr><td>ADN/Control Positivo/Control Negativo</td><td>5 µl</td></tr><tr><td>Volumen Total</td><td>20 µl</td></tr></table> Se registran los cálculos y el mapa de la posición de las muestras en el cuaderno de registro diario de Preparación de Master Mix	qPCR Mix 2X	10,0 µl	Primer-sonda	0,5 µl	Control reacción	0,5 µl	Agua libre Nucleasas	4,0 µl	Volumen Master Mix	15 µl	ADN/Control Positivo/Control Negativo	5 µl	Volumen Total	20 µl	Profesional responsable del área
qPCR Mix 2X	10,0 µl															
Primer-sonda	0,5 µl															
Control reacción	0,5 µl															
Agua libre Nucleasas	4,0 µl															
Volumen Master Mix	15 µl															
ADN/Control Positivo/Control Negativo	5 µl															
Volumen Total	20 µl															
1.3	Se limpia cuidadosamente la superficie de trabajo y las pipetas con suficiente alcohol y secar con servilletas. Encender la luz ultravioleta durante 15 minutos antes de iniciar la PCR.	Profesional responsable del área														
2	PROCESO															
2.1	Se toma un vial de 1,5 ml y marcar como MM (Master Mix).	Profesional responsable del área														
2.2	Se seleccionan tubos de PCR de 0.2 ml (tiras x 8 tubos) o platos de PCR (96 pozos) estériles de acuerdo con el número de muestras a procesar. Se ubican los strips o la placa de PCR en el cooler de acuerdo con lista de trabajo. Se registra la posición de cada muestra de la lista del mapa de la corrida del software del termociclador	Profesional responsable del área														
2.3	Se retira del congelador los reactivos a utilizar y se procede a colocarlos en la gradilla de refrigeración. Se prepara la Master Mix siguiendo los cálculos realizados previamente. Se mezcla en vortex antes de agregar cada reactivo, excepto la Taq polimerasa.	Profesional responsable del área														
2.4	Adicione 20 µl de la MM a cada tubo de PCR.	Profesional responsable del área														
2.5	Llevar la placa con el mix de PCR al área de carga de RNA.	Profesional responsable del área														

	Preparación de Tiras o Tubos con Master Mix	Código	IPI.CD-04 v.00
		Página	3 de 3

2.6	Se limpia el área de trabajo y las micropipetas con Etanol 70% y prender Luz UV por 15 min	Profesional responsable del área
2.7	Se llenan los FPI.CD-09 “Monitoreo Luz Ultravioleta”, FPI.CD-06 “Monitoreo Temperatura Ambiental” y FPI.CD-07 “Monitoreo Humedad Ambiental”	Profesional responsable del área

5. Documentos de Referencia

- NTC ISO 9000 vigente Sistema Integrado de Gestión. Fundamentos y Vocabulario.
- NTC ISO 9001 vigente Sistema Integrado de Gestión. Requisitos.
- Ley 962 de 2005 “Antitrámites”
- Ley 594 de 2000 Archivo General de la Nación.
- TIB MOLBIOL - LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control Cat No. 40-0776-96
- TIB MOLBIOL - LightMix Modular SARS-CoV-2 (COVID19) RdRp Cat No.53-0777-96
- TIB MOLBIOL - Liophilized 1 -step RT-PCR Polymerase Mix Cat No. 90-9999-96
- GeneProof Mycobacterium tuberculosis PCR Kit

6. Historia de Modificaciones

Versión	Naturaleza del Cambio	Fecha de Aprobación	Fecha de Validación

7. Anexos

No aplica