

MAGFLO™ PCR

Sfere magnetiche per la purificazione PCR



Sommario

1. Come utilizzare le sfere magnetiche MAGFLO PCR	2
1.1 Uso previsto	2
1.2 Simboli usati nel documento	2
1.3 Note sulla sicurezza	3
1.4 Cosa contiene il reagente MAGFLO PCR	4
2. Applicazione delle sfere magnetiche MAGFLO PCR	4
2.1 Introduzione alla purificazione PCR	5
3. Prima di iniziare	6
3.1 Spedizione, stoccaggio e manipolazione del reagente	6
3.2 Controllo di qualità	6
3.3 Materiali e reagenti aggiuntivi	6
3.4 Preparazione dei reagenti	7
4. Protocollo	8
4.1 Purificazione PCR	8
5. Risoluzione dei problemi	9
6. Informazioni per l'utente sulle soluzioni di pipettaggio da banco di INTEGRA	10
6.1 Soluzioni ad alta produttività per le sfere magnetiche MAGFLO PCR	10
7. Informazioni di ordinazione	11
8. Colophon	11

1. Come utilizzare le sfere magnetiche MAGFLO PCR per la purificazione PCR

1.1 Uso previsto

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR sono destinate al **solo uso di ricerca (RUO)** nell'ambito della biologia molecolare. Non sono destinate o convalidate per l'uso nella diagnosi di malattie o altre condizioni mediche. Sono progettate per essere utilizzate manualmente o insieme a una manipolazione automatizzata dei liquidi in applicazioni di biologia molecolare.

1.2 Simboli usati nel documento

Il manuale di istruzioni segnala in modo specifico i rischi residui utilizzando il seguente simbolo:



Avvertenza: Questo simbolo di sicurezza mette in guardia da pericoli che potrebbero provocare lesioni. Indica anche pericoli per i macchinari, per i materiali e per l'ambiente. È fondamentale osservare le relative precauzioni.



Nota: Questo simbolo identifica note importanti sul corretto funzionamento del reagente e sulle funzionalità di ottimizzazione del lavoro.

Tabella 1: Simboli sulla confezione delle sfere magnetiche MAGFLO PCR.

	QR code per accedere al manuale di istruzioni e alla SDS
	Temperatura limite di stoccaggio
	Data di scadenza
	Numero di lotto
	Informazioni sul produttore

1.3 Note sulla sicurezza

Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per tutte le informazioni sulla sicurezza e lo smaltimento. Per accedervi è sufficiente leggere il QR code sulla confezione.



Nota: secondo la SDS, le sfere magnetiche MAGFLO NGS non sono classificate come sostanza pericolosa, pertanto non esistono dichiarazioni precauzionali per la prevenzione o la risposta in merito a questo prodotto.



Avvertenza: osservare sempre le procedure della propria struttura e le precauzioni di carattere generale riguardanti la sicurezza, come l'utilizzo di guanti monouso, occhiali protettivi e un camice da laboratorio, quando si maneggiano sostanze chimiche.

1.4 Cosa contiene il reagente MAGFLO PCR

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR sono costituite da particelle superparamagnetiche in un tampone di legame.



Nota: leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il kit.



Nota: consultare le normative locali sui rifiuti per informazioni sullo smaltimento sicuro.

2. Applicazione delle sfere magnetiche MAGFLO PCR

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR offrono una soluzione efficace per la purificazione degli ampliconi durante la fase di purifica dei prodotti di PCR. Gli acidi nucleici purificati vengono eluiti utilizzando un tampone di eluizione a basso tenore salino o acqua per biologia molecolare e possono essere utilizzati direttamente nelle applicazioni a valle.

Il protocollo può essere facilmente eseguito utilizzando un dispositivo per la separazione magnetica con modulo INTEGRA MAG; in tal modo non è necessario montare e smontare manualmente la piastra dal magnete. I moduli MAG utilizzano array magnetici che si muovono verticalmente consentendo alla piastra di rimanere ferma durante i passaggi di magnetizzazione. I flussi di lavoro per la purificazione delle sfere magnetiche possono essere automatizzati anche con il robot di pipettaggio ASSIST PLUS o utilizzando una pipetta elettronica VIAFLO 96 o VIAFLO 384, che consentono una manipolazione semplificata dei liquidi.

Prestazioni

- Progettato per ampliconi di DNA.
- Elevato recupero di ampliconi di dimensioni superiori a 100 bp durante la fase di purifica dei prodotti di PCR.
- Rimuove efficacemente primer in eccesso, dimeri di primer, nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi.
- Non è necessario alcun passaggio di centrifugazione o filtrazione.

Requisiti di immissione del campione

- I campioni devono contenere un amplicone di DNA a doppio filamento.

I frammenti di acido nucleico sono pronti per essere utilizzati nelle seguenti applicazioni a valle

- PCR/qPCR/ddPCR
- Rilevazione di mutazioni e genotipizzazione
- Protocolli di sequenziamento Sanger
- Analisi di frammenti
- Microarray
- Reazioni enzimatiche
- Clonaggio
- Esperimenti di trasfezione
- Ligazione

2.1 Introduzione alla purificazione PCR

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR offrono una purificazione affidabile degli ampliconi per PCR a uno specifico rapporto tra sfere e campione pari a 1,8. Le sfere magnetiche legano selettivamente frammenti di DNA di dimensioni superiori a 100 bp. Il processo di purificazione della PCR prevede tre semplici passaggi (legame, lavaggio ed eluizione) durante i quali le sfere magnetiche legano i frammenti di DNA ≥ 100 bp, eliminando al contempo primer in eccesso, dimeri di primer, nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi. I frammenti di interesse vengono quindi recuperati in un tampone di eluizione (**Figura 1**).

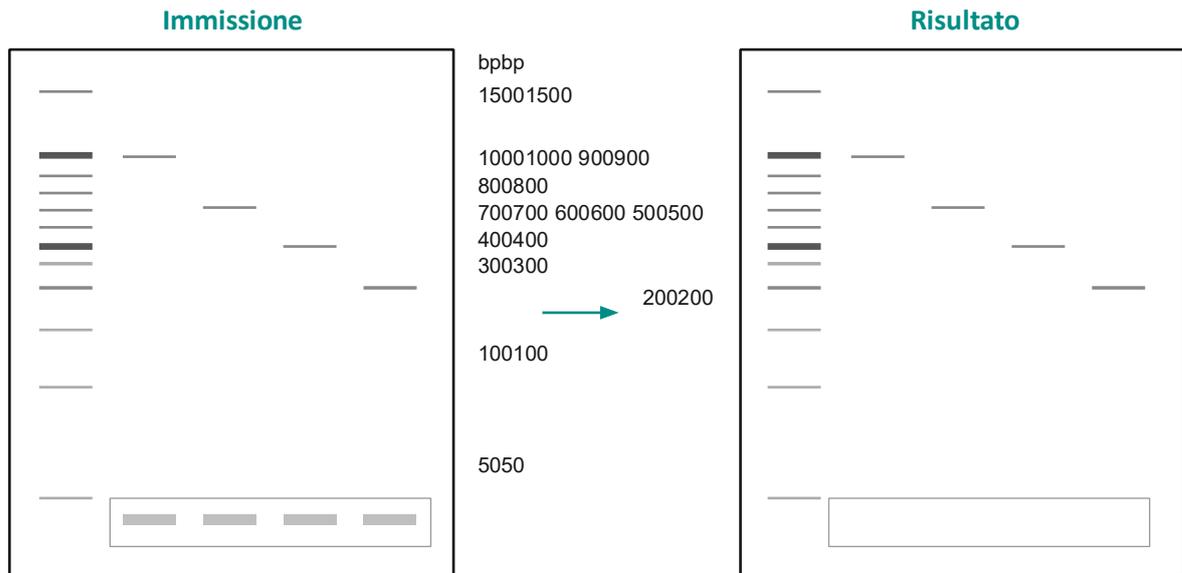


Figura 1: panoramica schematica del processo di purificazione della PCR illustrato con un grafico DNA ladder. Durante questo processo, i frammenti piccoli, che rappresentano i primer e/o i dimeri di primer (inferiori a 100 bp), vengono rimossi e vengono isolati ampliconi di dimensioni diverse.

3. Prima di iniziare

3.1 Spedizione, stoccaggio e manipolazione del reagente

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR sono stabili durante la spedizione a temperatura ambiente, ma non possono essere congelate. La temperatura di stoccaggio raccomandata è di 2-8 °C. Portare il prodotto a temperatura ambiente (TA) prima dell'uso.



Nota: una volta congelate, le sfere magnetiche MAGFLO PCR non sono più idonee per l'uso.



Nota: non utilizzare il prodotto dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

3.2 Controllo di qualità

Le sfere magnetiche MAGFLO PCR vengono prodotte secondo protocolli predeterminati e convalidati nel sistema di gestione della qualità. Dopo la produzione di ogni lotto viene inoltre eseguito un controllo di qualità. Ciò viene documentato nel certificato di conformità per garantire una qualità costante del prodotto.



Nota: il certificato di conformità è disponibile su richiesta. Contattare il proprio rappresentante INTEGRA locale.

3.3 Materiali e reagenti aggiuntivi

Materiali e reagenti che devono essere forniti da parte dell'utente.

Apparecchiatura

- Dispositivo per la separazione magnetica (ad esempio modulo INTEGRA MAG/HEATMAG)
- Pipette (manuali o elettroniche)
- Un sistema di manipolazione dei liquidi (ad esempio ASSIST PLUS, VIAFLO 96 o VIAFLO 384)



Nota: si consiglia di utilizzare ASSIST PLUS con un modulo MAG/HEATMAG integrato per ottenere una purificazione walk-away delle sfere magnetiche. In questa configurazione, il software integra e automatizza completamente il passaggio di separazione magnetica, controllando il movimento di salita e di discesa dell'array magnetico.



Nota: si consiglia di combinare VIAFLO 96 o VIAFLO 384 con un modulo MAG/HEATMAG per eseguire una separazione magnetica semi-automatizzata senza trasferimento di materiale da laboratorio. In questa configurazione, il passaggio di separazione magnetica viene completamente automatizzato spostando



Nota: si consiglia di utilizzare le pipette elettroniche multicanale VIAFLO o le pipette manuali EVOLVE con un modulo MAG/HEATMAG standalone per flussi di lavoro manuali. In questa configurazione, il passaggio di separazione magnetica viene completamente automatizzato spostando l'array magnetico verso l'alto e il basso.

Materiali di consumo

- Materiale di laboratorio per le sostanze di partenza scelto dall'utilizzatore, come micropiastre da 96 o 384 pozzetti, strip per PCR da 8 pozzetti o provette per microcentrifuga
- Materiale di laboratorio per le sostanze di destinazione scelto dall'utilizzatore, come micropiastre da 96 o 384 pozzetti, strip per PCR da 8 pozzetti o provette per microcentrifuga
- Puntali per pipette
- Serbatoi per reagenti



Nota: si consiglia di utilizzare Bio-Rad Hard-Shell®96-Well PCR Plate (HSP9601) per prestazioni ottimali. Le piastre a pozzetti profondi INTEGRA (6535) sono consigliate per un pipettaggio affidabile dei reagenti sui sistemi di manipolazione dei liquidi INTEGRA, oppure se il volume di reazione supera il volume della piastra per PCR. Si consiglia inoltre l'uso di GRIPTIPS® per puntali per pipette a i reagenti utilizzati nel protocollo.

Reagenti

- Etanolo al 70% (preparato di fresco da alcol non denaturato) per i passaggi di lavaggio
- Acqua per biologia molecolare (priva di DNasi) o tampone di eluizione (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) per il passaggio di eluizione



Nota: è importante preparare ogni volta una soluzione fresca di etanolo all'70%.
Lo stoccaggio della soluzione prima dell'uso potrebbe compromettere l'efficacia del passaggio di lavaggio e influenzare negativamente i risultati.

3.4 Preparazione dei reagenti

- Assicurarsi di preparare la soluzione di etanolo al 70% subito prima dell'uso.
- Portare le sfere magnetiche MAGFLO PCR a TA e agitarle in vortex per risospendere completamente le particelle magnetiche prima dell'uso.

4. Protocollo

4.1 Purificazione PCR

Il protocollo fornito è valido per i formati di piastra da 96 o 384 pozzetti, per le provette per microcentrifuga e per le piastre a pozzetti profondi 2,2 ml.

1. Utilizzare un rapporto pari a 1,8x tra sfere e campione per la purifica dei prodotti di PCR.
2. Portare le sfere magnetiche MAGFLO PCR a TA e agitarle in vortex per risospendere completamente le particelle magnetiche prima dell'uso.
3. Misurare il volume di reazione del/i campione/i e determinare se è necessario trasferire il/i campione/i in una piastra o in una provetta idonee per il processamento.
4. Aggiungere il volume di reazione 1,8x di sfere magnetiche MAGFLO PCR in ciascun pozzetto. Un esempio del rispettivo volume delle sfere è riportato nella **Tabella 2** di seguito.

$$\text{Volume campione immesso} \times \text{rapporto} = \text{volume delle sfere magnetiche}$$

Esempio: 50 µl × 1,8 = 90 µl di sfere magnetiche

5. Pipettare su e giù per 5-20 volte o agitare in vortex per 30 secondi fino a quando la soluzione non sembra omogenea.
6. Incubare a TA per 5 minuti.
7. Attivare il magnete e separare le sfere magnetiche. Incubare a TA fino a quando la soluzione non è completamente priva di sfere magnetiche e si forma il pellet di sfere.
8. Aspirare il surnatante privo di sfere e gettarlo. Non spostare il pellet di sfere magnetiche.
9. Aggiungere il volume appropriato di etanolo fresco al 70% in ogni pozzetto nel modo seguente:
30 µl per una piastra da 384 pozzetti; 200 µl per una piastra da 96 pozzetti; 500-1000 µl per una provetta per microcentrifuga o per una piastra a pozzetti profondi
10. Incubare a TA per 1 minuto senza risospendere il pellet.
11. Aspirare il surnatante privo di sfere e gettarlo. Non spostare il pellet di sfere magnetiche.
12. Ripetere i passaggi 9-11 per eseguire una seconda fase di lavaggio con etanolo al 70%.
13. Mantenendo attivo il magnete, rimuovere il liquido residuo e asciugare all'aria le sfere magnetiche per 3-15 minuti. Assicurarsi che tutto il liquido residuo sia stato rimosso.
14. Disattivare il magnete e aggiungere il volume appropriato (tra 10 e 100 µl) di acqua per biologia molecolare o di tampone di eluizione in ciascun pozzetto (ad esempio, 10 µl di campione e 10 µl di volume di eluizione rappresentano una diluizione 1:1).
15. Pipettare su e giù per 20-30 volte o agitare in vortex per 30 secondi fino a quando la soluzione non sembra omogenea.
16. Incubare a TA per 5 minuti.
17. Attivare il magnete e separare le sfere magnetiche. Incubare a TA fino a quando la soluzione non è completamente priva di sfere magnetiche.
18. Trasferire il surnatante privo di sfere contenente DNA purificato in una nuova piastra o provetta e conservare gli eluati a 2-8 °C per uno stoccaggio a breve termine oppure -20 °C per uno stoccaggio a lungo termine.

Tabella 2: volumi per ottenere un rapporto MAGFLO PCR/campione pari a 1,8x.

MATERIALE DI LABORATORIO	VOLUME DI REAZIONE PCR (µl)	VOLUME SFERE MAGNETICHE (µl)
Piastra per PCR da 96 pozzetti	10	18
	20	36
	50	90
Piastra per PCR da 384 pozzetti	5	9
	7	12,6
	10	18
Provetta per microcentrifuga	50	90
	100	180
	150	270

5. Risoluzione dei problemi

Utilizzare questa guida per risolvere alcuni problemi noti che potrebbero verificarsi. Per ulteriore assistenza, contattare il rappresentante commerciale o il tecnico specializzato INTEGRA di zona.

Tabella 3: risoluzione dei problemi.

PROBLEMA	CAUSA	SOLUZIONE
Resa bassa	Reazione PCR inefficiente	Aumentare il numero di cicli di amplificazione per la PCR e/o ottimizzare ulteriormente la reazione di PCR.
	Prodotto di piccole dimensioni (bp)	Frammenti di DNA di piccole dimensioni producono normalmente rese inferiori.
	Interferenza da residui di etanolo	Durante il passaggio di asciugatura, rimuovere tutto il liquido dal fondo del pozzetto. Assicurarsi di utilizzare etanolo fresco al 70%.
	Perdita di sfere magnetiche durante la procedura	Aumentare il tempo di magnetizzazione. Aspirare lentamente. Assicurarsi che la piastra o la provetta si adattino bene al magnete.
	Il DNA rimane legato alle sfere magnetiche	Evitare di asciugare eccessivamente le particelle e/o aumentare il volume di eluizione.
	Risospensione incompleta delle sfere magnetiche durante l'eluizione	Agitare in vortex o pipettare su e giù per risospingere completamente le particelle. Aumentare il numero di cicli di miscelazione. Per aumentare la resa è anche possibile riscaldare il tampone di eluizione fino a 65 °C prima dell'uso. Ridurre il tempo di asciugatura per evitare di seccare eccessivamente le sfere.
Carry-over del primer	Lavaggio insufficiente delle sfere magnetiche	Lavare le sfere magnetiche un'altra volta con etanolo al 70%. Assicurarsi di utilizzare una soluzione di etanolo appena preparata.
Non sono stati rimossi i prodotti di amplificazione non specifici	La dimensione dei prodotti di amplificazione non specifici è superiore a 100 bp	I prodotti di amplificazione non specifici di dimensioni superiori a 100 bp non vengono rimossi efficacemente dai prodotti di PCR nel protocollo standard (rapporto 1,8x). Potrebbe essere necessaria un'ottimizzazione del rapporto tra sfere e campione.
Problemi nelle applicazioni a valle	Carry-over di sale	L'etanolo al 70% deve essere conservato a TA.
	Carry-over di etanolo	Assicurarsi che qualsiasi traccia di etanolo sia stata rimossa dopo ogni lavaggio con etanolo e che le sfere magnetiche siano completamente asciutte prima dell'eluizione. Assicurarsi di utilizzare etanolo fresco al 70%.

6. Informazioni per l'utente sulle soluzioni di pipettaggio da banco di INTEGRA

6.1 Soluzioni ad alta produttività con le sfere magnetiche MAGFLO PCR

In caso di interesse nel processamento di una piastra completa di campioni, fare riferimento alla configurazione del flusso di lavoro che combina una pipetta elettronica manuale VIAFLO 96 o VIAFLO 384 con un modulo di separazione magnetica (MAG/HEATMAG). Uno script dettagliato con i parametri di pipettaggio ottimizzati è disponibile per il download nella nota applicativa sul nostro sito web.



Nota: se si desidera modificare il programma, consultare il manuale per modificare l'immissione del campione e il volume di eluizione per la purificazione PCR in VIAFLO 96 e VIAFLO 384, disponibile su richiesta presso il rappresentante INTEGRA locale.



Nota: gli script per la purifica dei prodotti di PCR con una pipetta elettronica manuale VIAFLO 96 o VIAFLO 384, equipaggiata con la testa di pipettaggio da 125 µl o 300 µl a 96 canali, sono forniti in modalità manuale e automatica.



7. Informazioni di ordinazione

Per fare un ordine, contattare il rappresentante commerciale INTEGRA locale.

Tabella 4: codici articolo disponibili per le sfere magnetiche MAGFLO PCR.

CODICE ARTICOLO	DESCRIZIONE	NUMERO DI REAZIONI PER LA PURIFICA DEI PRODOTTI DI PCR*
7010	Sfere magnetiche MAGFLO PCR, 1 ml	~ 55
7012	Sfere magnetiche MAGFLO PCR, 50 ml	~ 2777
7014	Sfere magnetiche MAGFLO PCR, 500 ml	~ 27.777

*Il numero di reazioni si basa su un volume di reazione di PCR di 10 µl. Per la purificazione dei prodotti di PCR con un rapporto sfere/campione di

1,8x, il volume di sfere magnetiche da usare per ogni reazione è $10 \times 1,8 = 18 \mu\text{l}$.

8. Colophon

Copyright © 2024 by INTEGRA Biosciences AG.

Tutti i diritti su questa documentazione sono riservati. In particolare, i diritti di riproduzione, elaborazione, traduzione e forma di presentazione spettano a INTEGRA Biosciences AG. È vietata la riproduzione, conservazione, elaborazione elettronica o distribuzione in altro modo della documentazione completa o di parti di essa senza il previo consenso scritto di INTEGRA Biosciences AG.

Lo scopo del presente manuale è fornire informazioni complete e accurate. Anche se il presente manuale dovrebbe contenere un avviso sulla garanzia specificamente indicato per il prodotto, INTEGRA Biosciences AG non rilascia alcuna dichiarazione o garanzia in merito al contenuto del presente manuale e si riserva il diritto di modificare il presente manuale senza preavviso se e quando verranno apportati miglioramenti.

INTEGRA Biosciences AG non è responsabile di eventuali perdite, danni, costi di riparazione, danni accidentali o indiretti di qualsiasi tipo, basati su garanzia esplicita o implicita, contratto, omissione o responsabilità oggettiva, derivanti dalla progettazione, dallo sviluppo, dall'installazione o dall'uso dei prodotti.

INTEGRA Biosciences AG si propone di fornire dati e documentazione affidabili e accurati. Qualora fossero riscontrate delle discrepanze, inviare un'e-mail all'indirizzo info@integra-biosciences.com.

Il codice articolo del presente manuale di istruzioni è 137963, la versione è V00.



Produttore e assistenza clienti

Prodotto per INTEGRA Biosciences AG by CleanNA BV (Coenecoop 75, 2741 PH Waddinxveen, Paesi Bassi). Il rappresentante locale di INTEGRA Biosciences, ulteriori informazioni e le versioni in altre lingue del presente manuale di istruzioni sono disponibili sul sito web www.integra-biosciences.com o su richiesta all'indirizzo info@integra-biosciences.com.

INTEGRA Biosciences AG

Tardisstrasse 201
CH-7205 Zizers, Svizzera
T +41 81 286 95 30
info-ch@integra-biosciences.com

INTEGRA Biosciences Ltd

2 Rivermead Business Park
Thatcham, Berks, RG19 4EP, Regno Unito
T +44 1635 797 00
info-uk@integra-biosciences.com
