

IN0055

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 06/03/2012

Rev.09

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE STRs DE ADN NUCLEAR

Índice:

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. DEFINICIONES
4. DESCRIPCIÓN DE LA INSTRUCCIÓN OPERATIVA
 - 4.1. MATERIALES
 - 4.1.1. REACTIVOS
 - 4.1.2. MATERIAL FUNGIBLE
 - 4.1.3. EQUIPAMIENTO
 - 4.2. PROCEDIMIENTO PARA LA DESNATURALIZACIÓN MANUAL
 - 4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS POST-PCR
 - 4.2.2. INTRODUCCIÓN DE DATOS EN EL SOFTWARE DEL SECUENCIADOR
 - 4.2.2.1. Introducción de datos en la hoja de muestras
 - 4.2.2.2. Introducción de los datos en la hoja de inyección
 - 4.3. PROCEDIMIENTO DE LA DESNATURALIZACIÓN AUTOMATIZADA
 - 4.3.1. Exportar los datos del robot Tecan Evo 150
 - 4.3.2. Crear un archivo para definir las muestras amplificadas
 - 4.3.3. Preparación del robot Tecan Evo 75
 - 4.3.4. Realizar el mantenimiento
 - 4.3.5. Ejecutar el script de desnaturalización
 - 4.4. DESNATURALIZACIÓN
 - 4.5. EXPORTAR LOS DATOS DE LA DESNATURALIZACIÓN AL SECUENCIADOR ABI 3500
5. FORMATOS
6. REFERENCIAS
7. ANEXOS
8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

1.- Objeto:

El objeto de esta instrucción es describir la sistemática a seguir para la preparación de las muestras, a partir del producto amplificado, para el análisis de STRs de ADN nuclear en el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (GF037-GF038) o bien en el ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (GF087).

2.- Alcance:

Aquellos ensayos realizados en la sección de Genética Forense en los que se analizan STRs de ADN nuclear.

3.- Definiciones:

No aplicable

4.- Descripción de la instrucción

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

- Formamida desionizada
- Estándar de tamaño GeneScan 500 LIZ y/o Genescan 600 LIZ (Applied Biosystems)
- Escaleras alélicas de los diferentes kits utilizados para la amplificación ([IN0051](#), [IN0053](#) [IN0105](#), [IN0118](#), [IN0136](#))
- Agua destilada

4.1.2. Material fungible

- Viales de 0,5 ml específicos para el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (GF037 - GF038)
- Un vial de 1,5 ml
- Jeringa de plástico de 10 ml

- Placa de 96 pocillos. MicroAmp optical 96-well Reaction Plate
- Puntas de pipeta (1000, 200, 20 y 10 µl) estériles
- Tapa de caucho para placa de 96 pocillos
- Tapas de caucho de viales de 0,5 ml para desnaturalizar
- Guantes desechables

4.1.3. Equipamiento

- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (GF072)
- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (GF037 - GF038)
- Cabina de seguridad biológica (GF077)
- Jeringa
- Bandeja de colocación de muestras
- Reservorio de vidrio para buffer
- Reservorio de vidrio para agua destilada
- Vaso reservorio de buffer
- Centrífuga (GF022)
- Pipetas de 50-1000, 20-200, 2-20 y 1-10 µl
- Agitador (GF017)
- Centrífuga para placas (GF093)
- Robot Tecan 75 (GF091)
- ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (GF087)

4.2. PROCEDIMIENTO PARA LA DESNATURALIZACIÓN MANUAL

4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS POST-PCR

Preparar las muestras en los viales de 0,5 ml para secuenciador con 20 ± 2 µl de formamida desionizada (la formamida para que se conserve desionizada, según el protocolo debe ser alicuotada y mantenida entre -10 y -25°C), 0.5 ± 0.2 µl del estándar de tamaño GeneScan 500 LIZ y/o GeneScan 600 LIZ y $0.5 - 1 \pm 0.1$ µl del producto de amplificación.

La cantidad de producto final de PCR varía si la amplificación no ha sido eficiente, en este caso se aumenta el volumen del producto de amplificación a 1,5 - 2 µl. Ocurre cuando una muestra ya migrada no ha dado resultado y se tiene que repetir. En este caso es posible también aumentar el tiempo de inyección de 5 segundos hasta 10 segundos aunque es cuestionable que de esta última manera se recupere un mal resultado.

- Realizar vórtex a los viales con el producto elaborado.
- Desnaturalizar a 95°C las muestras, utilizando el programa de desnaturalización de la PCR (5 min. a 95°C y 20 min. a 4°C con un mínimo de 5 min.). Tras la desnaturalización se introducirán al secuenciador o se guardarán en nevera un máximo de 72 horas antes del tipaje.
- Se procederá a la preparación de las escaleras alélicas de la misma forma que se prepararon las muestras.

4.2.2. INTRODUCCIÓN DE DATOS EN EL SOFTWARE DEL SECUENCIADOR ABI 310

4.2.2.1. Introducción de datos en la hoja de muestras

- Abrir el programa "*Data Collection*".
- Ir a "*File / New / GeneScan SampleSheet 48 tube*".
- Debemos escoger en el desplegable de los fluorocromos "*5 dyes*" ya que el kit o reacción multiplex utiliza primers marcados con 5 fluorocromos.

- Rellenar la columna "*Sample Name*" con las muestras, teniendo en cuenta que es recomendable cada 15 muestras poner un ladder. Asimismo incluiremos un control positivo (Control DNA 9947A para el kit Identifiler [-IN0051-](#) o para el kit de Identifiler Plus [-IN0136-](#) y Control DNA 007A para el kit Yfiler [-IN0053-](#), para el kit Minifiler [IN0105](#)) y para el kit NGM SElect [-IN0118-](#) y un control negativo.
- Guardar la hoja de muestras con "*File / Save as*" poniendo la fecha con el formato AAAAMMDD.

4.2.2.2. Introducción de los datos en la hoja de inyección

- Abrir el programa "*Data Collection*" (normalmente ya estará abierto del paso anterior).
- Ir a "*File / New / GeneScan Injection List*".
- Buscar la hoja de inyección (creada en el punto 4.2.2.1.) en el cuadro desplegable "*Injection List*".
- En la columna "*Module*" debemos de seleccionar el módulo GS STR POP4 (1ML) G5 v2.md5.
- En las columnas "*Matrix File*", "*Size Standard*" y "*Analysis Parameters*" no importa lo que pongamos puesto que deberemos seleccionar los parámetros adecuados al abrir el software de interpretación GeneMapper ID-X V1.2 ([IN0056](#)).
- Los parámetros para la electroforesis serán los siguientes:
 - Voltaje: 15,0 Kv.
 - Current: 8.0 mA
 - Temperatura: 60 °C
 - Laser: 9.9 mW
 - Tiempo de carrera: 28 min.
 - Tiempo de inyección: 1-9 seg.
- Pinchar sobre el botón Run para comenzar la electroforesis.

4.3. PROCEDIMIENTO DE LA DESNATURALIZACIÓN AUTOMATIZADA

Existen dos tipos de scripts, uno para cuando deseamos que el robot realice la mastermix o bien lo podemos hacer manualmente terminando en placa de 96 pocillos para el secuenciador ABI 3500 y otro para cuando deseamos que finalice en tubo de 0,5 mililitros para el secuenciador ABI 310.

4.3.1 Exportar los datos del robot Tecan Evo 150

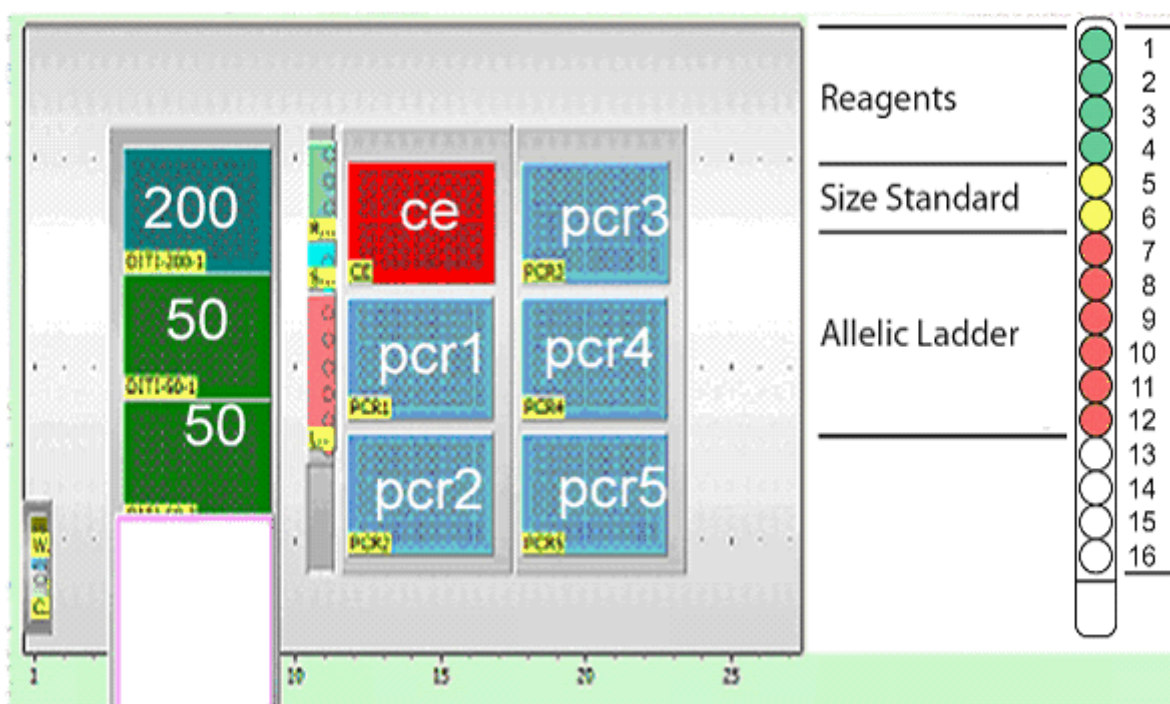
- Seleccionar **C/HIDEVolution_qPCSTRfiles**.
- Transferir el archivo **HIDDDetails_STR** al lápiz de memoria.
- Guardar este archivo en el Tecan 75 en la carpeta **Escritorio/Templates/Placas**.

4.3.2. Crear un archivo para definir las muestras amplificadas

Si se ha realizado una amplificación manual o bien de forma alternativa a la exportación de los datos explicada en el punto 4.2.1, se pueden crear dos archivos CSV, uno para las muestras y otro para definir las posiciones de los ladders y de pocillos con formamida (samples y layout). Para ello nos valdremos de las plantillas ejemplo que se encuentran en la carpeta **Escritorio/Templates**.

4.3.3. Preparación del robot Tecan Evo 75

Colocar según el esquema de la imagen adjunta:



- Colocar las puntas de 200 y 50 µl.
- Colocar una placa de 96 pocillos vacía en la posición CE para el ABI 3500.
- Colocar en la posición PCR5 los tubos de 0,5 ml para la desnaturalización para el ABI 310.
- Colocar las placas amplificadas en las posiciones PCR1 a PCR5 (excepto si se desnaturaliza para el secuenciador ABI310, que la posición PCR5 se utiliza para colocar los tubos de 0,5).
- Colocar en la posición 1 un tubo eppendorf de 1'5 ml (vacío si deseamos que el robot realice la mastermix, o bien con la mastermix que hayamos creado manualmente).
- Colocar en la posición 2 la formamida descongelada y alicuotada en un tubo eppendorf de 1'5 ml.
- Colocar el tubo de Size Standard en la posición 5.
- Colocar el tubo de Minifiler Allelic ladder en la posición 7.
- Colocar el tubo de Yfiler Allelic ladder en la posición 8.
- Colocar el tubo de Identifiler Plus Allelic ladder en la posición 9.
- Colocar el tubo de NGMSElect Allelic ladder en la posición 10.

4.3.4. Realizar el mantenimiento

- Encender el ordenador.
- Encender el robot.
- Arrancar el software, clicando sobre EVOware User, nos pedirá nombre de usuario y contraseña.
- Se debe realizar el mantenimiento diario, clicando sobre **Run maintenance/CE_Setup_2channel_flush/Start**.
- Al finalizar Clicar cerrar Runtime controller.

4.3.5. Ejecutar el script de desnaturalización

- En el menu **Startup**, seleccionar **Edit an existing script**.
- Seleccionar el script que nos interese:
 - CE_Setup_3500_Crea_MasterMix (para finalizar en placa y si deseamos que el robot nos cree la mastermix de forma automatizada).
 - CE_Setup_3500_NO_Crea_MasterMix (para finalizar en placa y si deseamos

realizar la mastermix de forma manual).

- CE_Setup_310_Crea_MasterMix (para finalizar en tubo de 0,5 ml y si deseamos que el robot nos cree la mastermix de forma automatizada).
- CE_Setup_310_NO_Crea_MasterMix (para finalizar en tubo de 0,5 ml y si deseamos realizar la mastermix de forma manual).
- Clicar sobre **Run**.
- Clicar sobre **Execute Run**.
- Nos aparece una pantalla para seleccionar el número de capilares, no se debe de desclicar ninguno y clicaremos sobre **Run**.
- En la pantalla CSetup, debemos exportar mediante los navegadores los archivos donde están definidas las muestras y las ladders (4.2.1 y 4.2.2). Clicar sobre **Run**.
- Introducir los datos de los reactivos. Clicar sobre **Run**.
- Confirmar que están correctamente colocados los fungibles y reactivos. Clicar sobre **Run**.
- Indicar el nombre/código de barras de la placa vacía y de la placa amplificada (que debe coincidir con el nombre que le hemos puesto anteriormente (4.2.1 y 4.2.2)).
- Al finalizar el script cerraremos el programa.

4.4. DESNATURALIZACIÓN

- La placa se extrae de la posición CE, se tapa con la tapa de caucho.
- Se realiza un centrifugado de la placa durante un minuto.
- Se introduce la placa en el termociclador (sin cerrar la tapa del secuenciador), seleccionando el programa de desnaturalización.
- Al finalizar el programa se introducirá la placa en el secuenciador.

4.5. EXPORTAR LOS DATOS DE LA DESNATURALIZACIÓN AL SECUENCIADOR ABI 3500

Al finalizar el script de desnaturalización el Tecan Evo 75 ha creado en la carpeta C/CSetup, un archivo .txt (guardado con la fecha del día). Este archivo se guardará en un lápiz de memoria y se trasladará al secuenciador ABI 3500 para poder importar todos los datos de las muestras y los ladders en la placa de inyección, en el proceso explicado en la instrucción IN0135 PREPARACIÓN DEL SECUENCIADOR ABI 3500.

5.- Formatos:

Código	Denominación
FM0087	Control de amplificación - Identifier
FM0089	Control de amplificación - Yfiler
FM0158	Control de amplificación Minifiler
FM0168	Control de amplificación NGM SElect
FM0180	Control de amplificación Identifier Plus

6.- Referencias:

7.- Anexos:

ABI PRISM User's Manual

8.- Historial de modificaciones:

Nº revisión

Descripción de la modificación

Fecha modif.

Nº Revisión	Descripción de la modificación	Fecha modif.
00	Edición inicial	22/12/2006
01	Modificar tecnicismos	26/06/2007
02	Ampliar fundamentos	14/03/2008

03	Se reflejan los datos que se recogen en el FM0087 y FM0089; se detalla el proceso de preparación de los productos Post-PCR; y especifican las condiciones de la electroforesis.	20/05/2008
04	En apartado 4.1.1 Reactivos incluir IN0105 En apartado 4.1.3 Equipamiento Incluir Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (GF033) y Cabina de seguridad biológica GF077) En apartado 4.2.1 Preparación... Modificar dosis e incluir FM0158 En apartado 4.2.2.1 Introducción... incluir "para el kit Minifiler – IN0105- Introducción de la relación de instrucciones y formatos y cambio de ubicación de las referencias.	14/04/2009
05	Adaptar el procedimiento a la nueva estructura del Departamento de Interior creada por el Decreto 471/2009, de 28 de agosto, sobre estructura orgánica y funcional del Departamento de Interior.	23/02/2010
06	Adaptar el procedimiento a la nueva estructura del Departamento de Interior creada por orden de 17 de junio de 2011 sobre estructura orgánica y funcional del Departamento de Interior.	04/10/2011
07	A propuesta del Jefe de la Sección de Genética Forense: Añadir Genescan 600 LIZ en los apartados 4.1.1, 4.2.1 y 4.2.2.1, añadir IN0118 y IN0136, Añadir FM0168, FM0180. Añadir en al apartado 4.2.2.1, o para el KIT de Identifiler Plus –IN0136- y para el Kit NGM Select –IN0118-.	20/01/2012
08	A propuesta del Jefe de Sección de Genética Forense: Añadir cambios debidos a la validación del Robot Tecan evo 75 para dispensación automatizada de reactivos para la desnaturalización.	08/02/2012

Elaborado:**Revisado:****Aprobado:**

Jefe de la Sección de Genética Forense

Jefe/a de la Ertzaintza

Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

Fecha:**Fecha:****Fecha:**

08/02/2012

05/03/2012

06/03/2012

