

IN0051

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 17/10/2011

Rev.08

AMPLIFICACIÓN DE STRs (D8S1179-D21S11-D7S820-CSF1PO-D3S1358-TH01-D13S317-D16S539-D2S1338-D19S433-VWA-TPOX-D18S51-D5S818-FGA) Y AMELOGENINA DE ADN
NUCLEAR-KIT IDENTIFILER-AMPLIFICACIÓN FRAGMENTOS IDENTIFILER

Índice:

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. DEFINICIONES
4. DESCRIPCIÓN DE LA INSTRUCCIÓN
- 4.1. MATERIALES
- 4.1.1. Reactivos
- 4.1.2. Material Fungible
- 4.1.3. Equipamiento
- 4.2. PROCEDIMIENTO
- 4.2.1 Preparación manual de las muestras
- 4.2.2 Preparación robotizada de las muestras
- 4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO
5. FORMATOS
6. REFERENCIAS
7. ANEXOS
8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

1.- Objeto:

Se define la sistemática seguida para la realización de la amplificación de los loci de ADN nuclear D8S1179 - D21S11 - D7S820 - CSF1PO - D3S1358 - TH01 - D13S317 - D16S539 - D2S1338 - D19S433 - VWA - TPOX - D18S51 - D5S818 - FGA y de la Amelogenina mediante la utilización del AmpFISTR Identifiler™ kit (Applied Biosystem).

2.- Alcance:

El presente procedimiento afecta a todos los ensayos que realiza la Sección de Genética Forense de la UPC, en los cuales se obtiene suficiente cantidad de ADN para la realización del análisis de polimorfismos de ADN nuclear.

3.- Definiciones:

No aplicable

4.- Descripción de la instrucción**4.1. Materiales****4.1.1. Reactivos**

- AmpFISTR Identifiler™ PCR Amplification kit
 - AmpFISTR PCR Reaction Mix: 2 tubos conteniendo $MgCl_2$, dNTPs y Albúmina sérica bovina en una solución tamponada con 0,05% de azida sódica. Cada uno de los tubos contiene 1,1 ml
 - AmpFISTR Identifiler Primer Set: Un tubo de 1,1 ml conteniendo tanto primers (cebadores) marcados con fluorescencia como primers (cebadores) no marcados
 - AmpliTaq Gold DNA Polymerase: Dos tubos de enzima con una actividad de 5 U/ μ l. Cada uno de los tubos contiene 50 μ l
 - AmpFISTR Control DNA 9947A: Un tubo de 0,3 ml conteniendo ADN (a una concentración de 0,10 ng/ μ l) de una línea celular humana femenina en una solución tamponada con 0,05 % de azida sódica. Su utilización es como muestra de referencia y control positivo con el siguiente genotipo

para los marcadores incluidos en el kit Identifiler:

D8S1179 13,13
 D21S11 30,30
 D7S820 10,11
 CSF1P0 10,12
 D3S1358 14,15
 TH01 8,9.3
 D13S317 11,11
 D16S539 11,12
 D2S1338 19,23
 D19S433 14,15
 vWA 17,18
 TPOX 8,8
 D18S51 15,19
 Amelogenina XX
 D5S818 11,11
 FGA 23,24

- Material de referencia SRM 2391b: material de referencia para marcadores de cromosomas autosómicos creado por el NIST (National Institute of Standards and Technology – Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) y que contiene 12 muestras (1-12) tipadas para los loci del kit Identifiler, además de otros STRs. Las muestras contienen 20 µl a una concentración de 1 ng/µl y su tipaje es:

Descripción	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1P0	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539
Genomic 1	13,13	29,33.2	9,10	12,12	14,17	6,7	11,13	12,14
Genomic 2	11,16	29,30	9,10	11,12	15,16	8,9.3	8,11	12,12
Genomic 3	14,16	28,31.2	12,13	11,12	15,15	9.3,9.3	11,12	11,12
Genomic 4	14,14	28,30	8,10	11,12	15,17	7,9	12,12	9,10
Genomic 5	15,16	28,30	8,10	10,12	15,18	7,7	11,12	9,11
Genomic 6	10,16	28,29	8,11	10,13	14,17	9,9.3	12,13	12,13
Genomic 7	13,15	28,31.2	9,9	10,11	14,15	6,7	11,12	10,10
Genomic 8	12,14	30,31	9,10	10,12	15,18	7,8	9,13	9,11
Genomic 9	13,13	30,30	10,11	10,12	14,15	8,9.3	11,11	11,12
Genomic 10	12,13	29,30	11,11	10,11,12	15,17	6,9.3	11,13	11,11
Cell11 GM09947A	13,13	30,30	10,11	10,12	14,15	8,9.3	11,11	11,12
Cell12 GM09948	12,13	29,30	11,11	10,11-12-	15,17	6,9.3	11,13	11,11

Descripción	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Amelo.	D5S818	FGA
Genomic 1	17,23	13,16.2	17,17	8,11	14,14	XY	12,12	21,22
Genomic 2	17,26	14,16	14,16	8,10	10,14	XX	12,12	20,22
Genomic 3	20,24	12,14	18,19	8,11	16,20	XY	11,11	23,25
Genomic 4	17,23	11,13	17,17	8,9	18,18	XX	11,11	18,22
Genomic 5	17,19	12,2,14	16,20	10,11	14,16	XX	11,12	23,26
Genomic 6	25,25	12,14	16,18	8,8	18,18	XX	12,12	21,26
Genomic 7	17,22	13,15.2	16,16	8,11	13,16	XY	11,12	23,24
Genomic 8	22,22	12,2,15	15,17	8,12	15,18	XX	12,13	24,28
Genomic 9	19,23	14,15	17,18	8,8	15,19	XX	11,11	23,24
Genomic 10	23,23	13,14	17,17	8,9	15,18	XY	11,13	24,26
Cell11 GM09947A	19,23	14,15	17,18	8,8	15,19	XX	11,11	23,24
Cell12 GM09948	23,23	13,14	17,17	8,9	15,18	XY	11,13	24,26

Agua destilada

Tampón TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0)

4.1.2. Material Fungible

- Viales eppendorf de 1,5 ml
- Viales eppendorf de 0,5 ml

- Viales de amplificación de 0,2 ml
- Puntas de pipeta con filtro (1000, 200, 20 y 10 µl) estériles
- Gradillas para viales de 0,2 ml
- Gradillas para viales de 0,5 ml
- Gradillas para viales de 1 ml
- Guantes estériles desechables
- Rotulador permanente
- Microamp String Caps
- Cubierta adhesiva de bandeja de PCR de 96 muestras
- Cubierta adhesiva de aluminio para bandeja de PCR de 96 muestras

4.1.3. Equipamiento

- Cabina de seguridad biológica (GF012)
- Centrífuga (GF022)
- Pipetas de 50-1000, 20-200, 2-20 y 1-10 µl
- Agitador GF018
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (GF034 ó GF072)
- Centrífuga para placas (GF083)
- Robot Tecan Evo (GF082)

4.2. Procedimiento

A continuación se detallan los marcadores genéticos analizados, su localización cromosómica, su probabilidad de exclusión a priori (PE), su poder de discriminación (PD), así como sus tasas estimadas de mutación paterna y materna.

Los valores de probabilidad de exclusión a priori (PE) y poder de discriminación (PD) se han obtenido usando las fórmulas descritas en:

- Chakravarti A and Li CC, The effect of linkage of paternity calculations. En: Inclusion probabilities in parentage testing. (Ed.: Walker, R.H.) American Association of Blood Banks (1983), Arlington, Virginia, pp. 411-422,

para la probabilidad de exclusión a priori y:

- Jones DA, Blood samples: probability of discrimination. J. Forensic. Sci. Soc. 12 (1972) 355-359 y Smalldon KW and Moffat AC, The calculation of discriminating power for a series of correlated attributes. J. Forensic Sci. Soc. 13 (1973) 291-295

para el poder de discriminación; y a partir de estudios poblacionales realizados en población española y publicados en:

- Spanish population data on 7 tetrameric short tandem repeat loci. International Journal of Legal Medicine 108: 145-149 (1995).
- Spanish population data on 13 PCR-based systems. Advances in Forensic Haemogenetics, vol. 6, pp. 578-580 (1996).
- Allele frequencies of D3S1358 and FGA in a Central Spanish population. Progress in Forensic Genetics, vol. 7, pp. 309-311 (1998).
- A Spanish population study of the STR loci HumLPL, D5S818, D7S820 and D13S317. International Journal of Legal Medicine 112: 70-71 (1998).
- Spanish population data on the four STR loci D8S1179, D16S539, D18S51 and D21S11. International Journal of Legal Medicine 112: 340-341 (1999).
- A Spanish population study of the STR loci D2S1338, D19S433, Penta D and Penta E. Journal of Forensic Sciences 48(5): 1182 (2003).

A partir de dichos valores se estima una probabilidad de exclusión a priori total de 99,999937 % y un poder de discriminación total > 99,999999 % para los marcadores genéticos analizados mediante el kit Identifiler.

Los valores de tasa de mutación paterna y materna se han obtenido del "Annual report summary for testing in 2003" de la AA.BB. (American Association of Blood Banks) publicado en 2004 y disponible en la siguiente dirección:

http://www.aabb.org/Documents/Accreditation/Parentage_Testing_Accreditation_Program/ptannrpt03.pdf

Locus	Localización Cromosómica	PE	PD	Tasa mutación materna	Tasa mutación paterna
D8S1179	8q	0,6382	0,9421	0,023 %	0,159 %
D21S11	21q11.2-q21	0,6939	0,9536	0,107 %	0,147 %
D7S820	7q11.21-22	0,6128	0,9312	0,013 %	0,116 %
CSF1PO	5q33.3-34	0,4487	0,8741	0,031 %	0,153 %
D3S1358	3p	0,5892	0,9225	0,015 %	0,128 %
TH01	11p15.5	0,5882	0,9234	0,009 %	0,009 %
D13S317	13q22-31	0,5840	0,9242	0,040 %	0,142 %
D16S539	16q24-qter	0,5442	0,9069	0,028 %	0,109 %
D2S1338	2q35-37.1	0,7447	0,9591	0,021 %	0,103 %
D19S433	19q12-13.1	0,6224	0,9332	0,054 %	0,075 %
VWA	12p-12pter	0,6405	0,9360	0,033 %	0,170 %
TPOX	2p23-2pter	0,3740	0,8210	0,004 %	0,012 %
D18S51	18q21.3	0,7421	0,9669	0,063 %	0,221 %
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
D5S818	5q21-31	0,4593	0,8618	0,025 %	0,116 %
FGA	4q28	0,7253	0,9654	0,050 %	0,319 %

Para la amplificación de los loci anteriormente descritos usando el kit Identifiler se usará el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (GF033 ó GF034), con el siguiente programa:

- Fase de incubación inicial: 95 °C durante 11 minutos
- Fase de amplificación: 28 ciclos
 - Desnaturalización: 94 °C durante 1 minuto
 - Anillamiento: 59 °C durante 1 minuto
 - Extensión: 72° C durante 1 minuto
- Fase de extensión final: 60 °C durante 60 minutos
- Fase final: 4° C hasta la retirada de los tubos

4.2.1 PREPARACIÓN MANUAL DE LAS MUESTRAS

Para efectuar el proceso de amplificación, se crea una solución usando la siguiente tabla a partir de los componentes del Kit Identifiler:

- AmpFISTR PCR Reaction mix 10,5 µl
 - AmpliTaq Gold DNA polymerase 0,5 µl
 - AmpFISTR Identifier Primer Set 5,5 µl
- } x nº de muestras (incluyendo controles pos. y neg.)

La cantidad obtenida es de 16,5 µl por muestra a amplificar (incluyendo controles positivo y negativo), de los cuales se depositarán 15 µl en viales adecuadamente etiquetados para las muestras y controles a amplificar. La cantidad restante hasta alcanzar 25 µl (volumen final de amplificación) será:

- En aquellas muestras con una concentración de ADN igual o inferior a 0,05 ng/µl, añadir 10 µl del extracto de ADN
- En aquellas muestras con una concentración de ADN superior a 0,05 ng/µl, diluir una porción de la muestra con agua destilada o tampón TE, de tal forma que haya entre 0,5 y 2 ng de ADN total en un volumen de 10 µl
- En el control negativo, añadir 10 µl de agua destilada o tampón TE
- Se incluirá como **control de calidad** 1 µl de muestra del material de referencia (genomic 1 a genomic 10) SRM 2391b diluido en 9 µl de agua destilada (1 ng), al inicio de cada nuevo kit de Identifier y 1 µl del control positivo del citado kit. Tras verificar la validez del control positivo, se utilizará únicamente éste como control de calidad hasta la finalización del kit.

4.2.2 PREPARACIÓN ROBOTIZADA DE LAS MUESTRAS

Existen dos versiones de scripts, para cuando se han extraído tanto en tubos de 1.5 ml o para cuando se han extraído en placa, aunque no se puede hacer una normalización mixta.

Cuando se preparan los controles positivos, el robot pipetea 10 µl del AmpFISTR Control DNA, para Identifier, si la concentración del control positivo original es diferente, se deberá de diluir para conseguir una concentración de 0.1 ng/µl.

4.2.2.1 Exportar los resultados de la cuantificación

Exportar los resultados SDS del ABI 7500.

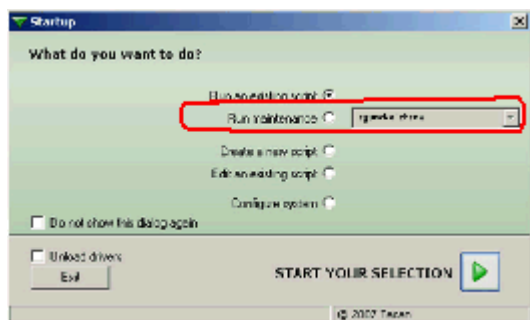
- Seleccionar **File / Export / Results**.
- En el menú **Save in**, buscar el lápiz de memoria.
- En el cuadro **File name**, guardar con el nombre AAAA-MM-DD_nº profesional.
- seleccionar **Results Export Files (*.csv)** en el menú **Save as type**.
- Seleccionar **Save**.

4.2.2.2 Preparar el robot TECAN Freedom EVO 150 y los reactivos del kit Identifier para la normalización y amplificación.

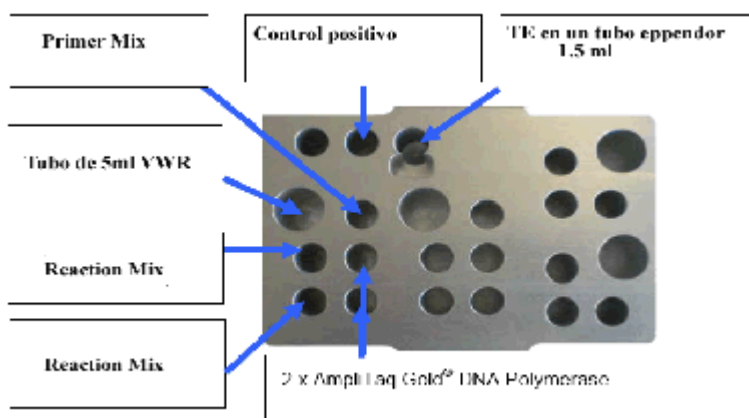
- Se deberá de realizar el **mantenimiento diario**, corriendo el script eguneko lehena.
- Encender el ordenador



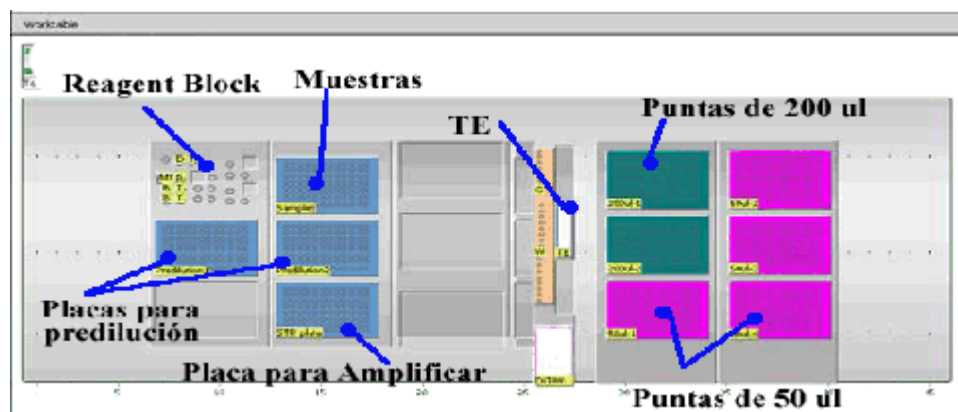
- Encender el Robot
- Para arrancar el software EVOware Standard, nos pedirá un nombre de usuario y contraseña (usuario y 00000)
- Arrancar el software EVOware Standard, aparece una pantalla de Start up, clicar sobre **“Run maintenance - eguneko lehena / Start your selection”**



- En la pantalla “**Runtime controller**” clicar sobre “**Run / Initializing**”. Tras este proceso el brazo robótico comienza a moverse para testar la zona de trabajo
- Al finalizar, cerrar “**Runtime Controller**”
- Preparar los reactivos de Identifiler, vorteándolos ligeramente y realizando un spin.
- Prepara el AmpFISTR Reagent Block para la normalización según la imagen adjunta (el bloque se debe de guardar en la nevera antes y tras el uso).

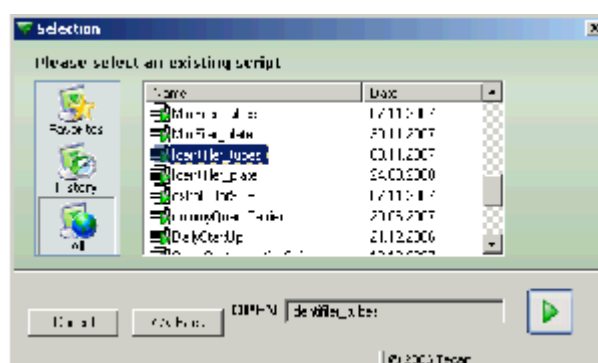


- Colocar las puntas de 200 μ l y 50 μ l según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar el depósito para TE con una cantidad variable de TE, que dependerá de la cuantificación que puede ir desde 20 hasta 100 μ l, según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar la placa con las muestras (si se extrajo en placa) según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar las muestras comenzando en la posición S1 en el rack para tubos en caso de extracción en tubos.
- Colocar dos placas para la predilución según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar una placa de 96 pocillos para la amplificación, según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar el Reagent Block según el esquema de la imagen adjunta.



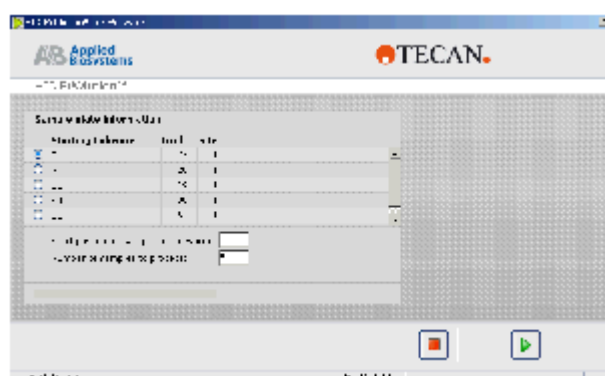
4.2.2.3 Ejecutar el Script de normalización y amplificación.

- Seleccionar el Script.
 - a) Para ello seleccionaremos en el menú Startup **Edit an existing Script**.
 - b) Seleccionar el Script, **Identifiler_tubes combo** o **Identifiler_plate combo** y presionar sobre la flecha verde (Run).



- d) Clicaremos sobre **Execute, Run**
- e) En la pantalla **Runtime controller** presionaremos sobre **Run**

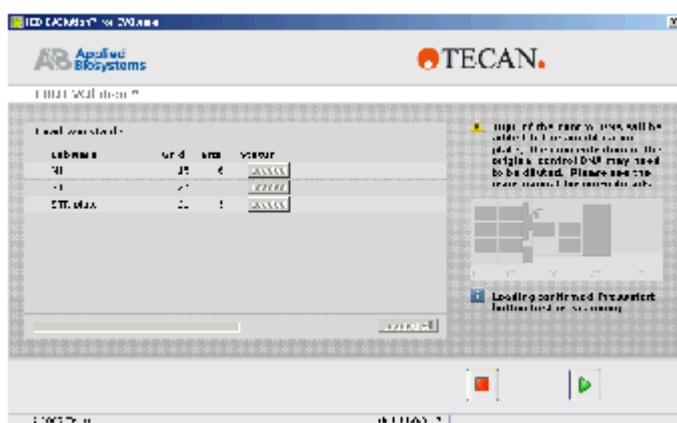
- Definir el número de muestras y el punto de inicio.
 - a. Asignar el número de muestras y verificar que está correcto el punto de inicio.



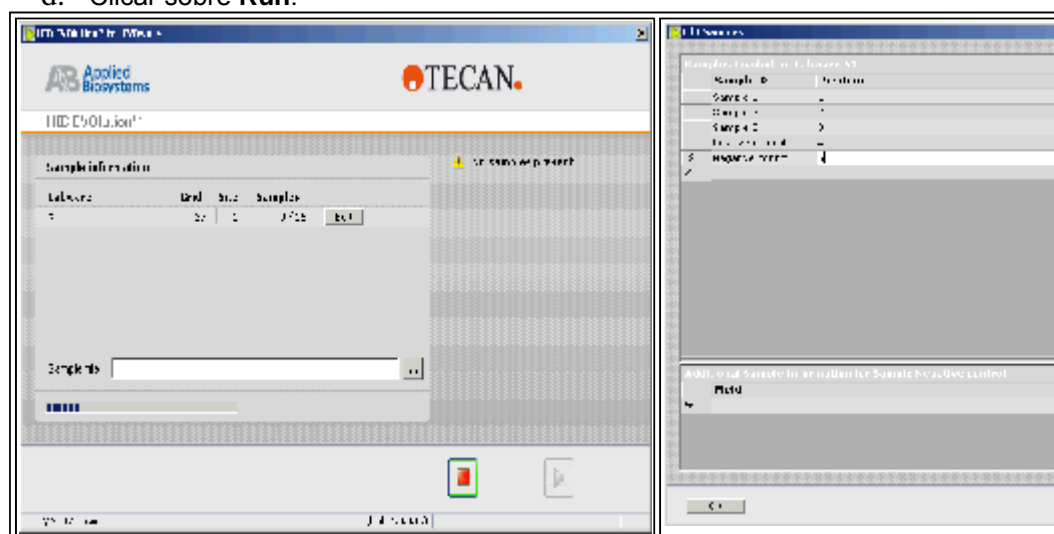
- b. Presionar sobre **Run**.

- Introducir los datos de número de lote y fecha de caducidad de los reactivos clicando en **Record Reagent Information**. Presionar sobre Run al finalizar.
- Confirmar que está correctamente colocado lo que nos pide (Reagent Block, Placas para diluir....) clicando sobre load en cada uno de ellos (o loaded all), y al final clicar sobre Run. Nos informa que

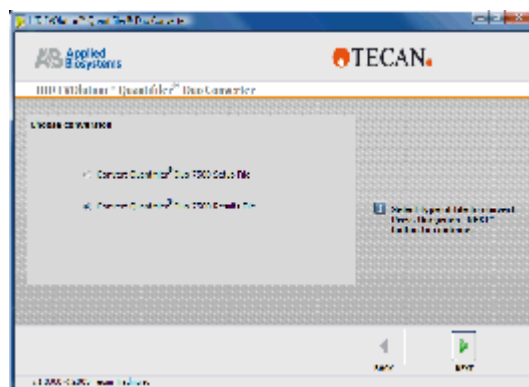
el robot va a tomar 10 μ l del control positivo, por lo que se deberá de normalizarlo a una concentración de 0.1 μ l.



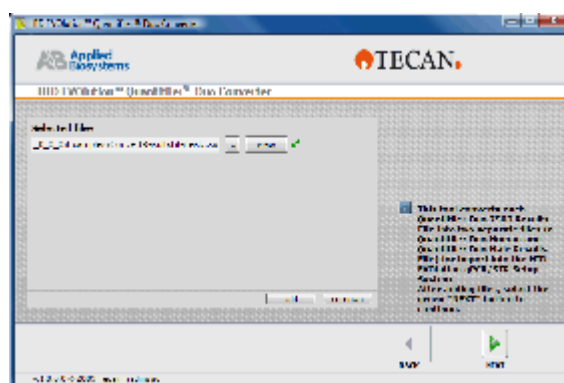
- El robot escanea los códigos de barra y como no los detecta, deberemos seleccionar **ignore** y clicar sobre **Run**.
- Definir la información de las muestras y su posición.
 - a. En la sección Sample Information, seleccionar **Edit**, para introducir las muestras manualmente.
 - b. Se puede importar los datos desde un archivo csv clicando sobre el botón (Todas las muestras deben de ser contiguas). Se debe navegar hasta la carpeta **C:/HIDEVolution Extraction Files/Export/date_time**). Una vez importados los datos clicar sobre **edit** para comprobar que están correctas.
 - c. Seleccionar **OK** para continuar.
 - d. Clicar sobre **Run**.



- Importar los resultados de la cuantificación obtenidos en el ABI 7500.
 - a. Transferir el archivo obtenido desde el lápiz de memoria a la carpeta **Escritorio/ Para normalizar**.
 - b. Para Quantifiler Duo, debemos de separar los resultados obtenidos en la cuantificación para obtener dos archivos para la normalización, uno con los valores obtenidos para ADN humano y otro con los valores obtenidos de ADN de varón. Para ello una vez creado el archivo CSV deberemos de guardarlo en la capeta **Escritorio/Quantifiler Duo** en el ordenador del robot. Se debe de abrir el software HID EVOLution Quantifiler Duo Converter y seleccionar la opción **Convert Quantifiler Duo 7500 Results File** y clicar sobre **Next**

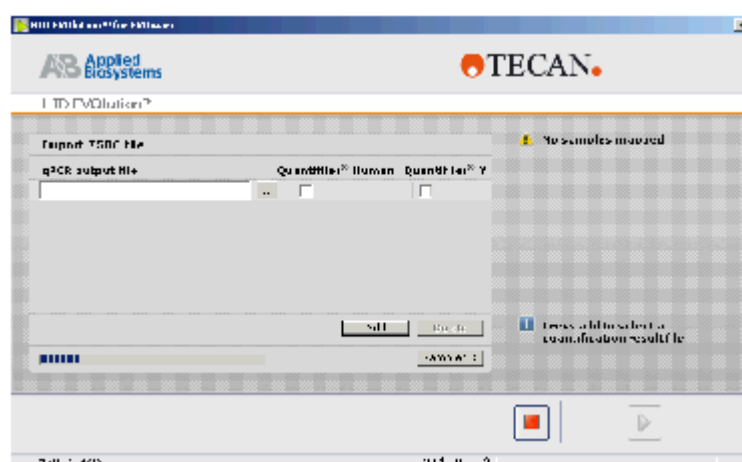


Nos aparecerá una pantalla en la que deberemos de navegar hasta el archivo CSV.

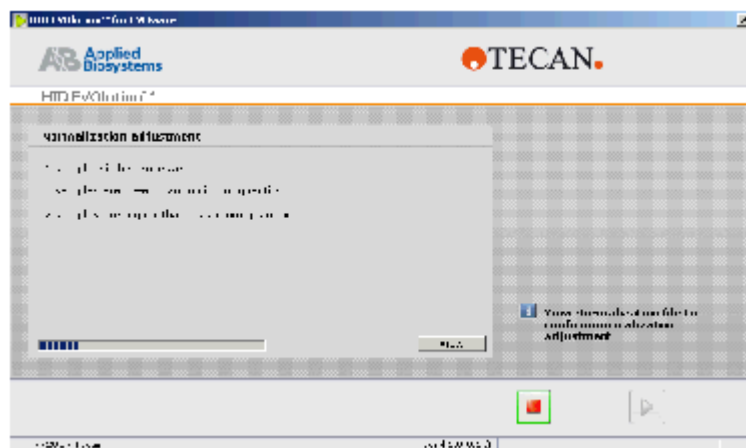


Clicaremos sobre **next**, y con el buscador indicaremos la carpeta en la que vamos a guardar los archivos CSV creados para ADN total y de varón utilizables para la normalización.

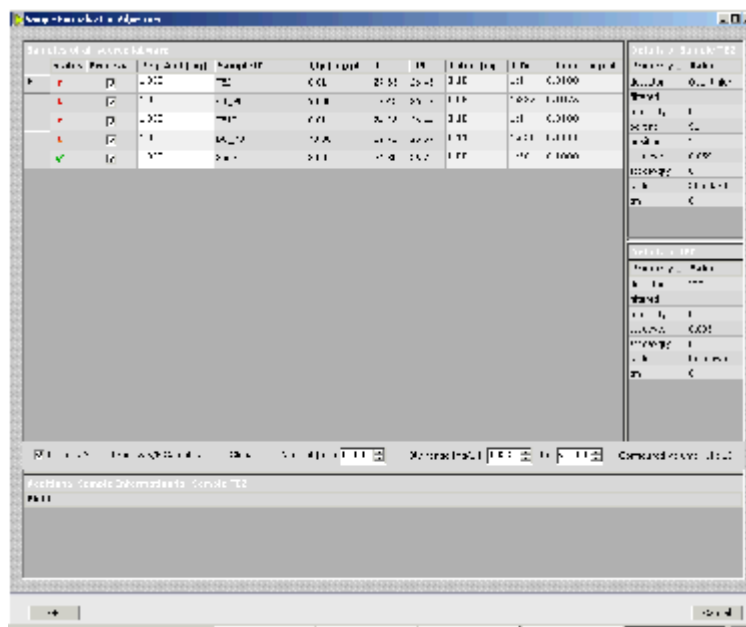
- c. Clicar sobre **Add**.
- d. Seleccionar **Quantifier Human** o **Quantifier Y**.
- e. Seleccionar el botón ...
- f. Navegar hasta el archivo con la cuantificación.(o el lápiz de memoria.)
- g. Clicar sobre **Open**



- h. Clicar sobre Run.
- Confirmar la normalización.
 - a. En la siguiente pantalla se observa un resumen del número de muestras a procesar, el número de muestras que están por debajo del umbral de amplificación definido por el usuario, y el número de muestras que están por encima de la cantidad máxima establecida por el usuario.



b. Clicar sobre View, para ver la ventana de ajuste de la normalización de las muestras. Sample normalization adjustment.



c. Clicar sobre **Process All** si queremos normalizar todas las muestras, si deseamos deseleccionar alguna de ellas deberemos de quitar el símbolo verde, o ponerle si está deseleccionado.

d. Para poder cambiar los parámetros de la normalización (por defecto está a 1ngμl deberemos ir a

Global req. Amount.

e. Se puede cambiar el umbral mínimo, en ng, da partir del cual amplificar y la cantidad máxima

aceptable desde la opción **Qty range.**

f. Se puede cambiar el volumen de la normalización (por defecto 10 μl) desde la opción **Configured volume.**

g. Clicar sobre **OK**

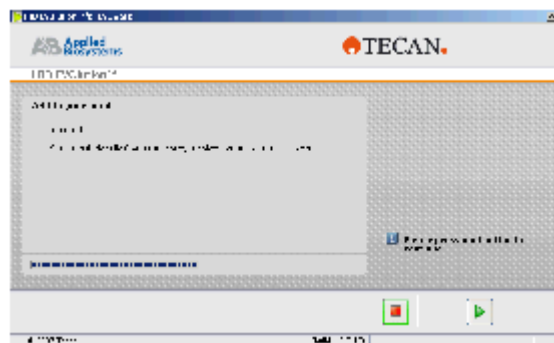
h. Clicar sobre **Run** para comenzar la normalización.

i. Nos aparecerá una pantalla para recordar que se cambien las puntas de pipetas en las posiciones 29 y 25

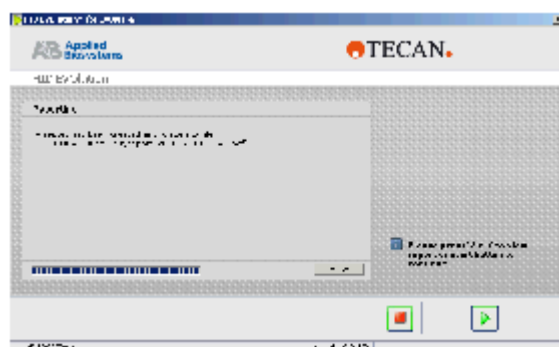
- Importar el archivo para el 3130

a. Cuando ha finalizado la normalización y creará un archivo para exportar al ABI 3130

(HIDEvolution_qPCRSTRfiles / ABI3130 Input Strplate_aaaamdd_hhmm)



b. Clicar sobre **Run** para continuar.



c. Clicar sobre **View** para ver el informe generado para esta normalización.

d. Clicar sobre **Run** para finalizar el script.

- Poner el film sellador (de aluminio) a la placa para amplificar o bien los tapones (caps)
- Llevar la placa al termociclador y seleccionar el programa adecuado
- Disposición de la placa para todos los kit excepto Yfiler.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S14	S22	S29	S37	S44	S52	S59	S67	S74	
B	S2	S10	S15	S23	S30	S38	S45	S53	S60	S68	S75	
C	S3	S11	S16	S24	S31	S39	S46	S54	S61	S69	S76	
D	S4	S12	S17	S25	S32	S40	S47	S55	S62	S70	S77	
E	S5	S13	S18	S26	S33	S41	S48	S56	S63	S71	S78	
F	S6	POS	S19	S27	S34	S42	S49	S57	S64	S72		
G	S7	NEG	S20	S28	S35	S43	S50	S58	S65	S73		
H	S8	LDR	S21	LDR	S36	LDR	S51	LDR	S66	LDR		

el material amplificado fuera a almacenarse por un tiempo inferior a las 2 semanas, deberá conservarse congelado (de -15 a -25 °C) o refrigerado (de 2 a 6 °C). En caso de que el almacenamiento de los productos amplificados fuera mayor a 2 semanas, deberá conservarse congelado (de -15 a -25 °C) hasta su uso.

Los procesos se anotarán en el formato [FM0087](#) de Control de Amplificación Identifier.

4.3. Criterios de aceptación y rechazo

Cuando el resultado obtenido en la muestra del material de referencia no de los resultados esperados (tipaje especificado para el SRM 2391b por el NIST según la muestra realizada) se procederá a repetir todo el proceso de amplificación.

De igual manera, si en el control negativo utilizado se comprobase la presencia de contaminación, se procederá a repetir el proceso de amplificación utilizando nuevos reactivos.

5.- Formatos:

Código	Denominación
FM0087	Control de Amplificación Identifiler

6.- Referencias:

7.- Anexos:

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	Añadir información técnica	14/03/2008
03	Se especifica el procedimiento a seguir para generar la solución a partir de los diferentes componentes del kit Identifiler cuando se trabaja con varias muestras.	20/05/2008
04	Se cambia en el apartado 4.2 el control positivo por el material de referencia como control de calidad. Se incluye el apartado 4.3. Criterios de aceptación y rechazo.	07/07/2008
05	En apartado 4.1.3 Equipamiento modificar GF033 ó GF034 por GF034 ó GF072.	14/04/2009
06	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
07	Incluir la preparación automatizada con el robot Tecan Evo, se cambia el índice	29/06/2010
08	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

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

Jefe de la Sección de Genética Forense

Jefe/a de la Ertzaintza

Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

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

04/10/2011

13/10/2011

14/10/2011

