

IN0047

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 14/10/2011

Rev.09

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

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
 - 4.2.1. Preparación de la muestra para análisis
 - 4.2.1.1. Restos sanguíneos
 - 4.2.1.2. Restos espermáticos
 - 4.2.1.3. Restos salivares
 - 4.2.1.4. Restos epiteliales
 - 4.2.1.5. Pelos
 - 4.2.2. Proceso de extracción manual
 - 4.2.2.1. Digestión proteolítica.
 - 4.2.2.2. Extracción.
 - 4.2.2.3. Purificación y concentración con Amicon Ultra-4 30
 - 4.2.3. Proceso de extracción automatizada
 - 4.2.3.1. Condiciones de almacenaje de los reactivos del kit Prepfiler
 - 4.2.3.2. Preparación de los reactivos del kit Prepfiler
 - 4.2.3.3. Extracción en placa
 - 4.2.3.3.1. Realizar la prelis
 - 4.2.3.3.2. Creación de una hoja de cálculo para introducir los datos de las muestras a extraer
 - 4.2.3.3.3. Pasos previos en el robot
 - 4.2.3.3.4. Disposición del robot para extracción de placa a placa
 - 4.2.3.3.5. Revisión inicial del robot
 - 4.2.3.3.6. Puesta en marcha del proceso automatizado de extracción
 - 4.2.3.3.7. Archivo de los resultados
 - 4.2.3.4. Extracción en tubo
 - 4.2.3.4.1. Realizar la prelis
 - 4.2.3.4.2. Creación de una hoja de cálculo para introducir los datos de las muestras a extraer
 - 4.2.3.4.3. Pasos previos en el robot
 - 4.2.3.4.4. Disposición del robot para extracción de tubo a tubo
 - 4.2.3.4.5. Revisión inicial del robot
 - 4.2.3.4.6. Puesta en marcha del proceso automatizado de extracción
 - 4.2.3.4.7. Archivo de los resultados
 - 4.2.4. Mantenimiento de las muestras
5. FORMATOS
6. REFERENCIAS
7. ANEXOS
8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

1.- Objeto:

Se define la sistemática seguida para la realización de la extracción del ADN tanto mediante digestión proteolítica y posterior tratamiento mediante fenol-cloroformo seguido de purificación mediante filtración con Amicon Ultra-4 30, como mediante el kit PrepFiler (Applied Biosystems, Estados Unidos) en una estación robotizada Tecan HID EVO 150 (Tecan Trading AG, Switzerland).

2.- Alcance:

El presente procedimiento afecta a todos los ensayos que realiza la Sección de Genética Forense de la UPC, realizados sobre muestras que puedan contener restos de sangre, semen, saliva, pelos, células

epiteliales y, en general, cualquier tipo de restos biológicos que pueda contener células humanas susceptibles de ser analizadas mediante polimorfismos de ADN. En las muestras de pelos, se utilizará exclusivamente el protocolo manual. Significar que las muestras en las cuales se prevé mezcla de restos seminales con células de descamación del epitelio vaginal, anal o bucal (por ejemplo, hisopos vaginales tras una agresión sexual con penetración y eyaculación en el interior de la vagina) y a aquellos en los cuales tras la identificación de fluido seminal, se obtiene un perfil genético mezcla por coexistencia con células sanguíneas, salivares u otras células epiteliales, se aplicará el procedimiento de extracción descrito en la [IN0049](#)

3.- Definiciones:

No aplicable

4.- Descripción de la instrucción

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

Tampón Acetato Sódico 0,2 M ([IN0071](#))
Tampón Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 10 % p/v ([IN0071](#))
Ditiotreitol (DTT) 1M ([IN0071](#))
Proteinasa K (10 mg/ml) ([IN0071](#))
Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1)
Tampón Tris-EDTA (TE) ([IN0071](#))
Tampón de lisis del kit Prepfilier
Partículas magnéticas del kit Prepfilier
Tampón de lavado del kit Prepfilier ([IN0071](#))
Tampón de elución del kit Prepfilier

4.1.2. Material Fungible

Viales eppendorf de 1,5 ml
Pegatinas circulares de referenciación
Puntas de pipeta con filtro estériles (1000, 200, 50 y 10 µl)
Amicon Ultra-4 30
Gradillas
Guantes
Rotulador permanente
"Filter Plate" y "Spin Plate"
Placa de 96 pocillos ("MicroAmp Optical 96 well")
"Processing Plate"
Depósitos de plástico ("trough")
Film adhesivo ("MicroAmp Clear Adhesive Film")

4.1.3. Equipamiento

Cabina de seguridad biológica (GF011)
Baño termostático (GF013 o GF014)
Pipetas de 50-1000, 20-200 y 2-20 µl
Centrífuga (GF021)
Centrífuga (GF019 o GF020)
Agitador (GF043)
Dispensadores (GF074 -agua destilada- y GF075 -TE-)
Baño seco o incubador (GF085)
Centrífuga para placas (GF083)
Robot Tecan Evo (GF082)

4.2. PROCEDIMIENTO

Todos los procedimientos que se describen a continuación se realizarán en una cabina de seguridad biológica (GF011) situada en el laboratorio de extracción de ADN. Además, ha de tenerse en cuenta la necesidad de usar un blanco de extracción en cada tanda de extracción. De esta manera, el uso de controles negativos verifica la esterilidad de los reactivos y la asepsia durante el proceso de extracción. Las muestras de referencia (indubitadas) de un caso pericial se extraerán separadamente a las muestras

dubitadas de ese mismo caso, en caso de extracción manual.

La extracción es un proceso físico-químico en el que, mediante una rotura o lisis celular se libera el ADN y posteriormente se purifica para separarlo de los restantes componentes celulares, que podrían actuar como inhibidores en la posterior fase de amplificación génica.

La extracción orgánica consta de las siguientes fases:

- Digestión proteolítica: Se realiza a temperatura elevada en presencia de un detergente, como el SDS, que rompe las membranas celulares, y de proteinasa K (que digiere proteínas entre las que se hallan las histonas, unidas al ADN nuclear).
- Extracción orgánica propiamente dicha: Mediante el uso del fenol-cloroformo-álcool isoamílico se consigue una solución con dos fases en las que el ADN queda en la fase acuosa y las proteínas que no se hayan eliminado previamente se encuentran en la fase fenólica.
- Concentración, lavado y purificación del extracto: Se realiza un proceso de ultrafiltración a través de una membrana (Amicon Ultra-4 30) que permite el paso de sustancias de bajo peso molecular (productos de la digestión proteolítica y posibles inhibidores), reteniendo el ADN.

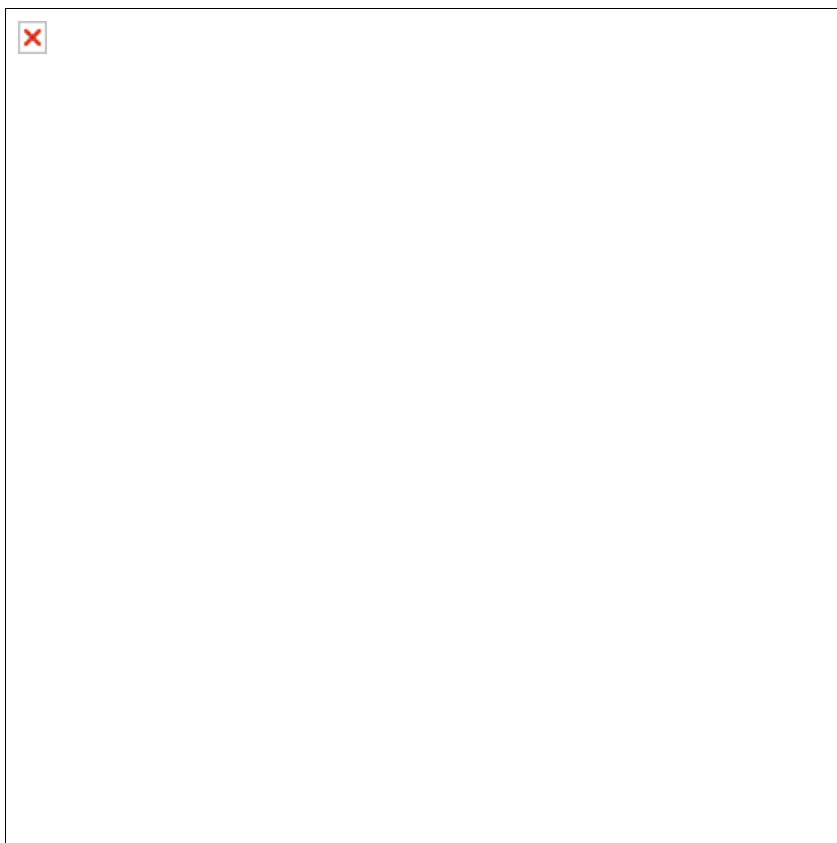
El kit Prepfil se basa en la unión del ADN del lisado a unas partículas magnéticas, formando un complejo que permanece estable durante los procesos de eliminación de los inhibidores

La extracción comienza con una pre-lisis manual en la que se va a producir la lisis celular y la liberación del ADN nuclear, utilizando el tampón de extracción y DTT.

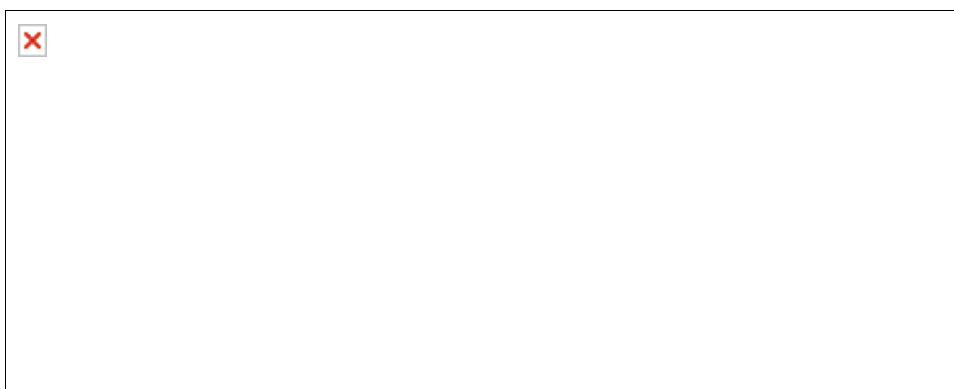
El proceso automatizado incluye la unión del ADN a las partículas magnéticas para formar un complejo ADN-partículas magnéticas, la eliminación de inhibidores y la elución del ADN purificado del complejo ADN-partículas magnéticas.

El proceso comienza cuando el robot añade una suspensión de 15 µl de partículas magnéticas al lisado (entre 280 y 300 µl de lisado), se mezcla y esta mezcla se transfiere al "processing plate", en el que previamente se han añadido 180 µl de isopropanol (solución de cohesión) por parte del robot. Se agita el "processing plate" en el "Te-shake" a 1000 rpm durante 1 minuto y a 700 rpm durante 5 minutos, posteriormente el robot coloca el "processing plate" sobre el soporte magnético durante 6 minutos para separar las partículas magnéticas. El sobrenadante se transfiere al depósito para el sobrante de la lisis (que se deberá de descartar para reciclar), y las partículas magnéticas se resuspenden mezclándolas con 300 µl de tampón de lavado.

Se completa el proceso de lavado al posicionar el "processing plate" sobre el soporte magnético durante 1 minuto para separar las partículas magnéticas, transfiriendo el sobrenadante a la abertura para residuos y repitiendo este proceso de lavado durante otros 2 ciclos. Se incuba el "processing plate" a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación (1000 rpm) para permitir la evaporación de los solventes orgánicos residuales. Posteriormente las partículas magnéticas son resuspendidas mezclando 50 µl del tampón de elución, se calienta la placa en el "Te-shake" a 65 °C durante 6 minutos con agitación (1000 rpm) y se coloca el "processing plate" sobre el soporte magnético durante 7 minutos para separar las partículas magnéticas. Para finalizar se transfiere el ADN diluido a los tubos de 1,5 ml o a una placa de 96 pocillos.



DISPOSICIÓN GENERAL DE LA ZONA DE TRABAJO DEL ROBOT



- 1 Rejilla para tubos para la elución, desde S1 a S6 (cuando finalizamos en tubo y no en placa)
- 2 Rejilla para tubos para la lisis, de L1 a L6 (cuando se realiza la lisis en tubo y no en placa)
- 3 Placa de 96 pocillos para la elución
- 4 Bloque para las partículas magnéticas ("PrepFiler™ Magnetic Particles").
- 5 "PrepFiler™ Spin Plate", placa de muestras (si la lisis se realiza en placa)
- 6 "Magnetic Ring Stand" (placa magnética)
- 7 "PrepFiler™ Processing Plate" puesto sobre el "Te-Shake"
- 8 "Lysate waste trough" / Depósito para sobrante de la lisis
- 9 "Isopropanol trough" / Depósito para isopropanol
- 10 "Wash Buffer trough" / Depósito para tampón de lavado
- 11 "Elution Buffer trough" / Depósito para tampón de elución
- 12 "DiTi waste unit" / Unidad para desechar las puntas de pipeta
- 13–15 200 µL "disposable pipette tips" (DiTis) / puntas de pipeta de 200 µL
- 16–18 1000-µL DiTis / puntas de pipeta de 1000 µL

En la parte superior (no mostrado) se colocan en las posiciones 5, 6 y 7 puntas de pipeta de 1000 µL.

4.2.1. Preparación de la muestra para análisis

Como norma básica, siempre que sea posible (en función de la cantidad de muestra disponible), se reservará una cantidad de muestra suficiente (aproximadamente la misma que se determinó para la analítica) para un eventual segundo análisis (bien del propio laboratorio o por solicitud para una contrapericia).

Como consecuencia de la diversidad de soportes sobre los que puede asentar el resto biológico a analizar, la cantidad disponible y las diferentes condiciones de conservación del mismo, se establecen las siguientes indicaciones para la determinación de la muestra a someter a análisis:

4.2.1.1. Restos sanguíneos

Líquidos: Se procederá a tomar entre 10 y 50 µl de muestra (en función de que se observe dilución de la misma).

Impregnados en hisopo: Se recortará al menos la mitad del algodón del mismo (dependiendo del grado de impregnación del mismo) conteniendo parte de la mancha impregnada.

En papel o tela: Se procederá a recortar un fragmento de entre 2 y 4 cm².

Otros soportes sólidos: Se procederá a pasar un hisopo ligeramente humedecido en agua destilada

4.2.1.2. Restos seminales.

En aquellos casos en que los estudios preliminares hayan detectado presencia de semen y no sea previsible la presencia de mezcla de semen con otros restos celulares, se dividirá la muestra en dos partes iguales, pues cabe la posibilidad de tener que realizar una extracción diferencial, si el resultado de la extracción total fuese de mezcla.

Líquidos: Se procederá a tomar entre 10 y 50 µl de muestra.

Impregnado en hisopo: Se recortará al menos la mitad del algodón del mismo (dependiendo del grado de impregnación del mismo) conteniendo parte de la mancha impregnada.

En papel o tela: Se procederá a recortar un fragmento de entre 1 y 2 cm².

Otros soportes sólidos: Si el resto seminal permanece húmedo se procederá a pasar un hisopo ligeramente humedecido en agua destilada. Si el resto seminal es sólido se procederá a extraer entre una y tres láminas mediante raspado con bisturí.

4.2.1.3. Restos salivares

Líquidos: Se procederá a tomar entre 10 y 50 µl de muestra.

Impregnado en hisopo: Si se dispone de un único hisopo y ante la posibilidad de no disponer de suficiente concentración celular para dos análisis, se recortará el fragmento de algodón del mismo entero. Si se dispone de más de un hisopo de la misma muestra, se preservarán éstos.

En papel o tela: Se procederá a recortar un fragmento de entre 2 y 4 cm².

Colillas de cigarrillo: Se recortará aproximadamente la mitad del papel de filtro en supuesto contacto con la boca.

4.2.1.4. Restos epiteliales

Impregnado en hisopo: Si se dispone de un único hisopo y ante la posibilidad de no disponer de suficiente concentración celular para dos análisis, se recortará el fragmento de algodón del mismo entero. Si se dispone de más de un hisopo de la misma muestra, se preservarán éstos.

En papel o tela: Se procederá a recortar un fragmento de entre 2 y 4 cm².

Sobre recipientes y objetos: Se procederá a pasar un hisopo ligeramente humedecido en agua destilada.

4.2.1.5. Pelos: Se procederá como se indica en la [IN0046](#) "Estudios preliminares en muestras de pelo".

La muestra seleccionada se introducirá en un vial eppendorf de 1,5 ml, y se procederá con la extracción manual.

El resultado se registra en el formato [FM0080](#) Control de preparación de muestras, así como se archivarán todos los registros primarios generados.

4.2.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN MANUAL

4.2.2.1 Digestión proteolítica

- Sacar los reactivos de congelador y atemperar unos 15 min. a temperatura ambiente.
- A cada vial con muestra y al vial vacío de control negativo se añaden:

400 ± 20 µl de acetato sódico 0,2 M

30 ± 3 µl de proteinasa K

20 ± 2 µl de DTT 1M

30 ± 3 µl de SDS al 10% (p/v)

- Se mezcla pipeteando o bien mediante un vortex
- Se introducen las muestras en el baño termostático:

18 horas a una temperatura de 37 ± 1,5 °C

2 horas a una temperatura de 56 ± 2 °C

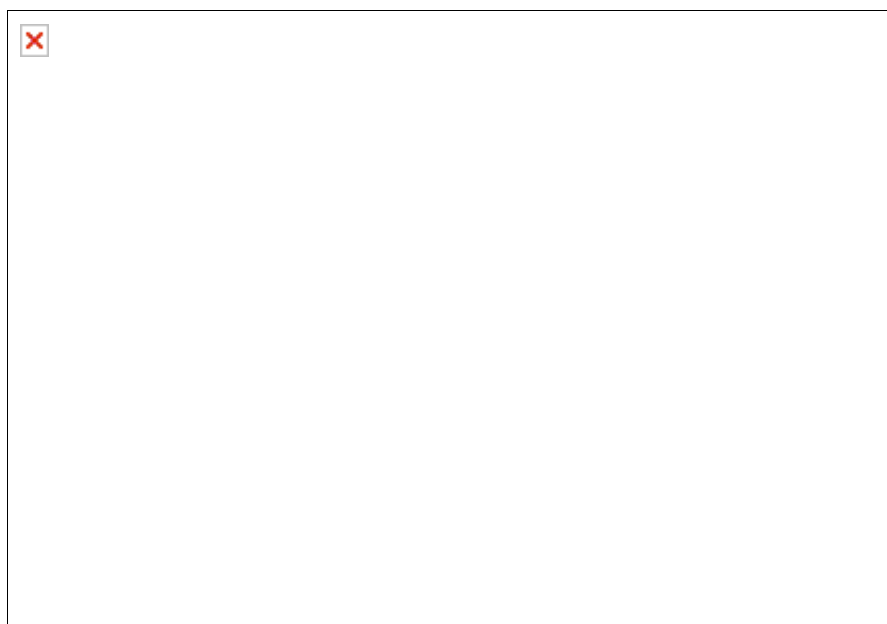
16 horas a una temperatura de 56 ± 2 °C (pelos)

4.2.2.2 Extracción

- Se preparan y etiquetan los viales precisos. Se perforan, con aguja hipodérmica estéril, la parte inferior de cada vial con muestra y se introducen en los viales preparados y referenciados. Se perfora la zona superior del vial con muestra.
- Se centrifugan los viales a 6000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga (GF021) durante 5 minutos, descartándose posteriormente los restos de muestra.
- Se añaden 200 ± 20 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) a cada vial y se realiza un vortex a cada vial hasta conseguir una perfecta emulsión.

Se centrifugan los viales a 13000 rpm. aproximadamente durante 2 minutos.

4.2.2.3. Purificación y concentración con Amicon Ultra-4 30



- Se toman los tubos necesarios de Amicon Ultra-4 30 y se referencian.
- Tras quitar el tapón, se introducen 3,5 ± 0,3 ml de tampón Tris-EDTA (TE) en cada tubo.
- Se transfiere al Amicon Ultra-4 30 la fase acuosa (sobrenadante) del vial, evitando coger parte de la

interfase.

- Se pone el tapón, y se centrifugan los tubos (GF019 o GF020) a 3500 rpm durante 20 minutos.
- Se separa el cestillo intermedio (unidad de filtrado) del tubo contenedor o tubo de centrifugado, se vacía el contenido del tubo contenedor en una cubeta y se recoge el extracto de ADN del cestillo intermedio (se obtendrá una cantidad de entre 20 a 150 µl de extracto) que se introducirá en un vial de 0,5ml debidamente etiquetado.
- Se guardan los extractos en congelador hasta su uso y tras éste un mínimo de 5 años.

El resultado se registra en el formato [FM0085](#) Control de extracción, así como se archivarán en un AZ ubicado en el área de trabajo todos los registros primarios generados.

4.2.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA

4.2.3.1 Condiciones de almacenaje de los reactivos del kit Prepfiler

- Partículas magnéticas: A 4-8° C una vez que se recibe el kit. Una vez abierto el vial se podrá guardar durante 3 meses a temperatura ambiente o hasta la fecha de fin de uso preferente en la nevera.
- El resto de componentes, tampón de lisis, concentrado para el tampón de lavado y el tampón de elución se mantendrán a temperatura ambiente hasta su caducidad.

4.2.3.2 Preparación de los reactivos del kit Prepfiler

En el PrepFiler Automated Forensic DNA Extraction kit figuran los siguientes componentes (suficientes para la extracción de 960 muestras usando el protocolo estándar):

- PrepFiler Lysis Buffer Una botella de 500 ml
- PrepFiler Magnetic Particles 13 tubos de 1'5 ml
- PrepFiler Wash Buffer Concentrate Una botella de 500 ml
- PrepFiler Elution Buffer Una botella de 125 ml

Incubar las partículas magnéticas a 37 °C durante 30 minutos. Si el almacenamiento se produce en nevera o se observara precipitación, antes de cada uso, deberá realizarse una incubación a 37 °C durante 30 minutos.

Mezclar 260 ml de "PrepFiler Wash Buffer Concentrate" con 740 ml de etanol (el tampón así preparado se almacena a temperatura ambiente y puede ser usado durante 6 meses).

Preparar DTT 1 M o descongelar uno ya preparado y previamente alicuotado.

Si el "PrepFiler Lysis Buffer" contiene precipitados, calentar a 37 °C y realizar un posterior vórtex.

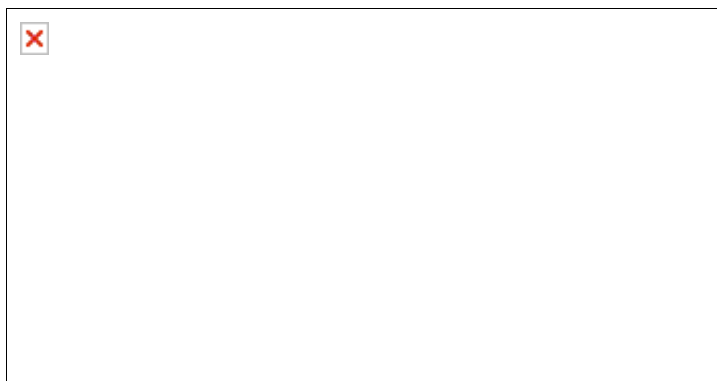
4.2.3.3 Extracción en placa

4.2.3.3.1 Realizar la prelis.

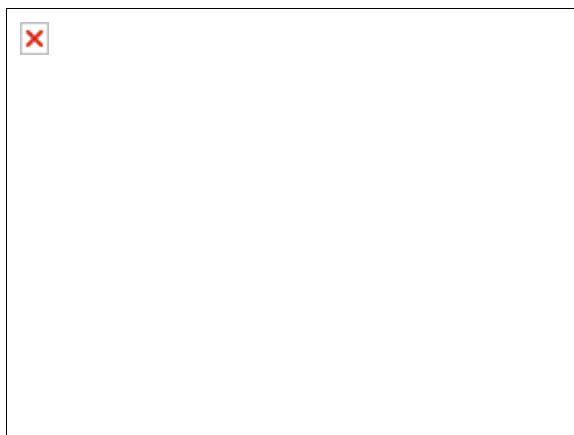
- Encender el incubador (GF085) con agitación a 70 °C
- Confirmar que el "Filter Plate" esté fuertemente unido al "Spin Plate". Para ello puede centrifugarse durante 2 min a 650 x g. Es necesario poner un contrapeso para que la centrífuga (GF083) esté balanceada



- Colocar cada muestra a extraer en el “Filter Plate” rellenando los pocillos por columnas
- Colocar en hielo durante 10 min y mantener en hielo mientras se añaden los reactivos
- Preparar el tampón de lisis adecuado según el número de muestras (incluir controles negativos y/o blancos de extracción) que vayamos a extraer usando 300 µl de “PrepFiler Lysis Buffer” y 5 µl de DTT 1 M para cada muestra, en un tubo de ensayo
- A cada pocillo de la placa donde hayamos colocado muestra para su extracción (deberá tenerse en cuenta los controles negativos y/o blancos de extracción) añadir 300 µl de buffer de lisis - DTT
- Quitar la placa del hielo y sellar (usando “MicroAmp Clear Adhesive Film”)



- Incubar la placa a 70 ° C y 150 rpm durante 60 min (es importante mantener horizontal la placa en su traslado al incubador (GF085) para evitar contaminaciones cruzadas)
- Tras la incubación, centrifugar la placa 10 min a 650 g en la centrífuga (GF083)
- Separar el “Filter Plate” del “Spin Plate”. Las muestras extraídas permanecerán en el “Filter Plate” mientras que las muestras lisadas permanecerán en el “Spin Plate”



- Eliminar el “Filter Plate” con los restos de las muestras extraídas

4.2.3.3.2 Creación de una hoja de cálculo para introducir los datos de las muestras a extraer

Los datos de las muestras se introducirán manualmente o alternatively se creará en una hoja excel un listado de las muestras, introduciendo los datos:

- En la primera columna se debe escribir “**SpinPlate**”
- En la segunda columna se creará un listado numérico desde el 1 hasta la última muestra.
- En la tercera columna se introducirán los nombres de las muestras
- En la cuarta columna se debe escribir “**Sample**”
- Se guarda en la carpeta adecuada como CSV.



4.2.3.3.3 Pasos previos en el robot

Una vez por semana, los viernes a última hora, para evitar la formación de burbujas, se deberá de rellenar el contenedor de agua ultrapura (SYST LIQUID) con ddH₂O, y se deberá de vaciar el contenedor con el agua de desperdicio (WASTE).

Se debe de comprobar antes de cada uso que el nivel de agua del contenedor de agua ultrapura esté entre los niveles máximo y mínimo, y en su caso se debería de rellenar hasta el nivel máximo y esperar a trabajar hasta el día siguiente.

Comprobar antes de cada uso que no haya burbujas en el contenedor o en los tubos de subida y bajada del agua a los contenedores.

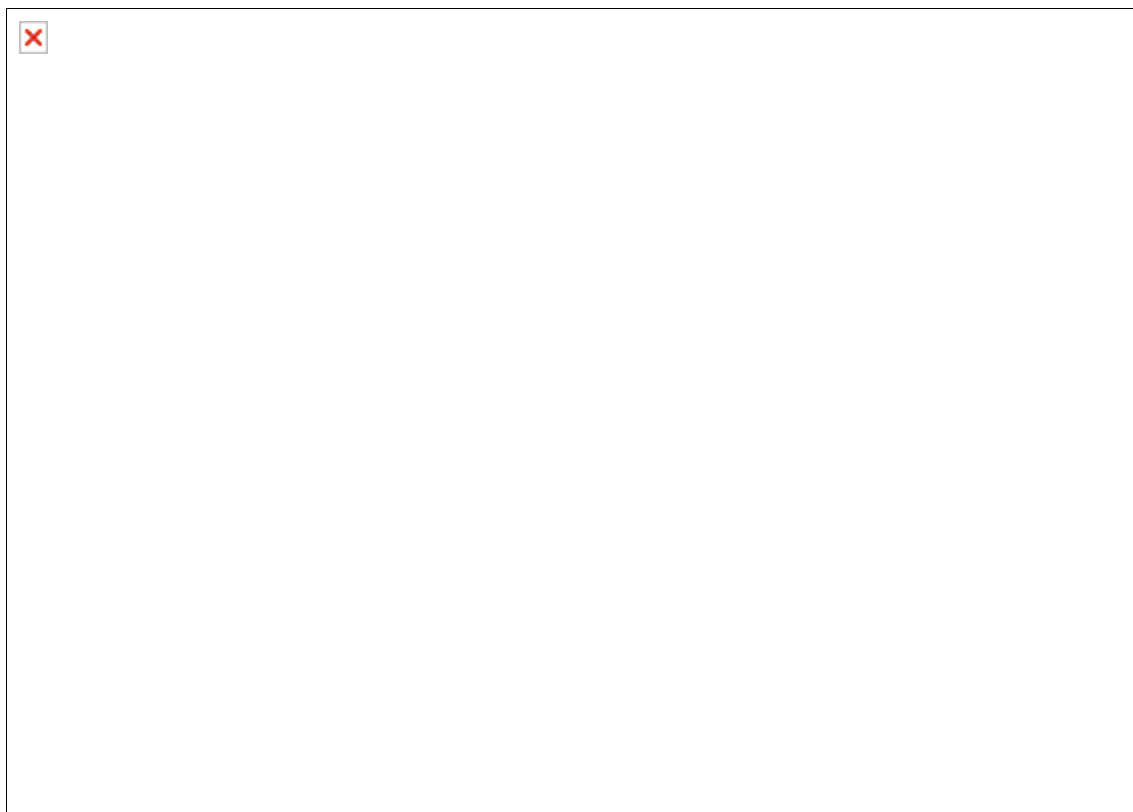
4.2.3.3.4 Disposición del robot para extracción de placa a placa



- Comprobar el mantenimiento de las tuercas de las pipetas.
- Preparar puntas de 200 y 1000 μ l, y ponerlas en las posiciones 29 y 35 de la zona de trabajo, según se ve en el esquema superior.
- Colocamos el "Microamp Optical 96 Well" (placa donde se guardarán los extractos) según el esquema.
- Colocamos el "Spin Plate" (con nuestras muestras a extraer) según el esquema.
- Colocamos el "Prepfilier Processing Plate" según el esquema
- Colocamos el depósito para isopropanol (con la cantidad adecuada -tabla superior-) según el esquema.
- Colocamos el depósito para el tampón de lavado (con la cantidad adecuada -tabla superior-) según el esquema.

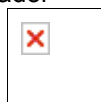
Reactivo	Reactivo por muestra	Sobrante	Ejemplo (75- 80 muestras)
Isopropanol	(Protocolo de 300 μ l) 180 μ l	8 ml	23 ml
	(Protocolo de 500 μ l) 300 μ l	8 ml	32 ml
Tampón lavado	900 μ l	13 ml	86 ml
Tampón elución	50 μ l	6 ml	10 ml

- Colocamos el depósito para el tampón de elución (con la cantidad adecuada -tabla superior-) según el esquema.
- Colocamos un depósito vacío para desperdicio ("waste") en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos las partículas magnéticas en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Poner puntas de pipeta de 1000 μ l en las posiciones 5, 6 y 7 mientras que la posición 4 debe de quedar vacía.

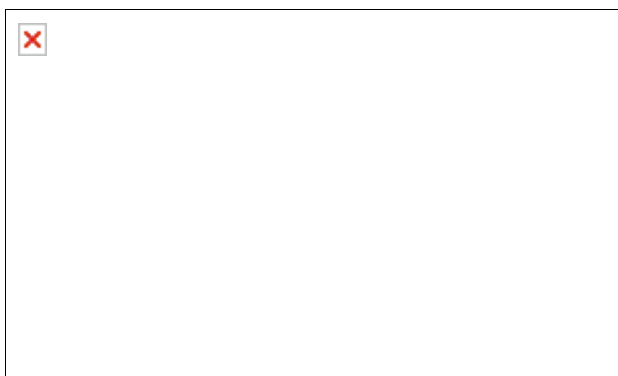


4.2.3.3.5 Revisión inicial del robot

- Encender el ordenador



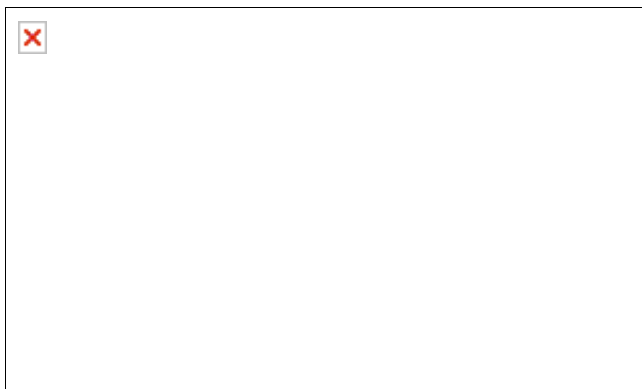
- Encender el Robot
- Para arrancar el software EVOware Standard, nos pedirá un nombre de usuario y contraseña (usuario y 00000)
- Arrancar el software EVOware Standard, aparece una pantalla de Start up, clicar sobre “**Run maintenance - eguneko lehena / Start your selection**”



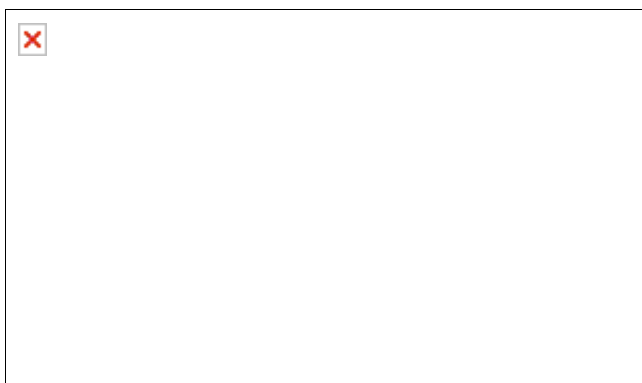
- En la pantalla “**Runtime controller**” clicar sobre “**Run / Initializing**”. Tras este proceso el brazo robótico comienza a moverse para testar la zona de trabajo
- Al finalizar, cerrar “**Runtime Controller**”

4.2.3.3.6 Puesta en marcha del proceso automatizado de extracción

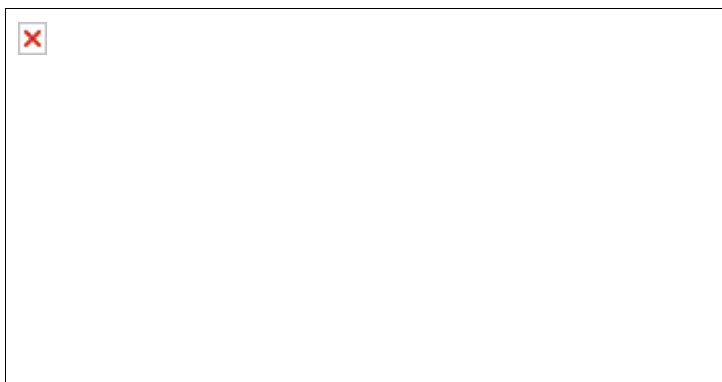
- En el software Evo, seleccionaremos la opción **“Edit an existing script”**
- En la pantalla **“Startup”**, seleccionaremos **“Start your selection”** y clicaremos sobre **“Run”**



- Buscar en el desplegable **“Prepfilier_Plate_Plate COMBO”**

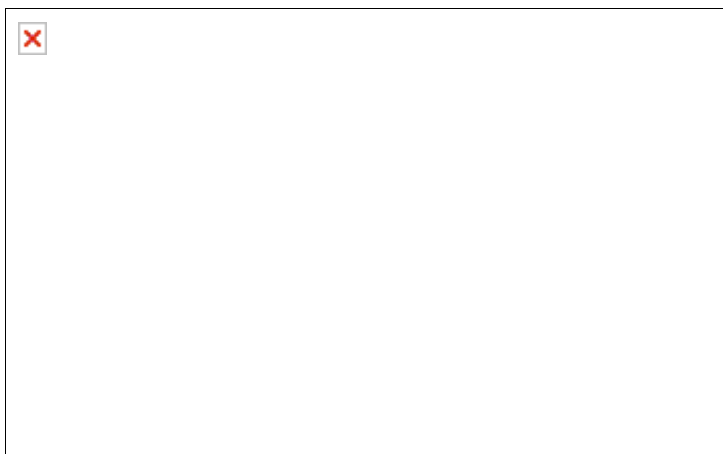


- Clicar sobre **“Run”**.
- Clicar sobre **“Execute / Run”**
- En la pantalla **“Runtime controller”**, clicar sobre **“Run”**
- Aparece un mensaje de **“No samples present”**

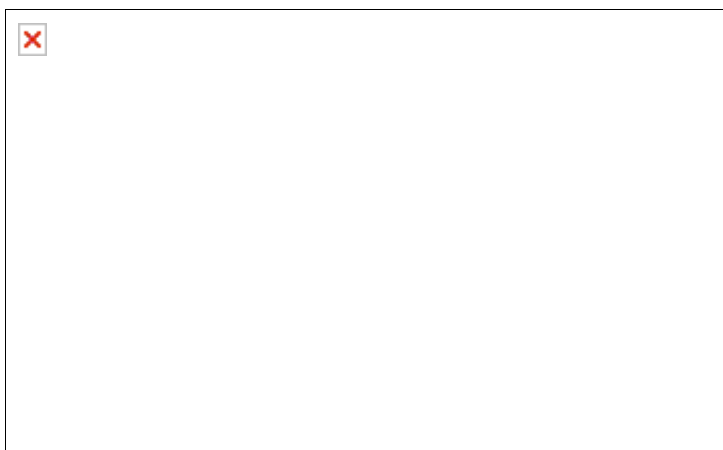


- Clicar sobre **“Edit”** y sale una pantalla de **“edit samples”**
- Introducir las muestras, manualmente, o bien en un archivo *.csv desde la opción buscar (ver 4.2.3.3.2), comprobar que están correctas y clicar sobre **OK**
- Clicar sobre **“Run”**
- Introducir los números de lotes de los reactivos
- Clicar sobre **“Run”**

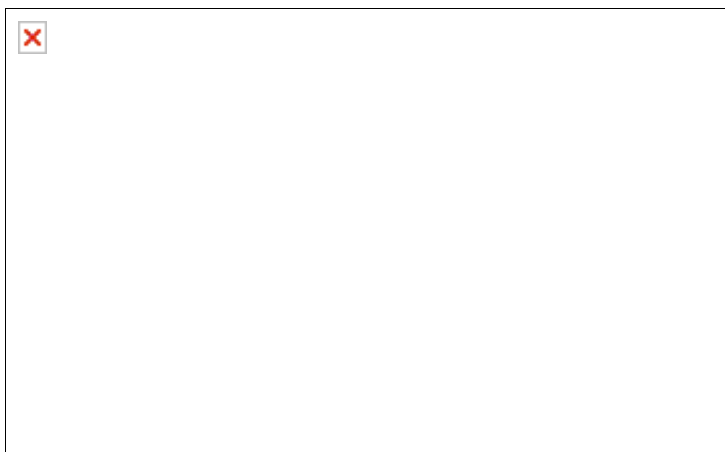
- Comprobar que está correctamente colocado lo que pide (“samples”, “magnetic particles”, etc.)



- Situar el cursor sobre la “**Description**”, y ver si lo que indica el gráfico está correcto, tras comprobar que todos están en su sitio (clicando sobre “**loaded**”) o bien si están todos bien se puede clicar sobre “**loaded all**”.
- Clicar sobre “**Run**”
- El brazo robótico escanea los códigos de barra, y si no los detecta deberemos seleccionar “**Ignore**” y clicar sobre “**Run**”
- Aparece una pantalla en la que nos indica que las puntas de 1000 µl deben de estar en las posiciones 5, 6 y 7 mientras que la posición 4 debe de estar vacía.
- Clicar sobre “**OK**”
- Al finalizar la carrera, más o menos dos horas, deberemos ir a la pantalla Freedom Evo y clicaremos “**Run**” en la pantalla para crear el “report” (archivo con los resultados)



- Clicar otra vez sobre “**Run**” para finalizar



4.2.3.3.7 Archivo de los resultados

Una vez que se ha realizado la extracción se guarda el archivo con los datos de las muestras y los reactivos que hemos utilizado.

Al finalizar el “script” (programa), los datos se guardan automáticamente en la carpeta **C:\HIDEVolutionExtractionFiles**, cuando se realice la siguiente extracción este archivo se moverá automáticamente a la carpeta **C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\date_time**, así por ejemplo si el “Run” se finalizó el 15 de agosto de 2008 a las 3:08, se guardará como **C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\20080815_150800**.

4.2.3.4 Extracción en tubo

4.2.3.4.1 Realizar la prelis

- Encender el incubador (GF085) con agitación a 70 °C
- Se preparan y etiquetan tantos viales de 1,5 ml como muestras a analizar más un blanco de extracción, y se introducen en un soporte para viales.
- Colocar cada muestra a extraer en un vial.
- Preparar el tampón de lisis adecuado según el número de muestras (incluir controles negativos y/o blancos de extracción) que vayamos a extraer usando 300 µl de “PrepFiler Lysis Buffer” y 5 µl de DTT 1 M
- Añadir a cada vial donde hayamos colocado muestra para su extracción (deberá tenerse en cuenta los controles negativos y/o blancos de extracción) 300 µl de buffer de lisis – DTT
- Incubar el soporte para viales a 70 ° C y 150 rpm durante 60 min
- Se preparan y etiquetan los viales precisos. Se perforan, con aguja hipodérmica estéril, la parte inferior de cada vial con muestra y se introducen en los viales preparados y referenciados. Se perfora la zona superior del vial con muestra.
- Se centrifugan los viales a 6000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga (GF021) durante 5 minutos, descartándose posteriormente los restos de muestra, debiendo quedar, como mínimo, un volumen de 150l.
- Reservar los viales hasta colocarlos en el robot.

4.2.3.4.2 Creación de una hoja de cálculo para introducir los datos de las muestras a extraer

Los datos de las muestras se introducirán manualmente o alternatively se creará en una hoja excel un listado de las muestras, introduciendo los datos:

- En la primera columna se creará un listado con S1 para el primer “rack” (las 16 primeras muestras),

S2 para el segundo y sucesivamente

- En la segunda columna se creará un listado numérico desde el 1 hasta el 16 para cada uno de los “racks”
- En la tercera columna se introducirán los nombres de las muestras
- En la cuarta columna se debe escribir “Sample”
- Se guarda en la carpeta adecuada como CSV.

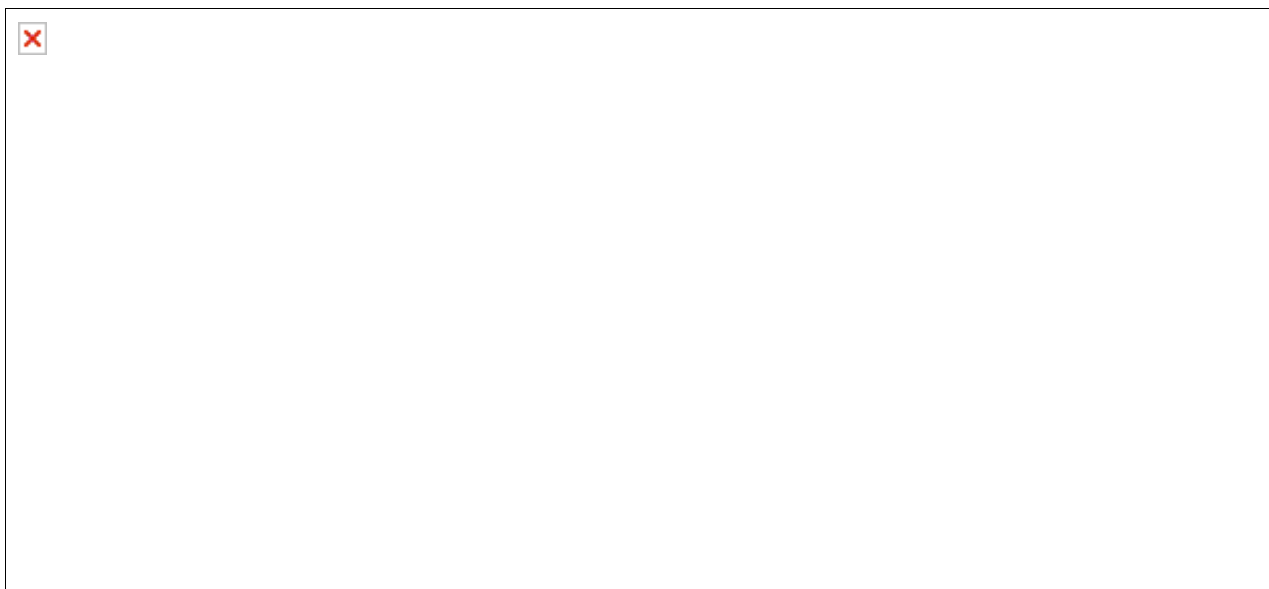
4.2.3.4.3 Pasos previos en el robot

Una vez por semana, los viernes a última hora, para evitar la formación de burbujas, se deberá de rellenar el contenedor de agua ultrapura (SYST LIQUID) con ddH₂O, y se deberá de vaciar el contenedor con el agua de desperdicio, (WASTE).

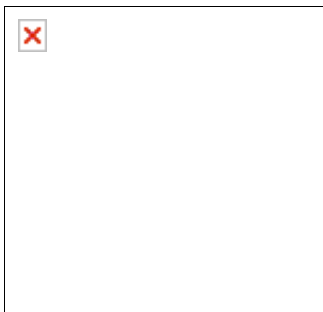
Se debe comprobar antes de cada uso que el nivel de agua del contenedor de agua ultrapura esté entre los niveles máximo y mínimo, y en su caso se debería rellenar hasta el nivel máximo y esperar a trabajar hasta el día siguiente.

Comprobar antes de cada uso que no haya burbujas en el contenedor o en los tubos de subida y bajada del agua a los contenedores.

4.2.3.4.4 Disposición del robot para extracción de tubo a tubo



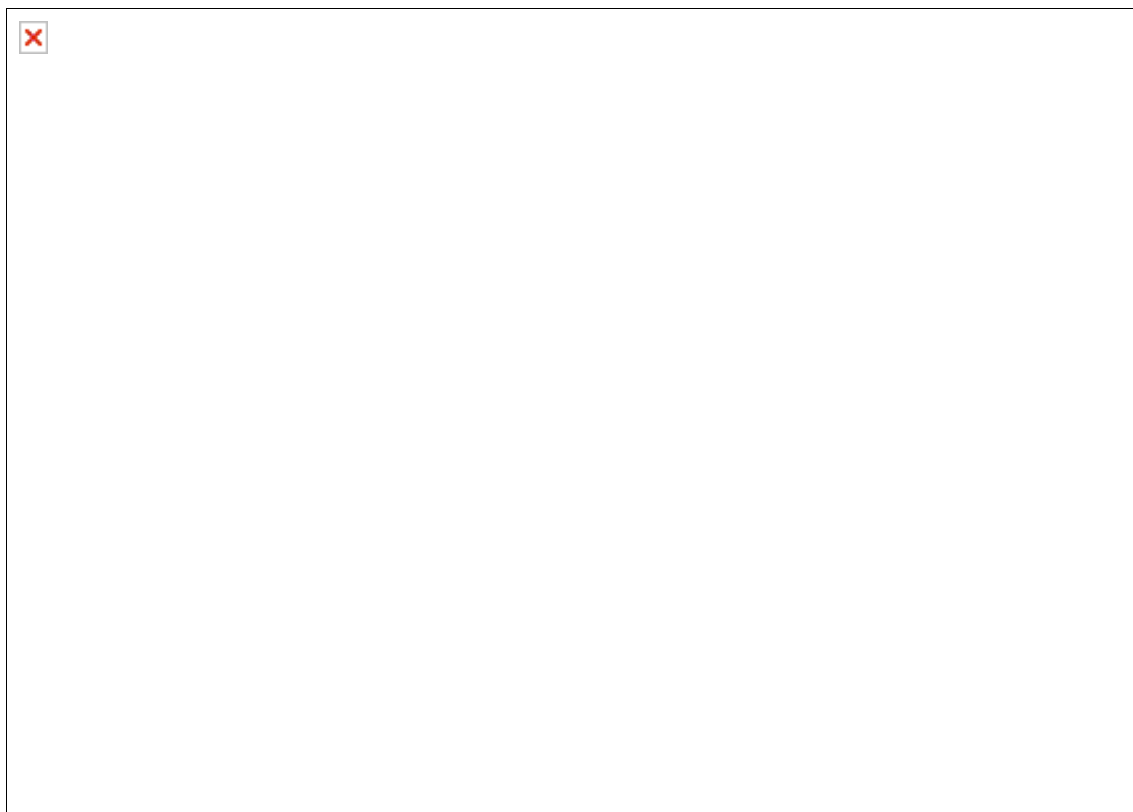
- Colocar los “racks” para la elución con tubos de 1,5 ml vacíos en su posición comenzando en S1.
- Se introducen los viales a extraer en el robot comenzando en posición L1, con cuidado de colocar el tapón según la ilustración inferior.



- Preparar puntas de 200 y 1000 μ l, y ponerlas en las posiciones 29 y 35 de la zona de trabajo, según se ve en el esquema superior.
- Colocamos el "Prepfilier Processing Plate" en la zona de trabajo del robot según el esquema.

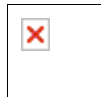
Reactivo	Reactivo por muestra	Sobrante	Ejemplo (75- 80 muestras)
Isopropanol	(Protocolo de 300 μ l) 180 μ l	8 ml	23 ml
	(Protocolo de 500 μ l) 300 μ l	8 ml	32 ml
Tampón lavado	900 μ l	13 ml	86 ml
Tampón elución	50 μ l	6 ml	10 ml

- Colocamos el depósito para isopropanol (con la cantidad adecuada según la tabla superior) en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos el depósito para el tampón de lavado (con la cantidad adecuada según la tabla superior) en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos el depósito para el tampón de elución (con la cantidad adecuada según la tabla superior) en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos un depósito vacío para desperdicio ("waste") en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos las partículas magnéticas en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Poner puntas de pipeta de 1000 μ l en las posiciones 5, 6 y 7 mientras que la posición 4 debe de quedar vacía.

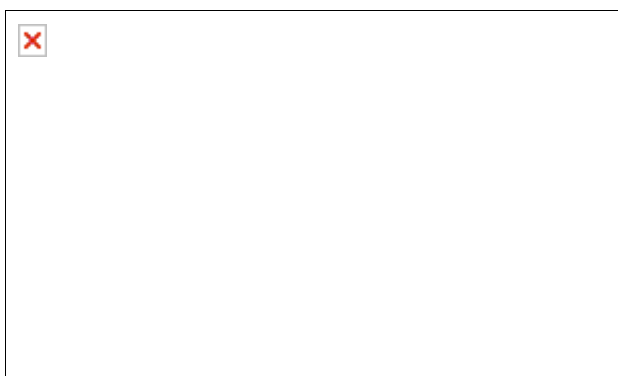


2.3.4.5 Revisión inicial del robot

- Encender el ordenador



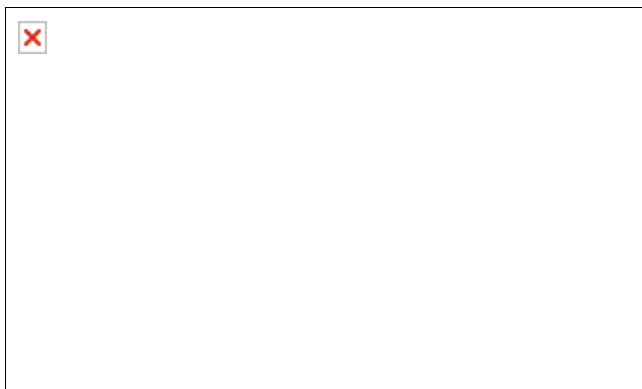
- Encender el Robot
- Para arrancar el software EVOware Standard, nos pedirá un nombre de usuario y contraseña (usuario y 00000).
- Arrancar el software EVOware Standard, aparece una pantalla de “**Start up**”, clicar sobre “**Run maintenance - eguneko lehena / Start your selection**”



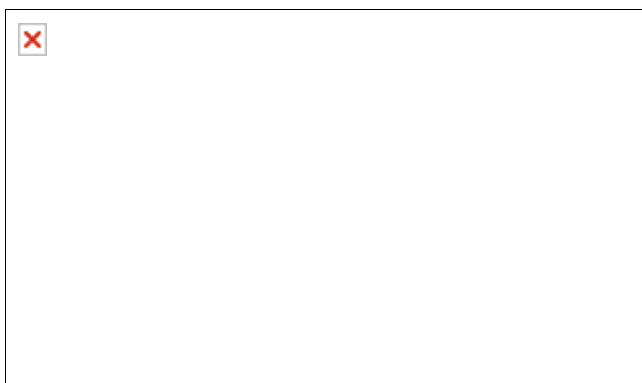
- En la pantalla “**Runtime controller**” clicar sobre “**Run / Initializing**”. Tras este proceso el brazo robótico comienza a moverse para testar la zona de trabajo
- Al finalizar, cerrar “**Runtime Controller**”

4.2.3.4.6 Puesta en marcha del proceso automatizado de extracción

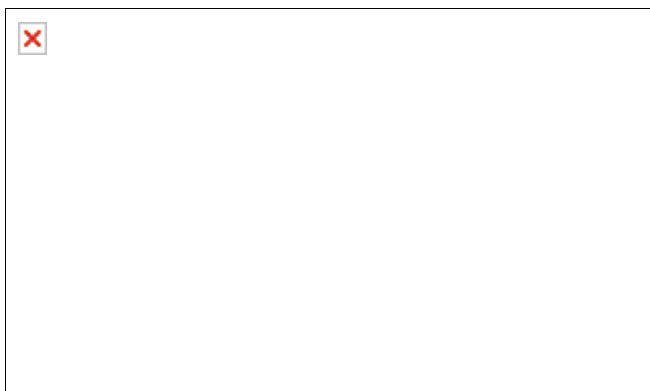
- En el software Evo, seleccionaremos la opción **“Edit an existing script”**
- En la pantalla **“Startup”**, seleccionaremos **“Start your selection”** y clicaremos sobre **“Run”**



- Buscar en el desplegable **Prepfilер_Tube_Tube COMBO**.

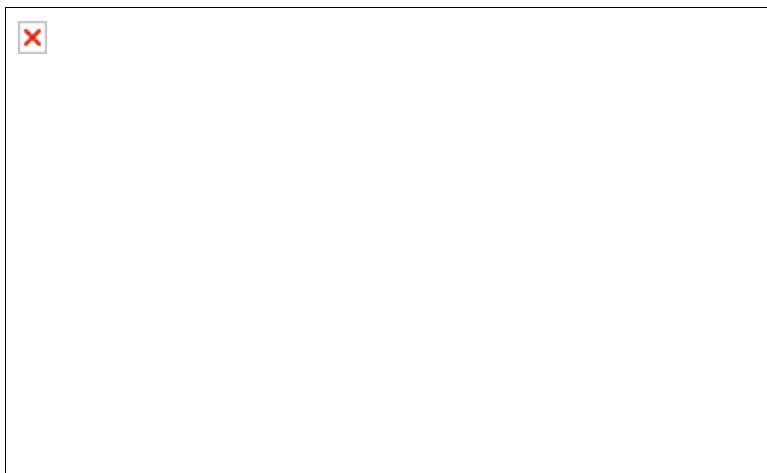


- Clicar sobre **“Run”**
- Clicar sobre **“Execute/ Run”**
- En la pantalla **“Runtime controller”**, clicar sobre **“Run”**
- Aparece un mensaje de **“No samples present”**

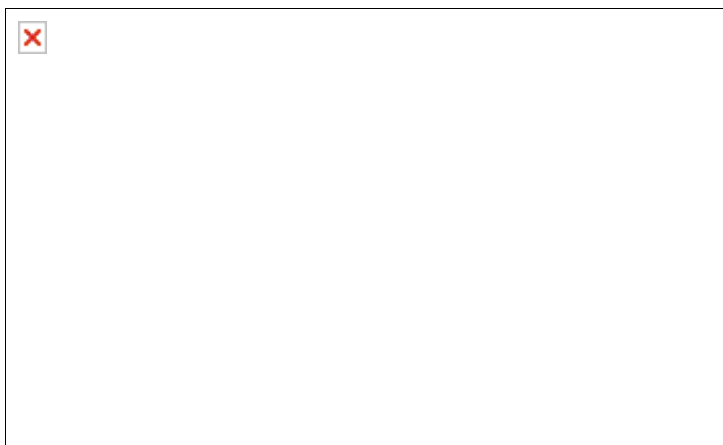


- Clicar sobre **“Edit”** y sale una pantalla de **“edit samples”** para cada uno de los **“racks”** (posiciones 7,8,9...)
- Introducir las muestras, manualmente, o bien en un archivo *.csv desde la opción buscar (ver 4.2.3.4.2), comprobar que están correctas y clicar sobre **“OK”**
- Clicar sobre **“Run”**
- Introducir los números de lotes de los reactivos

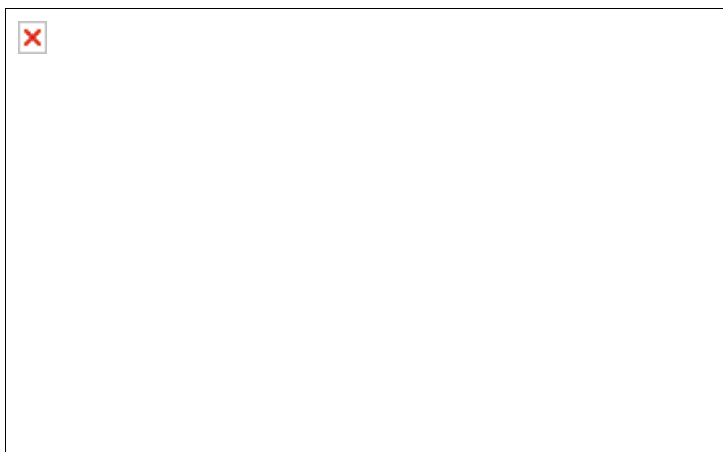
- Clicar sobre **“Run”**
- Comprobar que está correctamente colocado lo que pide (“samples”, “magnetic particles”, etc.)



- Situar el cursor sobre la **“Description”** y ver si lo que indica el gráfico está correcto, tras comprobar que todos están en su sitio (clicando sobre **“loaded”**) o bien si están todos bien se puede clicar sobre **“loaded all”**
- Clicar sobre **“run”**
- El brazo robótico escanea los códigos de barra, y si no los detecta deberemos seleccionar **“Ignore”** y clicar sobre **“Run”**
- Aparece una pantalla en la que nos indica que las puntas de 1000 µl deben de estar en las posiciones 5, 6 y 7 mientras que la posición 4 debe de estar vacío
- Clicar sobre **“OK”**
- Al finalizar la carrera, más o menos dos horas, deberemos ir a la pantalla Freedom Evo y clicaremos **“Run”** en la pantalla para crear el “report” (archivo con los resultados)



- Clicar otra vez sobre **“Run”** para finalizar



4.2.3.4.7 Archivo de los resultados

Una vez que se ha realizado la extracción se guarda el archivo con los datos de las muestras y los reactivos que hemos utilizado.

Al finalizar el “script” (programa), los datos se guardan automáticamente en la carpeta **C:\HIDEVolutionExtractionFiles**, cuando se realice la siguiente extracción este archivo se moverá automáticamente a la carpeta **C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\date_time**, así por ejemplo si el “run” se finalizó el 15 de agosto de 2008 a las 3:08, se guardará como **C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\20080815_150800**.

4.2.4. Mantenimiento de las muestras

Se guardan los extractos en congelador hasta su uso y tras éste un mínimo de 5 años.
Los resultados primarios se archivarán en un AZ ubicado en el área de trabajo todos los registros primarios generados.

5.- Formatos:

Código	Denominación
FM0085	Control de extracción
FM0080	CONTROL DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

6.- Referencias:

Referencias	Código	Denominación
Instrucciones	IN0046	ESTUDIOS PRELIMINARES EN MUESTRAS DE PELO
	IN0049	EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS CON MEZCLA DE RESTOS ESPERMÁTICOS Y OTROS RESTOS CELULARES (SANGUÍNEOS, SALIVARES, EPITELIALES)
	IN0071	PREPARACIÓN DE REACTIVOS
Artículos		Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TT (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2 nd ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press.
		Jung et al. Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ gene. Int J Legal Med 104: 145-148 (1991)
		Comey CT. DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. J Forensic Sci 39(5): 1254-1269 (1994)
		Nagy et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. Forensic Sci Int 152: 13-22 (2005)

		Dundas N et al. Comparison of automated nucleic acid extraction Methods with manual extraction. J Mol Diagn 10: 311-316 (2008).
		Stangegaard M. et al. Automated extraction of DNA and PCR setup using a Tecan Freedom EVO liquid handler. Forensic Sci Int: Genet Supp Series 2(1): 74-76 (2009)
		Brevnov M et al. Automated extraction of DNA from forensic simple types using the PrepFiler automated forensic DNA extraction kit. JALA 14: 294-302 (2009)
		Brevnov M eta al. Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. J Forensic Sci 54: 599-607 (2009)
		Zimmermann P et al. Adaptation and evaluation of the PrepFiler™ DNA extraction technology in an automated forensic DNA analysis process with emphasis on DNA yield, inhibitor removal and contamination security. Forensic Sci Int: Genet Supp Series 2(1): 62-63 (2009)
		Frégeau Ch J. et al. Validation of a DNA IQ™-based extraction method for TECAN robotic liquid handling workstations for processing casework. Forensic Sci Int: Genet 2010 (in press)

7.- Anexos:

Manual de uso del Amicon

Ultra-4 30 Applied Biosystems. PrepFiler™ automated forensic DNA extraction kit getting started guide. PPN 4393917 Rev. B, 2008.

Applied Biosystems. PrepFiler™ forensic DNA extraction kit user guide. PPN 4390932 Rev. B, 2008.

TECAN. HID EVOLution™. Extraction application manual. Part no. 395372, 2008.

8.- Historial de modificaciones:

Nº revisión	Descripción de la modificación	Fecha modif.
00	Edición inicial	22/12/2006
01	Añadir " Amicon Ultra-4", añadir anexo y quitar apartado 4.2.3.	08/05/2007
02	Modificar tecnicismos	26/06/2007
03	Ampliar fundamentos	14/03/2008
04	Se especifican las características de las muestras sobre las que se va a realizar la extracción de ADN y se reflejan el número de lavados que se realizan durante la purificación y concentración de ADN	20/05/2008
05	Incluir preparación de la muestra para análisis apartado 4.2.1 y el sistema de concentración de ADN cambiando el Centricon 100 por Amicon Ultra-4 30, se cambia el índice.	07/07/2008
06	En el apartado 4.2.1.1. cambiar los valores por entre 100 y 500 ml Incluir en el punto 4.1.3. Equipamiento, los dispensadores GF074 y GF075.	14/04/2009
07	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
08	Incluir la extracción automatizada utilizando el kit Prepfilier y el Robot Tecan Evo 150. Se cambia el índice	29/06/2010
09	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: Jefe de la Sección de Genética Forense
Revisado: Jefe/a de la Ertzaintza
Aprobado: Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

Fecha: 04/10/2011
Fecha: 13/10/2011
Fecha: 14/10/2011

