

IN0049

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 17/10/2011

Rev.08

---

## EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS CON MEZCLA DE RESTOS ESPERMÁTICOS Y OTROS RESTOS CELULARES (SANGUÍNEOS, SALIVARES, EPITELIALES)

---

### 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 el análisis
    - 4.2.2. Primera digestión (obtención de la fracción no espermática)
      - 4.2.2.1. Tratamiento con proteinasa K
      - 4.2.2.2. Obtención de ADN de la fracción no espermática
    - 4.2.3. Segunda digestión (obtención de la fracción espermática)
      - 4.2.3.1. Tratamiento con proteinasa K
      - 4.2.3.2. Extracción de ADN de la fracción espermática
    - 4.2.4. Purificación y concentración con Amicon Ultra-4 30
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 mediante digestión proteolítica diferencial, de la fracción espermática y la fracción no espermática y posterior extracción mediante fenol-cloroformo seguido de purificación mediante filtración con Amicon Ultra-4 30 en muestras biológicas.

#### 2.- Alcance:

El presente procedimiento afecta a todos los ensayos que realiza la Sección de Genética de la Unidad de la Policía Científica (UPC) de la Ertzaintza, en los 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 de varón y mujer, por coexistencia con células sanguíneas, salivares u otras células epiteliales.

#### 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](#))  
Solución lavado ([IN0071](#))

##### 4.1.2. Material fungible

Viales eppendorf de 1,5 ml  
Pegatinas circulares de referenciación  
Puntas de pipeta con filtro estériles (1000, 200 y 20 µl)  
Amicon Ultra-4 30  
Gradillas  
Guantes

#### 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)

## 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.

Este procedimiento trata de la extracción (y purificación) diferencial del ADN, por un lado, de las células de descamación del epitelio vaginal u otros restos celulares (sanguíneos, salivares, otros epitelios) que se corresponderá con la fracción de ADN de la primera lisis o normalmente fracción no espermática; y por otro lado, el ADN de los espermatozoides que se corresponderá con la fracción de ADN de la segunda lisis o normalmente fracción espermática) en muestras con espermatozoides para el análisis de polimorfismos del ADN.

#### 4.2.1. Preparación de la muestra para análisis

En aquellos casos en que la presencia de mezcla pueda ser la norma (por ejemplo, en hisopo vaginal, anal o bucal de una víctima de violación), se seleccionará la muestra siguiendo las indicaciones expresadas en la [IN0047](#) y se realizará directamente una extracción diferencial. Cuando tras la extracción de una muestra conteniendo restos seminales como resultado del análisis de polimorfismos de ADN nuclear en la misma se obtuviera un perfil genético mezcla, al segundo recorte se le realizaría una extracción diferencial tal y como se describe a continuación. 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. Primera digestión (obtención de la fracción no espermática)

##### 4.2.2.1. Tratamiento con proteinasa K

- A cada vial con muestra se añaden los siguientes componentes:  
500 ± 20 µl NaCl-EDTA  
15 ± 1 µl de proteinasa K  
35 ± 3 µl de SDS al 10% (p/v)
- Se mezcla pipeteando o bien mediante vortex
- Vortear unos 10 segundos las muestras una vez añadida la solución de digestión y dar un spin
- Se introducen las muestras en el baño termostático 2-3 horas a 56 ± 2 °C

##### 4.2.2.2. Obtención de la fracción no espermática

- 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 6.000 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 mezcla aproximadamente durante 10-15 segundos en el agitador (GF043) hasta formar una emulsión.

- Se centrifugan los viales a unas 12000 rpm aproximadamente durante 2 minutos.
- Se recoge el sobrenadante obtenido del vial inferior (fracción no espermática) y se trasvasa a otro vial debidamente etiquetado. De aquí pasaríamos al punto 4.2.4. (purificación y concentración).
- Si no se fuera a proceder a la extracción en el momento, se mantendría la parte inferior en nevera a 2 – 8 °C hasta el día siguiente.

#### 4.2.3. Segunda digestión (obtención de la fracción espermática)

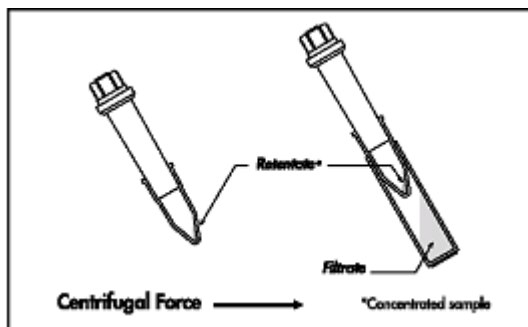
##### 4.2.3.1 Tratamiento con proteinasa K

- Se lava el sedimento obtenido en el vial inferior en el punto 4.2.2.2 de la primera digestión (fracción no espermática) 2 ó 3 veces con 1 ml de solución de lavado ([IN0071](#)).
- Se centrifuga 2 minutos a unas 14.000 rpm.
- Se desecha el sobrenadante después de cada lavado.
- A cada vial se añaden los siguientes componentes:  
400 ± 40 µl de acetato sódico 0,2 M  
20 ± 2 µl de proteinasa K  
20 ± 2 µl de DTT  
30 ± 3 µl de SDS al 10% (p/v)
- Se mezcla pipeteando o bien mediante vortex
- Vortear unos 10 segundos las muestras una vez añadida la solución de digestión y dar un spin
- Se introducen las muestras en el baño termostático de 12 a 16 horas a 37 ± 1,5 °C

##### 4.2.3.2 Extracción de ADN de la fracción espermática

- Se añaden 200 ± 20 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) al vial con la fracción espermática y se mezcla aproximadamente durante unos 10 segundos en el agitador hasta formar una emulsión.
- Se centrifuga 2 minutos a unas 14000 rpm
- Se recoge la fase acuosa superior (teniendo mucho cuidado de no coger material de la interfase o de la fase orgánica inferior), y se deposita en viales convenientemente identificados, cambiando siempre la punta de pipeta entre cada muestra. El volumen de fase acuosa recogido será aproximadamente de 500 µl.

##### 4.2.4. 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 [FM0110](#) Control de extracción diferencial de semen y otros restos biológicos, así como se archivarán todos los registros primarios generados..

#### 5.- Formatos:

--	--

Código	Denominación
<a href="#">FM0110</a>	Control de Extracción diferencial de semen y otros restos biológicos
FM0080	Control de preparación de muestras

**6.- Referencias:**

Referencias	Código	Denominación
<b>Instrucciones</b>	IN0047	Extracción y purificación del ADN mediante digestión proteolítica
	IN0071	Preparación de Reactivos

**7.- Anexos:**

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TT (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> 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)

Manual de uso del Amicon Ultra-4 30

**8.- Historial de modificaciones:**

Nº revisión	Descripción de la modificación	Fecha modif.
00	Edición inicial	22/12/2006
01	Añadir "Amicon ultra-4" en el proceso de extracción. Quitar apartado 4.2.3.	08/05/2007
02	Modificar título de la instrucción y modificación de 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 apartado 4.2.2.1 cambiar acetato sódico 0,2 M por NaCl-EDTA Introducción de la relación de instrucciones y cambio de ubicación de las referencias.	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	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

