

IN0053

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 31/01/2012

Rev.09

AMPLIFICACIÓN DE STRs (DYS389I-DYS389II-DYS390-DYS456-DYS19-DYS385-DYS458-DYS391-DYS392-DYS393-DYS439-DYS635-DYS437-DYS438-DYS448-GATA H4) DE ADN DEL CROMOSOMA Y - KIT YFILER-

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 **DYS389I - DYS389II - DYS390 - DYS456 - DYS19 - DYS385 - DYS458 - DYS391 - DYS392 - DYS393 - DYS439 - DYS635 - DYS437 - DYS438 - DYS448 - GATA H4** mediante la utilización del **AmpFISTR Yfiler™** 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, tras la extracción y cuantificación, se obtiene una cantidad de ADN superior a los 20 pg/μl, independientemente de la naturaleza de la muestra de partida y en aquellos casos en los que interesa constatar la identidad de individuos varones.

3.- Definiciones:

No aplicable

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

- AmpFISTR Yfiler™ PCR Amplification kit
 - AmpFISTR Yfiler PCR Reaction Mix: 1 tubo de 1,1 ml conteniendo MgCl₂, dNTPs y Albúmina sérica bovina en una solución tamponada con 0,05% de azida sódica.
 - AmpFISTR Yfiler Primer Set: Un tubo de 0,55 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/μl. Cada uno de los tubos contiene 50 μl
 - AmpFISTR Control DNA 9947A: Un tubo de 25 μl conteniendo ADN (a una concentración de 10 ng/μl) 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 negativo para los

marcadores incluidos en el kit Yfiler

- AmpFISTR Control DNA 007A: Un tubo de 0,3 ml conteniendo ADN (a una concentración de 0,10 ng/μl) de una línea celular humana masculina en una solución tamponada con 0,05 % de azida sódica. Su utilización es como muestra de referencia y control positivo para los marcadores incluidos en el kit Yfiler:

DYS456 15
 DYS389I 13
 DYS390 24
 DYS389II 29
 DYS458 17
 DYS19 15
 DYS385 a/b 11,14
 DYS393 13
 DYS391 11
 DYS439 12
 DYS635 24
 DYS392 13
 Y GATA H4 13
 DYS437 15
 DYS438 12
 DYS448 19

- Material de referencia SRM 2395: material de referencia para marcadores de cromosoma Y creado por el NIST (National Institute of Standards and Technology – Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) y que contiene 5 muestras (A-E) masculinas tipadas (y secuenciadas) para los loci del kit Yfiler, además de otros STRs y SNPs del cromosoma Y; así como una muestra femenina (F) usada como control negativo. Las muestras contienen 50 μl a una concentración de 2ng/μl y su tipaje es:

Locus	A	B	C	D	E	F
DYS456	15	15	15	15	15	-
DYS389I	13	13	14	12	14	-
DYS390	25	23	21	22	24	-
DYS389II	29	28	32	28	31	-
DYS458	16	15	17	16	16	-
DYS19	14	14	16	15	17	-
DYS385 a/b	12,15	14,17	17,20	14,15	13,15	-
DYS393	13	12	13	14	14	-
DYS391	11	11	12	10	10	-
DYS439	12	12	11	11	11	-
DYS635	23	21	23	21	21	-
DYS392	13	11	11	11	12	-
Y GATA H4	12	12	12	12	11	-
DYS437	15	14	14	16	14	-
DYS438	12	9	11	11	10	-
DYS448	19	21	21	21	20	-

- 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 1000, 200, 20 y 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 y su diversidad génica, así como sus tasas estimadas de mutación.

Los valores de diversidad génica (y de diversidad haplotípica) se han obtenido usando las fórmulas descritas en:

- Nei M, Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press, New York, NY, USA, 1987

y a partir de estudios poblacionales realizados en población vasca autóctona y publicados en:

- The Basques Y chromosome in the European landscape. European Journal of Human Genetics 13: 1293-1302 (2005).
- Distribution of Y-chromosomal haplotypes in the Basque Country autochthonous population using a 17-locus multiplex PCR assay. International Congress Series 1288: 319-321 (2006)

A partir de dichos valores se estima una diversidad haplotípica de 0,9903 y una capacidad de discriminación (entendida como la proporción de haplotipos diferentes en una muestra analizada) de 0,8214.

Los valores de tasa de mutación se han obtenido de STRBase (Short tandem repeat DNA internet database) disponible en la siguiente dirección:

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>

Locus	Localización Cromosómica	Diversidad génica	Tasa mutación
DYS456	Yp11.2	0,6155	0,53 %
DYS389I	Yq11.21	0,6170	0,24 %
DYS390	Yq11.221	0,4248	0,25 %
DYS389II	Yq11.21	0,6736	0,35 %
DYS458	Yp11.2	0,6545	1,06 %
DYS19	Yp11.2	0,3067	0,25 %

DYS385 a/b	Yq11.222	0,6169	0,21 %
DYS393	Yp11.2	0,2378	0,08 %
DYS391	Yq11.21	0,4572	0,28 %
DYS439	Yq11.21	0,5855	0,61 %
DYS635	Yq11.21	0,3268	0,46 %
DYS392	Yq11.222	0,2532	0,07 %
Y GATA H4	Yq11.221	0,5748	0,43 %
DYS437	Yq11.21	0,4946	0,13 %
DYS438	Yq11.21	0,2330	0,07 %
DYS448	Yq11.223	0,5571	0,11 %

Para la amplificación de los loci anteriormente descritos usando el kit Yfiler 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: 30 ciclos
 - Desnaturalización: 94 °C durante 1 minuto
 - Anillamiento: 61 °C durante 1 minuto
 - Extensión: 72° C durante 1 minuto
- Fase de extensión final: 60 °C durante 80 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 Yfiler:

▪ AmpFISTR PCR Reaction mix	10,5 µl	} x nº muestras (incluyendo controles positivos y negativos)
▪ AmpliTaq Gold DNA polymerase	0,5 µl	
▪ AmpFISTR Yfiler kit Primer Set	5,5 µl	

La cantidad obtenida es de 16,5 µl por el número de muestras a amplificar, de los cuales, tras realizar un vortex, 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 1 µl (10 ng) de AmpFISTR Control DNA 9947A diluido en 9 µl de agua destilada
- Se incluirá como **control de calidad** 0,5µl de muestra del material de referencia (A a E) SRM 2395 diluido en 9,5 µl de agua destilada (1 ng), al inicio de cada nuevo kit de Yfiler y 1µl 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 Yfiler. 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.

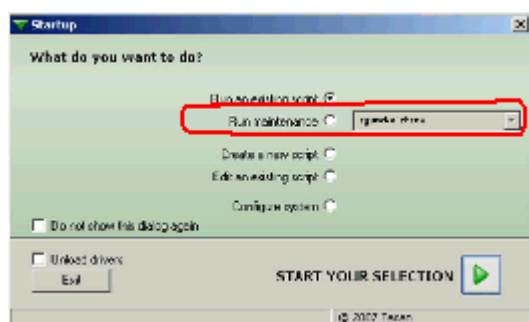
- Seleccionar **File / Export / Results**.
- En el menú **Save in**, buscar el lápiz de memoria.
- En el cuadro **File name**, guardar con el nombre AAAA-MM-DD_nº profesional.
- seleccionar **Results Export Files (*.csv)** en el menú **Save as type**.
- Seleccionar **Save**.

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

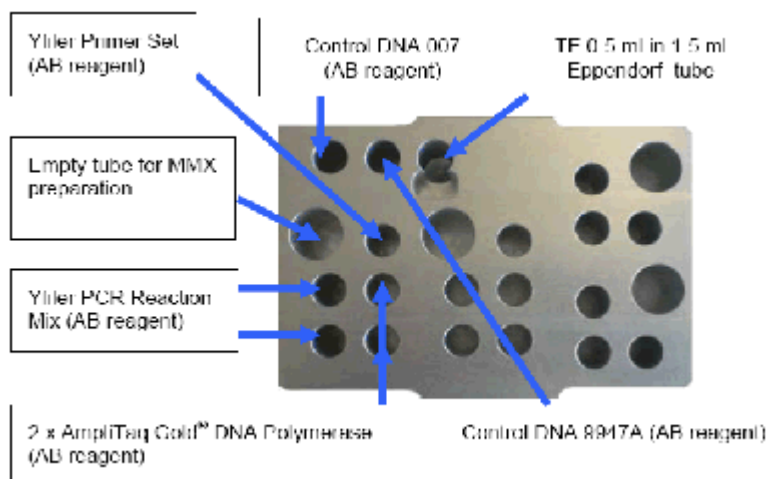
- Se deberá de realizar el **mantenimiento diario**, corriendo el script egunekoko lehena
- Encender el ordenador



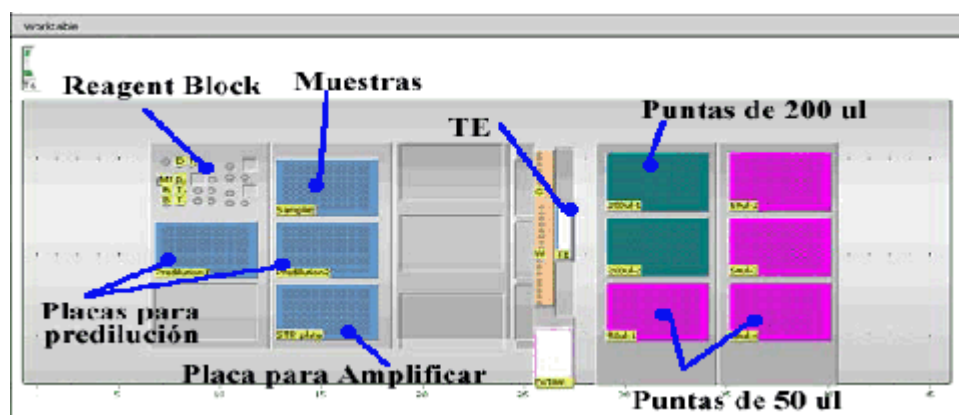
- Encender el robot
- Para arrancar el software EVOware Standard, nos pedirá un nombre de usuario y contraseña (usuario y 00000)
- Arrancar el software EVOware Standard, aparece una pantalla de Start up, clicar sobre **“Run maintenance - egunekoko lehena / Start your selection”**



- 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 Yfiler, vortexeándolos 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).

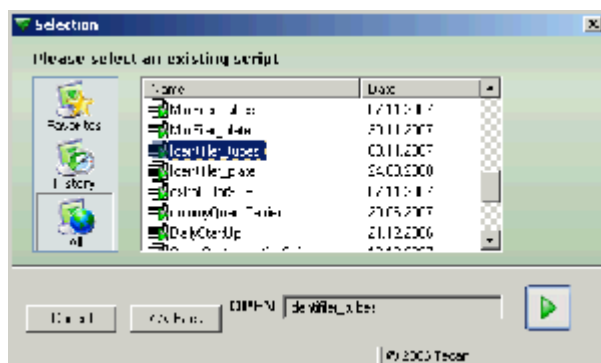


- Colocar las puntas de 200 μ l y 50 μ l según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar el depósito para TE con una cantidad variable de TE, que dependerá de la cuantificación que puede ir desde 20 hasta 100 μ l, según el esquema de la imagen adjunta.
- Colocar la placa con las muestras (si se extrajo 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, **Yfiler_tubes combo** o **Yfiler_plate combo** y presionar sobre la flecha verde (Run).

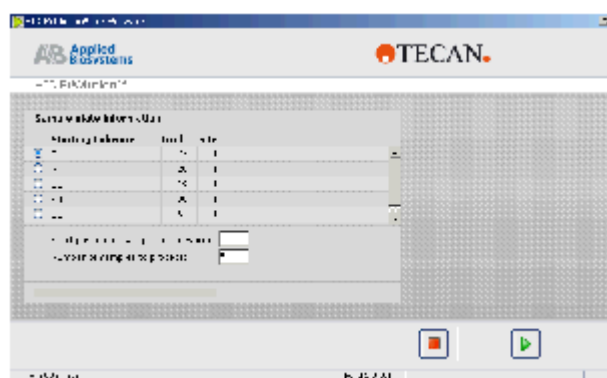


c. Clicaremos sobre **Execute, Run**

d. En la pantalla **Runtime controller** presionaremos sobre **Run**

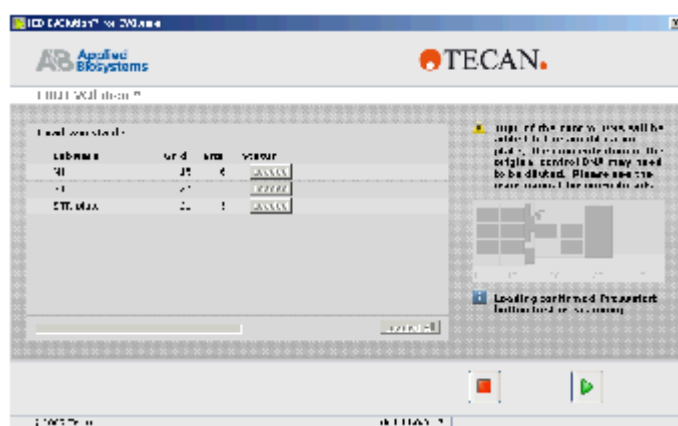
- Definir el número de muestras y el punto de inicio.

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 µl del control positivo, por lo que se deberá de normalizarlo a una concentración de 0.1µl.

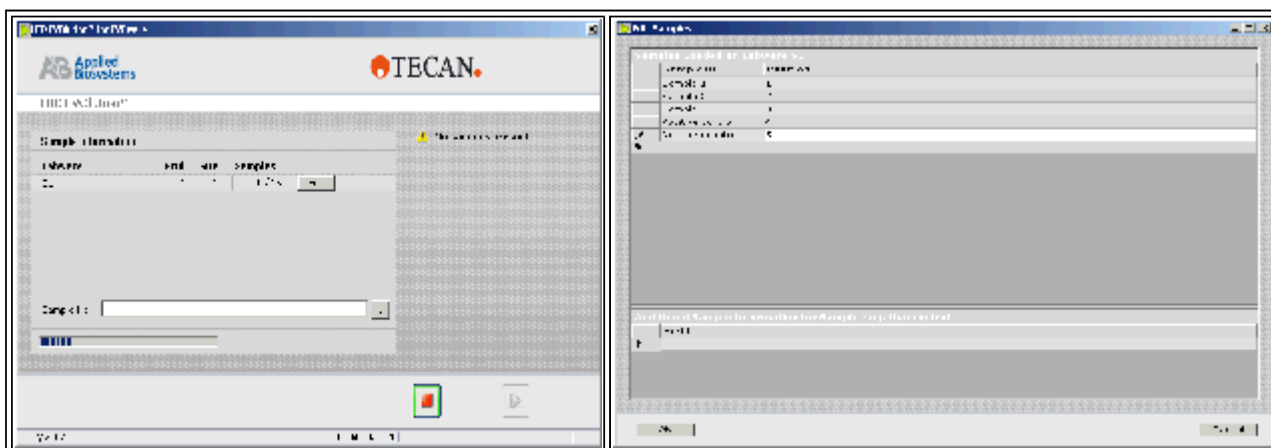


- El robot escanea los códigos de barra y como no los detecta, deberemos seleccionar **ignore** y clicar sobre **Run**.
- Definir la información de las muestras y su posición.
 - En la sección Sample Information, seleccionar **Edit**, para introducir las muestras

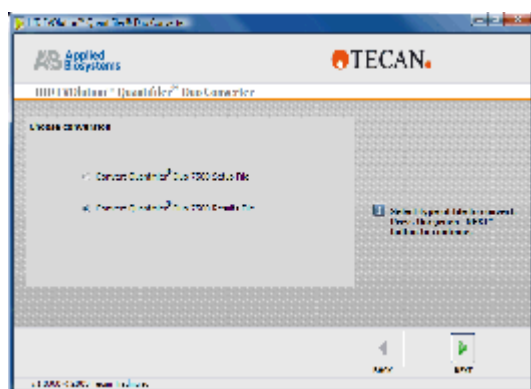
manualmente.

- 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.

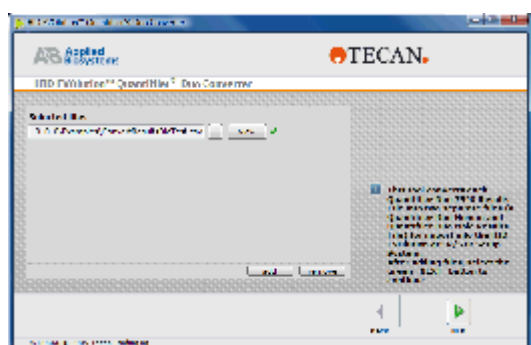
a. Clicar sobre **Run**.



- Importar los resultados de la cuantificación obtenidos en el ABI 7500.
 - a. Si se ha cuantificado con Quantifiler, 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**.



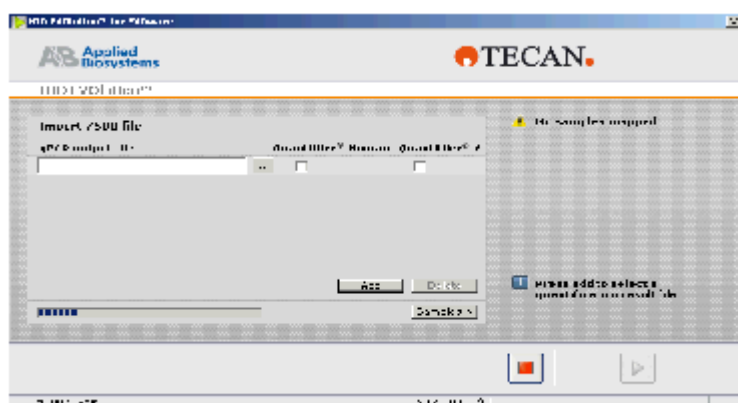
- Nos aparecerá una pantalla en la que deberemos de navegar hasta el archivo CSV.



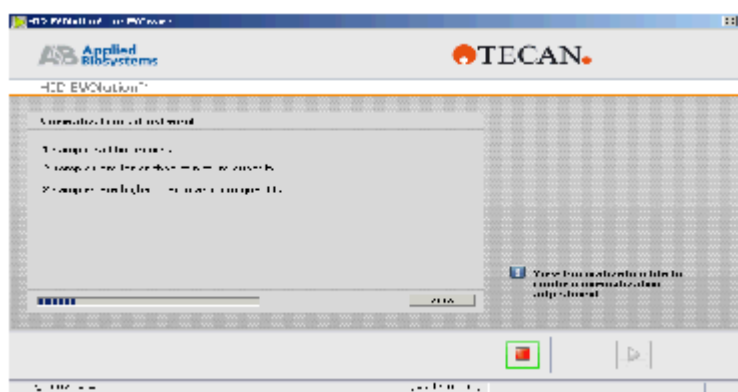
- Clicaremos sobre **next**, y con el buscador indicaremos la carpeta en la que vamos a guardar los archivos CSV creados para ADN total y de varón utilizables para la normalización.



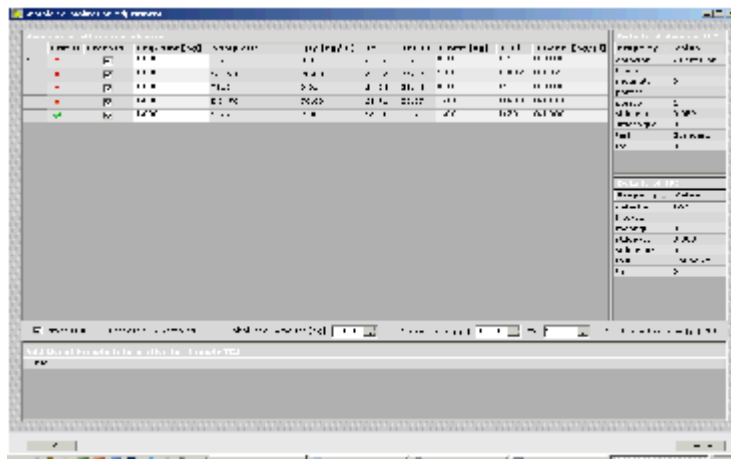
- Clicar sobre **Add**.
- Seleccionar **Quantifiler Human** o **Quantifiler Y**.
- Seleccionar el botón ...
- Navegar hasta el archivo con la cuantificación.(o el lápiz de memoria.)
- Clicar sobre **Open**.



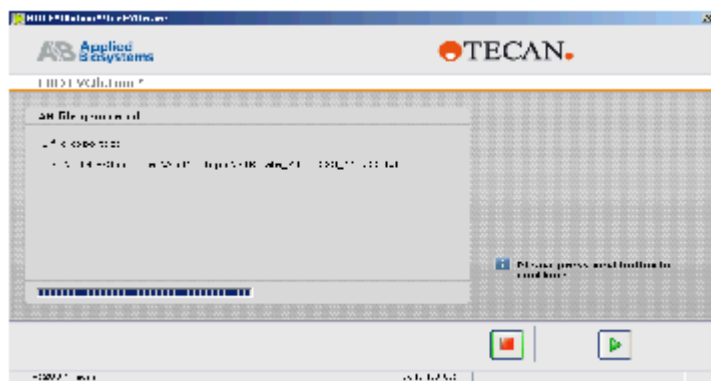
- Clicar sobre **Run**.
- Confirmar la normalización.
 - En la siguiente pantalla se observa un resumen del número de muestras a procesar, el número de muestras que están por debajo del umbral de amplificación definido por el usuario, y el número de muestras que están por encima de la cantidad máxima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



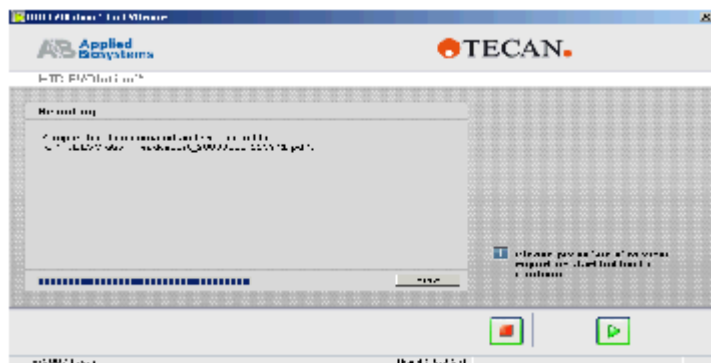
- Clicar sobre **View**, para ver la ventana de ajuste de la normalización de las muestras. Sample normalization adjustment.



- 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 1ng/µl deberemos ir a **Global req. Amount**.
 - e. Se puede cambiar el umbral mínimo, en ng, a 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_aaaammdd_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 el kit Yfiler.

Los procesos se anotarán en el formato [FM0089](#) de Control de Amplificación Yfiler

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 2395 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
FM0089	Control de Amplificación Yfiler

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 de composición de la solución resultante de la mezcla de los diferentes reactivos que componen el kit de amplificación	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 el apartado 4.1.3. Equipamiento sustituir 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 automática con el robot Tecam Evo 150. 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
09	A propuesta del Jefe de la Sección de Genética Forense: En el apartado 4.2.2.2, cambiar Identifiler por Yfiler.	20/01/2012

Elaborado: Jefe de la Sección de Genética Forense
Revisado: Jefe/a de la Ertzaintza
Aprobado: Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

Fecha: 20/01/2012
Fecha: 26/01/2012
Fecha: 31/01/2012

