
CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN MEDIANTE EL KIT QUANTIFILER

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 manual de las muestras para la cuantificación.
 - 4.2.1.1 Creación de la plantilla de cuantificación utilizando la aplicación SDS v.1.3.1 ó SDS v.1.2.3 del programa 7500 System Software
 - 4.2.1.1.1 Abrir un nuevo documento para crear una plantilla de cuantificación
 - 4.2.1.1.2 Rellenar la plantilla de cuantificación
 - 4.2.1.1.2.1 Introducción de datos de forma manual
 - 4.2.1.1.2.2 Introducción de datos utilizando una hoja excel
 - 4.2.1.1.3 Guardar los datos de la plantilla
 - 4.2.1.2 Preparación de las muestras a cuantificar
 - 4.2.1.2.1. Pasos previos a la preparación de las muestras
 - 4.2.1.2.2. Preparación de las diluciones seriadas del Standard
 - 4.2.1.2.3. Preparación de las reacciones
 - 4.2.2 Preparación robotizada de las muestras para la cuantificación.
 - 4.2.2.1 Cuantificación en placa con el kit Quantifiler usando el robot TECAN Freedom EVO 150
 - 4.2.2.1.1 Disposición del robot para Quantifiler para cuantificación de placa a placa
 - 4.2.2.1.2 Revisión inicial del robot
 - 4.2.2.1.3 Puesta en marcha del proceso de preparación automatizada
 - 4.2.2.2 Cuantificación en tubo con el kit Quantifiler usando el robot TECAN Freedom EVO 150
 - 4.2.2.2.1 Disposición del robot para Quantifiler para cuantificación de tubo a placa
 - 4.2.2.2.2 Revisión inicial del robot
 - 4.2.2.2.3 Puesta en marcha del proceso de preparación automatizada
 - 4.2.2.3 Archivo de los resultados para la cuantificación en el robot.
 - 4.2.2.4 Configurar el software SDS e importar el archivo SDS y correr la placa en el ABI 7500
 - 4.2.3 Puesta en marcha de la cuantificación.
 - 4.2.4 Lectura de resultados del programa de cuantificación
 - 4.2.5 Comprobación de la calidad de la cuantificación
 - 4.2.6. Criterios de aceptación y rechazo
 - 4.2.7. Guardar los datos obtenidos en la cuantificación
 - 4.2.8. Guardar los datos obtenidos en la cuantificación
 5. FORMATOS
 6. REFERENCIAS
 7. ANEXOS
 8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

1.- Objeto:

Se define la sistemática seguida para la realización de la cuantificación de los extractos de ADN mediante amplificación en una reacción de PCR utilizando el kit Quantifiler (Applied Biosystems, Foster City, California. Estados Unidos).

2.- Alcance:

El presente procedimiento afecta a todos los ensayos que realiza la Sección de Genética Forense de la UPC, realizados sobre los extractos de ADN de 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 aquellos casos relacionados con delitos contra la libertad sexual y dado que en los mismos pudieran encontrarse mezclas de perfiles genéticos masculinos y femeninos, se utilizará el kit Quantifiler Duo (IN0106)

3.- Definiciones:

No aplicable

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

- Quantifiler Human DNA Quantification kit
- Quantifiler Human Primer Mix: 3 tubos de 1,4 ml cada uno de ellos, conteniendo los cebadores para amplificar ADN humano, las sondas para detectar dicho ADN y un control interno de PCR (IPC) que es una secuencia sintética que no se encuentra en la naturaleza. Las dianas específicas a las que dirigen las sondas de estos kits son: 62 pares de bases de un intrón del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT, 5p15.33) para el Quantifiler Human DNA Quantification kit
- Quantifiler Human DNA Standard: 1 tubo de 120 µl conteniendo ADN purificado de una concentración de 200 ng/µl
- Quantifiler PCR Reaction Mix: 1 tubo de 5 ml conteniendo AmpliTaq Gold Polymerase, dNTPs con dUTP en un tampón optimizado
- Human DNA Quantitation Standard (SRM 2372). National Institute of Standards & Technology. Gaithersburg. United States of America.

Consistente en tres componentes de aproximadamente 110 µl cada uno consistentes en:

52,4 ng/µl de ADN de varón único donante (tapón rojo)

53,6 ng/µl de ADN de varias mujeres donantes (tapón verde)

54,3 ng/µl de ADN mezcla de varios varones y mujeres donantes (tapón azul)

- Tampón TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) (IN0071)

4.1.2. Material Fungible

- Viales eppendorf de 1,5 ml
- Viales eppendorf de 0,5 ml
- Puntas de pipeta con filtro estériles (200, 20 y 10 µl)
- Bandeja de PCR de 96 muestras
- Adaptador para bandeja de PCR
- Cubierta adhesiva de bandeja de PCR de 96 muestras
- Gradillas
- Guantes estériles desechables
- Rotulador permanente

4.1.3. Equipamiento

- Cabina de seguridad biológica (GF011 y GF012)
- RT-PCR (GF035 o GF078)
- Pipetas de 50-200, 2-20 y 1-10 µl
- Agitador (GF043)
- Centrífuga para placas (GF083)
- Robot Tecan Evo (GF082)

4.2. PROCEDIMIENTO

El proceso de cuantificación no es en sí mismo un proceso crítico, pero si importante debido a que va a dar una información necesaria para poder optimizar la posterior fase de amplificación.

El ensayo Taqman utiliza la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa para hidrolizar una sonda hibridada a su secuencia diana. La correcta unión de dos moléculas cebadoras ("forward" y "reverse"), que definen los puntos extremos del amplicón, a sus secuencias diana específicas proveen el primer nivel de especificidad; con lo cual se minimizan posibles problemas asociados a una hipotética contaminación de ADN no humano, seleccionando los cebadores de forma adecuada. Un segundo nivel de especificidad de este ensayo se logra por la utilización de una sonda oligonucleotídica que hibrida con un amplicón en la fase de alineamiento y extensión de la PCR. Esta sonda contiene un fluorocromo informador en su extremo 5', cuyo espectro de emisión es enmascarado por un segundo fluorocromo que se encuentra en el extremo 3'. Si no se produce la amplificación del amplicón complementario a la sonda durante la PCR, la sonda permanecerá sin unirse, libre. Como la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa es específica de doble cadena, la sonda libre quedará intacta y no se detectará fluorescencia producida por el fluorocromo donante. En cambio si el amplicón se amplifica correctamente, la sonda se unirá a esta secuencia amplificada tras la fase de la desnaturalización y permanecerá unida mientras la polimerasa extiende la cadena neonata de ADN desde los cebadores hasta que llegue a la sonda de hidrólisis, donde desplazará a su extremo 5', dando una forma de horquilla al extremo de la sonda. La polimerasa continuará su movimiento rompiendo el nucleótido situado en el extremo 5' de la sonda, con lo cual se separará el fluorocromo donante del enmascarador, lo que producirá una detección de fluorescencia emitida por el donante.

Debido a que la polimerasa sólo puede romper la sonda mientras ésta permanezca hibridada a su secuencia complementaria, las condiciones de temperatura de la fase de polimerización de la PCR deben de ajustarse para asegurar la unión de la sonda.

El concepto de ciclo umbral (Ct) es importante para la exactitud y reproducibilidad de la cuantificación en las RT-PCR basadas en fluorescencia. Los valores de fluorescencia se recogen durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto de la reacción de amplificación. Cuanto más templado haya presente al comienzo de la reacción, será necesario un menor número de ciclos para llegar al punto en el cual la señal de fluorescencia que se recoge sobrepase de un modo estadísticamente significativo el nivel del ruido de fondo.

Este punto es definido como Ct, y ocurre durante la fase exponencial de la amplificación. En la fase "plateau" la reacción no está afectada por ninguno de los componentes de la reacción que pudieran llegar a ser limitantes, lo que resulta un sesgo contra los templados más abundantes y hace que la cuantificación basada en la medición del producto total final sea inviable. Este valor puede posteriormente trasladarse a un resultado cuantitativo de la cantidad de ADN inicial construyendo una curva estándar.

La cuantificación absoluta permite la determinación precisa del número de copias del ácido nucleico por célula o la concentración total y requiere la construcción de una curva estándar absoluta para cada amplicón. Un estándar consiste en una muestra con una cantidad conocida de ADN, un calibrador o ladder, que se utiliza para crear una serie de diluciones de unidades arbitrarias. El calibrador puede ser un ácido nucleico (ADN) con una concentración y longitud de amplicón conocidas. Durante la RT-PCR, el Ct de la muestra de prueba es comparado directamente con el Ct de la serie de diluciones del calibrador para saber si contiene más o menos ADN que éstos.

El valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias inicial del ADN ($Ct = 1 / \log [i]$).

La curva estándar es generada representando los valores de Ct en intervalos de confianza del 95% en el eje X, frente al logaritmo del número inicial de copias del ADN que se representa en el eje Y, con lo que obtendremos una recta. El número de copias de ADN de la muestra problema, se calcula al final de la PCR realizando una regresión lineal en la curva estándar.

En esta curva estándar podremos observar la eficiencia de la amplificación representada por la pendiente de la curva, siendo más eficiente cuanto menor sea la pendiente, y la sensibilidad de la amplificación representada por el valor sobre el eje Y, siendo más sensible cuanto menor sea este valor de Y.

Se debe de encender la RT-PCR (GF035 o GF078) aproximadamente 30 minutos antes de comenzar el proceso de la cuantificación, para que la lámpara esté a una temperatura adecuada.

Los pasos a seguir para poner en marcha el termociclador son:

- Encender el ordenador
- Encender el termociclador
- Abrir el programa SDS v.1.3.1 ó SDS v.1.2.3

Una vez finalizada la cuantificación y para evitar desgastar la lámpara halógena se debe de apagar el termociclador, y se puede seguir trabajando con las aplicaciones informáticas.

4.2.1 Preparación manual de las muestras para la cuantificación.

4.2.1.1 Creación de la plantilla de cuantificación utilizando la aplicación SDS v.1.3.1 ó SDS v.1.2.3 del programa 7500 System Software.

4.2.1.1.1 Abrir un nuevo documento para crear una plantilla de cuantificación.

Se debe de pinchar sobre el programa 7500 System Software, donde se deberá de seleccionar la opción “File / New document” y se abrirá una ventana donde se debe de comprobar la aparición de lo siguiente en las pestañas:

- “Assay” opción “*Absolute Quantification (Standard Curve)*”
- “Container” opción “*96-well clear*”
- “Template” opción “*Quantifiler*”

Se pinchará sobre la pestaña “*Finish*” para finalizar el proceso de creación de la plantilla de cuantificación.

The screenshot shows the 'New Document Wizard' window with the 'Define Document' tab selected. The instructions at the top read: 'Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.' The fields are populated as follows: Assay: Absolute Quantification (Standard Curve); Container: 96-Well Clear; Template: Blank Document; Run Mode: Blank Document, AQ RNase P Install, quantifiler enero 06 (selected); Operator: 7500; Comments: SDS v1.3.1; Plate Name: Plate3. At the bottom, there are four buttons: '< Back', 'Next >', 'Finish', and 'Cancel'. The 'Next >' button is highlighted with a black border.

4.2.1.1.2 Rellenar la plantilla de cuantificación

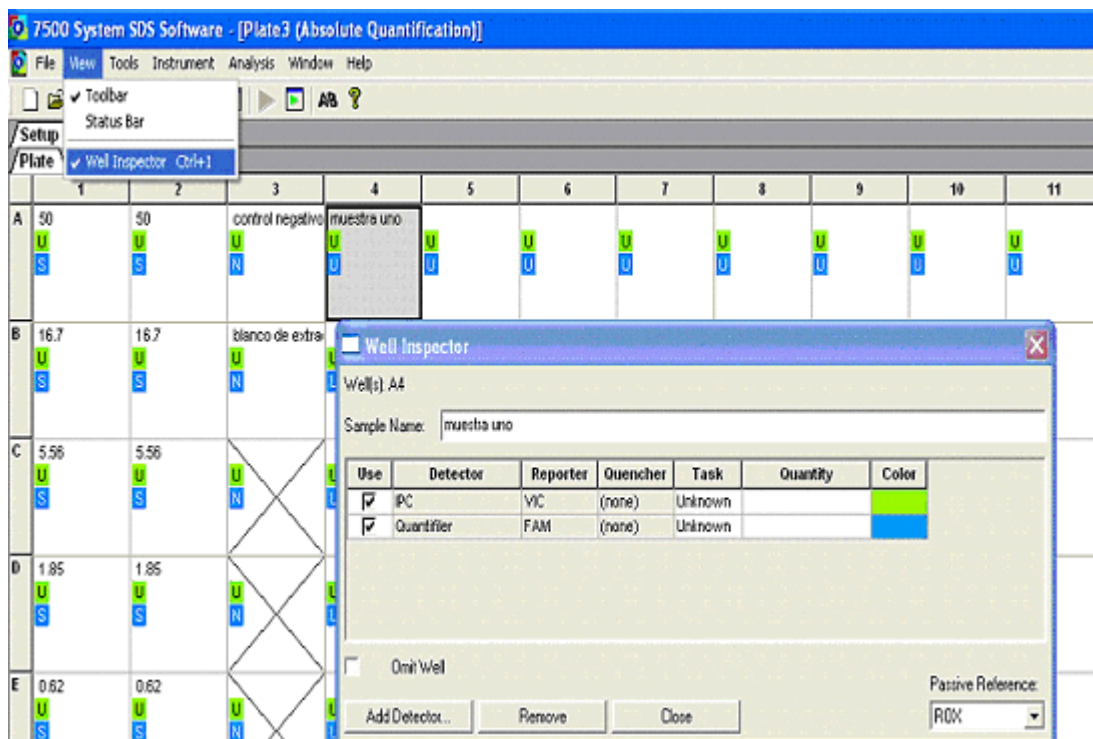
Tras el proceso anterior se obtiene una pantalla que se debe de completar con las muestras a cuantificar, control negativo y muestras de ladder (por defecto la plantilla se abre en la subpestaña “Plate” de la pestaña “Setup”). Las muestras se pueden introducir en la plantilla de forma manual o utilizando una plantilla de texto.

4.2.1.1.2.1 Introducción de datos de forma manual

Por defecto las dos primeras columnas representan las muestras de las series del estándar diluido, en la tercera columna deberán de incluirse el control negativo, el control positivo de la cuantificación y el/ los blanco/s de extracción. A partir de la cuarta columna se deberá de rellenar cada una de las celdas (cada

celda representa a uno de los pocillos de la bandeja de PCR) necesarias para cuantificar todas las muestras problema introduciendo el número o nombre de cada muestra problema a cuantificar.

Para introducir datos en cada una de las celdas o modificar alguno de los controles que aparecen se deberá de abrir el “Well inspector”, bien pinchando sobre “View / Well inspector” o bien pinchando sobre la celda de interes. También se pueden marcar más de una celda a la vez pinchando “Control” o bien pinchando sobre las filas o columnas.



Una vez en la celda se abre una pantalla en la cual se deben de introducir los siguientes datos:

- “Sample name”: incluir el número o nombre de la muestra
- “Task”
 - Para IPC (control interno de la reacción de PCR) en todos los recuadros debe estar elegida la opción “Unknown”
 - Para los estándares se marcará la opción “Standard” (esto obliga a en la opción “Quantity” poner la cantidad del estándar en nanogramos).
 - Para el blanco y control negativo se marcará “NTC”
 - Para las muestras a cuantificar se marcará “Unknown”

Otras opciones:

- “Quantity” sólo para los estándares.
- “Omit well” se marca si el pocillo no se va a amplificar. Al marcar esta opción el programa omite ese pocillo.

4.2.1.1.2.2 Introducción de datos utilizando una hoja Excel

También se pueden añadir los datos de las muestras importando los datos creados en una lista de cuantificación creada en un formato de texto.

Se debe de acceder a la carpeta que se encuentra en el escritorio “Listados de cuantificación” y pinchar/clicar en la tabla Excel “Maqueta para importar lista quantifier”.

Se trata de una plantilla en la que en la Hoja 2 se debe de rellenar en la columna A, el nombre/número de la evidencia con el formato Año-nº de I.P-nº Evidencia (p.ej. 07-0421-1.34), en la columna C se deberá de introducir la fecha de la cuantificación con el formato Año-mes-día.sds (p.ej. 2007-ENERO-02.sds), y en la columna D se introducirán el control positivo y los blancos de extracción si hubiese más de uno, ya que la propia plantilla crea de forma automatizada un blanco de extracción y un control negativo. Se debe de ir a la Hoja 1 de la tabla excel, donde aparecerán los datos que se han introducido en la Hoja 2 más 16 estándares, un control negativo y un blanco de extracción. Desde esta hoja se deberá de guardar el documento en la carpeta Listas de inyección (*Escritorio / Listas de inyección*) utilizando la opción *Archivo / Guardar como Texto (delimitado por tabulaciones)* con el formato Año-mes-día (p.ej. 2007-09-07.txt) y se cerrará el programa Excel.

Desde el programa SDS v.1.3.1 ó SDS v.1.2.3 se importará la plantilla creada utilizando la opción *File / Import Sample Set up / Desktop / Listas de inyección* donde se seleccionará la creada con la fecha adecuada.

En la pantalla que aparece seleccionaremos todas las celdas que correspondan a pocillos que contengan muestras, y pincharemos sobre *View / Well Inspector* y en la pantalla de opciones que nos aparece pincharemos sobre la opción IPC para añadir éste a las celdas seleccionadas.

4.2.1.1.3 Guardar los datos de la plantilla

Una vez introducidos los datos de forma manual o automatizada, se guardará la plantilla en la carpeta correspondiente al año en curso, con la opción *File / Save as / Disco D / Applied Biosystems / Sds documents / 2008* con el formato Año-mes-día (p.ej. 2008-09-07.sds). Imprimir la plantilla para utilizar de guía en pasos posteriores.

4.2.1.2 Preparación de las muestras a cuantificar

4.2.1.2.1 Pasos previos a la preparación de las muestras

Antes de proceder a realizar cualquier operación se deberán de tomar las medidas de protección adecuadas, utilizando guantes libres de polvo y trabajando dentro de una campana de seguridad biológica.

4.2.1.2.2 Preparación de las diluciones seriadas del Standard Quantifiler

El primer paso consiste en la realización de una escalera de concentraciones (en adelante ladder), dilución seriada con diferentes concentraciones de ADN partiendo del DNA Standard incluido en el Kit Quantifiler (partiendo de una concentración inicial de 200 ng) para obtener una serie de diluciones desde los 50 ng hasta los 23 pg. Para ello se deberán seguir las diluciones propuestas en las columnas Ej. 1 y Ej. 2 de la Tabla 1.

Se prepararan 8 viales de 0,5 ml referenciándolos desde Std1 hasta Std8, y se introducirán durante 20 minutos a la luz ultravioleta en la campana de flujo laminar GF010.

Se deberá sacar del congelador GF029 el DNA Standard y dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos para que se atempere.

Se deberá sacar del congelador GF028 el tampón TE y dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos para que se atempere.

Una vez transcurridos los 20 minutos se procederá a realizar la ladder en la campana GF010 y para ello se deberán seguir las diluciones propuestas en las columnas Ej. 1 y Ej. 2 de la Tabla 1, realizando un vortex en cada paso para la homogeneización de las diluciones.

Se realizará una ladder para cada cuantificación o bien se podrán almacenar los estándares congelados por un periodo máximo de 3 meses, en este caso deberá de realizarse un vortex de cada uno de los 8 estándares antes de cada uso.

Tabla 1

Standard	Concentr. (ng/ μ l)	Ej. 1	Ej. 2	Dilución
Std.1	50.000	50 μ l (200ng/ μ l DNA Standard) + 150 μ l tampón TE	10 μ l (200ng/ μ l DNA Standard) + 30 μ l tampón TE	1/4
Std.2	16.700	50 μ l (Std 1) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 1) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.3	5.560	50 μ l (Std 2) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 2) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.4	1.850	50 μ l (Std 3) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 3) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.5	0.620	50 μ l (Std 4) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 4) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.6	0.210	50 μ l (Std 5) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 5) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.7	0.068	50 μ l (Std 6) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 6) + 20 μ l tampón TE	1/3
Std.8	0.023	50 μ l (Std 7) + 100 μ l tampón TE	10 μ l (Std 7) + 20 μ l tampón TE	1/3

4.2.1.2.3 Preparación de las reacciones

Sacar del congelador GF0028 el “*Quantifiler Human Primer Mix*”, dejarlo atemperar durante 20 minutos.

Es importante que se encuentre dentro de su caja para evitar un contacto directo con la luz.

Sacar de la nevera GF0081 el “*Quantifiler PCR Reaction Mix*”, para dejarlo atemperar durante 20 minutos, se deberá guardar alicuotado en viales de 1,5 ml.

Se procederá a calcular el volumen de la Master Mix, para ello se utilizará la siguiente fórmula:

Componente	Volumen por reacción (μ l)	
Quantifiler Human Primer Mix	10.5	x N
Quantifiler PCR Reaction Mix	12.5	

Donde N es igual al número de celdas ocupadas en la plantilla de cuantificación realizada en el punto 4.2.1.1.2, más dos (control positivo y control negativo).

En la campana GF012 del laboratorio de amplificación, se colocará la bandeja de 96 muestras dentro de su adaptador para evitar que se contaminen con motas de polvo los laterales de los pocillos.

Se colocaran los viales con las muestras en el soporte para muestras siguiendo el orden marcado en la plantilla de cuantificación que previamente se ha impreso en el punto 4.2.1.1.3.

Se deben de añadir 23 μ l del master mix a cada pocillo de los ocupados en la plantilla.

Se debe de añadir 2 μ l de cada uno de las muestras, ladder y controles, siguiendo el orden marcado por la plantilla que previamente se ha impreso, para conseguir un volumen total de 25 μ l para cada pocillo.

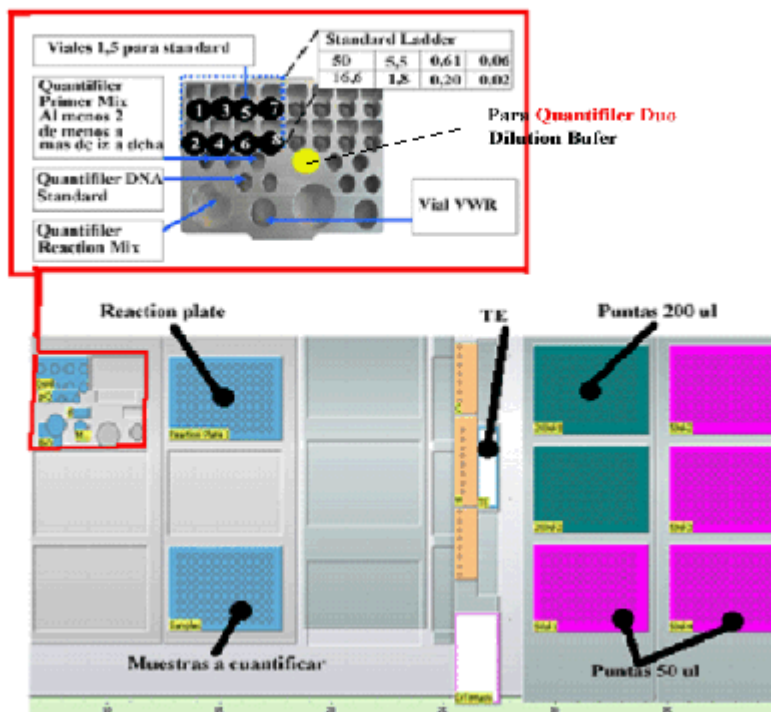
En cada proceso de cuantificación se incluirá una muestra del Human DNA Quantitation Standard (SRM 2372) diluida a una concentración de 5 ± 1 ng/ μ l de ADN.

Para finalizar se cubre la bandeja con una cubierta adhesiva de bandeja e introduce la bandeja en la RT-PCR (GF035).

4.2.2 Preparación robotizada de las muestras para la cuantificación.

4.2.2.1 Cuantificación en placa con el kit Quantifiler usando el robot TECAN Freedom EVO 150

4.2.2.1.1 Disposición del robot para Quantifiler™ para cuantificación de placa a placa



- Preparar puntas de 200 y 50 μ l, y ponerlos en las posiciones 29 y 35 de la zona de trabajo, según se ve en el esquema superior.
- Colocamos la placa con las muestras a cuantificar en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos el Reaction Plate (una placa vacía para realizar la cuantificación) en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos el depósito para TE con 20 ml en la zona de trabajo del robot según el esquema (NO PARA QUANTIFILER DUO).
- Colocamos 8 viales de 1,5 ml para crear la ladder en la base de aluminio (que se guarda en nevera) según el esquema.
- Colocamos al menos dos de los tubos de Quantifiler Primer Mix (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio (poniendo si no son nuevos el tubo que menos tenga a la izquierda, y así sucesivamente) según el esquema.
- Colocamos el tubo de Quantifiler DNA Standard (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio según el esquema.
- Colocamos el tubo de Quantifiler Reaction Mix (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio según el esquema.
- Colocamos el vial VWR (para la Master Mix) en la base de aluminio según el esquema.

4.2.2.1.2 Revisión inicial del robot



- Encender el ordenador
- Encender el robot

-
- Startup
- What do you want to do?
- Run an existing script **G**
- Run maintenance ☐ **apex.bat**
- Create a new script ☐
- Edit an existing script ☐
- Configure system ☐
- ☐ Do not show this dialog again
- ☐ Unload drivers
Exit
- START YOUR SELECTION
- 20:07 Tuesday

- #### 4.2.2.1.3 Puesta en marcha del proceso de preparación automatizada.

Startup

What do you want to do?

Run an existing script ☒

Run maintenance ☐ [dropdown menu]

Create a new script ☐

Edit an existing script ☐

Configure system ☐

☐ Do not show this dialog again

☐ Unload drivers

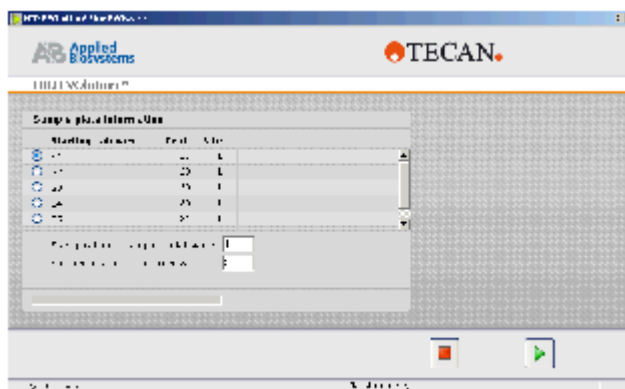
Exit

START YOUR SELECTION [play button icon]

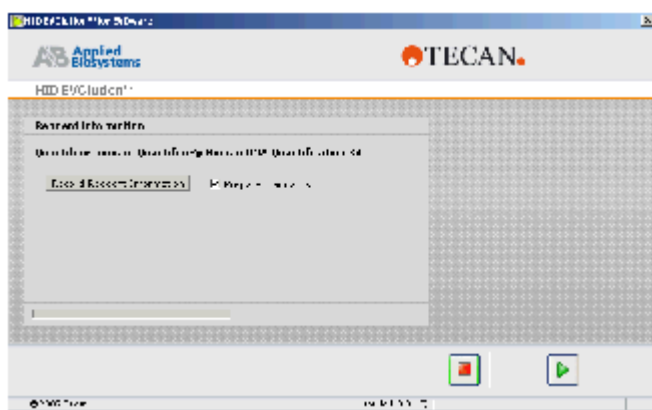
© 2007 Tecan

- [illegible]

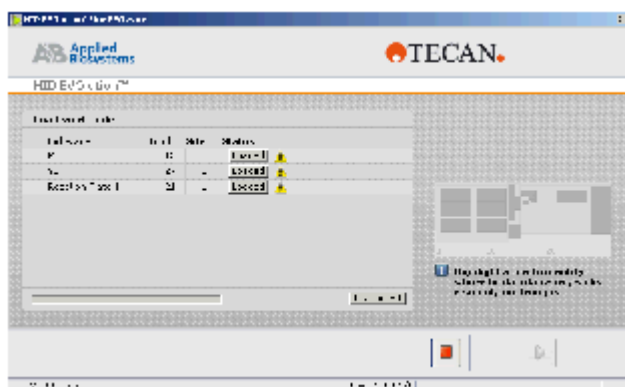
- <http://datos.intranet.utap/web/GC000000.nsf/ccv80/E5554FACDD00D13AC1257925...> 15/03/2012



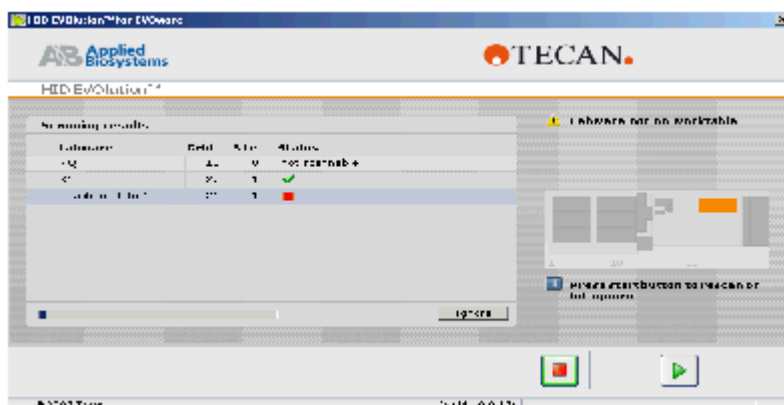
- Clicar sobre **Prepare Standards** si deseamos que cree los tubos de la ladder, los estándares se podrán mantener durante tres meses congelados, y podrán ser reutilizados, en este caso deberemos de **deseleccionar** la opción **Prepare Standards**.
- Introducir los números de lotes de los reactivos, clicando sobre **Record Reagent Information** y al final clicar sobre **OK**.



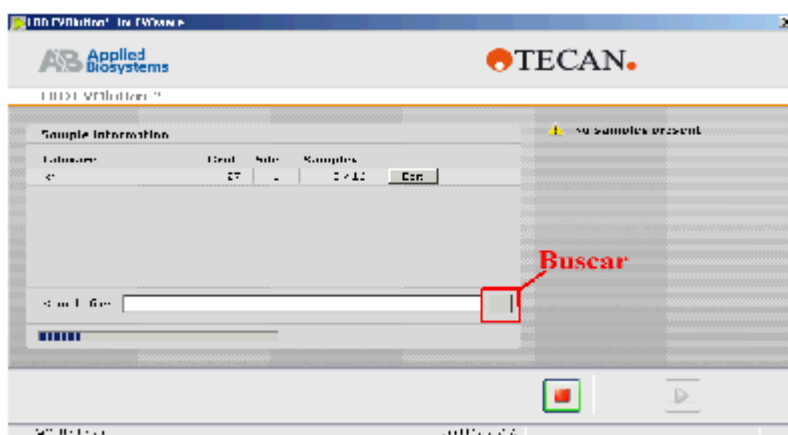
- Clicar sobre **Run**
- Comprobar que tanto el **Quantifiler Reagent Block (MQ)**, la **bandeja con las muestras** y la **bandeja vacía** están en su posición, clicando a cada uno de **los loaded** o bien todos con **loaded all**.



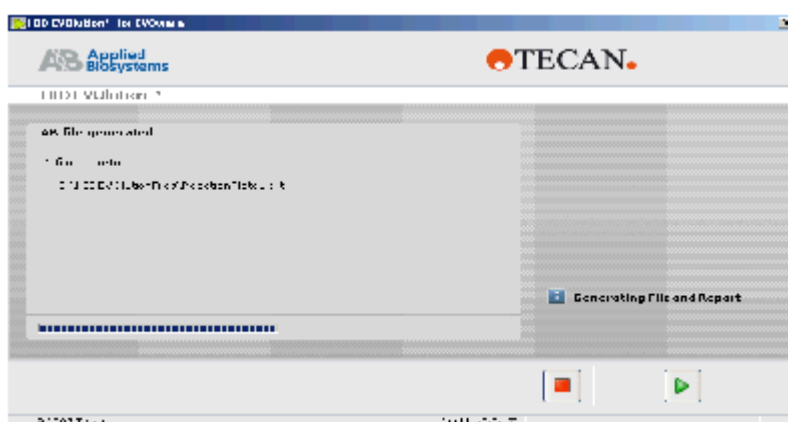
- Clicar sobre **Run**.
- El brazo robótico escanea los códigos de barra, y si no los detecta deberemos seleccionar **Ignore** y clicar sobre **Run**.



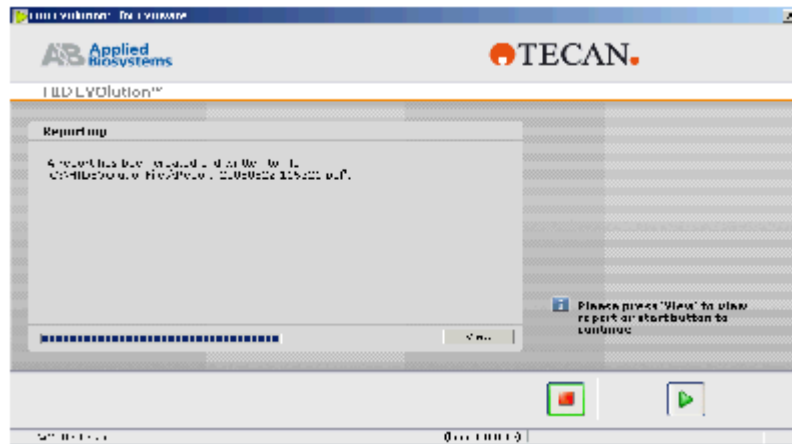
- Clicar sobre **Edit** y sale una pantalla de **edit samples**.
- Introducir las muestras que deben ser contiguas, manualmente clicando en **edit**, o bien en un archivo csv desde la opción **buscar** (**C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\date_time**), clicar en **edit**, comprobar que estan correctas y clicar sobre **OK**.



- Clicar sobre **Run**
- Aparece una pantalla donde debemos de ir indicando si está correctamente colocado lo que nos pide (puntas de pipeta). Clicar sobre **OK**.
- Una vez finalizado se generará un archivo SDS para exportarlo en el ABI 7500 para realizar la cuantificación, clicaremos sobre **Run**.



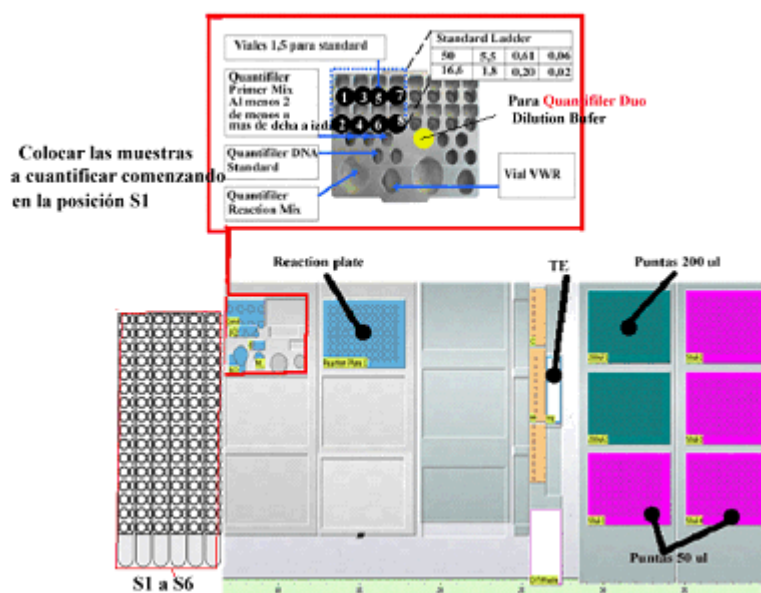
- Seleccionaremos la función **View** para ver el informe generado, este informe puede ser guardado como varios formatos (.pdf, xls, doc y rtf) desde view, pero se crea una copia automáticamente como pdf, en **C:\HIDEVolutionFiles_qPCRSTRFiles**.



- Clicar sobre **Run** para completar el Script.

4.2.2.2 Cuantificación en tubo con Quantifiler™ usando el robot TECAN Freedom EVO 150

4.2.2.2.1 Disposición del robot para Quantifiler™ o Quantifiler Duo™ para cuantificación de tubo a placa



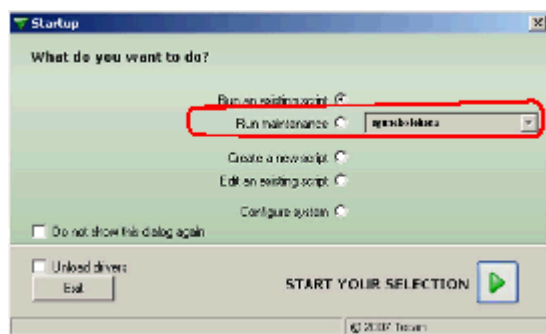
- Preparar puntas de 200 y 50 μ l, y ponerlos en las posiciones 29 y 35 de la zona de trabajo, según se ve en el esquema superior.
- Colocamos los tubos de 1,5 ml en el robot, empezando en la posición S1, con cuidado de poner los tapones correctamente.
- Colocamos el Reaction Plate (una placa vacía para realizar la cuantificación) en la zona de trabajo del robot según el esquema.
- Colocamos el depósito para TE con 20 ml en la zona de trabajo del robot según el esquema (NO PARA QUANTIFILER DUO).
- Colocamos 8 viales de 1,5 ml para crear la ladder en la base de aluminio (que se guarda en nevera) según el esquema.
- Colocamos al menos dos de los tubos de Quantifiler Primer Mix (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio (poniendo si no son nuevos el tubo que menos tenga a la izquierda y así sucesivamente) según el esquema.
- Colocamos el tubo de Quantifiler DNA Standard (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio según el esquema.

- Colocamos el tubo de Quantifiler Reaction Mix (previamente dejar que se atempere y agitar) en la base de aluminio según el esquema.
- Colocamos el vial VWR (para la Master Mix) en la base de aluminio según el esquema.

4.2.2.2.2 Revisión inicial del robot



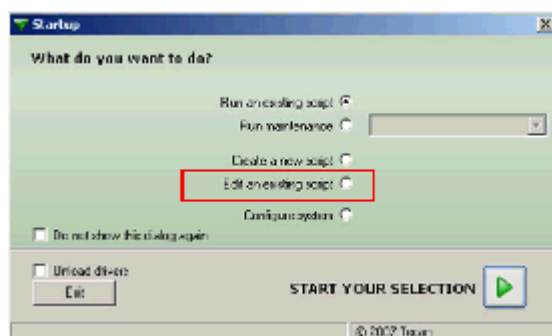
- Encender el ordenador
- Encender el Robot
- Para arrancar el software EVOware Standard, nos pedirá un nombre de usuario y contraseña (usuario y 00000)
- Arrancar el software EVOware Standard, aparece una pantalla de Start up, clicar sobre **“Run maintenance - eguneko lehena / Start your selection”**



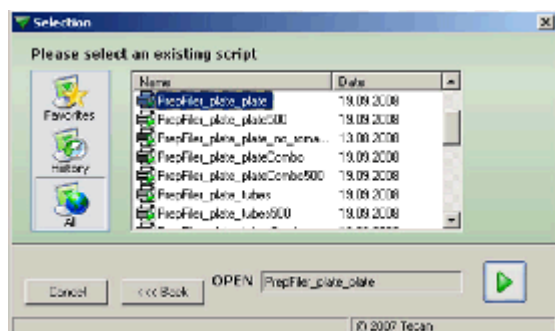
- En la pantalla **“Runtime controller”** clicar sobre **“Run / Initializing”**. Tras este proceso el brazo robótico comienza a moverse para testar la zona de trabajo
- Al finalizar, cerrar **“Runtime Controller”**

4.2.2.2.3 Puesta en marcha del proceso de preparación automatizada.

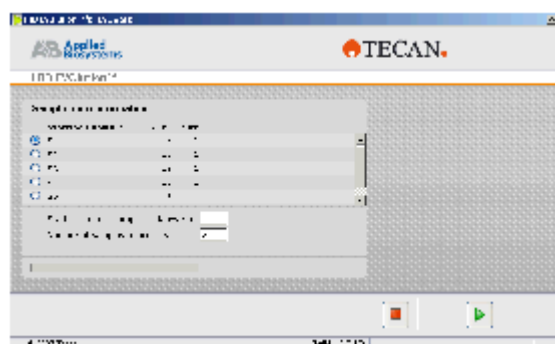
- En el software Evo, seleccionaremos la opción **Edit an existing script** y en la pantalla Startup clicar sobre Start your selection / Run



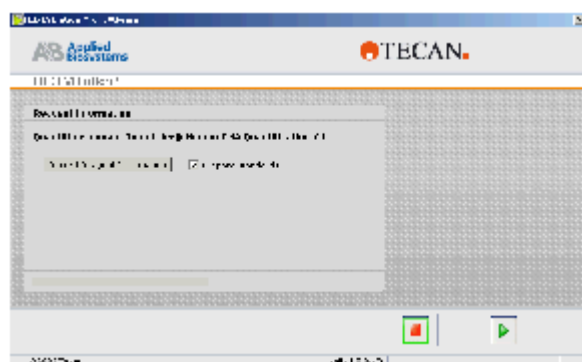
- Buscar en el desplegable **QuantifilerHuman_Tubes_Combo**.



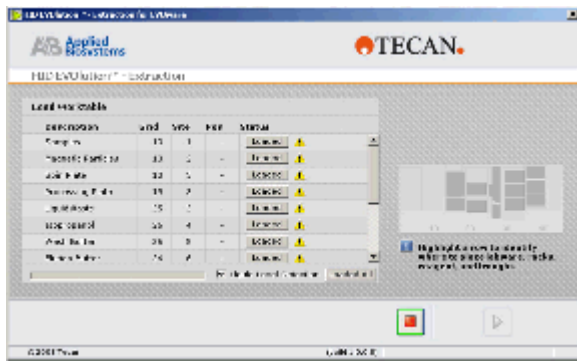
- Clicar sobre **Execute/ Run**.
- En la pantalla **Runtime controller** clicar sobre **Run**.
- Definiremos el número de muestras a cuantificar y la posición de inicio. Clicar sobre **Run**



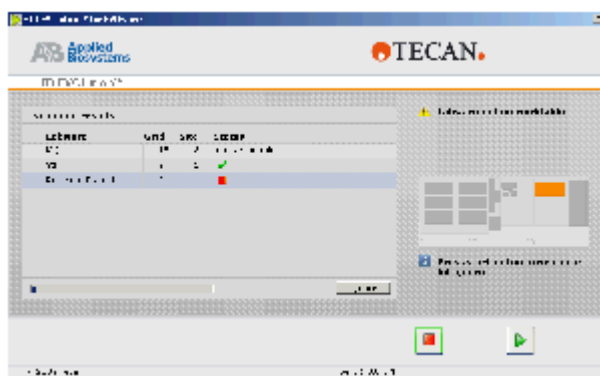
- Clicar sobre **Prepare Standards** si deseamos que cree los tubos de la ladder, los estándares se podrán mantener durante tres meses congelados, y podrán ser reutilizados, en este caso deberemos de **deseleccionar** la opción **Prepare Standards**.
- Introducir los números de lotes de los reactivos, clicando sobre **Record Reagent Information** y al final clicar sobre **OK**.



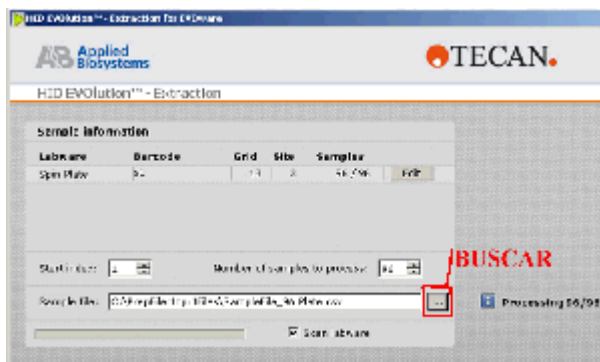
- Clicar sobre **Run**
- Comprobar que tanto el **Quantifiler Reagent Block (MQ)**, la **bandeja con las muestras** y la **bandeja vacía** están en su posición, clicando a cada uno de **los loaded** o bien todos con **loaded all**.



- Clicar sobre **Run**.
- El brazo robótico escanea los códigos de barra, y si no los detecta deberemos seleccionar **Ignore** y clicar sobre **Run**.



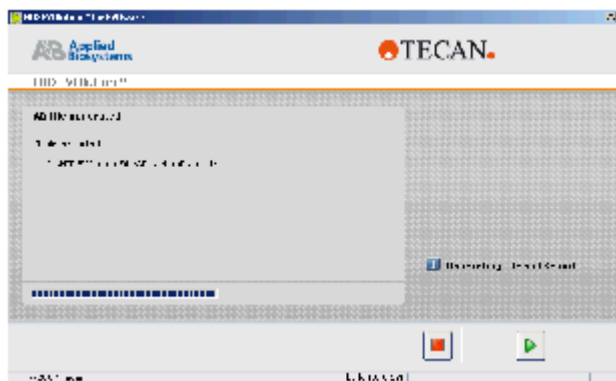
- Aparece un mensaje de No Samples present.



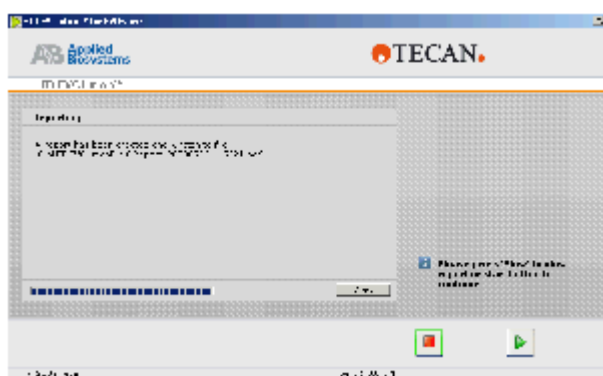
- Clicar sobre **Edit** y sale una pantalla de edit samples.
- Introducir las muestras (contiguas), manualmente, o bien en un archivo csv desde la opción **buscar**

(C:\HIDEVolutionExtractionFiles\Archive\date_time) comprobar que estan correctas y clicar sobre **OK**

- Clicar sobre **Run**.
- Comprobar que está correctamente colocado lo que pide (las puntas de pipetas....)
- Una vez finalizado se generará un archivo SDS para exportarlo en el ABI 7500 para realizar la cuantificación, clicaremos sobre **Run**.



- Seleccionaremos la función **View** para ver el informe generado, este informe puede ser guardado como varios formatos (.pdf, xls, doc y rtf) desde view, pero se crea una copia automáticamente como pdf, en **C:\HIDEVolutionFiles_qPCRSTRFiles**.



- Clicar sobre **Run** para completar el Script.

4.2.2.3 Archivo de los resultados para la cuantificación en el robot.

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

Los datos para importar al ABI 7500 se guardan automáticamente en la carpeta **C:\HIDEVO_qPCRSTRFiles** como un archivo txt, denominado **ReactionPlate1.txt**, (si la placa tuviese código de barras barcode.txt) así mismo se generarán automáticamente además un informe con todos los datos (Report) y una hoja csv con los detalles.

Cuando se realice la siguiente cuantificación todos estos archivos quedarán guardados de forma automática en la carpeta nombrada como **aaaammdd_horayminuto** en la carpeta **C:\HIDEVO_qPCRSTRFiles/Archives**.

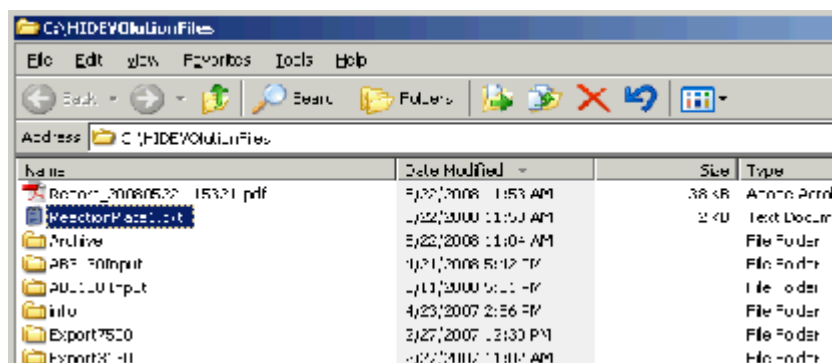
4.2.2.4 Configurar el software SDS e importar el archivo SDS y correr la placa en el ABI 7500

Se saca la placa a cuantificar del robot y colocarlo sobre su base.

Colocar el film adhesivo (Optical Adhesive Cover) sobre la placa, y ayudarnos del aplicador para fijarlo.

Centrifugar la placa (1000 rpm durante 1 minuto).

Copiar el archivo SDS (**ReactionPlate1.txt**) creado en el robot en un lápiz de memoria desde **C:/HIDEVolution_qPCRSTRFiles**.



Renombrar el archivo utilizando la fórmula **aaaammdd_nºprofesional**, así para una cuantificación realizada por el Técnico 12345 el 01 de enero de 2009, se debería de guardar como **20090101_12345**

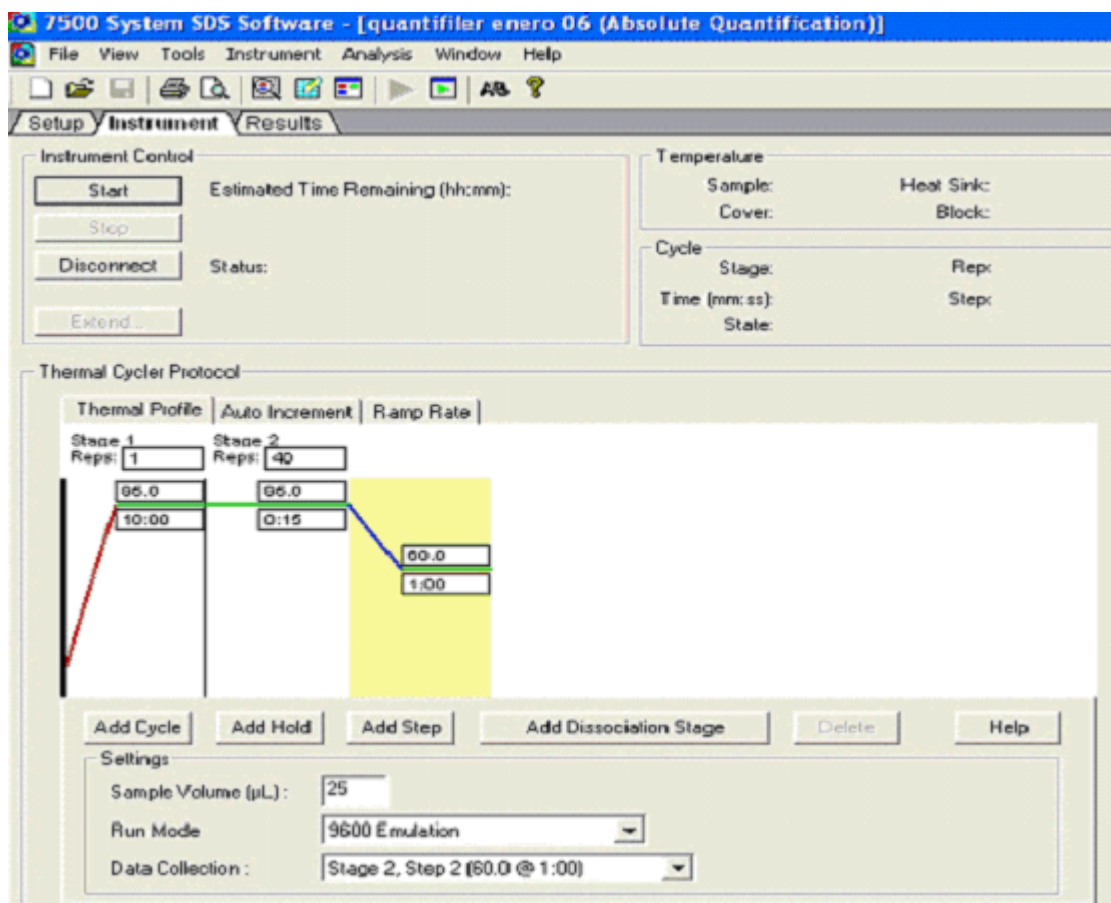
Ir a la sala de cuantificación y guardar este archivo en el ABI 7500 dentro de la carpeta **C: / Escritorio/ listas de inyección**.

Alternativamente se podrá crear la hoja con los datos de las muestras a cuantificar en el ABI 7500 siguiendo los pasos explicados en el punto 4.2.1.1.2.2.

Colocar la placa que hemos sacado del robot en el ABI 7500.

4.2.3 Puesta en marcha de la cuantificación

En el programa SDS v.1.3.1 ó SDS v.1.2.3, en la pestaña "*Instrument*" están definidas las condiciones de la reacción de PCR, las que vienen por defecto son las que están recomendadas por el fabricante de los kits de cuantificación y que son un primer paso con un ciclo a 95 °C durante 10 minutos y un segundo paso de 40 ciclos con dos rampas de temperatura, una primera a 95 °C durante 15 segundos y una segunda a 60° C durante 1 minuto.



Para poner en marcha la reacción se deberá de ir a la pestaña “*Instrument*” (imagen anterior) y pinchar sobre el botón “*Start*”, o bien se deberá de ir a “*Instrument / Start*” sobre la barra de herramientas.

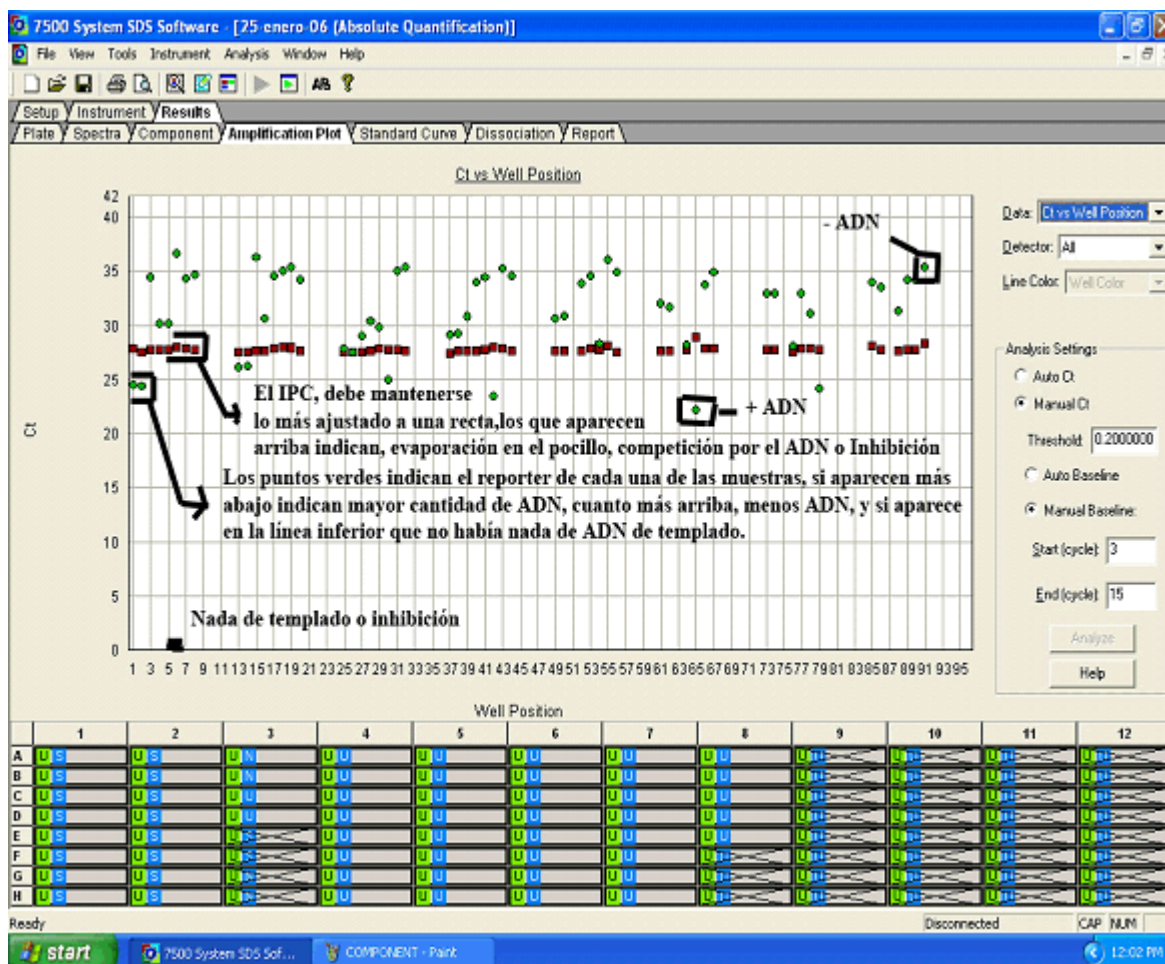
4.2.4 Lectura de los resultados del programa de cuantificación

Una vez finalizada la reacción de PCR (aparece una pantalla que indica “*Run succesfully completed*”), se deben de analizar los datos de la cuantificación, para ello se deberá ir en la barra de herramientas a “*Análisis / analyze*”, o bien pinchando sobre el triángulo verde de la imagen.

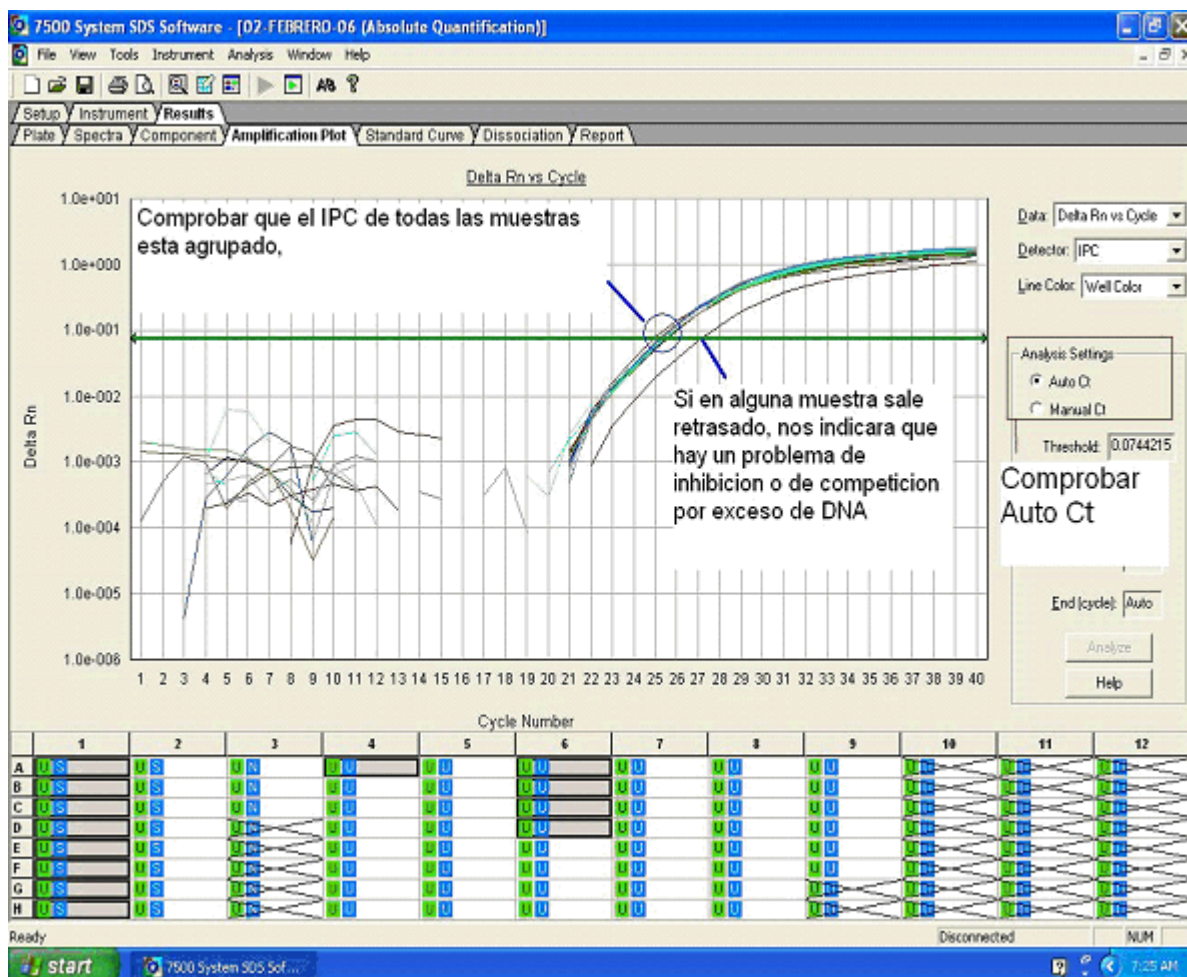


Los valores de la cuantificación para cada muestra se observan en la pestaña “*Results*”, que tiene a su vez varias subpestañas. A continuación se explican las funciones de cada una de estas:

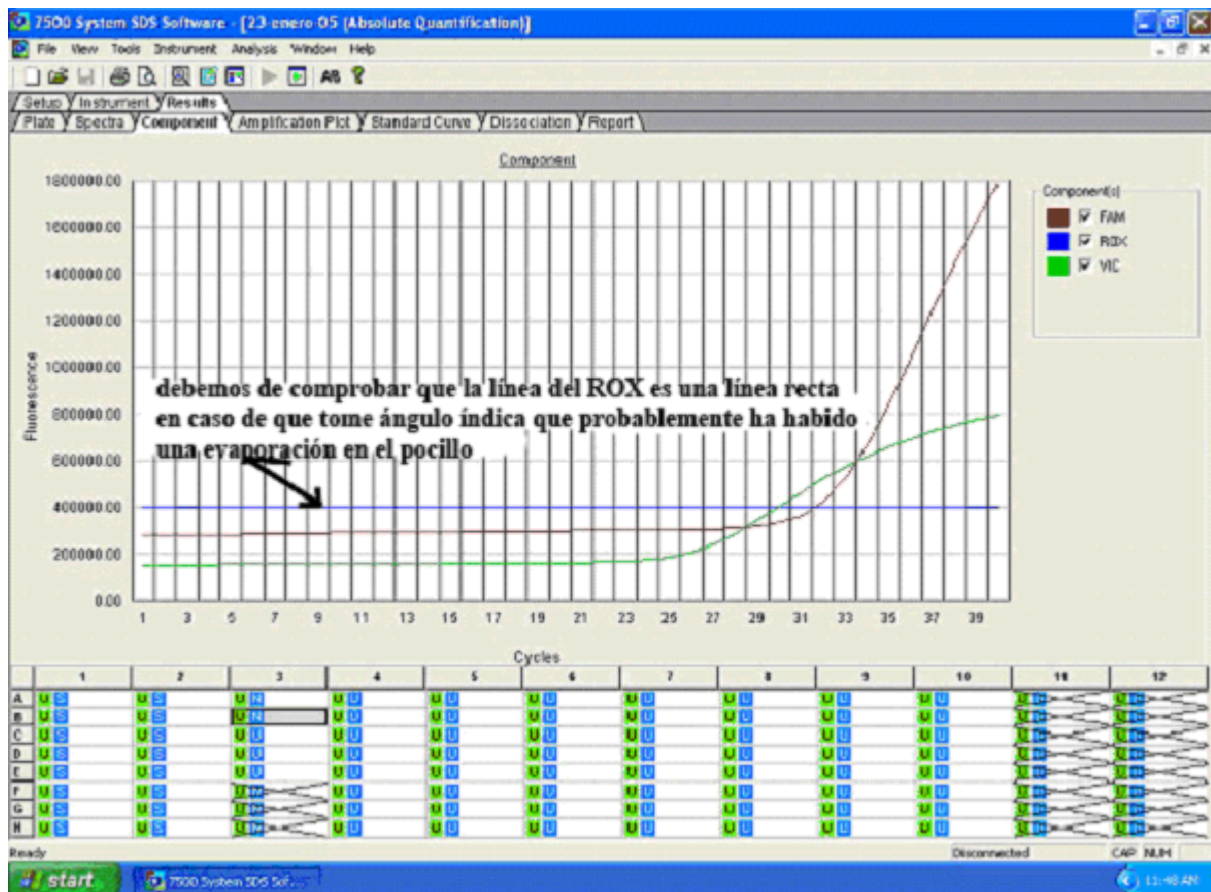
- En la subpestaña “*Amplification plot*”, en la opción “*Ct vs Well Position*”, se puede comprobar visualmente cómo han amplificado todas las muestras (círculos verdes) así como la correcta amplificación del IPC (cuadrados rojos), que si ha habido una reacción de PCR perfecta deben formar una recta. Si alguno de ellos se aleja de esta recta eso indica que ha habido una bajada en la eficiencia de la amplificación en ese pocillo. Así mismo se puede comprobar de forma intuitiva, la cantidad de templado inicial en las muestras (círculo verde) y si ha podido haber inhibición (tanto el círculo como el cuadrado aparecen en la parte inferior de la pantalla) o competencia por los reactivos por exceso de ADN templado.



- En la opción "*Delta Rn vs Cycle*" y con el detector en "*IPC*" se puede comprobar visualmente si el IPC de todas las muestras aparecen agrupados. En el caso de que el IPC de alguna de las muestras aparezca retrasado indicaría que hay un problema de inhibición o bien una competición por los reactivos por partir de exceso de ADN templado.



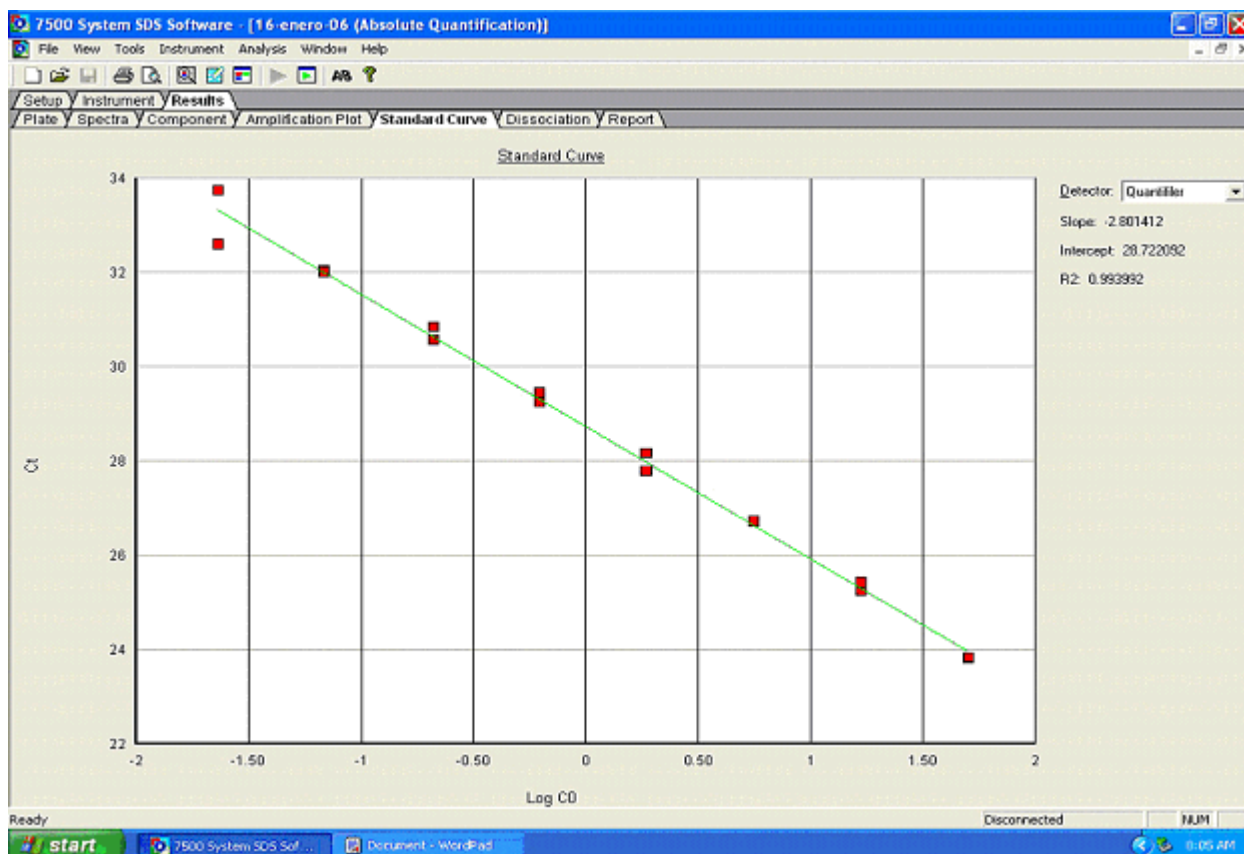
- En la subpestaña “Component” se puede comprobar que aparecen en cada muestra tanto el IPC como la curva de la muestra y que el ROX se haya mantenido constante durante la amplificación.



- En la subpestaña "Plate" se pueden ver los resultados de la cuantificación (por defecto los valores aparecen en nanogramos/microlitro, ng/ μ l) para cada uno de los pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50.000 U Undet. S 5.00e+001	50.000 U Undet. S 5.00e+001	control negativo M1 U Undet. N	M1A U Undet. 1.57e+001	M1A U Undet. 1.47e+001	1931-6 U Undet. U Undet.	1993-5B U Undet. U 1.67e-001	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.
B	16.700 U Undet. S 1.67e+001	16.700 U Undet. S 1.67e+001	blanco de extracción M2 U Undet. N	M2A U Undet. 8.08e+000	M2A U Undet. 7.43e+000	1931-7 U Undet. U Undet.	1993-1.2 U Undet. U 1.91e-003	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.
C	5.560 U Undet. S 5.56e+000	5.560 U Undet. S 5.56e+000	N	M3 U Undet. 3.29e+000	M3A U Undet. 3.15e+000	1990-1 U Undet. U 6.02e-003	1990-1 U Undet. U 2.88e-001	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.	U Undet. U Undet.

- En la subpestaña "Standard curve" se va a obtener la curva de regresión de la amplificación, en la cual se obtienen una serie de valores que se deben de controlar, que son la pendiente de la curva ("Slope") que da una idea de la reacción de la PCR y la " R^2 " que da idea del ajuste de los valores de los estándares a la curva obtenida.



4.2.5 Comprobación de la calidad de la cuantificación

Se debe de comprobar que en la subpestaña "Standard curve".

- El valor de R^2 sea ≥ 0.99 ya que un valor de $R^2 \leq 0.98$ indica la existencia de algún problema a la hora de realizar las diluciones, en el pipeteo, etc.
- Una pendiente de - 3.3 indica una eficiencia del 100% en la amplificación, en la reacción de la PCR, una desviación de este, en cierto grado es normal pero si es excesiva indica problemas en la reacción, error de pipeteo, pérdida de corriente eléctrica, etc.

Valores de pendiente obtenidos por Applied Biosystems		
KIT	RANGO	PENDIENTE MEDIA
QUANTIFILER	-2.9 a -3.3	-3.1

4.2.6 Criterios de aceptación y rechazo

Valores mínimos admitidos	
Valor mínimo de R^2	
El valor de R^2 debe de ser ≥ 0.981	
Valor mínimo de pendiente	
KIT	RANGO
QUANTIFILER	-2.81 a -3.49

En caso de que los valores obtenidos no estén dentro de los valores mínimos admitidos se deberá de repetir la amplificación.

El valor máximo que se puede admitir para el control negativo será de 19 pg/ μ l, si se obtiene un valor

superior a este se deberá de repetir la amplificación.

Si se obtiene un valor igual o superior a 20 pg/μl se procederá a continuar con el proceso de amplificación de la muestra y en caso de obtener una cantidad de ADN inferior a 20 pg/μl, no se continuará con el proceso de amplificación y se valorará en función al tipo delictivo, al tipo de solicitud de estudios, al número de muestras obtenidas en la misma solicitud de estudio con una cantidad de ADN superior a 20 pg/μl y la cantidad de muestra restante, la conveniencia o no de comenzar con una nueva extracción de la muestra problema.

El valor de aceptación para el control positivo (SRM 2372) será de entre 2 y 15 ng/μl, si se obtiene un valor fuera de este rango se deberá de repetir la cuantificación.

El valor máximo admitido para la cuantificación será de 150 ng/μl, en caso de ser superior se deberá de diluir esta muestra problema en una proporción 1/10.

4.2.7 Guardar los datos obtenidos en la cuantificación

Se procederá a almacenar los datos obtenidos en la cuantificación, en la carpeta "Resultados". Para ello utilizaremos la función "File / Export / Results" utilizando la ruta "Desktop / Resultados" con el formato Año-Mes-Día.csv (p.ej. 2008-09-12.csv).

El resultado se registra en el formato [FM0111](#) Control de cuantificación Quantifiler si se ha cuantificado de forma manual

5.- Formatos:

Código	Denominación
FM0111	Control de cuantificación QUANTIFILER

6.- Referencias:

Referencias	Código	Denominación
Instrucciones	IN0106	Cuantificación de las muestras de ADN mediante el kit Quantifiler DUO
	IN0071	Preparación de reactivos
Artículos	Alonso A. y García O. Real Time Quantitative PCR in Forensic Science. Molecular Forensics. Ed.: Wiley, pp. 59-70 (2007).	
	Alonso et al: Specific Quantification of Human Genomes from Low Copy Number DNA samples in Forensic and ancient DNA Studies. Croatian Medical Journal 44(3): 273-280 (2003)	
	Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25(2): 169-193 (2000).	
	Alonso et al. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. Forensic Science International 139(2-3): 141-149 (2004).	
	Absolut Quantification Getting Started Guide. Applied Biosystems, Foster City, California. USA	
	Installation and Maintenance Guide. Applied Biosystems, Foster City, California. USA	

7.- Anexos:

- Manual del usuario de los kits Quantifiler Human DNA Quantification Kit and Quantifiler Y Human Male DNA Quantification.
- Folleto de composición de los kits Quantifiler Human DNA Quantification Kit and Quantifiler Y Human

Male DNA Quantification.

- Boletín del usuario de Validation Using SDS Software Version 1.2.3 on the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System and the ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System
- Boletín del usuario de ABI PRISM 7000 Sequence Detection System and Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
- Prospecto informativo de los kits Quantifiler Human DNA Quantification Kit and Quantifiler Y Human Male DNA Quantification.

8.- Historial de modificaciones:

Nº revisión	Descripción de la modificación	Fecha modif.
00	Edición inicial	26/06/2007
01	Se suprime a partado 4.1. Se suprime el FM0086 del apartado 5.	26/06/2007
02	Modificar tecnicismos	26/06/2007
03	Introducción material referencia	14/03/2008
04	En el apartado 4.2.2.3 se incluye el material de referencia como control de calidad. En el apartado 4.2.5. se incluye el criterio de aceptación y rechazo del mismo	07/07/2008
05	En índice, punto 4.2.1 incluir "ó SDS v.1.2.3" En alcance introducir referencia a Quantifiler Duo En apartados 4.1.3 (Equipamiento) incluir GF078 En apartado 4.2.1 (Creación...) incluir GF078 y ó SDS v.1.2.3 En apartado 4.2.1.1 quitar "enero 06" En apartado 4.2.1.2.2 añadir "ó SDS v.1.2.3" En apartado 4.2.2.2 (Preparación...) eliminar referencia a IN0071 En apartado 4.2.3 añadir "ó SDS v.1.2.3" En apartado 4.2.5 (Criterios de aceptación y rechazo) eliminar referencia a IN0051, IN0052 e IN0053 Cambio de ubicación de las referencias.	14/04/2009
06	En el punto 4.2.2.3 sustituir GF0029 por GF0028 y en (nevera) GF0029 por GF0081 En punto 4.2.5 Criterios de aceptación y rechazo dar un retorno de carro antes de éste subtítulo	07/07/2009
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 preparación automatizada con 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:**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

