

IN0054

Estado:Definitivo

Fecha Vigor: 17/10/2011

Rev.03

---

## PREPARACIÓN DEL SECUENCIADOR ABI 310

---

### 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. PASO PREVIO
    - 4.2.2. INSTALACIÓN DEL CAPILAR
    - 4.2.3. CARGA DEL POLÍMERO
    - 4.2.4. INSTALACIÓN DE LA JERINGA
    - 4.2.5. CALIBRACIÓN DEL AUTOSAMPLER (BRAZO MÓVIL DONDE VA SITUADA LA BANDEJA)
    - 4.2.6. LLENADO DE LOS RESERVORIOS DE TAMPÓN
    - 4.2.7. SELECCIONAR LA TEMPERATURA DE MIGRACIÓN
    - 4.2.8. LLENADO DEL CAPILAR CON POLÍMERO
    - 4.2.9. INSTALACIÓN DEL CAPILAR
    - 4.2.10. OPERACIONES A REALIZAR ANTES DE APAGAR EL ORDENADOR (Y EL SECUENCIADOR)
  - 4.3. LIMPIEZA DEL SECUENCIADOR
5. FORMATOS
6. REFERENCIAS
7. ANEXOS
8. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

#### 1.- Objeto:

El objeto de esta instrucción es describir la sistemática a seguir para la preparación del secuenciador ABI 310 para la realización del tipaje de las muestras amplificadas.

#### 2.- Alcance:

Aquellos ensayos realizados en la sección de Genética Forense en los que se analizan STRs de ADN nuclear.

#### 3.- Definiciones:

#### 4.- Descripción de la instrucción

##### 4.1. MATERIALES

###### 4.1.1. Reactivos

- Etanol absoluto
- Polímero POP 4 **Applied Biosystems**
- 10X Genetic Analyzer EDTA Buffer
- Agua destilada

###### 4.1.2. Material fungible

- Capilar
- Un vial de 1,5 ml
- Jeringa de plástico de 10 ml
- Parafilm

- Guantes

#### 4.1.3. Equipamiento

- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (GF037 - GF038)
- Jeringa
- Bandeja de colocación de muestras
- Reservorio de vidrio para buffer
- Reservorio de vidrio para agua destilada
- Vaso reservorio de buffer

### 4.2. PROCEDIMIENTO

#### 4.2.1. Paso previo

- Encender el secuenciador y comprobar que se enciende el piloto verde
- Encender el ordenador (si el ordenador da un error porque se ha cerrado inapropiadamente el programa o bien si hemos encendido primero el secuenciador y luego el ordenador, deberemos de ir a "*Window / Preferences / General Settings*" y en "*Communication ports*" deberemos cambiar "*No port*" por "*COM1*")
- Abrir el programa Data Collection
- Comprobar que en el secuenciador la jeringa está arriba ("*Window / Manual control / Function / Syringe home*") y que la válvula del buffer está cerrada (*Buffer valve close*) (Pag 4-2 del manual del usuario)

#### 4.2.2. Instalación del capilar

- Si observamos impurezas se deberá limpiar la ventana del capilar con papel humedecido en etanol absoluto
- Abrir el tapón del lado derecho del bloque de metacrilato
- Insertar el capilar sin que sobrepase la cruz
- Cerrar el tapón fuerte para que el capilar quede suficientemente sujeto
- Abrir la puerta del láser y colocar el capilar de manera que la ventana del capilar quede frente al detector láser
- Introducir el capilar junto al electrodo hasta dejarlos a la misma altura
- Mover el electrodo hasta que electrodo y capilar estén en una posición convergente (Pag 4-11 del manual del usuario)

#### 4.2.3. Carga del polímero

- Poner el polímero a temperatura ambiente antes de llenar la jeringa
- Invertir suavemente la botella varias veces para homogeneizar el contenido de la misma
- Dejar reposar 5-10 minutos el polímero antes de su uso
- Llenar manualmente la jeringa con un máximo de 0.4 ml (el volumen utilizado es aproximadamente de 0.1 ml para el llenado del bloque y unos 10 µl por muestra)
- No usar polímero que haya estado en el secuenciador más de una semana (incluso en funcionamiento)
- No devolver polímero usado a su botella original
- Eliminar las burbujas de aire invirtiendo la jeringa
- Limpiar la jeringa por su parte exterior para quitar el exceso de polímero

#### 4.2.4. Instalación de la jeringa

- Enroscar la jeringa en el cuerpo de metacrilato utilizando el anillo metálico como soporte para girar la jeringa al enroscar
- Cerrar manualmente las válvulas situadas abajo y a la izquierda de la jeringa
- Cerrar desde el ordenador la válvula del buffer
- Abrir la válvula de debajo de la jeringa y empujar manualmente la jeringa para llenar el bloque con el polímero, cerrar esta válvula y abrir la de la izquierda, rellenar y abrir por último la válvula de buffer ("*Window / Manual control / Function / Open buffer valve*") y cuando esté relleno todo el bloque cerrar ésta última válvula ("*Buffer valve close*")
- Bajar la jeringa ("*Window / Manual control / Function / Syringe down*") y poner un valor numérico (por ejemplo, 500). Antes de que toque el émbolo a la pieza metálica subir la jeringa ("*Syringe up*") poniendo, por ejemplo, 1

#### 4.2.5. Calibración del "Autosampler" (brazo móvil donde va situada la bandeja)

- La bandeja debe ser quitada del autosampler antes del calibrado
- Elegir del menú "*Collection*" la opción "*Instrument / Autosampler calibration*"
- Aparece en la pantalla la ventana de calibración. Pulsar "*Star*" y seguir las instrucciones
- Usar las flechas de la pantalla o las correspondientes teclas del teclado. Para mover recorridos muy pequeños pulsar la tecla "*Shift*" y la flecha correspondiente
- Centrar y aproximar (aprox. la distancia es de 0,5 mm) el capilar a los puntos metálicos situados en la parte frontal y trasera de la bandeja
- Seguir las instrucciones de la pantalla para completar la calibración (Pag 4-28 del manual del usuario)

#### 4.2.6. Llenado de los reservorios del tampón

- Preparar  $15 \pm 1$  ml de tampón de electroforesis utilizando  $1,5 \pm 0,2$  ml del reactivo 10X Genetic Analyzer EDTA Buffer y  $13,5 \pm 0,8$  ml de agua destilada
- Llenar el reservorio del ánodo hasta la línea roja con el buffer y colocarlo en el bloque
- Llenar un tubo de vidrio ( $4 \pm 0,4$  ml) de tampón de electroforesis con una pipeta y poner un adaptador blanco y un tapón gris perforado. Colocar este tubo en el "*autosampler*", en la posición 1
- Llenar un segundo tubo de vidrio ( $4 \pm 0,4$  ml) con agua destilada, el adaptador blanco y el tapón gris y colocarlo en el "*autosampler*" en la posición 2
- Llenar un vial de  $1,5 \pm 0,1$  ml con agua destilada y colocarlo en la posición 3 del "*autosampler*" (después de realizada la calibración del "*autosampler*")
- Es recomendable cambiar el tampón todas las semanas o cada 200 migraciones (Pag 4-20, 4-22 y 4-23 del manual del usuario)

#### 4.2.7. Seleccionar la temperatura de migración

La temperatura será de 50 °C para secuenciación y de 60 °C para el análisis de fragmentos (STRs). Se deberá seleccionar "*Window / Manual control / Function / Temperatura set*"

#### 4.2.8. Llenado del capilar con polímero

Se realizará un llenado de polímero en el capilar. Esta opción rellena el capilar de polímero fresco. Es recomendable realizar este llenado cada vez que se instala el capilar en el equipo de secuenciación, independientemente de que este capilar sea nuevo o no. También realizar esta operación sirve de ayuda a la conservación del capilar, si es realizado este relleno antes de ser desmontado el capilar. Se deberá seleccionar "*Window / Manual control / Module / Seq fill capillary Mod 4*". A la vez que se calienta la placa térmica se irán realizando las hojas de las muestras y la hoja de inyección.) (Pag 5-15 del manual del usuario)

#### 4.2.9. Instalación del capilar

- Abrir la ventana "*Window / Manual control / Seq fill capillary / Module / Star*" con la finalidad de eliminar los restos de muestras que hayan quedado en el capilar
- Apagar el secuenciador (el "Autosampler" baja cuando se apaga el aparato)
- Abrir la tapa de la placa térmica
- Bajar el capilar hasta el fondo del tubo situado en posición 2 ó 3 (agua)
- Pegar el capilar y cerrar las puertas

#### 4.2.10. Operaciones a realizar antes de apagar el ordenador y el secuenciador

Con independencia de que se desmonte o no el capilar, es conveniente realizar las siguientes operaciones:

- Abrir la ventana "*Window / Manual control / Function / Syringe home / Execute*" con la finalidad de poder manipular con la jeringa
- Quitar la bandeja con las muestras. Para presentar la bandeja y posteriormente devolverla a su posición, presionaremos sobre el botón "*Tray*" que se encuentra en la parte izquierda inferior del secuenciador

#### 4.3. LIMPIEZA DEL SECUENCIADOR

- Deberemos cerrar el programa de la lista de inyección, dando a "*Terminate*", si no ha finalizado
- Deberemos de subir la jeringa "*Window / Manual control / Function / Syringe up*" y cerrar la válvula de tampón "*Window / Manual control / Function / Buffer valve close*"
- Apagar el programa "*Data Collection*"
- Quitar el capilar del secuenciador y guardarlo en dos viales de agua a temperatura ambiente
- Quitar la jeringa y guardarla en la nevera tapando la punta con parafilm.
- Quitar el cuerpo de electroforesis, el vaso de tampón y los tubos de tampón y agua y lavarlos con agua destilada con la jeringa de plástico, y secarlos

#### 5.- Formatos:

#### 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	14/03/2008
02	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
03	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:**

Jefe de la Sección de Genética Forense  
Jefe/a de la Ertzaintza

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

04/10/2011  
13/10/2011

**Aprobado:**

Viceconsejera/Viceconsejero de Seguridad

**Fecha:**

14/10/2011

