



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN
DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO
HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-BIO-043

VERSION: 01

Rige desde: 15/11/2024

PAGINA: 1 de 21

Elaborado o modificado por:

**Máster. Rossana Oliva Barboza
Perito Judicial II, Sección de
Biología Forense**

Revisado por Líder Técnico:

**Lic. Roberto Morales Montero
Perito Judicial II, Sección de
Biología Forense**

Visto Bueno Encargado de Calidad:

**Dra. Paola Solano Naranjo
Encargado de la Calidad de la Sección de
Biología Forense**

Aprobado por:

**Lic. John Vargas Fonseca
Jefe, Sección de Biología Forense**

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	15/11/2024	-	Versión Inicial del Procedimiento	24-24	JVF

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 2 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

1. Objetivo:

Este procedimiento describe el método de amplificación de ADN, que significa obtener miles de copias de un trozo determinado de ADN a partir de extractos de muestras no humanas que tiene cantidades diminutas de ADN. La amplificación se realiza por la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando un Termociclador, que permite que se multiplique el trozo de ADN del extracto de la muestra para que se pueda secuenciar e identificar.

2. Alcance:

Este procedimiento se puede utilizar con cualquier extracto de ADN no humano obtenido en la fase de extracción. Este procedimiento se puede utilizar para amplificar ADN mitocondrial, ribosomal y cloroplástico siempre utilizando la técnica Barcoding, la cual trabaja con secuencias cortas de ADN utilizando *primers* universales o específicos

Para realizar el análisis se utiliza un Termociclador donde los productos de PCR se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN. Luego se verifican estos resultados por medio de electroforesis capilar

Los usuarios de este PON deben tener conocimientos básicos en la preparación de los productos PCR y el uso del Termociclador, este último se adquiere por la capacitación que imparten los proveedores del equipo o, en su defecto, una capacitación que imparte un usuario previamente capacitado en el uso del equipo, esto según carta de funciones de cada funcionario.

Este procedimiento está basado en la validación respectiva y sus resultados publicados en los Informes de Validación cuyas identificaciones son 002-BIO-VAL-2023 y 004-BIO-VAL-2024

3. Referencias:

- Amorim J.A, de Oliveira T.M.P, de Sá I.L.R, da Silva T.P, Sallum M.A.M. 2023. DNA Barcodes of *Mansonia* (*Mansonia*) *Blanchard*, 1901 (Diptera, Culicidae). *Genes* 2023, 14,1127. <https://doi.org/10.3390/genes14061127>
- Applied biosystems. Manual de uso del ProFlex, PCR System Installation and Operation
- Branicki Wojciech, Kupiec Tomasz and Pawlowski Ryszard. 2003. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *J Forensic Sci*, Jan. 2003, Vol. 48, No. 1
- Chaca L. D, and Thinb B. B.2023. Species Identification through DNA Barcoding and Its Applications: A Review. ISSN 1062-3590, *Biology Bulletin*, 2023, Vol. 50, No. 6, pp. 1143-1156. © Pleiades Publishing, Inc., 2023.
- Dawnay Nick, Ogden Rob, McEwing Ross, Carvalho Gary R, Thorpe Roger S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173 (2007) 1-6
- Hebert Paul D. N, Penton Erin H, Burns John M, Janzen Daniel H and Hallwachs Winnie. in Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, October 12, 2004, vol. 101, no. 41

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 3 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

- Janzen Daniel H. CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, May 27 (received for review March 18, 2009).
- Kress W. John, Erickson David L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnHpsbA Spacer Region. PLoS ONE | www.plosone.org 1 June 2007 | Issue 6 | e508
- Martinez Pilar. 2021. Genetic identification and subsequent LC-QTOF MS analysis of plant remains (Oenanthe spp.) could prove the cause of an undetermined sudden death. International Journal of Legal Medicine (2021) 135:1407–1411
- Natalia Ivanova and Chris Grainger. 2006. Canadian Centre for DNA Barcoding CCDB. Protocols. COI Amplification
- Panday Raju, K. Jha Dinesh, Thapa Nirajan, Pokharel Basant R. y Aryal Nanda K. 2014. Forensic Wildlife Parts y su identificación de producto y Individualización usando el código de barras de ADN. The Open Forensic Science Journal, 2014, 7, 6-13.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. Int J Legal Med (2000) 114 :23–28
- Pereira F, Carneiro J, and Asch B. 2010. A Guide for Mitochondrial DNA Analysis in Non-Human Forensic Investigations. The Open Forensic Science Journal, 2010, 3, 33-44 33.
- Policía Nacional de Colombia. Procedimiento Código: 2DC-GU-0073: Métodos para el análisis de muestras biológicas en el laboratorio de identificación genética forense de especies silvestres
- QIAgen. Manual de uso del QIAxcel
- Rey B Fabiana y Capdevielle S Fabián. 2020. Aplicación del código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. INNOTEC, núm. 20, pp. 117-138. Laboratorio Tecnológico del Uruguay
- Sandeep Antil, Jeeva Abraham, Sripoorna S, Swati Maurya, Jyoti Dagar, Seema Makhija, Pooja Bhagat, Renu Gupta, Utkarsh Sood, Rup Lal and, Ravi Toteja. 2023. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. Molecular Biology Reports (2023) 50:761–775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Shilin Chen1, Hui Yao1, Jianping Han1, Chang Liu2, Jingyuan Song1, Linchun Shi1, Yingjie Zhu1, Xinye Ma1, Ting Gao1, Xiaohui Pang1, Kun Luo3, Ying Li1, Xiwen Li1, Xiaocheng Jia1, Yulin Lin1, Christine Leon. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. PLoS ONE | www.plosone.org. January 2010 | Volume 5 | Issue 1 | e8613
- Webster Lucy, Prigge Tracey and Frankham Greta. 2024. A guide for the validation of DNA based species identification in forensic casework. Forensic Science International: Animals and Environments 5 (2024) 100080
- Yang Fan, Ding Fei, Chen Hong, He Mingqi, Zhu Shixin, Ma Xin, Jiang Li y Haifeng Li. Código de barras de ADN para la identificación y autenticación de Especies animales en medicina tradicional. Medicina complementaria y alternativa basada en la evidencia Volumen 2018, ID de artículo 5160254, 18 páginas

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 4 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

4. Equipos y Materiales:

- Bloque frío para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y 2 mL.
- Bloques fríos para placas PCR.
- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, no punzo cortante.
- Cajas de plástico para guardar productos PCR.
- Cajas de plástico para guardar tubos de para microcentrífuga de 1,5 mL y 2 mL.
- Capilla de flujo laminar marca Biobase, modelo PCR 1000 o similar.
- Centrífuga refrigerada marca Eppendorf, modelo 5430R, o similar, con capacidad para alcanzar 14000 rpm, con adaptadores para filas de tubos PCR y placas PCR y su correspondiente libro de control de uso.
- Cintas adhesivas para placas de PCR nuevas.
- Computadora con acceso a red y al Sistema de Automatización del Departamento de Ciencias Forenses (SADCF).
- Computadora del QIAxcel
- Congelador con temperaturas cercanas a los -20° C. (rango de -10 a -30°C ,± 2°C).
- Cubre cabezas.
- Equipo de medición de temperatura y humedad, marca Amprobe, modelo TR300, o similar.
- Formulario de Análisis de ADN no humano
- Formulario P-DCF-GCT-JEF-008-R16: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo.
- Formulario P-DCF-ECT-BIO-043-RI: Ficha PCR
- Gabacha desechable limpia o de tela que se encuentre limpia.
- Gradillas para tubos de micro centrifuga, limpias.*
- Gradillas para tubos PCR, limpias.*
- Guantes desechables de nitrilo o similar.
- Herramienta para sellar la cinta adhesiva para tapar las placas PCR
- Instrumento de Electroforesis Capilar marca QIAGEN, modelo QIAxcel Advanced o similar, con su computadora asignada y correspondiente libro de uso.
- Lapicero.
- Lápiz de grafito.
- Ligas elásticas de hule.
- Marcador de tinta indeleble.
- Mascarilla desechable.
- Micropipeta electrónica Eppendorf Xplorer, o similar, con volumen graduable de 5,0 a 100,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 5 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 0,5 a 10,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 0,1 a 2,5 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 10,0 a 100,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 100,0 a 1000,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta multicanal Eppendorf Research Plus de 8 canales, o similar, con volumen graduable de 0,5 a 10,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Minicentrífuga Fisherbrand, marca Sprout Plus o similar, con adaptadores para filas de tubos PCR.
- Papel blanco.
- Placas de PCR nuevas divisibles.
- Placas de PCR nuevas.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 0,5 a 10 uL.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 100-1000 uL.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 20-200 uL.
- QIAxcel, marca Qiagen
- Recipientes de material plástico rígido para "punzo cortantes", preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra acompañada del símbolo de biopeligrosidad.
- Refrigerador con temperaturas cercanas a los 4° C. (rango 2-8°C ,± 2°C)
- Registrador de temperatura marca Amprobe, modelo TR300 o similar, con rango de medición de -20 a 70°C y tolerancia de ± 0,6°C en el rango de 0 a 50°C.
- Registrador de temperatura marca Thermo Scientific, modelo Smart Vue SV400-101-LSB o similar, con rango de medición de -40 a 80°C.
- Soportes especiales para montar PCR
- Tapas de tiras de 8 y 12 para tubos de PCR de 2uL, nuevas y autoclavadas.
- Termociclador marca Applied Biosystems, modelo ProFlex o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Tiras de 8 y 12 tubos de PCR de 2 uL, nuevos y autoclavados.
- Toallas desechables para uso en superficies delicadas tipo "Kimwipes" o similar.
- Tubos cónicos de 15 ml.
- Tubos de PCR de 2 uL, nuevos y autoclavados.
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, nuevos y autoclavados.
- Tubos para microcentrífuga de 2 mL, nuevos y autoclavados.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 6 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

- Vórtex marca Benchmark, modelo Benchmixer o similar.

*Limpie cuidadosamente la parte externa de los instrumentos con DNA Away y posteriormente con alcohol al 70% para eliminar el exceso, utilizando una toalla desechable. En caso de que se considere necesario, las micropipetas se pueden autoclavar.

5. Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua libre de nucleasas, igual o similar a Ambion Nuclease-Free Water de Invitrogen, REF AM9930 Alícuotas de *primers* preparados a 10uM (ver Anexo 1).
- Bovine Serum Albumin (BSA), igual o similar a Thermo Scientific, CAT B14
- Cartucho QIAxcel DNA Screening Kit, igual a CAT N° 929004.
- Cilindros de Nitrógeno QIAxcel, igual a CAT N° 929705
- Control positivo de ADN (Ver Anexo 3)
- D-(+)- Trealosa dihidratada, marca Sigma-Aldrich, igual o similar a CAT N° T9449, preparada en alícuotas al 20%. (Ver Anexo 2)
- Etanol al 70 % grado comercial.
- Jabón neutro para lavado de cristalería, marca Alconox o similar.
- Kit HotStarTaq Plus Master Mix, marca Qiagen, igual a CAT N° 203645.
- Marcador de alineación 15bp/3kb, marca Qiagen, igual a CAT N° 929522.
- Marcador de peso molecular 50bp-1.5 kb, marca Qiagen, igual a CAT N° 929554.
- Solución DNA Away, marca Molecular BioProducts, Cat. N° 7010, o similar.

6. Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura ambiental del laboratorio	18 °C ± 2 °C	24 °C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.
2	Temperatura de refrigeración	2°C ± 2 °C	8°C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 7 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

				promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.	
3	Temperatura de congelación	de	-15°C ± 2 °C	-25°C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.

7. Procedimiento:

7.1 Preparación del mix o coctel de PCR.

7.1.1 Complete el Formulario P-DCF-ECT-BIO-043-R1: Ficha de PCR, para lo cual debe completar la siguiente información: tipo de muestras (ejemplo: sangre de mamíferos, hojas de plantas o patas de insectos), fecha, marcador, *primers*, números de muestras o tubos, volumen final de PCR, volumen de ADN o de extracto, concentraciones de reactivos, cantidades para el coctel o mix de PCR, programa de la PCR en el termociclador, espacio para colocar las muestras o extractos y espacio libre para comentarios y/o observaciones.

Nota 1: Las muestras o extractos deben mantener la rotulación que traían de la fase anterior de extracción

7.1.2 Prepare la zona donde va a trabajar colocando siempre un pliego de papel blanco sobre la mesa de trabajo.

7.1.3 Tome los extractos de ADN y colóquelos en una gradilla en la zona antes preparada para trabajar.

Nota 2: Si los extractos de ADN están congelados, debe permitir que se atemperen antes de iniciar con el procedimiento. Cuando los mismos lleguen a temperatura ambiente, se deben vortexear y centrifugar rápidamente.

Nota 3: El vortexeo rápido implica realizar una agitación en el vórtex a una velocidad alta por un tiempo de 5-10 segundos. El centrifugado rápido o golpe de centrifuga se puede hacer tanto en la mini centrifuga cuando se utilizan tubos de PCR individuales o tiras de 8 tubos de PCR, como en la centrifuga convencional cuando se utilizan placas de PCR completas o divisibles. En la mini centrifuga el centrifugado rápido es por un período de 5-10 segundos, mientras que en la centrifuga convencional es a una velocidad de 1000 rpm por unos 2 minutos

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 8 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

- 7.1.4** Encienda la capilla de flujo laminar, presionando en el botón de inicio/apagado (ver figura 1).
- 7.1.5** Abra la ventana de la capilla y verifique que todo lo necesite esté dentro de la misma (gradilla, pipetas, puntas, tubos para microcentrífuga, recipientes de material plástico rígido para "punzo cortantes", rotulador indeleble)
- 7.1.6** Encienda la luz UV presionando el botón con la figura de un bombillo ubicado en la parte de abajo del panel, dejándolo los 30 minutos que marca la cámara (ver figura 1).
- 7.1.7** Luego de los 30 minutos de la luz UV, encienda el ventilador, presionando el botón con la figura de un ventilador, para que recircule el aire a una velocidad F8, la cual puede escoger con las flechas del panel (ver figura 1).
- Nota 4:** Recuerde que los materiales de la capilla no se pueden sacar de la misma, son exclusivos para trabajar dentro de la misma.
- 7.1.8** Encienda la luz normal presionando el botón con la figura de un bombillo ubicado en la fila de arriba del panel (ver figura 1)



Figura 1. Panel de control de la capilla de flujo laminar

- 7.1.9** Tome los reactivos que se requieren para hacer el mix o el coctel de PCR que se encuentran en congelación, los mismos son: alícuotas de agua libre de nucleasas, alícuotas de primers (ver anexo 1), el mix HotStarTaq Plus Master, BSA o trehalosa (ver anexo 2). Estos últimos según las muestras que se están trabajando.

Nota 5: Los reactivos por estar congelados, debe permitir que se atemperen y cuando los mismos lleguen a temperatura ambiente, se deben vortexear y centrifugar rápidamente.

- 7.1.10** Introduzca en la gradilla que está dentro de la capilla de flujo laminar, los reactivos mencionados en el punto anterior.

Nota 6: En el caso de la HotStar, es importante que una vez fuera del congelador y si no se va a utilizar en el momento, se mantenga el mayor tiempo posible en el bloque frío de tubos para

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 9 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

microcentrífuga. Este bloque de frío NO se coloca dentro en la capilla de flujo, se mantiene en la mesa de trabajo y hasta el momento en el que la va a utilizar, se introduce el tubo de la taq dentro de la capilla.

7.1.11 Tome un tubo para microcentrífuga de 1,5 ul o 2 ul, según el volumen final que va a preparar, colóquelo en la gradilla y agregue la cantidad de cada uno de los reactivos tal cual lo indica la ficha PCR para preparar el mix o coctel de PCR

Nota 7: El orden en que agregue los reactivos es importante. Debe agregar primero el agua libre de nucleasas, luego la HotStar Taq, luego los *primers* y de último, en caso de que lo requiera, la muestra BSA o trehalosa.

7.1.12 Saque el tubo de la capilla, proceda a vortexear y centrifugar intensamente

7.1.13 Retire todos los reactivos de la capilla y proceda a guardarlos ya sea en congelación o refrigeración, según el requerimiento de cada uno.

7.1.14 Encienda de nuevo la luz UV presionando el botón con la figura de un bombillo ubicado en la parte de abajo del panel (ver figura 1), dejándolo los 30 minutos.

7.1.15 Encienda el ventilador, presionando el botón con la figura de un ventilador, para que recircule el aire a una velocidad de F8, escogida en las flechas del panel por un periodo de unos 15 minutos

7.1.16 Apague la capilla de flujo laminar, presionando en el botón de inicio/apagado (ver figura 1)

7.2 Preparación de la placa o tubos PCR

7.2.1 Tome una placa de PCR o filas de tubos de PCR, esto según la cantidad de muestras que va a montar.

7.2.2 Tome una gradilla de placa de PCR y coloque la placa o la fila de tubos sobre la gradilla para que pueda trabajar y evite movimientos que provoquen derrames. También puede usar, en lugar de la gradilla de placa de PCR, los soportes especiales que vienen con el termociclador.

7.2.3 Introduzca en cada uno de los pozos de la placa o en cada tubo de PCR con la pipeta correspondiente (esto según el volumen que va a agregar), el volumen del coctel o mix de PCR recién preparado. Recuerde que el volumen que debe agregar por muestra tal como lo indica la ficha de PCR.

7.2.4 Coloque con la pipeta correspondiente, esto según el volumen que va a agregar, en cada uno de los pozos de la placa o en cada tubo de PCR, la cantidad de ADN o del extracto que desea amplificar. Recuerde que el volumen que debe agregar de ADN por pozo o tubo lo indica la ficha de PCR.

Nota 8: Una vez que coloque la cantidad de ADN dentro del pozo o tubo debe pipetear varias veces dentro del pozo o tubo para asegurar la mezcla.

Nota 9: Recuerde que dentro de las muestras que va a montar siempre debe haber un control positivo y un control negativo, tal como lo indica la ficha PCR (ver anexo 3).

7.2.5 Tape la placa o la tira de tubos con la etiqueta adhesiva o con la fila de tapas respectivamente.

Nota 10: Independientemente lo que use, ya sea la etiqueta adhesiva para las placas o la tira de tapas para las tiras de tubos de PCR, debe asegurarse que se encuentre bien cerradas. En el caso las cintas adhesivas, una vez que la coloca debe usar una herramienta especial para sellar las cintas P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 10 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

adhesivas a las placas de PCR. Esta herramienta debe pasarla en varias direcciones por toda la placa ejerciendo cierta presión sobre la etiqueta para asegurar el cierre. En caso de las tapas de tiras de tubos PCR, debe ejercer presión de manera que cada tapa calce de manera correcta en cada uno de los tubos PCR. Al ejercer la presión se escucha un sonido tipo "click", el cual indica que la misma está bien cerrada.

7.2.6 Vortexee rápidamente la placa de PCR cerrada o la tira de tubos de PCR cerrada.

7.2.7 Centrifugue rápidamente la placa de PCR o la tira de tubos de PCR.

Nota 11: Para centrifugar la placa de PCR debe usar una centrífuga regular con adaptador para placas, a una velocidad de 1000 rpm por un lapso de tiempo de 1 minuto. Para centrifugar la fila de tubos de PCR se debe utilizar la mini centrífuga con el adaptador de filas de tubos de PCR por unos 10 segundos, aproximadamente.

7.2.8 Asegúrese de que no se observen burbujas dentro del tubo, de lo contrario debe tratar de reventarlas dando golpes en seco a las paredes de los pocillos o de los tubos con los dedos y repetir los pasos 7.2.6 y 7.2.7, las veces que sean necesario hasta que desaparezcan las burbujas.

7.3 Procedimiento de análisis en el Termociclador

7.3.1 Encienda el Termociclador, tal como lo indica el manual de uso del mismo.

7.3.2 Escoja el programa de PCR, tal como lo indica la ficha PCR.

Nota 12: Los programas de PCR dentro del termociclador se puede crear, modificar y guardar en el mismo equipo, esto siguiendo las instrucciones del manual de uso.

7.3.3 Abra la tapa del equipo, levantándola hacia arriba, e introduzca la placa de PCR o la tira de tubos de PCR, recién preparadas en la placa de montaje (ver figura 2)

Nota 13: En caso de trabajar con tiras de tubos de PCR, las mismas se deben de poner de manera equilibrada, tratando primero que se cubran los costados de la placa de montaje evitando que queden todas juntas en un mismo extremo del equipo

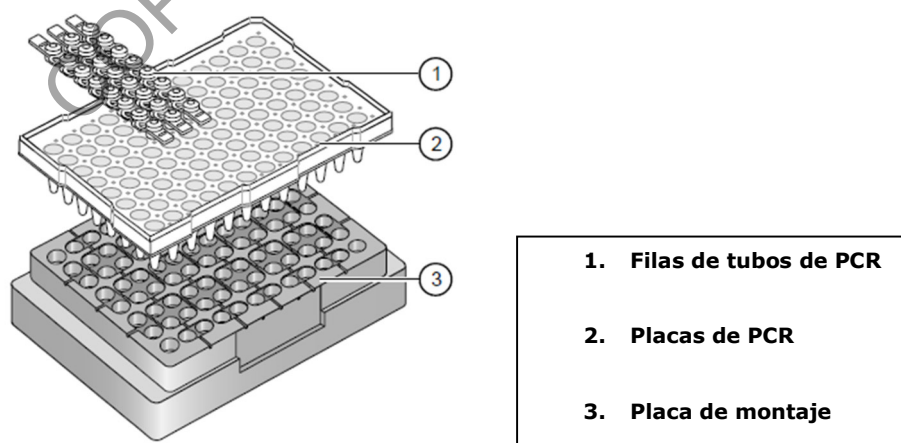


Figura 2. Colocación en la placa de montaje dentro del Termociclador

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 11 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

7.3.4 Retire las muestras del termociclador, cuando el programa de PCR finalice.

Nota 14: Una vez que el programa de PCR termine, dependiendo del programa utilizado el equipo mantendrá las muestras a una temperatura de 4 grados por tiempo indefinido.

7.3.5 Cierre la tapa del equipo como lo indica el manual de uso del mismo.

Nota 15: Los productos PCR, en caso de no chequearse ese mismo día, se pueden guardar en congelación.

7.4 Chequeo de productos PCR en el QIAxcel

7.4.1 Preparación del marcador de alineamiento

7.4.1.1 Agregue 15 uL de QX Alignment Marker a una tira de 12 tubos de 0.2 mL.

7.4.1.2 Agregue 25 uL de aceite mineral a cada tubo que contiene marcador de alineamiento.

Nota 16: El marcador de alineamiento preparado puede ser almacenado de 2-8°C para ser reutilizado en diferentes corridas, por un tiempo de 20 días

7.4.2 Preparación del marcador de peso molecular

7.4.2.1 Cargue 10 uL de Buffer de Dilución en uno de los pocillos de la tira de 12 tubos.

7.4.2.2 Agregue 2 uL del marcador de peso molecular. Evite las burbujas.

Nota 17: El marcador de peso molecular preparado puede ser almacenado de 2-8°C para ser reutilizado en diferentes corridas, por un tiempo de 20 días

Nota 18: El volumen mínimo de análisis requerido para el análisis es de 10 uL. Asegúrese que todos los pocillos de la tira de 12 tubos contengan, al menos, 10 uL.

7.4.3 Preparación de muestras dentro del QIAxcel

7.4.3.1 Agregue 10 µl de Buffer de Dilución en los tubos de la tira de 12 o en los pocillos en caso de usar placas de PCR.




7.4.3.2 Cargue 2 µl de los productos PCR en los pocillos o tubos que contienen buffer de dilución.

7.4.3.3 Retire el cartucho de QIAxcel de refrigeración (2-8°C), manténgalo dentro del soporte de cartuchos y espere 30 minutos para que llegue a temperatura ambiente.

7.4.3.4 Encienda el equipo presionando el botón ubicado en la parte trasera del mismo.

7.4.3.5 Encienda la computadora que acompaña el equipo.

7.4.3.6 Abra el software QIAxcel ScreenGel. El Usuario es ADN y la contraseña es Adn12345.

Nota 19: El ícono  indica que la conexión se está estableciendo. El ícono  indica que el QIAxcel está conectado a la computadora. En caso de que el instrumento no logre hacer la comunicación, se mostrará un mensaje de notificación indicando "Instrument is not available" (el instrumento no está disponible). Cierre el mensaje e intente establecer la conexión seleccionando el ícono .

7.4.3.7 Retire el sello de la salida de purga que se encuentra en la parte trasera del cartucho. Conserve este sello, el cual se utiliza para almacenar el cartucho.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 12 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

Nota 20: Use una toalla desechable para limpiar cualquier residuo de gel que haya quedado en la salida de purga.

7.4.3.8 Retire el QIAxcel DNA Gel Cartridge del soporte.

7.4.3.9 Abra la puerta del equipo en donde se inserta el cartucho e inserte el QIAxcel DNA Gel Cartridge dentro del instrumento (ver figura 3)

Nota 21: La etiqueta del cartucho debe de colocarse hacia el frente y la salida de purga hacia atrás del instrumento.



Figura 3. Instalación del cartucho dentro del equipo

7.4.3.10 Inserte la llave de lectura en el puerto de llaves. Esta llave puede ser insertada en cualquier dirección (ver figura 4)




Figura 4. Inserción de la llave inteligente

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 13 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

7.4.3.11 Cierre la puerta de cartuchos.

Nota 22: La identificación del cartucho, número de corridas y tipo de cartucho se mostrarán automáticamente en el software, después de que la llave es insertada. El sistema no va a reconocer el cartucho y el equipo no va a operar si la llave no ha sido insertada.

7.4.3.12 Seleccione el icono  para que el soporte de tubos y la bandeja de buffers esté accesible.

7.4.3.13 Abra la puerta transparente del equipo y coloque la tira con el marcador de alineamiento preparado (ver el punto 7.4.1 del presente procedimiento) en la posición MARKER 1 de la bandeja de buffers

7.4.3.14 Coloque las tiras de tubos con las muestras antes preparadas en el soporte de tubos del equipo (ver figura 5, posición b), iniciando desde la fila A.

Nota 23: La puerta del cartucho y la puerta del equipo deben de permanecer cerradas mientras que el equipo está operando. Abrir alguna de las puertas va a causar que el Sistema se detenga



Figura 5. Soporte de tubos del QIAxcel

7.4.4 Programación de la corrida.

7.4.4.1 Seleccione la opción de la lista "process profile", que se ajuste a los parámetros señalados en la nota 23

Nota 24: EL equipo se puede trabajar de tres maneras, esto dependiendo de la concentración de ADN de los extractos. Los modos de trabajo disponibles en el equipo son: AM320/Mediana Concentración (de 10 a 100 ng/uL), AL320/Baja Concentración (menor a 10 ng/uL) o AH320/ Alta Concentración (mayor a 100 ng/uL).

Nota 25: En los extractos que se obtienen del Kit Direct de Thermo que no se pueden cuantificar se debe montar con el AM320 primero y si no se obtienen buenos resultados puede montarlo en los otros dos métodos

7.4.4.2 En la pestaña de "Run Parameters", seleccione el número de filas que van a ser utilizadas. Seleccione la posición en la que colocó el marcador de peso molecular haciendo "click" derecho sobre la posición en que se encuentra el mismo.

7.4.4.3 Ingrese la información de las muestras respetando la rotulación indicada en el PON de extracción.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 14 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

7.4.4.4 Verifique las casillas en la pestaña de "Run Check".

7.4.4.5 Seleccione RUN.

7.4.4.6 Lea el resultado de cada uno de los productos PCR.

Nota 26: Un resultado positivo en el gel se determina cuando se logra observar una banda en el tamaño del marcador utilizado, el cual también se puede ver en un electroferograma donde se visualiza mejor el tamaño de la banda que logró amplificar (ver figura 6 y 7)

Nota 27: Un resultado negativo en el gel se determina cuando no se observa ninguna banda o cuando la misma está fuera del tamaño del marcador utilizado, el cual también se aprecia en el electroferograma, donde no se observa ningún pico de la muestra, solo los picos del marcador de alienación (ver figura 6 y 7)

Nota 28: Puede ver los resultados de dos maneras, directamente en el equipo o ver el reporte que el equipo genera de manera automática cuando finaliza el análisis.

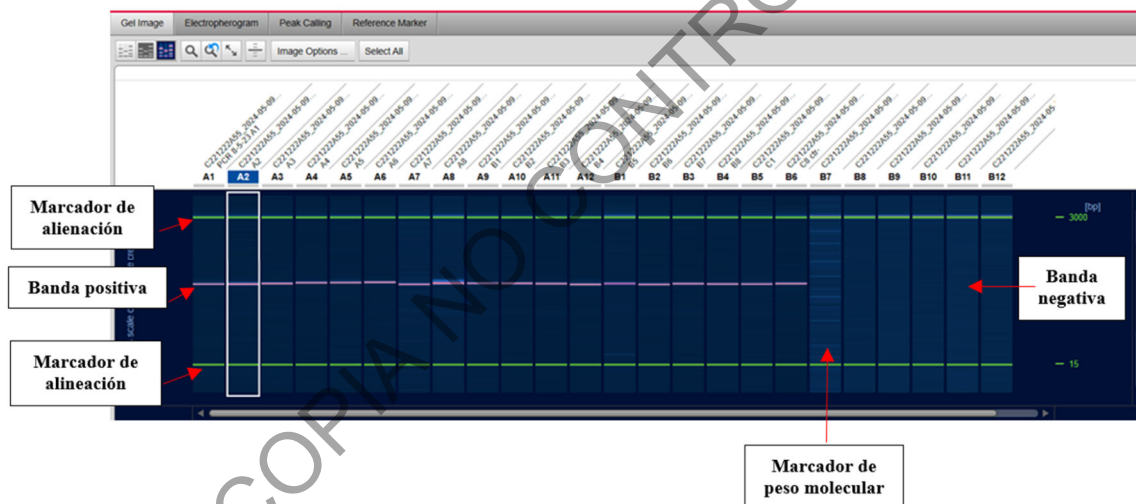


Figura 6. Bandas positivas y negativas en el QIAxcel

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 15 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

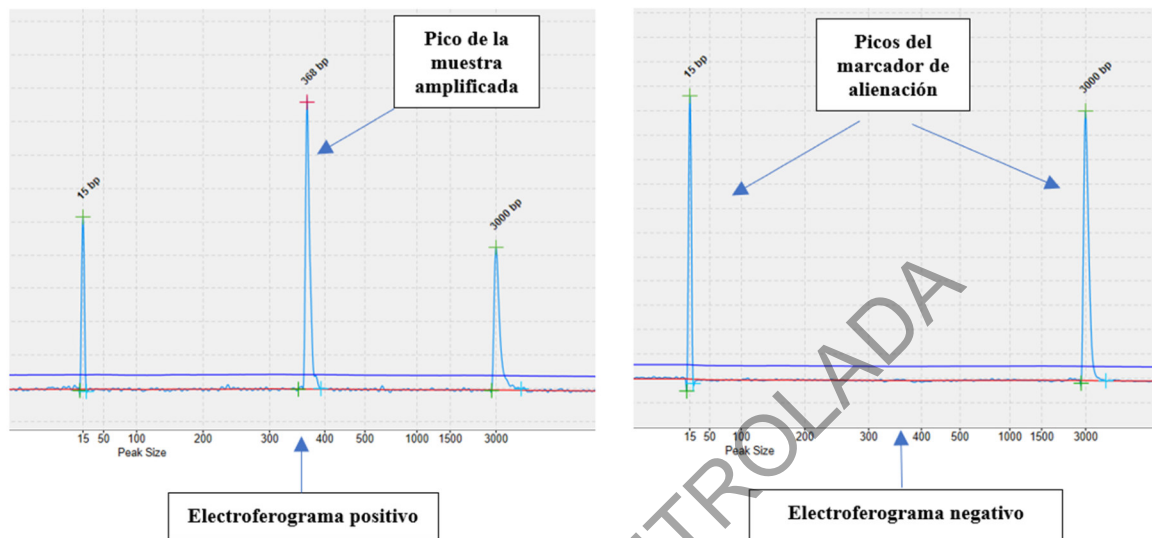




Figura 7. Electroferograma positivo y negativo

7.4.5 Apagado del equipo

7.4.5.1 Seleccione el icono  para traer hacia el frente del equipo el soporte de tubos y la bandeja de buffers.

7.4.5.2 Abra la puerta del equipo y retire las muestras y la tira con el marcador de alineamiento.

Nota 29: La tira de tubos PRC, con el marcador de alineamiento la puede tapar y guardar en refrigeración por un periodo de 20 días máximo. La misma se guarda dentro de una caja de plástico para guardar productos PCR y la misma se rotula colocando "marcador de alineación" y la fecha en que lo creó.

7.4.5.3 Seleccione el ícono del candado  para que se libere el cartucho.

7.4.5.4 Abra la tapa donde está el cartucho, retire la llave y luego el cartucho.

Nota 30: Debe colocarle de nuevo el sello en la salida de purga y guardar el cartucho ya sea dentro del soporte del cartucho o dentro del gel del empaque original donde venía el cartucho. En ambos casos se debe guardar en refrigeración.

7.4.5.5 Apague el equipo, presionando el botón ubicado en la parte trasera del mismo.

7.4.5.6 Cierre el software y luego apague la computadora en el botón de inicio/apagado.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 16 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

8. Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
01	Control positivo	No obtener banda	Repetir todo el proceso de PCR.
02	Control negativo	Obtener banda en el tamaño esperado según marcador	Se continúa a la secuenciación de las muestras que dieron positivas para analizar posible fuente de contaminación. En caso de detectar la fuente de contaminación se repite todo el proceso de PCR.

9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10. Reporte de Análisis y Resultados:

Los resultados obtenidos deben reportarse en "Formulario de Análisis de ADN no humano", según el número de OT respectivo.

Los resultados pueden ser los siguientes:

Positivo: Cuando se logra obtener una banda en el tamaño del marcador utilizado, el cual también se puede ver en un electroferograma donde se visualiza mejor el tamaño de la banda que logro amplificar.

Negativo: Cuando no se observa banda o cuando la misma está fuera del tamaño del marcador utilizado.

Cuando todas las muestras dan negativo en el QIAxel se puede concluir en el dictamen lo siguiente: "No se puede identificar taxonómicamente la muestra XXXXXXXX, esto debido a que no se logró la amplificación de su posible ADN"

Como parte de los resultados debe incorporar al legajo del caso como un "Reporte generado por software", el documento que genera de manera automática el QIAxel después de cada corrida, el cual se va a llamar "QIAxel, dd-mm-aa"

11. Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Recuerde colocarse antes de ingresar al laboratorio de ADN no humano, gabacha, mascarilla, cubre cabezas y guantes, para prevenir fuentes de contaminación en el proceso.
- En la mesa de trabajo, debe colocarse un pliego de papel blanco, estos papeles se descartan cuando se finaliza el trabajo o cuando por alguna razón el mismo se contaminó con alguna muestra o reactivo. Además, esta mesa de trabajo cuando se retira el papel blanco se debe limpiar primero con DNA Away y luego con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 17 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

- Siempre antes de iniciar a trabajar y después de trabajar, limpie la parte externa de las micropipetas con descontaminante de ADN y ARNnasa DNA Away Cat 7010 o similar y/o con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- El montaje de PCR se debe hacer en la capilla de flujo laminar previamente irradiada con luz ultravioleta durante 30 minutos.
- Revise que los reactivos cumplan las normas mínimas de calidad (botellas bien cerradas, almacenados de manera correcta según corresponda, rotulados de manera correcta).
- Mantenga los reactivos para PCR bien cerrados mientras se está preparando el montaje.
- Recuerde que todo el material que se usa en este proceso (puntas, tubos eppendorf, tubos de PCR, tiras y tapas de tubos de PCR) debe estar autoclavado.
- Evite tocar el plato calentador del termociclador mientras está funcionando ya que la temperatura de este es alta.
- El material usado como puntas o restos de muestras y los guantes deben ser desechados en los basureros correspondientes para material bioinfeccioso, rotulados para tal fin.
- En caso de una contaminación de la piel con alguna de las muestras analizadas, lave la zona afectada con abundante agua y jabón, luego aplique alcohol al 70%.
- Al terminar de trabajar en su área de trabajo, recuerde dejar todo ordenado y limpio para que otro analista pueda ingresar a trabajar sin problema. Bajo ningún motivo deje muestras o material de laboratorio expuesto, todo debe quedar guardado en las gavetas de los muebles del laboratorio o gavetas de los refrigerados o congeladores correspondientes.

12. Simbología:

° C: Grados Celsius, unidad de medida de temperatura

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BSA: Bovine Serum Albumin

CAT N°: Número de catálogo

mL: Mililitros

OT: Orden de trabajo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PON: Procedimiento operativo normado

Rpm: Revoluciones por minuto

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses

µl: Microlitros

µM: Micrómetro

UV: Ultravioleta

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 18 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		P-DCF-ECT-BIO-043

13. Terminología:

Autoclavado: Proceso de limpieza y eliminación de todas las bacterias de los instrumentos médicos y otros equipos en una autoclave.

Control negativo: Es aquel producto pcr que solo lleva el coctel o mix de PCR, sin extracto de ADN

Control positivo: Es aquel producto pcr que además del coctel o mix de PCR lleva el extracto de ADN de una muestra conocida ósea que está identificada a nivel de especie de manera previa

Desechos punzo cortantes: El desecho punzocortante es todo objeto metálico, plástico y de cristal, con capacidad de penetrar y/o cortar tejidos humanos, facilitando el desarrollo de infección.

Electroforesis capilar: La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño.

PCR: La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de la biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Pipetear: Tomar con la pipeta cierta cantidad de líquido.

Primers: Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Producto PCR: Es el producto que se genera luego del proceso de amplificación de ADN

Secuenciación de ADN: La secuenciación del ADN es un método de laboratorio utilizado para determinar el orden de las bases dentro del ADN. Consisten en general en romper las largas cadenas de ADN en muchas piezas pequeñas y utilizar luego uno de los diversos tipos de pruebas analíticas, para determinar el orden de las bases de nucleótidos que componen esas piezas.

14. Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de Alicuotas de <i>primers</i>
02	Preparación de Trehalosa al 20 %
03	Control positivo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 19 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

Anexo 1. Preparación de alícuotas de *primers*.

Según el protocolo que el proveedor le proporciona junto con los *primers*, prosiga a:

- Agregar la cantidad de agua libre de nucleasas que le indique el proveedor dentro del tubo del *primers* liofilizado, esto para preparar la solución stock del primer a una concentración de 100 uM.
- El tubo con el stock debe rotularse con el nombre del primer, la fecha cuando se preparó y las iniciales de quién lo preparó.
- Para preparar una alícuota de 10 uM, agregue una cantidad del primer stock antes preparado y 90ul de agua libre de nucleasas en un nuevo tubo para microcentrifuga de 1,5 mL
- El tubo con la alícuota de los *primers* debe rotularse con la siguiente información: Nombre de los *primers*, fecha en que se preparó e iniciales de quien lo preparó.
- La solución stock y las alícuotas de los *primers* deben guardarse luego de preparadas en congelación.

NOTA: Los stocks y las alícuotas si se almacenan adecuadamente, no presentan fecha de vencimiento, siempre y cuando pasen los controles positivos y negativos en la PCR

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 20 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

Anexo 2. Preparación de Trehalosa al 20%.

- Disuelva 10 g de D-(+)-trehalosa deshidratada (Sigma, T9449), en 50 ml de volumen total de H₂O de grado molecular.
- Divida la solución en alícuotas, usando tubos para microcentrífuga de 2 mL.
- Rotule cada una de las alícuotas con el nombre del reactivo, la fecha en que se realizó el reactivo y las iniciales de la persona que lo preparó
- Almacene a -20°C.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 21 de 21
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE ADN NO HUMANO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BIO-043	

Anexo 3. Control positivo de PCR

- Como control positivo use algún extracto usado en la fase de validación el cual se sabe con certeza el origen del mismo, esto según las muestras con las que esté trabajando
- Estos extractos están en el congelador en una caja de tubos epperforf, rotulados como "validación de vertebrados", "validación de plantas" o "validación de insectos" y con la fecha en que se realizó la extracción

COPIA NO CONTROLADA