



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

**PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE
ADN**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-BIO-42

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, Sección de Biología Forense	Aprobado por: Lic. John Vargas Fonseca Jefatura, 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 EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

1. Objetivo:

Este procedimiento describe dos métodos de extracción de ADN a partir de muestras de distintos organismos. Un método es manual, en el cual hay que seguir los pasos recomendados por varios kits comerciales según la muestra que se desee trabajar. El otro es un método que utiliza un equipo robotizado de purificación automatizada llamado *KingFisher APEX System*, el cual trabaja con distintos kits que varían según las muestras de las que se desee extraer el ADN.

2. Alcance:

Este procedimiento se puede utilizar con muestras de distintos organismos tales como sangre, tejidos, pelos, plumas, hojas, semillas, entre otros, con el fin de extraer su ADN, el cual luego será amplificado utilizando la técnica de Barcoding.

Los usuarios de este PON deben tener conocimientos básicos en el uso del equipo robotizado de purificación automatizada llamado KingFisher APEX System del APEX, además el uso de pipetas monocanal o multicanal, tanto mecánicas como electrónicas, uso correcto de la centrífuga y los bloques térmicos, así como tener experiencia en la técnica del pipeteo. El uso del equipo robotizado de purificación automatizada llamado KingFisher APEX System del APEX se adquiere mediante la capacitación recibida por parte del proveedor del equipo o de un funcionario que ya haya recibido esta capacitación, tenga certificación de la misma y la replique a sus compañeros

Este procedimiento está basado en la validación respectiva y sus resultados publicados en el informe de validación cuya identificación es 001-BIO-VAL-2023 y 002-BIO-VAL-2024

3. Referencias:

- Abdel A and Osman G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13:1DOI 10.1186/s13007-016-0152-4
- Applied Biosystems. 2024. MagMax Core Nucleic Acid Purification Kit. Guía de usuario. Número de catálogo A32700, A32702
- Applied Biosystems. 2024. MagMax Core Nucleic Acid Purification Kit. Validation of the use of prefilled wash and elution plates with the MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit. Número de catálogo A32700, A32702
- Dittrich G, Wingfield M, Klein H and Slippers B. 2012. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources* 12, 109–115 doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03074.
- Gutiérrez R, Martínez-de la Puente J, Gangoso L, Soriguer R, Figuerola J. 2015. Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology*. Volume40, Issue1: pages 11-15
- Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. 2012. Procedimiento de extracción de ADN/ARN mediante el sistema Quiamp DNA Mini Kit. Código PMT-B-T125.
- Karaaslan C, Akel H, Ünlü S and Perçin I. 2014. Comparison of Six Commercial DNA Extraction Kits for DNA Extraction from Wheat. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 42 (3),395-400

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 3 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

- Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Linacre A, Lapwong Y, Chotigeat W. 2013. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample análisis. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 e71–e72
- Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. 2014. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. Forensic Sci Med Pathol 10:29–38. DOI 10.1007/s12024-013-9521-8
- Pereira F, Carneiro J, and Asch B. 2010. A Guide for Mitochondrial DNA Analysis in Non-Human Forensic Investigations. The Open Forensic Science Journal, 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.
- Quiagen. 2020. Quick Start Protocol. DNeasy® Blood & Tissue. Código 69506.
- Quiagen. 2020. Quick Start Protocol. DNeasy® Plant Mini Kit. Código 69106.
- Schiebelhut L, Abboud S, Gómez L, Swift H, Dawson M. 2016. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. Molecular Ecology Resources 17, 721–729 doi: 10.1111/1755-0998.12620
- Thermo Scientific. 2024. Generalidades KingFisher Apex.
- Thermo Scientific. 2024. KingFisher Apex Purification System User Guide.
- Thermo Scientific. 2024. Manual de Phire Tissue Direct PCR Master Mix. Código F170S.
- Thermo Scientific. 2016. NanoDrop One Espectrofotómetros micro-UV/Vis. Guía del usuario.
- Wang L, Maddox C, Prarat M, Zhang Y, Yan L, Ramachandran A, Narayanan SS, Patil G 2022. Extraction of bacterial DNA using MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit on KingFisher™ Flex Instrument. Protocols. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgb781ovpk/v2Version> created by Sarah Nemser

4. Equipos y Materiales:

- Balanza analítica marca Mettler Toledo XP Excellence Plus, modelo XP204, con un rango de pesada de 0.1 mg hasta 200.0000 g e incertidumbre de $\pm 0.0005g$, o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Bloque térmico marca Eppendorf modelo C o similar, con los siguientes parámetros de operación: rango de temperatura de 1 a 100 °C con incertidumbre de $\pm 0,5^{\circ}C$ en temperaturas entre 20 y 45 °C y $\pm 1,0^{\circ}C$ en temperaturas fuera del rango anteriormente indicado y frecuencia de mezcla entre 300 y 3000 rpm.
- 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 tubos de para microcentrífuga de 1,5 mL y 2 mL.
- 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.
- Cubre bocas

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 4 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

- Cubre cabezas.
- Equipo de medición de temperatura y humedad, marca Amprobe, modelo TR300, o similar.
- Equipo para macerar muestras, marca Qiagen, modelo Tissuelyser II, o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Espectrofotómetro de micro volumen marca Thermo Scientific, modelo NanoDrop One o similar, y su correspondiente libro de control de uso.
- Estereoscopio marca Zeiss, modelo Stemi 2000 –C o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Formulario de Análisis de ADN no humano
- Formulario P-DCF-GCT-JEF-008-R16: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo.
- Gabacha desechable limpia o de tela que se encuentre limpia.
- Gradillas para tubos de microcentrifuga, limpias.*
- Guante criogénico.
- Guantes desechables de nitrilo o similar.
- Horno para secar muestras, similar o igual a marca Fisher Scientific, Modelo Isotemp
- Jeringas para la pipeta electrónica de dispensador múltiple igual o similar a marca Eppendorf, modelo Combitips Advanced. Presentación en volúmenes de 0.5 mL, 0.1 mL y 5 mL.
- Lapicero.
- Lápiz de grafito.
- 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.*
- Micropipeta electrónica Eppendorf Xplorer, o similar, con volumen graduable de 50 a 1000,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- 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.*
- Micropistilos, limpios y autoclavados.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 5 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

- Minicentrífuga marca Fisherbrand, modelo Sprout Plus o similar, con adaptadores para filas de tubos PCR.
- Papel blanco.
- Pinzas limpias y autoclavadas.
- Pipeta electrónica de dispensador múltiple, marca Eppendorf, Modelo Multipette E3x, con volumen variable de 1 uL a 50 mL, verificada y limpia.
- Placas petri plásticas de diversos tamaños**
- Puntas para micropipetas para dispensar de 0,5 a10 uL, limpias y/o autoclavadas.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 100-1000 uL, limpias y/o autoclavadas.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 20-200 uL, limpias y/o autoclavadas.
- 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 bio-peligrosidad.
- Sistema Automatizado de Purificación de ADN, ARN, proteínas y células, marca Thermo Fisher Scientific, modelo KingFisher Apex System y su correspondiente libro de control de uso. Tapas adhesivas para placas PCR.
- Tijeras autoclavadas.
- Toallas desechables tipo "Kimwipes".
- Tubos cónicos de 15 ml, nuevos y limpios
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, nuevos y autoclavados.
- Tubos para microcentrífuga de 2 mL, nuevos y autoclavados.
- Vórtex marca Benchmark, modelo Benchmixer o similar.

*Para su limpieza, limpie con DNA away, posteriormente con alcohol al 70% para eliminar el exceso, utilizando kimwipes. En el caso de las micropipetas limpie la parte externa de las mismas.

** El tamaño escogido dependerá del tamaño de la muestra que se esté trabajando.

5. Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua desionizada.
- Dneasy Blood & Tissue Kit, marca Qiagen, Cat.Nº. 69504.
- Dneasy Plant Mini Kit, marca Qiagen, Cat.Nº. 69106.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70% grado comercial.
- MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit, marca Applied Biosystems, Cat. Nº A32700 y/o A32702.
- Nitrógeno líquido.
- PBS pH 7.4 similar o igual a marca Gibco, Cat. Nº 10010023.
- Phire Tissue Direct PCR Master Mix, marca Thermo Sientific, Cat. Nº F170S y/o F170L.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 6 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

- 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 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 la refrigeradora	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 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 del congelador	-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 de la muestra

7.1.1 Utilice gabacha, cubre cabezas, cubre bocas y guantes.

7.1.2 Limpie la zona donde va a trabajar, primero con DNA Away y luego con alcohol al 70 %

7.1.3 Coloque en la zona donde va a trabajar, un pliego de papel blanco.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 7 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Nota 1: La zona de trabajo en la cual se hace esta preparación de las muestras, debe ser una zona ubicada fuera de laboratorio de ADN.

7.1.4 Tome un fragmento de la muestra e introdúzcala dentro de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.

7.1.5 Rotule el tubo con el número de DCF seguida de una letra que hace referencia al indicio y por último un número consecutivo de muestra. Ejemplo: 24-0002-BIO/AM01

7.1.6 Pese el tubo con la de muestra cortado en la balanza analítica, en caso de ser requerido por el kit.

Nota 2: Dependiendo de la muestra que va a trabajar, utilice herramientas como pinzas y tijeras autoclavadas y un estereoscopio, para tomar el fragmento de la muestra.

Nota 3: El tamaño o peso que se requiere de cada tipo muestra lo indica cada kit de extracción sea manual o automatizado (Anexos 1,2,3 y 4).

Nota 4: En el caso de plantas, es importante lavar con agua desionizada las muestras ya sea de hojas, semillas o frutos para eliminar posibles impurezas, antes de tomar el fragmento de la muestra.

Nota 5: Si la muestra es de una composición muy dura o rígida, como por ejemplo semillas de plantas, puede utilizar nitrógeno líquido o el equipo macerador de muestras, tal como lo indica el manual de uso. En caso de que las muestras o indicios no permitan ser procesadas con el macerador o con nitrógeno líquido, ya sea por su tamaño o composición (ejemplo piedras o prendas de vestir), puede cortar un fragmento o realizar un levantamiento con aplicador húmedo o seco (dependiendo el estado de la muestra) de la superficie del indicio.

Nota 6: En casos de aplicadores impregnados de sangre o fluidos biológicos, se debe de tomar dos cortes pequeños de cada cara del aplicador para formar la muestra

Nota 7: Si la muestra se encuentra conservada en alcohol, la misma se debe dejar secando en el horno a 36 °C hasta que el alcohol se evapore en su totalidad.

7.2 Extracción Manual

Nota 8: Para realizar los pasos de la extracción ya puede ser dentro del laboratorio de ADN, para lo cual debe preparar la mesa de trabajo de la misma manera que se indicó en los puntos 7.1.2 y 7.1.3

Nota 9: La extracción manual se debe realizar cuando por alguna razón no se cuente con el kit para trabajar en el APEX o sean muy pocas muestras.

Nota 10: Existen distintos kits manuales validados y verificados por la sección, con los que se pueden trabajar según la muestra que se tenga. Si se trabaja con sangre o tejidos use el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen y si trabaja con plantas debe usar el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen. En el caso de utilizar el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen, se siguen los pasos que indica el protocolo diseñado por la casa comercial (Anexo 1) con la única excepción que en el punto 8 en lugar de agregar 200 ul de Buffer de elusión, se agregan 100 ul para tejidos como orejas, escamas, piel, aletas y aplicadores, que fueron los volúmenes que se verificaron en la validación.

Nota 11: En caso de plumas, pelos y uñas, este kit ofrece un protocolo aparte para este tipo de muestras, el cual se debe de seguir tal cual fue diseñado por el proveedor (Anexo 2).

7.2.1 En el caso de utilizar el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen, se siguen los pasos que indica el protocolo diseñado por la casa comercial (Anexo 3).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 8 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

7.3 Extracción Automatizado (APEX) con el kit para tejidos MagMAX CORE Nucleic Acid Purification.

Nota 12: Utilice las muestras, que están en los tubos para microcentrífuga de 1,5 mL del punto 7.1.4, en caso de que amerite ser procesados por este tipo de extracción

7.3.1 Inicialmente encienda el equipo en el botón trasero, del lado izquierdo, espere alrededor de un minuto y luego enciéndalo en el botón frontal (Figura 1).

7.3.2 Espere que la pantalla del equipo le solicite, el Usuario: BIO-OIJ y Contraseña: Bio1234.

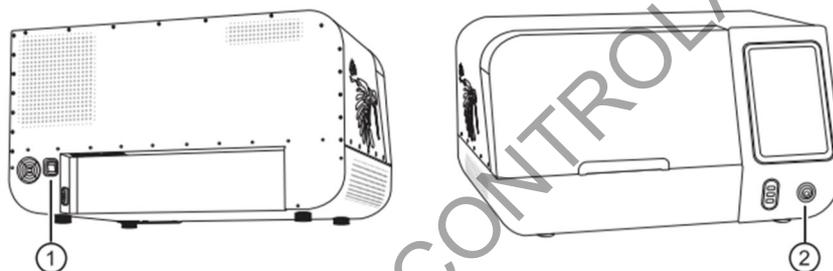


Figura 1. Botones de encendido/apagado. 1. Trasero. 2. Frontal

7.3.3 Seleccione en la pantalla de inicio del instrumento, en la barra de herramientas, la ventana "correr protocolo".

Nota 13: En la pantalla de inicio los usuarios con perfil de administrador pueden acceder a las siguientes funcionalidades: Editor de protocolos, Biblioteca de protocolos, Historial de ejecución, importar/Exportar, Instrumento, Configuración y Perfil de usuario. Todos los usuarios pueden ejecutar protocolos. Los usuarios también pueden crear, abrir y buscar protocolos.

7.3.4 Dentro de la ventana de correr protocolo, se muestran varias opciones, escoja la que indica "abrir protocolo".

7.3.5 Seleccione el protocolo llamado: "Kit MagMAX CORE a media reacción" (Anexo 4)

7.3.6 Abra la ventana transparente del equipo, tirando hacia arriba.

7.3.7 Coloque las placas en el orden que solicita el equipo.

7.3.8 Al terminar el proceso, retire las placas y traslade las muestras de cada pocillo de elusión a un tubo de microcentrífuga con tapa, debidamente rotulado y proceda a tapar cada una de las placas con las tapas adhesivas para PCR.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 9 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Nota 14: Los pocillos de las placas que quedaron sin usar se pueden utilizar en las próximas corridas. Asegúrese de marcar debidamente los espacios utilizados para no incurrir en contaminación de las muestras posteriores al uso de una placa. La marca de los pocillos usados se hace colocando una raya vertical al finalizar cada columna de la placa con un marcador indeleble y en caso de pozos aislados marcarlos dentro de un círculo Encienda la luz UV del equipo y seleccione una hora de tiempo de exposición.

7.3.9 Encienda la luz UV del equipo y seleccione una hora de tiempo de exposición y luego de que transcurra el tiempo de descontaminación, apague el equipo, primero por el botón delantero y luego de alrededor de un minuto por el botón trasero.

7.4 Cuantificación de ADN en el Espectrofotómetro de micro volumen.

Nota 15: En el caso de que se utilice el kit Phire Tissue Direct PCR Master Mix, el mismo no se puede cuantificar debido a la manera directa de realizar la extracción.

7.4.1 Encienda el equipo en el botón ubicado en la parte trasera del mismo y espere que se encienda la pantalla del equipo.

7.4.2 Realice una limpieza con agua desionizada del pedestal, colocando 3 uL de agua y dejando actuar unos 5 minutos. Luego, limpie con toallas desechables tipo "Kimwipes" el pedestal.

Nota 16: Cada vez que se desee tener acceso al pedestal se debe levantar el brazo, y para que realice la limpieza o la lectura se debe bajar el brazo (Ver Figura 2)



Figura 2. Pedestal y Brazo del Espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop One)

7.4.3 Seleccione en la pantalla táctil del equipo, el ícono que corresponde al análisis de ADN, el mismo indica "dsDNA" o en la versión en español ADNbc (Ver Figura 3)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 10 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

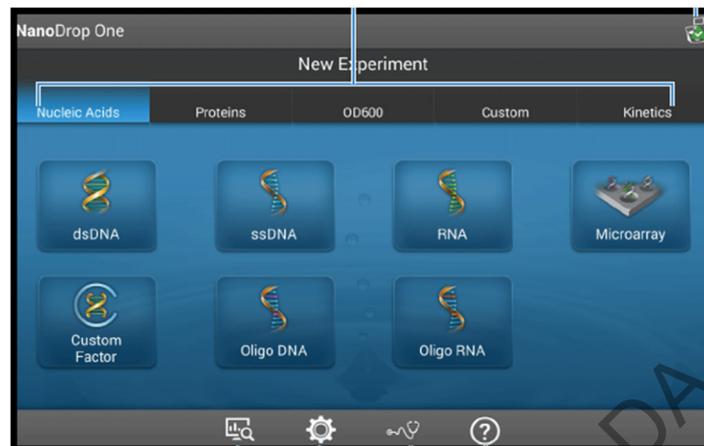


Figura 3. Aplicaciones en pantalla táctil del Espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop One)

- 7.4.4** Inicie con el montaje del blanco, colocando en el pedestal, 2ul del blanco que consiste en el Buffer de Elusión utilizado por cada kit de extracción.
- 7.4.5** Seleccione en la pantalla táctil, el ícono que indica "blanco" y baje el brazo para que inicie la lectura.
- 7.4.6** Limpie el pedestal con un trozo de toalla desechable tipo "Kimwipes".
- 7.4.7** Ingrese un nombre a la muestra, escribiendo en la pantalla táctil el nombre de cada muestra o extracto, el cual debe conformarse por el número de OT acompañado por una letra que corresponde al indicio donde se tomó la muestra, seguida por un número consecutivo de muestra. Ejemplo: 25-0001, A01
- 7.4.8** Vortexee el extracto a cuantificar por unos segundos hasta que se vea bien homogenizado el extracto
- 7.4.9** Coloque 2 ul del extracto de ADN a cuantificar en el pedestal, baje el brazo para que inicie la lectura.

Nota 17: La lectura se debe centrar en la concentración de ácido nucleótido (ng/uL)

Nota 18: Luego de hacer la lectura de la concentración de una muestra, se debe limpiar el pedestal antes de agregar otra muestra, igual como se indica en el punto 7.4.2.

Nota 19: Una vez que coloca la muestra en el pedestal y baja el brazo, el equipo inicia de manera automática la lectura, lo que se debe ingresar de manera manual es el nombre de cada una de las muestras antes de iniciar con la lectura.

Nota 20: Repita los pasos 7.4.6, 7.4.7, 7.4.8 y 7.4.9 para cada una de los extractos que va a cuantificar.

Nota 21: Aproximadamente cada 10 muestras leídas, se debe montar un blanco, tal como lo indica el punto 7.4.4

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 11 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

7.4.10 Cierre la ventana en la cual se encuentra generando las lecturas.

7.4.11 Realice una limpieza del pedestal agregando al mismo 3ul de agua desionizada, tal como lo indica el punto 7.4.2

7.4.12 Apague el equipo en la parte trasera del mismo.

7.4.13 Coloque en el pedestal un trozo de toalla "kimwipes" y deje el brazo del equipo abajo.

8. Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
01	Control positivo	Obtener un resultado de cuantificación en el espectrofotómetro de micro volumen menor o igual al 1 ug/uL.	Repetir el proceso de extracción y de cuantificación
02	Control negativo	Obtener un resultado de cuantificación en el espectrofotómetro de micro volumen mayor a 1 ug/uL.	Repetir el proceso de extracción y de cuantificación

9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10. Reporte de Análisis y Resultados:

Se debe completar el formulario llamado "Formulario de Análisis de ADN no humano", en el mismo debe colocar el resultado obtenido según la cuantificación brindada la por el equipo

Los resultados que se reportan pueden ser los siguientes:

Positivo: Aquellos extractos que, al momento de cuantificarlos, obtienen un resultado igual o mayor al 1 µg/uL.

Negativo: Aquellos extractos que, al momento de cuantificarlos, obtienen un resultado menor al 1 µg/uL.

11. Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Antes de ingresar al laboratorio de ADN no humano, recuerde colocarse 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 desechan 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 limpia con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Siempre antes de iniciar a trabajar y después de trabajar, limpie la parte externa de las micropipetas con descontaminante DNA Away o similar y/o con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Revise que los reactivos cumplan las normas mínimas de calidad (botellas bien cerradas, almacenados de manera correcta según corresponda, rotulados de manera correcta).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 12 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

- Recuerde que el material que se usa en este proceso (puntas, tubos eppendorf, tubos de PCR, tiras y tapas de tubos de PCR) debe estar autoclavado.
- El material usado como puntas o restos de muestras y los guantes deben ser desechados en los basureros correspondientes según el tipo de desecho 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

Cat. N°: Número de Catálogo

mL: Mililitros

OT: Orden de trabajo

PON: Procedimiento operativo normado

RPM: Revoluciones por minuto

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses

µg: Microgramo

µL: Microlitros

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 aquella muestra que no contiene ADN como por ejemplo el agua

Control positivo: Es aquella muestra que se sabe que contiene ADN, como por ejemplo algún extracto anteriormente cuantificado

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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 13 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

14. Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.
02	Procedimiento para la extracción de ADN para pelos y plumas utilizando el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.
03	Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen.
04	Procedimiento para la extracción utilizando el equipo APEX y el kit para tejidos MagMax.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 14 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Anexo 1.

Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.

Notas antes de comenzar:

- Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Re disuelva los precipitados en los tampones AL y ATL.
- Agregue etanol a los concentrados de tampón AW1 y AW2.
- Equilibre el tejido congelado o los pellets de células a temperatura ambiente.
- Precaliente una incubadora a 56 °C.
- Consulte el manual para el pretratamiento de tejido fijado, insecto, bacteria u otro material.

1a. Tejido: corte el tejido (≤ 10 mg de bazo o ≤ 25 mg de otro tejido) en trozos pequeños y colóquelos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Para las colas de roedores, use 1 (rata) o 2 (ratón) de 0,4–0,6 cm de longitud de cola. Agregue 180 μ l de tampón ATL. Añadir 20 μ l de proteinasa K, mezclar mediante agitación con vortex e incubar a 56 °C hasta que se lisis por completo. Agite con el vortex de vez en cuando durante la incubación. Agite con el vortex durante 15 s directamente antes de continuar con el paso 2.

1b Sangre no nucleada: pipetear 20 μ l de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml. Añadir 50–100 μ l de sangre tratada con anticoagulante. Ajustar el volumen a 220 μ l con PBS. Continuar con el paso 2.

1c Sangre nucleada: pipetee 20 μ l de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml. Agregue 5–10 μ l de sangre tratada con anticoagulante. Ajuste el volumen a 220 μ l con PBS. Continúe con el paso 2.

1d. Células cultivadas: centrifugue un máximo de 5×10^6 células durante 5 min a $300 \times g$ (190 rpm). Re suspenda en 200 μ l de PBS. Agregue 20 μ l de proteinasa K. Continúe con el paso 2.

2. Agregue 200 μ l de tampón AL. Mezcle bien mediante agitación con el vórtex. Incube las muestras de sangre a 56 °C durante 10 min.

3. Agregue 200 μ l de etanol (96–100%). Mezcle bien mediante agitación con el vórtex.

4. Pipetear la mezcla en una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 minuto. Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

5. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Agregar 500 μ l de tampón AW1. Centrifugar durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$. Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

6. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, agregar 500 μ l de tampón AW2 y centrifugar durante 3 minutos a $20\,000 \times g$ (14 000 rpm). Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

7. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 15 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

8. Eluya el ADN agregando 200 µl de tampón AE al centro de la membrana de la columna de centrifugación. Incube durante 1 minuto a temperatura ambiente (15–25 °C). Centrifugue durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$.

9. Opcional: repita el paso 8 para obtener un mayor rendimiento de ADN.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 16 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Anexo 2.

Protocolo de Purificación del ADN total de uñas, cabello o plumas mediante extracción manual con el Kit Dneasy Blood & Tissue de QIAGEN

Puntos importantes antes de empezar:

Si utiliza el kit de sangre y tejido DNeasy por primera vez, lea las "Notas importantes" en el Manual de sangre y tejido DNeasy.

Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15–25 °C) en una microcentrífuga

La agitación se debe realizar mediante pulsos de agitación durante 5 a 10 s.

Cosas que hacer antes de empezar

Prepare una solución acuosa de DTT 1 M. Conserve alícuotas a –20 °C. Descongele inmediatamente antes de usar.

Los tampones ATL y AL pueden formar precipitados durante el almacenamiento. Si es necesario, calentar a 56 °C hasta Los precipitados se han disuelto completamente

Los tampones AW1 y AW2 se suministran como concentrados. Antes de usarlos por primera vez, agregue la cantidad adecuada de etanol (96-100 %) como se indica en la botella para obtener una solución de trabajo.

Pre caliente en un bloque térmico, un baño de agua con agitación o una plataforma oscilante a 56 °C para usar en el paso 3.

Procedimiento

1. Agregue 300 µl de tampón ATL, 20 µl de proteinasa K y 20 µl de DTT 1 M a 1,5 ml. tubo de microcentrífuga (no incluido).

El DTT se oxida rápidamente en soluciones acuosas y también debe añadirse justo antes de su uso. Conserve la solución madre de DTT (1 M) a –20 °C.

2. Para las uñas, siga el paso 2a; para el cabello, siga el paso 2b; para las plumas, siga el paso 2c.

2a. Uñas: corte la muestra (hasta 10–25 mg) en trozos pequeños y transfírela al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3. 2b.

2b. Cabello: corte un trozo de 0,5 a 1 cm de la base del cabello y transfírela al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3. 2c.

2c. Plumav: corte un trozo de 2 a 5 cm de la pluma (hasta 25 mg) y transfírela al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3.

3. Incubar a 56 °C hasta que la muestra esté completamente lisada. Agitar en vórtex ocasionalmente durante incubación para dispersar la muestra, o colocar en un termomezclador, baño de agua con agitación o en una plataforma oscilante.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 17 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

El tiempo de lisis varía según la muestra procesada. En general, los pelos se lisan en 1 hora. ¡Si es más conveniente, las muestras se pueden lisan durante la noche; esto no las afectará negativamente.

Las púas de las plumas permanecerán sin lisar. En el caso de las muestras que contengan púas sin lisar, centrifugue brevemente y transfiera el sobrenadante a otro tubo antes de continuar con el paso 4.

4. Agite en vórtex durante 15 s. Agregue 300 µl de tampón AL a la muestra y mezcle bien mediante agitación en vórtex. A continuación, añadir 300 µl de etanol (96–100 %) y volver a mezclar bien mediante vórtex.

Es esencial que la muestra, el tampón AL y el etanol se mezclen de inmediato y completamente mediante agitación en vórtex o pipeteo para obtener una solución homogénea. El tampón AL y el etanol se pueden mezclar previamente y agregar juntos en un solo paso para ahorrar tiempo al procesar múltiples muestras. Se puede formar un precipitado blanco al agregar el tampón AL y el etanol. Este precipitado no interfiere con el procedimiento DNeasy. Algunos tipos de muestra pueden formar un lisado gelatinoso después de agregar el tampón AL y el etanol. En este caso, se recomienda agitar vigorosamente o mezclar con vórtex la preparación.

5. Pipetee la mezcla del paso 4 (incluido cualquier precipitado) en el centrifugador DNeasy Mini. Columna colocada en un tubo de recolección de 2 ml (incluido). Centrifugar a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 minuto. Desechar el líquido de flujo y el tubo de recolección

6. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido), agregue 500 µl de tampón AW1 y centrifugue durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Descarte el flujo continuo y el tubo de recolección.*

7. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido), agregue 500 µl de tampón AW2 y centrifugue durante 3 minutos a $20\,000 \times g$ (14 000 rpm) para secar la membrana DNeasy. Descarte el tubo de recolección y el de flujo continuo.

Es importante secar la membrana de la columna de centrifugación DNeasy Mini, ya que el etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores. Este paso de centrifugación garantiza que no quede etanol residual durante la siguiente elución.

Después del paso de centrifugación, retire la columna de centrifugación DNeasy Mini con cuidado para que no entre en contacto con el flujo, ya que esto provocaría un arrastre de etanol. Si se produce arrastre de etanol, vacíe el tubo de recolección y luego reutilícelo en otra centrifugación durante 1 minuto a $20\,000 \times g$ (14 000 rpm).

8. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml o 2 ml (no incluido) y pipetee 200 µl de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego centrifugue durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) para eluir. La elución con 100 µl (en lugar de 200 µl) aumenta la concentración final de ADN en el eluido, pero también disminuye el rendimiento general de ADN (consulte el Manual de sangre y tejidos DNeasy).

9. Recomendado: Para obtener el máximo rendimiento de ADN, repita la elución una vez como se describe en el paso 8. Se puede utilizar un nuevo tubo de microcentrífuga para el segundo paso de elución a fin de evitar la dilución del primer eluido. Como alternativa, para combinar los eluidos, se puede reutilizar el tubo de microcentrífuga del paso 8 para el segundo paso de elución.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 18 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Nota: No eluya más de 200 µl en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml porque la columna de centrifugación DNeasy Mini entrará en contacto con el eluido. Este paso conduce a un mayor rendimiento general de ADN.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 19 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Anexo 3.

Extracción manual con el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen

Notas antes de comenzar

- Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Si es necesario, vuelva a disolver los precipitados en los concentrados de tampón AP1 y tampón AW1.
- Agregue etanol a los concentrados de tampón AW1 y tampón AW2.
- Precaliente un baño de agua o un bloque de calentamiento a 65 °C.

1. Rompa las muestras (≤ 100 mg de peso húmedo o ≤ 20 mg de tejido liofilizado) utilizando el TissueRuptor®, el TissueLyser II o un mortero.

2. Agregue 400 μ l de tampón AP1 y 4 μ l de ARNasa A. Mezcle en vórtex e incube durante 10 min a 65 °C. Invierta el tubo 2–3 veces durante la incubación.

Nota: No mezcle el tampón AP1 y la ARNasa A antes de usar.

3. Agregue 130 μ l de tampón P3. Mezcle e incube durante 5 minutos en hielo.

4. Recomendado: centrifugue el lisado durante 5 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm).

5. Pipetee el lisado en una columna de centrifugación QIAshredder colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugue durante 2 minutos a 20 000 x g.

6. Transferir el líquido de filtración a un tubo nuevo sin alterar el sedimento, si lo hubiera. Añadir 1,5 volúmenes de tampón AW1 y mezclar mediante pipeteo.

7. Transferir 650 μ l de la mezcla a una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar durante 1 min a ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Desechar el líquido de filtración. Repetir este paso con la muestra restante.

8. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo de 2 ml. Añadir 500 μ l de tampón AW2 y centrifugar durante 1 min a ≥ 6000 x g. Desechar el líquido de filtración.

9. Añadir otros 500 μ l de tampón AW2. Centrifugar durante 2 min a 20 000 x g.

Nota: Retire la columna de centrifugación del tubo de recolección con cuidado para que no entre en contacto con el líquido que fluye a través de la misma.

10. Transfiera la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.

11. Agregue 100 μ l de tampón AE para la elución. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C). Centrifugue durante 1 minuto a ≥ 6000 x g.

12. Repita el paso 11.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 20 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Anexo 4.

Extracción APEX, kit para tejidos MagMax

A continuación, se indican los pasos para el programa del kit para tejidos de extracción llamado MagMAX CORE, a mitad de reacción, utilizado directamente con tejidos o bien con aplicadores con sangre.

Preparación de la muestra:

Primero tome una pequeña cantidad de la muestra, esto según el inserto del kit es entre 20-30mg de tejido, pero depende del tipo de tejido y condiciones de este, por lo que se recomienda es que en un tubo de microcentrífuga la muestra cubra solamente la parte inferior de un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.

Nota: evite colocar mucha muestra pues el objetivo es que está quede en contacto con alrededor de 100ul del siguiente punto.

A cada tubo de microcentrífuga coloque 90ul de PBS y 10ul de MagMAX CORE proteinasa k (20mg/ml). Esta mezcla puede ser preparada previamente para el conjunto de tubos que se va a preparar o bien dispensar los volúmenes directamente en cada tubo.

Coloque cada uno de los tubos a encubar por dos horas a 55°C en un "termomixer" a 300 RPM.

Mientras pasan las dos horas de incubación inicie la preparación de las placas plásticas del APEX.

Preparación de las placas de trabajo

Prepare las 5 placas plásticas que requiere el proceso:

- Placa de muestra (profunda o deepwell)
- Placa de lavado 1 (profunda o deepwell)
- Placa de lavado 2 (profunda o deepwell)
- Placa de elusión (estándar)
- Placa de puntas (estándar, con puntas para deepwell)

Nota: Se pueden reutilizar plásticos usados, con espacios disponibles sin usar, solo debe dejar al menos un espacio entre la última línea utilizada y la nueva línea a que se va a utilizar. Además, se recomienda verificar que la placa de muestras reutilizada no permanezca con residuos para evitar un mal funcionamiento del APEX.

Preparación de reactivos para cada placa:

Placa de muestra

Prepare una mezcla por separado, por cada muestra la solución debe tener:

- 10ul de MagMAX CORE Magnetic Beads
- 175ul de MagMAX CORE Lysis Solution
- 175ul MagMAX CORE Binding solution

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 21 de 21
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	P-DCF-ECT-BIO-42	

Nota: Se recomienda preparar al menos 1 solución adicional a la cantidad de muestras que se están trabajando.

Nota: Tenga presente que agitar brevemente en un Vortex la solución antes de pipetear, ya que los Magnetic Beads se precipitan al dejar la solución en reposo.

- Tome 360ul de la solución preparada y colóquela en cada uno de los pocillos de la placa que va utilizar.
- Luego de las dos horas de incubación de las muestras, centrifugue brevemente cada tubo y tome 100ul de cada muestra y coloque en los pocillos de la placa que va a utilizar.

Nota: No siempre quedan los 100ul en cada tubo, en ese caso tome la mayor cantidad posible.

Nota: Rotule con un marcador indeleble los pocillos utilizados de la placa.

Placa de lavado 1

- 275ul de MagMAX CORE Wash Solution 1

Placa de lavado 2

- 275ul de MagMAX CORE Wash Solution 2

Placa de elusión

- 50ul de MagMAX Elution Buffer

Placa de puntas

- No requiere reactivos y preparación adicional

Luego ya proceda a utilizar el programa del equipo de acuerdo a como se indica en el procedimiento.