

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

 DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)			PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO P-DCF-ECT-BQM-50		
Versión: 11			Rige desde: 11/08/2022		PAGINA: 2 de 24
04	15/06/2017	18/07/2017	Revisión y edición	53-2017	EFM
05	18/07/2017	21/06/2018	Revisión y edición	62-2017	EFM
06	21/06/2018	17/05/2019	Revisión y edición	12-2018	EFM
07	17/05/2019	01/08/2019	Revisión y edición	10-2019	EFM
08	01/08/2019	08/03/2021	Corrección de punto 7.5.14	17-2019	EFM
09	08/03/2021	29/07/2021	Revisión y edición. Elimina uso equipo Maxwell. Se añade uso de Qiagility y proceso de desmineralización.	10-2021	EFM
10	29/07/2021	11/08/2022	Edición de documento.	39-2021	EFM
11	11/08/2022		Revisión y edición. Correcciones varias	16-2022	ARQ

**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 11	PAGINA: 3 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

1 Objetivo:

El objetivo de este PON es el de establecer la metodología para la limpieza, pulverización y extracción de ADN a partir de restos humanos calcificados (huesos y dientes).

2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para limpiar, realizar la pulverización y extraer ADN nuclear y mitocondrial de todas las muestras de restos humanos calcificados (huesos y dientes) que se analizan en la Sección de Bioquímica, sin importar su estado.

3 Referencias:

- Armed Forces DNA Identification Laboratory. 1995. Extraction of DNA from Dried Skeletal Remains. Washington, D.C.
- FBI Laboratory. 2001. Calcified Tissue Extraction.
- Sambrook, J; Fritsch, E y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- The Merck Index. 1989. Merck & Co., Inc. USA.
- Huel R, Amory S, Bilic A, Vidovic S, Jasaragic E, Parsons TJ. Chapter 13. DNA Extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis. En: Alonso A, editor. DNA electrophoresis protocols for forensic genetics, methods in molecular biology vol. 830 (Springer protocols). New York: Humana Press; 2012. p. 185-198.
- Lorielle, O.M. et al. (2007) High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. Forensic Science International: Genetics. 1, 191.
- Purification of DNA from bone samples using bone DNA extraction kit, Custom and DNA IQ™ Chemistry, Promega Corporation, Application Note #AN343.
- QIAquick® PCR Purification Kit, Quick-Star Protocol, QIAGEN, July 2018
- QIASymphony® SP Protocol Sheet, Casework_500_V8 protocol and Casework_500_H20_V8, QIAGEN, February 2019.

4 Equipos y Materiales:

- Agitador vortex.
- Aguja vacutainer N.º 22 o similar, nuevas y estériles.
- Anteojos de seguridad.
- [Autoclave Panasonic MLS-3781L](#).
- Balanza granataria

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 4 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

- Bisturí estéril.
- Bolsas plásticas nuevas estériles pequeñas y con cierre metálico.
- Broca estéril del esmeril dremel de óxido de aluminio tipo fresa, de 5,5mm para alta velocidad.
- Cámara de Bioseguridad Clase II Tipo A2 con luz U.V, o similar.
- Cámara de extracción de gases.
- [Centrífuga Termo IEC Centra CL3R con rotor basculante/oscilante o similar.](#)
- Columnas concentradoras Amicon Ultra-4 y Amicon Ultra-15 de 30 K o hasta 100 K o similar desechables.
- Columnas de purificación de ADN QIAquick®, Qiagen.
- Congelador de temperatura con rango de -15 a - 25 ± 1 °C.
- Equipo de extracción automatizados QIA Symphony^{SP} o similar.
- Esmeril Dremel.
- Espátula acanalada o similar estéril.
- Freezer Mill Spex Centriprep Modelo 6850 o 6870 con tapones de metal, viales, morteros y/o similar.
- [Formulario: "Lista de verificación Procedimiento Limpieza y Pulverización de Restos Óseos: Sección de Bioquímica".](#)
- [Formulario: "Lista de Verificación de Cumplimiento Procedimiento Extracción de ADN a partir de Restos Humanos Calcificados".](#)
- Formulario: "Entrega de muestras para cuantificación".
- Gabacha desechable.
- Gasa estéril.
- Gorro desechable.
- Gradilla para tubos cónicos de 15 y/o 50 ml.
- Gradilla para tubos de 1,5 ml.
- Guantes desechables.
- Guantes crioprotectores.
- Hojas para bisturí #20 nuevas.
- Horno hibridizador ProBlot Labnet o similar. (capaz de alcanzar y mantener los 56 °C ± 1 °C)
- Mangas desechables.
- Mascarillas desechables, con filtro de partículas N95.
- Marcador con tinta indeleble.
- Martillo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 5 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

- Medidor de pH Accumet Mod 915 (rango 0-14) (precisión 0,1), o similar (ver Anexo Número 01).
- Microcentrífuga rango 0 a 14000 r.p.m, marca Termo IEC Microlite o similar.
- [Micropipetas automáticas de volumen ajustable.](#)
- Prensa de mesa York de 10 cm o similar.
- Papel aluminio.
- Papel Kraft.
- Papel parafilm.
- Pinzas y tijeras finas estériles.
- Pinzas tipo lagarto estériles.
- Placas de petri de vidrio estériles.
- [Puntas nuevas y estériles para micropipetas.](#)
- Refrigerador de temperatura con rango 2 a 8 ± 2 °C.
- Recipiente de plástico duro para desecho de material punzocortante marca Fisherbrand Cat. No. 14-827-122 o similar.
- Set de viales para pulverización estériles (Incluye barra magnética impactadora de metal, vial cilíndrico de policarbonato y tapones metálicos).
- Tanque para nitrógeno líquido con tubería para llenado del Pulverizador Freezer Mill.
- Thermomixer marca Eppendorf o similar.
- Testigo métricos de al menos 30 cm (± 0,1 cm).
- Tijera para cortar huesos o similar.
- Traje de bioseguridad
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 ml y/o 50 ml estériles y nuevos, con tapa antiderrame Falcon o similar.
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 ml nuevos y estériles, marca Eppendorf o similar

Nota 1: Las puntas de micropipeta y los tubos para microcentrífuga deben ser nuevos y autoclavados. (Ver Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado).

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Los reactivos deben ser elaborados según procedimiento de preparación de reactivos (Ver Anexo Número 1)

- Ácido etilén diamino tetracético disódico (EDTA), grado biología molecular, Sigma E-5134 o similar, para preparar EDTA 0,5 M pH 8 (Ver Anexo Número 1).
- Agua del tubo.
- Agua tipo Milli-Q o similar (Ver Anexo Número 01).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 6 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

- Buffer de extracción de hueso "Bone Incubation" Promega Corp. Part. #X176X o similar.
- Buffers y solución de lavado provistos en el kit de purificación de ADN QIAquick®, Qiagen (PB, PE y EB).
- Descontaminador de ADNasas y ARNasas Detergente Terg-A-Zyme al 1% (Ver Anexo Número 01) o DNA Away
- Ditiotreitól (DTT) grado biología molecular Sigma D-9799 o similar.
- EDTA 0,5 M, pH 8. Ver Anexo Número 01.
- Etanol al 80 % (Ver Anexo Número 01).
- Etanol al 70 % grado comercial (ver Anexo Número 1).
- Fenol:Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (25:24:1) ya preparado, que se adquiere comercialmente Sigma código P-3803 o similar. Mantenga a una temperatura aproximada de 2º a 8º C.
- Kit de reactivos y consumibles para extracción de ADN por medio de equipo automatizado QIASymphony o similar "QIASymphony DNA Investigator Kit (QIAGEN)" (se incluyen aquí a los Cartuchos de reactivos y sus cobertores, Rack de enzimas, Tapas perforantes, Buffer ATE, Buffer AVE, Buffer ATL, Carrier ARN, Proteinasa K) (*)
- Nitrógeno líquido.
- N-Lauroylsarcosinate.
- Proteinasa K, marca Sigma P-2308 grado biología molecular o similar (reactivo crítico). (*)
- Solución stock de proteinasa K (Ver Anexo 1). Proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml. (*)

(*) Reactivos críticos. Ver el punto 7.3.3 Reactivos y suministros críticos del PROCEDIMIENTO DE GESTIÓN DE CASOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS, UNIDAD DE GENÉTICA FORENSE, SECCIÓN DE BIOQUÍMICA, para referirse al proceso de verificación intermedia y de prueba de nuevos lotes de reactivos.

6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento de extracción debe realizarse en las áreas designadas para la extracción de ADN de la Unidad de Genética Forense (pre amplificación) de la Sección de Bioquímica.

Para minimizar la posible contaminación por sudor del analista, se recomienda trabajar en áreas de trabajo con aire acondicionado de ser posible. La temperatura de esta área no debe ser registrada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 7 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7 Procedimiento:

Nota 2: Se deben completar, dependiendo del caso los siguientes formularios: "Lista de verificación Procedimiento Limpieza y Pulverización de Restos Óseos: Sección de Bioquímica" y/o "Lista de Verificación de Cumplimiento Procedimiento Extracción de ADN a partir de Restos Humanos Calcificados" como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

7.1 Apertura de restos humanos calcificados (huesos y dientes):

- 7.1.1 Elabore la Lista de Solicitud de Muestras a Bodega de Indicios de todos los huesos y/o dientes que es necesario procesar. En términos generales sólo se pulverizan y amplifican aquellos huesos y dientes cuya solicitud indica que son restos no identificados ya sea provenientes de autopsias o inspecciones, o aquellos donde existan referencias con indicios para comparación.
- 7.1.2 Limpie la mesa de trabajo con Solución de descontaminación DNA Away o similar y/o etanol al 70% y cubra con papel kraft.
- 7.1.3 Rotule con al menos el número de autopsia o inspección, y/o número de OT: un trozo de papel kraft, una placa Petri y asíelos con su respectivo embalaje para iniciar la toma de fotografías.
- 7.1.4 Utilice el equipo fotográfico de la Sección para la realización de la toma de fotografías.
- 7.1.5 Tome, para cada hueso y/o dientes, una fotografía de: cada uno de los lados del embalaje externo, del embalaje interno y de su contenido (utilice testigo métrico).
- 7.1.6 El acta de apertura se deberá generar posteriormente, dadas las condiciones de trabajo de este tipo de muestras.

7.2 Limpieza general de restos humanos calcificados (huesos y dientes):

- 7.2.1 Limpie la cámara de bioseguridad con Solución de descontaminación DNA Away o similar y/o etanol al 70% y cubra con papel kraft.
- 7.2.2 Limpie el esmeril tipo dremel, las brocas y de ser necesario las Pinzas tipo lagarto con Solución de descontaminación DNA Away o similar y/o etanol al 70%.
- 7.2.3 Coloque el esmeril tipo dremel, las brocas y las pinzas tipo lagarto en luz UV por al menos 15 minutos.
- 7.2.4 Encienda la cámara de bioseguridad ubicada en el cuarto de Restos óseos.
- 7.2.5 Utilice traje de bioseguridad o gabacha, delantal y cubre zapatos desechables. Además use gorro desechable, mangas desechables, mascarilla desechable con filtro contra partículas N95, guantes desechables y anteojos protectores.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 8 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

- 7.2.6 Limpie los trozos de huesos en la cámara de bioseguridad con el esmeril tipo dremel y/o bisturí (usando hojas nuevas). Idealmente utilice una Broca estéril del esmeril dremel de óxido de aluminio tipo fresa, de 5,5mm para alta velocidad.
- 7.2.7 Entre muestra y muestra de huesos, limpie el esmeril dremel con detergente Terg-A-Zyme, enjuague con agua de tubo y solución de descontaminación DNAway o similar y/o etanol al 70%. De ser necesario para eliminar restos de las brocas utilizar una hoja de bisturí.
- 7.2.8 Limpie, al finalizar la actividad, la cámara de bioseguridad con solución de descontaminación DNAway o similar y/o etanol al 70% y deje irradiando con luz UV por al menos 15min.
- 7.2.9 En el caso de los dientes, proceda a limpiar los que va a analizar de cada caso con agua de tubo, detergente Terg-A-Zyme y utilizando una gaza estéril con el fin de eliminar tierra o algún otro material contaminante.
- 7.2.10 Embale los trozos de hueso y/o dientes sobrantes, con el fin de que queden como testigo, en una bolsa plástica estéril con cierre metálico, y ésta a su vez dentro de una bolsa de papel, sellada y lacrada; los mismos deben ser devueltos a la Bodega de indicios.
- 7.2.11** Rompa los trozos de huesos y/o dientes en fragmentos con ayuda del martillo y la prensa de mesa York. Puede utilizar también una tijera para cortar huesos para realizar esta tarea.
- 7.2.12** Coloque los fragmentos de huesos y/o dientes en tubo cónico de 50 ml rotulado con el # de autopsia o Inspección y # OT. Coloque los tubos con las muestras en una gradilla.
- 7.2.13** Adicione a los huesos y/o dientes la solución de Terg-A-Zyme al 1 % hasta cubrir el material y agite fuertemente cada uno de los tubos. Deje reposar al menos 20 minutos.
- 7.2.14** Decante la solución de Terg-A-Zyme al 1% en la pila ubicada en el cuarto de Restos óseos procurando dejar la menor cantidad del detergente.
- 7.2.15** Enjuague al menos tres veces los huesos y/o dientes con agua desionizada tipo Milli Q o similar estéril tibia, hasta eliminar la espuma generada por la solución de Terg-A-Zyme al 1%.
- 7.2.16** Enjuague una última vez con etanol al 80%.
- 7.2.17** Coloque los huesos y/o dientes lavados sobre un trozo de papel aluminio rotulado en sus bordes con el # de autopsia o Inspección y # OT dentro de la cámara de bioseguridad.
- 7.2.18** Deje secar los huesos y/o dientes dentro de la cámara por al menos 4 horas.
- 7.2.19 Irradiar con luz U.V. por al menos 30 minutos y por cada lado las muestras.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 9 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7.2.20 Coloque los huesos y/o dientes en un tubo cónico de 50 ml, previamente identificados con el # de autopsia o Inspección y # OT. En este punto los huesos y/o dientes quedan listos para ser pulverizados.

7.3 Pulverización de restos humanos calcificados (huesos y dientes):

7.3.1 Tome los huesos y/o dientes y reduzca su tamaño (con ayuda del martillo y/o tijera para cortar huesos) a trozos del menor tamaño posible.

7.3.2 Rotule con marcador de tinta indeleble, el vial cilíndrico de polycarbonato (Figura 1) y la base o tapón metálico con el # de autopsia o Inspección y # OT. Coloque la base o tapón metálico de extremo plano en uno de los extremos del vial, fije bien este tapón haciendo uso de la prensa de mesa.

7.3.3 Coloque dentro del vial cilíndrico la barra impactadora metálica (figura 2) y agregue la muestra de huesos y/o dientes. Coloque en el otro extremo del vial cilíndrico el tapón metálico de extremo convexo (figura 3) y ajuste bien utilizando para ello la prensa de mesa.

Nota 3: Procure no llenar excesivamente el vial cilíndrico con el material a pulverizar. Mucho material dentro del vial impide el libre movimiento de la barra impactadora metálica y por ende el adecuado proceso de pulverización.

		
Figura 1. Set de Viales de pulverización (viales cilíndricos de polycarbonato, barra impactadora, tapones metálicos).	Figura 2. Barra impactadora de acero inoxidable	Figura 3. Tapón de metal de extremo convexo

7.3.4 Encienda el equipo Freezer Mill y levante la tapa.

7.3.5 Limpie con etanol al 70% el tanque para el nitrógeno líquido del equipo Freezer Mill.

7.3.6 Coloque los viales cilíndricos de polycarbonato con los huesos y/o dientes a pulverizar en el compartimento para este fin en el interior del equipo Freezer Mill. Los viales se deben colocar de manera que el tapón metálico de extremo convexo queden contra la tapa del compartimento, en este se puede colocar como máximo cuatro viales. Cierre el compartimento.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 10 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

Nota 4: En caso de que tenga más muestras por pulverizar puede colocarlas dentro de la canastilla metálica que viene con el equipo Freezer Mill para que las muestras se enfríen al contacto con el nitrógeno líquido mientras las otras muestras se pulverizan.

7.3.7 Llene de nitrógeno líquido el tanque del Freezer Mill hasta la marca que tiene el equipo en su interior. Utilice gabacha, anteojos y guantes crioprotectores para manipular el nitrógeno.

7.3.8 Cierra la tapa del Freezer Mill.

7.3.9 Para configurar por primera vez los parámetros de pulverización en el equipo Freezer Mill. En el panel de control del equipo los parámetros son los siguientes: 15-20 minutos de preenfriamiento, 3 ciclos pulverización (2 minutos de pulverización con dos minutos de enfriamiento) y una frecuencia de impacto de 10.

7.3.9.1 Configuración en Freezer Mill Modelo 6870:

7.3.9.1.1 Toque en la pantalla la opción "CURRENT SETTINGS", lo que desplegará la pantalla "SETTINGS". Seleccione la opción "**PRECOOL**" (figura 4). El cambio en el color de la opción de gris a amarillo indica que el campo está activo, ajuste con las flechas el tiempo de preenfriamiento en 20 minutos (Figura 5). Una vez ajustado el tiempo seleccione nuevamente la opción "**PRECOOL**" para guardar el cambio.

7.3.9.1.2 Defina los ciclos de pulverización, para ello toque en la pantalla la opción "**CYCLES**", el cambio en el color de la opción de gris a amarillo indica que el campo está activo, ajuste con las flechas la cantidad de ciclos que debe ser 3. Una vez ajustada la cantidad de ciclos tiempo seleccione nuevamente la opción "**CYCLES**" para guardar el cambio.

7.3.9.1.3 Defina los parámetros de cada ciclo de pulverización (2 minutos pulverización). Seleccione la opción "**RUN**". El cambio en el color de la opción de gris a amarillo indica que el campo está activo, ajuste con las flechas el tiempo de pulverización en 2 minutos. Una vez ajustado el tiempo seleccione nuevamente la opción "**RUN**" para guardar el cambio.

7.3.9.1.4 Defina los parámetros de cada ciclo de pulverización (2 minutos de enfriamiento). Seleccione la opción "**COOL**". El cambio en el color de la opción de gris a amarillo indica que el campo está activo, ajuste con las flechas el tiempo de enfriamiento en 2 minutos. Una vez ajustado el tiempo seleccione nuevamente la opción "**COOL**" para guardar el cambio.

7.3.9.1.5 Defina la frecuencia de impacto (RATE), seleccione la opción "**RATE**". El cambio en el color de la opción de gris a amarillo indica que el campo está activo, ajuste con las flechas la frecuencia de impacto en 10. Una vez ajustado seleccione nuevamente la opción "**RATE**" para guardar el cambio.

7.3.9.2 Para realizar esta configuración en Freezer Mill Modelo 6850:

7.3.9.2.1 Configure inicialmente el tiempo de enfriamiento para ello presione una vez el botón **T3** en el panel de control, en este punto se ponen en forma intermitente

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 11 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

las las letras que indican **"P COOL"** en el panel de control (figura 6). Mientras estas están en forma intermitente, defina presionando con el teclado numérico el tiempo de preenfriamiento en 20 minutos, verifique que este tiempo se haya fijado en la pantalla que indica el tiempo **"TIME"**, una vez definido el tiempo de preenfriamiento presione la tecla **ENT**, para fijar el tiempo en la memoria.

7.3.9.2.2 Luego defina los ciclos de pulverización, para ello presione el botón **CYC** en el panel de control, luego utilice el teclado numérico para definir el número de ciclos (3), verifique que en pantalla que indica los ciclos **"CYCLES"** esté el número correcto y finalmente presione la tecla **ENT**, para fijar el valor en la memoria.

7.3.9.2.3 Defina los parámetros de cada ciclo de pulverización (2 minutos pulverización + 2 minutos de enfriamiento), para ello presione el botón **T1** en el panel de control, en este punto se pone en forma intermitente las letras **"RUN"** en el panel del equipo (figura 6). Mientras la luz está intermitente, defina utilizando el teclado numérico del panel el valor de 2 minutos, verifique este valor en la pantalla que indica el tiempo **"TIME"**, una vez fijado el valor presione la tecla **ENT**. Repita el paso anterior pero utilizando el botón **T2** y defina el tiempo en 2 minutos, de esta forma queda fijado el tiempo de enfriamiento dentro del ciclo de pulverización.

7.3.9.2.4 Para cambiar la frecuencia de impacto (RATE), utilice unicamente los botones con las flechas (↑) o (↓) en el panel de control, y luego presione la tecla **ENT**., para fijar el valor en la memoria.

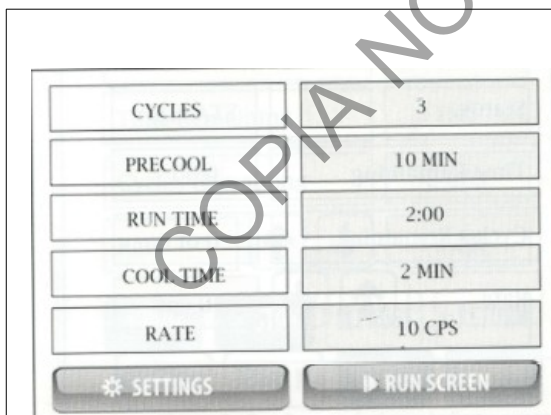


Figura 4. Panel de control del Freezer Mill 6870.

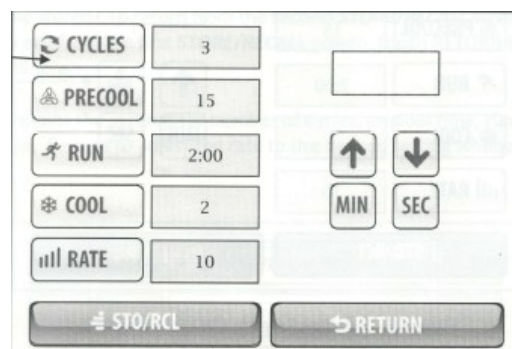


Figura 5. Panel del Freezer Mill 6870.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 12 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

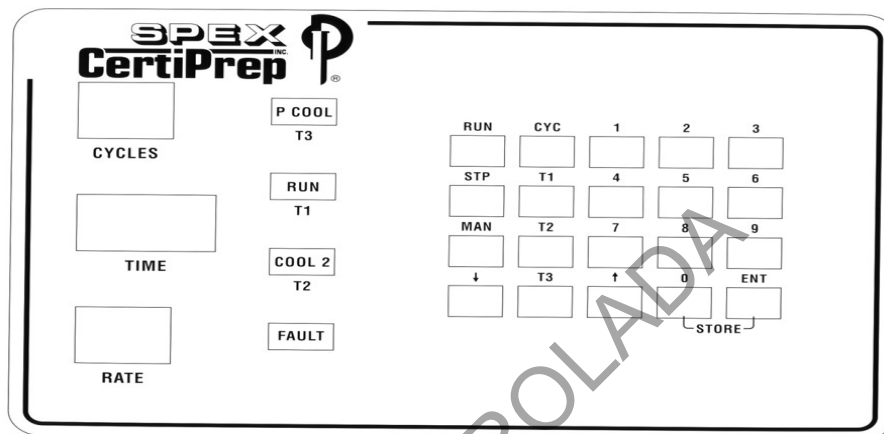


Figura 6. Panel de control del Freezer Mill 6850.

- 7.3.10** Una vez configurado los parámetros de pulverización, presione la tecla **RUN** en el panel de control.
- 7.3.11 Espere que el equipo realice el proceso de pulverización.
- 7.3.12** Una vez finalizado el proceso de pulverización abra lentamente la tapa del Freezer Mill. Utilice gabacha, anteojos y guantes crioprotectores.
- 7.3.13 Retire los viales de polycarbonato del compartimento, verifique que se haya dado una correcta pulverización o vuelva a realizar el proceso de pulverización.
- 7.3.14 Colóquelos sobre la mesa de trabajo hasta que se evapore todo el nitrógeno y alcancen la temperatura ambiente.
- 7.3.15 Retire con ayuda de la prensa de mesa el tapón metálico con extremo convexo (figura 3).
- 7.3.16** Almacene el polvo obtenido en un tubo cónico de 15 ó 50 ml rotulado con al menos el # de OT y número de autopsia o Inspección y almacene a temperatura de congelación o utilizar inmediatamente.

7.4 Extracción de ADN:

7.4.1 La Sección de Bioquímica cuenta con tres metodologías para la obtención de ADN a partir de restos humanos calcificados (huesos y dientes): extracción con el kit "QIAasymp[®] DNA Investigator[®]" (QIAGEN) en el equipo QIAasymp^{SP}, extracción orgánica con fenol-cloroformo y extracción por desmineralización completa de la matriz ósea.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 13 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

Nota 5: En caso de no obtener material genético en cantidad suficiente para la amplificación de marcadores genéticos al realizar una de las metodologías aprobadas, se deberá confirmar el resultado obtenido, por al menos una de las otras dos metodologías, con el fin de completar de ser posible al menos tres extracciones antes de emitir un resultado negativo, lo anterior siempre y cuando la cantidad de muestra lo permita.

Nota 6: En todas las extracciones descritas en este procedimiento, se debe incluir al menos una muestra control positivo de extracción y una muestra de control negativo de extracción por lote de muestras analizadas (Ver anexo 02).

Nota 7: Antes de empezar cualquier procedimiento de extracción de ADN a partir de restos humanos calcificados (huesos y dientes) se debe limpiar tanto el área de trabajo como el material de trabajo (pipetas, tijeras pequeñas, pinzas finas, pinzas tipo lagarto, espátula acanalada) con solución descontaminante DNA Away y/o etanol al 70%.

Nota 8: Antes de utilizar el buffer ATL en cualquiera de los procesos de extracción o purificación descritos en este procedimiento, se debe revisar que no contenga un precipitado color blanco. En caso de ser necesario se debe colocar a 70° C por al menos 30min.

7.4.2 Extracción semiautomatizada con el kit "QIAasymphony® DNA Investigator®" en el equipo QIAasymphony^{SP} de la casa comercial QIAGEN.

7.4.2.1 Transfiera aproximadamente 100 mg de polvo de hueso o diente a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo y estéril, rotulado con al menos el número de OT y # de autopsia o inspección. Haga lo mismo para las muestras control tanto positivas como negativas (Ver Anexo 02)

7.4.2.2 Agregue 475 µl de buffer ATL a las muestras y controles.

7.4.2.3 Agregue 25 µl de proteinasa K (kit QIAasymphony® DNA Investigator®) y agite en vortex.

7.4.2.4 Coloque los tubos en el thermomixer e incube a 56°C en agitación a 900 rpm durante la noche.

7.4.2.5 Centrifugue los tubos a máxima velocidad por 1 min en microcentrífuga.

7.4.2.6 Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a tubos de 2,0 ml con tapa de rosca (QIAGEN), previamente rotulados con al menos el número de OT.

7.4.2.7 Purifique los extractos en el equipo automatizado QIAasymphony^{SP}, utilizando el protocolo 500-ADV-HE.

7.4.2.8 Almacene las muestras extraídas en refrigeración hasta el momento de utilizarlas o a temperatura de congelación si necesita preservarlas por más tiempo.

7.4.2.9 Entregue las muestras a la persona encargada de realizar la cuantificación de ADN (humano total y masculino) mediante PCR tiempo Real (Ver: Procedimiento para la

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 14 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real y el Formulario: Entrega de muestra para Cuantificación).

7.4.3 Extracción de ADN con la metodología de extracción orgánica con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico:

7.4.3.1 Transfiera entre 0,5g-1,0g de polvo de hueso o diente a un tubo cónico de 15 ml nuevo, estéril y rotulado con al menos el número de OT y/o número de autopsia o Inspección. Haga lo mismo para las muestras de control positivo y negativo de extracción (Ver Anexo 02).

Nota 9: 1,0g de de polvo de hueso es la cantidad preferible para incrementar la recuperación de ADN. En casos donde la muestra sea escasa, se puede utilizar una cantidad menor de polvo de hueso o diente. En los casos en que se requiera también se podrá aumentar la cantidad de polvo, siempre y cuando se guarde la proporción de 1,0g de polvo por cada 4,5 ml de buffer de extracción de hueso y 200 µl de solución de proteína K (20 mg/ml).

7.4.3.2 Descongele la solución de Proteinasa K (20 mg/ml).

7.4.3.3 Agregue 4,5 ml de buffer de extracción de hueso y 200 µl de solución de proteína K (20 mg/ml) a cada muestra, incluyendo el control positivo. En el caso del control negativo agregue 100 µl de solución de proteína K (20 mg/mL).

7.4.3.4 Incube a 56°C en agitación entre 10-18h (horno de hibridización ProBlot Labnet o similar).

Nota 10: Durante la agitación, los tubos deben estar colocados de manera que el polvo de hueso o diente siempre esté en contacto con la solución de extracción.

7.4.3.5 Centrifugue por 10 minutos a 4000 rpm. Separe el sobrenadante y colóquelo en un tubo cónico nuevo de 15 ml. Preserve el botón de polvo de hueso o diente.

7.4.3.6 Agregue EDTA (0,5 M pH= 8.0) en una relación de 0,5 ml por cada gramo de polvo de hueso o diente al botón que quedó en el punto 7.4.3.5. Agite en vortex vigorosamente.

7.4.3.7 Agite por 10 minutos a temperatura ambiente, para esta tarea puede utilizar el horno de hibridización ProBlot Labnet o similar.

7.4.3.8 Centrifugue por 10 minutos a 4000 rpm. Separe el sobrenadante y júntelo con el sobrenadante obtenido anteriormente (punto 7.4.3.5).

7.4.3.9 Agregue en la cámara de extracción de gases aproximadamente un volumen igual de la mezcla de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) a la solución acuosa obtenida en el punto 7.4.3.5. Agite en vortex vigorosamente.

7.4.3.10 Centrifugue por 20 minutos a 4000 rpm, de manera que las dos capas queden bien separadas.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 15 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7.4.3.11 Separe la capa superior a un nuevo tubo cónico de 15 ml.

7.4.3.12 Agregue a la capa superior separada en el punto anterior un volumen igual de la mezcla de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). Agite en vortex vigorosamente.

Nota 11: Al control negativo de extracción opcionalmente se le puede hacer solo un lavado con la solución de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v)

7.4.3.13 Centrifugue por 20 minutos a 4000 rpm de manera que las dos capas queden bien separadas.

7.4.3.14 Transfiera la capa superior acuosa a una columna Amicon Ultra-4 de 30-100 K o similar rotulada con al menos el número de OT y/o número de autopsia o Inspección.

7.4.3.15 Centrifugue de 4000-4500 rpm por 2-10 minutos o hasta que la muestra haya atravesado el filtro. Procure que la membrana de la columna no se seque. Descarte el líquido que se filtró.

7.4.3.16 Agregue de 2 a 3 ml de agua estéril tipo Milli Q o similar y centrifugue de 4000 a 4500 rpm por 2 a 5 minutos o hasta alcanzar un volumen entre los 50 y 250 µl.

7.4.3.17 Transfiera el contenido de la columna a un tubo de 2,0 ml con tapa de rosca (QIAGEN) rotulado con al menos el número de OT y lave la membrana de la columna con un volumen de 50 a 100 µl adicionales de agua desionizada estéril tipo Milli Q y transfiera este volumen al tubo con muestra previamente separado.

7.4.3.18 Agregue al extracto obtenido en el punto 7.4.3.17 el volumen de buffer ATL (kit QIASymphony® DNA Investigator®) necesario para completar aproximadamente 500 µl.

7.4.3.19 Purifique los extractos con el equipo automatizado de extracción de ADN QIASymphony^{SP} (QIAGEN) con el kit "QIASymphony® DNA Investigator®", utilizando el protocolo 500-ADV-HE.

7.4.3.20 Almacene las muestras extraídas en refrigeración hasta el momento de utilizarlas o en congelación si necesita preservarlas por más tiempo.

7.4.3.21 Entregue las muestras a la persona encargada de realizar la cuantificación de ADN (humano total y masculino) mediante PCR tiempo Real (Ver: Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real y el Formulario: Entrega de muestra para Cuantificación).

7.4.4 EXTRACCIÓN DE ADN POR DESMINERALIZACIÓN COMPLETA:

7.4.4.1 Transfiera entre 0,4-1,0g de polvo de hueso o diente a un tubo cónico de 50 ml nuevo, estéril y rotulado con al menos el número de OT y/o número de autopsia o Inspección (ver nota 9). Haga lo mismo para las muestras de control positivo y negativo de extracción (Ver Anexo 02).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 16 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7.4.4.2 Agregue 15 ml de buffer de desmineralización y 500 µl de solución de proteinasa K (20 mg/mL) a cada muestra, incluyendo el control positivo. En el caso del control negativo agregue al tubo cónico 5 ml de buffer de desmineralización y 100 µl de solución de proteinasa K (20 mg/mL).

7.4.4.3 Asegúrese que la tapa de cada tubo esté bien ajustada y envuélvalas con parafilm con el fin de evitar filtraciones durante la incubación.

7.4.4.4 Agite en vortex.

7.4.4.5 Perfore cuidadosamente con el extremo biselado de una aguja nueva de vacutainer N.º 22, el centro de la tapa de cada muestra como se observa en la figura 7. Deje la aguja insertada en la tapa de cada tubo de manera que sirva como una válvula hechiza para la liberación del gas que se produce durante la incubación.



Figura 17. Tubos cónicos de 50ml con tapa perforada con aguja de vacutainer N°22.

7.4.4.6 Coloque los tubos de manera horizontal en el horno de hibridización ProBlot Labnet e incube a 56°C en agitación entre 10-18h (ver nota 10).

7.4.4.7 Una vez transcurrido el periodo de incubación saque las muestras y asegúrese que todo o casi todo el polvo de hueso y/o diente ha sido completamente digerido.

7.4.4.8 Centrifugue los tubos a 3000 rpm por 5 minutos con el fin de sedimentar cualquier resto de material sin digerir.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 17 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7.4.4.9 Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo cónico de 50 ml nuevo y estéril y agregue en la cámara de extracción de gases aproximadamente un volumen igual de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). Agite en vortex vigorosamente.

7.4.4.10 Centrifugue por 20 minutos a 4000 rpm, de manera que las dos capas queden bien separadas.

7.4.4.11 Transfiera la capa superior acuosa a una columna Amicon Ultra-15 de 30-50 K o similar rotulada con al menos el número de OT y/o número de autopsia o Inspección.

7.4.4.12 Centrifugue las columnas entre 40-50 minutos a 3000 rpm o hasta que la mayoría de la muestra haya pasado a través del filtro de la columna.

7.4.4.13 Agregue 3-4 ml de agua estéril tipo Milli Q o similar y centrifugue entre 20-30 minutos a una velocidad entre los 3000-3500 rpm o hasta alcanzar un volumen remanente en la columna cercano a los 150 µl.

7.4.4.14 Transfiera el contenido de la columna a un nuevo tubo de 2,0 ml con tapa de rosca (QIAGEN) rotulado con al menos el número de OT. Lave la membrana de la columna con agua estéril tipo Milli Q utilizando para ello un volumen cercano o igual al recuperado en el punto 7.4.4.13 y transfiera este volumen al tubo de 2,0 ml con la muestra previamente separada.

7.4.4.15 Proceda con la purificación de las muestras o extractos obtenidos en el punto 7.4.4.14 siguiendo lo indicado en el punto 7.4.5 del presente procedimiento.

7.4.4.16 En caso de no disponer del kit de purificación QIAquick® (QIAGEN), puede realizar la purificación de las muestras con el kit QIASymphony® DNA Investigator® en el equipo QIASymphonySP (QIAGEN), para ello proceda de la siguiente manera:

7.4.4.17 Agregue al extracto obtenido en el punto 7.4.4.14 el volumen de buffer ATL (kit QIASymphony® DNA Investigator®) necesario para completar aproximadamente 500µl.

7.4.4.18 Continúe según se indica en los puntos 7.4.3.19 al 7.4.3.21.

7.4.5 Purificación de ADN con el kit de purificación QIAquick® (QIAGEN):

7.4.6 Agregue 5 volúmenes de buffer PB por volumen de muestra al tubo con muestra (7.4.4.14) y mezcle bien por inversión varias veces.

7.4.7 Para cada una las muestras coloque una columna de centrifugación QIAquick® dentro del tubo de recogida de 2 ml provisto en el kit.

7.4.8 Transfiera 650 µl de la mezcla buffer PB/muestra (7.4.6) a la columna de centrifugación QIAquick® y cierre la tapa.

7.4.9 Centrifugue la columna por 1 min a 13000 rpm. Descarte el filtrado.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 18 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

7.4.10 Repita los pasos 7.4.8 y 7.4.9 hasta que la totalidad de la mezcla buffer PB/muestra (7.4.6) haya sido filtrada a través de la columna.

7.4.11 Lave la columna con 750 µl de buffer PE y centrifugue por 1 min a 13000 rpm.

Nota 12: Asegúrese de haber diluido con 24 ml de etanol (96%-100%) el buffer PE previo a su uso.

7.4.12 Descarte el filtrado y centrifugue nuevamente la columna por 3min a 13000 rpm con el fin de eliminar el etanol residual.

Nota 13: Es importante descartar el filtrado del tubo de recogida de 2 ml después de cada etapa de centrifugación. Todo el etanol del buffer PE debe ser removido antes de realizar la elución del ADN.

7.4.13 Descarte el tubo de recogida de 2 ml y coloque la columna QIAquick® en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo, estéril y rotulado.

7.4.14 Agregue 50 µl de buffer EB en el centro de la membrana de la columna y espere por 1min antes de centrifugar.

7.4.15 Eluya el ADN de la columna centrifugando las muestras por 1min a 13000 rpm. Descarte la columna QIAquick®.

7.4.16 Almacene las muestras extraídas en refrigeración hasta el momento de utilizarlas o a temperatura de congelación si necesita preservarlas por más tiempo.

7.4.17 Entregue las muestras a la persona encargada de realizar la cuantificación de ADN (humano total y masculino) mediante PCR tiempo Real (Ver: Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real y el Formulario: Entrega de muestra para Cuantificación).

8 Aceptación o Rechazo de Resultados:

En esta fase no es posible observar resultados pues las muestras, el control negativo y el control positivo de extracción deben para ello someterse a la cuantificación por PCR en Tiempo Real, amplificación por PCR y separación de fragmentos mediante el uso del analizador genético. (ver Procedimiento de Gestión de Casos e Interpretación de Resultados)

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 19 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

10 Reporte de Análisis y Resultados:

Se debe realizar el reporte de resultados y la interpretación de los mismos de acuerdo a lo estipulado en el SADCF.

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Recuerde colocarse la gabacha, cubreboca, los guantes y los anteojos de seguridad antes de manipular las muestras, ya que los fluidos biológicos son fuente potencial de enfermedades por lo que debe manipularse según normas establecidas.

Coloque el material contaminado en una disolución de agua de tubo y Terg-A-Zyme al 1%, para luego ser lavado y autoclavado.

Descarte las hojas de bisturí usadas en recipiente de plástico duro para material punzocortante y bioinfeccioso .

La proteinasa K en polvo o sus soluciones pueden irritar las membranas mucosas. Utilice anteojos y guantes cuando las maneje.

Toda extracción orgánica debe ser realizada en cámara para extracción de gases cuando agregue fenol y cloroformo.

El fenol puede causar severas quemaduras además de ser hepatotóxico. Debe usarse anteojos de seguridad y guantes al trabajar con fenol o cloroformo. Trabaje dentro de la cámara de extracción de gases. Si las soluciones de fenol entran en contacto con la piel o los ojos, lavar inmediatamente con suficiente cantidad de agua. No lave con etanol.

Descarte los residuos líquidos del fenol en una botella ámbar identificada para tal fin.

El nitrógeno líquido puede ser peligroso. Su punto de ebullición es -195,8 °C. Siempre utilice guantes criogénicos y el delantal para protegerse. Evite derramar sobre ropas o piel desprotegida.

Siempre utilice guantes para manipular objetos fríos o materiales como: los viales de las muestras, la válvula o manguera de los tanques de nitrógeno, los componentes del Freezer Mill. Cuando se este agregando el nitrógeno líquido utilice anteojos de seguridad y el delantal.

No intente operar el pulverizador Freezer Mill sin nitrógeno líquido. El pulverizador tiene un sensor de nitrógeno líquido que desconecta el control cuando el nitrógeno está por debajo del solenoide.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 20 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

12 Simbología:

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ADV-HE: advanced-high efficiency (según indicación comercial hace referencia a los protocolos de extracción en el equipo QIA Symphony^{SP} 200-ADV-HE, 500-ADV-HE o 1000-ADV-HE)

ATE: Según indicación comercial (Buffer ATE)

AVE: Según indicación comercial (Buffer AVE)

BQM: Bioquímica

Cat: Catálogo

CL3R: según indicación comercial (hacer referencia a la centrífuga Termo IEC Centra CL3R)

DCF: Departamento de Ciencias Forenses

EB: Elution Buffer

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético disódico

EFM: Eugenia Fernández Mora

g: gramos

HCl: ácido clorhídrico

IEC: según indicación comercial (hacer referencia a la centrífuga Termo IEC Centra CL3R)

L: litro

M: molar

ml: mililitros

mg: miligramos

NaOH: hidróxido de sodio

N/A: No aplica

OT: orden de trabajo

PB: según indicación comercial (buffer PB)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PE: según indicación comercial (buffer PE)

pH: grado de acidez o alcalinidad

PON: procedimiento de Operación Normado

RATE (frecuencia de impacto): número de movimientos de ida y de vuelta del impactador metálico por segundo.

r.p.m.: revoluciones por minuto

SCD: solicitud Cambio Documental

SDS: sodio Dodecil sulfato

U.V : ultravioleta

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 21 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

v/v: Expresión de concentración volumen en volumen

° C: Grados Celsius

µl: microlitros

13 Terminología:

N/A

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos
02	Preparación de controles

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 22 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

Anexo No. 1

Preparación de reactivos y controles

Para las mediciones de pH indicadas en los distintos reactivos utilice el Medidor de pH Accumet Mod 915 (rango 0-14) (precisión 0,1), o similar

Buffer de desmineralización (EDTA 0,5M pH 8 + N-Lauroylsarcosinate 0,5%)

Para cada 100 ml de buffer de desmineralización:

Pese 0,5 g de N-lauroylsarcosinate y agregue 100 ml de solución de EDTA 0,5M pH 8 previamente autoclavada. Agite suavemente con pastilla magnética hasta disolver todo el detergente. Almacene a temperatura ambiente.

Detergente Terg-A-Zyme al 1 %

Pese 10,00 g de detergente Terg-A-Zyme en la balanza granataria.

Disuelva 10 g de Detergente Terg-A-Zyme en 1 Litro de agua de tubo.

Preparar en el momento del lavado del material, no almacenar y consumir en su totalidad durante el lavado.

EDTA 0,5 M pH 8

Pese 186,1 g EDTA disódico, coloque en un beaker de 1 L y agregue 800 ml de agua desionizada Tipo Milli-Q o similar, ajuste el pH 8 con perlas de NaOH, luego afore a 1 L en un balón aforado, trasvase a botella de vidrio transparente y autoclave.

Almacene a temperatura ambiente y hasta que la solución no presente turbidez.

ETANOL AL 70%

Agregue 735 ml de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y afore a 1 L balón aforado estéril con agua desionizada Tipo Milli-Q o similar. Guarde en botella de vidrio estéril y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

ETANOL AL 80%

Agregue 840 ml de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y afore a 1 L balón aforado estéril con agua desionizada Tipo Milli-Q o similar. Guarde en botella de vidrio estéril y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 23 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

SOLUCIÓN STOCK DE PROTEINASA K (20 mg/ml):

1. Agregue 5,0 ml de agua desionizada Tipo Milli-Q o similar por cada 100 mg de Proteinasa K, revuelva suavemente para disolver. La concentración final de la Proteinasa K será de 20 mg / mL.
2. Haga alícuotas de 1000 µl y almacene a -20 °C hasta por un año. La proteinasa K puede congelarse y descongelarse hasta cinco veces sin que se observe una pérdida significativa en su actividad. Antes de usar la proteinasa K, ésta debe ser descongelada y conservada en hielo.

Tris-HCl 0,1 M pH 8

Pese 12,1 gramos de Tris en 800 ml de agua desionizada tipo Milli Q o similar ajustando el pH a 8 con HCl concentrado. Afore con agua desionizada tipo Milli-Q o similar en un balón aforado de 1 L.

Autoclave en una botella de vidrio transparente y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 11	PAGINA: 24 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA, PULVERIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS HUMANOS CALCIFICADOS (HUESOS Y DIENTES)	P-DCF-ECT-BQM-50	

Anexo No. 2

Preparación de controles

CONTROL POSITIVO DE HUESO O DIENTE:

Consiste en una muestra de polvo hueso o diente humano, a la cual se le ha determinado previamente su genotipo en el laboratorio. Para su preparación se requiere seguir lo indicado en el punto 7.3 del presente procedimiento. Transfiera aproximadamente 100 mg del polvo de hueso o diente en tubos de microcentrífuga de 1,5ml y almacene a temperatura de congelación.

CONTROL NEGATIVO DE HUESOS:

Utilice como control negativo de extracción de huesos un blanco de reactivos (todos los reactivos utilizados en el proceso de extracción y purificación de ADN) que no contenga muestra.

COPIA NO CONTROLADA