



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

**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E  
INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-BQM-55**

Versión: 02

Rige desde: 10/11/2023

PAGINA: 1 de 37

<p><b>Elaborado o modificado por:</b></p> <p><b>Lic. Ramón Angulo Roldán</b> Profesional en Genética Forense Sección de Bioquímica</p> <p><b>Dra. Anayanci Rodríguez Quesada</b> Profesional en Genética Forense. Sección de Bioquímica</p>	<p><b>Revisado por Líder Técnico:</b></p> <p><b>Dra. Magaly Segura Castillo</b> Profesional en Genética Forense. Líder Técnico a.i. de Sección/Unidad de Bioquímica</p>
<p><b>Visto Bueno Encargado de Calidad:</b></p> <p><b>Dr. Alejandro Hernández Bolaños</b> Profesional en Genética Forense. Encargado de Calidad de la Sección de Bioquímica</p>	<p><b>Aprobado por:</b></p> <p><b>Dra. Anayanci Rodríguez Quesad</b> Jefatura a.i. Sección de Bioquímica</p>

**CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN**

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	09/10/2019	10/11/2023	Versión inicial del procedimiento	22-2019	EFM
02	10/11/2023		Revisión y edición de documento	24-2023	ARQ



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

**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E  
INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-BQM-55**

Versión: 02

Rige desde: 10/11/2023

PAGINA: 2 de 37

**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**

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 3 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

## 1 Objetivo:

El propósito de este PON es establecer la metodología para los análisis por ADN mitocondrial.

## 2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para realizar análisis de ADN mitocondrial de elementos pilosos, sangre, restos óseos y otros tejidos humanos. Mediante este análisis se pretende comparar el haplotipo mitocondrial del ofendido y/o imputado/s con el haplotipo mitocondrial de la(s) muestra(s) cuestionada(s).

Según el PON vigente de análisis de restos óseos, cuando un hueso "Desconocido" o "no identificado" no amplifica por ADN nuclear, se debe realizar ADN mitocondrial. el procedimiento que se debe seguir en estos casos es que "Recepción de solicitudes" le asigne un numero nuevo como ampliación de la solicitud que se recibió de patología. El grupo de comparación deberá aportar los extractos de dichas muestras para para realizar los análisis de ADN mitocondrial. Tomar en cuenta si existen familiares para realizar la comparación correspondiente.

## 3 Referencias:

- Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer User Guide. APPLIED BIOSYSTEMS. 2015.
- GeneMapper® ID-X Software. Version 1.5 APPLIED BIOSYSTEMS. 2015.
- ADN mitocondrial: Interpretación y valoración de resultados. Manuel Crespillo Instituto Nacional de Toxicología, Sección de Biología Barcelona (España). Tema 2,5.
- Armed Forces DNA Identification Laboratory. 1995. Extraction of DNA from Dried Skeletal Remains. Washington, D.C.
- Cambridge Sequence Reference (CRS)" Anderson et al. 1981
- Database Search: SAM2 Huber et al 2018
- El ADN mitocondrial en Medicina Forense. Fabio Peiró Codina et al. Laboratorio de Genética Forense. Universidad de Zaragoza (España).
- FBI Laboratory. DQ $\alpha$  Typing Protocols. USA. 1992.
- Microcon. Centrifugal Filter Devices. User Guide. Millipore. 2005.
- Base de datos de Bioquímica: <http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>
- Base de datos EMPOP: [WWW.empop.online/](http://www.empop.online/).
- SeqScape Software User Documents. Sanger sequencing mutation analysis software. Applied biosystems
- Nomenclature: ISFG recommendations Parson et al 2014
- Quality Control (QC): Parson and Dür 2007, Zimmermann et al 2011

## 4 Equipos y Materiales:

- Agitador magnético con calentador, Corning Stirrer/hot plate o similar.
- Agitador Thermomixer, Eppendorf o similar.
- Agitador tipo vortex.
- Anteojos de seguridad.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 4 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

- Bandas de goma para fijación, nuevas.
- Balanza granataria Mettler Toledo o similar.
- Balón aforado tipo Pirex de 1 y 2L
- Barra agitadora magnética.
- Beaker de 150mL y 1L.
- Bisturí limpio y estéril.
- Botellas de plástico de 100mL con tapa de rosca tipo Nalgene o similar, estériles.
- Botellas de vidrio ámbar de 1L.
- Botellas de vidrio de 100mL, estériles.
- Botellas de vidrio transparentes de 1L.
- Cajas petri plásticas o vidrio estériles de 100mm X 15mm, nuevas.
- Cámara de electroforesis.
- Cápsulas plásticas desechables para pesar.
- Capilla de extracción de gases.
- Centrífuga de ángulo fijo, Termo IEC Centra CL3R o similar.
- Cubreboca (mascarilla).
- Cubrecabeza (gorro)
- Cobertor para gradilla de microtubos de reacción microamp o similar.
- Control positivo (sangre humana conocida en mancha). Ver Anexo Número 3.
- Congelador -20° C.
- Detergente Terg-A-Zyme, Marca Alconox al 5% o similar.
- Espátulas limpias y estériles.
- Erlenmeyer de 1L.
- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Análisis de ADN Mitocondrial.
- Fuente de poder.
- [Gabacha desechable.](#)
- Guantes desechables.
- Gradillas para microtubos de reacción microamp o similar.
- [Hoja de cálculo: LR= Coeficiente de Verosimilitud mito V1](#)
- Hielera con hielo en escarcha.
- Hoja de bisturí #20 o similar, nuevas estériles.
- Libro de control de equipo Baño María en agitación.
- Libro de control de equipo Microscopio Olympus CH-2 o similar.
- Libro de control de equipo Centrífuga y Microcentrífuga.
- Lupa pequeña 10x.
- Marcador con tinta indeleble.
- Micropipeta ajustable de 2 a 20ul.
- Micropipeta ajustable de 20-200uL.
- Micropipeta ajustable de 100-1000uL.
- Microcentrífuga con rango entre 0-14000 r.p.m, o similar.
- Microscopio de luz binocular con lente de inmersión a 100x, Olympus CH-2 o similar.
- Papel Filtro circular marca Whatman # 4 de 90 mm Ø o similar.
- Pastillas magnéticas.
- Pinzas de punta curva.
- Pinzas de punta recta.
- Pizeta de 500mL.
- Placas ópticas de 96 hoyos microamp optical o similar.
- Placas de petri 150 mm X 20 mm o similar.
- Placas petri plásticas o vidrio esteriles de 100 mm x 15 mm.
- Peines para cámara de electroforesis.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 5 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

- Puntas para micropipeta de 5, 20-200uL nuevas y estériles.
- Porta y cubre objetos nuevos para observación al microscopio, estériles.
- Probetas estériles de 25, 100, 250, 500mL.
- pH metro.
- Reloj de intervalos.
- Recipientes de material plástico rígido (polietileno o polipropileno), impermeable y resistente a la perforación, golpes o caídas, provistos preferiblemente de un sistema que impida extraer los objetos desechados, preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra "punzocortantes" acompañada del símbolo de biopeligrosidad.
- Regla dividida en milímetros.
- Toallas de papel desechables.
- Toallas suaves desechables "Kimwipes", marca Kimberly-Clark o similar.
- Tubos Centricom-YM100 (concentradores) Millipore o similar, nuevos, estériles.
- Tubo cónico de 50mL, estériles.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5mL nuevos y estériles, marca Eppendorf o similar
- Transiluminador UV.

## 5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Acetato de sodio grado reactivo, Sigma o similar.
- Acetato de sodio 0,2 M. Ver Anexo Número 01.
- Acetato de sodio 3 M. Ver Anexo Número 01.
- Ácido acético glacial grado reactivo Sigma o similar.
- Ácido clorhídrico concentrado, grado reactivo, Código H-7020 Sigma o similar.
- Ácido etilén diamino tetracético disódico (EDTA), grado reactivo, Sigma o similar.
- Azul de bromofenol
- Agua de tubo.
- Agua desionizada tipo Milli Q estéril.
- Agua desionizada tipo Milli Q.
- Azul de Bromofenol.
- Azul de Bromofeno mas glicerol.
- Etanol absoluto grado reactivo (99,8-100%), J.T. Baker o similar.
- ExoSapIt.
- Buffers de carga para electroforesis Ver Anexo Número 01.
- Buffer de extracción (SEB) 10 mM Tris- 100 mM NaCl- 39 mM DTT- 10 mM EDTA- 2 % SDS, ver anexo Número 01.
- Buffer TE -4. Ver Anexo Número 01.
- Cloruro de sodio grado reactivo, Sigma o similar.
- Detergente Alconox o similar.
- Detergente Alconox al 5% solución. Ver Anexo Número 01.
- Descontaminante de ADN ARNnadas, DNA Away o similar.
- Ditiotreitól (DTT) grado reactivo, Sigma o similar.
- DNA Quantification Ladder Origene o similar.
- EDTA 0,5 M pH 8. Ver Anexo No.1.
- Etanol de 70 % grado comercial.
- Formamida.
- Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamil (25:24:1), Sigma o similar.
- Gel Red nucleic acid Gel Stain Sigma o similar.
- Glicerol.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 6 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

- Hidróxido de sodio, grado reactivo, Merck o similar.
- Hielo en escarcha.
- Mezcla DTT-SEB. Ver Anexo No. 1.
- Primers o imprimadores para ADN mitocondrial:
  - A1 (L 15997) 5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3 '
  - B2 (H 16237) 5'-GGC TTT GGA GTT GCA GTT GAT-3 '
  - A2 (L 16159) 5'-TAC TTG ACC ACC TGT AGT AC-3 '
  - B1 (H 16391) 5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC-3 '
  - A4 \* (L 16209) 5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3 '
  - B4 \* (H 16164) 5'-TTT GAT GTG GAT TGG GTT T-3 '
  - C1 (L 048) 5'-CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC-3 '
  - D2 (H 285) 5'-GGG GTT TGG TGG AAA TTT TTT G-3 '
  - C2 (L 177) 5'-TTA TTT ATC GCA CCT ACG TTC AAT-3 '
  - D1 (H 409) 5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC-3 '
- Proteinasa K, Sigma o similar. Ver Anexo No. 1.
- Sodio Dodecil Sulfato (SDS) de grado biología molecular, Sigma o similar.
- Solución de SDS al 10% y al 20%. Ver Anexo Número 01.
- Tris-Base, grado Biología Molecular, Sigma o similar.
- Tris-HCl 1 M (pH 8.0) pH8. Ver Anexo No. 1.
- 8-hidroxiquinolina (HQL) grado biología molecular, Sigma o similar.
- Xilol.

## 6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento de extracción debe realizarse en las áreas asignadas para este propósito en la Unidad de Genética Forense de la Sección de Bioquímica.

## 7 Procedimiento:

### 7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE ELEMENTOS PILOSOS.

**Nota 1:** Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento para el Analisis de ADN Mitocondrial: Sección de Bioquímica como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

**Nota 2:** Para todo el procedimiento, utilice cubrecabeza, cubreboca, gabacha desechable (blanca pre-amplificación y celeste post-amplificación), anteojos de seguridad y guantes desechables.

**Nota 3:** Si las muestras son elementos pilosos fijados (EP) en resina en porta-cubre objetos, se deberá realizar el desmontaje (separación), ver punto 7.1.1. De lo contrario pase a la etapa de lavado del EP, ver punto 7.1.2.

**Nota 4:** Si las muestras son sangre u otras pase a la etapa de Digestión-extracción de ADN, ver punto 7.1.3

#### 7.1.1 DESMONTAJE DE ELEMENTOS PILOSOS.

**7.1.1.1** Limpie la mesa de trabajo con papel toalla y etanol al 70% y/o DNA Away.

**7.1.1.2** Revise al microscopio la lamina y registre la presencia/ausencia de raíz del elemento piloso.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 7 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

- 7.1.1.3** Coloque la lamina de vidrio con el EP a una temperatura aproximada de  $\pm -20^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 1:30hrs.
- 7.1.1.4** En la cámara de flujo laminar, separe el EP de la lámina utilizando una pinza y bisturí, posteriormente, sumerja la lámina en una caja de petri de vidrio con xilol, para deshacer la resina y separe por completo el EP.
- 7.1.1.5** Coloque el EP en un tubo de 1.5ml rotulado con el número de OT y el número de muestra, para ello utilice una pinza, posteriormente agregue xilol limpio para eliminar residuos de resina/vidrio.
- 7.1.1.6** Coloque el EP en papel kimwipes o similar dentro de una placa de petri rotulada con el número de OT y el número de muestra y deje secar de 2 a 15 horas a temperatura ambiente para evaporar el xilol.
- 7.1.1.7** El EP esta listo para la etapa de lavado.

### **7.1.2 ETAPA DE LAVADO DEL EP.**

- 7.1.2.1** Limpie la mesa de trabajo con papel toalla etanol al 70% y/o DNA Away.
- 7.1.2.2** Coloque papel toalla desechable sobre la superficie de trabajo para cada EP
- 7.1.2.3** Coloque el EP sobre papel kimwipes o similar e identifique con el número de orden de trabajo (OT) correspondiente.
- 7.1.2.4** Corte el EP utilizando una hoja de bisturí estéril desde la parte proximal (raíz) entre 2-4 cm y coloque en un tubo de 1,5ml rotulado con el numero de OT y nombre de la muestra. Ver anexo 4.
- 7.1.2.5** Agregue 400ul de acetato de sodio 0,2M, 35ul de SDS 10% y 30ul de PK (20 mg/ml).
- 7.1.2.6** Coloque los tubos en el thermomixer a  $56^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente de 1:30 a 2:00hrs en agitación a 600-1000rpm.
- 7.1.2.7** Retire el tubo/s del thermomixer y coloque el EP en otro tubo 1.5ml nuevo rotulado con el numero de OT y agregue 1ml de buffer TE-4.
- 7.1.2.8** Agite manualmente para enjuagar el EP.
- 7.1.2.9** Retire el EP con pinza y coloque en papel kimwipes o similar y proceda a cortarlo en trocitos de aproximadamente 0,5cm utilizando una hoja de bisturí estéril y coloque los trozos en otro tubo de 1.5ml nuevo rotulado con el numero de OT y la identificación de de la muestra.

### **7.1.3 ETAPA DE DIGESTION-EXTRACCION DEL ADN.**

**Nota 5:** A partir de este paso se deben agregar al procedimiento un control positivo de extracción (CPE) y un control negativo de extracción (CNE).

- 7.1.3.1** Agregue 400ul de buffer de extracción SEB con DTT fresco (ver anexo 1) a cada muestra (EP, sangre, etc) y controles.
- 7.1.3.2** Además, agregue a cada muestra y controles 35ul de SDS y 30ul de PK (20mg/ml).
- 7.1.3.3** Coloque los tubos en el thermomixer a  $56^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche en agitación a 600-1000rpm.
- 7.1.3.4** Al menos 12hrs después se deberá visualizar si la totalidad del EP fue digerido.
- 7.1.3.4.1** Si no sucedió la digestión completa del EP (se observan restos de EP en el tubo), agregue de 4-10ul de PK y de 5-10 ul DTT en solución y coloque nuevamente en el thermomixer por apropiadamente de 1 a 4hrs o hasta que se complete la digestión del EP.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 8 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

#### **7.1.4 ETAPA DE LIMPIEZA Y CONCENTRACION DEL ADN.**

- 7.1.4.1** Agregue a cada tubo 400µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo 25:24:1v/v (el reactivo debe estar a temperatura ambiente). Este paso se debe realizar en la capilla de extracción de gases.
- 7.1.4.2** Agite los tubos en vortex de 25-30seg hasta obtener una apariencia lechosa.
- 7.1.4.3** Centrifugue los tubos a 14000rpm durante 5 minutos.
- 7.1.4.4** Utilizando una micropipeta, transfiera el sobrenadante de cada tubo a una columna con filtro microcon YM-100 rotulado con el número de OT y muestra. Se debe tener cuidado de no transferir la capa fenólica a la columna. (Ver Anexo 2).
- 7.1.4.5** Centrifugue todos los filtros microcon aproximadamente de 20 a 30min a 500xg.
- 7.1.4.5.1** Se debe evitar que el filtro se seque demasiado en la etapa de centrifugación.
- 7.1.4.6** Agregue a cada tubo microcon 400uL agua desionizada MilliQ estéril.
- 7.1.4.7** Centrifugue aproximadamente de 20 a 30min por 500xg.
- 7.1.4.8** Repita el paso (7.1.4.6 y 7.1.4.7) 3 veces más desechando el filtrado entre cada lavado.
- 7.1.4.9** En el último lavado se debe recuperar el ADN retenido en el filtro.
- 7.1.4.10** Saque el filtro del tubo y colóquelo invertido en otro tubo nuevo rotulado con el numero de OT y muestra.
- 7.1.4.11** Centrifugue por apropiadamente 5 min a 1000xg. Se debe obtener un volumen ideal de aproximadamente 50-70ul.
- 7.1.4.12** Traslade todos los extractos provenientes de/los EP al encargado del proceso de cuantificación en tiempo real.
- 7.1.4.13** Si el resultado de la cuantificación es mayor/igual a 0.01 ng/ul de ADN nuclear (ADNnu), proceda a trasladar los extractos al analista correspondiente para el montaje de marcadores genéticos autosómicos.
- 7.1.4.14** Si el resultado de la cuantificación de ADNnu es menor al indicado, proceda a realizar el análisis por ADN mitocondrial (ADNMit).
- 7.1.4.15** Almacene los extractos  $\approx -20^{\circ}\text{C}$ .

#### **7.2 AMPLIFICACION Y SECUENCIACIÓN DE ADNmt.**

##### **7.2.1 MONTAJE DE PCR DE AMPLIFICACIÓN ADNmt.**

- 7.2.1.1** Asegúrese, antes de comenzar a trabajar, disponer de suficiente material limpio y autoclavado (puntas, tubos para PCR, gradillas, cobertor, etc).
- 7.2.1.2** Utilizar guantes desechables, cubreboca, cubrecabezas y gabacha desechable de color blanco. No se debe ingresar en el área de pre amplificación (montaje de PCR y/ o recorte de muestras) con una gabacha que hubiera utilizado mientras manipulaba producto amplificado en el área de electroforesis o secuenciación.

**Nota 6:** Las gabachas que se utilizan en la zona de pre amplificación son de color blanco, diferentes a las utilizadas en la zona de post amplificación(electroforesis) que son color celeste. Esto evita posibles contaminaciones entre áreas. En caso ÚNICO de no contar con gabachas desechables, se utilizaran gabachas limpias debidamente rotuladas.

- 7.2.1.3** Limpiar con DNA Away o similar y/o etanol de 70% la cámara de PCR o de flujo laminar que se va a utilizar.
- 7.2.1.4** Limpiar las micropipetas que se van a utilizar con DNA Away o similar y/o etanol de 70% e introducir las a la cámara estéril o de flujo laminar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 9 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**7.2.1.5** Coloque todo el material a utilizar (puntas, cobertores de placas, placas, tubos de PCR, gradillas y pipetas) dentro de la cámara de bioseguridad.

**7.2.1.6** Irradie todo el material dentro de la cámara de PCR o de flujo laminar con luz ultravioleta por al menos 15 minutos.

**7.2.1.7** Limpiar la mesa de trabajo de los cubículos de montaje de PCR con DNA Away o similar y/o etanol de 70% cada vez que va a hacer un montaje.

**Nota 7:** El material usado en amplificaciones puntas, tubos de reacción y restos de muestras amplificadas deben ser desechados en recipientes de material plástico rígido (polietileno o polipropileno), impermeable y resistente a la perforación, golpes o caídas, provistos preferiblemente de un sistema que impida extraer los objetos desechados, preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra "punzocortantes" acompañada del símbolo de biopeligrosidad. Los guantes deben ser desechados en bolsas para material bioinfeccioso. Nunca lleve material amplificado a la zona de pre-amplificación como es el área de extracción de ADN o montaje de PCR.

**7.2.1.8** Los controles que se deben montar cada vez que se realice una amplificación son:

**-Control positivo de extracción y amplificación):** control de extracto con haplotipo conocido. Generalmente es una muestra de sangre.

**-Control negativo de PCR (de amplificación):** es un control que lleva todos los reactivos de la amplificación excepto la muestra de ADN.

**-Control positivo de amplificación (DNA 007): control comercial**

**-Control negativo de extracción:** es un tubo de 1,5mL que se incluye cuando se realiza la extracción de las muestras y que contiene solamente los reactivos que se usaron en dicha extracción.

**7.2.1.9** Descongelar, de ser necesario, los reactivos y mantenerlos en hielo escarchado.

**7.2.1.10** Homogenizar con agitador tipo vortex o similar los reactivos y en todo momento trabaje la mezcla de reacción sobre hielo.

**7.2.1.11** Determinar el número de muestras que se van a amplificar. Incluya los controles de amplificación que correspondan. (Ver punto 7.2.1.5). Sumar 1 ó 2 reacciones a este número para compensar la pérdida de volumen por el error de pipeteo. Ese será el número total de reacciones y asegura el contar con suficiente mezcla de reacción para todas las muestras.

**7.2.1.12** Preparar la mezcla de reacción en un tubo de microcentrifuga estéril nuevo de 1,5mL o de 0,5mL dependiendo del volumen a preparar, de acuerdo a la siguiente tabla.

ADN Mitocondrial
------------------

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 10 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Reactivo	Vol. por muestra (µL)
Agua desionizada tipo Milli Q, estéril	*
Buffer STR Gold 10X	2,5
Primer L (5 µM)	1
Primer H (5 µM)	1
Taq Polimerasa (5 unidades/µL)	0,8
ADN	4-12 µL (2ng)

\* El vol. del agua debe completar el vol. final de la reacción, igual a 25 µL.

**7.2.1.13** Para amplificar la región de interés utilice los siguientes pares de primers:

Para la región HV1: A1+B1

Para la región HV1A: A1+B2.

Para la región HV1B: A2 y B1.

Si la secuencia cae en el homopolímero: A4+B4

Para la región HV2: C1+D1.

Para la región HV2A: C1+D2.

Para la región HV2B: C2+D1.

Región HV1:	Región HV2
A1,L 15997	C1,L 048
B4,H 16164	D2,H 285
B2,H 16237	C2,L 177
A2,L 16159	D1,H 408
A4,L 16209	-
B1,H 16391	-

**7.2.1.14** Colocar un tubo de reacción de 0,2µL nuevo y autoclavado por cada reacción en la gradilla y soporte correspondiente o bien utilice un pozo de las placas ópticas MicroAmp de 96 pozos (Applied Biosystems) por cada reacción.

**7.2.1.15** Agregar, del total de la mezcla de reacción, el volumen correspondiente a cada tubo de reacción de la gradilla, y a los controles preparados en el punto 7.2.1.8. De último agregue el ADN correspondiente.

**7.2.1.16** Colocar el cobertor sobre la gradilla de tubos de 0,2ul y rotular la base (iniciales de analista, fecha) con un trozo de cinta con marcador de tinta indeleble.

**7.2.1.17** Limpiar utilizando papel toalla desechable y absorbente las mesas de trabajo, cámaras de flujo laminar, micropipeteadores y todas las áreas donde se trabaja con ADN con DNA Away o similar y/o etanol de 70%. Ver Procedimiento para Limpieza, Revisión, Control de Acceso y Descontaminación de Áreas del Laboratorio de Análisis de ADN.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 11 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**7.2.1.18** Debe desplazarse al área de Post-amplificación con la gradilla preparada manteniéndola en hielo (recipiente o bolsa desechable)

**Nota 8:** Para el manejo de los termocicladores ver Procedimiento para el uso y manejo del Termociclador Veriti y/o Procedimiento para el uso y manejo del Termociclador ProFlex.

**7.2.1.19** Seleccionar el programa correspondiente (ver tabla), iniciar el programa y una vez alcanzada una temperatura de al menos 80° C colocar la gradilla en el termociclador y cerrar la cubierta. 30 ciclos para elementos pilosos (escaso ADN) y 28 ciclos para sangres.

ADN Mitocondrial		
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos
95°C/3 min	Hold	1
95°C/1 min	Ciclos	28/32
55°C/1 min		
72°C/1 min		
72°C/7 min	Hold	1
4°C	Hold	1

**7.2.1.20** Luego de la amplificación, almacene la gradilla a -20° C hasta que se realice la cuantificación de ADN por medio de gel de agarosa. Almacene este amplificado en el área de post-amplificación exclusivamente.

## 7.2.2 CUANTIFICACIÓN DE ADNmt (GEL DE AGAROSA)

**Nota 9:** Este proceso se realiza para el estudio de ADN mitocondrial y confirmar la amplificación de ADN, tanto en las muestras como en los controles. En caso de ADN nuclear la cuantificación se realiza mediante el PCR Tiempo Real y se realiza antes de realizar el procedimiento de amplificación. (Ver Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real).

**7.2.2.1** Preparación del gel de agarosa al 1% en buffer TBE al 0,5X con colorante Gel Red:

**7.2.2.1.1** Pese 0,43 g de agarosa.

**7.2.2.1.2** Agregue la agarosa a un erlenmeyer de 125 ml

**7.2.2.1.3** Agregue 43 ml de Buffer TBE 0,5X al erlenmeyer de 125 ml.

**7.2.2.1.4** Caliente y agite con pastilla magnética hasta que se disuelva la agarosa completamente.

**7.2.2.1.5** Agregue 1,5 ul de Gel Red.

**7.2.2.2** Colocar la base donde se chorreará el gel, dentro de la cámara de electroforesis horizontal, en la posición donde queden los lados descubiertos contra la pared. Colocar uno o dos peines de acuerdo a la cantidad de muestras.

**7.2.2.3** Verter lentamente con el fin de no ocasionar burbujas y colocar los peines y esperar a que solidifique por un mínimo de 30 minutos. Lavar inmediatamente el erlenmeyer utilizado con abundante agua de tubo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 12 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

- 7.2.2.4** Retirar los peines del gel preparado e introducirlo en la cámara de electroforesis y agregue buffer TBE al 0,5X que cubra el gel aproximadamente 0,5 cm.
- 7.2.2.5** Elaborar un esquema de montaje de las muestras y controles según la ubicación que tendrán en los pozos del gel. Preparar una dilución para cada una de las muestras y controles mezclando 2µL de buffer de corrida (Ver Anexo Número 1) con 5µL del producto amplificado. Se debe tomar en cuenta que se debe colocar la escalera de peso molecular para cuantificación de ADN.
- 7.2.2.6** Colocar 5 µL de cada una de las diluciones (punto 7.2.3.5) de las muestras y controles en el pozo correspondiente y de igual forma la escalera, según esquema (punto 7.2.3.5).
- 7.2.2.7** Conectar los electrodos a la fuente de poder y encender la fuente de poder (presione el botón de encendido) y programar a 100 voltios por un tiempo aproximado entre 30-50 minutos.
- 7.2.2.8** Una vez terminado el tiempo de corrida proceda a apagar la fuente de poder y desconectar los electrodos.
- 7.2.2.9** Coloque el gel en el transiluminador y coloque la tapa correspondiente para protegerse contra los rayos U.V.
- 7.2.2.10** Encienda el transiluminador y realice la lectura comparando la intensidad de la banda presente en cada una de las muestras con las diferentes intensidades que muestra la escalera de cuantificación de ADN.

**7.2.2.11** Anote el resultado (ng/ul de la banda) en el esquema correspondiente.

### **7.2.3 LIMPIEZA DEL PRODUCTO DE PCR.**

- 7.2.3.1** Agregue 2ul de reactivo ExoSap-it o similar por cada 5ul de producto PCR amplificado a cada tubo de amplificado de ADN Mitocondrial.
- 7.2.3.2** Coloque los tubos en un termociclador e inicie el programa de limpieza ExoSap-it correspondiente.
- 7.2.3.3** El producto de PCR purificado, esta listo para proceder con la reacción de secuenciación. Esta placa se puede almacenar hasta por una semana a una temperatura de -20°C.

### **7.2.4 PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN (*Big Dye Terminator*).**

**Nota 10:** El montaje de esta reacción de secuenciación (reactivos) debe prepararse en el área de pre-amplificación. El ADN amplificado debe incorporarse luego en el área de Post-amplificación.

- 7.2.4.1** Calcule la cantidad de reactivos a utilizar por reacción de acuerdo al siguiente cuadro:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 13 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

ADN Mitocondrial	
Reactivo	Vol. por muestra (µL)
Agua desionizada tipo Milli Q, estéril	*
Big Dye V1,1	4/8
*Primer (1,6 µM) una dirección	2
Buffer dilucion 5X	0/2
ADN**	1-2µL (2ng)

\*El vol. del agua debe completar el vol. final de la reacción igual a 20 µL.

\*\* El ADN (respectivo) debe ser agregado en el área de post-amplificación.

**Nota 11:** Se requiere montar una reacción para cada dirección (forward y reverse) en tubos separados de cada pareja de primers utilizados en la amplificación.

**Nota 12:** Una vez preparadas las reacciones de secuenciación debe desplazarse al área de post-amplificación para agregar el ADN transportando la gradilla en hielo (recipiente o bolsa desechable).

**Nota 13:** Para el manejo de los termocicladores ver Procedimiento para el uso y manejo de Termociclador Veriti y/o Procedimiento para el uso y manejo de Termociclador Proflex.

**7.2.4.2** Coloque la placa de secuenciación en el termociclador y amplifique utilizando el siguiente protocolo:

ADN Mitocondrial		
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos
96°C/1 min	Hold	1
91°C/10 seg	Ciclos	26
50°C/ 5 seg		
60 °C/4 min		
4 °C	Hold	1

## 7.2.5 LIMPIEZA PRODUCTO DE SECUENCIACION

### 7.2.5.1 Purificación con Kit X-Terminator

**7.2.5.1.1** Agregue en una placa de 96 pozos de 0.5-10 ul del producto de secuenciado

**7.2.5.1.2** Mezcle 22,5 ul del reactivo SAM y 5 ul de reactivo X-Terminator para cada reacción.

**7.2.5.1.3** Agregue a cada muestra 27,5ul de la mezcla preparada en el punto anterior.

**7.2.5.1.4** Selle la placa con film adhesivo.

**7.2.5.1.5** Coloque la placa en el thermomixer a 2000 rpm 30-50 minutos.

**7.2.5.1.6** Centrifugue la placa a 1000 xg/2 minutos.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 14 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**7.2.5.1.7** Tome del sobrenadante 10 ul de cada muestra y la colocó en otra placa de 96 pozos.

**7.2.5.2** Proceda a realizar la electroforesis capilar en el Analizador Genético respectivo.

### 7.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

**Nota 14:** Realice la comparación de los Haplotipos para ambas direcciones (forward y reverse) de las regiones completas (HV1 y HV2) con respecto a la secuencia de referencia "Cambridge Sequence Reference (rCRS)" Anderson et al. 1981, aceptada y utilizada a escala mundial en el campo de la identificación forense. Anote las discrepancias encontradas

**Nota 15:** Esta pericia permite excluir a un individuo falsamente acusado, y en casos de coincidencia no es individualizante, debido a que los haplotipos son compartidos por miembros de la misma línea materna y en menor grado al azar en la población en individuos no emparentados entre si.

**7.3.1.1** Una vez obtenido los resultados (archivos datos crudos) deben ser analizados con el programa SeqScape v2.1 o superior, disponible en la Sección de Bioquímica.

**7.3.1.2** Ensamble los datos crudos corridas generadas del ABI para cada una de las direcciones, en el programa de análisis SeqScape.

**7.3.1.2.1** Inicie con el análisis de los controles positivos (CPE y CNE) para validar la corrida.

**7.3.1.3** Obtenga los haplotipos de las muestras, de no lograrse la región completa, debe re-secuenciar con otros primers para obtener la mayor información posible de la región.

**7.3.1.3.1** De sospechar del fenómeno de "heteroplasmia", se debe valorar y analizar otro tejido del mismo individuo. En caso de EP, se deben analizar de 1-5 EP de diferentes zonas del cuerpo.

**7.3.1.4** Las lecturas de los electroferogramas en el SeqScape, la debe verificar un segundo Perito competente para confirmar el haplotipo resultante. (Firmar verificación registro en Formulario "Estudio de haplotipos (ADN mitocondrial).

**7.3.1.5** Los resultados se deben reportar de la siguiente manera:

SITUACION	INTERPRETACION
Secuencias idénticas	No exclusión
Heteroplasmia en mismo nucleótido en ambas	No exclusión
Un nucleótido de diferencia sin evidencia de heteroplasmia	No concluyente
Dos o más nucleótidos de diferencia sin evidencia de heteroplasmia	Exclusión

**7.3.1.6** En caso de No exclusión, se determinará la frecuencia del haplotipo (Counting method) en relación con la bases de datos de la población de Costa Rica (ver anexo No.05) y población hispana para Centro América) referida en la Base de datos de frecuencias Haplotípicas de ADN Mitocondrial EMPOD (ver anexo No.06) y/o se determinará el valor de Likelihood ratio (razón de verosimilitud) LR (ver anexo 07)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 15 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**Nota 16:** Los haplotipos de ADNmt en casos de mezclas de fluidos biológicos, no se analizan ya que este tipo de análisis no es el ideal para distinguir mezclas; determinar perfiles con mezclas de ADNmt se considera una práctica sumamente arriesgada, especialmente cuando existen desbalances significativos entre los componentes de dicha mezcla.

## 8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

El control negativo "CN" no debe producir amplificación, mientras que control positivo "CP" debe de originar amplificación.

## 9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

## 10 Reporte de Análisis y Resultados:

En el dictamen pericial se debe colocar lo siguiente:

### RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

**NO AMPLIFICA:** Los extractos preparados a partir del indicio descrito, no contienen la cantidad mínima necesaria de ADN para lograr la amplificación del haplotipo mitocondrial, debido a la escasa cantidad y/o degradación del material genético. Por lo que debe considerarse como negativo para efectos de esta investigación.

**EXCLUSION:** El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", es distinto al haplotipo de "xxx". Por lo tanto, se pueden excluir que dicha "muestra x" proceda de dicha persona o de algún familiar que comparta la línea materna.

**NO CONCLUYENTE:** El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", difiere en solo en una posición con respecto al haplotipo de "xxx" (sin evidencia de heteroplasma). Por lo tanto, no se puede incluir ni excluir que dicha "muestra x" proceda de "xx" o de algún familiar que comparta la línea materna.

**NO EXCLUSION:** El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", coincide con el haplotipo de "xxxx" en todas sus posiciones. Por lo tanto, no se puede excluir que dicha procedan de "xxx", o de algún familiar que comparta la línea materna.

Consultada la base de datos de ADN mitocondrial de la población costarricense se encontró que xx de las xxx personas que componen esa base de datos presenta el mismo perfil de la muestra reseñada como CASO XX. Ver anexo

Consultada la base de datos de ADN mitocondrial de EMPOP se encontró que xx de las xx personas de origen hispano (Centro America) que componen esa base de datos presenta el mismo perfil de la muestra reseñada como CASO XX. Ver anexo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 16 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

### 11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Todo material biológico es fuente potencial de patógenos.
- Utilizar siempre mascarilla, anteojos y guantes al manipular reactivos
- Descarte apropiadamente los material punzocortante.
- Descarte los desechos orgánicos en envases apropiados y rotulados

### 12 Simbología:

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- CPE: Control Positivo extracto.
- CNE: Control negativo extracto
- **CN PCR: Control negativo de PCR**
- **CP PCR: AmpF $\Phi$ STR™ DNA Control 007 (human male genomic DNA) o similar**
- **CN SEC: Control negativo de Big Dye Terminator**
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses.
- EP: Elemento piloso.
- N/A: No aplica.
- LOM: Lamina de vidrio Porta-cubre objetos para la observación al microscopio.
- **OT: Orden de trabajo**
- PK: Proteinasa K.
- PON: Procedimiento de Operación Normado.
- RPM: Revoluciones por minuto.
- SCD: Solicitud de Cambio Documental.
- SDS: Sodio Duodecil Sulfato.
- SEB: Amortiguador sales EDTA .
- SGC: Sistema de Gestión de la Calidad.
- UGC: Unidad de Gestión de la Calidad.
- UGF: Unidad de Genética Forense
- XG: Gravedades

### 13 Terminología:

- CNE: Consiste de un tubo de 1,5 mL, al que se agregan todos los reactivos salvo la muestra biológica a extraer y se somete a los mismos procesos de la muestra.
- CPE: consiste de un tubo de 1,5 mL y al que se le agrega una muestra (ADN conocido) que amplifique para asegurarse que las condiciones de las reacciones fueron las adecuadas.
- **Heteroplasmia: Diferentes tipos de ADN en el mismo organismo**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 17 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

#### 14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
<b>01</b>	Preparación de reactivos
<b>02</b>	Diagrama de ensamble del Tubo Centricon
<b>03</b>	Preparación de controles
<b>04</b>	Tipos de raíz de elemento piloso
<b>05</b>	Almacenamiento y búsqueda en bases de datos mitocondrial mtDNAManager-V1
<b>06</b>	PON Consulta base datos mitocondrial (EMPOP) V1
<b>07</b>	Coeficiente de Verosimilitud mitocondrial

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 18 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**Anexo No. 01**  
**Preparación de reactivos**

**Acetato de sodio 3 M**

En un beaker de vidrio de 150ml disuelva 13,6 gramos de acetado de sodio en 80mL de agua desionizada tipo Milli Q. El pH se ajusta (pH 8) agregando ácido acético glacial, mida con pHmetro. Ajuste el volumen final a 100mL y trasvase a una botella de vidrio de 100mL. Esterilice por autoclavado. [Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses \(revisar que no este turbio\)](#)

**Acetato de sodio 0,2M**

En un tubo cónico de 50 mL o similar mezcle en una proporción 1:15, solución preparada 3M con agua desionizada tipo Milli Q.  
[Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses \(revisar que no este turbio\).](#)

**Buffers de carga para electroforesis**

Prepare Buffer de Azul de Bromofeno (migración nominal 300bp) 25mg de azul de Bromofenol, 30ml de Glicerol y afora a 10ml con agua desionizada tipo Milli Q.  
[Almacene a temperatura ambiente hasta 8°C](#)

**Buffer TE-4 (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 (1L).**

Mida con una probeta de 25mL, 10mL de la solución 1M Tris-HCl (pH 8,0), y con una pipeta de vidrio de 1mL, 0,2mL de la solución de 0,5M EDTA. Agregue lo anterior a un balón aforado con 990mL de agua desionizada tipo Milli Q y lleve a su aforo. Autoclave la solución y almacene a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio transparente.  
[Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses \(revisar que no este turbio\).](#)

**Buffer de extracción SEB preparación fresca con DTT**

En una capsula desechable, pese 0,004gr/400ul SEB preparado. Este reactivo se debe prepararse cada vez que se utilice.

**EDTA 0,5 M pH 8**

Para 1L agregue 186,10g de la sal disódica del EDTA a 800mL de agua desionizada tipo Milli Q en un balón aforado. Agite vigorosamente con una barra magnética. Ajuste el pH 8 (use el pH metro) agregando perlas de NaOH (aprox. 20,00g).  
**Nota 17:** El EDTA no se disuelve hasta que se ajuste el pH. Ajuste el volumen a 1L con agua desionizada tipo Milli Q. Trasvase a botella de vidrio transparente.  
Esterilice por autoclavado.

[Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses \(revisar que no este turbio\)](#)

**Preparación del Buffer de extracción SEB: \***

En un beaker de 1L disolver 5,84g de NaCl en 500mL de agua desionizada tipo Milli Q. Pase esta solución a un balón aforado de un litro y agregue 10mL de Tri-HCL 1M, 20mL de EDTA 0,5M y 100mL de SDS al 20%. Mantener a pH 8 con HCl concentrado (use el pH metro). Lleve el volumen final con agua desionizada tipo Milli Q y estéril a la marca del balón aforado para ajustar un litro.

[Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses \(revisar que no este turbio\).](#)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 19 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**Preparación de Jabón Alconox:**

Solución al 5 %.

Pese 5,00gr de Alconox y disolver en 100mL de agua desionizada tipo Milli Q.

Almacene en botellas de plástico o vidrio de 100mL con tapa de rosca tipo Nalgene o similar, estériles.

Almacene a 4° C hasta por 6 meses.

**Proteinasa K, 20 mg/mL (600 UI/mL):**

A un frasco de Proteinasa K liofilizada de 100,00mg, agregue 5mL de agua desionizada tipo Milli Q estéril. Para mantener estable el reactivo, realice alícuotas de 10-50ul.

Almacene indefinidamente a -20°C

**Tris- HCl 1 M pH 8**

Pese 121,10grs de Tris-Base y disuelva en 800mL de agua desionizada tipo Milli Q ajustando el pH a 8 con HCl concentrado (Use el pH metro).

Aforar con agua desionizada tipo Milli Q en balón aforado de 1L.

Autoclave en una botella de vidrio transparente.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio)

**SDS 10% p/v**

Use mascarilla para pesar el SDS.

Disolver lentamente 100,00g de dodecil-sulfato de sodio en 800mL de agua desionizada tipo Milli Q estéril. Para ayudar a que se disuelva, la solución puede calentarse. Ajustar a 1L en balón aforado, trasvasar a botella de vidrio transparente.

Almacene a temperatura ambiente por un año.

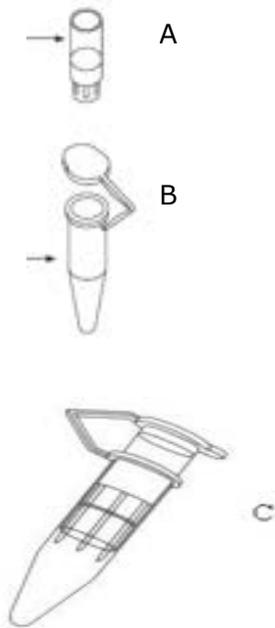
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 20 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**Anexo No. 02  
DIAGRAMA DE ENSAMBLAJE DE LOS TUBOS MICROCON**

User Guide: MICROCON®, Centrifugal Filter Devices,

A- Filtro y Tubo B-ensamblaje

C-Ensamble del tubo Centricon



COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 21 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

### **Anexo No. 3**

#### **Preparación de controles**

##### **Control positivo:**

Impregne sangre humana de un 1(a) donador(a) que no participe en análisis en una tarjeta FTA, rotule como control positivo y seque a temperatura ambiente en la cámara de secado Air Clean Systems. Una vez seco, recorte círculos de 1 o 2 mm<sup>2</sup> con el mini-sacabocados limpio o con tijeras de metal también limpias. Guarde en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL tipo "eppendorf" o similar rotulado como control positivo. Este control se debe almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración. La preparación de estos controles se deberá registrar en el "Formulario para Reactivos Preparados".

##### **Control negativo:**

[Control de reactivos.](#)

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 22 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**Anexo No. 04**

**Tipos de raíz del elemento piloso**

Fases con presencia de células epiteliales adheridas en diferentes fases				
				
<u>Telógena-1</u>	<u>Telógena-2</u>	<u>Catágena-1</u>	<u>Catágena-2</u>	<u>Anágena</u>
Es la última fase de la vida, donde se produce la pérdida o caída del mismo		Fase de crecimiento donde se ralentiza.		Fase de crecimiento donde se desarrolla

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 23 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

### Anexo No. 05

#### Almacenamiento y búsqueda en bases de datos mitocondrial mtDNAManager-V1

La base de datos mitocondrial de la Sección de Bioquímica, se encuentra almacenada en la aplicación Web mtDNA manager <http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>  
Se almacenan los datos de los haplotipos y también permite realizar búsquedas, tanto en la base BQM como en otras bases de datos de otros países.

1. Realizar el registro: ingresar una dirección de correo y definir una clave o inicie la sesión

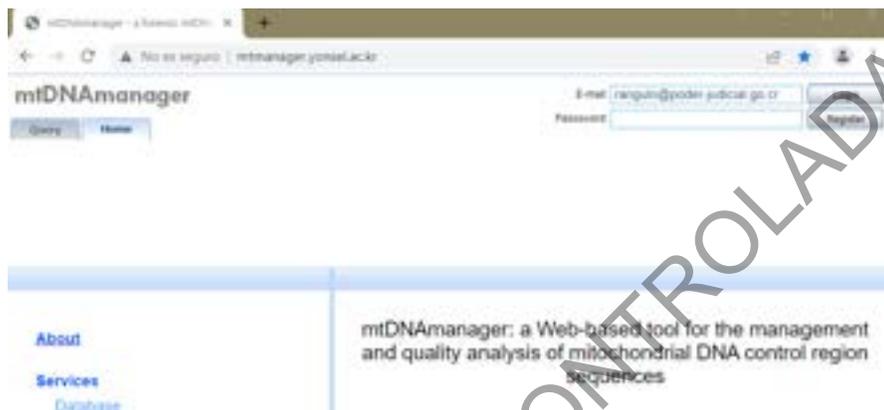
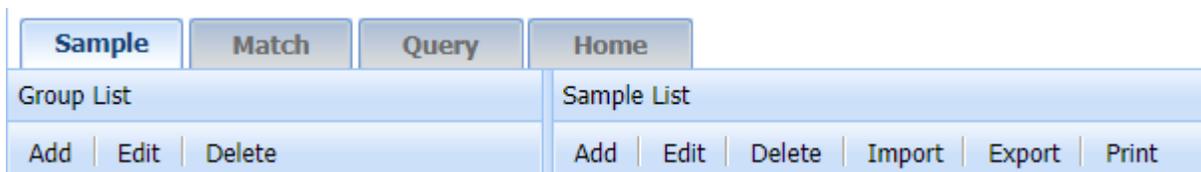


Fig.1 Registro de usuario

2. Presenta un menú de pestañas:



En la cejilla de **sample** aparece el siguiente desplegable:



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 24 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Primero se define el **Group list** (su base de datos) con un nombre e indicando en **Group Información** datos de su interés.

Fig. Definir Group list

En **sample list** aparecen varias cejillas las cuales sirven para manipular los datos correspondientes al **Group List**, definido anteriormente.

- Add** (adiciona los haplotipos)
- Edit** (puede hacer cambios editarlos)
- Delete** (borrar)
- Import** (importar datos)
- Export** (exportar los datos)
- Print** (imprime las búsquedas y resultados)

**Ejemplo** de un ingreso de datos:

Seleccione el **Group List**: con el que va a trabajar en nuestro caso HV1 y HV2.

Seleccione el **Sample List**: agregue los datos de la secuencia del haplotipo.

Sample ID: Ingrese el número de OT.

Descripción: es dato es opcional, se puede registra el Nombre de la muestra.

Fig.3 Edición de datos

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 25 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Seleccione **submit** para salvar o guardar la información.

3. Luego se despliega de esta forma:

Sample ID	Expected HG	Estimated HG	rp 1024-1050	rp 001-437	rp 438-576	Comments	Description
18-12126	A2	A2	16111 16223 16296 16319 16342	73 146 153 235 263 309 1C 315 1C			Asal imp. case 19-850
A 17-2918				73 263 309 1C 309.2C 315 1C			Sangre
A 17-2919	C1		16296 16325 16327	73 249d 263 290d 291d 309 1C 315 1C			Sangre patología
A17-1649	B4	B4	16183C 16189 16217	73 263 309 1C 315 1C			FEMUR

Fig. 4 Listado de la búsqueda

En la cejilla **Match:**

Se utiliza para buscar la frecuencia del haplotipo estudiado en las base de datos (Working Group)

The screenshot shows the 'miDNAManager' application. On the left, under 'Working Group', there is a list of groups including 'Autopsias', 'BASE DATOS P. Sangre oleridos-imputados', 'E. FILLOSOS cas. CASOS BQM-Costa Rica', 'MISSING-hueso HAPLOTIPOS IDENTIDAD', 'PRUE. INTERLA C.CAL-2015', 'Revision', and 'STAFF-BQM PERSONAL DCF Costa Rica'. On the right, under 'Working Sample', there is a list of samples including '18-12126', 'A 17-2918', 'A 17-2919', and 'A17-1649'. Below these lists, there are 'Matching Option' and 'Matching Result' sections. The 'Matching Option' section has radio buttons for 'Region' (HV1, HV2, HV3, Control Region) and a checkbox for 'Optim' (ignore heteroplasmic insertions in the poly C stretch). The 'Matching Result' section has fields for 'No. of Matched Samples' and 'No. of Target Samples'.

Fig. 4 Selección de la búsqueda

Ecoja el **Working group** señalando con un click y en **Target Group** señala con un click, la muestra de trabajo correspondiente que desea comparar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 26 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Luego:

- En la ventanilla **My mtDNA** aparece todos los **Working group** definidos por usted, el cual puede señalar con un click para iniciar la búsqueda como se ve en la figura Fig.5

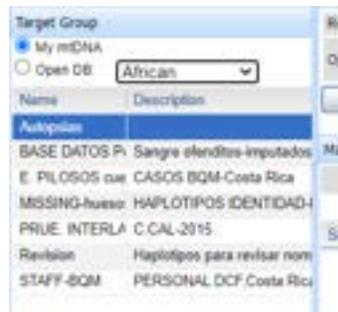


Fig.5 escogencia del target grup

También pude realizar búsquedas en la pestaña **Open DB**, De bases de datos de otros países o grupos, seleccionando

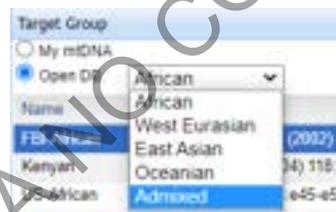


Fig.6 Seleccionando Bases de datos

- En **Matching Options**:

Las búsquedas se pueden realizar de tres formas o fuentes: Seleccionando los grupos con que quiere comparar.

**Matching Option**

Region  HV1  HV2  HV3  Control Region

Option  Ignore heteroplasmic insertions in the poly C-stretches

Maximum number of mismatched nucleotides

Fig.7 Escoja la región a comparar y las opciones indicadas

**En Match:**

Realiza la búsqueda de los grupos seleccionados el **Working Group**, con la muestra **Working Sample** correspondiente **Vrs** el grupo a buscar **Target Group** seleccionado.

**El Match All:**

Realiza la búsqueda con todos los grupos de su **My mtDNA** definidos por usted

**En Worldwide Frequency:**

Realiza la búsqueda con todos los grupos (bases de datos) de su **My mtDNA y Open DB**

Ejemplo de una búsqueda:

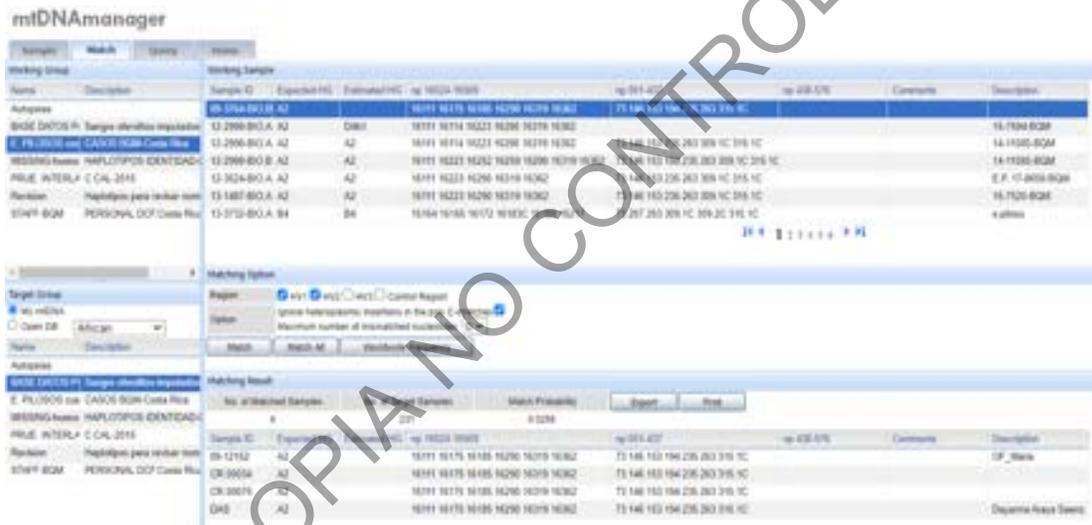
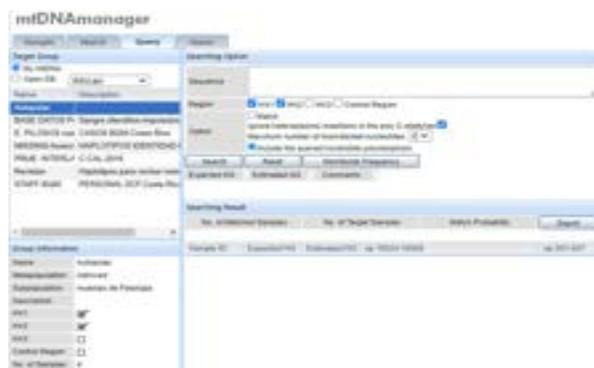


Fig. 8 Selección de coincidencia

En la cejilla **Query:** "consulta"



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 28 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Fig. 9 Consulta del haplotipo

Puede realizar la consulta o búsquedas ingresando la **secuencia** en el cuadro, escoger la **región** y las **opciones** que crea conveniente **versus** seleccione la **Target Group** que desee. Luego, de click en la cejilla correspondiente. Comentado anteriormente como:



La cual se comporta de la misma forma indicada.



Los resultados aparecen de esta forma:

Matching Result							
No. of Matched Samples	No. of Target Samples	Probability	Export		Print		
4	231	0.256					
Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16063	np 001-437	np 438-576	Comments	Description
09-12152	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C				OF_Maria
CR-00034	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C				
CR-00075	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C				
DAS	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C				Dayanna Araya Saenz

Fig.10 Resultado de búsqueda

- Número de nuestras coincidentes
- Total de muestras comparadas
- Probabilidad de coincidencias
- Exportar los datos
- Imprimir en DDF

También, aparece información de:

- ID muestra
- El HG (haplogrupo) esperado
- El HG estimado
- La secuencia resultante en regiones
- Comentarios: puede aparecer un dato que podría necesitar revisión (alerta)
- Descripción adicional de la muestras

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 29 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

**NOTA:**

- Automáticamente, se guardan los datos ingresados en la base al abandonar la aplicación
- Puede imprimir la base de datos en exportar con este formato



Luego, puede abrir el archivo como aparece.  
De aceptar y se despliega una ventana como esta.

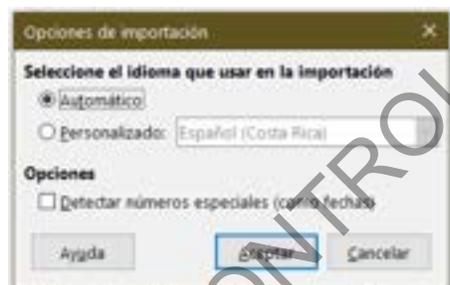


Fig.11 Opciones de importar

- Acepte y aparecen los datos en hoja electrónica, los cuales puede salvar con otro formato.

En las búsquedas, se puede **imprimir:** de click y aparece como sigue:

Sequence Match Information Print

Sequence	10111 10175 10185 10200 10210 10362 T3 146 153 164 226 263 315 1C
Region	MT HV2
Option	Ignore heteroplasmic insertions at the poly-C stretches. Maximum number of mismatched nucleotides: 3
Expected HG	A2
Estimated HG	
Comments	

Target Group: BASE DATOS Poblacional MT-BQM

No. of Matched Samples	No. of Target Samples	Match Probability
4	231	0.026

Matched Sample List

Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 1024-1030	np 091-437	np 438-576	Comments	Description
BR-12152	A2		10111 10175 10185 10200 10210 10362 T3 146 153 164 226 263 315 1C				CF_Mara
CR-00034	A2		10111 10175 10185 10200 10210 10362 T3 146 153 164 226 263 315 1C				
CR-00076	A2		10111 10175 10185 10200 10210 10362 T3 146 153 164 226 263 315 1C				
Z40	A2		10111 10175 10185 10200 10210 10362 T3 146 153 164 226 263 315 1C				Diapirna maya Saenz BQM

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 30 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

Fig.12 Impresión

Luego, puede seleccionar el formato a imprimir:

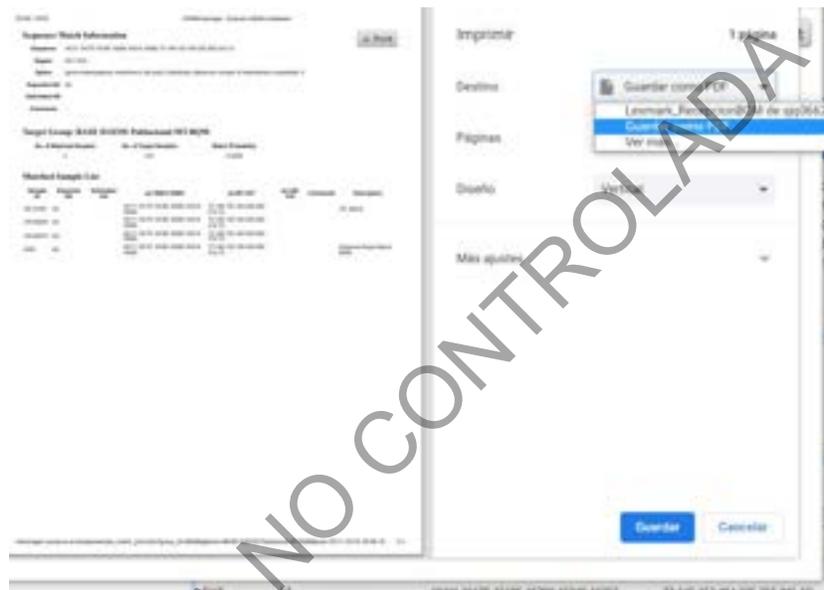


Fig.13 Formato de impresión

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 31 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

## Anexo No. 06

### Consulta en base de datos mitocondrial (EMPOP) V1

Base datos DNAmT EMPOP <https://empop.online/>

La base de datos EMPOP apunta a la recolección, control de calidad y presentación de búsqueda de haplotipos de ADNmt de diversas poblaciones mundiales.

1. El análisis de DNAmT es una herramienta poderosa para excluir muestras que se originan del mismo individuo / matrilinea. Si no se pueden excluir dos muestras, la importancia de la coincidencia de ADNmt se evalúa haciendo referencia a la abundancia de esa secuencia de ADNmt particular (= mitotipo) en una población relevante.



Fig. 1 Interfase de la aplicación EMPOP

2. Proceda al registro de usuario y contraseña EMPOP o inicie la sesión
  - Se identifica por la dirección de correo electrónico
  - Siga las instrucciones para registrarse.
  - Se enviará un correo electrónico con un enlace que completa el registro.

Ver fig.1

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 32 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

3. Se presenta 4 cejillas para consulta:



- Query (consulta)
- Populations (Poblaciones)
- Tools (varios)
- Contribute (contribuciones)

NOTA: En nuestro caso, por el momento nos interesa la cejilla Query

4. En **Query**: de "click" y rellene los datos solicitados:

- Sample ID (Identificación de la muestra)
- Rangos (Ingrese el rango 16024-16365, 73-340, etc)
- Profile (Ingrese el perfil o haplotipo a investigar)
- Pude marcar otras opciones que considere necesario (pero por default se puede quedar así)

Fig.2 Ingreso de datos solicitados

5. De "click" en submit (enviar/ok), donde aparece los resultados y otras cejillas.



**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E  
INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL**

**P-DCF-ECT-BQM-55**

**En Result:**

Entre las cejillas horizontales de color azul de interés tenemos:

- **Entire Database** (Base de datos completa)
- **Fequency** (frecuencia del haplptipo estudiado)
- **By Origin** (Por origen, Paíces con base de datos representados)
- **By Metapopulation** (Por metapoblación)

Origin	Frequency	Chances
Central America	503696.0	1.0000e+0
Africa	4.02577	1.1210e-1
America	36.78227	1.0000e-1
Asia	3.12700	1.0000e-1
Australia (continent)	0.00000	0.0000e+0
Europe	0.00000	0.0000e+0
Oceania	0.00000	0.0000e+0
Final origin		
By Metapopulation	Frequency	Chances
Sub-Saharan African	457436	1.0000e-1
West African	3.07481	1.0000e-1
South Asian	0.00000	0.0000e+0
East Asian	0.00000	0.0000e+0
Southwest Asian	0.00000	0.0000e+0
Native American	0.00000	0.0000e+0
Admixed	4.02960	1.0000e-1
Oceania	0.00000	0.0000e+0

Fig. 3

6. En nuestro caso, nos interesa la consulta de datos poblacionales para Centro América:

- En el espacio "Find origin" (encuentre el origen), introduzca "central america"
- Aparece los países con base de datos representados

**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL**

**P-DCF-ECT-BQM-55**

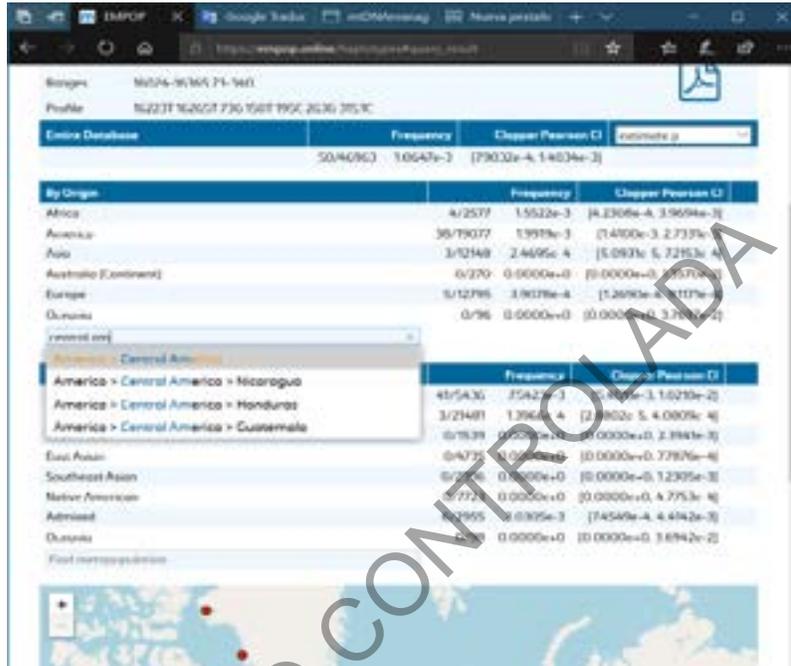


Fig. 4 Resultados de los Países de Centro América

7. En el mismo espacio "Find origin", puede escribir los Países representados de la figura 4:  
 - Los detalles de las frecuencias de los haplotipos para cada País, aparecerán

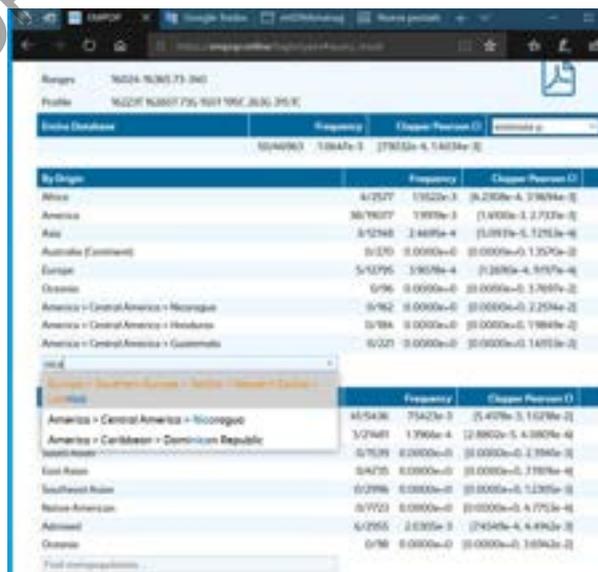
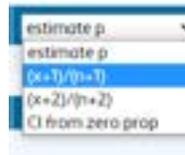


Fig. 5 Frecuencia del haplotipo estudiado por País representado

8. Los resultado obtenidos se respaldan, dando "click" en el este icono



9. En el espacio derecho seleccione la formula de probabilidad (color azul) de Balding y Nichols para calcular el LR



**10. En Details:**

Puede aparecer algunos detalles del haplogrupo

**11. En Neighbors:**

Aparecen detalles de los vecinos del haplotipos.

QUERY POPULATIONS TOOLS CONTRIBUTE										
Query Result Details <b>Neighbors</b> Alignment Haplogrouping										
Sample ID: 21-1998-A25-803										
Ranges: 16224-16265-73-340										
Profile: 16293C 16229A 16293K 16281T 16279T 16293G 16300G 16293C 16354T 73G 746C 1601T 1693C 263G 1957C										
3 of 5 haplotypes shown.										
Origin	Metapopulation				Count	Mutations	Ignored Mutations	Haplogroup (HRC)		Publications
Continent	Region	Country	Province	City	Count	Mutations	Ignored Mutations	Rank 1	Rank 2	Publications
America	Northern America	United States of America	North-Carolina		117	2	A6293C (0.72) T7627C (0.45)		L2a-N029 L2d	AFOL 2011
America	Northern America	United States of America	California	Orange County	117	2	A6293C (0.72) T7627C (0.45)		L2a-N029 L2d	AFOL 2011
America	Northern America	United States of America	Arizona	Mesa	147	2	C7628T (0.75) A6293C (0.72)		L2a7c	L2a-N029 AFOL 2012
America	Northern America	United States of America	California	Orange County	147	2	C7628T (0.75) A6293C (0.72)		L2a7c	L2a-N029 AFOL 2012
Africa	Eastern Africa	Rwanda			147	2	C7628T (0.75) A6293C (0.72)	3093a6C (0.000)	L2a7c	L2a-N029 Augustin 2010
America	Caribbean	Jamaica			147	2	C7628T (0.75) A6293C (0.72)	167933 167932a6C (0.000) 3093- 3093a6C (0.000)	L2a7c	L2a-N029 AFOL 2012

Fig.6 Haplotipos vecinos

### 12. En Alignment:

Aparece el alineamiento filogenético, los cual deben coincidir, o aparece un aviso (revisar)



Fig. 7 Alineamiento filogenético

### 13. En Haplogrouping:

- Aparece la haploagrupación.
- Puede aparecer una a varias posibilidades, dependiente de los datos. Escoger el mejor Haplogrupo
- Un valor de **"Cost"**, el cual debería ser el menor valor. Pero, puede valorarse de acuerdo a las **Missing Mutarions** y **Extra Mutations** un la menor coincidencia con un mayor **"Cost"**.

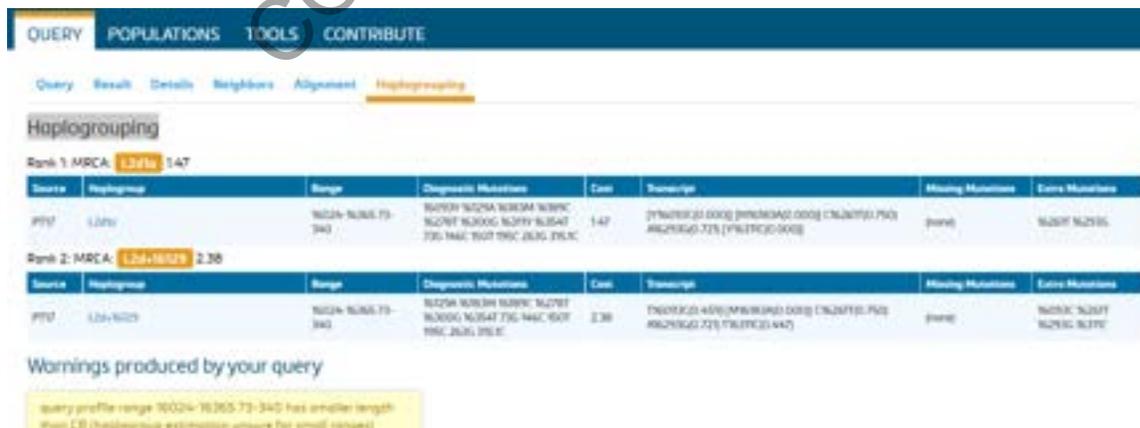


Fig. 8 Haplogrupo y cost

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 37 de 37
<b>PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACION DE ADN MITOCONDRIAL</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-55</b>	

### Anexo No. 07

#### Coeficiente de Verosimilitud mitocondrial

$$LR = \frac{p(E|H_p)}{p(E|H_d)}$$

----- Hipótesis Fiscal  
----- Hipótesis Defensa

Es el método de corrección de Balding y Nichols

$$\text{Donde } p = \frac{x+1}{N+1}$$

x= número de observaciones del haplotipo en la base de datos

N= número total de haplotipos en la base de datos

El +1 es la corrección de coincidencia

COPIA NO CONTROLADA