



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	1 de 19

CUANTIFICACIÓN DE ADN

ACTUALIZADO	REVISADO	APROBADO
Nombre: Any Rojas	Nombre: Yazmín Castillo	Nombre: Hebe Monteza
Firma:	Firma:	Firma:
Puesto: Enlace de Calidad	Puesto: Supervisor Técnico	Puesto: Jefe del Laboratorio
Fecha:	Fecha:	Fecha:



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	2 de 19

ÍNDICE

1. OBJETIVO	4
2. ALCANCE	4
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	4
4. REFERENCIAS	4
5. DIAGRAMA DE FLUJO	4
6. RESPONSABILIDADES	4
7. EQUIPOS E INSUMOS	5
8. REACTIVOS Y SOLUCIONES	5
9. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	5
9.1. Completar Formato de Hoja de Trabajo.	5
9.2. Preparar diluciones seriadas del estándar de ADN.	5
9.3. Preparar la mezcla de reacción de la cuantificación.	7
9.4. Crear el “Experimento” en el equipo.	9
9.5. Ejecutar el experimento en el equipo ABI-7500.	14
9.6. Aceptar o rechazar los resultados.	15
9.7. Realizar re-análisis (si aplica)	15
10. GUÍA DE CONCLUSIONES / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	16
10.1. Guía de Conclusiones	16
10.2. Interpretación de resultados	16
11. FORMATOS	16
11.1. FM-AB-PA-12 – Formato de Uso de Equipo	16
11.2. FM-AB-PA-13 – Formato de Hoja de Trabajo de Extracción de ADN	17
11.3. FM-AB-PA-15 – Formato de Hoja de Trabajo de Amplificación de ADN	17
11.4. FM-AB-PA-22 – Formato de Hoja de Trabajo de Cuantificación de ADN	17
11.5. FM-AB-PA-24 – Formato de Reporte para Re-Análisis	17
12. SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL	17
13. TABLA DE CONTROL DE CAMBIOS	18



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	3 de 19

14. ANEXOS _____ 19

Copia No Controlada



INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	4 de 19

1. OBJETIVO

Describir las instrucciones a seguir para la cuantificación de tres (3) regiones de ADN humano en el equipo ABI 7500.

2. ALCANCE

Para uso en el Laboratorio de Análisis Biomolecular, por personal autorizado, específicamente para determinar la cantidad y calidad del ADN humano extraído.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Blanco de reacción o NTC (del inglés: *Non template Control*):** se refiere a una muestra conformada únicamente por los reactivos que se utilizan para la cuantificación del ADN y que pasa por todo el proceso igual que una muestra.
- **ng/μL:** nanogramos/microlitro.
- **STD.:** estándar.
- **μL:** microlitro.

4. REFERENCIAS

- Manual del Sistema de Gestión de la Calidad, **MC-GC-01**.
- Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits User Guide. Número de publicación 4485354. Revisión G, **DE-AB-PA-21**.

5. DIAGRAMA DE FLUJO

No aplica.

6. RESPONSABILIDADES

Puesto	Responsabilidades
Perito	– Cumplir con todas las actividades descritas en este Procedimiento.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	5 de 19

Puesto	Responsabilidades
Supervisor Técnico	<ul style="list-style-type: none">– Realizar supervisión del correcto cumplimiento de todas las actividades descritas en este Procedimiento.– Realizar Revisiones Técnicas.
Líder Técnico/Enlace de Calidad	<ul style="list-style-type: none">– Realizar Revisiones Técnicas.– Realizar las modificaciones o cambios a los documentos.
Jefe del Laboratorio	<ul style="list-style-type: none">– Aprobar el presente Procedimiento

7. EQUIPOS E INSUMOS

ABI 7500 Real Time PCR System, cabina de bioseguridad, centrifuga, micropipetas, vortex,

8. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Quantifiler Trio DNA Quantification Kit.

9. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

9.1. Completar Formato de Hoja de Trabajo.

9.1.1. Completar el Formato de Hoja de Trabajo de Cuantificación de ADN, **FM-AB-PA-22**, con el listado de las muestras que se van a procesar.

9.2. Preparar diluciones seriadas del estándar de ADN.

9.2.1. Descongelar los reactivos a temperatura de cuarto, si es la primera vez que se va a utilizar el kit; si no es la primera vez, estos estarán almacenados en refrigeración a temperatura de 2 a 8°C aproximadamente, por lo que no será necesario descongelarlos.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	6 de 19

9.2.2. Rotular cinco tubos de 0.2 mL (STD. 1, STD. 2, STD. 3, STD.4 y STD. 5) para la preparación de las diluciones seriadas del estándar de ADN (Quantifiler® THP DNA Standard) y preparar las diluciones del estándar como se muestra en la Tabla No.1.

Estándar	Concentración (ng/ μ L)	Preparación de la dilución (Volumen de estándar + Volumen de Buffer de dilución)	Factor de dilución
STD. 1	50.000	10 μ L (100 ng/ μ L Quantifiler® THP DNA Standard) + 10ul Buffer de dilución	2X
STD. 2	5.000	10 μ L (STD.1) + 90 μ L Buffer de dilución	10X
STD. 3	0.500	10 μ L (STD.2) + 90 μ L Buffer de dilución	10X
STD. 4	0.050	10 μ L (STD.3) + 90 μ L Buffer de dilución	10X
STD. 5	0.005	10 μ L (STD.4) + 90 μ L Buffer de dilución	10X

Tabla No. 1

9.2.3. Dispensar la cantidad indicada de buffer de dilución en cada tubo.

- ❖ Para preparar el estándar 1 (STD. 1): mezclar por agitación (vortex a máxima velocidad) durante 3-5 segundos el tubo de Quantifiler® THP DNA Standard y colocar 10 μ L en el tubo de dilución STD. 1, mezclando con la micropipeta 30 veces y al finalizar descartar la punta de la micropipeta utilizada.
- ❖ Para preparar los estándares 2-5 (STD. 2 – STD. 5): usar una nueva punta de micropipeta, tomar 10 μ L de la dilución del estándar anterior y transferirla al siguiente tubo de dilución como se describió en la preparación del STD. 1. Repetir estas indicaciones para cada estándar hasta concluir con la preparación del STD. 5).



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	7 de 19

Nota A: es posible almacenar los estándares de ADN diluidos a una temperatura de 2°C a 8°C aproximadamente, hasta por dos semanas posterior a su preparación, y estos ser utilizados en cuantificaciones de ADN que se realicen en ese periodo de tiempo. De ser almacenados, los mismos deben estar identificados con la fecha de preparación, iniciales de quien los preparó, número de lote y de la caja del kit que se utilizó para prepararlos; además deben estar debidamente sellados (protegidos) para evitar derrames y/o aperturas involuntarias. Posterior a las dos semanas de almacenamiento deben ser descartados. El cumplimiento de esta actividad será monitoreado por el Supervisor Técnico.

9.3. Preparar la mezcla de reacción de la cuantificación.

9.3.1. Mezclar por agitación (vortex a máxima velocidad) la solución de “primers” (Quantifiler Trio® Primer Set) durante 3 - 5 segundos aproximadamente y centrifugar presionando el botón “spin” durante 10 segundos.

9.3.2. Mezclar por agitación manual el tubo la solución de mezcla maestra (Quantifiler Trio® Master Mix).

9.3.3. Rotular con la palabra “MIX” un tubo de 1.5mL para la preparación de la mezcla de reacción utilizando el volumen requerido de los reactivos de acuerdo a la cantidad de muestras que se vayan a analizar, como se describe en la Tabla No. 2 a continuación.

Reactivos	Volumen para 1 Muestra
Quantifiler Trio® Master Mix	10.0 µL
Quantifiler Trio® Primer Set	8.0 µL

Tabla No. 2

9.3.4. Mezclar por agitación (vortex a máxima velocidad) durante 3-5 segundos y centrifugar presionando el botón “short spin” durante 5 segundos.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	8 de 19

9.3.5. Utilizar un plato óptico de 96 pocillos y dispensar 18 μ L de la mezcla de reacción a cada pocillo que será utilizado del plato (el plato óptico debe estar colocado sobre una gradilla para platos de 0.2 mL durante su manipulación por el Perito).

9.3.6. Colocar 2 μ L de los estándares, de las muestras y del blanco de reacción (NTC) en las posiciones como se describe en la tabla No.3. El blanco de reacción (NTC) se debe colocar en el último pocillo seguido de la última muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD.1	STD.1										
B	STD.2	STD.2										
C	STD.3	STD.3										
D	STD.4	STD.4										
E	STD.5	STD.5										
F	Muestra	Muestra										
G	Muestra	Muestra										
H	Muestra	NTC										

Tabla No. 3

9.3.7. Sellar el plato con laminilla óptica transparente, utilizando la espátula plástica, reforzando los bordes de cada pocillo para evitar evaporación de la (s) muestra (s).

9.3.8. Si se observan burbujas en el plato, removerlas. Para esto se recomienda que mientras el plato se encuentra sobre la gradilla o bandeja, dar golpes suaves de la gradilla contra la mesa de trabajo para eliminar las burbujas. Verificar cada pocillo del plato (por la presencia de burbujas) y si es necesario dar un golpe suave al pocillo correspondiente con la punta del dedo (con guantes).

Nota B: este paso es crítico para evitar ruido en la señal de fluorescencia que puede ser ocasionado por la presencia de burbujas.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	9 de 19

9.3.9. Centrifugar el plato a 3000 rpm durante 20 segundos y repetirlo hasta asegurarse de que ningún pocillo mantenga burbujas.

9.3.10. Trasladar el plato al equipo ABI-7500 y colocarlo en la posición correcta utilizando como referencia la posición A1 del plato.

Nota C: posterior a la interpretación de los resultados, las muestras que no serán utilizadas para fases posteriores son devueltas a su ubicación original (descrita en el registro de Hoja de Trabajo de Extracción de ADN, **FM-AB-PA-13**) en la Sala de Extracción de ADN. Mientras las muestras se encuentren en proceso de análisis se mantendrán preservadas en el congelador disponible para ello en la sala Pre-PCR con la identificación de “Muestras en Proceso de Análisis. No Tocar”.

9.4. Crear el “Experimento” en el equipo.

9.4.1. Encender el equipo ABI-7500 y registrar su uso en el Formato de Uso de Equipo, **FM-AB-PA-12**.

9.4.2. Abrir el programa HID Real-Time PCR Analysis Software versión 1.2, utilizando el ícono del programa “HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2” que se ubica en la pantalla principal de la computadora que se encuentra conectada al equipo.

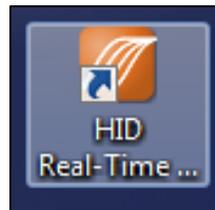


Imagen No. 1

	INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR	PL-AB-PA-06	
	PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN	Versión	03
		Vigencia	08/11/2019
		Página	10 de 19

9.4.3. Seleccionar la opción “Log in as Guest” que aparece en la ventana emergente, como se muestra a continuación:

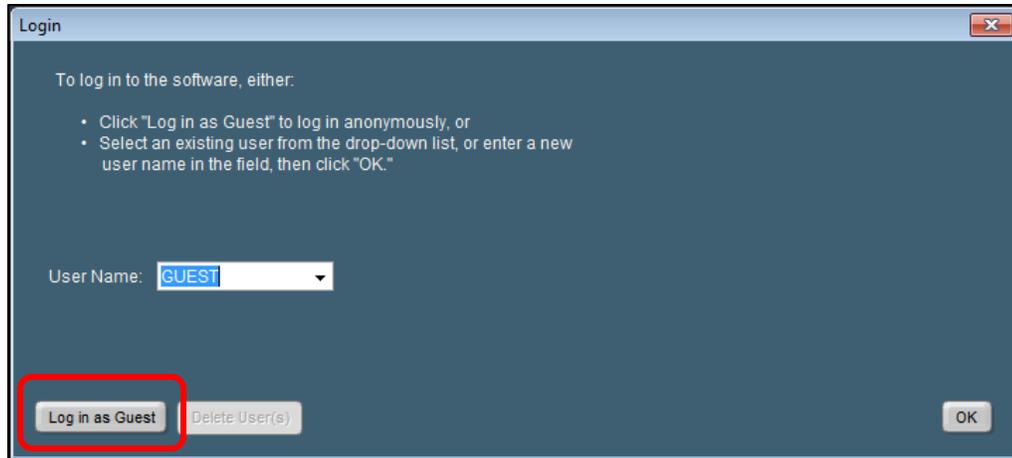


Imagen No. 2

9.4.4. Seleccionar la opción “Quantifiler Trio” para configurar la hoja del experimento colocando su nombre en mayúscula cerrada, como se muestra a continuación:

NOMBRE DEL MÉTODO – FECHA DE LA CUANTIFICACIÓN (INICIALES DEL PERITO
+ NUMERO SECUENCIAL DE LA CUANTIFICACIÓN DE ESE DÍA)

Ejemplo: **QUANTIFILERTRIO – 03-SEP-2017 (AR1)**



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	11 de 19

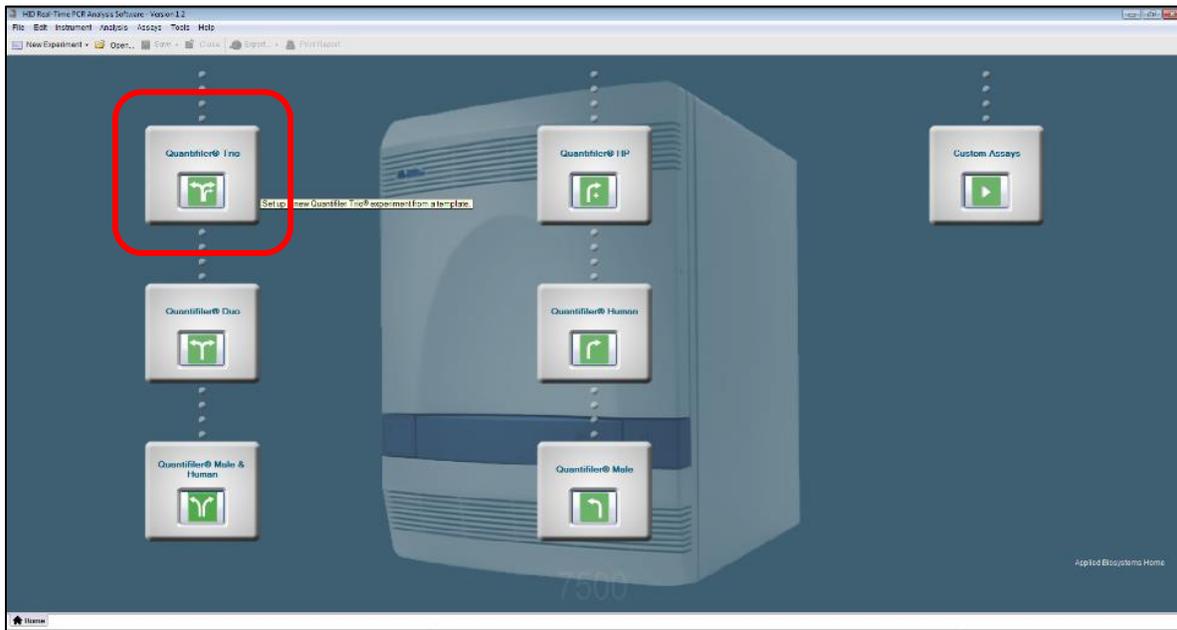


Imagen No. 3

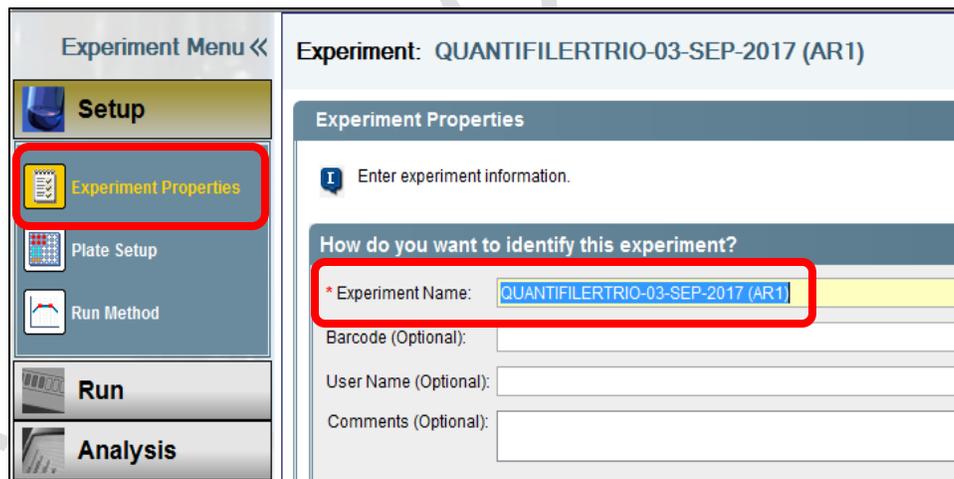


Imagen No. 4

9.4.5. El Perito define los nombres de las muestras, selecciona el tipo de muestra (estándar, muestra desconocida y blanco de reacción o NTC) y su posición en el plato de la cuantificación y esto lo puede realizar utilizando la opción “Plate Setup”-“Define Targets and Samples” (como se indica en el Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits User



INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	12 de 19

Guide, **DE-AB-PA-21**) o la opción “Assign Targets and Samples”. A continuación, se muestra una de las formas de realizar esta actividad utilizando la opción “Assign Targeted and Samples” (actividad 9.4.7 y 9.4.8):

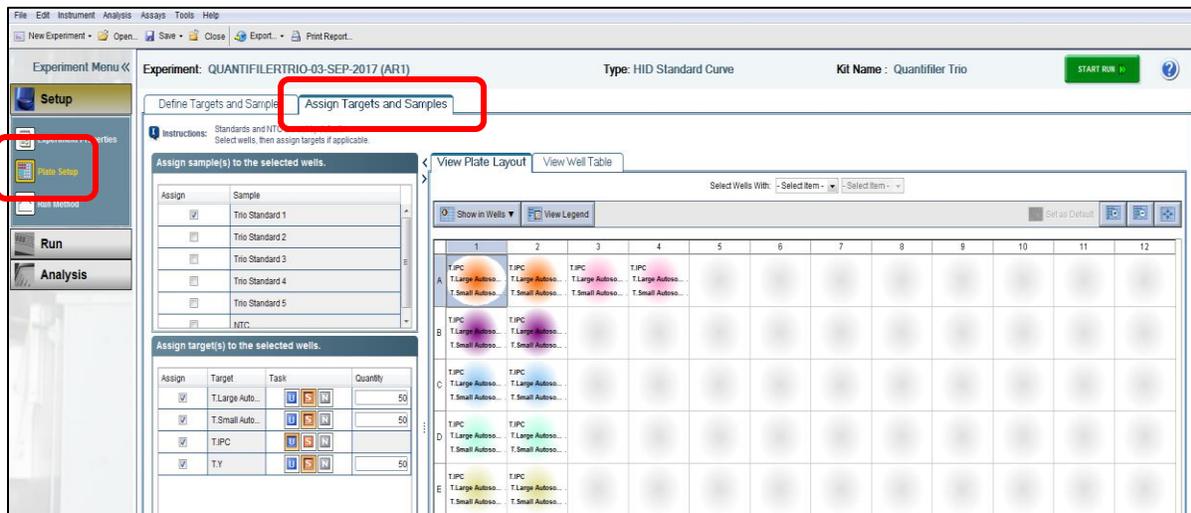


Imagen No. 5

9.4.6. Al realizar esta actividad es ir a las posiciones A3 y A4, de la plantilla del plato en el programa con los NTC que se muestran predefinidos y para ello realiza lo siguiente:

- ❖ Colocar el cursor sobre el pocillo A3 o A4 (uno a la vez), presionar el botón derecho del “mouse” y seleccionar la opción “Clear”.

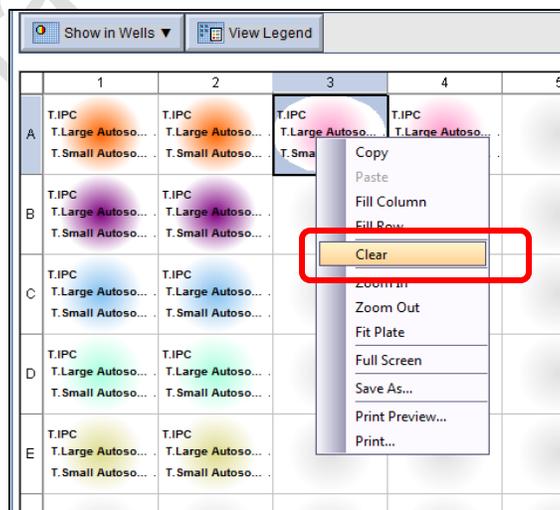


Imagen No. 6

9.4.7. Para realizar la creación de las muestras debe colocarse con el cursor en la posición del plato donde debe situar la muestra, presionar el botón izquierdo del “mouse” dos veces seguidas y se mostrará la opción de “Add New Sample” o añadir una nueva muestra, la cual debe seleccionar para escribir el código de la muestra correspondiente como se muestra a continuación:

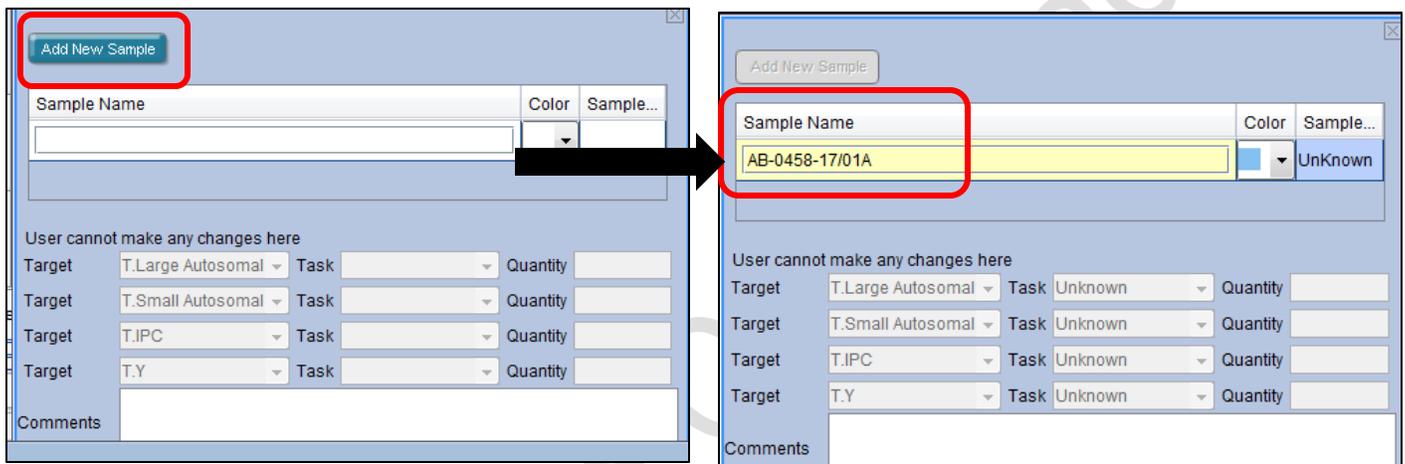


Imagen No. 7

9.4.8. Para realizar la selección del tipo de muestra creada debe seleccionar en esa misma ventana emergente la opción “Sample” y se desplegarán las opciones de “Standard” (si se trata de uno de los estándares de ADN proveídos por el fabricante), “Unknown” (si se trata de una muestra desconocida o de la cual requiero determinar la concentración de ADN) y “NTC” (si se trata de un blanco de reacción).



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	14 de 19

Add New Sample

Sample Name	Color	Sample...
AB-0458-17/01A	[Blue]	UnKn... Standard UnKnown NTC

User cannot make any changes here

Target	T.Large Autosomal	Task	Unknown	Quantity	
Target	T.Small Autosomal	Task	Unknown	Quantity	
Target	T.IPC	Task	Unknown	Quantity	
Target	T.Y	Task	Unknown	Quantity	

Comments

Imagen No. 8

9.5. Ejecutar el experimento en el equipo ABI-7500.

9.5.1. Verificar la transcripción de las muestras descritas en el registro de Hoja de Trabajo de Cuantificación de ADN, **FM-AB-PA-22**, y dejar constancia de ello en dicho registro (esto puede ser realizado por el mismo Perito que está realizando la cuantificación).

9.5.2. Dar inicio a la cuantificación seleccionando la opción "START RUN", la cual tiene una duración estimada de 1 hora.



Imagen No. 9



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	15 de 19

9.5.3. Una vez finalizada la corrida debe apagar el equipo ABI 7500 (si este no va a ser utilizado durante el resto del día), sacar el plato óptico con las muestras y descartarlo.

9.6. Aceptar o rechazar los resultados.

9.6.1. El Perito utiliza el Procedimiento de Interpretación de Resultados de la Cuantificación de ADN por PCR en Tiempo Real, **PL-AB-PA-10**, para determinar si acepta o rechaza los resultados obtenidos.

9.6.2. Si los resultados son aceptados se prepara para la amplificación del ADN y de requerir una dilución de la concentración del ADN en esa (s) muestra (s) es el Perito de amplificación quien la realiza utilizando para ello el HID Real-Time PCR Analysis Software como se describe en el Instructivo de Preparación de Diluciones para PCR utilizando el HID Real-Time PCR Analysis Software, **IT-AB-PA-09**, dejando constancia del factor de dilución en el Formato de Hoja de Trabajo de Amplificación de ADN, **FM-AB-PA-15**.

9.6.3. Si los resultados no son aceptados o si la cantidad de ADN obtenida no cumple con los parámetros establecidos por el Laboratorio, se continúa con la actividad 9.7. de este Procedimiento.

9.7. Realizar re-análisis (si aplica)

9.7.1. En el caso de no obtenerse ADN, de que la cantidad obtenida no sea suficiente o con la calidad necesaria o si durante la interpretación de resultados de la corrida de cuantificación no se cumplen los parámetros establecidos en el Procedimiento de Interpretación de Resultados de la Cuantificación de ADN por PCR en Tiempo Real, **PL-AB-PA-10**, el Perito debe verificar si se requiere realizar nuevamente la cuantificación o la extracción de ADN.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	16 de 19

9.7.2. En el caso de requerir realizar nuevamente una extracción de ADN debe verificar si aún existen muestras adicionales disponibles y de ser así puede realizar su extracción previa autorización utilizando para ello el Formato de Reporte para Re-Análisis, **FM-AB-PA-24**.

9.7.3. En el caso de requerir realizar la cuantificación de una o más muestras nuevamente procede a realizarlo previa autorización utilizando para ello el Formato de Reporte para Re-Análisis, **FM-AB-PA-24**.

10. GUÍA DE CONCLUSIONES / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

10.1. Guía de Conclusiones

10.1.1. La forma de redactar las conclusiones en el Informe Pericial, relacionadas con casos a los cuales se les ha aplicado este Procedimiento, se describen en el **Instructivo de Confección de Informe Pericial, IT-AB-PA-24**.

10.2. Interpretación de resultados

10.2.1. La interpretación de los resultados que se obtienen posterior al cumplimiento de este Procedimiento se describe en el **Procedimiento de Interpretación de Resultados de la Cuantificación de ADN por PCR en Tiempo Real, PL-AB-PA-10**.

11. FORMATOS

11.1. FM-AB-PA-12 – Formato de Uso de Equipo

Este Formato se utiliza para mantener un registro en el Laboratorio del personal que utiliza los equipos, el momento en el cual los utiliza y la limpieza antes y después de su uso.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	17 de 19

11.2. FM-AB-PA-13– Formato de Hoja de Trabajo de Extracción de ADN

Este Formato se utiliza para registrar las muestras que se extraen durante un proceso de análisis, los reactivos e insumos que se utilizan y los parámetros generales del proceso de extracción.

11.3. FM-AB-PA-15– Formato de Hoja de Trabajo de Amplificación de ADN

Este Formato se utiliza para registrar las muestras que se amplifican durante un proceso de análisis, los reactivos e insumos que se utilizan y los parámetros generales del proceso de amplificación.

11.4. FM-AB-PA-22– Formato de Hoja de Trabajo de Cuantificación de ADN

Este Formato se utiliza para registrar las muestras que se cuantifican durante un proceso de análisis, los reactivos e insumos que se utilizan.

11.5. FM-AB-PA-24– Formato de Reporte para Re-Análisis

Este Formato se utiliza para realizar la solicitud de autorización de un re-análisis.

12. SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

Durante la aplicación de este Procedimiento es deber del Perito cumplir con las Políticas internas de uso de implementos de bioseguridad en las áreas de procesamiento de las muestras, así como cumplir con las actividades de limpieza y organización de su área de trabajo antes y después del procesamiento de las muestras.



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Y CIENCIAS FORENSES
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOMOLECULAR**

PL-AB-PA-06

PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Versión	03
Vigencia	08/11/2019
Página	19 de 19

14. ANEXOS

No aplica.

Copia No Controlada