

SER029-17 Final Report

Archivo # : SER029-17

Fecha: 04 de Mayo de 2017.

Informe de Expertos

Nombre del Experto: Stephen Fratpietro, Máster., Licenciatura en Educación
Título: Director Técnico, Laboratorio de Paleo-ADN.

Yo, el abajo firmante, a petición de Thierry Jamin, del Instituto Inkari-Cusco, presenta mi opinión profesional en relación con el siguiente asunto: Examen de los objetos expuestos para el análisis de ADN (antiguo).

OBJETOS EXAMINADOS :

Los siguientes elementos (ver Tabla 1) fueron presentados por Thierry Jamin, del Instituto Inkari-Cusco para análisis genéticos. Estas muestras fueron identificadas por el laboratorio de ADN paleográfico (PDL) de la siguiente manera y con un número de muestra.

Designació PDL	Muestra PDL	Tipo de Muestra	Comentarios
SER029-17	1	Tejido desconocido	Posible muestra de biomateriales de un cerebro craneal
SER029-17	2	Hueso y Tejido	Muestras óseas extraídas de una mano (posiblemente no humana)

Tabla1. Muestras sometidas al Laboratorio de Paleo-DNA.

EXAMEN SOLICITADO: Análisis de ADN antiguo: extracción de ADN, prueba de viabilidad del ADN mitocondrial y nuclear, identificación universal y identificación de género.

REQUISITOS SOLICITADOS: Determine si se podría extraer información genética de la muestra. A menos que se indique lo contrario, los protocolos de extracción, purificación y amplificación estándar de la industria se utilizarán e intentarán en este caso. El Laboratorio de Paleo-ADN aceptó trabajar en el proyecto de acuerdo con altos estándares científicos y profesionales, pero como no hemos participado en la recolección y almacenamiento de la muestra, ni hemos inspeccionado la muestra, ni hemos evaluado el estado de la misma, el Laboratorio de Paleo-ADN no prometió éxito en el logro de ningún

SER029-17 Final Report

resultado deseado. El Laboratorio de Paleo-ADN llevó a cabo este proyecto sin ofrecer ninguna garantía de idoneidad para un fin determinado, ni ninguna otra garantía, expresa o implícita, sobre los resultados de su proyecto o las pruebas llevadas a cabo en el marco de su proyecto. Esto no incluye ninguna garantía de que el protocolo recomendado logrará los resultados deseados.

METODOLOGIA DE EXAMEN:

Todas las muestras de ADN se preparan antes de la amplificación en una sala dedicada específicamente a muestras de ADN de cantidad limitada. Este ambiente es monitoreado trimestralmente por la presencia de ADN. Este laboratorio tiene acceso restringido y requiere que se use equipo de protección en todo momento: traje tyvek que cubra la cabeza y los pies, guantes, redecilla y mascarilla. Todas las personas que ingresan a este laboratorio tienen su ADN perfilado y guardado para futuras comparaciones.

Preparación de las muestras

Todas las muestras de ADN se esterilizan con dos lavados de agua estéril y un lavado de etanol al 70%. Cada muestra se muele por separado en un polvo fino utilizando un molino mezclador.

Extracción del ADN

Desmineralización total [Loreille y al, 2007] :

Aproximadamente 1-2g de polvo de muestra se mezcla con 9.0mL M EDTA, 150uL 20% Lauryl Sarcosinate, y 100uL Proteinase K (20mg/mL) en un tubo estéril de 15.0mL. Esta reacción se incuba durante la noche a 56°C con una agitación suave. El sobrenadante resultante se transfiere al siguiente paso.

Purificación de perlas de sílice [Boom y al, 1990] :

El sobrenadante se mezcla con tiocianato de sílice y guanidinio 15 ul de 4M 18 ml. Descansar la solución durante 4 horas a 4 ° C para permitir que la sílice se una a la sílice, después de lo cual se elimina el sobrenadante y el resto de la sílice se lava con tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, 50 mM). NaCl, EDTA 1 mM, etanol anhidro y etanol al 100%, luego se deja secar. La sílice se resuspende en 55 l de agua estéril y se incuba durante 1 hora a 56 ° C para permitir que el ADN elimine el enlace de sílice y se disuelva en agua. El sobrenadante resultante se transfiere al siguiente paso.

SER029-17 Final Report

Purificación de columna de exclusión de tamaño [Matheson y al, 2009]

El extracto de ADN purificado se filtra posteriormente utilizando las columnas de cromatografía Biorad Micro Bio-Spin P30 según las instrucciones del fabricante.

**Es importante señalar que un control de extracción (negativo) se lleva a cabo a lo largo de todo el proceso como medida de control de calidad. **

Amplificación PCR

El ADN se amplifica en reacciones de 25uL utilizando Quanta Biosciences™ AccuStart™ II PCR Supermix (2X) con 12.5uL de AccuStart II PCR Supermix (2X), 0.25uL de 10uM cada imprimación, 3uL plantilla. Parámetros de ciclo: arranque en caliente de 94° durante 2 min. y 50 ciclos de 94°C durante 30s, 60°C durante 1 min. y 72°C durante 2 min.

Los tamaños de los amplicones varían en longitud y se distinguen entre sí. Los cebadores utilizados amplifican las regiones 16s, mt16191-16420 y 12s del ADN mitocondrial.

Información de la cartilla:

16s6	5'-TTCGGTTGGGGGGGCGACCTCGGGGAG-3'	Poinar et al. 2001. PNAS. 98(8): 4317-4322
16sB	5'-CTCCGGGTTTGAACCTCAGATC-3'	Xiong y Kocher 1991. Genoma 34: 306-311
16191F	5'-CCC ATG CTT ACA AGC AAG TA-3'	Kolman et al. 2000. Am. J. Phys. Anthropol. 111(1): 5-23
16420R	5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TGG TG-3'	Vigilant et al. 1989. PNAS. 86: 9350-9354
12sF	5'-ACTGGGGATTAGATACCCCACTATG-3'	Melton T, Holland C. 2007 J. Forensic Sci. 52, 1305-1307
12sO	5'-GTCGATTA AGGACAGGGTTCCTCTA-3''	Poinar et al. 1998. Ciencia 281(5375): 402-6

Amplicones y longitud para el análisis de ADN.

16s6 - 16sB = 270bp

16191F - 16420R = 229bp

12sF - 12sO = 150bp

Cada lote de reacción de la PCR incluye un control de PCR positivo y otro negativo, así como el control de extracción negativo. Cada amplicón se amplifica al menos dos veces para su replicación.

Cuantificación

El ADN nuclear está dirigido mediante el uso del kit de cuantificación de ADN humano Quantifiler™ de Life Technologies de acuerdo con las instrucciones del fabricante que se ejecutan en el Cepheid Smart Cycler® II.

SER029-17 Final Report

Electroforesis GEL

Los productos de PCR se mezclan con un colorante y se cargan en un gel de poliacrilamida al 6% (PAGE) que utiliza electricidad para separar cualquier producto de ADN producido por la reacción de PCR. El gel se tiñe con bromuro de etidio que se une al ADN en el gel y presenta fluorescencia bajo luz ultravioleta. Se toma una foto para la verificación visual de los productos de amplificación presentes en la reacción PCR. Cada región de la cartilla producirá una banda de ADN de un tamaño específico si el ADN está presente.

Los productos de PCR exitosos se purifican mezclando 20uL de producto de PCR con 2uL de nucleasa Exo I[Lucigen] y 4uL de Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP-*Shrimp Alkaline Phosphatase*) [Thermo Fisher]. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, luego las enzimas se desactivan a 80°C durante 15 minutos.

Secuenciación

Los productos PCR purificados se secuencian directamente con el kit de reacción Big Dye Terminator Ready de Life Technologies v3.1 tanto en la dirección hacia adelante como hacia atrás. 0.5uL Big Dye Terminator Ready Reaction Mix v3.1, 0.25uL 10uM primer, 2uL 5x Big Dye Terminator Sequencing Buffer, 4.2uL de agua estéril y 3uL de producto PCR purificado. Parámetros de ciclo: Inicio en caliente de 96°C durante 60 s; 15 ciclos de 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 75 s; 5 ciclos de 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 90 s; y 5 ciclos de 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 2 min. Los productos de secuenciación se purifican con una precipitación de acetato de sodio/etanol según la Guía de Química de Secuenciación Automatizada de ADN de Applied Biosystems. Los productos de secuenciación son resuspendidos en Formamida Hi-Di de 15uL y se ejecutan en el ABI 3130xl para el análisis de secuenciación.

La secuencia de ADN se compara con el *BLAST* (*basic local alignment search tool*) para obtener la concordancia más cercana. La base de datos *NCBI-BLAST* es una extensa colección de varias secuencias de ADN. Una concordancia del 100% significa que el 100% de la secuencia adquirida para esa muestra era una concordancia completa con la identificada en la base de datos. Una concordancia del 95% significa que sólo el 95% de la secuencia adquirida para esa muestra coincide con la identificada en la base de datos y que es la concordancia más cercana que se puede encontrar dentro de la base de datos. Cuando más de una Familia o Género podría ser una concordancia, significa que la secuencia adquirida para esa muestra

SER029-17 Final Report

Fue una concordância con todas las Familias/Género identificadas por igual (mismo nivel de confianza) y que fue la concordância más cercana que se pudo encontrar dentro de la base de datos. Existe la misma posibilidad de que pueda pertenecer a cualquiera de estas familias/géneros.

Los datos de secuenciación mitocondrial son editados y alineados a la Secuencia de Referencia de Cambridge Revisada usando el Software Sequencher™ de Gene Codes v4.10.1

Análisis de fragmentos

La región de amelogenina (sexado) se amplifica en reacciones de 25uL usando Quanta Biosciences™ AccuStart™ II PCR Supermix (2X) con 12.5uL de AccuStart II PCR Supermix (2X), 0.25uL de 10uM cada imprimación, 3uL plantilla. Parámetros de ciclo: inicio en caliente de 94° durante 2 min. y 40 ciclos de 94°C durante 30s, 60°C durante 1 min., 72°C durante 2 min. y un final de 72°C durante 80 min. Este lote de reacción PCR incluye un control PCR positivo macho, positivo hembra y negativo. Cada locus se amplifica al menos dos veces para su replicación.

Información de la cartilla: Sullivan et al. 1993. Biotecnologías. 15(4): 636-641

Amel 1 F 5'-(6FAM) CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'
Amel 1 R 5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3'

RESULTADOS: Los resultados que figuran a continuación se refieren únicamente a los elementos sometidos a ensayo.

Universal ID - Región 16s

Se produjo una secuencia de ADN a partir del material biológico del cerebro craneal (1).

```
TACGTAGGACTTACTTTAATCGTTTTACTTACTTTAATTTAATCGGCTCTCTTAATAGCTGCACCATCGGGATT  
CCTGATCCAACATCGAGGAGTCTAAACCCATTGATTGATGGATGGACTCTAATAGATAGGATTGATTGATTG  
ATTGATTGATTGATTGATTGAGAGATTAGTAGTAGTAGCTTTGACTGACTGGTGAAGGTTAGTAGTAGTA  
GTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAG
```


SER029-17 Final Report

Esta secuencia contenía daños en el ADN. La concordancia más cercana de secuencia legible, utilizando una base de datos genética (*National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, base de datos de nucleótidos*) se identificó como una coincidencia del 99% con *Homo sapiens* (humano). La diferencia del 1% se debe a que el daño en el ADN causa una falta de concordancia.

A partir de estos datos, la evidencia sugiere que la fuente de ADN del material biológico del cerebro craneal (1) y el hueso extraído de la mano (2) pertenece al *Homo sapiens* (humanos).

Los resultados de la prueba de viabilidad del ADN nuclear humano fueron positivos. Se detectó suficiente ADN nuclear para realizar más pruebas.

Identificación de sexo

La prueba de amelogenina para la identificación sexual encontró:

- El material biológico del cerebro craneal (1) pertenece a un individuo **masculino**.
- El hueso extraído de una mano (2) pertenece a un individuo **masculino**.

La combinación de replicación, los tamaños de los fragmentos obtenidos, los procedimientos implementados para la esterilización en laboratorio y la eliminación de los perfiles de ADN de Paleo-DNA Laboratory sugieren que los resultados son auténticos y no contaminantes. Sin embargo, no se enviaron muestras de comparación modernas con este lote por parte de los arqueólogos o cualquier otra persona que pueda haber manejado la muestra y posiblemente haberla contaminado. Por lo tanto, no podemos garantizar que estos perfiles sean auténticos y no un controlador anterior.

SER029-17 Final Report

NOTAS:

Los controles se ejecutaron en cada paso del análisis y dieron los resultados esperados. Este análisis cumple con los requisitos solicitados por el cliente. Los detalles de los procedimientos experimentales y el análisis de este caso se encuentran en el archivo de casos del laboratorio de Paleo-DNA, número de caso SER029-17. Tu opinión es importante para nosotros! Por favor complete nuestra encuesta de clientes en :

<http://lucas.lakeheadu.ca/customer-survey>.

Director Técnico:



Stephen Fratpietro

Fecha: 11 de Mayo de 2017