

SER066-17 Reporte Final

Archivo #: SER066-17

Fecha: 26 de Enero de 2018.

Informe de Experto

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: Este examen de los objetos expuestos está relacionado con un antiguo análisis de ADN.

ARTÍCULOS EXAMINADOS:

Thierry Jamin, Instituto Inkari-Cusco, presentó los siguientes artículos (ver Tabla 1) para el análisis genético. Estas muestras fueron designadas como el siguiente caso y número de muestra por el Laboratorio de Paleo-ADN (PDL):

Designación del Caso PDL	Designación de la Muestra de PDL	Tipo de Muestra	Comentarios
SER066-17	1	Tejido y Hueso	Palma de la mano derecha, María
SER066-17	2	Tejido y Hueso	Dedo del pie izquierdo, Maria
SER066-17	3	Hueso	Cóccix 1, Maria
SER066-17	4	Hueso	Brazo izquierdo, Maria
SER066-17	5	Hueso	Cóccix 2, Maria
SER066-17	6	Hueso	Vértebra, Maria

Tabla1. Muestras sometidas al Laboratorio de Paleo-DNA.

EXAMEN SOLICITADO: Análisis de ADN antiguo: extracción de ADN, prueba de viabilidad de ADN nuclear y perfiles de ADN autossômico

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.

SER066-17 Reporte Final

El Laboratorio de PaleoADN 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 PaleoADN no prometió éxito en el logro de ningún resultado deseado. El Laboratorio de PaleoADN 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, redcilla y mascarilla. Todas las personas que ingresan a este laboratorio tienen su ADN perfilado y guardado para futuras comparaciones.

Preparación de la muestra

Todas las muestras de ADN se enjuagan en etanol y se dejan secar. Cada espécimen se muele por separado y se disuelve en un tampón de extracción.

Extracción de ADN

TNE Extracción [Hansen et al, 1974] : Muestra 1 a 5

El tampón de extracción se hace fresco y consiste en 2175uL TNE [10mM Tris, 100mM Cloruro de Sodio (NaCl), 1mM Solución de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)], 300uL 20% de sulfato de sodio y dodecil sódico, 300uL 0.39M Ditiotreitól, 30uL 20mg/mL de Proteinasa K, y 195uL de agua estéril. Este tampón se incuba con la muestra durante la noche a 56°C durante 500rpms de agitación. El sobrenadante resultante se transfiere a la Purificación de Perlas de Sílice (*Silica Bead Purification*)

Desmineralización total [Loreille et al, 2007] : Muestra 6

Aproximadamente 1-2g de polvo de muestra se mezcla con 9.0mL 0.5M EDTA, 150uL 20% Lauryl Sarcosinate, y 200uL 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 a la *Purificación de Perlas de Sílice*.

SER066-17 Reporte Final

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

El sobrenadante se mezcla con 18 ml de tiocianato de guanidinio 4 M y 15 µl de sílice. Esto se deja reposar durante 4 horas a 4 ° C [para permitir que el ADN se una a la sílice] después de lo cual se elimina el sobrenadante y la sílice restante se lava con tampón de lavado de trabajo (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, 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 se desprenda de la sílice y se disuelva en el agua. El sobrenadante resultante se transfiere al siguiente paso.

Purificación de Columna de Exclusión de Tamaño [Matheson et al, 2009] (Size Exclusion Column Purification) :

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. ****

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 Cyclex® II.

Análisis de fragmentos

El ADN autosómico se amplifica en reacciones de 10 µL utilizando el sistema Promega PowerPlex® 21 utilizando los parámetros de ciclo del fabricante. Este lote de reacción PCR incluye un control PCR positivo y otro negativo. Cada locus se amplifica al menos dos veces para su replicación.

SER066-17 Reporte Final

RESULTADOS: Los resultados que se presentan a continuación se refieren únicamente a los elementos probados.

Los resultados de la prueba de viabilidad del ADN nuclear fueron los siguientes:

Muestra	Viabilidad del ADN nuclear
Palma de la mano derecha, María (1)	positivo
Dedo del pie izquierdo, María (2)	positivo
Cóccix 1, Maria (3)	negativo
Brazo izquierdo,, Maria (4)	negativo
Cóccix 2, Maria (5)	negativo
Vértebra, Maria (6)	positivo

Un resultado positivo indica que hay suficiente ADN nuclear en el extracto para proceder a más pruebas de ADN autosómico.

Análisis Autosómico

Se realizaron análisis autosómicos en las siguientes muestras de “Maria” : Palma de la mano derecha (1), dedo del pie izquierdo (2), vértebra (6). Cada análisis se realizó por triplicado. Se producen dos piezas de información numérica para cada marcador de ADN analizado. Dado que la mitad del ADN de la madre biológica y la otra mitad del ADN del padre biológico se transmiten al niño, una parte de la información de cada marcador proviene de cada uno de los padres biológicos.

SER066-17 Reporte Final

Marcadores de ADN analizados	Palma de la mano derecha (1)	Dedo del pie izquierdo (2)	Vértebra (6)
AMEL	X [Y]	X [Y]	X,Y
D3S1358	15,16,17	15,16 [17]	14,15,16,17
D1S1656	11,14	13,14,15	13,14,15
D6S1043	11	14,21.3 [11,18,19,20.3]	14,17,21.3
D13S317	10,14	9,11,12	10,11,12
Penta E	NR	17	15,17
D16S539	11 [10,12]	10,11	10,11,12
D18S51	13,14,17,18 [20]	14,17,18 [13,16]	17,18,20
D2S1338	17,19	17,19,20	19,20,23 [22]
CSF1P0	NR	10,11,12	12
Penta D	11	NR	10,14 [11]
TH01	7,9.3	7 [9.3]	7 [6,9.3]
vWA	16 [18,19]	16 [14,15,17,19]	14,16
D21S11	29,32.2	32.2	29,30,32.2 [31.2]
D7S820	10	11	11
D5S818	11,12	7,11,12	11
TPOX	11	11	8,11
D8S1179	10,14 [8,16]	10,14 [11,12,13,16]	10,12,14
D12S391	[16,18]19,20,21	16,19 [21]	16,19 [18,21]
D19S433	14[13,15,21]	13,15,17	13,14,15 [15.2]
FGA	24,25,26	21,25,26	21,26

Resumen de los resultados de tres análisis distintos. En algunos casos más de dos alelos estaban presentes en un marcador. Se combinaron los resultados de los tres análisis de cada muestra. Todos y cada uno de los alelos mayores (de alto nivel) se declaran como tales. Todos y cada uno de los alelos menores (de bajo nivel) se indican con '[]'. NR" significa que no se obtuvieron resultados.

Las siguientes conclusiones se extrajeron de los datos obtenidos:

845/5000

- Hay evidencia de contaminación del ADN.
- La palma de la mano derecha (1) contiene ADN de más de un individuo.
- El dedo del pie izquierdo (2) contiene ADN de más de un individuo.
- La vértebra (6) contienen ADN de más de un individuo.
- El marcador de Amelogenin [AMEL] (el marcador utilizado para la identificación sexual) dentro de este kit de genotipado) muestra que para cada una de las tres muestras analizadas, hay un componente principal de ADN femenino y un componente menor de ADN masculino.
- Para cada una de las muestras analizadas, hay una presencia de, al menos, un individuo femenino y un individuo masculino.
- El dedo del pie izquierdo (2) y la vértebra (6) muestran evidencia de compartir una fuente común de ADN.
- No hay datos suficientes para incluir ni excluir la palma de la mano derecha (1) que tiene una fuente común de ADN para el dedo del pie izquierdo (2) y la vértebra (6) con alguna seguridad.



Lakehead
UNIVERSITY

**Paleo-DNA
Laboratory**
Centre for Analytical Services

Tel 807 343-8616
Fax 807 343-8619
Toll Free 1-866-DNA-LABS
email paleodna@lakeheadu.ca

SER066-17 Reporte Final

NOTAS:

Se realizaron controles en cada etapa del análisis y se obtuvieron los resultados esperados. Los perfiles anteriores no coinciden con ningún miembro del personal o usuario de laboratorio del Paleo- DNA Laboratory, ni en el pasado ni en la actualidad. 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 expediente del laboratorio de ADN-Paleo, caso número SER066-17. Su opinión es importante para nosotros! Por favor, rellene nuestra encuesta de clientes en <http://lucas.lakeheadu.ca/customer-survey>.

Director Técnico:

Stephen Fratpietro

Fecha: 06 de Febrero de 2018

Traducción: Antoine Bruno

















