



0001

UNIVERSIDAD MÉDICA DE INNSBRUCK
Instituto De Medicina Legal
División de Laboratorio de Pruebas – Director: o. Univ. Prof. Dr.
Med. Richard Sheithauer
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos
Muellerstrabe 4, A-6020 Innsbruck, Austria
Tel. ++43-512-9003 70600, Fax. ++43-512-9003-73600

GMI
TIROL

Procuraduría General de la República

Procuraduría General de la República

Ave. Paseo de la Reforma "211 – 213
Col. Cuauhtémoc, Delegación Cuauhtémoc
06500 DISTRIT FEDERAL CP
MÉXICO

Nuestro Número de Referencia: SP159425/II
GMI1409191

Innsbruck, a 12 de septiembre de 2016

Reporte de ADN Mitocondrial

1 Artículos de Evidencia:

El 13 de noviembre de 2014 nosotros recibimos evidencias recolectadas de la Procuraduría General de la República. El propósito de la investigación actual es establecer los perfiles del AD mitocondrial (mtDNA).

El 2 de diciembre de 2015 nosotros recibimos evidencias recolectadas de la Procuraduría General de la República. El propósito de la investigación actual es establecer los perfiles del AD mitocondrial (mtDNA).

Las muestras analizadas se enumeran en la tabla 1:

GENERAL DE LA REPÚBLICA
de Derechos Humanos,
y Servicios a la Comunidad
e Investigación

Acreditado como Laboratorio de Pruebas ISO/IEC 17025, GZ 92714/715-II/12/02 Ministerio de Economía y Trabajo, Austria

SP159425M_2.DOC

Página 1 de 7

Pa

Rev.2

IT-TR-01

EC-TR-02

Av. Río Consulado No.715 Colonia Santa María Insurgentes, Delegación Cuauhtémoc, C.P. 06420
México, D.F. Tel: (55)53 46 19 19 www.pgr.gob.mx



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

Tabla 1:

	Glosario de términos que aparecen en esta foja: DNA Bone Sample = Muestra Ósea de ADN Reference Sample = Muestra de Referencia
--	--

* N. del T.: Las cantidades, cifras y números no son materia de traducción. Con el propósito de evitar errores en la transcripción de los mismos, no se incluyen en la presente traducción. Sin embargo, es posible que aparezca la transcripción de algunos de ellos como referencia. En caso de discrepancia, se deberá consultar el original remitido por la autoridad.

2. Métodos de tipificación del ADN mitocondrial:

Son tres los pasos principales para llevar a cabo el análisis de ADN mitocondrial. La extracción de ADN mitocondrial (aislamiento de material genético de una mancha), la amplificación (replicación de segmentos cortos definidos de ADN mitocondrial) y la detección (secuenciación del ADN mitocondrial). En este caso la Secuenciación Progresiva Masiva de la Próxima Generación (PEG NGS) fue realizada.

2.1 Extracción

2.1.1 Método de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico [Módulos DEX01, DEX13]

Las muestras fueron limpiadas y purificadas previo a la perforación. El polvo óseo y dental fueron sometidos a lisis y el ADN fu extraído conforme al método Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico. Después se purificó el ADN y se disolvió. En paralelo, los agentes extractores fueron incluidos en el mismo procedimiento sin agregar material biológico con el fin de controlar la pureza de la química (extracción del valor ciego).

2.2. Amplificación y Secuenciación de ADN mitocondrial Región Control utilizando PEC NGS

2.2.1. Preparación de Muestras de la Librería

Lo controles positivos fueron compartidos durante 40 minutos utilizando el Kit Ion Shear (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) que fue seguido por la preparación de la librería utilizando



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

[REDACTED]

el Kit de Librería IonXpress Fragment (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) de conformidad con el protocolo del fabricante. Las muestras óseas no fueron sujetas a cizallamiento primer, pero la preparación de la librería fue hecha instantáneamente de la misma forma como se describe anteriormente. Después de la preparación de la librería todas las muestras fueron sujetas a una amplificación de 10 ciclos utilizando mezclas de Polimerasa y Primer inherentes en el Kit de Preparación de la Librería de acuerdo con el protocolo del fabricante.

2.2.2. Preparación del control de enriquecimiento

Se preparó un control de enriquecimiento mediante la amplificación de una región 405 bp del genoma mitocondrial del control positivo utilizando dos iniciadores en las posiciones 8251 (hacia adelante, 5'-GCCCCGATTTACCTATAGCAC-3') Y 8656 (inversa, 5'-CTCATCAACAACCGACTAATCA-3'). El producto PCR resultante fue entonces sujeto a preparación de librería utilizando el Kit de Librería IonXpress Fragment (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Los productos finales fueron entonces cuantificados utilizando el ensayo 143bp TaqMan y diluidos a 10000000 copias por μ l. Para la simulación de fondo, 1 μ g E.coli ADN (D2001-5MG tensión Tipo B VII, SIGMA ALDRICH, St. Louis, MI USA) fue cizallado utilizando el Kit Ion Shear (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y la preparación de la librería se realizó utilizando Kit de Librería IonXpress Fragment (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) de conformidad con el protocolo del fabricante. 15-20 ng de este ADN E.coli cizallado fueron entonces mezclados con 1 μ l de producto PCR diluido para control de enriquecimiento.

2.2.3. Selección del tamaño de la perla

Después de la preparación de la librería 1 μ l de cada muestra fue cargado a un chip de Análisis de ADN de Alta Sensibilidad (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para el control del tamaño. La muestra fue sujeta a un procedimiento de selección del tamaño de la perla para reducir el tamaño del fragmento arriba de 400 bp para emulsión PCR. Primero las muestras fueron mezcladas con 0.5X perlas de purificación Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) e incubadas durante 5 minutos. Después el sobrenadante fue recolectado colocando los tubos conteniendo la mezcla de perla-muestra en un recolector magnético de partículas (MPC). A este sobrenadante se le



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

se le agregó perlas de purificación 1.5X Agencourt AMPure y se incubó durante 5 minutos. Los tubos fueron colocados en un recolector magnético de partículas MPC y el sobrenadante fue desechado. Después las perlas se re-suspendieron en 25µl Low TE Buffer y el eluido se recogió vía MPC. Las perlas de la primera etapa fueron re-suspendidas en 25µl Low TE Buffer y el eluido se recogió y se almacenó.

2.2.4. Diseño del iniciador

Se seleccionaron cuidadosamente catorce iniciadores utilizando Primer3 para expandir la región de control mitocondrial espaciando 50-100 bp de separación. Se dio especial énfasis para lograr una longitud uniforme, temperatura de fusión y contenido de GC. Se añadió iniciador adicional reconociendo la posición 8342 del Genoma mitocondrial, la región que también es objetivo mediante el ensayo de cuantificación 143bp TaqMan previamente descrito. Se ordenaron iniciadores adicionales a la Microsynth AG, Balgach, Suiza).

2.2.5. Extensión del Iniciador I

Todas las muestras, incluyendo la (PC) positiva, no plantilla (NTC-PEC), no iniciador ((NPC), enriquecimiento (ERC) y preparación de librería en blanco (NTC-LP) fueron tratados utilizando el protocolo PEC. La reacción fue detenida agregando 10 µl de 0.5M EDTA. Treinta µl de beads MyOne Streptavidin C1 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) por muestra fueron lavados tres veces con 2xBW Buffer de acuerdo con el protocolo del fabricante y re-suspendidos en 60 µl de 2xBW Buffer. 60 µl de muestra fueron agregados y girados a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2.2.6. Lavados y captura I

Después de la incubación los tubos de incubación conteniendo la mezcla de perla-muestra fueron colocados en un MPC durante 2 minutos. El sobrenadante fue desechado y las perlas fueron re-suspendidas en Wash1 (1xBW Buffer, 0.1%SDS, 0.01% Tween20). Este paso se repitió tres veces en total. En los siguientes dos lavados las perlas fueron re-suspendidas en solución de Wash2 (2Xssc, 0.1%SDS, 0.01% Tween20). El lavado final consistió en calentar



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

la solución de Wash2 a 65°C, mezclándola con las perlas e incubar los tubos durante 2 minutos a 65°C, agitando ligeramente. Se llevaron a cabo eluciones de cadenas de ADN a 95°C mediante el mezclado previo de las perlas con 25 µl de TE Buffer bajo. Las muestras fueron después amplificadas para 14 ciclos utilizando el Kit de Preparación de Librería de mezcla de polimerasa y primer y purificada con procedimiento de purificación 1.5X Agencourt AMPure XP de conformidad con el protocolo del fabricante. Las muestras fueron analizadas para el control de calidad en un chip para análisis de Alta Sensibilidad de ADN (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.2.7. Extensión de Primer II

Este paso se llevó a cabo como se describe en el párrafo Captura de la Extensión del Iniciador I, excepto la elevación de la temperatura de fijado a 59°C.

2.2.8. Lavados de Captura II

Llevada a cabo conforme se describe en el párrafo Lavados de Captura I.

2.3. Detección

2.3.1. Secuenciación

Para el agrupamiento, las muestras fueron cuantificadas utilizando la Librería DEL Kit de Cuantificación TaqMan™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Emulsión PCR, el enriquecimiento y la secuenciación fueron realizadas utilizando el Sistema Ion OneTouch™ 2 y el Ion PGM™ respectivamente, de acuerdo con los protocolos del fabricante. La muestra ósea fue secuenciada excesivamente.

2.3.3. Análisis de Secuencia

La información generada de la secuenciación corrida en el formato Fastq, fue alineada ya sea en TMAP (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) o en bwa, el demás procesamiento fue realizado utilizando picard tools (<http://picard.sourceforge.net>) y biopython. La tipificación de variante fue realizada manualmente de acuerdo con los siguientes criterios:



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

- a) Las regiones mitocondriales consideradas para la tipificación de variante tuvieron que cubrirse con al menos 15 lecturas
b) Los polimorfismos solo son tipificados cuando:
* están presentes en todas las lecturas si las lecturas solo vienen de una dirección (hacia adelante o inversa).
* o estuvieron presentes en lecturas hacia adelante e inversa en al menos el 95% del total de lecturas.

3. Aseguramiento de la Calidad

Junto con la extracción de las muestras óseas las muestras ciegas y las muestras sin ADN fueron procesadas con el fin de demostrar la ausencia de cualquier contaminación de los químicos utilizados. Los resultados de todas las muestras analizadas incluyendo las reacciones de control están almacenados como registros electrónicos en el Instituto. Los más altos estándares internacionales son aplicados en todo el proceso. Nuestro Instituto realiza exitosamente pruebas de aptitud internacionales para el control de calidad.

4. Resultados

Tabla 2: Resultados de PEC NGS Y Análisis Sanger

Código de barra	Muestra	

* N. del T.: Las cantidades, cifras y números no son materia de traducción. Con el propósito de evitar errores en la transcripción de los mismos, no se incluyeron en la presente traducción. Sin embargo, es posible que aparezca la transcripción de algunos de ellos como referencia. En caso de discrepancia, se deberá consultar el original remitido por la autoridad.

Leyenda: *frases de la Comunidad* en letras itálicas

Los análisis se terminaron el 12 de septiembre de 2016.



Instituto de Medicina Legal, Universidad Médica de Innsbruck
Departamento de Genética Forense y Trabajo de Casos

4. Conclusiones

Los análisis PEC NGS dieron como resultado un perfil parcial de ADN mitocondrial interpretable de la muestra ósea 16-29102014 (15942501 1).

Los análisis PEC NGS dieron como resultado un perfil parcial de ADN mitocondrial interpretable de la muestra ósea F6-001 (1743330119).

El análisis de secuenciación Sanger dio como resultado un perfil interpretable de ADN mitocondrial en referencia a la muestra 13MR5421-14 (1594260610).

(Firmado)

(Firmado)

Nota: Este reporte de ADN no deberá ser copiado parcialmente sin la autorización por escrito del Laboratorio de ADN.

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
PROCURADURÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA
de Derechos Humanos,
y Servicios a la Comunidad
e Investigación