

**FAMSI © 2009: Vera Tiesler**

## **Relaciones de parentesco entre la elite de Calakmul, México**

*Reporte final elaborado por Carney Matheson, traducido y enviado por Vera Tiesler*

**Año de investigación:** 2006

**Cultura:** Maya

**Cronología:** Clásico Temprano y Tardío

**Ubicación:** México

**Sitio:** Calakmul

### **Tabla de Contendios**

[Resumen](#)

[Abstract](#)

[Muestras](#)

[Metodología](#)

[Reporte final](#)

[Conclusión](#)

[Protocolos](#)

### **Resumen**

Esta investigación, financiada por FAMSI, está motivada por establecer métodos aptos para la evaluación del ADN derivado de un serie de esqueletos humanos provenientes de presuntas tumbas dinásticas fechadas para el Clásico Temprano y Tardío. Los protocolos establecidos tienen como objetivo analizar los esqueletos que se permiten someter a este tipo de análisis para determinar relaciones genéticas entre los individuos que conforman la muestra.

### **Abstract**

This research funded by FAMSI is to establish methods to evaluate the DNA from a set of human skeletons pertaining to the Early and Late Classic royal tombs from Calakmul. This research is to analyze as many sets of remains as possible and to establish genetic relationships between the individuals.

## MUESTRAS:

Las siguientes muestras se sometieron al análisis genético y su evaluación:

**Tabla 1.** Muestras enviadas para evaluación genética (UAC = Proyecto Calakmul de la Universidad Autónoma de Campeche; INAH = Proyecto Calakmul del Instituto Nacional de Antropología e Historia).

Ent 1* (UAC)	Ent 18 (UAC)	II-5b '98 (INAH)
Ent 2* (UAC)	Ent 19 (UAC)	II-6a '98 (INAH)
Ent 3 (UAC)	Ent 20 (UAC)	II-6b '98 (INAH)
Ent 4 (UAC)	Ent 21 (UAC)	IIA-1-99 (INAH)
Ent 6 (UAC)	Ent 22 (UAC)	E.II-c.1 (INAH)
Ent 7 (UAC)	Ent XV-2 (INAH)	IA-1-98 (INAH)
Ent 9* (UAC)	Ent XV-3 (INAH)	IV-1 (INAH)
Ent 10 (UAC)	II-1 '97 (INAH)	IV-B-5 (INAH)
Ent 11 (UAC)	II-2 '97 (INAH)	IV-B-6 (INAH)
Ent 12 (UAC)	II-4a '97 (INAH)	IV-B-7 (INAH)
Ent 14 (UAC)	II-2 '97/98 (INAH)	IV-t.2 8B (INAH)
Ent 15 (UAC)	II-4 '97/98 (INAH)	Utsinal Caan 1 '98 (INAH)
Ent 16 (UAC)	II-4b '97/98 (INAH)	Utsinal Caan 2 '98 (INAH)
Ent 17 (UAC)	II-5a '98 (INAH)	Kinich Pale #1 (INAH)

\* Muestras designadas como prioritarias para el análisis.

## METODOLOGÍA:

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio estéril de *Paleo-DNA*, un laboratorio altamente especializado que fue diseñado específicamente para el análisis de ADN degradado y antiguo. El laboratorio cuenta con un espacio de almacenaje separado donde las muestras son recepcionadas y almacenadas en contenedores especiales. También existe un espacio de laboratorio de trabajo que integra 4 cuartos separados. Corresponden al área de preparación de los reactivos, donde no se han introducido a la fecha muestras o ADN moderno. El segundo cuarto se diseñó para la preparación de las muestras, el tercero para la preparación experimental y el cuarto para acceder a cada espacio por medio de un corredor. El espacio limpio cuenta con dos sistemas independientes de ventilación aérea y se accede por medio de un mecanismo de “ducha de aire”. La persona que trabaja dentro del espacio limpio debe estar vestido con un traje de cuerpo completo (con solo una parte de la cara descubierta), con capa, botas dobles, mangas dobles, dobles guantes, máscara facial y gafas. El laboratorio se limpia con cloro y se esteriliza cada semana, así como antes de cada uso del área laboral. Se procede con el mismo proceso de esterilización con todo el material que se usa dentro de este laboratorio. Ningún material que sale del área limpia del laboratorio puede ser re-introducido debido a su potencial de contaminación. Las muestras son transferido entre los cuartos a través de orificios especiales en la pared. La amplificación no se lleva a cabo en el área de laboratorio limpia sino en un

cuarto especial destinado para estos fines en el área de post-análisis, espacio destinado también a otros procesos de post-análisis. Como principio, las labores se realizan en un modo uni-direccional para eliminar las posibilidades de contaminación cruzada entre diferentes áreas.

### ***Decontaminación***

Al recibir una muestra biológica para análisis de ADN, no siempre se conoce el manejo anterior a su llegada al laboratorio. Otra incógnita es el medio ambiente del que la muestra deriva, el cual puede contener sustancias que resultan perjudiciales al análisis genético. Para prevenir cualquier contaminación, debe procederse con una decontaminación preventiva. Para este estudio se usó una solución de hipoclorito de sodio de 6% (w/v) y una solución de etanol de 70%; estas medidas permiten remover contaminantes superficiales y ADN exógena. Además se empleó radiación ultravioleta mediante exposición de las muestras a la luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda a una distancia de 30 cm. Esta medida promueve la reacción de timina en cualquier contaminación potencial exógena de ADN.

### ***Preparación de muestra***

En este proyecto se empleó un taladro Dremmel en la preparación para el estudio de ADN de las muestras, una forma de extracción ventajosa, ya que recolecta sustancia en forma de polvo desde el núcleo de la muestra matriz, es decir, material relativamente protegido de las fuentes de contaminación del ambiente externo. Una forma de extracción en casos especiales era la pulverización con un molino mezclador.

### ***Extracción de ADN***

El método de extracción de ADN que se empleó dependía de factores tales como el tipo y la antigüedad de la muestra, las condiciones tafonómicas en que se encontró originalmente y la forma de preparación anterior a la extracción. Para los fines de este proyecto se consideraron convenientes dos métodos: el método de proteinasa encimática y el método químico de tiociano guanidinio.

### ***Cuantificación de ADN:***

En teoría, existe una relación cuantitativa entre la concentración del ADN modelo antes de la amplificación y de la concentración de la secuencia de ADN destino con cualquier ciclo durante el PCR. Por ello, el PCR de tiempo real detecta el incremento de la cantidad del ADN destino conforme incrementa el número de ciclos. Hay métodos alternos que se pueden utilizar para detectar el avance de la reacción. En este estudio se emplearon dos métodos de detección: el tinte de SYBR Verde y el kit de cuantificación de Applied Biosystems Quantifiler™ para ADN humano.

### ***Amplificación de ADN***

Después de la extracción y purificación de la muestra de ADN, una región destino de interés dentro del tope de ADN se amplifica para detectar la presencia de ADN viable y determinar el grado de fragmentación del tope. Esta se refiere como PCR de detección. Todos los PCRs de detección realizados para este proyecto se componen de los siguientes reactivos y sus correspondientes concentraciones finales para cada muestra.

Los Primers que se seleccionaron para la amplificación de ADN dependen del tipo de ADN amplificado y la región destinataria de interés. En esta investigación del ADN mitocondrial, solo Primers que habían sido desarrollados y validados previamente fueron utilizados, así como varias longitudes de fragmentos destino del D-Loop mitocondrial. Los Primers de ADN nuclear se diseñaron para una región destinataria localizada sobre el gen de amelogenin sobre las cromosomas sexuales y kits para STRs autosomal fueron empleado para este análisis. La amplificación de PCR anidada y hemi-anidada se realizó siguiendo el PCR de detección. Los productos de PCR de la detección de PCR son purificados utilizando una de las columnas comerciales mencionadas en las secciones correspondientes a los protocolos de purificación. Estos productos purificados luego se someten a un segundo PCR bajo las mismas condiciones como en el PCR de detección, con la excepción de que se emplean diferentes pares del Primer. En el caso de un PCR anidado, los Primers seleccionados adhieren internamente a los Primers usados en el PCR de detección inicial. En el caso de un PCR hemi-anidado, uno de los Primers usados para la detección de PCR se acopla con un nuevo Primer que se adhiere internamente en el PCR de detección. Para este proyecto de investigación se realizaron PCRs hemi-anidados para procesar las muestras de ADN mitocondrial en un estado de degradación avanzado o aquellas muestras determinadas como antiguas. El PCR anidado se llevó a cabo otra vez en ADN nuclear para de gen de amelogenin para muestras consideradas en un estado de degradación avanzado o determinados como antiguos.

#### ***Secuenciación de ADN mitocondrial:***

La reacción de secuenciación genética mitocondrial que se empleó en este proyecto utiliza una técnica química de terminación de cadena. Concretamente, el kit de secuenciación por ciclo de terminación ABI Big Dye® v3.1 se usa para preparar las reacciones de secuenciación; cabe notar que los volúmenes de los reactivos fueron modificados de aquellos listados en el protocolo del productor.

#### ***Réplicas autosomales de tandem corto Multiplex:***

Réplicas cortas de tandem (STRs) se amplifican utilizando un kit comercial desarrollado por Applied Biosystems. Este kit de PCR de amplificación, denominado AMPFI STR® Identifiler®, es capaz de amplificar simultáneamente, en una sola reacción, 15 *loci* de cromosomas autosomales. El kit usa químicos de tinte 5 y permite la diferenciación de grupos de *loci* cuando se emplea conjuntamente con un analizador genético ABI PRISM® 3100.

#### ***Detección de amplificación de ADN:***

Se emplearon tres métodos en el análisis y en la detección del producto amplificado. Estas tres técnicas consisten en electroforesis de gel de agarosa, electroforesis de gel de poliacrilamida y electroforesis capilar.

## REPORTE FINAL:

El financiamiento permitió el procesamiento de diez muestras (Tabla 2). Estas incluyen las muestras determinadas como prioritarias.

**Tabla 2.** Lista de muestras procesadas (UAC = Proyecto Calakmul de la Universidad Autónoma de Campeche; INAH = Proyecto Calakmul del Instituto Nacional de Antropología e Historia).

<b>Muestras</b>	
Ent 1 (UAC)	Ent 14 (UAC)
Ent 2 (UAC)	Ent 15 (UAC)
Ent 3 (UAC)	Ent 20 (UAC)
Ent 9 (UAC)	Ent XV-2 (INAH)
Ent 12 (UAC)	Ent XV-3 (INAH)

Las muestras en cuestión se habían extraído de material óseo, cuyo peso va de 0.095 a 0.171 gramos. Se extrajo material por lo menos dos veces de cada muestra. La ampliación de la región destinataria del ADN se enfocó en la zona hipervariable 1 y en la supresión 9bp del genoma mitochondrial. Cada extracto se amplificó por lo menos 4 veces por categoría. La amplificación mas exitosa se obtuvo de la segunda mitad de la región hipervariable 1 de np16191 a np16420. Dos perfiles fueron generados del Entierro 2 (UAC). Por lo menos uno de los perfiles estaba contaminado. Es difícil determinar si el segundo perfil también se encuentra contaminado. Los resultados generados indican una filiación cercana entre los individuos de los entierros 9 (UAC), 15 (UAC) y XV-3 (INAH). También el Entierro 2 (UAC) comparte muchos polimorfismos con estos tres individuos y podría haber constituido un pariente cercano. Algunas muestras no produjeron secuencias que sean diferentes de las Secuencia de Referencia de Cambridge (rCRS). Es factible, por tanto, que estas muestras estén contaminadas, aspecto que queda por corroborar en futuros análisis.

También fue posible identificar lesiones de error de codificación en la información generada. Estas lesiones son una indicación del grado de degradación del material genético. La naturaleza de degradación también se determinó usando PCRs múltiples, método que indica que los fragmentos de ADN recuperados median 200bp o menos en promedio.

**Tabla 3.** Alineamiento secuencias de individuos con ADN mitocondrial (UAC = Universidad Autónoma de Campeche; INAH = Instituto Nacional de Antropología e Historia).

Anderson 16201	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCACACATCA	ACTGCAACTC
Ent 1 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	..T.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 3 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 9 (UAC)	.....	.....	..T.....	.....	.....
Ent 12 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 14 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 15 (UAC)	.....	.....	..T.....	.....	.....
Ent 20 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-2 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-3 (INAH)	.....	.....	..T.....	.....	.....
Anderson 16251	CAAAGCCACC	CCTCACCCAC	TAGGATACCA	ACAAACCTAC	CCACCCTTAA
Ent 1 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....T	.....
Ent 3 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 9 (UAC)	.....	.....	.....	.....T	.....
Ent 12 (UAC)	.....	T.....	.....	.....	.....
Ent 14 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 15 (UAC)	.....	.....	.....	.....T	.....
Ent 20 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-2 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-3 (INAH)	.....	.....T	.....	.....T	.....
Anderson 16301	CAGTACATAG	TACATAAAGC	CATTTACCGT	ACATAGCACA	TTACAGTCAA
Ent 1 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....T	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	C.....A.	.....	.....	.....
Ent 3 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 9 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 12 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 14 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 15 (UAC)	.....	.....A.	.....	.....	.....
Ent 20 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-2 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....

Ent XV-3 (INAH) .....

Anderson 16351	ATCCCTTCTC	GTCCCCATGG	ATGACCCCCC	TCAGATAGGG	GTCCTTGAC
Ent 1 (UAC)	.....	.C.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 3 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 9 (UAC)	.....	.C.....	.....	.....	.....
Ent 12 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 14 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 15 (UAC)	.....	.C.....	.....	.....	.....
Ent 20 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-2 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-3 (INAH)	.....	.C.....	.....	.....	.....

Anderson 16401	CACCATCCTC	CGTGAAATCA	ATATCCCGCA	CAAGAGTGCT	ACTCTCCTCG
Ent 1 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 2 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 3 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 9 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 12 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 14 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 15 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent 20 (UAC)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-2 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....
Ent XV-3 (INAH)	.....	.....	.....	.....	.....

Los costos generados por este análisis fueron elevados debido a los esfuerzos requeridos en la extracción y evaluación de ADN degradado. Un método novedoso fue establecido en la prospección de las muestras con la finalidad de determinar la calidad del ADN recuperado. Este método de prospección emplea espectrometría de masa por cromatografía de gas para medir el grado de daño en ADN degradado. Sus resultados son consistentes con aquellos generados mediante la determinación de lesiones de error de codificación.

## **CONCLUSIÓN:**

La evaluación genética fue posible en diez individuos esqueléticos del sitio de Calakmul. De estos se halló contaminación en uno y la posibilidad de relación de parentesco por vía materna en cuatro más. Debido a los costos elevados inherentes en procesar muestras de ADN altamente degradados, no pudieron ser realizados análisis en individuos adicionales o réplicas o estudios complementarios en las muestras que sí arrojaron información. El daño del ADN fue identificado mediante análisis de GCMS y de "lesión de error de codificación".

## **PROTOCOLOS:**

### ***Protocolo de Decontaminación:***

Limpia la superficie del hueso con una solución de 6% (w/v) de hipoclorito de sodio  
Deja escurrir una solución de etanol de 70% sobre la superficie del hueso.

- Exponer la muestra a radiación ultravioleta (254 nm de longitud de onda) a una distancia de 30 cm por más de 24 horas.

### ***Protocolo de preparación de la muestra:***

Selecciona una superficie lisa y libre de daño sobre la muestra biológica a procesar.

Un taladro Dremel con un disco rotatorio remueve la superficie del hueso.

Debe comenzarse el proceso de perforación con una velocidad lenta para evitar que el taladro se caliente o la muestra se quemé.

Colecciona el polvo de hueso en un tubo de micro-centrífuga de 1.5mL.

Si se recuperan partículas se colocan dentro de una cámara de acero con un mango de acero de molino mezclador.

Sella la cámara con cinta y coloca la cámara horizontalmente dentro del molino mezclador.

Endereza el contenedor usando el tornillo ubicado en uno de los extremos.

Enciende el molino mezclador durante 20 segundos.

Remueve la cámara del molino mezclador y remueve el sello.

Licuefiere el polvo que se formó adentro de tubos de micro-centrífuga de 1.5mL.

- Almacene la muestra en condiciones secas y a temperatura ambiente hasta continuar con análisis adicionales.

### ***Protocolo de extracción de proteinasa K:***

La proteinasa K (PK) designa un método de extracción enzimática que es utilizado como método estándar de extracción en laboratorios forenses. El PK se usa en combinación con sulfato dodecilo de sodio (SDS) y ditionito (DTT), para crear un tope de extracción para la lisis celular y la liberación de los componentes celulares, incluyendo ADN, en solución. La actividad enzimática de PK luego es capaz de desnaturalizar las proteínas. El ADN se aísla seguidamente empleando uno de los métodos de purificación descritos líneas abajo. El método de extracción se utiliza para

la extracción de ADN de varias sustancias biológicas, incluyendo hueso, dientes y tejidos blandos.

*Reactivos requeridos:*

Proteinasa K (20mg/mL)

Tope de TNE

20% SDS

0.39M DTT

ddH<sub>2</sub>O

Fenol

Cloroformo: alcohol de isoamilo (24:1 v/v)

3M de acetato de sodio

100% Etanol

95% Etanol

ddH<sub>2</sub>O

Prepare 400µL 1X de tope de extracción como sigue; 290µL de tope de TNE, 40µL 20% SDS, 40µL 0.39M DTT, 2µL proteinasa K, y 28µL de agua y agregue la muestra. Deje la noche para la incubación a una temperatura de 37°C debajo de una tapa de humo, agitando la mezcla lentamente.

Limpie dentro de un set los tubos de 1.5mL, agregue 200µL de fenol y 200µL de cloroformo y alcohol de isoamilo (24:1) a cada tubo.

Limpie dentro de un segundo set los tubos de 1.5mL tubos, agregue 400µL de cloroformo, alcohol de isoamilo (24:1) a cada tubo.

Una vez completado el período de incubación de la solución de extracción agregue directamente 200µL de fenol y 200µL de cloroformo, alcohol de isoamilo (24:1) a la solución de extracción.

Las soluciones se mezclan y se centrifugan durante 5 minutos a una velocidad de 13000 rpm.

La capa acuosa se remueve y se coloca en un tubo previamente preparado con 200µL de fenol y 200µL de cloroformo, alcohol de isoamilo (24:1). Importa señalar que nada de la interfase que contenía proteína denaturalizado se removió.

Las soluciones se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 13000rpm.

La capa acuosa se remueve una vez más y colocada dentro del tubo preparado previamente con 400µL de cloroformo, alcohol de isoamilo (24:1). Este tubo se centrifuga durante 5 minutos a una velocidad de 13000rpm.

La capa acuosa se remueve y se coloca dentro de un tubo limpio de 1.5mL.

La muestra no era sujeto de purificación adicional, sino las soluciones se colocaron en un bloque calentado a 65°C con las tapas abiertas para permitir la evaporación de cualquier remanente de cloroformo.

Agregue un volumen de 10% de acetato de sodio de 3M al volumen completo del extracto dentro de un tubo limpio y estéril de 2.0 mL.

Mezcle el tubo durante 1 minuto.

Agregue 2.5 veces el volumen de etanol COLD 95% al tubo conteniendo la solución del extracto.

Coloque el tubo sobre hielo durante 30 minutos.

Centrifuge el tubo durante 5 minutos a una velocidad de 13 000rpm.

Deseche el líquido flotante.

Agregue en el tubo 500µL de etanol al 100% a temperatura de hielo.

Mezcle el contenido del tubo durante 1 minuto, después centrifugar durante 10 minutos a una velocidad de 13000rpm.

Deseche el sobrante y deje secarse durante 30 minutos.

- Para re-suspender, agregar agua e incubar a una temperatura de 37°C durante 15 minutos.

### ***Protocolo de extracción de tiocianato de guanidinio:***

Este método químico de extracción es de uso común en las instalaciones de investigación. Utiliza el agente caotrópico tiocianato de guanidinio (GuSCN) para deshidratar el ADN disponible y para incitar su precipitación. Desde ahí, el ADN puede ser purificado utilizando uno de los métodos de purificación descritos abajo. Este método de extracción se aplica en sustancias biológicas de origen moderno, antiguo y degradado, incluyendo hueso, dientes y tejidos blandos.

#### *Reactivos requeridos:*

4 M tiocianato de guanidinio (GuSCN)

Tope de extracción: resina de cuentas de silicio

Tope de limpieza activa

100% Etanol

ddH<sub>2</sub>O

Agregue 500µL de 4M GuSCN ( 0.1M Tris-HCl pH 6.4, 0.02M EDTA pH 8.0, 1.3% Triton X-100) directamente a la muestra.

Incubar a una temperatura de 56°C durante la noche, agitando la mezcla gentilmente.

Hierva el extracto de GuSCN a una temperatura de 94°C durante 10 minutos y centrifuge a una velocidad de 13000 rpm durante 1 minuto.

Remueva el sobrante y coloque en un tubo esteril de 1.5 mL.

Agregue 900 µL de solución de GuSCN y de 20 µL de silicato a la muestra y mezcle brevemente.

Coloque la muestra sobre hielo durante 60 minutos e invierta la muestra cada 15 minutos para resuspender el silicato.

Mezcle la muestra y desheche el sobrante.

Agregue 500 µL de tope a la muestra y mezcle durante 1 minuto para volver a suspender las cuentas de silicio.

Mueva las muestras, remueva y descarte el sobrante.

Repetir el paso de limpieza de tope.

Agregue 150 µL of 100% etanol a la muestra, mezcle durante 1 minuto y luego mueva (zip).

Mover y descartar el sobrante.

Secar al aire la cápsula de silicio durante 30 minutos.

Agregue 100  $\mu$ L of ddH<sub>2</sub>O en la cápsula ahora seca y mezcle para suspender de nuevo el ADN en el silicio.

Incubar at 56°C durante 1 hora.

- Antes de la preparación del PCR, centrifuge la muestra a una velocidad de 13000rpm durante 1 minuto.

### ***Protocolo de columnas de microcentrífuga de Bio-Rad Micro Bio-Spin® P-30:***

Columnas de cromatografía de P-30 microcentrífuga se emplean para separar las macro-moléculas mediante el peso molecular de sus componentes. La matriz dentro de las columnas se compone de cuentas porosas de polímeros. Cuando la solución se agrega y se procesa mediante centrifugación, las moléculas más grandes pasarán por la columna, mientras de las cuentas porosas capturan las moléculas más pequeñas, proceso que resulta en una muestra purificada. Las mismas columnas se emplean en un paso de purificación adicional que tiene como motivo remover todo inhibidor que pudiera haber sido co-purificado durante la extracción y las fases iniciales de la purificación.

#### *Reactivos requeridos:*

Columnas de cromatografía Micro Bio-Spin® P30

Invertir la columna varias veces para suspender de nuevo el gel en la columna y remover las burbujas.

Remover el pico y colocar la columna en un tubo de micro-centrífuga de 2 ml y remover la tapa superior.

Centrifugar la columna durante 2 minutos a una velocidad de 3.4rpm para remover el tope.

Desechar el tope.

Clonar la columna dentro de un tubo limpio de 1.5ml. Introducir la muestra (20 – 75  $\mu$ L de volúmen) directamente en el centro de la columna. Importa señalar que si se aplica más o menos del volúmen recomendado, la eficacia de la columna puede sufrir.

Centrifugar la columna durante 4 minutos a una velocidad de 3.4rpm. El ADN purificado está en solución ahora con el tope de TRIS.

- Desechar la columna.

**Protocolo de cuantificación de ADN por SYBR Verde:**

SYBR Verde es un tinte que liga con el surco menor del doble hélice del ADN. Conforme se va ligando, incrementa la intensidad de la fluorescencia y la cantidad de cuerda doble de ADN. Este procedimiento se emplea para cuantificar las muestras de hueso, diente y tejidos blandos. Se usa también para preparar la detección de PCR, aunque sin la adición de 1.25 µL del tinte SYBR Verde.

Reagent	Final Concentration
10X tope, menos Mg	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>	200 µM
dNTP mezcla	0.2 µM
10 µM Forward Primer	0.2 µM
10 µM Reverse Primer	2 mM
Platinum Taq DNA Polimerasa (5U/µL)	1.0 U
SYBR Verde	
ddH <sub>2</sub> O	--*
Patrón	--*

\* El volumen de ddH<sub>2</sub>O agregado depende del volumen del patrón agregado.  
Se agrega ADN.

Los parámetros cíclicos de PCR remanente SYBR Green Real-time se observan abajo. El número de ciclos permanecen consistentes independientemente de la edad y de la degradación de la muestra sospechada, permitiendo por tanto la cuantificación relativa entre diferentes muestras.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
94.0	2:00	1
94.0	0:30	40
60.0*	1:00	
72.0	2:00	
4.0	Hold	1

\*Esta temperatura puede variar dependiendo de la secuencia del Primer. Los Primers mitocondriales empleados en este proyecto usan el Primer arriba mencionado. Sin embargo, para los Primers nucleares, la temperatura de cuajar será diferente y se describirá al discutir los procedimientos correspondientes.

**Applied Biosystems Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit Protocol:**

El kit de cuantificación del ADN humano, Applied Biosystems Quantifiler™, es un kit comercial que incorpora la actividad polimerasa de ADN de la 5' nucleasa de AmpliTaq Gold® para realizar un procedimiento TaqMan que se ha pegado a un ADN de cuerda única con la corriente. Un incremento en fluorescencia indica un incremento en el número de ADN de hélice simple a amplificar. Esta técnica se usa para cuantificar las

muestras de ADN extraídos de hueso, dientes y tejidos blandos. Se prepara la reacción de cada muestra utilizando los volúmenes enlistados en la tabla abajo

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Quantifiler™ PCR Reaction Mix	12.5
Quantifiler™ Human Primer Mix	10.5
ADN Patrón	2

Ya que eso es un kit, parámetros cíclicos específicos fueron desarrollados para permitir una amplificación óptima y detección de la fluorescencia. Los parámetros son como siguen;

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
95.0	10:00	1
95.0	0:15	40
60.0	1:00	
4.0	Hold	1

#### **Detection PCR Protocol:**

Reagent	Concentración final
10X Tope, menos Mg	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>	200 µM
dNTP mezcla	0.2 µM
10 µM Forward Primer	0.2 µM
10 µM Reverse Primer	2 mM
Platinum Taq polimerasa de ADN (5U/µL)	1.0 U
ddH <sub>2</sub> O	--*
Patrón	--*

\* El volumen del ddH<sub>2</sub>O agregado depende del volumen del patrón de ADN adicionado.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
94.0	2:00	1
94.0	1:00	30 – 45**
60.0*	1:00	
72.0	2:00	
4.0	Hold	1

\*La temperatura de cuaje puede variar dependiendo de la secuencia del Primer. Los Primers mitocondriales que se usaron en este proyecto emplean el Primer arriba mencionado. Sin embargo, para los Primers nucleares, la temperatura de cuaje será diferente y se describe al discutir los procedimientos correspondientes.

\*\*El número de ciclos varía dependiendo del tipo y de la naturaleza de la muestra biológica examinada. Para muestras modernas, 30 a 35 ciclos serán suficientes, mientras que 40 a 45 ciclos se usan para muestras de ADN antiguas o degradadas.

**Primers de amplificación de ADN mitocondrial:**

Primer mitocondrial y secuencia	Primer longitud (bp)	Fusión Temperatura, Tm (°C)	GC Contenido (%)
mt15971F TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC	20	58.35	45.0
mt16071F CCC ATC AAC AAC CGC TAT GT	20	60.4	50.0
mt16210F CCC ATG CCT ACA AGC AAG TA	20	56.0	45.0
mt16301F CAG TAC ATA GTA CAT AAA GCC A	22	57.8	36.4
mt1F GAT CAC AGG TCT ATC ACC C	19	60.5	52.6
mt15F CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG	20	60.4	50.0
mt155F TAT TTA TCG CAC CTA CGT TC	20	56.3	40.0
mt247F GAA TGT CTG CAC AGC CAC	18	60.7	55.6
mt187R CGC CTG TAA TAT TGA ACG TAG G	22	61.5	45.5
mt279R GAT GTC TGT GTG GAA AGT GG	20	60.4	50.0
mt389R CTG GTT AGG CTG GTG TTA GG	20	62.5	55.0
mt429R CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A	22	61.5	45.5
mt16114R			
mt16257R			
mt16322R TGG CTT TAT GTA CTA TGT ACT G	22	57.8	36.4
mt16420R TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG	20	60.4	50.0

**Secuenciación de ADN mitocondrial:**

La reacción de secuenciación de ADN mitocondrial que se realiza en este proyecto emplea un procedimiento químico de terminación de cadena. Más específicamente, el kit de secuenciación cíclica de terminador ABI Big Dye® v3.1 se emplea para preparar

las reacciones de secuenciación. Cabe notar que los volúmenes de los reactivos fueron adaptados ligeramente, para los fines de este proyecto, de los indicados por el distribuidor.

### Reactivos requeridos

#### Big Dye® Terminator v3.1

- Para cada reacción de terminación de ADN, añada los siguientes reactivos en un tubo de 0.2mL: 3.0 µL de terminador Big Dye® v3.1, 0.3 µL del Primer *Forward* o *Reverse* usados en la detección de PCR y 7.0 µL del producto PCR purificado.
- La reacción de secuenciación de ADN luego se amplifica usando los parámetros de PCR a ciclar que se nombran a continuación.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de Ciclos
94.0	0:30	35*
50.0	0:15	
72.0	4:00	
4.0	Hold	1

\* Nótese que para muestras degradadas o antiguas, el número de ciclos se incrementó hasta 40 ciclos.

- Purificar el PCR producido usando columnas DTR de exclusión Dyex o de tamaño E.Z.N. (mencionados en la sección de los protocolos de purificación).
- Desecar el producto purificado de secuenciación.
- Almacene la muestra a 4 °C hasta la detección de secuencia con el analizador genético ABI PRISM 3100.

### Primers de amplificación de ADN nuclear

Primer y secuencia	Longitud (bp)	Fusión Temperatura, Tm (°C)	GC Contenidos (%)
Amel-A CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	24	65.4	50.0
Amel-B ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG	24	63.7	45.8
AmF GCT ACC ACC TCA TCC TGG GCA CCC	24	64.0	67.0
AmR ACA GGC TTG AGG CCA ACC ATC AGA GC	26	63.0	58.0

### **Multiplex Autosomal Short Tandem Repeats:**

Réplicas de tandem corto autosomales (STRs) se amplifican usando un kit comercial desarrollado por Applied Biosystems. El kit de amplificación de PCR AMPFI STR® Identifiler® es capaz de amplificar simultáneamente 15 *loci* de cromosomas autosomales y el *locus* de amelogenin en las cromosomas sexuales en una sola reacción. Ya que se trata de un kit comercial, la información sobre los reactivos utilizados en esta reacción son propiedad de la empresa. Aun así, se sabe que el kit usa química 5-dye para permitir la diferenciación de los grupos de *loci* cuando se corre en un analizador genético ABI PRISM® 3100.

### *Reactivos requeridos*

AmpFI STR Identifiler Mastermix  
AmpFI STR Identifiler Primer Mix  
AmpliTaq polimerasa de oro (5U/μL)  
ddH2O

- Para cada muestra de amplificación de PCR AmpFI STR® Identifiler®, se combinan los siguientes reactivos en un tubo de 0.2mL.

<b>Reactivos</b>	<b>Volúmen por reacción (μL)</b>
AmpFI STR Identifiler Mastermix	10.5
AmpFI STR Identifiler Primer Mix	5.5
AmpliTaq polimerasa de oro (5U/μL)	0.5
ddH2O	--*
Patrón de ADN	--*

\*El volúmen total de la reacción es de 25μL. Sin embargo, solo 15 μL del coctel de *mastermix*, Primer y AmpliTaq se agrega en esta reacción, ya que el volúmen adicional se reserva para cualquier error de pipeta. El volúmen del ddH2O agregado depende del volúmen del patrón.

La mezcla de reactivos AmpFI STR® Identifiler® se amplifica usando los siguientes parámetros de PCR: Después de la amplificación, cubra el producto con folio de aluminio.

Debido a que los Primers son etiquetados con fluorescencia, los reactivos son sensibles a la luz. Almacene las muestras a una temperatura de 4 °C hasta que se realice el análisis de fragmentación con el analizador genético ABI PRISM® 3100.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de Ciclos
95.0	11:00	1
94.0	1:00	28
59.0	1:00	
72.0	1:00	
60.0	1:00:00	1
4.0	Hold	1

### ***Agarose Gel Electrophoresis Protocol:***

La electrophoresis de gel de agarosa es un método de detección que se usa para detectar la ausencia o presencia de ADN, además de comparar diferencias en tamaño de fragmentos de ADN amplificados para este proyecto. Geles de agarosa mantienen una resolución más baja que otras técnicas de detección y por tanto no pueden usarse para diferenciar fragmentos que solo difieren por una longitud de tan solo unos pocos pares de base.

### *Reactivos requeridos*

1X TBE Tope  
Agarosa  
10mg/mL bromido de etidio

### Protocolo para producir gel

- \*El procedimiento siguiente producirá un gel de agarosa de 1-1.5%.
- Pesar 0.375g de agarosa y vertir en un recipiente Pyrex de 125 mL.
- Medir 25mL de tope de 1X TBE y agregar lentamente a la agarosa, mientras que continuamente se esté agitando el recipiente.
- Cubrir la apertura del recipiente con folio de aluminio.
- Calentar la solución agitando cada 1-2 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
- Permitir que la solución se enfríe durante 5 minutos.
- Agregue 2.0 µL of 10mg/mL de tinte de bromido de etidio.
- Vierta lentamente la solución en un plato de agarosa e inserte el peine del gel.
- Permita que el gel repose durante 30 a 45 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, el gel puede ser colocado en el refrigerador por menos tiempo.

Cargando y corriendo una prueba de gel

- Una vez que el gel se ha sentado, remover lentamente el peine del gel y cuidadosamente colocarlo dentro del aparato de gel.
- Rellene el aparato del gel con 1X de tope TBE hasta que el gel está completamente sumergido. Comúnmente hay un indicador de línea de relleno en un lado del aparato.
- Limpie los orificios dentro del gel con una pipeta de Pasteur para asegurar que no haya burbujas de aire.
- Mezcle 7.0  $\mu\text{L}$  del producto de PCR con 3.0  $\mu\text{L}$  de 6X de tinte de carga y coloque la muestra en los orificios del gel (asegúrese que un orificio esté vacío).
- Cargue 3.0  $\mu\text{L}$  de un estándar de tamaño de ADN en el orificio remanente.
- Fije el voltaje en 110 volts y el tiempo a 25 minutos en el aparato de electroforesis. Enchufe el aparato de gel con el aparato de electroforesis.
- Una vez que el gel está corriendo, coloque el gel sobre el trans-iluminador (fije a longitud de honda de UVB) y tome fotografías.

### ***Protocolo para la electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE):***

Geles de poliacrilamido (PAGE) constituyen la segunda técnica a emplear para la detección de ADN amplificado en este proyecto de investigación. Esta técnica de detección guarda ventajas, ya que es altamente sensible a las reducidas concentraciones de productos de PCR. Además es capaz de distinguir fragmentos de ADN que solo difieren por una longitud de un par de bases. Geles de PAGE se emplean para el análisis del gen de amelogenina, PCRs anidados y hemi-anidados y para comparar diferentes tamaños de fragmento.

### *Reactivos requeridos*

1X TBE Tope  
5X TBE Tope  
Acrilamida  
TEMED  
10% APS  
ddH<sub>2</sub>O

### Protocolo para producir gel

- \*La aplicación de este protocolo produce geles PAGE de 12 – 6%.
- La solución APS de 10% es preparado mezclando 0.1 g APS con 1.0 mL ddH<sub>2</sub>O.
- Enfríe con hielo un recipiente de vidrio Pyrex de 125 mL flask.
- Coloque 12 cajas de gel y peines antes de hacer la solución.
- Combine 20 mL 5X TBE Tope, 12.5 mL acrilamida, 66.5 mL ddH<sub>2</sub>O, 900  $\mu\text{L}$  de 10% APS y 90.0  $\mu\text{L}$  de TEMED dentro de un recipiente de vidrio Pyrex.

- Tras mezclar la solución mantener sobre hielo y continúe a agitar cada 2 minutos.
- Rellene los estuches de gel con la solución usando una pipeta de transferencia. Se recomienda inclinar el estuche para verter la solución solo en una de las esquinas a la vez para evitar la formación de burbujas.
- Coloque el peine encima del estuche llenado.
- Permita que el gel se asienta manteniéndolo hasta una hora con temperatura ambiente.
- Guarde los geles a una temperatura de 4 °C hasta usarlos.

#### Cargando y corriendo el gel

Remover la tapa blanca en el fondo del gel y del peine de gel del estuche de gel.

Deslice el estuche de gel hacia el aparato de gel. Cada aparato puede contener hasta dos geles; si se pretende cargar solo un gel, recomendamos colocar un estuche vacío dentro del otro compartimento.

Rellene el aparato del gel con tope de 1X TBE hasta que los orificios del gel estén completamente sumergidos en el centro del aparato y la salida en el fondo del estuche de gel igualmente lo esté.

Purgar los orificios con una pipeta Pasteur asegurando que no haya burbujas.

Combine 7 µL del producto de PCR con 3 µL del tinte de carga 6X. Cargue 3 µL del estándar del tamaño de ADN en un orificio, seguido por las muestras que deben distribuirse dentro de los orificios restantes.

Conecte el aparato de gel con el aparato electroforético y ajuste el voltage a 125 volts y el tiempo a 40 minutos.

Una vez que se haya completado la corrida, abra el estuche de gel y remueva con cuidado el gel de PAGE. Tiña el gel de PAGE durante 15 minutos con bromido de etidio. Coloque el gel sobre un trans-iluminador (defina una longitud de onda UV B) y fotografíe.

#### ***Protocolo para la electroforesis capilar:***

La detección de STRs autosomales y secuencias de ADN mitocondrial se logra con un analizador genético ABI PRISM® 3100. Esta técnica no solo es capaz de diferenciar fragmentos de ADN mediante un solo par de bases, sino también puede analizar múltiples fragmentos de la misma longitud mediante el empleo de Primers que son etiquetados con fluorescencia durante la amplificación.

Detección analítica de fragmentos Genescan

#### *Reactivos requeridos*

Hi-Di Formamido

Tamaño estándar (usualmente 500-LIZ)

#### Preparación y carga de la muestra

- Re-suspender la muestra desecada a secuenciar en 15 µL de Hi-Di formamido.
- Mezclar la muestra durante 1 minuto y mover (zip) el tubo.
- Calentar la muestra at 95 °C durante 3 minutos y colocar inmediatamente sobre hielo durante 2 minutos.
- Mezclar y mover (zip) la muestra.
- Mantenga la muestra sobre hielo hasta que esté lista para su carga de electroforesis capilar.
- Transferir el volúmen completo de 15µL de la muestra a un plato con 96 orificios ABI.
- Asegurarse que los 16 orificios que corresponden a un ducto capilar contengan 15µL de muestra o Hi-Di Formamido durante el análisis.
- Centrifugar el plato de ABI para remover todas las burbujas de aire antes de cargar el plato en un analizador genético ABI PRISM® 3100.

#### ***Protocolo para el análisis de fragmentacion usando el kit de identificación ABI AMPFISTR®:***

##### *Reactivos requeridos*

Hi-Di formamido

500-LIZ tamaño estándar

#### Preparación y carga de la muestra

- Etiquetar un tubo 0.5 mL para cada muestra y uno adicional para la muestra Allelic Ladder.
- Agregue 10 µL de la muestra en un tubo apropiadamente etiquetado y 10 µL de Allelic Ladder.
- Agregue 0.3 µL del estándar de tamaño 500-LIZ y 9.0 µL de Hi-Di Formamido en cada tubo.
- Mezclar la muestra y luego mover (zip).
- Calentar la muestra a 95 °C durante 3 minutos y colocar inmediatamente sobre hielo durante 2 minutos.
- Brevemente mezclar y mover (zip) la muestra.
- Mantenga la muestra sobre hielo hasta que esté lista para cargarla para la electroforesis capilar.
- Transferir el volúmen total de la muestra (10.3 µL) en un orificio dentro de un plato ABI 96.
- Asegúrese que los 16 orificios que corresponden a cada unidad capilar durante el análisis contengan 15µL de muestra o formamida Hi-Di.
- 10. Centrifuge el plato ABI para remover todas las burbujas de aire antes de cargar el plato en un analizador genético ABI PRISM® 3100.