

Inhibición de PCR

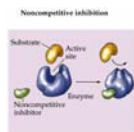
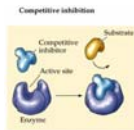
- Inhibidores son materiales que son co-extraídos o inhiben la extracción de ADN
- Trabajan
 - Interferiendo con la ruptura de la célula
 - Degradando ó enlazando ácidos nucleicos
 - Degradando ó enlazando la polimerasa
 - Interferiendo con las condiciones de reacción de PCR

Ejemplos de inhibidores

Fuente	Inhibidor
Sangre	Hematina
Pelo	Melanina
Heces	Sales biliares, sacáridos
Tierra	sustancias húmicas
Orina	urea
Mahones	tintes textiles

Mecanismos de Inhibición

- Ruptura de célula no exitosa
- Degradación ó caputra de ADN
- Inhibición de polimerasa
 - Inhibidores bloquean el sitio activo de la polimerasa
 - Afecta procesamiento de enzima

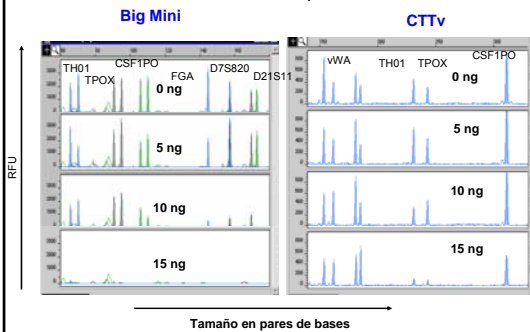


<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit4/genetics/protsyn/regulation/comp.html>
(accesado Agosto 2004)

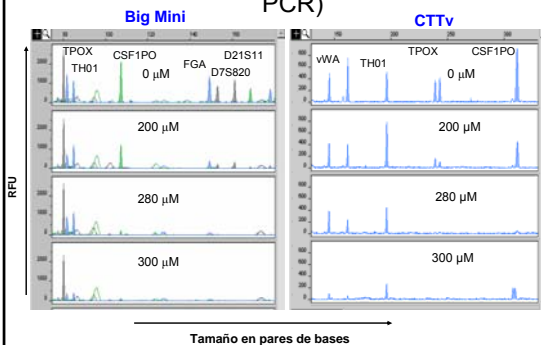
Estudio de Inhibidor

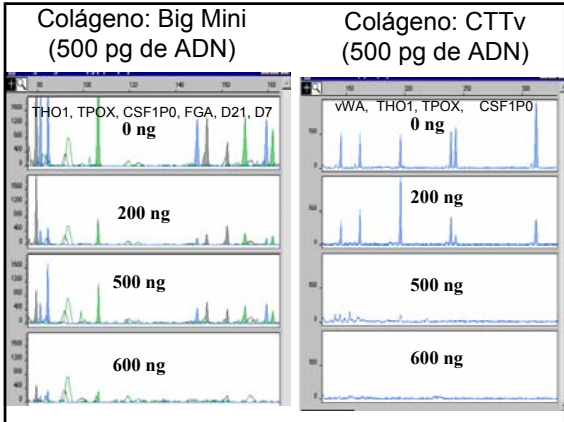
- Inhibidores de PCR: hematina, indigo, melanina, ácido húmico, colágeno, calcio
- Presente en muestras degradadas Ej. muestras de hueso, muestras expuestas a condiciones ambientales
- ¿Cuál es el efecto del tamaño de picos y secuencia en inhibición de PCR?
- ¿En qué niveles ocurre inhibición?

Efecto Cuando se Aumenta la Concentración de Ácido Húmico (25 μ L de volumen de reacción de PCR)



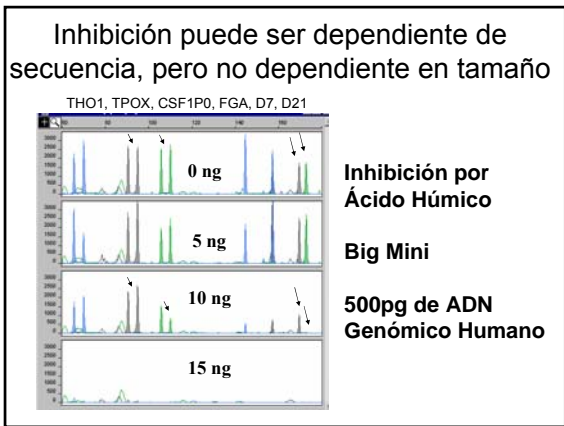
Efecto Cuando se Aumenta la Concentración de Índigo: (25 μ L de volumen de reacción de PCR)





Inhibidores de PCR

- En el proceso de PCR, la enzima se mueve a lo largo de la cadena de ADN, añadiendo bases complementarias
- Si hay inhibidores presente, el proceso no funciona-porqué?
- En nuestros estudios, la falta parece ser más una función de secuencia que de tamaño de pico
- Mecanismos de inhibición pueden variar y en muchos casos-tierra y hueso-por ejemplo, ambos degradación e inhibición pueden estar presente



Punto de fusión de 'primer' de PCR puede ser un factor

Locus	Secuencias de 'primers' de Big Mini (5'-3')	Tm(°C)
TH01	F 6FAM-CCTGTTCTCCCTTATTTCCC	61.0
	R GTTCTTGGGAACACAGACTCCATGGTG	62.8
FGA	F 6FAM-AAATAAAATTAGGCATATTTACAAGC	55.9
	R GCTGAGTGATTTGTCTGTAATTG	56.6
CSF1PO	F VIC-ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG	52.4
	R GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA	53.6
D21S11	F VIC-ATTCCCAAGTGAATTGC	55.8
	R GGTAGATAGACTGGATAGATAGACGA	56.5
TPOX	F NED-CTTAGGGAACCCTCACTGAATG	60.0
	R GTTCTTGTCCTTGTGAGCGTTTATTTC	61.0
D7S820	F NED-GAACACTTGTGATAGTTTGAACGAAC	58.9
	R GTTCTTTCATTGACAGAATTGCACCA	58.6

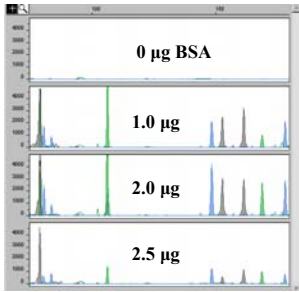
Concentración Inhibitoria Mínima

INHIBIDOR (ADN inicial)	Big Mini (500 pg)	Mini 2 & Mini 4 (250 pg)	CTTv (500 pg)
Hematina	0.76 µM	0.50 µM	0.50 µM
Índigo	280 µM	280 µM	280 µM
Melanina	4 ng	4 ng	4 ng
Ácido Húmico	15 ng	12.5 ng	15 ng
Colágeno	800 ng	600 ng	200 ng
Calcio	1000 µM	800 µM	800 µM

Limpieza para Inhibidores de PCR

- **Albumina de suero bovino (BSA)**
 - Disminuye inhibición de PCR haciendo a la enzima más eficiente y enlazando ciertos compuestos inhibitorios
- **Agarosa de temperatura de fusión baja/sephadex/filtración**
 - Disminuye inhibición de PCR capturando polimeros largos como ADN, y liberando otros compuestos inhibitorios
- **Añadición de mayores concentraciones de polimerasa**
 - Saturar inhibidores que enlazan la polimerasa
- **Dilución de la muestra**
 - ADN aún amplifica, inhibidores están menos concentrados y enlazan la polimerasa/u otros componentes de la reacción
- **Destrucción de inhibidores con NaOH**

BSA puede disminuir inhibición por ácido húmico
Figura muestra incremento en concentración de BSA en un coctel de PCR que contiene 30ng de ácido húmico

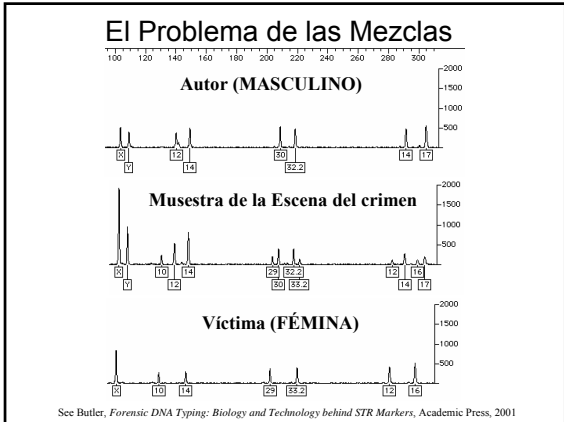


Big Mini
Volumen de
reacción 25 µl,
33 ciclos

Conclusiones

- Inhibidores actúan de muchas maneras – Los más preocupantes son aquellos que se coextraen con el ADN
- Estos inhibidores producen varios efectos en la data incluyendo - problemas en balance de picos, amplificación de secuencia específica y pobre sensibilidad
- Adición de BSA y extra polimerasa son métodos comunes para remediar dicho problema
- QPCR es un método nuevo que ayuda en la detección de inhibición

Temas Forenses/Análisis de Mezclas



"Artefactos" Biológicos de Marcadores STR afectan la interpretación de las mezclas

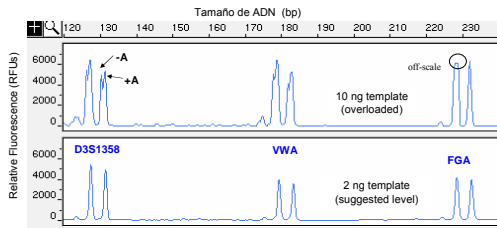
- Productos 'Stutter'
- Adición de nucleótidos 'Non-template'
- Microvariantes
- Alelos nulos
- Mutaciones

- Producen picos extra, desbalance de picos, alelos fuera del marcador, alelos ausentes

Productos 'Stutter'

- Picos que aparecen primordialmente una repetición menos que el alelo verdadero como resultado de 'strand slippage' durante la síntesis de ADN
- 'Stutter' es menos pronunciado en unidades de repetición con tamaños más grandes (dinucleótidos > tri- > tetra- > penta-)
- Regiones de repetición más largas generan más 'stutter'
- Cada producto 'stutter' en sucesión, es menos intenso que el anterior (alelo > repetición-1 > repetición-2)
- Picos 'stutter' hacen el análisis de mezclas más complicado

Altos Niveles de ADN producen Adenilación Incompleta

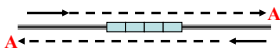


Baje [ADN] o mantenga a 60C por 20-40 min para corregir

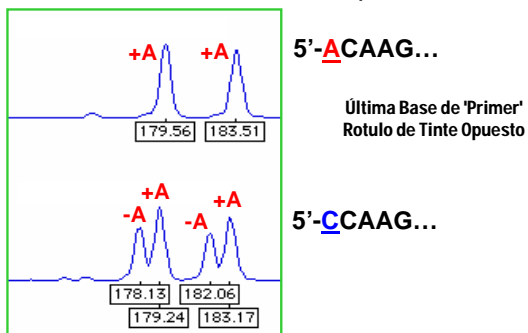
Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 6.4, ©Academic Press

Adición Non-template

- La polimerasa will often add an extra nucleotide to the end of a PCR product; most often an "A"
- Dependent on 5'-end of the reverse primer
- Can be enhanced with extension soak at the end of the PCR cycle (e.g., 15-45 min @ 60 or 72 °C)
- Can be reduced with new polymerase
- Best if there is NOT a mixture of "+/- A" peaks – bad quantitation/poor sensitivity



Impacto del nucleotido 5' en Adición 'Non-Template'



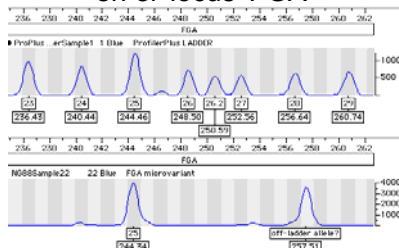
Alelos Microvariantes

- No todos los alelos tienen unidades de repetición completas
- Alelos con unidades de repetición parciales están designados por el número de repeticiones completas seguido de un punto decimal y el número de bases en la repetición parcial. Ejemplo: Alelo TH01 9.3
- $(AATG)_6(-ATG)(AATG)_3$

Microvariantes

- Definidos como alelos que no son múltiplos exactos de la estructura básica de repetición ó variantes de secuencia de la estructura de repetición ó ambos
- Pueden existir como inserción, deleción ó cambio de base
- Variación en secuencia puede ocurrir dentro de la repetición, en la región adyacente, o en un lugar de enlace de 'primers'
- Puede causar fallo en PCR debido a polimorfismos en el sitio del 'primer' -- "alelos nulos"

Detección de un alelo microvariante en el 'locus' FGA



$$\delta_1 = S_{27} - L_{25} = 244.34 - 244.46 = -0.12 \text{ bp}$$

$$\delta_2 = S_{31} - L_{29} = 257.51 - 256.64 = +0.87 \text{ bp}$$

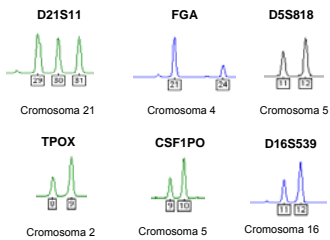
$$s = |\delta_1 - \delta_2| = |-0.12 - 0.87| = 0.99 \text{ bp}$$

Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 6.5, ©Academic Press

Tres patrones de picos

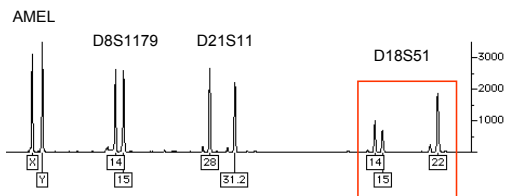
- Pueden resultar de translocaciones cromosomales (2 copias del mismo gene of same gen), trisomías, mutaciones somáticas
- Resultado puede ser un grupo de 3 alelos balanceados ó no dependiente en el tipo de mutación
- A menudo, estas anomalías pueden fortalecer antes de debilitar una conclusión
- Más de 56 patrones trialélicos han sido reportados en todos los 13 'loci' de CODIS

Altura de picos Anormal de la línea de células K562



Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing, Focus Box 7.1*, ©Academic Press

Patrón de Tres picos en D18S51

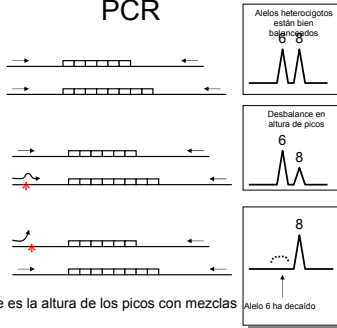


Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing, Figure 6.6*, ©Academic Press

Alelos Nulos

- Alelo está presente en la muestra de ADN pero no puede ser amplificado debido a un cambio en nucleótido en el lugar de enlace del 'primer'
- Decaimiento alélico es un problema porque muestras heterocigotas aparecen como un homocigoto falso
- Dos grupos de 'primers' de PCR pueden proveer diferentes resultados en muestras que se originan de la misma fuente
- Este fenómeno impacta las bases de datos de ADN
- Estudios de concordancia son típicamente llevados a cabo antes de utilizar un estuche de STR nuevo

Impacto de Variación de Secuencia de AND en el lugar de enlace del 'primer' en PCR



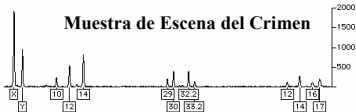
Un aspecto importante es la altura de los picos con mezclas
 Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 6.8, ©Academic Press

El Problema de las Mezclas

- ¿Pueden/deben ser interpretadas?
 - Cálculos pueden ser basados en la probabilidad de un sospechoso siendo incluido vs. una persona al azar teniendo los alelos encontrados
 - Alternativamente una interpretación puede ser basada en buscar contribuidores mayores/menores
 - En este caso la razón de altura de los picos se torna importante
 - Todas las posibilidades deben ser examinadas y aquellas que son ilógicas deben ser rechazadas
 - Para muestras mezcladas, los picos de amelogenina pueden proveer información valiosa

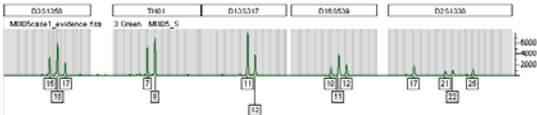
Primer Paso

- Determinar si es una mezcla
 - Busque bandas adicionales
 - Mida razón de bandas 'stutter' (mayor de 15%?)
 - Discuente artefactos tales como gotas de tinte, puntos y eventos de matriz
 - Busque bandas +A (N)



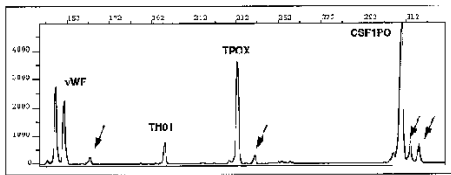
Primer Paso (b)

- Busque asimetría de picos
 - Familiares cercanos con perfiles parciales pueden ser muy similares
 - ADN con bajo número de copias produce asimetría de picos y aumenta el 'stutter'
 - Mutaciones en lugar de enlace de 'primer' también puede causar asimetría (lejos del extremo 3')
 - Verifique anomalías cromosomales con muestras de referencia
 - PHR por debajo de 60% indica mezcla potencial, efecto estocástico ó inhibición



Segundo Paso

- Identificar el número de contribuidores a la mezcla
- Para dos contribuidores un máximo de 4 alelos deben ser observados
- 5-6 alelos en un 'locus' indica 3+ contribuidores
- # de contribuidores debe cuadrar con los hechos del caso



Cuarto Paso

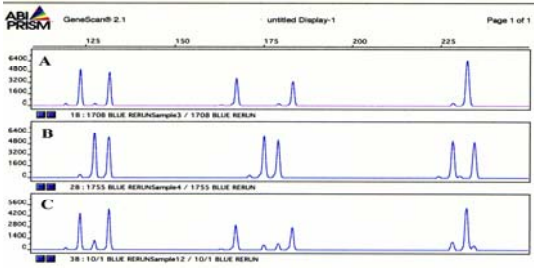
- Cuando 4 picos están presentes usualmente es trabajo fácil determinar los contribuidores mayores y menores
- El trabajo es más difícil si existen alelos compartidos
- A este punto uno debe resistir la tentación de mirar los perfiles individuales de la víctima y el sospechoso
- Esto limita predisposición en la interpretación

Cuarto Paso (b)

- Haga una lista de todas las posibles combinaciones
- Examine la proporción de intensidad de picos
 - Calcule la intensidad de pico esperada/áreas esperadas de acuerdo a sus asunciones
 - Algunas asignaciones en pareja se toman ilógicas
 - Haga una lista de las posibles asignaciones

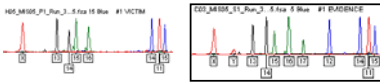
Quinto Paso

- Compare resultados previos con sospechoso, víctima y muestras de referencia
- Esto permite una evaluación imparcial de toda la data



Estudio Interlab de Interpretación de Mezclas (MIX05)

- Sólo considera interpretación de data - para remover problemas de variación en detección del instrumento y problemas de cuantificación
- 94 labs se matricularon para participar
- 69 labs han devuelto resultados (17 de fuera de los EU)
- Cuatro casos ficticios provistos con electroferogramas de "víctima" y "evidencia" (Archivos .fsa de GeneScan – que pueden ser convertidos para Mac ó GeneMapper; archivos de gelatina disponibles a FMBIO labs)
- Data disponible con estuches Profiler Plus, COfiler, SGM Plus, PowerPlex 16, Identifier, PowerPlex 16 BIO (FMBIO)



Perfil de sospechoso
??
 Junto con razones para hacer llamados y cualquier estadística que sea reportada

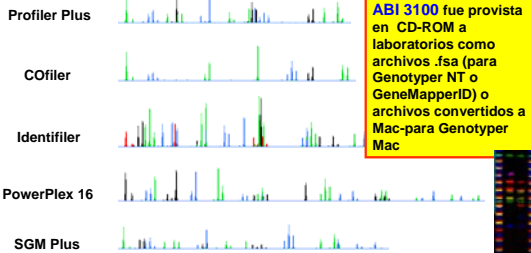
Diseño y propósito de estudio MIX05

- Permite a un gran número de practicantes forenses **evaluar data de la misma mezcla**
- Provee múltiples casos representando un amplio rango de escenarios de mezclas
- Genera data de multiples estuches de STR en la mismas muestras de mezclas para comparar el procedimiento de detección de componentes menores
- La variable primordial debe ser la guía de interpretación del laboratorio más que la extracción del ADN, amplificación por PCR ó la sensibilidad de análisis del instrumento
- **Existen mejores prácticas que puedan ser inculcadas a otros?**

Resultados de MIX05 en Múltiples Estuches

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/interlab/MIX05.htm>

Evidencia de Primer Caso (mezcla)



Data Generada por ABI 3100 fue provista en CD-ROM a laboratorios como archivos .fsa (para Genotyper NT o GeneMapperID) o archivos convertidos a Mac-para Genotyper Mac

Data de FMBIO se hizo disponible cuando requierda
