



Promega

Technical Manual

Kit PunchSolution™

INSTRUCCIONES PARA UTILIZAR EL PRODUCTO DC9271.



www.promega.com

IMPRESO EN ESTADOS UNIDOS
5/12

Nro. de pieza: TMD038

Kit PunchSolution™



Toda la bibliografía técnica está disponible en Internet, en el sitio www.promega.com/resources/protocols/
Visite el sitio web para asegurarse de estar utilizando la versión más actualizada de este manual técnico.
Comuníquese con el servicio técnico de Promega si tiene alguna pregunta acerca del uso de este sistema.
Correo electrónico: genetic@promega.com

1. Descripción	1
2. Componentes y condiciones de almacenamiento del producto	2
3. Protocolo para procesamiento de perforaciones de 1,2 mm desde tarjetas de almacenamiento no FTA	2
4. Protocolo para amplificación y detección de ADN por medio de PowerPlex® Systems	3
A. Configuración de la amplificación para PowerPlex® Systems independientes de AmpSolution™	4
B. Configuración de la amplificación para PowerPlex® Systems dependientes de AmpSolution™	5
C. Electroforesis capilar	5
5. Resolución de problemas	6
6. Productos relacionados	9

1. Descripción

El kit PunchSolution™ está diseñado para procesar perforaciones a partir de tarjetas de almacenamiento no FTA antes de la amplificación por medio de PowerPlex® Systems para determinar el genotipo STR humano. El kit PunchSolution™ es idóneo para procesar preliminarmente perforaciones a partir de tarjetas de almacenamiento no FTA que se han usado para recolectar células o sangre de la boca. El kit PunchSolution™ contiene el PunchSolution™ Reagent y el 5X AmpSolution™ Reagent. El PunchSolution™ Reagent se usa para tratar perforaciones antes de la amplificación, en tanto que el 5X AmpSolution™ Reagent debe agregarse a PowerPlex® Systems que son dependientes de AmpSolution™ (vea la Tabla 1). Los PowerPlex® Systems dependientes de AmpSolution™ enumerados en la Tabla 1 no generarán un perfil completo a partir de perforaciones tratadas con el PunchSolution™ Reagent sin adición del 5X AmpSolution™ Reagent. Para amplificación directa a partir de tarjetas de almacenamiento FTA(R) por medio de PowerPlex® Systems dependientes de AmpSolution™, consulte el 5X AmpSolution™ Reagent (Nro. de cat. DM1231).

Tabla 1. Compatibilidad de amplificación directa de PowerPlex® Systems.

PowerPlex® Systems dependientes de AmpSolution™ ¹	PowerPlex® Systems independientes de AmpSolution™
PowerPlex® 16 System ²	PowerPlex® 18D System
PowerPlex® 16 HS System	PowerPlex® 21 System
PowerPlex® ESX Systems	PowerPlex® Y23 System
PowerPlex® ESI Systems	
PowerPlex® CS7, Custom	

¹ Otros PowerPlex® Systems pueden ser compatibles pero no se han sometido a pruebas. Los sistemas que no están diseñados originalmente para amplificación directa requieren la incorporación del 5X AmpSolution™ Reagent a la mezcla de amplificación. Se necesita optimización y validación del laboratorio individual. Comuníquese con el servicio técnico de Promega para obtener más información.

² El kit PunchSolution™ y el PowerPlex® 16 System se debe usar únicamente con muestras bucales, no con muestras de sangre.

2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
Kit PunchSolution™	100 preparaciones	DC9271

No debe ser utilizado para diagnóstico médico. Este sistema contiene los reactivos necesarios para procesar 100 muestras. Incluye:

1 ml	PunchSolution™ Reagent
500 µl	5X AmpSolution™ Reagent*

Condiciones de almacenamiento: A su llegada, el PunchSolution™ Reagent debe descongelarse por completo, mezclarse al invertirlo suavemente y almacenarse a 2–10 °C. El 5X AmpSolution™ Reagent debe descongelarse por completo, mezclarse mediante agitación y almacenarse a 2–10 °C. El reactivo puede estar turbio después de su descongelamiento o almacenamiento a 4 °C. Si ocurre esto, caliente el buffer brevemente a 37 °C, y luego agítelo hasta que esté claro. No almacene los reactivos en la puerta del refrigerador, en donde puede fluctuar la temperatura. Almacenar los reactivos en la puerta del refrigerador puede poner en riesgo la estabilidad.

*El AmpSolution™ Reagent se usa con PowerPlex® Systems que no son compatibles con la amplificación directa (vea la Tabla 1). No se requiere el reactivo para sistemas de amplificación directa, tales como los sistemas PowerPlex® 18D, PowerPlex® 21 y PowerPlex® Y23.

3. Protocolo para procesamiento de perforaciones de 1,2 mm desde tarjetas de almacenamiento no FTA

Los tipos de muestras que no son FTA incluyen:

- Muestras bucales en dispositivos Bode Buccal DNA Collector™
- Muestras de sangre o bucales en perforaciones de tarjetas de almacenamiento no FTA (por ejemplo, S&S 903)

Nota: Aunque muchos sistemas son lo suficientemente sólidos para encargarse del arrastre de hemoglobina desde perforaciones de sangre, los PowerPlex® Systems que usan el Gold ST★R Buffer, tal como el sistema PowerPlex® 16 y el sistema Y se ven inhibidos por la hemoglobina presente en las perforaciones de sangre, aun cuando usen el 5X AmpSolution™ Reagent.

Materiales que deberá suministrar el usuario:

- Placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp® de 0,2 ml (Nro. de pieza N801-0560 de Applied Biosystems) o equivalente
- Calentador de 70 °C con inserción capaz de aceptar una placa de 96 pocillos o un termociclador fijado en 70 °C.
 1. Coloque una perforación de 1,2 mm por muestra en un pocillo de la placa de reacción de 96 pocillos.
 2. Agregue 10 µl de PunchSolution™ Reagent a cada perforación de 1,2 mm.

Nota: No cubra la placa con una tapa ni con un sellador; como tampoco coloque la placa en un termociclador con una tapa cerrada y sometida al calor. Una tapa cerrada y caliente evitará la evaporación, aun con una placa abierta. Si utiliza una termociclador con una tapa sometida al calor, deje la tapa abierta para permitir una evaporación eficaz.

3. Incube la placa a 70 °C durante 30 minutos hasta que se seque.

Nota: Recomendamos enfáticamente incubar durante el periodo total de 30 minutos. Un tiempo menor de incubación puede originar un mal desempeño.

4. Protocolos para amplificación y detección de ADN por medio de PowerPlex® Systems

Materiales que deberá suministrar el usuario

- PowerPlex® System
- Placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® de 0,2 ml (Applied Biosystems) o equivalente
- calentador en seco de 95 °C, baño de agua o termociclador
- Hielo picado o baño de hielo
- Centrifugador compatible con placas de 96 pocillos
- Puntas para pipetas resistentes al aerosol
- Placa óptica de 96 pocillos MicroAmp® de 0,2 ml y septa para electroforesis capilar
- termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- 3100, 3130, 3130xl, 3500 o 3500xL serie capilar
- Polímero de rendimiento optimizado 4 (POP-4™)
- formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems Nro. de Cat. 4311320)

Nota: Aunque los PowerPlex® Systems de amplificación directa (es decir, los PowerPlex® 18D, 21 e Y23 Systems) y los más recientes PowerPlex® Systems (es decir, los PowerPlex® 16 HS, ESX y ESI Systems) son lo suficientemente resistentes para encargarse del arrastre de hemoglobina desde perforaciones de sangre, las versiones anteriores de PowerPlex® Systems, tales como los PowerPlex® 16 e Y Systems se ven inhibidos por la presencia de hemoglobina en las perforaciones de sangre, aun cuando se use 5X AmpSolution™ Reagent. Por este motivo, no recomendamos usar el PowerPlex® 16 System para perforaciones a partir de tarjetas de sangre.

Recomendamos incluir un control positivo (por ejemplo, ADN de control 2800M) en la misma placa que las amplificaciones de perforaciones procesadas. Sugerimos agregar la cantidad de plantilla de ADN de control 2800M por cada reacción de 25 µl que esté indicada para cada PowerPlex® System en la Tabla 2 en un volumen de 1 µl. El aumento en el volumen de reacción de 25 µl a 26 µl que se produce en las amplificaciones de control positivo no tiene efecto en la reacción. Un cambio en el número de ciclos requerirá cambiar la masa de ADN de control 2800M para mantener las alturas de picos comparables. Una reducción de un ciclo en el número de ciclos requerirá un aumento del doble en la masa de la plantilla de ADN amplificada, en tanto que un aumento de un ciclo requerirá una reducción del doble.

Use el programa de ciclos recomendado en el Manual técnico apropiado del PowerPlex® System y los números de ciclos que se muestran en la Tabla 2, como punto de partida para la optimización. Coloque la placa de amplificación en el termociclador y comience el programa de ciclos térmicos tan pronto como se agregue la mezcla de amplificación del PowerPlex® System PCR a todos los pocillos. El almacenamiento prolongado de reacciones acumuladas antes de los ciclos puede derivar en un mal rendimiento (es decir, alturas de bajo pico para amplicones mayores).

4. Protocolos para amplificación y detección de ADN por medio de PowerPlex® Systems (continuación)

Los instrumentos de amplificación y detección pueden variar junto con la cantidad de material depositado en la perforación de 1,2 mm. Estos factores pueden afectar las alturas de los picos de amplificación. Es posible que deba optimizar el número de ciclos. Inicie con los números de ciclos enumerados en la Tabla 2 y aumente o disminuya en un ciclo el número de ciclos.

Tabla 2. Números de ciclos y cantidades de ADN de control 2800M recomendados para reacciones de PowerPlex® System.

PowerPlex® System	Número de ciclos	Cantidad de ADN de control 2800M (ng)
PowerPlex® 16 System	10/17	10
PowerPlex® 16 HS System	10/17	10
PowerPlex® ESX Systems	24	10
PowerPlex® ESI Systems	24	10
PowerPlex® 21 System	25	10
PowerPlex® 18D System	27	5
PowerPlex® CS7 System, Custom	27	10
PowerPlex® Y23 System	26	5

4.A. Configuración de la amplificación para PowerPlex® Systems independientes de AmpSolution™

Siga la sección de amplificación directa de ADN desde perforaciones no FTA del Manual técnico apropiado del PowerPlex® System para la configuración de la mezcla de amplificación. El PowerPlex® 18D System se muestra como un ejemplo.

1. Prepare la mezcla de amplificación de PowerPlex® 18D de la forma siguiente:

Componente ¹	Volumen por reacción
Agua, grado de amplificación	15 µl
PowerPlex® D 5X Master Mix	5,0 µl
PowerPlex® 18D 5X Primer Pair Mix	5,0 µl
Volumen total	25 µl

¹Agregue agua, grado de amplificación, al primer tubo, luego agregue la PowerPlex® D 5X Master Mix y la PowerPlex® 18D 5X Primer Pair Mix. Agite por completo antes de agregar a las perforaciones tratadas.

2. Por cada muestra, agregue 25 µl de la mezcla de amplificación PowerPlex® 18D, que se preparó en el Paso 1, directamente a la perforación de 1,2 mm que se procesó.

- Selle la placa, procese con centrifugación rápidamente y realice un recorrido de ciclo térmico inmediatamente luego de la configuración de la placa al emplear el programa recomendado, pero para 27 ciclos (consulte la sección Ciclos térmicos del Manual técnico Nro. TMD031 del *PowerPlex® 18D System*).

4.B. Configuración de la amplificación para PowerPlex® Systems dependientes de AmpSolution™

Siga la sección de amplificación directa de ADN desde perforaciones no FTA del Manual técnico apropiado del PowerPlex® System para la configuración de la mezcla de amplificación. Como ejemplo se muestra el PowerPlex® 16 HS System.

- Prepare la mezcla de amplificación PowerPlex® 16 HS de la manera siguiente:

Componente ¹	Volumen por reacción
Agua, grado de amplificación	12,5 µl
PowerPlex® HS 5X Master Mix	5,0 µl
PowerPlex® 16 HS 10X Primer Pair Mix	2,5 µl
5X AmpSolution™ Reagent	5,0 µl
Volumen total	25,0 µl

¹Agregue agua, grado de amplificación, al primer tubo, luego agregue la PowerPlex® HS 5X Master Mix, PowerPlex® 16 HS 10X Primer Pair Mix y el 5X AmpSolution™ Reagent. Agite por completo antes de agregar a las perforaciones tratadas.

- Por cada muestra, agregue 25 µl de la mezcla de amplificación PowerPlex® 16 HS PCR, que se preparó en el Paso 1, directamente a la perforación de 1,2 mm que se procesó.
- Selle la placa, procese con centrifugación rápidamente y realice el recorrido de ciclo térmico recomendado inmediatamente luego de la configuración de la placa, según se describe en la sección Ciclo térmico del Manual técnico Nro. TMD022 del *PowerPlex® 16 HS System*, pero al usar el número de ciclos indicado en la Tabla 2.

4.C. Electroforesis capilar

Siga los protocolos de detección estándar en la sección Configuración de instrumentos y Preparación de muestras del Manual técnico apropiado del PowerPlex® System correspondiente al sistema que está utilizando para preparar muestras para inyección en el ABI PRISM® 3100 o 3100-*Avant* o el 3130, 3130*xl*, 3500 o 3500*xL* Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Las sensibilidades del instrumento a la electroforesis capilar (CE) pueden variar. Es posible que se deba ajustar el tiempo y el voltaje de inyección.



5. Resolución de problemas

La siguiente sección de Resolución de problemas es específica para el PunchSolution™ Kit. Para obtener información adicional sobre resolución de problemas concerniente al PowerPlex® System específico que está empleando, consulte la sección de resolución de problemas del Manual técnico de ese PowerPlex® System.

Si tiene preguntas que no se hayan resuelto aquí ni en la sección de resolución de problemas del Manual técnico del PowerPlex® System, comuníquese con su oficina local de Promega o con su distribuidor. La información de contacto está disponible en: www.promega.com. Correo electrónico: genetic@promega.com

Síntomas	Causas y comentarios
Picos de alelos débiles o ausentes	<p>Acumulación insuficiente de la muestra. El desprendimiento y recolección de las células del donante fue variable. Aumente el número de ciclos.</p> <p>PunchSolution™ Reagent activo arrastrado hacia la reacción del PowerPlex® System. Asegúrese de que el calentador haya estado a 70 °C y que las muestras se hayan incubado durante 30 minutos. La incubación durante periodos más cortos puede derivar en inactivación incompleta del PunchSolution™ Reagent. No hemos evaluado tiempos de incubación más prolongados.</p> <p>PunchSolution™ Reagent inactivo. El PunchSolution™ Reagent descongelado debería almacenarse en el refrigerador a 2-10 °C. No almacene los reactivos en la puerta del refrigerador, en donde puede fluctuar la temperatura. No vuelva a refrigerar; evite varios ciclos de congelamiento-descongelamiento ya que esto puede reducir la actividad.</p> <p>Si se usa un PowerPlex® System que no esté específicamente diseñado para amplificación directa (consulte Tabla 1), asegúrese de que la mezcla de amplificación PowerPlex® contiene el AmpSolution™ Reagent. La omisión del AmpSolution™ Reagent de estas reacciones del PowerPlex® System derivará en una amplificación fallida.</p> <p>Si se amplifica el ADN a partir de una perforación de 1,2 mm de una tarjeta de sangre no FTA, asegúrese de estar usando un PowerPlex® System compatible con amplificación directa (es decir, PowerPlex® 18D, 21 o Y23 Systems), o bien, uno de los PowerPlex® Systems que no se ven inhibidos por la hemoglobina que se arrastra con la perforación (consulte la Tabla 1). Las versiones anteriores de PowerPlex® Systems, tales como los PowerPlex® 16 o Y Systems, no son tan tolerantes del arrastre de hemoglobina y las amplificaciones pueden verse inhibidas, aun ante la presencia del AmpSolution™ Reagent.</p>
Picos débiles o ausentes que observan para ADN de control positivo	<p>Si el ADN de control positivo suministrado con el ADN de se del PowerPlex® System falla en la amplificación, revise para comprobar que la cantidad correcta de ADN de control positivo se haya agregado a la reacción de amplificación. Debido a los números de ciclo menores utilizados con perforaciones procesadas, es necesario aumentar la masa de ADN de control positivo para obtener un perfil. Para el</p>

Síntomas

Causas y comentarios

	<p>protocolo suministrado acá, recomendamos utilizar la cantidad de ADN de control 2800M indicado en la Tabla 2 por cada reacción de amplificación de 25 µl. Esta masa de ADN debe reducirse si el número de ciclos se aumenta y se debe disminuir si el número de ciclos aumenta. Recomendamos aumentar o disminuir al doble la masa de ADN de control de 2800M para cada disminución o incremento de un ciclo, respectivamente.</p> <p>Vea también la sección Resolución de problemas del manual técnico correspondiente al PowerPlex® System que se está usando para enterarse de más razones por las cuales falló en amplificarse el ADN de control positivo.</p>
<p>Picos adicionales visibles en uno o todos los canales de color</p>	<p>La perforación procesada de 1,2 mm resultó contaminada. La amplificación de perforaciones procesadas con altas concentraciones de ADN puede causar picos de artefactos debido a exceso de amplificación, lo que derivaría en saturación de la señal en el CE. Recomendamos una perforación de 1,2 mm por cada reacción de 25 µl de amplificación. El uso de un tamaño mayor de perforación o un volumen menor de reacción puede derivar en exceso de amplificación y saturación de la señal. Si la señal se satura, repita la amplificación con una tarjeta de perforación más pequeña, un volumen de reacción mayor o un número de ciclos menor para reducir las alturas de los picos.</p> <p>La amplificación de la plantilla de exceso para un número determinado de ciclos puede derivar en sobrecarga del sistema capilar al recibir la inyección electrocinética. La presencia de excesivo ADN en el sistema capilar dificulta mantener el ADN en un estado desnaturalizado de cadena sencilla. Alguna parte del ADN de cadena sencilla se renaturaliza y se vuelve de cadena doble. El ADN de doble cadena migra más rápido que el ADN de una cadena durante la electroforesis capilar y aparece como picos con “sombra” que migran delante de los picos principales. Si esto ocurre en un locus heterocigoso, a veces es posible ver dos picos con “sombra” que difieren en tamaño entre sí en aproximadamente la misma distancia que los alelos de una cadena.</p>
<p>Falta de equilibrio de la altura de picos</p>	<p>El exceso de ADN en las reacciones del PowerPlex® puede ocasionar una falta tal de equilibrio de locus a locus dentro de un canal de tinte, que las alturas de picos en los locus más pequeños sean mayores que las de los locus más grandes (efecto de pendiente de esquí). Use una perforación más pequeña, un volumen de reacción mayor o un número menor de ciclos.</p> <p>PunchSolution™ Reagent activo arrastrado hacia la reacción del PowerPlex® System. Los locus más grandes son los más susceptibles a arrastre del PunchSolution™ Reagent y se dejarán fuera antes que los locus más pequeños. Asegúrese de que el calentador haya estado a 70 °C y que las muestras se hayan incubado durante 30 minutos. La incubación durante periodos más cortos puede derivar en inactivación incompleta del PunchSolution™ Reagent.</p>



5. Resolución de problemas (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
	<p>PunchSolution™ Reagent inactivo. El PunchSolution™ Reagent descongelado debería almacenarse en el refrigerador a 2-10 °C. No almacene los reactivos en la puerta del refrigerador, en donde puede fluctuar la temperatura. No vuelva a refrigerar; evite varios ciclos de congelamiento-descongelamiento ya que esto puede reducir la actividad.</p> <p>Arrastre de PunchSolution™ Reagent en exceso hacia la reacción de amplificación. Recomendamos tratar una perforación de 1,2 mm con 10 µl de PunchSolution™ Reagent por cada reacción de 25 µl de amplificación. El uso de una reacción de amplificación más pequeña puede poner en riesgo el rendimiento si se usan 10 µl de PunchSolution™ Reagent. La reducción del volumen de PunchSolution™ Reagent puede mejorar los resultados para un volumen de reacción de amplificación menor. Se necesita optimización y validación del laboratorio.</p>
Variabilidad extrema en la muestra	<p>Puede existir una variabilidad significativa de individuo a individuo hacia las alturas de picos de muestras de la acumulación de células en una perforación, lo que deriva en variabilidad en la altura de picos entre muestras. El PunchSolution™ Kit aumenta la recuperación del ADN a partir de muestras pero no normaliza la cantidad de ADN presente.</p>

6. Productos relacionados

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
SwabSolution™ Kit*	100 preparaciones	DC8271
5X AmpSolution™ Reagent*	100 preparaciones	DM1231
PowerPlex® 18D System*	200 reactivos	DC1802
	800 reactivos	DC1808
PowerPlex® 21 System*	200 reactivos	DC8902
PowerPlex® 16 HS System*	100 reactivos	DC2101
	400 reactivos	DC2100
PowerPlex® 16 System*	100 reactivos	DC6531
	400 reactivos	DC6530
PowerPlex® ESX 16 System*	100 reactivos	DC6711
	400 reactivos	DC6710
PowerPlex® ESX 17 System*	100 reactivos	DC6721
	400 reactivos	DC6720
PowerPlex® ESI 16 System*	100 reactivos	DC6771
	400 reactivos	DC6770
PowerPlex® ESI 17 Pro System*	100 reactivos	DC7781
	400 reactivos	DC7780
PowerPlex® CS7 System, Custom*	100 reactivos	X6613
PowerPlex® Y 23 System*	50 reactivos	DC2305
	200 reactivos	DC2320
Plexor® HY System*	200 reactivos	DC1001
	800 reactivos	DC1000
QuantiFluor™ dsDNA System**	1 ml	E2670

*No debe ser utilizado para diagnóstico médico.

**Únicamente para uso en investigación.

© 2012 Promega Corporation. All Rights Reserved.

PowerPlex and Plexor are registered trademarks of Promega Corporation. AmpSolution, PunchSolution, QuantiFluor and SwabSolution are trademarks of Promega Corporation.

ABI PRISM and MicroAmp are registered trademarks of Life Technologies, Inc. Bode Buccal DNA Collector is a trademark of the Bode Technology Group, Inc. GeneAmp is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. Hi-Di and POP-4 are trademarks of Life Technologies, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

