



Malriin Vares-Kurvinen

Oikeusgeneettisen yksilöntunnistuskitin verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

3.5.2024

Tiivistelmä

Tekijä: Malriin Vares-Kurvinen
Otsikko: Oikeusgeneettisen yksilöntunnistuskitin verifiointi
Sivumäärä: 40 sivua
Aika: 3.5.2024

Tutkinto: Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat: Tutkija Eve Karvinen
Lehtori Tiina Soininen

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeusgenetiikan laboratoriossa ja sen tarkoituksena oli verifioida uusi yksilöntunnistuskitti tiimin käyttöön. THL:n oikeusgenetiikan tiimi kuuluu oikeuskemian yksikköön, ja sen tehtäviin kuuluu lakisääteiset oikeusgeneettiset isyystutkimukset ja perhesidetutkimukset.

Yksilöntunnistustutkimuksissa (isyys- ja sukulaisuustutkimukset, vainajan tunnistus) monistetaan DNA-merkkejä, joissa väestössä esiintyy hyvin paljon erilaisia muotoja, tässä tapauksessa eripituisia DNA-jaksoja. Muotojen pituuserot johtuvat kullekin merkille ominaisen ns. toistojakson erilaisesta toistumismäärästä. Vertailemalla DNA-merkkien tuloksia tutkituilla voidaan tutkimuksessa testattava sukulaisuusoletus (esim. isyys) vahvistaa tai poissulkea.

Verifiointiprosessissa testattiin erilaisia näytetyyppejä ja eristysmenetelmiä sekä selvitettiin uuden kitin yhteensopivuutta muiden käytössä olevien STR-kittien kanssa. PCR-olosuhteet optimoitiin ja tulokset analysoitiin GeneMapper™ ID-X -ohjelmalla, jonka jälkeen saatuja tunnisteita verrattiin aiemmin saatuihin tunnisteisiin. Prosessi sujui pääosin suunnitellusti.

Analyysivaiheessa todettiin, että VeriFiler™ Plus -kitti tuotti luotettavia ja toistettavia tuloksia, jotka vastasivat odotuksia ja aiempia tuloksia. Tämä osoitti, että kitti soveltuu laboratorion tarpeisiin ja se täyttää sille asetetut kriteerit.

Avainsanat: oikeusgenetiikka, verifiointi, yksilöntunnistus, STR, DNA

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Malriin Vares-Kurvinen
Title: Verification of the Forensic Genetic Individual Identification Kit
Number of Pages: 40 pages
Date: 3 May 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Eve Karvinen, Researcher
Tiina Soininen, Senior Lecturer

This thesis was done in the forensic genetics' laboratory of the Institute of Health and Welfare and its purpose was to verify the suitability of a new individual identification kit for the team's use. The forensic genetics team at THL is part of the forensic chemistry unit and is responsible for conducting legally mandated genetic paternity and family relationship tests.

In individual identification studies (paternity and kinship testing, identification of deceased individuals), DNA markers are replicated, which exhibit a wide variety of forms within the population, in this case, varying lengths of DNA segments. The differences in length arise from the varying repeat counts of the so-called repeat sequences specific to each marker. By comparing the results of DNA markers among individuals under study, the tested relationship hypothesis (e.g., paternity) can be confirmed or ruled out.

During the verification process, various sample types and isolation methods were tested, and the compatibility of the new kit with other commercially available STR kits was investigated. PCR conditions were optimized, and the results were analyzed using the GeneMapper™ ID-X software, followed by comparison with previous results. The process proceeded largely as planned, with no significant deviations from the instructions.

During the analysis phase, it was found that the VeriFiler™ Plus kit produced reliable and reproducible results consistent with expectations and previous findings. This demonstrated that the kit is well-suited to the laboratory's needs and meets the established criteria.

Keywords: forensic genetics, verification, individual identification, STR, DNA

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Oikeusgeneettiset tutkimukset	3
3	Oikeusgenetiikan DNA-näytteet ja analyysimenetelmät	6
3.1	Eristysmenetelmät	6
3.2	DNA-tunnisteiden analyysitekniikat	8
3.2.1	GeneMapper™ ID-X	12
3.2.2	Familias	13
4	Yksilöntunnistuskitin verifiointi	14
5	Työn toteutus	16
5.1	Näytteet	16
5.2	Esivalmistelut	16
5.3	Prep-n-Go™ -eristys	19
5.4	Monistus VeriFiler™ Plus -kitillä	20
5.5	ABI3500XL-ajo	22
5.6	Asetusten optimointi	23
6	Tulokset	24
6.1	Prep-n-Go™ -lyysauksen toimivuuden testaaminen	24
6.2	DNA-eristeiden monistuminen ja PCR:n optimointi	26
6.3	Prep-n-Go™ -eristyspuskuri ja muut STR-kitit	29
6.4	Positiivikontrolli	30
6.5	Henkilökuntanäytteiden tulokset	33
6.6	Tulosten laatu	36
7	Yhteenveto	37
	Lähteet	39

Lyhenteet

FFPE: *Formaldehyde-fixed and paraffin-embedded*. Formaldehydillä käsitelty ja parafiiniin upotettu.

HID: *Human identification*. Yksilöntunnistus.

IQC: *Internal quality control*. Sisäinen laadunvalvonta.

LIMS: *Laboratory information management system*. Laboratorion tiedonhallintajärjestelmä.

rfu: *Relative fluorescence unit*. Suhteellinen fluoresenssiyksikkö.

STR: *Short Tandem Repeat*. Lyhyt tandem-toisto.

THL: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

1 Johdanto

Oikeusgeneettinen yksilöntunnistus sai alkunsa 1900-luvulla, kun Karl Landsteiner löysi veriryhmät. Veriryhmämääryksiä tehtiin sukulaisuus- ja rikostutkimuksissa aina 1990-luvulle saakka, ja lopulta ne laajenivat veren proteiinien määryksiin. Yksilöntunnistuksen uusi aikakausi alkoi vuonna 1985, kun Sir Alec Jeffreys kehitti DNA-sormenjälkitekniikan. Tekniikka hyödynsi satelliittidna:n ainutlaatuaista vaihtelua yksilöiden välillä ja keskittyi tutkimaan tiettyjä DNA-alueita, joissa esiintyy erityisen paljon vaihtelua ihmisten kesken. Suomessa otettiin DNA-tunnisteet käyttöön rikostutkimuksissa vuonna 1991 ja isyystutkimuksissa vuonna 1993 (Avela ym. 2019).

Yksilöntunnistustutkimuksissa (isyys- ja sukulaisuustutkimukset, vainajan tunnistus) monistetaan DNA-merkkejä, joissa väestössä esiintyy hyvin paljon erilaisia muotoja, tässä tapauksessa eripituisia DNA-jaksoja (nk. short tandem repeat I. STR-jakso). Muotojen pituuserot johtuvat kullekin merkille ominaisen ns. toistojakson erilaisesta toistumismäärästä. DNA-merkit siirtyvät sukupolvelta toiselle Mendelin periytymissääntöjen mukaan, esim. autosomaalisissa mikrosatelliittimerkeissä yksilö on perinyt yhden muodon isältään ja yhden äidiltään. Vertailemalla DNA-merkkien tuloksia tutkituilla voidaan tutkimuksessa testattava sukulaisuusoletus (esim. isyys) vahvistaa tai poissulkea.

Teknologian kehitys on mahdollistanut nopeammat ja tarkemmat analyysimenetelmät: Kary Mullisin vuonna 1985 kehittämä PCR mullisti molekyylibiologian mahdollistamalla spesifisten DNA-sekvenssien monistamisen huomattavalla herkkyydellä ja tehokkuudella (Butler 2012: 69). PCR:n kehityksen ansiosta pystytään monistamaan pidempiä pätkiä DNA:ta yhä heikkokuntoisemmasta materiaalista. Tekniikan kehitys on mahdollistanut muun muassa useamman DNA-merkin tuottamisen yhdessä reaktiossa. Vuonna 1994 pystyttiin tuottamaan vain neljä merkkiä, kun taas nykyisin yleisimmät STR-kitit sisältävät 17–25 merkkiä. Kapillaarielektroforeesilaitteiden kehitys puolestaan mahdollistaa useamman värin käytön, jolloin näytteiden analysoinnista tuli nopeampaa ja

tehokkaampaa. STR-kitit ovat muodostuneet yksilöntunnistuksen standardimenetelmiksi ympäri maailmaa. Vaikka STR-alueiden valinnassa on kansainvälisiä eroja, suurin osa maista käyttää yleisesti hyväksytyjä lokuskohtia. Yhtenäisten merkkien käyttö mahdollistaa DNA-profiilien tehokkaan vertailun ja yhteistyön myös rajat ylittävissä yksilöntunnistustarkoituksissa sekä aiemmin tehtyjen tulosten hyödyntämisen myöhemmissä vaiheissa. (Butler 2010: 14–16, 158.)

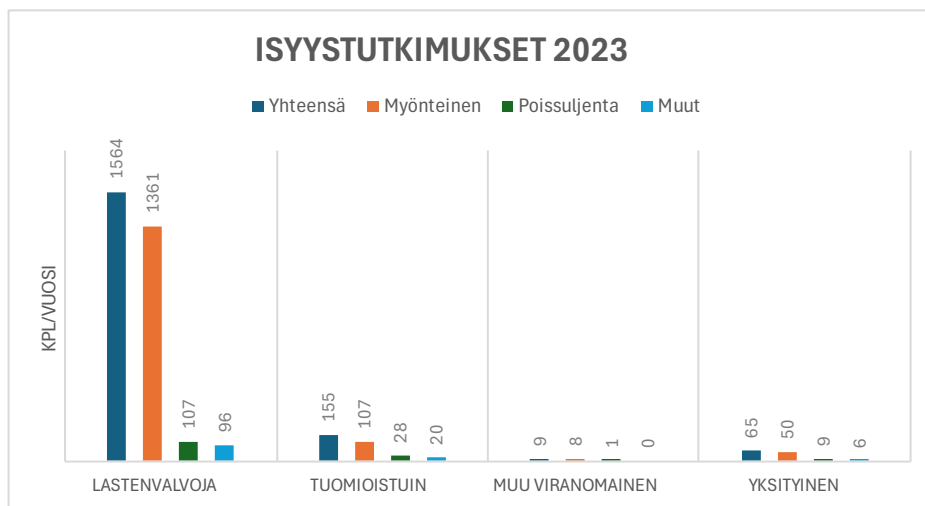
THL:n oikeusgenetiikan tiimi kuuluu oikeuskemian yksikköön ja sen tehtäviin kuuluu lakisääteisenä oikeusgeneettiset isyystutkimukset ja perhesidetutkimukset. Laboratoriossa tehdään myös muita yksilöntunnistustutkimuksia esim. vainajien tunnistamiseksi, identtisyystutkimuksia ja kuolemansyynselvityksessä hyödynnettäviä DNA-diagnostiikkatutkimuksia. Oikeusgenetiikan laboratorio on FINAS-akkreditoitu laboratorio, ja sen laadunhallintajärjestelmä täyttää SFS-EN ISO/IEC 17025:2017 -standardin vaatimukset.

Tämän opinnäytetyön aiheena oli uuden STR-kitin verifiointi Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeusgenetiikan tiimin käyttöön. Edellisen yksilöntunnistuskittin sopimuskausi päättyi marraskuussa 2023, ja uuden sopimuksen solmimiseksi järjestettiin tarjouskilpailu. Tarjoukseen tuli sisällyttää paitsi DNA-merkkien monistuskitti, myös posken sisäpinnan sivelynäytteiden DNA-eristykseen käytettävä lyysauspuskuri.

2 Oikeusgeneettiset tutkimukset

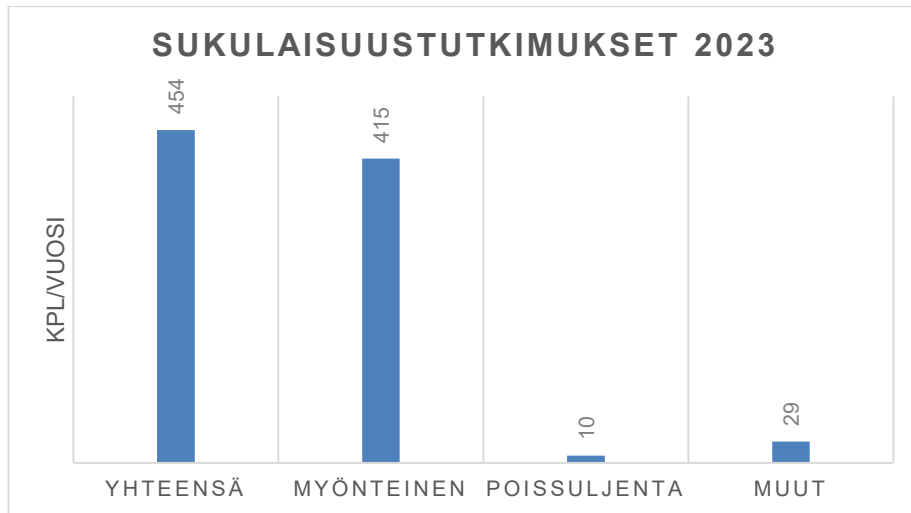
Vuonna 2023 isyystutkimustilauksia tuli oikeusgenetiikan laboratorioon lähes 2 000 kpl (kuva 1). Näistä suurin osa oli lastenvalvojen tilaamia, 1 564 kpl, joita seurasi tuomioistuin 155 tilauksella (LIMS v1.9.243 2023).

Lastenvalvojen tilaamista isyystutkimuksista 1 361 kpl saivat myönteisen lopputuloksen, 107 poissuljennan ja 96 tapausta ovat vielä avoimia tai keskeytettyjä pysyvästi tai tilapäisesti. Tuomioistuimen tilattavista isyystutkimuksista 107 tapausta sai myönteisen tuloksen ja 28 poissuljennan, 20 tapausta on vielä avoimia tai keskeytettyjä pysyvästi tai tilapäisesti. Loput tutkimukset ovat muun viranomaisen, kuten poliisin, tai yksityishenkilöiden tilaamia (LIMS v1.9.243 2023).



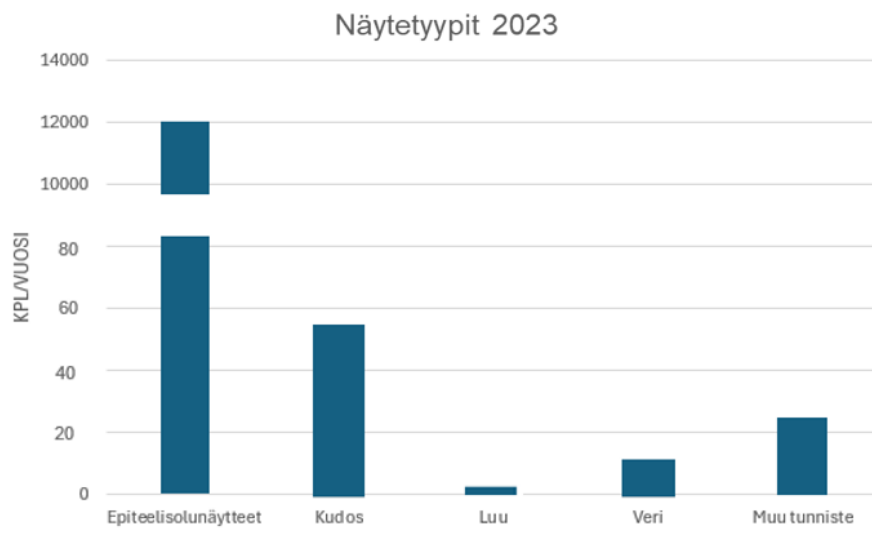
Kuva 1. Isyystutkimukset vuonna 2023. Eniten isyystutkimuksia tilasivat lastenvalvojat (1564 kpl), toiseksi eniten tuomioistuimet (155 kpl) (LIMS v1.9.243 2023).

Isyystutkimusten lisäksi oikeusgenetiikan laboratoriossa tehdään myös sukulaissuustutkimuksia (kuva 2). Vuonna 2023 kyseisiä tutkimuksia suoritettiin 454 kpl, joista 415 kpl saivat myönteisen lopputuloksen ja 10 kpl poissuljennan. Muut tapaukset ovat edelleen avoimia tai keskeytettyjä pysyvästi tai tilapäisesti.



Kuva 2. Laboratoriossa suoritettut sukulaisuustutkimukset vuonna 2023.

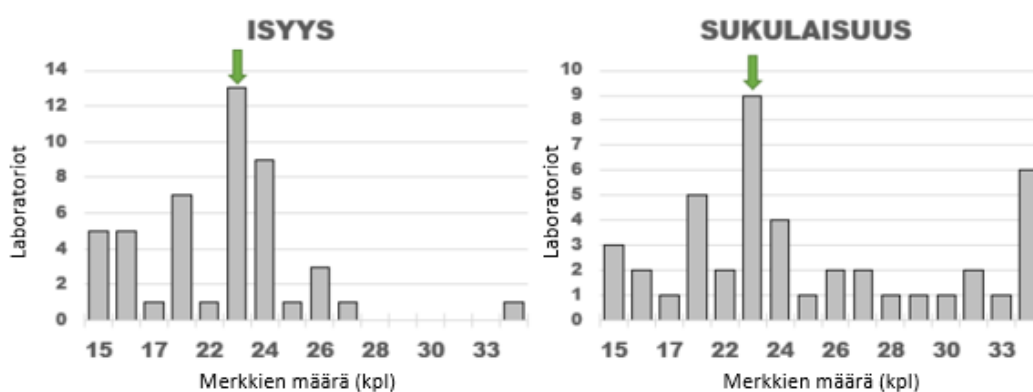
Oikeusgenetiikan laboratoriossa analysoidaan useita eri näytematriiseja (kuva 3). Analysoiduista näytteistä 99 prosenttia oli epiteelisolunäytteitä ja noin yksi prosentti kudosis-, luu- ja verinäytteitä. Muut tunnistetut edustavat lähinnä keskusrikospoliisin tuottamia valmiita tunnistuksia, jotka liittyvät oikeusgenetiikan tiimissä tutkittuihin tapauksiin (LIMS v1.9.243 2023).



Kuva 3. Analysoidut näytematriisit (kpl) vuonna 2023.

ISFG/ESWG (the International Society of Forensic Genetics/the English Speaking Group) järjestää vuosittain laadunvalvontatestin, johon myös oikeusgenetiikan laboratorio osallistuu. Testissä arvioidaan laboratorioiden toimintaa, mukaan lukien erilaisten tapausten käsittelyä. Vuonna 2022 testiin osallistuneista laboratorioista isyystutkimuksia käsitteli 41 laboratoriota, 33 laboratoriota käsitteli sukulaisuustutkimuksia. ESWG-testiin osallistuneista laboratorioista oikeusgenetiikan laboratorio oli tutkimusmääränsä perusteella kuudenneksi suurin, käsitellen yhteensä 1 685 isyystapausta ja 386 sukulaisuustutkimusta (Raportti/ESWG 2023: 2–4).

Vuonna 2023 testiin osallistui 51 anonyymia laboratoriota ja lähes kaikki laboratoriot käyttivät kaupallisia aSTR-kittejä muun muassa isyys- ja sukulaisuustapauksissa. Tyypitettyjen merkkien lukumäärien jakauma näkyy kuvassa 4 (Raportti/ESWG 2023: 2–4).



Kuva 4. Laboratorioiden käyttämien merkkien määrän jakaumat. Vihreällä nuolella on merkattu oikeusgenetiikan laboratorion käyttämä merkkien määrä (Raportti/ESWG 2023: 4).

Vuoden 2019 ESWG-testin raportin mukaan (2019: 5) useimmat laboratoriot käyttivät pääasiassa sellaisia STR-kittejä, jotka pystyivät tuottamaan 12–16 merkkiä. Neljässä vuodessa on tapahtunut merkittävää kehitystä, sillä nykyään suosituimpia ovat 23 merkin kitit ja 12–16 merkin kitit ovat jäämässä taaksepäin (Raportti/ESWG 2023: 2–4).

3 Oikeusgenetiikan DNA-näytteet ja analyysimenetelmät

3.1 Eristysmenetelmät

Eri näytetyyppien analysointiin liittyy erilaisia haasteita, jotka puolestaan vaikuttavat analyysimenetelmiin ja -tuloksiin. Yleisemmät haasteet, joita DNA-näytteissä esiintyy, liittyvät näytteen DNA-pitoisuuteen ja täten saatavan DNA-eristeen vahvuuteen tai heikkouteen. Biologinen näyte on monimutkainen sekoitus erilaisia aineita, joista osa voi vaikuttaa DNA-analyysin onnistumiseen. Esimerkiksi soluproteiinit, jotka ympäröivät ja suojaavat DNA:ta solun ympäristössä, voivat inhiboida DNA:n analysointia. Tämän vuoksi on kehitetty eristysmenetelmiä, jolla voidaan erottaa proteiinit ja muut solukomponentit DNA-molekyyleistä.

Eristysmenetelmän valintaan vaikuttaa käytettävissä oleva näytemateriaali ja suunnitellut jatkotyöt. Tavoitteena on solujen hajottaminen DNA-molekyylien vapautumista varten, DNA:n erottaminen muista solumateriaaleista sekä eristäminen sellaiseen muotoon, joka on yhteensopiva jatkokäsittelyjen, kuten PCR-monistamisen, kanssa. (Butler 2012: 29–30.)

Epiteelisolunäytteiden DNA-eristykseen käytetään yleisesti kaupallista lyysauspuskuria. Menetelmässä näyte inkuboidaan lyysauspuskurissa tietty aika. Puskurissa olevat aineet hajottavat solumembraanin, ja näin ollen geneettinen materiaali vapautuu solujen sisältä puskuriliuokseen.

FTATM-paperi on selluloosapohjainen paperi, jonka avulla voidaan kerätä, säilyttää ja puhdistaa nukleinihappoja. Se sisältää neljä kemiallista ainetta, jotka suojaavat DNA-molekyylejä muun muassa bakteerien kasvulta, hapettumiselta ja UV-valolta. Tämän seurauksena FTA-paperilla oleva DNA voi olla huoneenlämmössä stabiili useiden vuosien ajan (Palo ym. 2016: 148–153). Menetelmä, jolla DNA:ta eristetään FTA-papereista, vaihtelee tapauskohtaisesti ja riippuu siitä, millaisessa muodossa näytteet saapuvat analysoitaviksi. FTA-kiekoista voidaan monistaa DNA:ta suoraan ilman eristystä, tai FTA-papereille käytetään esimerkiksi Chelex-eristystä. Chelex on kelatoivaa hartsia, joka sitoo niitä näytteen metalli-ioneja, jotka kuumennettaessa muuten tehostaisivat DNA-

hajoamista. Menetelmässä käytetään myös proteinaasi K:ta, joka proteiinien katkaisemisen lisäksi tehostaa kalvorakenteiden hajoamista ja pilkkoo DNA:n ympärillä olevia valkuaisaineita. Proteinaasi K denaturoidaan lopuksi, jottei se PCR-monistuksessa hajottaisi polymeerasientsyymiä (DNA:n eristys 2023).

Sekä kudosis- että verinäytteet ovat usein peräisin vainajista. Kudosisnäytteet voivat olla tuorekudoksena tai histologisina blokkinäytteinä, ja ennen eristystä näyte täytyy puhdistaa useita kertoja. Sekä kudosis- että verinäytteiden DNA:n eristykseen ja puhdistukseen käytetään yleisesti eristysautomaatteja sekä yhteensopivia kaupallisia kittejä. Useimmat näistä menetelmistä perustuvat näytteen hajottamiseen ja sitoutumiseen paramagneettisiin hiukkasiin. Liuos, jonka pH on alle 7,5, sisältää magneettiset helmet. DNA-molekyylit sitoutuvat (reversiibelisti) näihin helmiin, jotka sitten magneetin avulla vedetään putken pohjaan tai sivuun. Liuokseen jäävät mahdolliset epäpuhtaudet, kuten proteiinit ja solujen jäämät. Hiukkaset, johon on kiinnittynyt DNA:ta, pestään useita kertoja perusteellisen puhdistuksen varmistamiseksi, kunnes lopulta DNA liuotetaan eluointipuskuriin. (Butler 2012: 35–36.)

Luunäytteissä DNA:ta sisältävät solut ovat suojassa kovan kalsiumhydroksidiapatiitin muodostaman rakenteen sisällä. Ennen DNA:n eristystä näytteet täytyy murskata mekaanisesti, jotta solut vapautuvat. Luueristys jatkuu digestiolla, jossa kova kalsium-hydroksidiapatiittirakenne ja solut rikkoutuvat ja liukenevat kemiallisesti EDTA:n ja proteinaasi K:n vaikutuksesta. Tämän jälkeen eriste konsentroidaan ja konsentraatin epäpuhtaudet puhdistetaan (Luueristys 2018).

Nämä näytteet ovat tavallisesti DNA-pitoisuudeltaan heikkoja, tai niiden DNA voi myös olla hyvinkin hajonnutta. Kudosisnäytteiden laatu voi vaihdella riippuen siitä, onko kyseessä tuorekudos tai histologinen parafiiniblokkinäyte. Histologiset menetelmät sisältävät myös työvaiheita ja erilaisia käsittelyitä, joilla voi olla vaikutusta kudoksen DNA:han. Parafiiniblokissa olevien kudosten käsittely on haastavampaa, koska ne, samoin kuin luunäytteet, ovat yleensä vanhoja näytteitä, jolloin kudosis on hyvin kuiva ja hauras. Tämä tekee niistä staattisia ja vaikeasti käsiteltäviä, mikä lisää näytteen menetyksen riskiä sekä vaikeuttaa

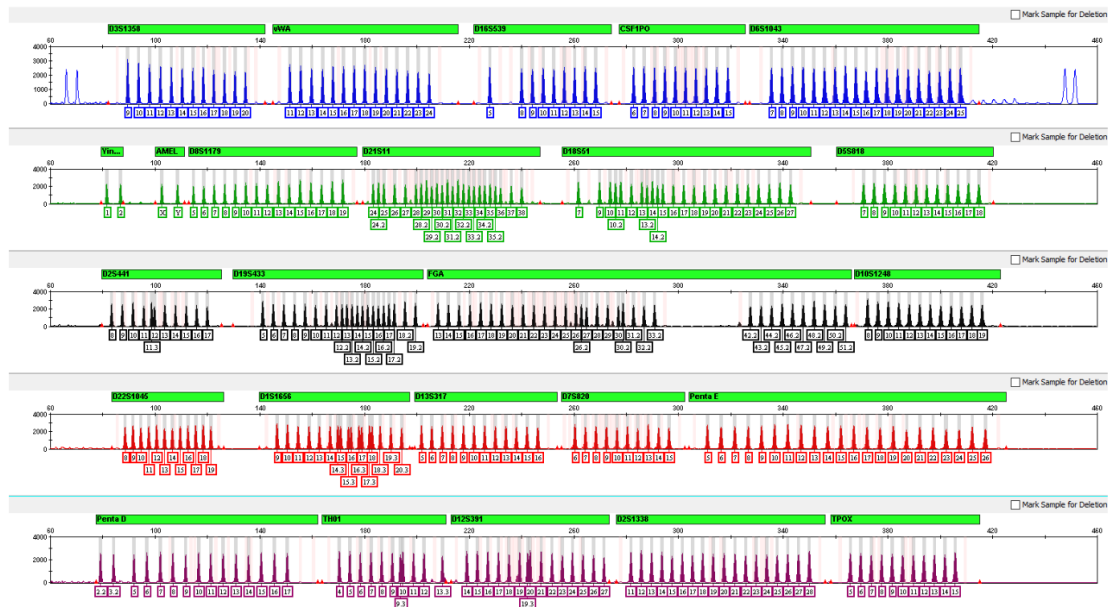
näytteen siirtämistä putkiin. Lisäksi on aina riski, että parafiinin mukana putkeen siirtyy kontaminaatioita. Luunäytteet voivat olla vielä vanhempia kuin kudoksenäytteet (esimerkiksi sotavainajien luut), ja niiden analysoinnissa on eniten haasteita. On enemmän sääntö kuin poikkeus, että luunäyte on hajonnut ja heikko.

3.2 DNA-tunnisteiden analyysitekniikat

DNA-eristeen monistamiseen käytetään PCR-tekniikkaa. Laboratoriossa käsiteltävät näytteet eivät ole aina tasalaatuisia, eikä parempaa tai puhtaampaa näytettä useinkaan ole saatavilla. Tämä asettaa puolestaan haasteita monistukselle. Tarvitaan siis riittävän herkkä menetelmä, jolla pystytään tuottamaan DNA-merkkejä myös erittäin heikosta näytteestä. Koska näytevolyymit voivat olla suuria, menetelmän on oltava myös nopea ja käyttäjäystävällinen.

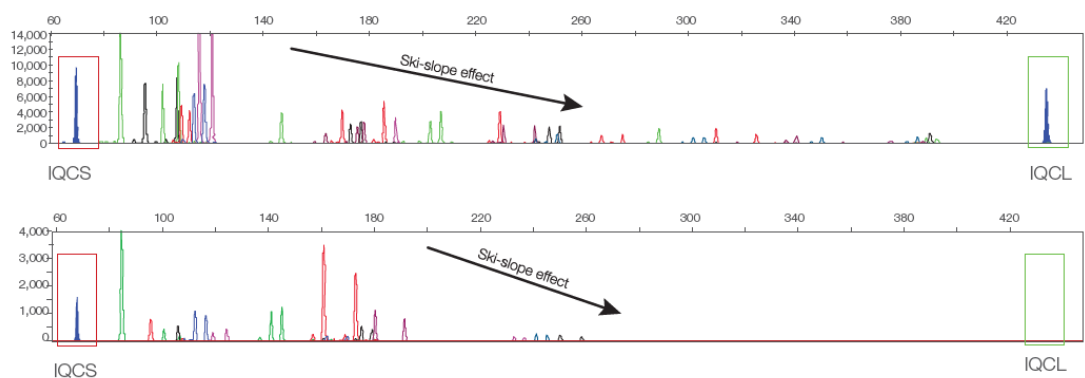
Kaupalliset PCR-monistuskitit, kuten tässä työssä verifioitu VeriFiler Plus -kitti, sisältävät kaikki tarvittavat reagenssit DNA:n monistamiseen ja tulosten varmistamiseksi. VeriFiler Plus -kitti sisältää 23 autosomaalista DNA-merkkiä, 2 sukupuolen ilmaisevaa merkkiä (Y indel ja AMEL), alleeli-ladderin, positiivikontrollin, joka on tiedossa oleva tunniste, sekä sisäisen standardin menetelmän.

Alleeli-ladder (kuva 5) on synteettinen sekoitus yleisesti esiintyvistä alleleista, jotka ovat ominaisia tietyille DNA-markkereille. Ne on luotu samoilla alukkeilla kuin testatut näytteet ja siten tarjoavat referenssi-DNA-koon jokaiselle ladderissa olevalle alleelille. Näin ne toimivat standardina jokaiselle STR-lokuksetille (Butler 2012: 111).



Kuva 5. VeriFiler Plus -kitti sisältää alleeli-ladderin (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit User Guide 2020: 14).

Sisäisen standardin menetelmä eli IQC-järjestelmä (internal quality control) varmistaa PCR-monistuksen ja tunnistaa inhibiittorien läsnäolon näytteessä (kuva 6).



Kuva 6. VeriFiler Plus -kitin sisäiset standardit (Confident answers in challenging cases 2020: 2).

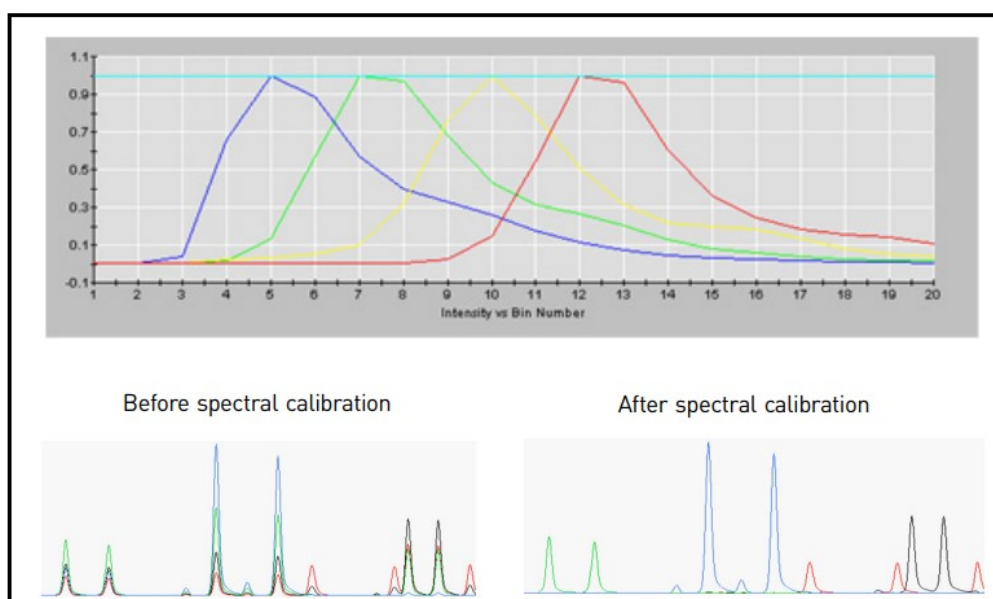
Järjestelmässä on kaksi synteettistä markkeria, jotka monistetaan yhdessä näytteen kanssa: IQCS, jonka molekyylipaino on 70 nt ja IQCL, jonka molekyylipaino on 451 nt. PCR-reaktion toimivuutta voidaan arvioida näiden piikkien korkeuksien perusteella. Ideaalitulanteessa elektroferogrammissa näkyisi tasapainossa oleva tunniste ja IQCL- ja IQCS-piikit korkeudella yli 2 000 rfu:ta. IQC-piikit korkeudella yli 2 000 rfu:ta ja tunnisteessa tasaisesti laskevat piikit ("ski-slope" -efekti) on indikaattori heikoille ja/tai hajonneille näytteille. Inhibiittorista näytteessä kertoisi puuttuva IQCL-piikki ja IQCS-piikin korkeus $\leq 2\ 000$ rfu:ta (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit User Guide 2020: 55–56).

DNA-eristeiden vaihtelevaan laatuun voidaan vaikuttaa eri tavoin, kuten eristeen laimentamisella tai konsentroimisella, lisäpuhdistamisella, tai vaihtoehtoisesti voidaan säätää PCR-ohjelman monistus- eli syklimäärää. 20 sykliä tuottaa noin miljoonakertaisen monistuksen ja 30 sykliä noin miljardikertaisen. Monistamalla saadaan tuotetuksi haluttua DNA-merkkiä riittävä määrä analyysiä varten. Lisäksi tuotteisiin liittyy alukkeiden mukana fluoresoiva leima. PCR-putkessa monistetut DNA-merkkien muodot erotellaan kokonsa mukaan kapillaarielektroforeesilla.

Kapillaarielektroforeesi on maailmanlaajuisesti merkittävin menetelmä STR-alleelien erottamiseen ja tunnistamiseen. Kamera, laser ja kapillaarit vaikuttavat erottelukykyyneen: ne mahdollistavat STR-alleelien erottamisen jopa yhden nukleotidin kokoisella erolla ja kykenevät lisäksi erottamaan eri fluoresoivat väriaineet, mikä taas mahdollistaa eri väreillä leimattujen PCR-tuotteiden tarkkailemisen. Nämä ominaisuudet ovat keskeisiä STR-typityksen luotettavuuden takaamiseksi. Viimeisten 20 vuoden aikana kapillaarielektroforeesitekniikan kehitys on ollut huomattavaa. Ensimmäinen yksikapillaarinen kapillaarielektroforeesilaitte tuli markkinoille vuonna 1995, ja siitä lähtien laitteiden kehitys on ollut jatkuvaa. Esimerkiksi oikeusgenetiikan laboratorioissa käytössä oleva laite lanseerattiin vuonna 2010, ja siinä on 24 kapillaaria (Butler 2012: 141–142). Tämä merkittävä edistysaskel mahdollistaa samanaikaisen monen näytteen analysoinnin, mikä parantaa laboratorioiden tehokkuutta ja tuottavuutta. Lisäksi uudempien laitteiden avulla voidaan käyttää useampaa erilaista fluoresoivaa

väriainetta, kuten esimerkiksi ABI3500XL-laitteella, jossa hyödynnetään kuutta erilaista väriä. Näin saadaan yhdessä analyysissä määritettyä myös samankokoisia muotoja yhden näytteen eri DNA-merkeistä. Jokaisessa kapillaarielektroforeesijossa on mukana alleeli-ladder sekä kokostandardi. Kokostandardi toimii referenssinä kapillaarielektroforeesin aikana, mahdollistaen DNA-fragmenttien tarkan koon määrittämisen.

Kiteissä käytettävät väriaineet ovat aina kittikohtaisia, joten jokaiselle kitille on aina tarpeen määrittää nämä väriaineet, jotta kapillaarielektroforeesilaitteelle voidaan luoda spektri. Matriisi-ajo on pääpiirteittäin prosessi, jossa spektri kalibroidaan kapillaarikohtaisesti. Tämä vaaditaan, jotta ohjelmisto erottaa värit toisistaan vähentämällä eri väriaineiden spektrin päällekkäisyyttä oikeassa suhteessa. (kuva 7).



Kuva 7. Spektrin kalibraatiossa määritellään kitin väriaineet ja vähennetään spektrin päällekkäisyyksiä (DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis 2014: 85).

Fluoresoivat väriaineet lisätään DNA-fragmenteihin PCR-prosessin aikana. Aluke-sekoitus on leimattu fluoresoivalla väriaineella ja DNA:n monistuksen aikana alukkeet varmistavat, että syntyvät DNA-fragmentit kantavat fluoresoivaa

väriainetta. Näitä merkittyjä DNA-fragmentteja voidaan visualisoida ja analysoida kapillaarielektroforeesin avulla, jossa fluoresoivan väriaineen lähettämä signaali auttaa tunnistamaan ja karakterisoimaan DNA-fragmentit. Jokainen väriaine säteilee valoa omalla aallonpituudellaan.

DNA-merkit voidaan erottaa toisistaan niiden sisältämän leiman ja fragmentin koon perusteella (taulukko 1). Kokostandardilla on oma värinsä erottaakseen sen analysoitavista DNA-fragmenteista: se auttaa tunnistamaan ja seuraamaan sen siirtymistä kapillaarigeelin läpi näytteen DNA-fragmenttien kanssa. VeriFiler Plus -kitissä kokostandardina toimii GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (Cat. no. 4408399) jonka valmistaja toimittaa erikseen matriisin kanssa.

Taulukko 1. DNA-merkkejä vastaavat väriaineet VeriFiler Plus -kitissä.

Väri- aine	Merkit						
6-FAM™	IQCS	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	D6S1043	IQCL
VIC™	Y indel	AMEL	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	
TAZ™	D22S1045	D1S1656	D13S317	D7S820	Penta E		
SID™	Penta D	TH01	D12S391	D2S1338	TPOX		
TED™	D2S441	D19S433	FGA	D10S1248			

Ajosta saadut genotyyppitytulokset tarkastetaan GeneMapper™ ID-X -ohjelmalla ja todennäköisyyslaskennat suoritetaan Familias- ja FamLinkX-ohjelmilla. Analysoitavat tulokset siirretään ABI-laitteelta GeneMapper-ohjelmaan, joka tulkitsee kapillaarielektroforeesilaitteelta saadun raakadatan tunnisteiksi. Tunnistukset siirretään GeneMapper-ohjelmasta edelleen LIMSiin ja sieltä Familias-ohjelmaan todennäköisyyslaskentaa varten.

3.2.1 GeneMapper™ ID-X

GeneMapper ID-X -ohjelmisto on automaattinen genotyyppitysohjelmisto, joka on suunniteltu erityisesti oikeusgenetiikan tapauskäsittelyihin, tietokantoihin ja

tulosten analysointiin. Se tarjoaa tehokkaan työkalun DNA-analyysin parissa työskenteleville laboratorioille, ja sen avulla voidaan suorittaa monipuolisia DNA-profiilien analysointiin ja tulkintaan liittyviä tehtäviä.

Ladderin ja kokostandardin avulla GeneMapper ID-X määrittää kunkin DNA-merkin muodon koko, ja se nimetään ladderissa olevien vertailumuotojen perusteella. Tämän prosessin tarkoituksena on tuottaa lopullinen DNA-tunniste oikeusgeneettisiä yksilöntunnistustutkimuksia varten.

Ohjelmisto kykenee analysoimaan DNA-fragmenttien tuottamaa tietoa ja tunnistamaan geenien ja geenimerkkien tyypilliset alleelit. Se erottelee automaattisesti erilaiset DNA-fragmentit toisistaan ja luokittelee ne kokonsa perusteella. Lisäksi ohjelmisto mahdollistaa eri näytteiden välisen vertailun ja havaitsee mahdolliset poikkeamat tai mutaatiot. (GeneMapper™ ID-X Software v1.4 2012.)

3.2.2 Familias

Familias-ohjelma tarjoaa mahdollisuuden laskea todennäköisyyksiä ja skenaarioita tilanteissa, joissa tiettyjen henkilöiden DNA-profiilit ovat tiedossa, mutta heidän sukulaisuussuhteensa ovat epäselvät. Ohjelma analysoi vaihtoehtoisten sukupuiden todennäköisyyksiä ja vertaa niitä keskenään. Se ottaa huomioon DNA-merkkien esiintymistiheydet kyseisessä väestössä ja kykenee käsittelemään monimutkaisia tapauksia, joissa esiintyy mahdollisia mutaatioita, nolla-alleeleja ja populaatioiden stratifikaatiota. Yksi ohjelman eduista on sen kyky käsitellä samanaikaisesti useita sukupuita (Kling ym. 2017: 6).

4 Yksilöntunnistuskitin verifiointi

Oikeusgenetiikan tiimissä prosessi sisältää näytteiden kirjauksen, DNA-eristykseen vaihtelevasta näytemateriaalista, monistuksen käyttäen STR-kittiä, kapillarielektroforeesiajon, tulosten analysoinnin ja tulkinnan. Lopuksi tapaukselle luodaan tutkimuslausunto. Koko prosessi näytteiden kirjauksesta aina tulosten käsittelyyn ja tutkimuslausuntojen laatimiseen tapahtuu laboratoriotietojärjestelmä LIMSin avulla. Tämän verifiointin tarkoituksena oli testata laboratorioprosessin toimivuus uudella yksilöntunnistuskitillä ja vertailla saatuja tuloksia aiemmin käytössä olleen kitin analyysituloksiin.

Verifiointissa testattiin myös kitin mukana tuleva posken sisäpinnan sivelynäytteiden DNA-eristykseen käytettävä Prep-n-Go™ -lyysauspuskuri (Cat. no. 4471406). Posken sisäpinnan sivelynäytteet kattavat yli 90 prosenttia oikeusgenetiikalle saapuvista tutkimusnäytteistä. Tutkittavaksi saapuu myös muita näytematriiseja, ja niiden eristysprosessi on erilainen. Jokainen näytetyyppi edustaa erilaisia haasteita DNA:n eristämisessä ja analysoinnissa, ja siksi niiden kattava testaus on välttämätöntä, jotta VeriFiler Plus -kitin (Cat. no. A35495) suorituskyvystä on varmuus eri olosuhteissa.

Verifiointi on tavallinen käytäntö akkreditoidussa laboratoriossa, koska kitti on yleensä validoitu valmistajan puolesta. Verifiointin tarkoitus on varmistaa, että menetelmä täyttää sille annetut vaatimukset.

Verifiointi sisälsi seuraavat kohdat:

- Prep-n-Go -lyysauksen toimivuuden testaaminen
- PCR-ohjelman optimointi
- DNA-eristeiden monistuminen VeriFiler Plus -kitillä
- STR-kittien toimivuus Prep-n-Go -eristeillä
- ajoasetusten optimointi
- GeneMapper-analyysiasetusten optimointi
- tulosten vertailu aiemmin samoista näytteistä saatuihin tuloksiin
- tietojärjestelmän tarvittavat muutokset.

Kriteerit menetelmän toimivuudelle ja tulosten luotettavuudelle:

1. Yli 90 prosentista posken sisäpinnan sivelynäytteistä tulee saada täydellinen tunniste
 - a. ei inhibitiosta johtuvia DNA-merkkien puutoksia
 - b. näytteen laimennos/konsentroidi tarpeellista vain osalle näytteistä.
2. Valmiiden eristeiden onnistuminen (yhtä hyvä tai parempi tunniste kuin aiemmin) yli 90 prosenttia näytteistä.
3. DNA-tunnisteen tulee olla laadukas. Hyvillä näytteillä ei saa olla
 - a. olkapäitä alleeleilla
 - b. saturoituneita piikkejä
 - c. puuttuvia/kynnysrajan alle jääviä alleeleja/DNA-merkkejä.
4. DNA-tunnisteiden tulee olla yhtenevät aiemmin saatuihin tuloksiin
 - a. ei nolla-alleeleja
 - b. mikäli aiemmat nolla-alleelit monistuvat nyt, tulos on parannus aiempaan kittiin verrattuna. (VeriFiler™ Plus verifiointisuunnitelma 2023: 2–3.)

Verifiointille laadittiin verifiointisuunnitelma, joka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Verifiointisuunnitelma.

Viikko	Suunnitelma
30	esivalmistelut: laitteiden asetukset
31–33	Prep-n-Go -lyysauksen toimivuuden testaaminen
	PCR-ohjelman optimointi
	DNA-eristeiden monistuminen VeriFiler Plus -kitillä
	STR-kittien toimivuus Prep-n-Go -eristeillä
	ajoasetusten optimointi
35	GeneMapper-analyysiasetusten optimointi
	tulosten vertailu
	käsialatestit
40–43	tietojärjestelmän tarvittavat muutokset

5 Työn toteutus

5.1 Näytteet

Verifiointissa analysoidut posken epiteelisolunäytteet olivat ns. varanäytteitä. Kaikista verifiointiin käytetyistä näytteistä löytyi jo eri kiteillä tuotettuja tuloksia, joten tulosten vertailu oli mahdollista. Tässä työssä analysoitavia näytteitä oli yhteensä 31, joista 21 posken epiteelisolunäytteitä, 4 luu- ja kudoseristettä ja yksi verinäyte. Luueristeet oli eristetty jo aiemmin laboratorion sisäisellä eristysmenetelmällä. Kudos- ja verieristeet oli eristetty Promegan Maxwell® Rapid Sample Concentrator (RSC) -laitteella käyttäen yhteensopivia kaupallisia kittejä (parafiiniblokeissa oleville kudoksenäytteille Maxwell RSC FFPE Plus DNA-, ja tuorekudoksille sekä verinäytteille Maxwell RSC Blood DNA-kittiä). Näytteistä noin 95 prosenttia oli isyystutkimusnäytteitä ja noin viisi prosenttia perheenyhdistämistutkimusnäytteitä. Epiteelisolunäytteiden avulla testattiin koko laboratorioprosessi eristyksestä tulosten tarkastukseen asti. Kudos-, luu- ja verinäytteiden avulla pyrittiin osoittamaan eri eristysmenetelmien toimivuus VeriFiler Plus -kitin kanssa.

5.2 Esivalmistelut

Laitteisiin asennettiin valmistajan ohjeiden mukaiset asetukset (taulukko 3).

Taulukko 3. ABI3500XL-laitteen asetukset.

Parametri	Asetus
Ajometodi	HID36_POP4xl
Injektioaika	1,2 kV / 24 s
Ajo	13 kV / 1500 s
Väri	Dye Set J6-T

Seuraavaksi ABI3500XL-laitteelle säädettiin laatukontrollin protokolla (taulukko 4). VeriFiler Plus -kitti on validoitu tuottamaan luotettavia tuloksia kahdella eri kokostandarditulosten tulkintamenetelmällä: *the 3rd Order Least Square* -menetelmä, jossa DNA-fragmenttien koko vaihtelee 80:stä 460 emäspariin ja *the Local Southern* -menetelmä, jossa DNA-fragmenttien koko vaihtelee 60:stä 460 emäspariin. (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 2020: 27–28.)

Taulukko 4. Laatukontrollin protokolla.

Parametri	Asetus
Kokostandardi	GS600_LIZ_(60–460)
DNA-fragmenttien koon mittausalue	osittainen
DNA-fragmentin minimikoko	60 bp
DNA-fragmentin maksimikoko	460 bp
Analyysimetodi	<i>Local Southern</i>
Baseline Window Pts.	33
Peak Window Size	11

Koska analysoitavien merkkien koko vaihtelee 64–453 bp, valittiin analyysimetodiksi *Local Southern* -metodi. Taulukkojen 3 ja 4 perusteella luotiin ajossa tarvittava "Assay" (taulukko 5).

Taulukko 5. Ajoasetusten perusteella luotu "Assay".

Parametri	Asetus
Assay	Verifiler
Application Type	HID
Instrument Protocol	HID36_POP4xl
QC Protocol	J6(T) LS(60-460)+Normalization

GeneMapper ID-X v.1.6 -ohjelmaan tuotiin tarvittavat Thermo Fisherin koodaamat analyysiasetukset (taulukko 6) (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 2020: 36–42).

Taulukko 6. GeneMapper™ ID-X v.1.6 ohjelmaan syötetyt analyysiasetukset.

Parametri	Asetus
Panels	VeriFiler_Plus_Panel_v1.txt
Bins	VeriFiler_Plus_Bins_v1.txt
Stutter Text Files	VeriFiler_Plus_Stutter_v1.txt
Kokostandardi	GS600_LIZ_(60-460)

Valmistajan toimittama DS-37 Matrix Standard Kit (Dye set J6-T, 6-dye) (Cat. A31234) sisältää kuusi DNA-fragmenttia, joista yksi (LIZ™) on kokostandardin fragmentti. Nämä fragmentit on leimattu eri fluoresoivilla väreillä.

ABI3500XL-laitteelle suoritettiin matriisiajo valmistajan ohjeiden mukaisesti: ependorf-putkeen pipetoitiin ensin 6 µl vorteksoitua ja sentrifugoitua matriisistandardia sekä 294 µl Hi-Di™-formamidia (Cat. no. 4311320). Kyseinen määrä on

tarkoitettu 24 kapillaariselle ABI-laitteelle. Sekoitettu ja sentrifugoitu liuos pipetoitiin kaivoihin 10 µl/kaivo (DS-37 Matrix Standard Product Information Sheet).

5.3 Prep-n-Go™ -eristys

Eristyksen testaus aloitettiin posken sisäpinnan sivelynäytteistä (13 kpl) valmistajan toimittamien ohjeiden mukaisesti käyttäen Prep-n-Go -lyysauspuskuria (Cat. No. 4471406). Ohjeiden mukaan näytteitä tulisi inkuboida 90 °C:ssa 20 minuutin ajan ja sen jälkeen jäähdyttää 15 minuuttia. Valmistaja on todennäköisesti validoinut tämän menetelmän erilaiselle näyteharjalle (kuva 8), koska ohjeissa suositellaan pipetoimaan 400 µl lyysauspuskuria katkaistujen harjojen päälle ja sulkemaan eppendorf-putket.



Kuva 8. Katkaistava näyteharja (Boca Scientific Inc Buccal Prep Plus DNA Isolation Kit, 50 reactions, with 50 SK-2S Buccal Swabs 2024).

THL:n oikeusgenetiikan laboratoriossa posken sisäpinnan sivelynäytteille käytetään 4N6FLOQSwabs®-näyteharjoja (Cat. no. 4504C) (kuva 9). Aikaisemmissa verifiointiprosesseissa näyteharjojen katkaisemista on kokeiltu, mutta hyväksyttäviä tuloksia ei ole saatu. Siksi laboratorion eristysmenetelmä eroaa nyt valmistajan validoidusta menetelmästä: näyteharjoja ei katkaista, joten eppendorf-putkia ei ole mahdollista sulkea inkuboinnin ajaksi.



Kuva 9. THL:n oikeusgenetiikan tiimissä käytössä oleva näyteharja (4N6FLOQSwabs® Genetics 4504C 2024).

Sen lisäksi, että näytteiden kuumentaminen ja jäähdyttäminen takaisin huoneenlämpöiseksi on huomattavasti totuttua eristysmenetelmää hitaampi, näyttesekaannuksien ja kontaminaatiovaaran riski lisääntyy, kun näytteet poimitaan telineestä lämpöblokkiin ja takaisin. Näistä syistä Prep-n-Go -lyysauspuskurin toimivuutta testattiin menetelmällä, joka vastaa laboratorion aiemmin verifioimaa pikaeristysmenetelmää: eppendorf-putkiin pipetoitiin 400 µl lyysauspuskuria ja näytteitä inkuboitiin pöydällä huoneenlämmössä 15 minuutin ajan. (Direct Amplification of Reference Samples Using the Applied Biosystems™ VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 2021: 4.)

5.4 Monistus VeriFiler™ Plus -kitillä

VeriFiler Plus -kitti sisältää kaiken tarvittavan monistaakseen 25 µl:n tilavuudella 200 näytettä tai vaihtoehtoisesti 10 µl:n tilavuudella noin 400 näytettä. Reagenssien pitoisuudet ja sisältö ovat patentoituja, joten näitä tietoja ei ole saatavilla. Vaikka kitti on tarkoitettu ensisijaisesti vaikeille näytteille (luu, pehmytkudos jne.), valmistaja toimitti lisäohjeistuksen, jossa PCR-reaktio oli optimoitu ns. vertailunäytteille, eli oikeusgenetiikalla yleisimmin käytetyille posken epiteelisolunäytteille sekä vastaaville hyvälaatuisille näytteille. Lisäohjeen mukainen reaktiovolyyymi on 25 µl.

Ensimmäinen testiajo suoritettiin valmistajan pipetointiohjeilla ja 25 µl:n näytetilavuudella. Oikeusgenetiikan laboratoriossa analysoidaan yleensä kerrallaan 21 näytettä. Näytteiden lisäksi analysoidaan aina alleeli-ladder sekä positiivi- ja negatiivikontrolli. Positiivikontrollilla varmistetaan PCR-reaktion toimivuus ja negatiivikontrollilla puolestaan käytettävien reagenssien puhtaus. Alla olevassa taulukossa (taulukko 7) on esitetty reagenssien määrät sekä yhdelle näytteelle että 23 reaktion työlialle. Reagenssien määrät lasketaan aina näytteiden määrä + 1, jotta pipetoinnissa syntyvä hävikki tulee huomioituksi.

Taulukko 7. Valmistajan pipetointiohjeet 25 µl:n näytetilavuudelle.

Reagenssi	Tilavuus / näyte (µl)	Tilavuus / 23 + 1 näytettä (µl)
Master Mix	5	120
Primer Set	2,5	60
Vesi (PCR laatu)	15,5	372
Yhteensä	23	552

PCR-stripin kaivoihin pipetoitiin 23 µl taulukon 7 mukaista seosta ja 2 µl lyaattia, minkä jälkeen stripit sentrifugoitiin. PCR-ajoasetuksissa valmistaja oli ohjeistanut käyttämään 26 sykliä 25 µl:n reaktiovolyymille (taulukko 8). (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 2020: 23–24.)

Taulukko 8. PCR-asetukset 25 µl:n reaktiovolyymille.

Alkudenaturaatio	Sykli (26x)		Ekstensio	Pito
	Denaturaatio	Annealing		
95 °C	94 °C	61 °C	60 °C	4 °C
1 min	3 s	60 s	10 min	∞

5.5 ABI3500XL-ajo

Ajo suoritettiin ABI3500XL-laitteella valmistajan ohjeiden mukaisesti. Taulukossa 9 on esitetty ajoliuoksen määrät sekä yhdelle näytteelle että koko työliselle.

Taulukko 9. Valmistajan ohjeen mukainen ajoliuoksen määrä.

Reagenssi	Tilavuus / näyte (µl)	Tilavuus / 24 + 1 näytettä (µl)
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (Cat. no. 4408399)	0,4	10
Hi-Di™ Formamidi (Cat. no. 4311320)	9,6	240

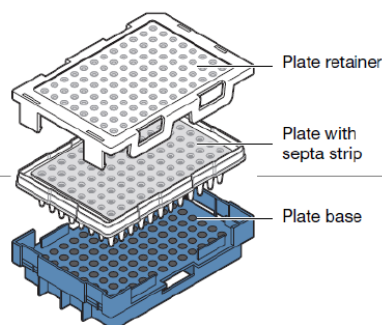
Ajoliuos sisältää kokostandardia ja formamidia. Formamidia käytetään kapillaarielektroforeesissa DNA-näytteiden denaturoimiseen ennen niiden lataamista kapillaariin. Tämä denaturointiprosessi auttaa muokkaamaan DNA-molekyylit lineaarisiksi, mikä varmistaa niiden tasaisen liikkumisen kapillaarissa ja parantaa laitteen kykyä erottaa DNA-piikkejä.

Ajolevyille pipetoitiin 10 µl ajoliuosta ja 1 µl PCR-tuotetta/ladderia/kaivo, minkä jälkeen levy sentrifugoitiin 20 sekunnin ajan nopeudella 3 000 RPM ja inkuboitiin 95 °C:ssa 3 minuuttia. Tämän jälkeen levy siirrettiin välittömästi kylmäblokkiin, jota oli pidetty pakastimessa. Muutaman minuutin kuluttua levy asetettiin alla olevan kuvan mukaisesti (kuva 10) siniselle levyalustalle (plate base) ja päällimmäiseksi laitettiin vielä kuvassa esitetty pidike (plate retainer).

IMPORTANT! Prepare the plate assembly on a clean, level surface. Do not heat plates that are sealed with septa.

1. Align the holes in the septa strip with the wells of the plate, then firmly press downward onto the plate.
2. Place the sample plate into the plate base.

IMPORTANT! Make sure to use the correct plate base for standard plates versus 8-tube strips and fast plates. Using the wrong plate base may affect performance.



Kuva 10. Levy peitettiin septalla ja asetettiin siniselle levyalustalle, päällimmäiseksi laitettiin kuvassa esitetty pidike. (Applied Biosystem 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide 2010: 53).

ABI3500XL-laitteelle luotiin uuden levyn templaatti, joka nimettiin työlistan numerolla, analyysimetodi oli HID. 24 näytteen analysointi kestää noin 40 minuuttia. (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 2020: 33–34.)

5.6 Asetusten optimointi

VeriFiler Plus -kitin ohjekirjassa on määritelty GeneMapper-ohjelmalle tarvittavat analyysiparametrit lukuun ottamatta piikkien hyväksymiskorkeusrajaa. Oikeusgenetiikalla ei kvantitoida näytteitä ja PCR-reaktioon käytettävä DNA:n määrä vaihtelee johtaen siihen, että tuloksissa eri näytteiden piikkien korkeudessa havaitaan suurta vaihtelua. Oikeusgenetiikalla tämän ongelman kiertämiseksi on käytössä jokaisen kitin kohdalla kolme eri analyysiasetusta. Pääanalyysiasetusten tulee sopia valtaosalle näytteistä. Erityisen heikoille ja erityisen vahvoille näytteille on omat asetuksensa.

Huolimatta PCR-reaktioiden optimoinnista ja ABI3500XL-ajossa käytettävästä filteristä (spectral), GeneMapper-tuloksissa on usein havaittavissa epäspesifisiä piikkejä. Analyysikynnyksen oikealla asemoinnilla valtaosasta näytteitä nämä epäspesifit piikit saadaan suodatettua pois. DNA-pitoisuudeltaan hyväkuntoisten näytteiden kohdalla DNA-merkkien kynnyksäraja

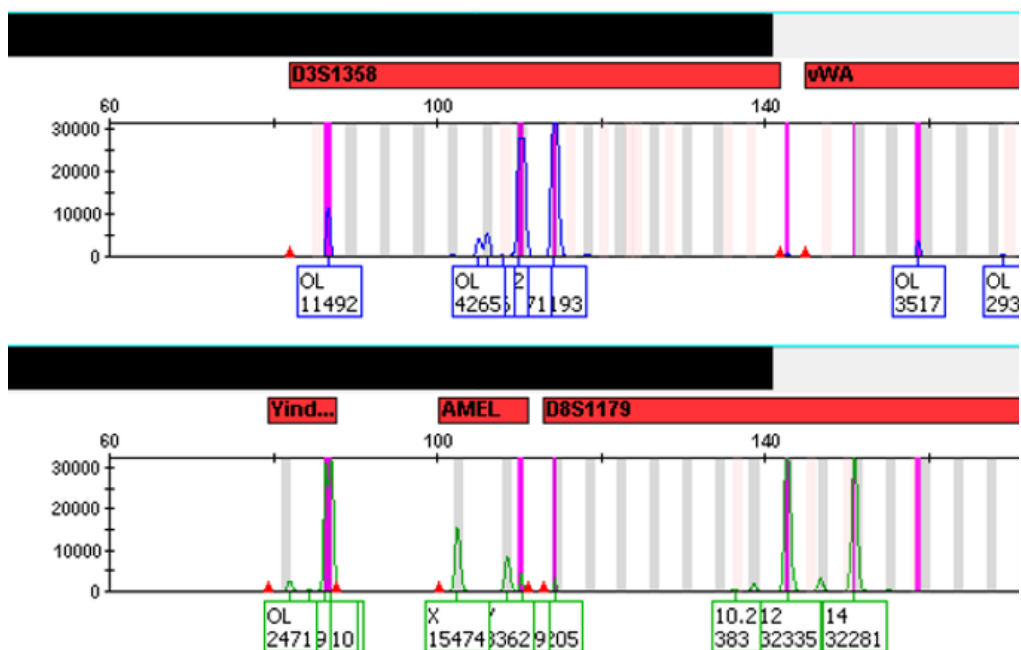
heterotsygootti-alleelien tunnistamiselle asetettiin 300 rf:hen ja homotsygoottien kohdalla 500 rf:hen. Homotsygoottien DNA-merkkien kohdalla hyväksymisraja on korkeampi, jotta mahdollisesti huonommin monistunut ja kynnysrajan alle jäänyt toinen alleeli ei aiheuttaisi virheellistä tulosten tulkintaa.

DNA-pitoisuudeltaan heikompien näytteiden kohdalla taustan määrä on vähäisempi ja kynnysrajan lasku on mahdollista. Näiden näytteiden kohdalla havaittiin, että kynnysrajana käytettyjä arvoja (100 rf:ta heterotsygooteille ja homotsygooteille 300 rf:ta) voidaan pitää luotettavina. Näytteiden, joiden DNA-pitoisuus on vahva, osalta otettiin käyttöön VeriFiler-kitillä GeneMapper-analyysissä mahdollistettu normalisaatio, joka poistaa ylimääräisen fluoresenssin tasottaen tulospiikit yhteneväisimmäksi ja poistaen ajossa spektraalin ohittaneen ”vuodon” toisiin väreihin. Tässä työssä tulosten laskenta Familias-ohjelmalla ei ollut tarpeen, koska tarkoituksena oli vain verrata, että näytteistä saadut tunnistukset vastaavat aiemmin määritettyjä tunnistuksia.

6 Tulokset

6.1 Prep-n-Go™ -lyysausmenetelmän toimivuuden testaaminen

Koska THL:n oikeusgenetiikan laboratoriossa DNA-eristeiden DNA-pitoisuus ei ole tiedossa, eristyksen toimivuus selvisi vasta, kun ensimmäinen kapillaarielektroforeesiajo oli suoritettu. Ajon elektroferogrammista nähtiin, että kaikista näytteistä saatiin tuloksia, vaikkakin vahvoja. Näytteiden vahvuus näkyy elektroferogrammissa korkeina piikkeinä, jotka ikään kuin ”lyövät läpi” koko elektroferogrammin (kuva 11). Kuvassa näkyy myös epäspesifisiä OL-piikkejä (”off-ladder”). ”Off-ladder-alleeli” viittaa geneettisen profiilin alleeliin, joka ei vastaa mitään alleeli-ladderissa olevista alleeleista. Tämä voi johtua mutaatiosta, muutoksesta DNA-sekvenssissä tai teknisistä ongelmista analyysin aikana (Butler 2015: 58–68).



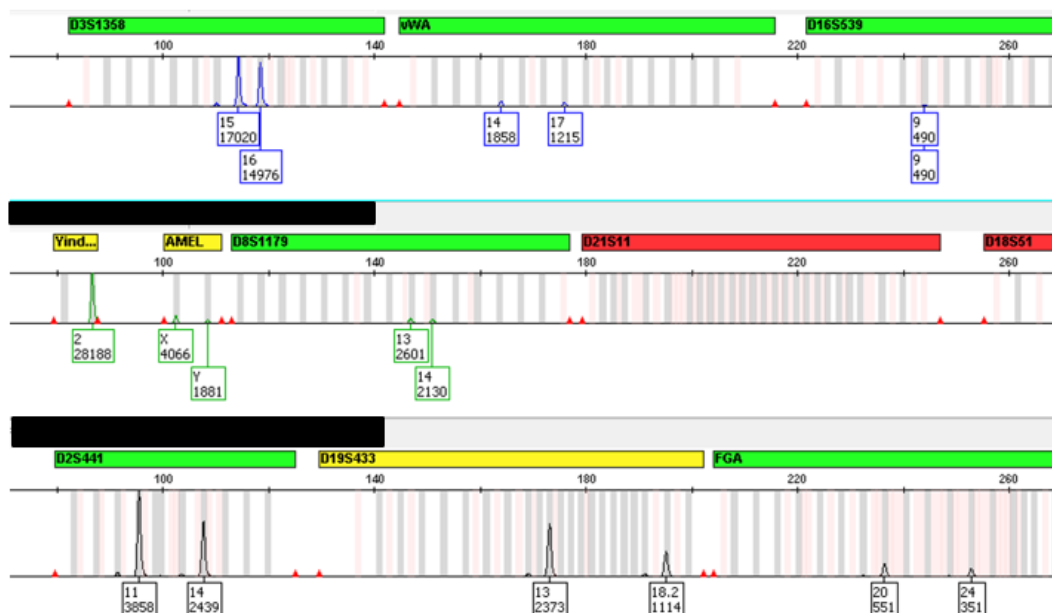
Kuva 11. Vahva näyte näkyy elektroferogrammissa läpilyönteinä (kuvassa liila-pinkinväriset piikit). OL- eli "off-ladder"-piikit ovat epäspesifisiä piikkejä.

Tämä tulos riitti varmistamaan, että oikeusgenetiikan tiimin aiemmin toimivaksi todettu tapa eristää DNA:ta näytteestä inkuboimalla näytteitä huoneenlämmössä 15 minuutin ajan toimii, eikä kitin valmistajan suosittelemaa eristysmenetelmää, jossa näytteitä inkuboidaan 90 °C:ssa 20 minuutin ajan ja sen jälkeen jäädytetään 15 minuutin ajan, ei ollut tarpeen testata. Näytteiden vahvuuden oletettiin johtuvan PCR-sykliden määrästä – 26 – joka oli valmistajan ohjeiden mukainen. Muita syitä vahvoin tuloksiin voi olla esimerkiksi lyaatin määrä 2 µl tai eristysaika 15 minuuttia. PCR-sykliden määräksi vaihdettiin 25 sykliä ja vähennettiin lyaatin määrää 1 µl:aan. Pienemmällä lyaatin määrällä ja PCR-sykliden vähentämisellä saatiin lähes samanlaisia tuloksia. Reagenssien ja PCR-menetelmän toimivuuden vahvistivat myös sisäisen standardin piikkien korkeudet, jotka olit 25 syklissä 400 rfu:ta ja 26 syklissä 4 000 rfu:ta. Tasaisimmat tulokset saatiin käyttämällä PCR-sykliden määränä 26 sykliä, ja pipetoinnin helpottamiseksi lyaatin määrä pidettiin 2 µl:ssa.

6.2 DNA-eristeiden monistuminen ja PCR:n optimointi

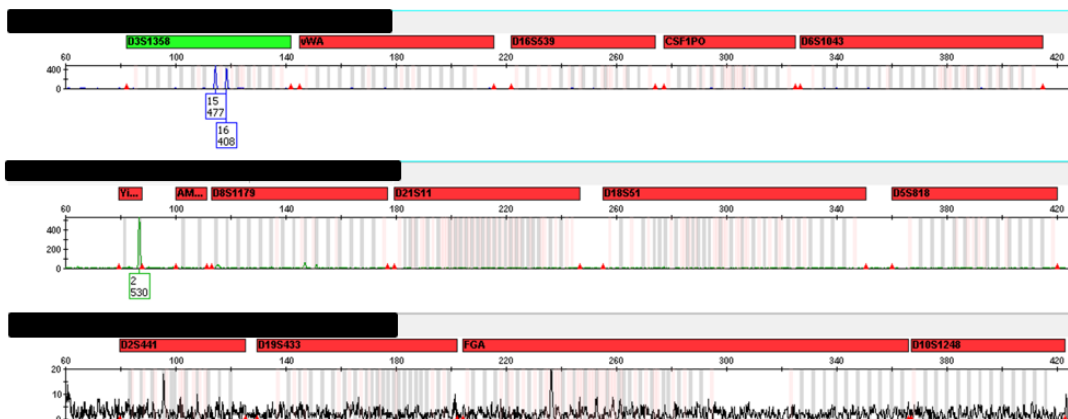
Kun Prep-n-Go -eristyksen toimivuus oli varmistettu 13 epiteelisolunäytteellä, otettiin työlistoille haastavimmat näytteet. Testeihin käytettiin yhteensä kuutta luu-, veri- ja kudospäyteistä aiemmin tehtyjä DNA-eristeitä. Kuten luvussa 3.1 mainittiin, näiden näytteiden eristysmenetelmä on erilainen, joten tämän tarkoituksena oli testata muiden eristysmenetelmien yhteensopivuutta uuden VeriFiler-PCR-kitin kanssa. Ensimmäisessä ajossa DNA-eristeitä pipetoitiin 5 µl/näytematriisi, koska aiempien analyysien perusteella tiedettiin, että luu-, veri- ja kudospäyteiden PCR-pitoisuudet olivat heikkoja.

Kaikki näytteet, paitsi toinen verieristeistä (30 µl), olivat monistuneet. Luueristeiden kohdalla tulokset osoittautuvat niin hyviksi, että analysointivaiheessa piikkien hyväksymisrajan kynnyksen lasku riitti tulosten saamiseksi. Kudoseristeissä taas oli hieman enemmän haastetta, koska näyte oli selkeästi hajonnut (kuva 12): elektroferogrammissa havaittiin ”ski-slope”-efekti, jossa suurempien DNA-fragmenttien monistuminen on heikompaa, koska niitä on pieniä fragmentteja vähemmän.



Kuva 12. Osa kudospäyteen elektroferogrammista, kun lysaattia pipetoitiin 5 µl ja PCR-syklejä oli 26.

Yleensä tämänkaltaisessa tilanteessa PCR-sykliden määrää nostettaisiin, mutta ottaen huomioon, että enemmän syklejä tarkoittaa myös pidempää monistusai-
kaa, päätettiin ensin kokeilla suurempaa lyaatin määrää. Seuraavassa ajossa
pipetoitiin lyaattia 10 µl ja PCR-sykliden määrä pidettiin samana. (kuva 13).



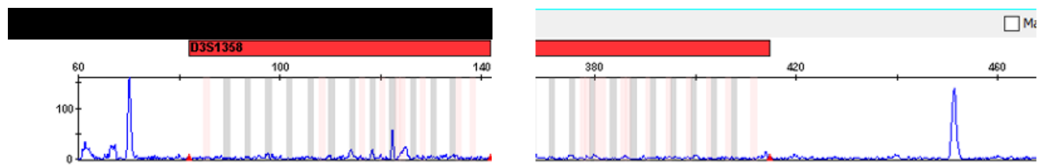
Kuva 13. Osa kudoksenäytteen elektroferogrammeista (sama kudos kuin kuvassa 12), kun lyaattia pipetoitiin 10 µl ja PCR-syklejä 26.

Yleisesti ottaen eristeen määrän lisääminen ei paranna tulosta ja tämä havaittiin myös elektroferogrammeista. On todennäköistä, että eristeessä on joitakin aineita, jotka estävät näytteen monistumisen. Tätä tukee myös se, että IQC-piikit eivät reaktiossa monistuneet. Luonnollisesti suurempi eristemäärä tarkoittaa myös enemmän inhiboivia aineita. Lisäksi suurempi eristemäärä vie tilaa PCR-reaktiolta, ja monistuminen voi täten jäädä vajavaiseksi.

Tämän vuoksi päätettiin palata takaisin 5 µl:n näytemäärään ja kokeilla pidempää PCR-reaktiota. PCR-laitteelle luotiin heikkoja näytteitä varten kaksi uutta metodologia: ensimmäisessä oli 28 sykliä ja toisessa 30 sykliä. Aluksi testattiin 28 syklin PCR-reaktiota, mikä osoittautui toimivaksi: merkit monistuivat ja elektroferogrammeissa havaittiin selkeitä piikkejä. Viimeisenä testinä kuvien 14 ja 15 kudoksenäytteen kohdalla kokeiltiin vielä pienempää lyaatin määrää 28 syklin PCR-reaktion kanssa. Myös tämä osoittautui toimivaksi menetelmäksi, joten

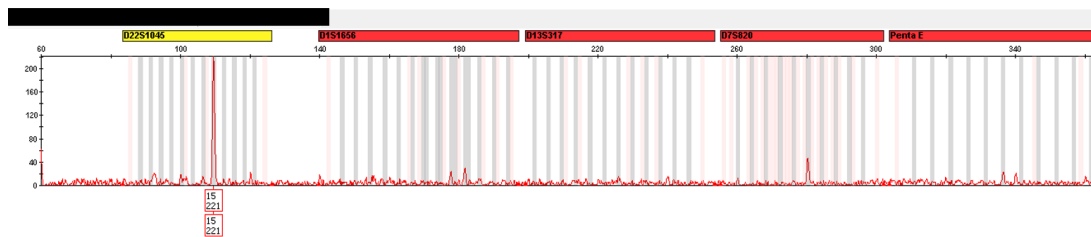
lopulliseksi monistustavaksi heikoille näytteille valittiin 28:n syklin PCR ja 2 µl lyaattia.

Koska verinäyte oli peräisin vainajasta, siitä oli tehty kaksi rinnakkaista eristettä: toiseen eristykseen oli käytetty 3 µl ja toiseen 30 µl verta. Kummatkin eristeet monistettiin 26 syklin PCR-reaktiolla, PCR-lysaattia oli 5 µl. Etukäteen tiedettiin, että 3 µl:n verestä oli saatu tuloksia myös edellisellä kitillä, mutta 30 µl:n verestä ei ollut lainkaan tuloksia. Näin kävi myös VeriFiler Plus -kitin kanssa (kuvat 14 ja 15). Elektroferogrammista havaittiin, että kaksi sisäisen standardin piikkiä oli monistunut, mikä viittaisi inhibiittoriin näytteessä.



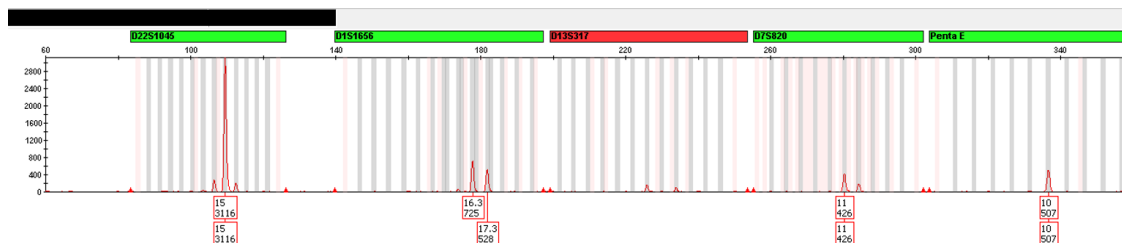
Kuva 14. Osa 30 µl:n verieristeen tunnisteesta. Elektroferogrammin päädyissä olevat IQC-piikit, joiden korkeus on alle 2000 rfu:ta, viittavat inhibiittoriin.

On mahdollista, että koska eristys oli tehty 30 µl:sta verta, DNA:n pitoisuus näytteessä on liian korkea. Toisinaan myös liian suuret DNA-pitoisuudet voivat estää DNA-jaksojen monistumista.



Kuva 15. Osa 30 µl:n verieristeen tunnisteesta (sama ajo kuin kuvassa 14), kun sen tilavuus oli 5 µl ja PCR-syklejä 26.

Kuvasta 15 nähtiin ”ski-slope”-efekti, joka oli odotettavissa tällaisen näytetyypin ollessa kyseessä. Vaikka tällainen tulos ei ollut sinänsä yllättävä, päätettiin kokeilla vielä 30 syklin PCR-reaktiota kyseiselle verieristeelle (kuva 16).



Kuva 16. Osa 30 µl:n verieristeen tunnisteesta, kun syklejä oli monistusvaiheessa 30.

PCR-sykliden määrää lisäämällä elektroferogrammissa näkyi hyväksyttävissä rajoissa, eli sopivalla korkeudella ja vahvuudella, olevia piikkejä. Tämän tuloksen pohjalta päätettiin, että erittäin heikoille näytteille käytetään jatkossa 30 syklin PCR-reaktiota ja 2 µl lysaattia.

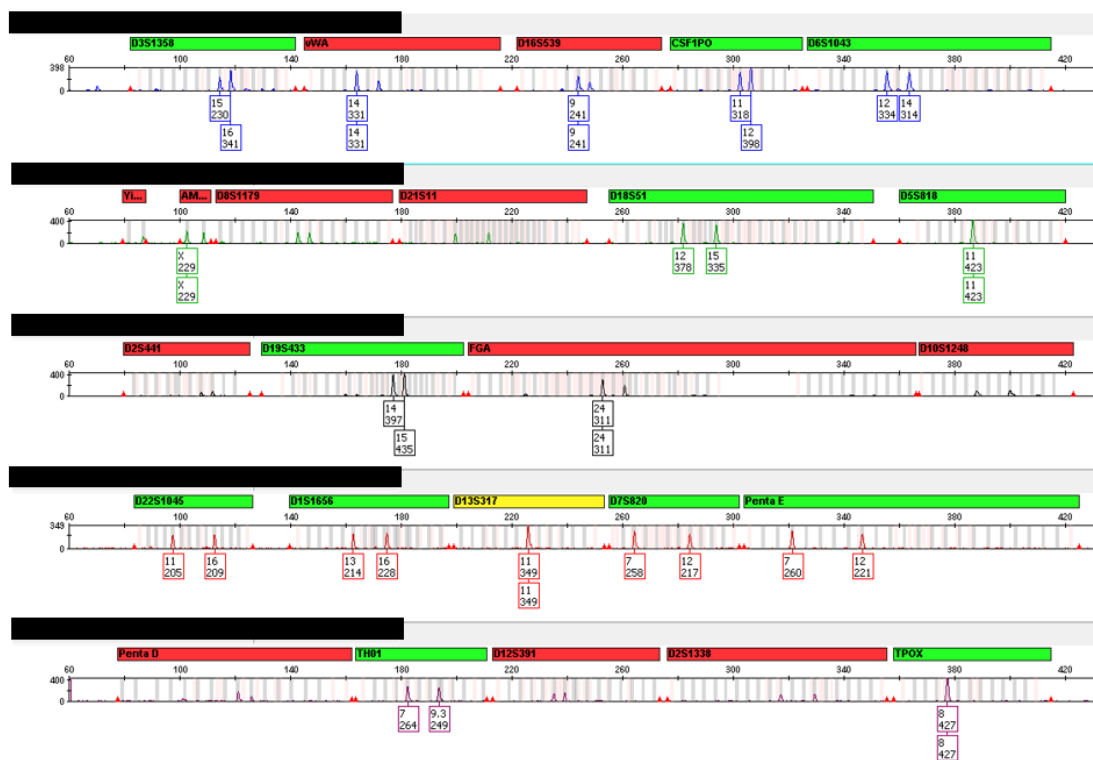
6.3 Prep-n-Go™ -eristyspuskuri ja muut STR-kitit

Prep-n-Go -eristyspuskurin yhteensopivuutta eri valmistajien kittien kanssa testattiin Qiagen Investigator HDplex -kitillä (Cat. no. 381215), koska aiemmin laboratoriossa epiteelinäytteiden DNA-eristykseen käytetyt lysispuskurit eivät ole toimineet täysin ongelmitta kyseisen kitin kanssa. Näissä lysaateissa on todennäköisesti ollut PCR-monistusta inhiboivia aineita, joille Investigator HDplex -kitti on hyvin herkkä. Lysaatit on laimennettu aina vedellä suhteessa 1:5. Prep-n-Go -lyysatuilla näytteillä testattiin Investigator HDplex -kitin monistuvuus laimentamatta, ja näytteet monistuivat lähes ongelmitta. Osa tuloksista oli kuitenkin liian vahvoja, joten päätettiin jatkossa tehdä kaikista näytteistä laimennokset suhteessa 1:3.

6.4 Positiivikontrolli

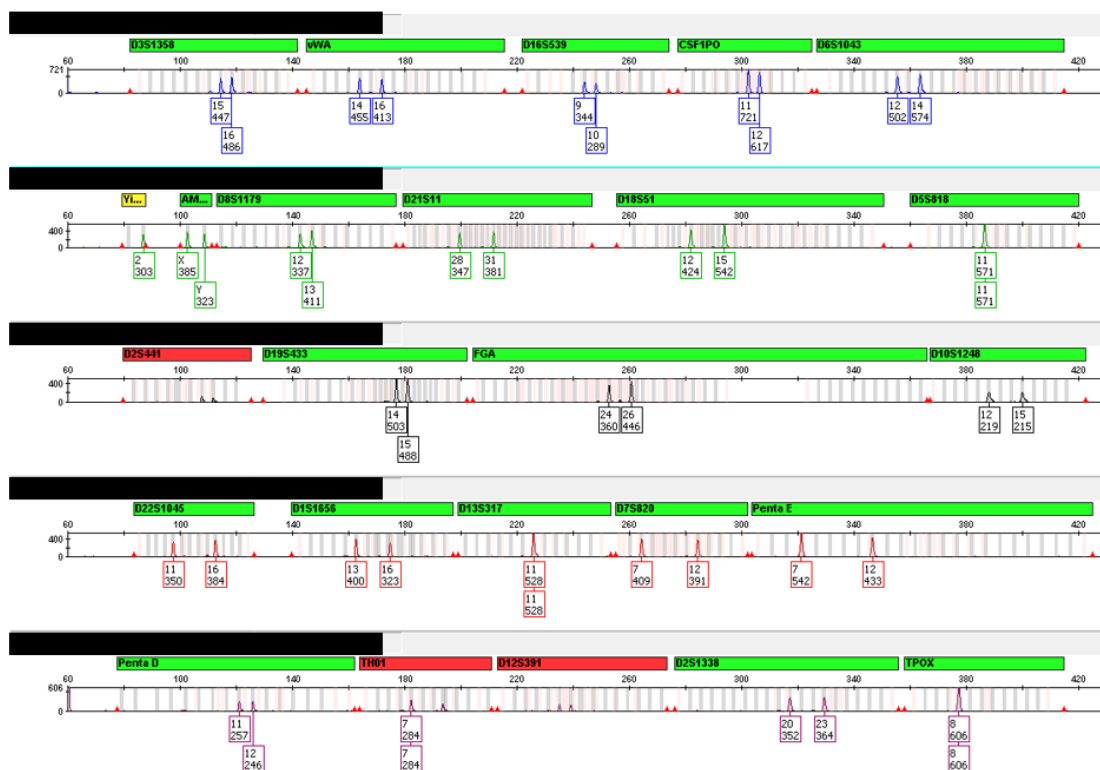
Butlerin (2010: 131) mukaan positiivikontrolli on arvokas indikaattori siitä, ovatko PCR-komponentit epäonnistuneet tai jääneet lisäämättä PCR-analyysin aloitusvaiheessa. Positiivikontrollina tulisi käyttää DNA-templaattia, jonka sekvenssi tunnetaan ja joka sisältää korkealaatuista DNA:ta. Sen tarkoituksena on varmistaa, että reaktion komponentit ja lämpösyklien parametrit toimivat luotettavasti tietyn DNA-alueen monistamisessa. Jos positiivikontrollista ei saada hyväksyttäviä tuloksia, muitakaan kyseisen ajon tuloksia ei voida hyväksyä, joten positiivikontrolli on erittäin tärkeä laboratorioprosessin osa.

VeriFiler Plus -kittiin sisältyvä positiivikontrolli DNA Control 007 (0,1 ng/μl, Cat. no. 4479014) aiheutti ongelmia jo ensimmäisestä ajosta lähtien. Positiivikontrollin tilavuutta PCR-reaktiossa säädettiin koko verifiointin aikana. Valmistaja oli ohjeistanut käyttämään 25 μl:n PCR-reaktiossa 5 μl positiivikontrollia, 12,5 μl vettä ja 7,5 μl PCR-seosta (kuva 17).



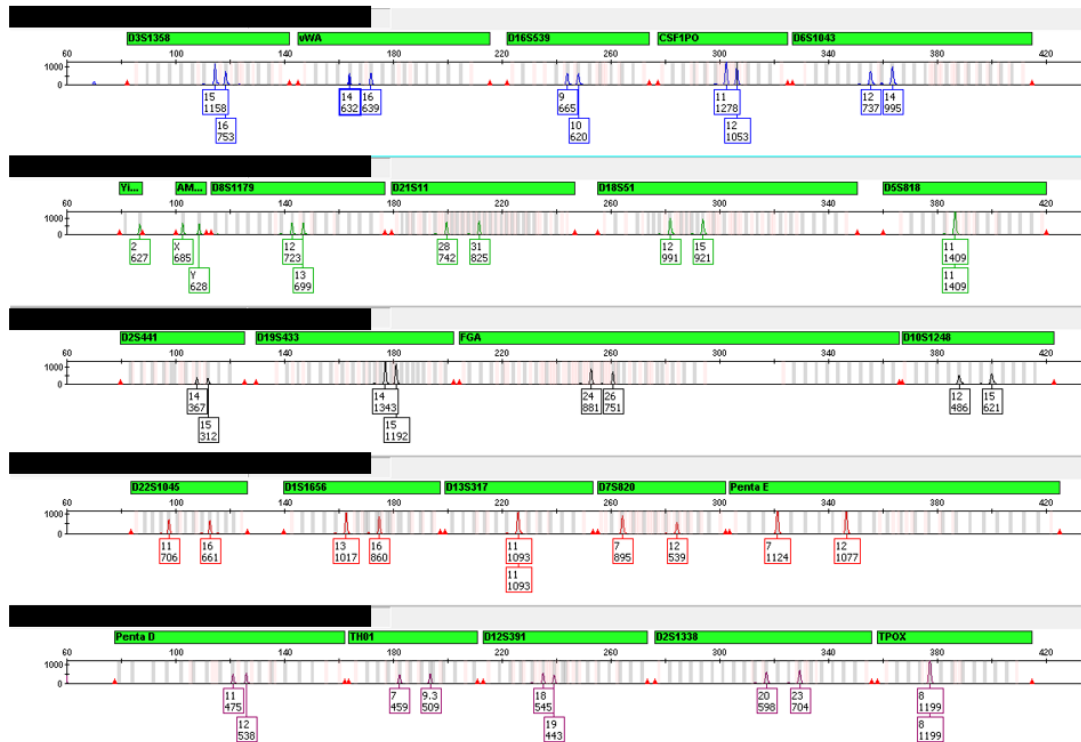
Kuva 17. Positiivikontrollin (0,1 ng/μl) tunniste, kun sen tilavuus oli 5 μl ja PCR-syklien määrä 26.

Elektroferogrammista nähtiin, että piikit jäivät erittäin mataliksi ja useissa merkeissä niitä ei näkynyt ollenkaan. Tämän perusteella 5 µl:n tilavuudella positiivikontrollia ei voida käyttää, joten päätettiin kaksinkertaistaa kontrollin määrä 10 µl:aan (kuva 18).



Kuva 18. Positiivikontrollin (0,1 ng/µl) tunniste, kun sen tilavuus oli 10 µl ja PCR-syklien määrä 26.

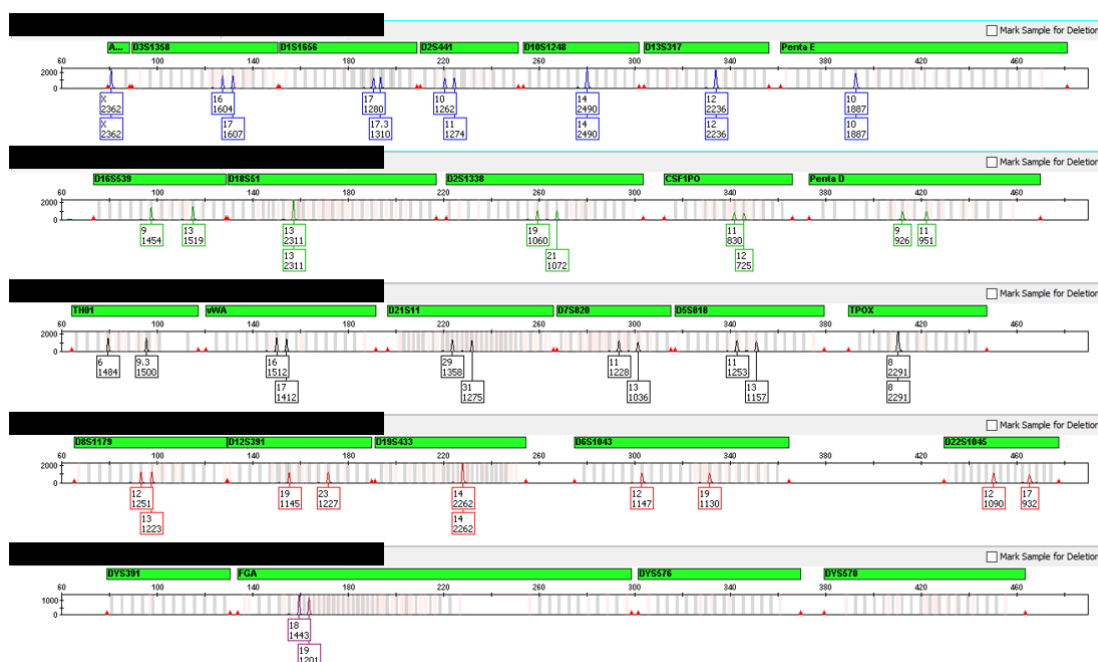
Tämä tulos näytti jo hieman paremmalta, mutta piikit olivat edelleen liian matalia ja tunnisteesta löytyi myös merkkejä, jotka eivät monistuneet. Seuraavaksi testattiin positiivikontrollille 17,5 µl:n tilavuutta (kuva 19).



Kuva 19. Positiivikontrollin (0,1 ng/ μ l) tunniste, kun sen tilavuus oli 17,5 μ l ja PCR-syklien määrä 26.

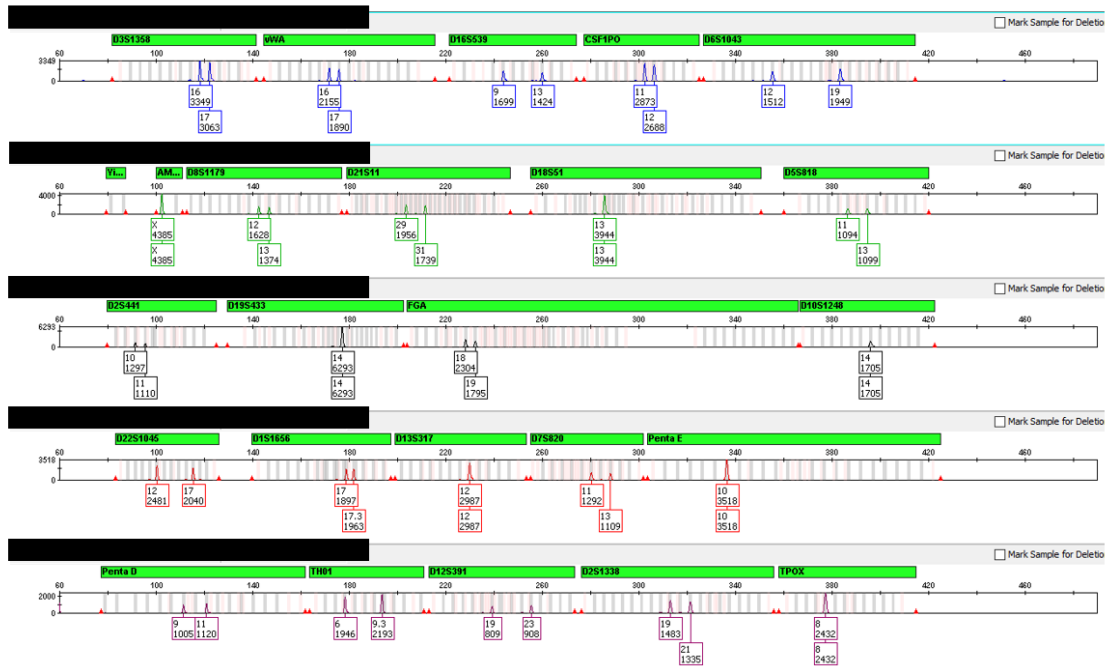
Elektroferogrammista nähtiin, että 17,5 μ l:n tilavuus voisi toimia. Seuraavissa ajoissa sama kontrollitilavuus käyttäytyi kuitenkin eri tavalla. Tämän epävakauksen vuoksi katsottiin perustelluksi, että tilataan ja testataan vahvemman konsentraation (2 ng/ μ l) omaavaa kontrollia pienemmällä tilavuudella stabiiliin tilanteen saavuttamiseksi.

kontaminaatioiden alkuperän selvittämiseksi. Profiilissa saatetaan havaita esimerkiksi kahden henkilön tunnisteet. Tällöin normaalin käytänteen mukaisesti tarkastetaan muiden tarkastusprosessien lisäksi, onko kontaminaatio mahdollisesti peräisin laboratorion henkilökunnasta. Henkilökunnan tunnisteet löytyvät GeneMapper-ohjelman tietokannasta vertailua varten. Kuvissa 21–22 on esitetty verifiointin suorittajan tunnisteet, jotka on analysoitu oikeusgenetiikan laboratorion edellisellä käytössä olleella kitillä sekä nyt verifioitavalla kitillä.



Kuva 21. Verifiointin suorittaneen tunniste analysoituna aiemmin oikeusgenetiikan laboratoriossa käytössä olleella kitillä.

Edellinen kitti on ollut eri valmistajan kitti. Kaikissa DNA-merkeissä näkyy piikkejä alle 2 000 rfu:ta. Merkit DYS391, DYS576 ja DYS578 ovat Y-kromosomin merkkejä, jotka ilmaisevat sukupuolen. AMEL-merkistä nähtiin, että alleelit ovat X ja X eikä edellä mainituissa Y-kromosomin kolmessa merkissä ole piikkejä havaittavissa, joten kyseessä on nainen. Lisäksi tunnisteesta havaittiin kuusi homotsygotista merkkiä: D10S1248, D13S317, Penta E, D18S51, TPOX ja D19S433.



Kuva 22. Verifiointin suorittaneen tunniste analysoituna VeriFiler Plus -kitillä.

VeriFiler Plus -kitin tunnisteesta nähtiin edellisen kitin tavoin, että kaikissa merkeissä on piikkejä havaittavissa ja piikkien korkeus vaihtelee johtuen analyysi-asetuksista. Tässä kitissä sukupuolen ilmaisee AMEL-merkin lisäksi Y indel -merkki, jossa nyt ei ole piikkiä havaittavissa, joten tämä tulos vastaa myös edellisen kitin tulosta. Profiili on siis yhtenevä edellisen kitin tulosten kanssa. Taulukossa 10 on esitetty edellisen kitin sinisen värin merkit ja vastaavat merkit uuden kitin väreissä.

Taulukko 10. Aiemman kitin sinisen värin merkit verrattuna VeriFiler Plus -kitin väreihin.

Merkki	Alleelit	Väri (edellinen kitti)	Väri (VeriFiler™ Plus)
AMEL	X-X		
D3S1358	16–17		
D1S1656	17–17,3		
D2S441	10–11		
D10S1248	14–14		
D13S317	12–12		
Penta E	10–10		

Taulukosta ja kuvista nähdään, että vaikka merkkien värit vaihtelevat eri kittien välillä, alleelien tuloksiin ja saatuihin tunnisteesiin tämä ei vaikuta millään tavalla. Tämän tyyppinen merkkien ja alleelien vertailu suoritettiin kaikkien testattujen näytteiden kohdalla, ja vertailussa nähtiin, että tulokset olivat yhteneväisiä.

6.6 Tulosten laatu

Verifiler Plus -kitillä saatujen tulosten laatua arvioitiin viimeisen ajon tulosten perusteella. Näytesarjassa ei havaittu lainkaan inhibitiosta johtuvia merkkien puutoksia eikä entsyymien toiminnan loppumisesta kieliviä ”olkapäitä”. Sen sijaan näytteissä havaittiin joissain merkeissä leveneviä (varsinaisen piikin perässä yhtä emästä pitempi, matala varjopiikki) piikkejä. Tämä ilmiö esiintyi heikoilla ja keskivahvoilla näytteillä. Vahvoilla näytteillä ilmiötä ei havaittu. Analyysiasetuksissa muuttamalla +1bp piikkien tunnistusta ongelmasta päästiin eroon (VeriFiler™ Plus ja Prep-n-Go™ verifiointiraportti 2023: 4).

7 Yhteenveto

THL:n oikeusgenetiikan laboratorio on FINAS-akkreditoitu laboratorio, joka tekee tärkeitä lakisäätöistä työtä. Suoritettavilla tutkimuksilla, kuten isyys- ja perheenyhdistämistutkimukset, on vaikutusta monen ihmisen elämään. Annetut tutkimuslausunnot ovat tärkeässä roolissa vahvistettaessa ja kumotessa isyyksiä sekä myönnettäessä oleskelulupia perhesiteen perusteella. Tämän vuoksi on tärkeää, että laboratorion toiminta on selkeää, perusteellista ja tarkkaa ja että tuloksia voidaan pitää luotettavina.

Tämän työn tarkoituksena oli verifioida uusi yksilöntunnistuskitti oikeusgenetiikan tiimin käyttöön. Työssä testattiin epiteelisolunäytteitä (21 kpl), luu-, kudosa ja verieristeitä (yhteensä 10 kpl). Testeillä varmistettiin Prep-n-Go -eristyspuskurin sopivuus, VeriFiler Plus -kitin toimivuus eri DNA-eristysmenetelmillä eristettyjen näytetyyppien kanssa, yhteensopivuus eri valmistajien STR-kittien kanssa sekä verrattiin saatuja tuloksia aiemmin saatuihin tuloksiin. VeriFiler Plus -kitin käyttöönotto on melko vaivatonta, koska se on jo valmiiksi validoitu. Kitissä on kaikki tarvittavat komponentit, ja ohjekirjoissa on selkeät vaiheittaiset ohjeet laitteiden asetuksiin, pipetointiin, PCR-asetuksiin ja GeneMapper-ohjelman asetuksiin. Tässä työssä suoritettulla verifiointilla varmistettiin VeriFiler Plus -kitille annetut vaatimukset.

Prep-n-Go -eristyspuskuri osoittautui toimivaksi oikeusgenetiikan laboratorion jo hyväksi havaitulla eristysmenetelmällä, jossa epiteelisolunäytteitä inkuboidaan huoneenlämmössä 15 minuutin ajan. Muutkin näytetyypit, kuten veri, kudosa ja luu, joiden eristysmenetelmä eroaa epiteelisolunäytteistä, monistuivat VeriFiler Plus -kitillä hyvin. PCR-asetuksissa epiteelisolunäytteille valittiin 26 syklin menetelmä, heikkojen näytteiden kohdalla hyväksi havaittiin 28 ja 30 syklin menetelmät. Eri valmistajien kaupallisten STR-kittien yhteensopivuus Prep-n-Go -eristyspuskurin kanssa varmistettiin suorittamalla testiajo Investigator HDplex -kitillä. Kyseinen kitti on aiemmin ollut herkkä aiemmin käytössä olleelle lyysauspuskurille, jolloin eristettä on jouduttu laimentamaan. Nyt laimentamattomasta eristeestä saatiin melko hyviä tuloksia, mutta tulosten epätasaisuuden takia

päätettiin jatkaa eristeiden laimentamista pienemmässä suhteessa kuin aikaisemmin.

Kitin alkuperäisen positiivikontrollin (0,1 ng/μl) kanssa oli haasteita koko verifiointin ajan. Vaikka kitin mukana tulleen positiivikontrollin tilavuuksia vaihdeltiin monta kertaa, siitä ei missään vaiheessa saatu tasaista ja hyvää tulosta. Tämän vuoksi päätettiin siirtyä vahvempaan positiivikontrolliin. Vahvemman kontrollin (2 ng/μl) laimennoksella (0,5 ng/μl) päästiin hyväksyttäviin tuloksiin, ja tämä valikoitui käytettäväksi menetelmäksi jatkossa.

Valmistaja mainostaa VeriFiler Plus -kittiä erittäin tarkkana ja herkkänä kittinä, joka on optimoitu oikeuslääketieteellisiä tapauksia varten. Kitin on sanottu olevan erityisen herkkä haastavimmille näytteille, jotka ovat hajonneita, kontaminoituneita tai jollain tapaa inhiboituneita (VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit). Näitä mainittuja ominaisuuksia ja herkkyyttä olisi ollut mielenkiintoista testata vielä lisääkin. Jatkotutkimuksena kitin herkkyyttä voitaisiin testata DNA-näytteen laimennoksilla, jolloin olisi mahdollistaa tunnistaa pienin luotettavasti havaitsevissa oleva pitoisuus. Tämän lisäksi testausta voisi jatkaa vielä näytteisiin, joissa on tunnetut pitoisuudet ja koostumukset. Näin pystyttäisiin arvioimaan herkkyuden lisäksi myös kitin spesifisyyttä. Myös jatkotestaus näytteiden inhibiittoreiden ja kontaminanttien vaikutuksesta monistumiseen toisi kiinnostavaa lisätietoa aiheesta.

Kitille oli asetettu tiettyjä kriteerejä, jotka sen piti täyttää, jotta tuloksia voidaan pitää luotettavina. Uudella lyysauspuskurilla eristetyillä posken sisäpinnan siveilynäytteillä tuli saada eheä ja laadukas tunniste; muilla menetelmillä tuotettujen DNA-eristeiden tuli monistua verifioidulla STR-kitillä onnistuneesti, DNA-tunnistusten tuli olla hyvälaatuisia sekä yhteneviä aiemmin saatuihin tuloksiin. Nämä kaikki kriteerit voitiin osoittaa VeriFiler Plus -kitin verifiointiprosessilla täytetyksi ja kitti voitiin täten ottaa oikeusgenetiikan laboratoriossa käyttöön virallisesti 6.11.2023.

Lähteet

4N6FLOQSwabs® Genetics 4504C. 2024. Verkkoaineisto. Copan Diagnostics. <<https://www.copanusa.com/products/genetics/4n6floqswabs-genetics/4504c/>>. Luettu 9.4.2024.

Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide. 2010. Applied Biosystems.

Avela, Marjo; Hedman, Minttu; Palo, Jukka & Strengell, Mari. 2019. Oikeusgenetiikka yksilöntunnistuksessa. Duodecim. Vol. 135 (8), s. 727–734.

Boca Scientific Inc Buccal Prep Plus DNA Isolation Kit, 50 reactions, with 50 SK-2S Buccal Swabs. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.fishersci.com/shop/products/buccal-prep-plus-dna-iso-kit/NC1894505>>. Luettu 9.4.2024.

Butler, John M. 2010. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Oxford: Elsevier.

Butler, John M. 2012. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Oxford: Elsevier.

Butler, John M. 2015. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. Oxford: Elsevier.

Confident answers in challenging cases. Casework Flyer. 2020. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Flyers/verifiler-plus-casework-flyer.pdf.pdf>>. Luettu 9.4.2024.

Direct Amplification of Reference Samples Using the Applied Biosystems™ VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit. Technical Note. 2021. Thermo Fisher Scientific.

DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. 2014. Thermo Fisher Scientific.

DNA:n eristys. 2023. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos.

GeneMapper® ID-X Software. Expert System and Expert Assistant Software for Forensic DNA Analysis. 2012. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Fcms_107273.pdf>. Luettu 2.4.2024.

Kling, Daniel; Mostad, F. Petter & Egeland, Thore. 2017. Manual for Familias 3. Verkkoaineisto. <<https://familias.name/Files/manualFamilias.pdf>>. Luettu 2.4.2024.

LIMS v1.9.243. 2023.

Luueristys. 2018. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.

Maxwell® RSC Instrument Operating Manual. 2022. Promega Corporation.

Palo, U. Jukka; Rahikainen, Anna-Liina; de Leeuw, Wiljo; Budowle, Bruce & Sajantila, Antti. 2016. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. Forensic Science International. Vol. 261, s. 148-153.

Raportti/ESWG:n laaduntarkkailukierros. 2019. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.

Raportti/ESWG:n laaduntarkkailukierros. 2023. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.

VeriFiler™ Plus ja Prep-n-Go™ verifointiraportti. 2023. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.

VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit. 2020. Thermo Fisher Scientific.

VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A35495>>. Luettu 14.4.2024.

VeriFiler™ Plus verifointisuunnitelma. 2023. Yrityksen sisäinen aineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.