

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kerstin Joandi

**Proovivõtu efektiivsus ja DNA eralduse saagis kohtuekspertiisialaste
DNA analüüside puhul**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Juhendaja geenitehnoloogia vanemteadur Reet Kurg, PhD

Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituut

Juhendaja peaekspert Maarja Sadam, MSc

Eesti Kohtuekspertiisi Instituut

Tartu 2016

„Proovivõtu efektiivsus ja DNA eralduse saagis kohtuekspertiisialaste DNA analüüside puhul”

DNA analüüsi üks olulisemaid etappe on bioloogilise materjali kogumine sündmuskohalt või objektidelt. Proovide võtmiseks kasutatakse erinevaid meetodeid, kuid puudub üldaktsepteeritud metoodika nende efektiivsuse hindamiseks. Proovivõtu meetodite uurimisel on kasutatud kontaktjälgi ning vere- ja süljeproove. Neil juhtudel pole täpselt teada uuritavale pinnale jäetud rakkude arv. Täpset rakkude lugemist võimaldab FACSi kasutamine. Kindla rakkude arvuga uuritava materjali genereerimine võimaldab usaldusväärselt hinnata teoreetilist jäljes olevat DNA kogust ja seeläbi saab määrata proovi võtmise efektiivsust. Käesolevas töös luuakse kaks mudelsüsteemi erinevate proovivõtu meetodite testimiseks ja uuritakse, milline on proovivõtu efektiivsus ja saagis, kasutades kolme tampooni, kahte teibi ja väljalõikemeetodit. Lisaks võrreldakse, kas mudelsüsteemis saadud tulemused langevad kokku kontaktjälgede võtmisel saadud tulemustega. Töö tulemusena selgus, et mudelsüsteem plastikul sobis tampoonimeetodite efektiivsuse hindamiseks, kuid ei sobinud teibimeetoditele. Mudelsüsteem riidel ei sobinud tampoonimeetodite ega teipide efektiivsuse hindamiseks.

Märksõnad: kohtuekspertiis, DNA analüüs, sündmuskohalt proovide võtmine

B220 Geneetika, tsütogeneetika

‘Efficiency of forensic DNA trace recovery methods’

Sample collection is one of the most important parts in DNA analysis. There are many ways how to do it, but it is crucial to use these methods, which give the highest DNA yield. However, there have not been developed a method, which shows the efficiency of forensic DNA trace recovery methods. For this reason, FACS was used to create samples with certain amount of cells. The cells were sorted on plastic and fabric surfaces. Later, the samples were collected with three different swabbing methods, two tape lifting and cutting methods. Using FACS to create certain cell amounts, allows us to evaluate the efficiency of these sample collection methods. Fingerprints were generated and all the same sample collection methods were used to test if the method that was created with the model system actually works in real cases. To summarise, the created model system was suitable for testing swabbing methods on plastic surfaces, however, tape lifting methods could not be tested. Moreover, given model system was not suitable for testing sampling methods from fabric.

Keywords: forensic science, DNA analysis, trace recovery

B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Tamponimeetod	6
1.1.1. Puuvilltamponid	7
1.1.2. Nailontamponid	7
1.1.3. Tamponide võrdlused	8
1.2. Teibimeetod	9
1.2.1. <i>Scenesafe FAST mini</i> teip	10
1.2.2. <i>DNA-stub</i>	11
1.2.3. Teipide võrdlused	11
1.3. Tamponimeetodite ja teibimeetodite võrdlus	12
1.4. Väljalõikemeetod	13
1.5. Kraapimismeetod	13
1.6. Märg-vaakum (<i>M-Vac</i>) süsteem	13
1.7. Proovivõtu meetodite testimine	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1. Töö eesmärgid	15
2.2. Materjal ja meetodika	15
2.2.1. Proovide võtmine	16
2.2.2. DNA eraldamine	17
2.2.2.1. DNA eraldamine <i>Chelex</i> meetodiga	17
2.2.2.2. DNA eraldamine <i>Prepfilers BTA Forensic DNA extraction</i> puhastussüsteemiga ..	18
2.2.3. DNA kontsentratsiooni määramine	19
2.2.4. DNA-profiili määramine	19
2.2.5. Kapillaarelektroforees	20
2.2.6. Analüüs	20
2.2.7. Meetodika sobivuse hindamine	21
2.3. Tulemused ja arutelu	22
2.3.1. Mudelsüsteemide kirjeldus	22
2.3.3. Proovivõtu efektiivsus ja DNA saagis mudelsüsteemis plastikpinnalt võetud proovide puhul	24
2.3.5. DNA saagis ja DNA-profiil plastikpinnalt võetud kontaktjälgede puhul	28
2.3.4. Proovivõtu efektiivsus ja DNA saagis mudelsüsteemis riidelt võetud proovide puhul	31
2.3.6. DNA saagis ja DNA-profiil riidelt võetud kontaktjälgede puhul	34
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED	42
KASUTATUD KIRJANDUS	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	48
LISAD	49
LISA 1	49
LIHTLITSENTS	51

KASUTATUD LÜHENDID

Av – aritmeetiline keskmine (ingl *average*)

CV – variatsiooni koefitsent (ingl *coefficient of variation*)

DPBS – fosfaatpuhver (ingl *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

FACS – fluorestsents-aktiveeritud rakusorter (ingl *Fluorescence-activated cell sorting*)

Low-TE puhver – madala EDTA sisaldusega Tris puhver (pH 8.0), mille koostisosad on 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA

qPCR – kvantitatiivne e reaalaja PCR (ingl *real-time polymerase chain reaction*)

R^2 – determinatsioonikoefitsent

RD – suhteline erinevus (ingl *relative difference*)

rfu – mõõteühik, mida kasutatakse kapillaarelektroforeesil fluorestsentssignaali tugevuse väljendamiseks (ingl *relative fluorescence units*)

SD(S) – standardhälve (ingl *standard deviation*)

TE puhver – puhver (pH 8.0), mille koostisosad on 10 mM Tris, 1 mM EDTA

TPH – ilmsiks tulnud alleelide totaalne kõrgus (ingl *total peak height*)

SISSEJUHATUS

Üks esimesi kriminalistikaeksperte, prantslane Edmond Locard, on öelnud: „Iga kontakt jätab jälje“. Paul L. Kirk on seda printsiipi täiendanud sõnadega: „Kuhu iganes ta astub, mida iganes ta puudutab, mis iganes ta endast maha jätab, kasvõi kogemata – kõik see astub justkui vaikiva tunnistajana tema vastu kohtupinki. Need on tõendid, mis ei unusta. Need on faktidel põhinevad tõendid, mis ei saa olla valed. Tõendid, mis ei saa olla olemata. Ainult inimese suutmatust neid leida, uurida ja mõista võib vähendada nende väärtust“ (Kirk, 1953). Kriminalistika põhiliseks ülesandeks ongi kuriteopaigalt kokku kogutud, pealtnäha üksteisega mitte mingil viisil haakuvate detailide ühendamine nii, et tekib sidus pilt juhtunu kohta ning mis veelgi olulisem – identifitseerida asjasse segatud isikud. Kusjuures vähemalt sama oluline on välistada need, keda sündmuskohal polnud.

DNA analüüsi üks olulisemaid etappe on bioloogilise materjali kogumine sündmuskohalt või ekspertiisiks esitatud objektilt. Proovide võtmiseks kasutatakse mitmeid erinevaid meetodeid. Hetkel puudub üldaktsepteeritud metoodika proovivõtu meetodite efektiivsuse hindamiseks. Proovivõtu meetodite uurimisel on väga palju kasutatud vere- ja süljeproove ning kontaktjälgi. Antud juhtudel pole täpselt teada uuritavale pinnale jäetud rakkude arv. Lisaks esineb suur varieeruvus erinevate proovi doonorite ning isegi ühelt ja samalt doonorilt erineval ajal võetud materjali vahel. Täpset rakkude lugemist võimaldab fluorestsents-aktiveeritud rakusorteri (FACS; ingl *Fluorescence-activated cell sorting*) kasutamine. Kindla rakkude arvuga uuritava materjali genereerimine võimaldab usaldusväärselt hinnata teoreetilist jäljes olevat DNA kogust. Seeläbi saab testida erinevaid proovivõtmise meetodeid määrates proovi võtmise efektiivsust (saagist). Kirjeldatud lähenemine võimaldab luua mudelsüsteemi jälgede genereerimiseks ja nende edaspidiseks uurimiseks.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli välja töötada mudelsüsteem proovivõtu meetodite efektiivsuse hindamiseks kasutades FACS metoodikat ja vere mononukleaarseid rakke. Lisaks oli uurimistöö eesmärgiks võrrelda erinevaid proovivõtmise meetodeid nii mudelsüsteemis kui ka ehtsate kontaktjälgedega, kasutades jälje substraadina plastikut ja riidet.

Antud uurimistöö viidi läbi Eesti Kohtuekspertiisi Instituudi DNA-osakonna Tartu laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Sündmuskohalt leitav bioloogiline materjal on väga oluline asitõend. Selle analüüsimisel on võimalik kindlaks teha, kellelt bioloogiline materjal pärineb ning seostada süüdlane toime pandud kuriteoga. DNAd võib sündmuskohal leiduda igal pool, alustades mustast pesust ja lõpetades suitsukoniga. (Bond ja Phil, 2006; Kobilinsky *et al.*, 2005b) Enim levinud proovimaterjalid kohtuekspertiisialaste DNA analüüside puhul on veri, sülg, sperma ning puutejäljed. Lisaks on võimalik määrata DNA-profiili uriinist, karvadest, hammastest, koeproovidest, luudest ja muust bioloogilisest materjalist (Butler, 2001; Kobilinsky *et al.*, 2005b; van Oorschot *et al.*, 2010). Bioloogilised materjalid võib tinglikult jagada madala DNA sisaldusega proovideks ja kõrge DNA sisaldusega proovideks. Madala DNA sisaldusega proovideks on näiteks puutejäljed (kontaktjäljed) erinevatelt objektidelt. Suures koguses leidub DNAd näiteks veres, spermas ja süljes. (Wyatt *et al.*, 2011)

DNA analüüsiks materjali kogumine on üks olulisemaid etappe kogu DNA analüüsi juures. Sõltuvalt bioloogilise materjali tüübist ning sellest, millisel pinnal kogutav materjal asub, tuleb valida meetod materjali kogumiseks. Kriminologistika valdkonnas on kasutusel mitmeid erinevaid meetodeid DNA analüüsiks proovide võtmisel. Kõige levinumad proovivõtu meetodid on tampoonimeetodid, teibimeetodid ja väljalõikemeetod. Lisaks leiavad kasutust kraapimismeetod ja vaakumi kasutamine (Butler, 2011; Garrett *et al.*, 2014; Forensic Science Regulator, 2014; Handbook of Forensic Services, 2013). Alljärgnevalt käsitletakse nimetatud meetodeid lähemalt.

1.1. Tampoonimeetod

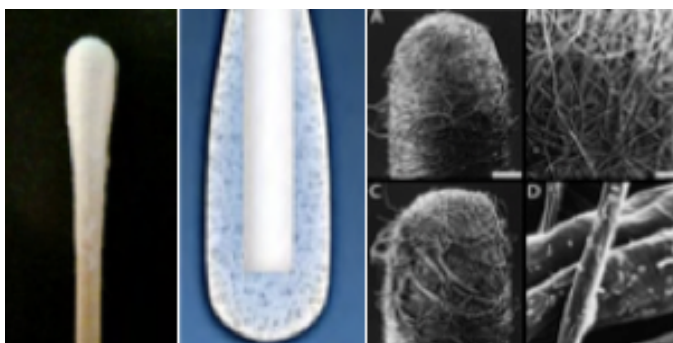
Tampoonide kasutamine on väga levinud meetod nii märjast kui ka kuivanud plekist proovi võtmisel. Viimasel juhul niisutatakse tampoon enne proovi võtmist destilleeritud vees. Bioloogilise materjali kogusest tulenevalt võetakse proov kas ühele või kahele vatitampoonile. Kui materjali on vähe, siis tuleks eelistada kahe vatitampooni kasutamist. (Pang ja Cheung, 2007) Kahe vatitampooni meetodi puhul niisutatakse esimene tampoon destilleeritud vees ning hõõrutakse sellega uuritavat pinda. Nii leotatakse rakud pinna küljest lahti. Järgnevalt võetakse kuiv vatitampoon, millega kuivatatakse uuritav pind üle. Kuiv tampoon on vajalik selleks, et kokku koguda need rehüdreeritud rakud, mis märja tampooniga võttes kaasa ei tulnud. Ühe vatitampooni meetodiga jääb kuiva tampooniga puhastamise etapp ära. (Castella ja Mangin, 2008; Lanno *et al.*, 2013; Pang ja Cheung, 2007)

Kõige levinumad tampoonid on puuvilltampoonid. Lisaks neile on kasutusel nailontampoonid, kunstsiidist (ingl *rayon*) tampoonid, pabertampoonid ja

polüestertampoonid. (Garofano *et al.*, 2012; Squassina *et al.*, 2011) Pabertampoon koosneb imavast mitmekihilisest filterpaberist. Kunstsiid- ja nailontampooniga võrreldes on pabertampooniga kättesaadav DNA hulk oluliselt väiksem. Garofano *et al.* viisid läbi katse, kus võrreldi *4N6FLOQSwabs* nailontampoone (COPAN Diagnostics, USA) kunstsiidist (Sarstedt, Saksamaa) ja *Omniswab* pabertampoonidega (Whatman, UK). Selgus, et kui nailontampooniga on kogutud DNA hulk 0,61 ng/μl, siis kunstsiidist tampooniga saadi DNAd vaid 0,014 ng/μl. Pabertampooniga ei õnnestunud DNAd üldse koguda. (Garofano *et al.*, 2012) Antud töös käsitletakse lähemalt ainult puuvill- ja nailontampoone.

1.1.1. Puuvilltampoonid

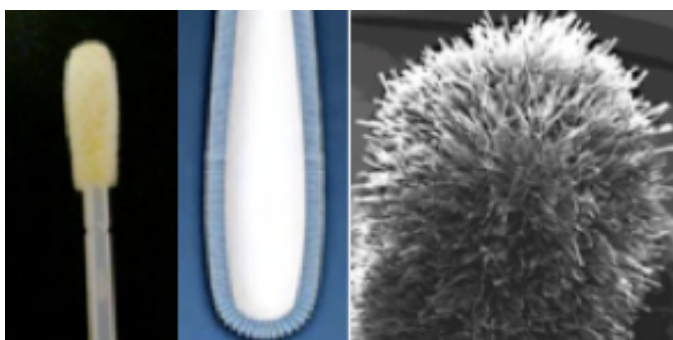
Puuvilltampoon koosneb pikkadest puuvilla kiududest, mis on tihedalt ümber puu- või plastikpulga mässitud (joonis 1). Puuvilltampoonid on hästi imavad ning tänu sellele väga head vahendid proovide võtmiseks. (Brownlow *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2013)



Joonis 1. Puuvilltampooni ehitus (Santiago *et al.*, 2013)

1.1.2. Nailontampoonid

Nailontampoon koosneb lühikestest paralleelsetest nailonkiududest, mis on kinnitatud plastikpulga külge (joonis 2; Santiago *et al.*, 2013). Nailontampoon on äärmiselt hea imavusega ning selle lühikeste kiudude vahele ei jää „lõksu“ rakulisi osakesi (Benschop *et al.*, 2010; Brownlow *et al.*, 2012; Daley *et al.*, 2006; Dalmaso *et al.*, 2008).



Joonis 2. Nailontampooni ehitus (Santiago *et al.*, 2013)

1.1.3. Tampoonide võrdlused

Tänapäeval on kohtuekspertiisialaste DNA proovide võtmisel kõige levinumad ühe ja kahe puuvilltampooni meetodid. Pang ja Cheung viisid läbi katse, kus nad võrdlesid klassikalist ühe niisutatud puuvilltampooni (Medical Wire & Equipment, UK) meetodit kahe puuvilltampooni (Medical Wire & Equipment, UK) meetodiga. Eksperimendist järeldus, et kahe tampooni meetod parandab oluliselt saadava DNA-profiili kvaliteeti. Nagu ka varasematest katsetest (Sweet *et al.*, 1997) on välja tulnud, selgus, et kahe vatitampooni meetodiga on võimalik kätte saada suurem hulk DNAd. Tulemused paranesid juba ainuüksi siis, kui kahe vatitampooni meetodit kasutades analüüsiti vaid kuivale (ehk teisele) tampoonile kogutud rakulist materjali. Kui kasutada ainult ühte märga tampooni, siis võivad paljud rakud maha jääda ning kättesaadav DNA hulk on oluliselt väiksem. (Pang ja Cheung, 2007)

On läbi viidud ka uuringuid, mis on jõudnud järeldusele, et puuvilltampooni meetodite vahel ei ole olulist erinevust. Graham ja Rutty viisid läbi katse, kus imiteeriti kägistamisjärgsete proovide võtmist. Selleks koguti „kannatanu” nahalt „süüdlase” DNAd. Proove võeti kahe erineva puuvilltampooni meetodiga – ühe niisutatud puuvilltampooniga ning kahe puuvilltampooniga, millest esimene oli niisutatud ning teine kuiv. Katsest selgus, et mõlemad meetodid andsid võrdväärseid tulemusi. (Graham ja Rutty, 2008)

Viimastel aastatel on mitmed uurimistööd näidanud, et oma tiheda ehituse tõttu võib osa rakulisest materjalist puuvilltampooni sisemusse kinni jääda ning seda ei saa DNA eraldamise käigus kätte (Brownlow *et al.*, 2012; Daley *et al.*, 2006; Dalmaso *et al.*, 2008). Benschop *et al.* võrdlesid puuvilltampoone (Deltalab, Hispaania) nailontampoonidega (COPAN Diagnostics, USA) vägistamisjärgsete proovide võtmisel ning näitasid, et nailontampoonid annavad paremaid tulemusi, kuna vähem materjali (spermatooside) jääb analüüsi käigus tampooni kiudude vahele kinni (Benschop *et al.*, 2010).

Nailontampoone on testitud ka meditsiinis ning saadud väga häid tulemusi. Näiteks võrdlesid Daley *et al.* nailontampoone (COPAN Diagnostics, USA) ja kunstiidist (COPAN Diagnostics, USA)ampoone hingamisteedest proovide (epiteelirakkude) võtmisel. Katsest järeldus, et nailontampoon andis oluliselt paremaid tulemusi – sellega õnnestus koguda suurem hulk rakke. (Daley *et al.*, 2006)

George Washingtoni Ülikoolis viidi läbi katse, kus võrreldi puuvilltampoone *4N6FLOQSwabs* nailontampoonidega (COPAN Diagnostics, USA). Katse läbiviimiseks kasutati verest eraldatud lümfotsüüte, mis olid kantud klaasile, nahkrihmale, plastikule, metallile ja puutükile. Kõige paremad tulemused andis nailontampooni meetod, kuid seda

ainult juhul, kui DNA eraldamiseks kasutati *Prepfilers* meetodit. Klaasilt, nahkrihmalt, plastikult, metallilt ja puutükilt võetud proovide puhul kasutati DNA eraldamiseks ka *DNA IQ* meetodit. Sellisel juhul andsid mõlemad tampoonid sarnaseid tulemusi. Antud uuring näitas, et kättesaadava DNA hulk ei sõltu ainult proovivõtu vahendist, vaid ka DNA eraldamise meetodikast. (Santiago *et al.*, 2013)

Sarnasele järeltulele jõudsid ka Robert J. Brownlow *et al.*, kes võrdlesid puuvilltampoone nailontampoonidega (COPAN Diagnostics, USA). Katses kasutati võrdlevalt DNA eraldamiseks kolme erinevat DNA eralduse meetodit firmalt Qiagen (Lee *et al.*, 2010). Antud uuringus andis eelnevalt niisutatud nailontampoon puuvilltampooniga samaväärseid tulemusi. Kui nailontampoon jäeti aga niisutamata oli kättesaadava DNA kogus märkimisväärselt madalam, mistõttu ei olnud niisutamata nailontampooni soovitatav kasutada DNA analüüsiks proovide kogumisel (Chernesky *et al.*, 2006; Daley *et al.*, 2006; Kishore *et al.*, 2006). Lisaks sõltus kättesaadava DNA hulk sellest, millist DNA eralduse meetodikat kasutati. Qiageni automatiseeritud (*QIAcube* ja *BioRobot EZ1*) DNA eralduse puhul andis paremaid tulemusi puuvilltampoon, kuid manuaalse eralduse puhul nailontampoon. (Brownlow *et al.*, 2012)

Phetpeng *et al.* uurimisgrupp võrdles erinevaid proovivõtmise meetodeid isetehtud lõhkeseadeldistelt proovide võtmisel. Testitud meetodite hulgas olid ka puuvilltampoonid (Bode Technology, USA; Puritan Medical, USA; MTT Marketing, Tai; Thai Gauze, Tai) ja nailontampoon (Puritan Medical, USA). Selles katses andis nailontampoon kõige kehvemaid tulemusi. (Phetpeng *et al.*, 2015) Antud tulemused lähevad vastuollu mõningate eelnevalt publitseeritud uuringutega (Barkham, 2006; Benschop *et al.*, 2010; Brownlow *et al.*, 2012; Daley *et al.*, 2006), kuid samas on veel üksikuid uuringuid, mis on jõudnud sarnasele järeltulele (Hansson *et al.*, 2009; Verdon *et al.*, 2014b; Williams *et al.*, 2013). Arvatakse, et nailontampoonid annavad häid tulemusi, kui materjali on palju, kuid väheste rakkude korral on tulemused üsna kehvad (Williams *et al.*, 2013).

1.2. Teibimeetod

Kriminalistikas koguvad aina enam populaarsust teibimeetodid, mis on näidanud häid tulemusi mitmetes uuringutes (Bright ja Petricevic, 2004; Gunnarson *et al.*, 2010; Hansson *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2013).

Teibimeetodite puhul on kasutusel äärmiselt lai valik erinevaid kleeplinte, alustades kõige tavalisemast isoleerpaelast ja lõpetades spetsiaalselt kohtuekspertiisilaboritele välja töötatud vahenditega. Teibimeetodi puhul surutakse liimipind vastu objekti. Teipi võib mitu korda eemaldada ja uuesti pinnale kleepida (Gunnarson *et al.*, 2010), kuid peab jälgima, et see ei kaotaks oma kleepuvust. Kättesaadava DNA hulk sõltubki teibi kleepuvusest (kui palju liimi

ja millist liimi vastav teip sisaldab). On näidatud, et teibid, mis ei ole piisavalt kleepuvad, koguvad oluliselt vähem rakulist materjali ja seeläbi annavad väiksema DNA saagise. (Zech *et al.*, 2012) Liigne kleepuvus jällegi võib raskendada hilisemalt DNA eraldamist – rakud ei pruugi liimi küljest lahusesse vabaneda või liimi osakesed inhibeerivad DNA eraldust ja/või sellele järgnevaid analüüsi etappe.

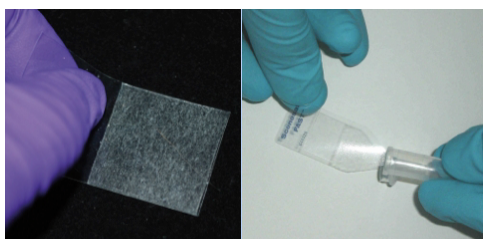
Proovi võtmisel on oluline jälgida, et proovivõtmise piirkond ei kujuneks liiga suureks. Vastasel juhul on suur oht saada bioloogilist materjali väga mitmelt erinevalt isikult, mis vähendab saadud DNA tõendi kaalu. (Gunnarson *et al.*, 2010)

Teibimeetodi eelisenä on osade allikate väitel välja toodud asjaolu, et teibimeetodi kasutamisel on inhibeerivate osakeste kaasatulemine oluliselt väiksem kui vatitampooni meetodi puhul (Gunnarson *et al.*, 2010; Hall ja Fairley, 2004). Lisaks on teibimeetodi plussiks proovivõtu mugavus. Samas võib võetud proovi edasine käsitlemine DNA eralduse käigus osutada mõnevõrra keerulisemaks võrreldes tampoonimeetoditega. Teibimeetodi miinusena on lisaks välja toodud asjaolu, et võttes proovi riidelt, saab teibiga kätte ainult pealmises kihis oleva materjali. Need osakesed, mis on riidekiudude vahel sügavamal, ei ole teibiga nii kergesti kättesaadavad. (Gunnarson *et al.*, 2010; Williamson, 2012)

Kriminalistikas on kasutatud bioloogilise materjali kogumiseks ka tavalist *ScotchMagic* kleeplinti ja *Post-It* kleebiseid (Williamson, 2012), kuid nendega kättesaadav DNA hulk ei ole kõige suurem. Alljärgnevalt vaatame lähemalt kahte kohtuekspertiisialaste DNA analüüside jaoks välja töötatud teipi: *DNA-stub* (Locis Forensics B.V., Holland) ja *Scenesafe FAST mini* teip (Scenesafe, UK).

1.2.1. *Scenesafe FAST mini* teip

Scenesafe FAST mini teip koosneb ruudu kujulisest liimiga kaetud kleepuvast alast, mille ühes otsas on mittekleepuv riba (joonis 3). Proovi võtmiseks eemaldatakse teibilt kaitsekile ning asetatakse potentsiaalselt rakke sisaldavale pinnale. Seejärel surutakse sõrmedega kergelt teibile, veendumaks, et teip on soovitud kohale kinnitunud. Teip eemaldatakse ja rakke sisaldav kleepuv teibi osa lõigatakse mittekleepuvast osast lahti ning asetatakse proovi tuubi. (Hall ja Fairley, 2004)



Joonis 3. *Scenesafe FAST mini* teip (Scenesafe – evidence recovery systems, 2016)

1.2.2. DNA-stub

DNA-stub on välja töötatud proovide võtmiseks igat tüüpi pindadelt – nii poorsed kui ka mittepoorsed pinnad. *DNA-stub* koosneb kokkusurutavast vahtplast otsast, mis on kinnitatud hoidikule vees lahustuva liimiga. *DNA-stub*il on kattekork, mis kaitseb teibi pinda kontaminatsiooni eest (joonis 4). Toode on eelnevalt etüleen oksiidiga töödeldud, mis tagab selle puhtuse ja sobivuse kohtuekspertiisialaste DNA analüüside jaoks. (Loci Forensics B.V. Newsletter, 2014)

DNA-stubi kasutamisel eemaldatakse kattekork ning vajutatakse teibi kleepuva otsaga uuritavale pinnale (seda korratakse mitu korda). Sündmuskohal töötades kaetakse teip vastava kattekorgiga. DNA labori tingimustes tilgutatakse teibile destilleeritud vett, et teipi otsiku küljest lahti saada või lõigatakse puhta skalpelliteraga teip otsiku küljest lahti ja pannakse proovituubi. (Loci Forensics B.V. Newsletter, 2014)



Joonis 4. *DNA-stub* teip (Loci Forensics B.V. Newsletter, 2014)

1.2.3. Teipide võrdlused

Teibimeetod on hea vahend riidelt rakulise materjali kogumiseks. Rootsis, Linköpingu kohtuekspertiisi laboris, viidi läbi uuring, kus võrreldi kolme erinevat teipi: *Scenesafe FAST Box* teip (Scenesafe, UK), *Touch* teip (Scenesafe, UK) ja *in-house* teip (ise kohandatud teip, mida labor mitmeid aastaid kasutas). Proovid koguti särkidelt, mida oli kandnud üks konkreetne doonor. Selgus, et ka *Scenesafe FAST Box* teip oli sobilik riidelt DNA analüüsiks rakulise materjali kogumisel, kuna andis samaväärseid tulemusi *in-house* teibiga. Kõige halvemaid tulemusi andis *Touch* teip. (Forsberg *et al.*, 2015)

Verdon *et al.* viisid läbi katse, kus võrdlesid *Scenesafe FAST mini* teipi (Scenesafe, UK) ja *ScotchMagic* teipi (3M, USA) kontaktjälgede kogumisel. Selgus, et *Scenesafe FAST mini* teip kleepus tugevamalt kanga külge ning võttis kaasa rohkem materjali kui *ScotchMagic* teip. Sellest tulenevalt andis *Scenesafe FAST mini* teip paremaid tulemusi ka genotüüpiseerimisel. (Verdon *et al.*, 2014a)

Barash *et al.* viisid läbi katse, kus võrreldi nelja erinevat teipi: 2"×2" *GripLifters* (Sirchie Fingerprint Laboratories, USA), *Handi-Lifts*, (Lightning Powder Brand Clear Tapes, USA), *Frosted Lifting* (Sirchie Fingerprint Laboratories, USA) teip ja 3-kihiline isekleepuv teip (Industrial Self Adhesives Limited, UK). Uuriti teipide kleepuvust ning kuidas liimi sisaldus mõjutab DNA analüüsi. Kaks esimest teipi (2"×2" *GripLifters* ja *Handi-Lifts*) sisaldasid liiga palju liimi, mis raskendas oluliselt proovide võtmist, sest teipi ei olnud võimalik proovivõtu materjali küljest eemaldada. *Frosted Lifting* teip moodustas DNA eraldamisel *Chelex* meetodika kasutamisel viskoosse massi, mis segas DNA eraldamist. Neist neljast teibist osutus ainsana kasutuskõlblikuks 3-kihiline teip, mis võimaldas probleemivabalt koguda bioloogilist materjali ja seda hiljem analüüsida. (Barash *et al.*, 2010)

1.3. Tampoonimeetodite ja teibimeetodite võrdlus

Aucklandi ülikoolis viidi läbi katse, mille käigus koguti kolme erineva meetodiga katsealuste naharakke jalanõu sisetaldadelt ja kätelt. Võrreldi *Scenesafe FAST mini* teibi (Scenesafe, UK), kahe puuvilltampooni ja väljalõike meetodeid. Eksperimendi käigus selgus, et kõige rohkem DNAd õnnestus koguda teibimeetodiga. Ilmsiks tuli ka asjaolu, et teibimeetodiga kogutud proovid sisaldasid kõige vähem PCR reaktsiooni inhibeerivaid ühendeid. (Bright ja Petricevic, 2004)

Oslo ülikoolis võrreldi *4N6 DNA* nailontampooni (COPAN Diagnostics, USA), *Self-Saturating* vahtplast otsaga tampooni (Puritan Medical, USA), *Dryswab* puuvilltampooni (Medical Wire & Equipment, UK) ja *Scenesafe FAST mini* teipi (Scenesafe, UK). Katsest järeldus, et teibiga kogutav materjali hulk oli oluliselt suurem (eriti imavate pindade puhul nagu tekstiil). Erinevad tampoonid andsid võrdväärseid tulemusi. (Hansson *et al.*, 2009)

Väga suurt rolli proovivõtmise meetodi valmisel mängib uuritav pind ja selle tekstuur. Williams *et al.* viisid läbi eksperimendi, kus nad uurisid kuut erinevat proovivõtu meetodit, et selgitada välja, milline neist annab parimad tulemused konarlike pindade puhul. Võrreldi ühte puuvilltampooni, kahte kahe puuvilltampooni, filterpaberi ja teibi (Invitrogen, USA) meetodeid. Katsest selgus, et parimaks meetodiks madala DNA sisaldusega proovi kogumisel reljeefselt pinnalt osutus teibi meetod. Teiste meetodite vahel ei olnud olulist erinevust kättesaadava DNA saagise osas. (Williams *et al.*, 2013)

Tampooni- ja teibimeetodeid on võrreldud ka sülje jälgede võtmisel kannatanu kehalt. Kenna *et al.*, viisid läbi katse, kus naise nahalt koguti mehe sülge sisaldavaid proove. Võrreldi ühe ja kahe puuvilltampooni meetodit teibimeetodiga. Katses kasutati puuvilltampoone ja kahepoolset 20 mm x 20 mm teipi (Sellotape, UK). Selgus, et kõige paremad tulemused andis teibimeetod. (Kenna *et al.*, 2010)

Mitmed uuringud on näidanud, et teibimeetod annab võrdväärseid tulemusi kahe puuvilltamponi meetodiga. Karla G. de Bruin *et al.* viisid läbi eksperimendi, kus koguti kannatanu nahalt kurjategija naharakke ja vastupidi. Võrreldi teibi- ja kahe puuvilltamponi meetodit. Selgus, et et nii kahe vatitamponi kui ka teibimeetod annavad võrdselt häid tulemusi. (de Bruin *et al.*, 2012)

1.4. Väljalõikemeetod

Väljalõikemeetodi puhul lõigatakse uuritavast materjalist puhaste kääride või ühekordse skalpelliteraga tükk. Väljalõikemeetod annab häid tulemusi, kuna uurimiseks võetakse kogu kangal olev bioloogiline materjal. Meetodi limiteerivaks faktoriks võib osutuda kanga suurus ning kangas võib sisaldada edasisi protsesse inhibeerivaid ühendeid. (Garrett *et al.*, 2014; Williamson, 2012) Lisaks osutub meetodi miinuseks asjaolu, et kõikidest materjalidest ei ole võimalik väljalõikeid teha – näiteks klaas- või plastikpinnad (Kobilinsky, 1992).

1.5. Kraapimismeetod

Kui uuritav objekt sisaldab suures koguses visuaalselt nähtavat kuivanud bioloogilist materjali (näiteks verd), siis kasutatakse ka kraapimismeetodit. Ennekõike kasutatakse seda pehmete poorsete pindade puhul. Uuritavat pinda kraabitakse žileti- või skalpelliteraga. Samal ajal hoitakse pinna all paberitükki, kuhu koguneb lahtitulnud materjal. Antud meetod ei ole kasutatav puutejälgede puhul. (Williamson, 2012) Kraapimismeetod on üks võimalik meetod proovide võtmiseks, mis ei ole väga laialdast kasutust leidnud.

1.6. Märg-vaakum (*M-Vac*) süsteem

M-Vac süsteemi puhul kasutatakse märg-vaakum tehnoloogiat, millega on võimalik koguda uuritavalt objektilt bioloogilist materjali. Enne proovi kogumist niisutatakse pinda spetsiaalse puhvriga. Seejärel kogutakse kokku (imetakse) rakuline materjal vastavale filterpaberile, mis lastakse kuivada. (Garrett *et al.*, 2014)

Märg-vaakum tehnoloogiat kasutatakse ennekõike poorsete pindade puhul. On näidatud, et see meetod võimaldab saada paremaid tulemusi võrreldes teiste proovivõtu meetoditega (tamponi-, teibi-, väljalõikemeetod ja kraapimine). (Xianhua, 2009) Garrett *et al.* viisid läbi katse, kus võrreldi märg-vaakum tehnoloogiat tamponi- ja teibimeetoditega. Katses võrreldi proovivõtu efektiivsust, kui bioloogilist materjali (veri ja sperma) kandvateks pindadeks olid teksariie ja vaipkate. Selgus, et märg-vaakum tehnoloogiaga on võimalik kätte saada oluliselt suurem hulk rakulist materjali kui teibi- või tamponimeetodit kasutades. (Garrett *et al.*, 2014)

M. J. Walder viis California ülikoolis läbi katse, kus võrreldi väljalõikemeetodit märg-vaakum süsteemiga. Eesmärgiks oli välja selgitada, millise meetodiga on kättesaadav DNA hulk kõige suurem. Väljalõikemeetodit kasutades saadi 1,5 ng DNAd, samal ajal kui märg-vaakum tehnoloogiaga kasutades õnnestus koguda 14 ng DNAd. Katsest järeldus, et märg-vaakum tehnoloogiaga oli võimalik koguda ~9 korda rohkem DNAd kui väljalõikemeetodit kasutades. (Wander, 2014)



Joonis 5. Märg-vaakum süsteemi põhimõte (M-Vac Systems, Inc., 2016)

1.7. Proovivõtu meetodite testimine

Hetkel puudub üldaktsepteeritud meetodika proovivõtu meetodite efektiivsuse hindamiseks. Seda põhjusel, et identse proovimaterjali saamine on väga keeruline. Seni kontaktjälgede osas publitseeritud tulemused lähtuvad eksperimentidest, mille aluseks on suure hulga puutejälgede tekitamine läbi isiku naha kontakti erinevate pindadega (Stanciu *et al.*, 2015; Thomasma ja Foran, 2013). Meetodi puuduseks on see, et erinevad inividivid võivad olla väga erinevad DNA doonorid (Bright ja Petricevic, 2004; Farmen *et al.*, 2008; Kiselevsky ja Wickenheiser, 1999; Lowe *et al.*, 2001; Lowe *et al.*, 2002; van Oorschott *et al.*, 1998). Lisaks võivad ühe ja sama doonori jäljed sisaldada erinevas koguses DNAd (Allen *et al.*, 2008; Phipps ja Petricevic, 2007).

Proovivõtu meetodite uurimisel on väga palju kasutatud ka vere- ja süljeproove (Brownlow *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2013). Antud juhtudel pole täpselt teada uuritavale pinnale jäetud rakkude arv. Täpset rakkude lugemist, näiteks verest või süljest, võimaldab FACS meetodika kasutamine. Kindla rakkude arvuga uuritava materjali genereerimine võimaldab usaldusväärset hinnata teoreetilist jäljes olevat DNA kogust. Seeläbi saab testida erinevaid proovivõtmise meetodeid, määrates proovi võtmise efektiivsust (saagist). Kirjeldatud lähenemine võimaldab luua mudelsüsteemi kontaktjälgede genereerimiseks ja nende edaspidiseks uurimiseks.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

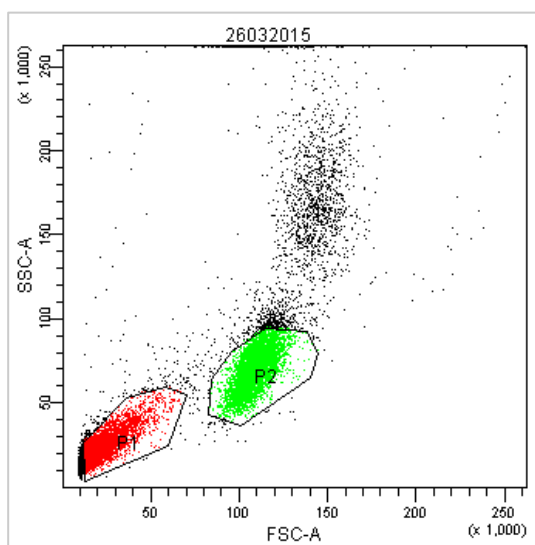
2.1. Töö eesmärgid

Kohtuekspertiisialaste DNA analüüside kõige esimeseks etapiks on DNA proovide võtmine. Proovide võtmiseks on kasutusel mitmeid erinevaid meetodeid ning sõltuvalt materjali tüübist, seisukorrast, kogusest ja uuritavast pinnast tuleb valida meetod, mis annab parima tulemuse. Hetkel pole ühtegi väga head meetodikat, mis võimaldaks hinnata proovivõtu meetodite efektiivsust (saagist). Sellest tulenevalt oli käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks töötada välja mudelsüsteem erinevate proovivõtu meetodite testimiseks ja uurida, milline on proovivõtu efektiivsus ja saagis kasutades kuut erinevat proovivõtu meetodit: ühe niisutatud puuvilltamponi, kahe puuvilltamponi (niisutatud ja kuiv), ühe niisutatud nailontamponi, *DNA-stub* teibi, *Scenesafe FAST mini* teibi ja väljalõikemeetodit (ainult riidest pinna puhul). Töö teiseks eesmärgiks oli võrrelda, kas mudelsüsteemis saadud tulemused langevad kokku reaalsete proovide (kontaktjälgede) võtmisel saadud tulemustega.

2.2. Materjal ja meetoodika

Katses kasutati doonor 1 veeniverd, millest eraldati perifeerse vere mononukleaarsed rakud (lümfotsüüdid ja monotsüüdid). Selleks kasutati hüdrofiilset polüsahhariide sisaldavat Ficolli lahust (1,077 g/ml; GE Healthcare, UK) ning gradient tsentrifuugimist. 15 ml tsentrifuugituubi pandi 3 ml Ficolli lahust. Täisveri lahjendati 1:1 Mg^{2+} ja Ca^{2+} vabas fosfaatpuhvrts (DPBS; ingl *Dulbecco's phosphate-buffered saline*; Applied Biosystems, USA). DPBS pidi olema eelnevalt soojendatud 37°C-ni. Tsentrifuugituubi (kuhu oli eelnevalt lisatud Ficolli lahust) lisati ettevaatlikult 3 ml lahjendatud vererakkude suspensiooni ning tsentrifuugiti 2000 pöört/min 30 minutit 20°C juures (Eppendorf 5810R, rootor A-4-81). Peale tsentrifuugimist tekkisid selgesti eristatavad fraktsioonid – kõige peale plasma fraktsioon, selle all perifeerse vere mononukleaarsete rakkude fraktsioon ning põhjas neutrofiilid, eosinofiilid ja erütrotsüüdid. Saadud tulemusest eraldati pipeteerimisega mononukleaarsete rakkude fraktsioon. Eraldatud leukotsüüte (~3 ml) suspendeeriti 11 ml DPBSis. Seejärel tsentrifuugiti 1200 pöört/min 5 minutit (Eppendorf 5810R, rootor A-4-81). Supernatant eemaldati ning rakkudest tehti lahjendus, milleks rakud suspendeeriti 0,5 ml-s Mg^{2+} ja Ca^{2+} vabas DPBSis. Rakkude suspensioonist sorditi FACSAria (BD) rakusorteri kasutades 50, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ja 16000 rakku 96 auguga PCR plaadile, 24 ning 12 auguga rakukultuuri plaatidele (joonis 7). Viimase puhul oli plaadi aukudesse eelnevalt asetatud puhas puuvillase riide tükk (eelnevalt pestud ja UV-kiiritatud kaks ööpäeva). Rakkude loendamiseks kuvas FACS erineva suurusega rakupopulatsiooni pilved. Antud

katses kasutati rakke, mis pärinesid rakupopulatsioonist P2 (joonis 6). Iga raku kogus sorditi igale substraadile ja iga proovivõtu meetodi jaoks kaheksas korduses. Sorditud rakkudel lasti kuivada toatemperatuuril kaks ööpäeva.



Joonis 6. FACSiga loendatud vererakkude populatsioonid P1 (punane) ja P2 (roheline). Antud uurimistöös kasutati mononuklearseid rakke populatsioonist P2, sest populatsioon P1 ei sisaldanud tuumaga rakke.

Lisaks kasutati katses doonor 2 ja doonor 3 poolt tekitatud kontaktjälgi. Kontaktjälgede tekitamise päeval ei olnud doonorid eelnevalt kandnud kummikindaid ega pesnud vähemalt kaks tundi enne jälgede tekitamist käsi. Kontaktjäljed tekitati puhtale Petri tassile (kuues korduses) ja puhtale puuvillasele riidele (eelnevalt pestud ja UV-kiiritatud kaks ööpäeva; kuues korduses). Jälje tekitamiseks suruti sõrm tugevasti vastu Petri tassi või puuvillast riiet ning hoiti ~3 sekundit. Kontaktjäljed tekitati kokku 12 erineval päeval järgnevate sõrmedega: parema ja vasaku käe põidla, nimetissõrme ja keskmise sõrmega.

2.2.1. Proovide võtmine

Proovivõtuks kasutati kuut erinevat meetodit. Nendeks olid proovide võtmine, kasutades ühte niisutatud puuvilltampooni (*Eurotubo*; Deltalab, Hispaania; Cat.# 300200), ühte niisutatud puuvilltampooni ja ühte kuiva puuvilltampooni (*Eurotubo*; Deltalab, Hispaania; Cat.# 300200), ühte niisutatud nailontampooni (*FLOQSwabs*; COPAN Diagnostics, USA; Cat.# 3509CS01), *DNA-stub* teipi (Locis Forensics by B.V., Holland; Cat.# 3005030), *Scenesafe FAST mini* teipi (Scenesafe, UK; Cat.# K544) ning riide puhul ka väljalõike tegemine. Võetud proove säilitati temperatuuril -15 kuni -25°C.

Tampooniga proovivõtmiseks niisutati steriilne vatitampoon/nailontampoon deioniseeritud vees. Seejärel pesti vatitampooniga/nailontampooniga puhtaks Petri tassil või puuvillasel riidel asunud potentsiaalselt rakke sisaldav pind. Vatitampooni ots, kus oli bioloogiline

materjal, lõigati ühekordse skalpelliteraga 1,5 ml reaktsioonituubi. Nailontampooni puhul murti tampooni pea 1,5 ml reaktsioonituubi. Kahe tampoonimeetodi puhul niisutati steriilne vatitampoon deioniseeritud vees. Niisutatud vatitampooniga pesti puhtaks Petri tassil või puuvillasel riidel asunud potentsiaalselt rakke sisaldav pind ning vatitampooni ots lõigati ühekordse skalpelliteraga 1,5 ml reaktsioonituubi. Seejärel võeti kuiv steriilne vatitampoon ning kuivatati eelnevalt niisutatud pind. Tampooni ots lõigati ühekordse skalpelliteraga 1,5 ml reaktsioonituubi (samasse tuubi kuhu eelnevalt oli lõigatud niisutatud tampooniga võetud proov). *DNA-stub* teibiga tupsutati potentsiaalselt rakke sisaldavat pinda. Seejärel eemaldati ühekordse skalpelliteraga *DNA-stubi* otsast teip. Teip pandi 1,5 ml reaktsioonituubi. *Scenesafe FAST mini* teibilt eemaldati kaitsekile ning teip asetati potentsiaalselt rakke sisaldavale pinnale. Vajutati kergelt sõrmedega teibile ning seejärel eemaldati. Potentsiaalselt rakke sisaldav teibi osa lõigati 1,5 ml reaktsioonituubi. Väljalõikemeetodi puhul lõigati puhaste kääridega riidest ~2 cm x 2 cm suurusega tükk, mis asetati 1,5 ml reaktsioonituubi.

2.2.2. DNA eraldamine

PCR plaadile sortitud rakkudest eraldati DNA, kasutades *Chelex* meetodikat. Rakukultuuri plaadile ja riidele sortitud rakkudest tampooniga võetud proovidest eraldati DNA *Chelex* meetodikat kasutades. Rakukultuuri plaadile sortitud rakkudest *DNA-stub* teibiga võetud proovidest eraldati DNA nii *Chelex* meetodil kui ka *Prepfiler BTA Forensic DNA extraction* puhastussüsteemi (Applied Biosystems, USA) kasutades. Riidele sortitud rakkude puhul, kus proovi võtmiseks kasutati väljalõike tegemist, kasutati DNA eraldamiseks nii *Chelex* meetodikat kui ka *Prepfiler BTA Forensic DNA extraction* puhastussüsteemi. Viimast kasutati põhjusel, et *Chelex* meetodika näitas osalist või täieliku reaalaja PCR (qPCR; ingl *real-time polymerase chain reaction*) reaktsiooni inhibitsiooni. Kontaktjälgedelt võetud proovidest eraldati DNA *Prepfiler BTA Forensic DNA extraction* puhastussüsteemi kasutades. (Lisa 1)

2.2.2.1. DNA eraldamine *Chelex* meetodiga

DNA eraldamiseks *Chelex* meetodikaga valmistati esmalt 20% ja 5% lahused ning proteinaas K lahuse lõppkontsentratsiooniga 20 mg/ml. *Chelexi* 20% lahuse valmistamiseks lisati 8 g *Chelex* (Bio-Rad Laboratories, USA) kerakestele 40 ml deioniseeritud vett ning segati kergelt. Pärast lahuse kaheminutilist seismist (*Chelex* kerakesed settisid põhja) eemaldati supernatant. Pesemist korrati veel kaks korda. Pestud *Chelexi* kerakestele lisati vett kuni 40 ml-ni. Lahust säilitati valguse eest kaitstult temperatuuril +2 kuni +8°C. *Chelexi* 5% lahuse valmistamiseks lisati 10 ml-le *Chelexi* 20% suspensioonile 30 ml deioniseeritud vett ja segati kergelt. Lahust säilitati valguse eest kaitstult temperatuuril +2 kuni +8°C. 5% *Chelexi* suspensiooni pH-d kontrollitakse kord nädalas enne töö alustamist. Selleks segatakse suspensiooni korralikult

ning lastakse *Chelexi* kerakestel settida. Seejärel pipeteeritakse 25 µl ilma kerakesteta lahust pH indikaatorribale. *Chelexi* 5% suspensiooni pH peab olema vahemikus 9–11. Enne pipeteerimist loksutatakse alati korralikult *Chelexi* suspensiooni anumad. Proteinaas K (lõppkontsentratsiooniga 20 mg/ml) valmistamiseks lahustati 1 g proteinaas K-d (Amresco Inc., USA) 50 ml-s deioniseeritud vees. Saadud lahus jagati 1 ml kaupa 1,5 ml reaktsioonituubidesse ja säilitati temperatuuril alla -18°C.

Chelex meetodikat kasutati DNA eraldamiseks nii PCR plaadil kui ka 1,5 ml-s reaktsioonituubides.

PCR plaati (kuhu olid sorditud rakud) tsentrifugeeriti 5 minutit 2000 pööret/min (Biosan tsentrifuug LMC-3000, rootor R-2). Ettevaatlikult eemaldati suur osa supernatandist, jättes alles ~30 µl. Proovidele lisati 190 µl *Chelexi* 5% suspensiooni (enne pipeteerimist lahust loksutati, et *Chelexi* suspensioon oleks võimalikult homogeenne) ja 1,5 µl proteinaas K (20 mg/ml) lahust. Seejärel segati proovid vorteksil ja inkubeeriti 56°C juures 60 minutit. Pärast seda segati proove vorteksil 5–10 sekundit ning inkubeeriti termotsükleris 100°C juures 8 minutit. Seejärel proovid tsentrifugeeriti 5 minutit 2000 pööret/min juures (Biosan tsentrifuug LMC-3000, rootor R-2). Plaati säilitati lühiajaliselt temperatuuril +2°C kuni +8°C ning pikemaajaliselt temperatuuril alla -18°C. Külmutatud proovide uuesti kasutamisel segati proove peale ülessulamist vorteksil 5–10 sekundit ja tsentrifugeeriti 5 minutit 2000 pööret/min juures (Biosan tsentrifuug LMC-3000, rootor R-2).

1,5 ml reaktsioonituubis olevale proovile lisati proovile 297,6 µl *Chelexi* 5% suspensiooni (enne pipeteerimist loksutati, et *Chelexi* suspensioon oleks võimalikult homogeenne) ja 2,4 µl proteinaas K (20 mg/ml) lahust. Proov segati vorteksil ja inkubeeriti termostaadis 56°C juures 60 minutit. Seejärel segati proove vorteksil 5–10 sekundit ning inkubeeriti termostaadis 100°C juures 8 minutit. Peale inkubeerimist proov tsentrifugeeriti 2 minutit toatemperatuuril 14000 pööret/min (Eppendorf 5424, rootor FA-45-24-11). Proovi säilitati lühiajaliselt temperatuuril +2°C kuni +8°C ning pikemaajaliselt temperatuuril alla -18°C. Külmutatud proovi uuesti kasutamisel tuli pärast proovi ülessulamist segada proovi vorteksil 5–10 sekundit ja tsentrifugeerida 3 minutit kiirusel 14000 pööret/min toatemperatuuril (Eppendorf 5424, rootor FA-45-24-11).

2.2.2.2. DNA eraldamine Prepfiler BTA Forensic DNA extraction puhastussüsteemiga

DNA eraldamine *Prepfiler BTA Forensic DNA extraction* puhastussüsteemiga (Applied Biosystems, USA) viidi läbi vastavalt tootja protokollidele. Väljalõigete ja tampooniga võetud proovide puhul kasutati kontaktjälgedest DNA eraldamise protokollid ning teibile võetud proovide puhul kasutati liimi sisaldavatest proovidest DNA eraldamise protokollid.

2.2.3. DNA kontsentratsiooni määramine

DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati kvantitatiivset reaalaja PCRi. Selleks kasutati *Quantifiler Human* testsüsteemi (Applied Biosystems, USA) ning järgiti tootja poolset protokollit. Reaalaja PCR reaktsioon viidi läbi lõppmahus 25 µl. Reaktsiooni komponendid on toodud tabelis 1 ja tsükleerimisrežiim tabelis 2. Amplifitseerimiseks kasutati 40 tsüklit.

Tabel 1. Reaalaja PCR segu komponendid

qPCR segu komponent		Kogus reaktsiooni kohta
Reaktsioonisegu	<i>Quantifiler PCR Reaction Mix</i>	12,5 µl
Praimerite segu	<i>Quantifiler Human Primer Mix</i>	10,5 µl
DNA	Standard või uuritav DNA proov	2 µl
Reaktsiooni lõppmaht		25 µl

Tabel 2. Reaalaja PCR tsükleerimisrežiim

Eelkuumutus	40 tsüklit	
	Denaturatsioon	Seondumine+süntees
95°C	94°C	60°C
10 min	15 sek	1 min

2.2.4. DNA-profiili määramine

DNA amplifitseeriti kasutades *AmpFlSTR® NGM PCR Amplification* testsüsteemi (Applied Biosystems, USA) vastavalt tootja protokollile. Antud testsüsteem amplifitseerib korraga 16 lookust: D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, Amelogenin, D16S539, D2S1338, D1S1656, D10S1248, FGA, D8S1179, vWA, D22S1045, D19S433, D12S391 ja D2S441. PCR reaktsioon viidi läbi lõppmahus 25 µl. Reaktsiooni komponendid on toodud tabelis 3 ja tsükleerimisrežiim tabelis 4. Amplifitseerimiseks kasutati 30 ja 32 tsüklit (Lisa 1).

Tabel 3. PCR segu komponendid

PCR segu komponent		Kogus reaktsiooni kohta
<i>Low-TE puhver</i> ^a		Lõppmahuni 25 µl
<i>Master Mix</i>	<i>AmpFlSTR[®] NGM[™] Master Mix</i>	10 µl
Praimerite segu	<i>AmpFlSTR[®] NGM[™] Primer Set</i>	5,0 µl
DNA	Uuritav DNA proov	Kuni 10 µl
Reaktsiooni lõppmaht		25 µl

^a madala EDTA sisaldusega TE-puhver (koostis 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8.0)

Tabel 4. PCR tsükleerimisrežiim

Eelkuumutus	30/32 tsükli		Sünteesi lõpetamine	Säilitamine
	Denaturatsioon	Seondumine+süntees		
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
11 min	20 sek	3 min	10 min	∞

Peale termotsükleri programmi lõppu säilitati proove pimedas +2°C kuni +8°C juures. Proovid analüüsiti esimesel võimalusel, kuid mitte hiljem kui kahe nädala möödumisel. Peale analüüsimist säilitati PCRi produkte pimedas -15°C kuni -25°C juures.

2.2.5. Kapillaarelektroforees

PCRil sünteesitud DNA fragmentide analüüsimiseks kasutati kapillaarelektroforeesi, mille käigus lahutatati erineva pikkusega DNA fragmentide segu ning määrati iga fragmendi pikkus. Amplifitseeritud DNA fragmendid märgistati PCRi käigus fluorestsentsmärgisega, mis võimaldas saadud tulemusi visualiseerida. Erinevate fluorestsentsmärgiste kasutamine võimaldas üheaegselt analüüsida sama pikkusega erinevaid DNA fragmente. Kapillaarelektroforeesi läbiviimisel kasutati geeni analüsaatorit AB 3130 (Applied Biosystems, USA). Proovi sisestamisel kasutati injektsiooni tingimusi 3 kV ja 10 sekundit.

2.2.6. Analüüs

Määratud DNA kontsentratsioonide alusel leiti DNA saagis, replikaatproovide keskmine DNA saagis (saagis_{AV}; Av; ingl *average*) ja standardhälve (SD(S); ingl *standard deviation*) ning proovivõtu efektiivsus iga meetodi kohta eraldi (ainult sorditud rakkude puhul). Proovivõtu efektiivsuse arvutus baseerus eeldusel, et üks diploidne rakk sisaldab $6,16 \times 10^{-3}$ ng DNAd (Kobilinsky *et al.*, 2005a). Selleks leiti proovivõtu efektiivsus iga proovi kohta, replikaatproovide keskmine ning standardhälve.

DNA-profiilide analüüsimiseks kasutati *GeneMapper*[®] *ID-X* programmi (versioon 1.4; Applied Biosystems, USA). Tulemuste analüüsimisel kasutati *AmpFlSTR*[®] *NGM* testsüsteemi laborisesel valideerimisel saadud analüüsi- ja saatepiikide läve väärtusi (valideerimisprotokoll, Sadam, 2015). Tulemuste analüüsimisel leiti DNA-profiilis ilmsiks tulnud alleelide protsent, replikaattulemuste keskmine protsent ja standardhälve ning ilmsiks tulnud alleelsete piikide totaalne kõrgus (TPH; ingl *total peak height*), replikaattulemuste keskmine alleelsete piikide totaalne kõrgus ja standardhälve. Alleelsete piikide kõrgust ehk signaali tugevust elektroferogrammil väljendatakse rfu-des (ingl *relative fluorescence unit*).

2.2.7. Metoodika sobivuse hindamine

Selleks, et välja selgitada, kas antud töös mudelsüsteemi tegemisel kasutatav metoodika on kasutatav, viidi läbi katse metoodika sobivuse hindamiseks. Katse käigus hinnati replikaattulemuste varieeruvust ja leiti määratud DNA kontsentratsiooni suhteline erinevus eeldatavast DNA kontsentratsioonist. Viimane baseerus eeldusel, et üks diploidne rakk sisaldab $6,16 \times 10^{-3}$ ng DNAd.

Metoodika sobivuse hindmiseks sortiti rakud 96 auguga PCR plaadile. Sortimisel kasutati järgmisi rakkude koguseid: 50, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ja 16000 raku (kaheksas korduses). Sortitud rakkudest eraldati DNA, kasutades *Chelex* metoodikat (punkt 2.2.2.1.). Seejärel määrati DNA lahuse kontsentratsioon kasutades *Quantifiler Human* testsüsteemi (punkt 2.2.3.). Tulemuste analüüsimisel leiti DNA saagis, replikaatproovide keskmine saagis ($saagis_{Av}$), standardhälve (SD(S)) ja variatsioonikoefitsient ($\%CV_{saagis}$; ingl *coefficient of variation*). Variatsioonikoefitsiendi leidmiseks kasutati alljärgnevat valemit:

$$\%CV_{saagis} = \frac{SD(S)_{saagis}}{saagis_{Av}} * 100\%$$

Variatsioonikoefitsient (%CV) näitab, kui suur on replikaatproovide tulemuste varieeruvus. Lisaks leiti määratud DNA kontsentratsiooni suhteline erinevus eeldatavast DNA kontsentratsioonist (%RD; ingl *relative difference*). Suhtelise erinevuse arvutamiseks kasutati valemit:

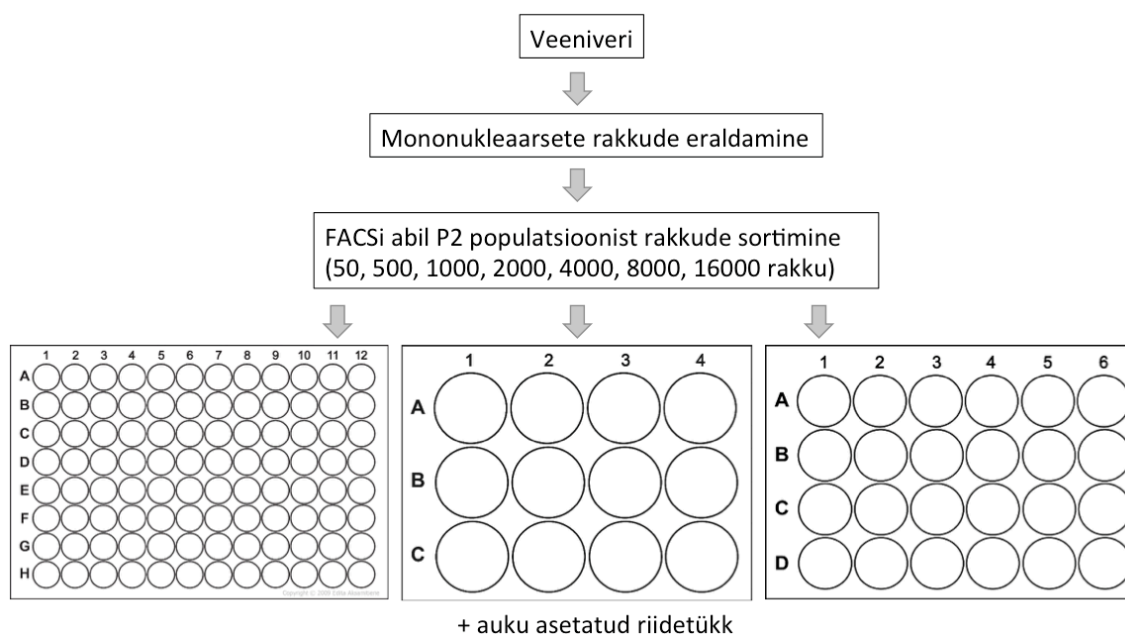
$$\%RD = \frac{Määratud - Eeldatav}{Eeldatav} \times 100\%$$

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Mudelsüsteemide kirjeldus

Uurimistöö eesmärgiks oli välja töötada mudelsüsteem proovivõtmise meetodite testimiseks ning uurida, milline on proovivõtu efektiivsus ja DNA saagis kasutades erinevaid proovivõtmise meetodeid. Selle uurimiseks loodi kaks mudelsüsteemi – tekitati loetud rakkude arvuga proovid plastikule ja puuvillasele riidele. Seejärel võeti uuritavast materjalist proovid, kasutades erinevaid proovivõtmise meetodeid.

Antud katsetes kasutati inimese täisverest eraldatud mononukleaarseid rakke, mis sortiti FACSi abil otse 96 auguga PCR plaadile ning 24 ja 12 auguga rakukultuuri plaadile (joonis 7). Viimase puhul oli plaadi aukudesse eelnevalt asetatud puhas puuvillase riide tükk. Töös kasutati järgmisi raku koguseid: 50, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ja 16000 rakku.



Joonis 7. Rakkude sortimine mudelsüsteemi tegemiseks. Esmalt eraldati veeniverest mononuklearsed rakud, mis lahjendati DPBS lahuses. Saadud suspensioonist (lümfootsüüdid ja monotsüüdid) loeti FACSi abil kindlaks määratud arv rakke (50, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 rakku) 96 auguga PCR plaadile, 12 auguga rakukultuuri plaadile, mille põhja oli asetatud riidetükk, ning 24 auguga rakukultuuri plaadile.

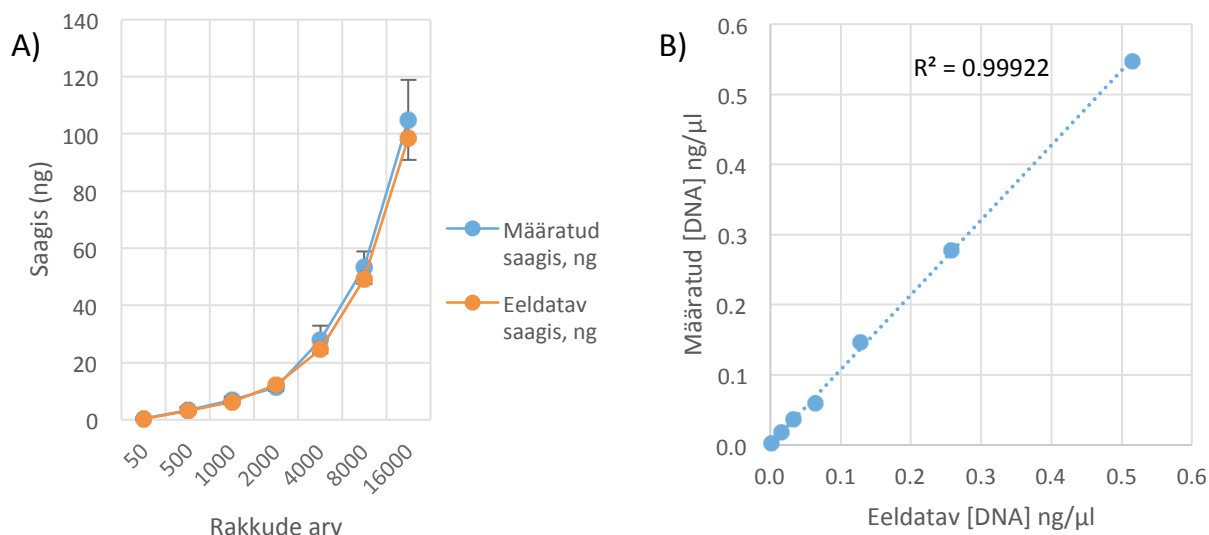
Lisaks uuriti kuidas töötavad mudelsüsteemis testitud meetodid n-ö „reaalse“ proovimaterjaliga. Selleks kasutati kohtuekspertiisialaste DNA analüüside puhul üht levinumat proovimaterjali – kontaktjalgi. Jäljed tekitati kahe erineva doonori poolt plastikule ja puuvillasele riidele ning võeti DNA analüüsiks proovid.

2.3.2. Mudelsüsteemi tegemisel kasutatud meetoodika sobivus

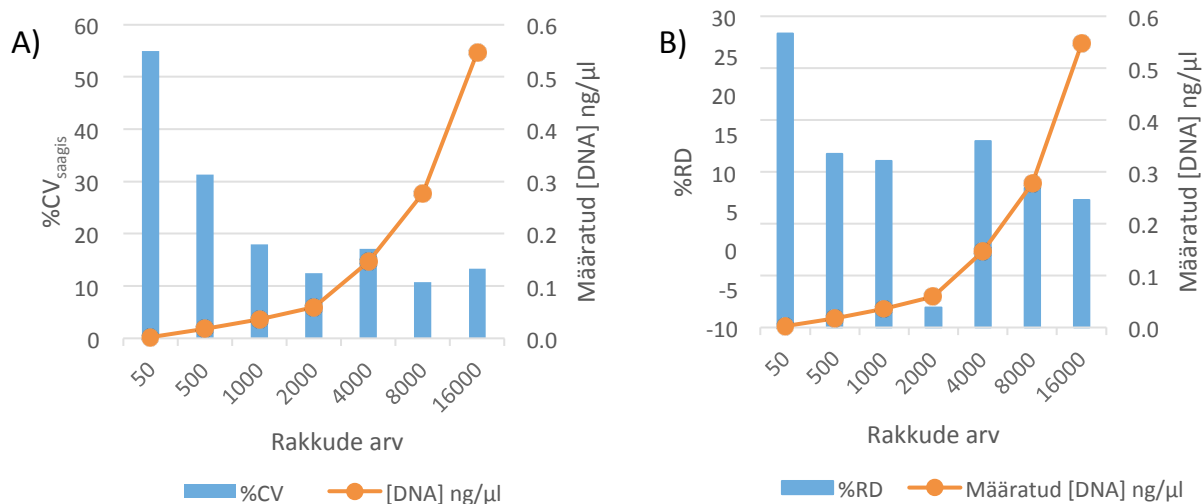
Mudelsüsteemi tegemisel kasutatud meetoodika sobivuse hindamiseks analüüsiti replikaattulemuste varieeruvust ja saadud DNA saagise suhtelist erinevust eeldatavast saagisest. Eeldatava saagise leidmisel võeti aluseks FACSiga loetud rakkude teoreetiline arv ja leiti selles sisalduv DNA kogus. Katse käigus analüüsiti FACSiga PCR plaadile loetud rakke, millest eraldati DNA *Chelex* meetoodikat kasutades. Antud meetoodika eeliseks on see, et DNA eraldamisel ei ole ühtegi etappi, kus võiks kaotada proovimaterjali. Seejärel määrati antud DNA lahuse kontsentratsioon, leiti DNA saagis, replikaattulemuste variatsioonikoefitsient ($\%CV_{\text{saagis}}$) ja DNA saagise suhteline erinevus eeldatavast saagisest ($\%RD$).

Saadud tulemused näitasid, et määratud ja eeldatava saagise (ja DNA kontsentratsiooni) vahel on tugev lineaarne seos (R^2 saadi 0,9992, mis näitab head sobivust regressioonisirgega; joonis 8B). Määratud DNA saagise suhteline erinevus eeldatavast saagisest jääb 500–16000 raku puhul vahemikku -7% kuni 14% (joonis 9B). 50 raku puhul ulatub määratud DNA saagise suhteline erinevus eeldatavast DNA saagisest 28%-ni. 50 raku puhul jääb saadud DNA kontsentratsioon allapoole DNA kontsentratsiooni määramise kasutatud meetoodika (*Quantifiler Human* testsüsteem) usaldusväärset tööpiirkonda, mis tähendab, et määratud kontsentratsioon ja saagis ei pruugi olla täpne. Sellele viitab ka replikaattulemuste variatsioonikoefitsient (joonis 9A), mis 50 raku puhul on 55%. Kui rakkude kogus suureneb, siis väheneb ka variatsioonikoefitsient. Saadud tulemused, kooskõlas laborisisese kvantiteerimise meetoodika valideerimise tulemustega, näitavad, et madala DNA sisalduse juures võibki kvantiteerimise meetoodikast tulenev varieeruvus olla suur ning kontsentratsiooni määramine ei ole täpne (valideerimisprotokoll, Sadam, 2015). Sellest tulenevalt otsustati kõikide proovide puhul, mille DNA kontsentratsioon oli madalam kui 0,05 ng/ μl , tulemuste tõepära kontrollida läbi genotüpiseerimise.

Seega on saadud saagiste erinevus eeldatavast saagisest seletatav peamiselt DNA kontsentratsiooni määramisel kasutatud meetoodikast tuleneva ebatäpsusega (500–16000 raku puhul maksimaalselt 14%; joonis 9B). Saadud tulemuste põhjal järeldati, et antud meetoodika sobib mudelsüsteemi tegemiseks.



Joonis 8. Määratud DNA saagis ja eeldatav DNA saagis FACSiga sortitud rakkudest. Eeldatav saagis näitab, kui palju DNAd on võimalik maksimaalslt kätte saada. Määratud saagis näitab, kui palju DNAd kätte saadi. Vasakpoolsel graafikul (A) on toodud määratud ja eeldatav saagis iga raku koguse kohta. Parempoolsel graafikul (B) on kujutatud eeldatava ja määratud DNA kontsentratsioonide vahelist seost.



Joonis 9. Replikaattulemuste variatsioonikoeffitsient (A) ja saadud DNA saagise suhteline erinevus eeldatavast saagisest (B) ning nende sõltuvus määratud DNA kontsentratsioonist ja rakkude arvust. Variatsiooni koeffitsient (%CV_{saagis}) näitab replikaattulemuste varieeruvust. %RD näitab määratud DNA saagise suhtelist erinevust eeldatavast DNA saagisest.

2.3.3. Proovivõtu efektiivsus ja DNA saagis mudelsüsteemis plastikpinnalt võetud proovide puhul

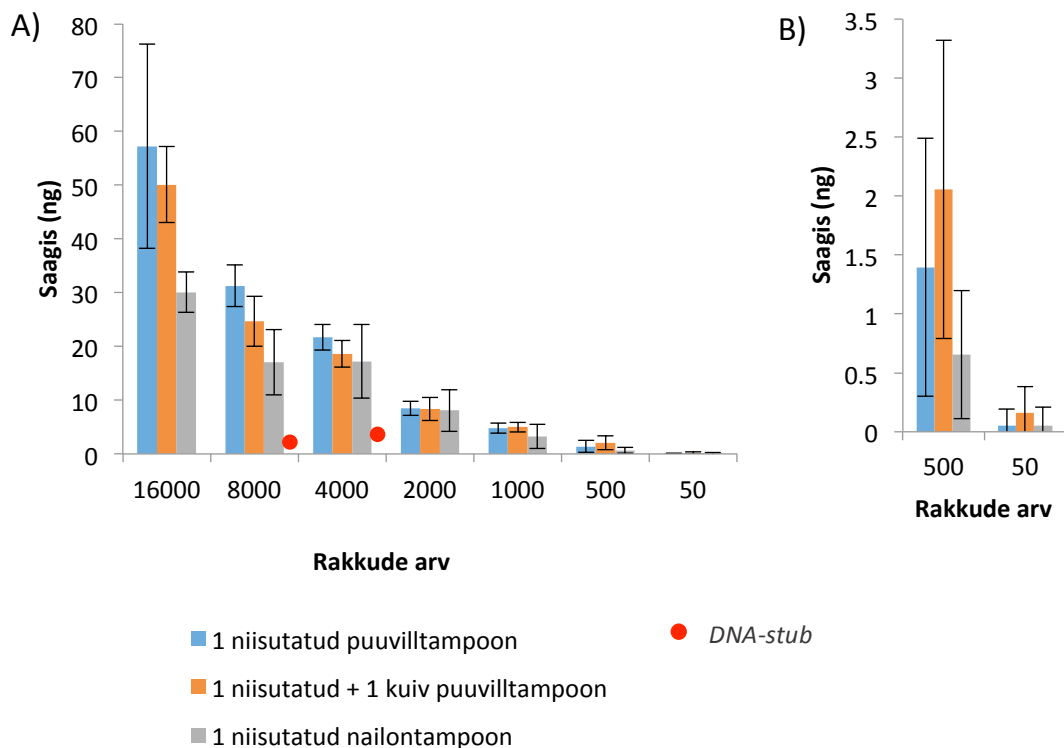
Proovivõtu efektiivsuse ja DNA saagise määramiseks võeti proovid plastikpinnale tekitatud proovidest (loetud rakkude arvuga) viit erinevat meetodit kasutades. Võetud proovidest eraldati DNA ning leiti DNA saagis (joonis 10) ja proovivõtu efektiivsus (joonis 11). Proovivõtu efektiivsuse arvutamisel lähtuti FACSiga loetud rakkude arvust substraadil (plastikul) ning leiti mitu protsenti maksimaalsest saagisest õnnestus kätte saada.

Plastikule loetud 16000 ja 8000 raku puhul andis kõige suurema keskmise DNA saagise ühe niisutatud puuvilltampooni meetod, järgnes kahe puuvilltampooni kasutamine (joonis 10A). 16000 ja 8000 raku puhul andis ühe niisutatud puuvilltampooni kasutamine keskmiseks proovivõtu efektiivsuseks ~60% ja kahe puuvilltampoonimeetod puhul 50% (joonis 11). Nailontampooni meetod andis 16000 ja 8000 raku puhul oluliselt väiksema DNA saagise ja madalama proovivõtu efektiivsuse (16000 raku korral 30% ja 8000 raku korral 35%). 4000–2000 raku puhul olid kõik tulemused üsna võrdväärised – keskmine proovivõtu efektiivsus jäi vahemikku 65–88%. 1000 raku korral andsid puuvilltampooni meetodid võrdväärse tulemuse (joonis 11). Võrreldes nailontampooniga oli keskmine saagis (joonis 10A) mõnevõrra suurem. Nailontampooni kasutamisel oli tulemuste kõikumine võrreldes teiste meetoditega oluliselt suurem.

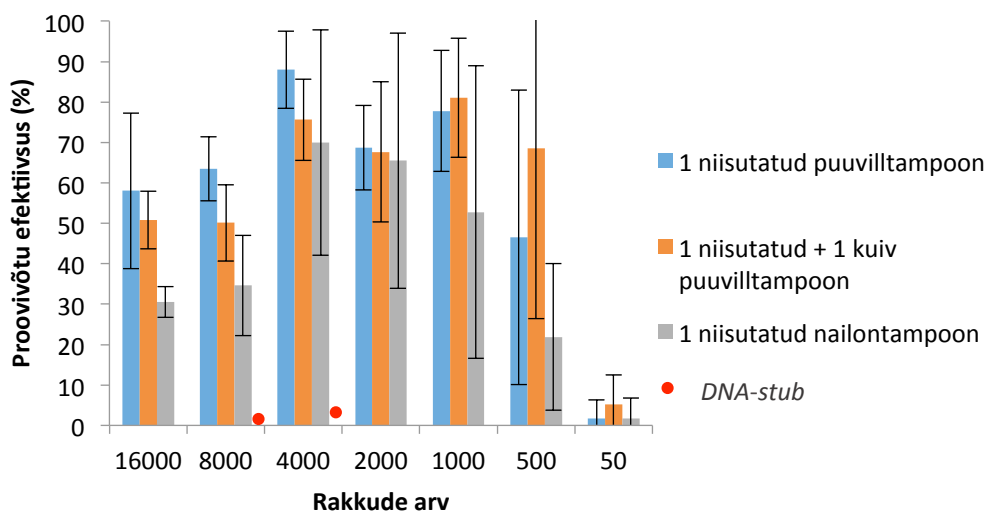
500 raku puhul andis kõige suurema keskmise DNA saagise (joonis 10B) ja proovivõtu efektiivsuse (joonis 11) kahe tampooni meetod, järgnes ühe puuvilltampooni meetod ning kõige väiksema keskmise saagise andis nailontampooni kasutamine. 50 raku puhul andis kõige suurema keskmise DNA saagise (joonis 10B) ja proovivõtu efektiivsuse (joonis 11) samuti kahe tampooni meetodi kasutamine ning järgnesid üsna võrdväärsetelt ühe puuvilltampooni ning ühe nailontampooni meetodid.

DNA-stubiga võeti esialgu proovid ainult 4000 ja 8000 rakust. *DNA-stubi* kasutamine andis äärmisel väikesed saagised (joonis 10A) tampoonimeetoditega võrreldes, mistõttu teipidega rohkem proove analüüsiks ei võetud (st ka *Scenesafe Fast mini* teipi ei proovitud). Väikse saagise põhjuseks võib olla asjaolu, et FACSiiga loetud rakud olid liiga tugevasti plastiku külge kuivanud. See omakorda tähendab, et antud meetodika – FACSiiga rakkude sortimine – ei ole kasutatav teibimeetodite testimiseks.

1000 raku korral, kui kasutati proovivõtmiseks nailontampooni, ning 500 ja 50 raku korral, kõikide proovivõtu meetodite puhul, saadi DNA kontsentratsiooni määramisel väärtused, mis jäävad allapoole DNA kontsentratsiooni määramisel kasutatud meetodika (*Quantifiler Human* testsüsteem) usaldusväärset tööpiirkonda. Seetõttu ei saa nende proovide puhul teha lõplikke järeldusi, baseerudes ainult DNA kontsentratsioonidele. Usaldusväärsete tulemuste saamiseks genotüüpiseeriti kõik proovid, mis olid võetud 50–2000 rakust (joonis 12).



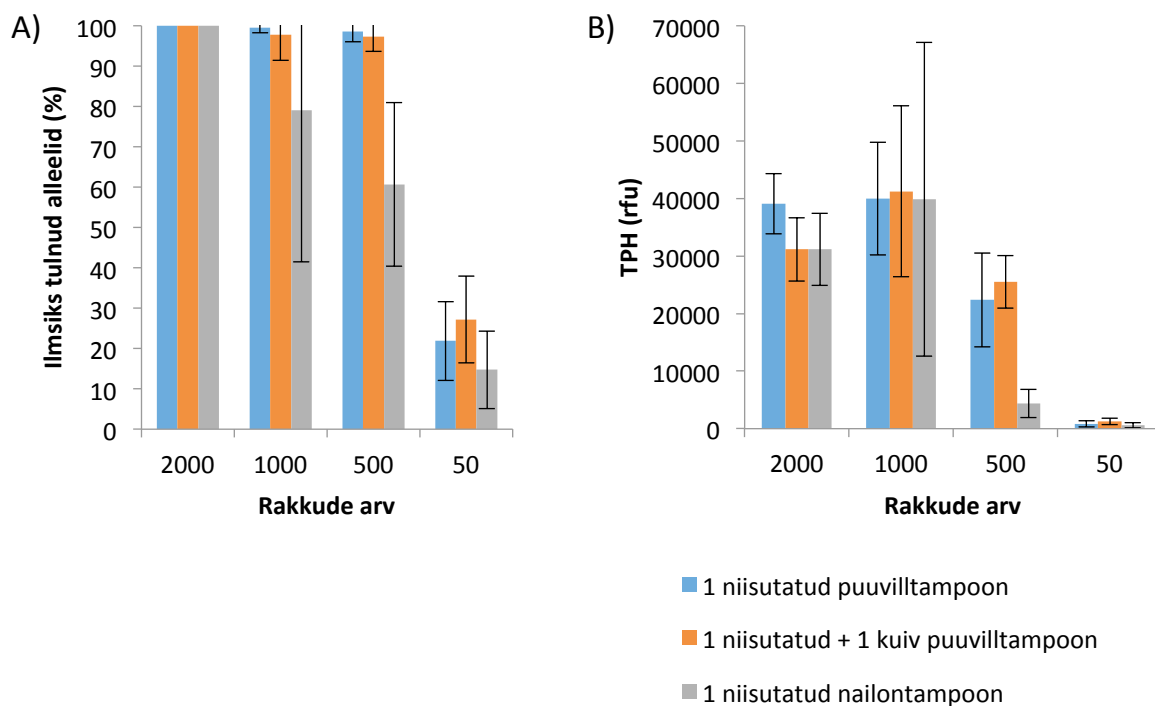
Joonis 10. DNA saagis mudelsüsteemis plastikpinnalt võetud proovidest. Joonisel A on toodud DNA saagis (ng) 50–16000 raku ning joonisel B 50–500 raku puhul, kui proovide võtmiseks kasutati ühte niisutatud puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni ja ühte niisutatud nailontampooni. *DNA-stubi* tehti katsed ainult 4000 ja 8000 rakuga (A).



Joonis 11. DNA proovivõtu efektiivsus (%) mudelsüsteemis plastikpinnalt võetud proovide puhul. Proovivõtu efektiivsus näitab, kui palju substraadil olnud bioloogilisest materjalist õnnestus DNA analüüsil kätte saada. Graafikul on välja toodud proovivõtu efektiivsus 50–16000 raku puhul, kui proovide võtmiseks kasutati ühte niisutatud puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni ja ühte niisutatud nailontampooni. *DNA-stubi* kasutati proovide võtmiseks vaid 4000 ja 8000 raku korral.

2000 raku korral andsid kõik proovivõtu meetodid täisprofili, st õnnestus amplifitseerida 100% alleelidest (joonis 12A). Kui vaadata saadud DNA-profiilide totaalset alleelsete piikide kõrgust (joonis 12B), siis ühe niisutatud puuvilltampooni kasutamine andis mõnevõrra kõrgemad alleelsed piigid (st antud proovi puhul õnnestus rohkem DNAd kätte saada). Kahe puuvilltampooni meetod ja nailontampooni meetod andsid võrdväärsed tulemused.

1000 raku korral õnnestus ühe puuvilltampooni meetodiga amplifitseerida keskmiselt 99,6% alleelidest ja kahe puuvilltampooni meetodiga keskmiselt 98% alleelidest. Teistest halvemad tulemused andis nailontampooni meetod, millega õnnestus amplifitseerida vaid 79% alleelidest (joonis 12A). Vaadates aga TPHd (joonis 12B), siis olid kõigi kolme meetodi keskmised totalsed piigi kõrgused üsna võrdväärsed. Nailontampooni kasutamine andis väga suure tulemuste varieeruvuse. Ühel juhul kaheksast ei õnnestunud nailontampooniga võetud proovist amplifitseerida mitte ühtegi alleeli.



Joonis 12. Ilmsiks tulnud alleelide protsent (A) ning alleelsete piikide totaalne kõrgus (B) mudelsüsteemis plastikpinnalt tampoonidega võetud proovide korral. Proovide võtmiseks kasutati ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni ja ühte nailontampooni. Ilmsiks tulnud alleelide protsent näitab, mitu protsenti doonoril esinevatest alleelidest õnnestus amplifitseerida. Alleelsete piikide totaalne kõrgus (TPH) näitab, kui tugeva signaali uuritavad proovid andsid (tugevam signaal viitab suuremale DNA kogusele PCR reaktsioonil).

500 raku korral andsid ühe puuvilltampooni ja kahe puuvilltampooni meetodid võrdväärsed tulemused (joonis 12). Nailontampooni kasutamine andis oluliselt madalama signaaliga tulemuse (joonis 12B) ning ilmsiks tulnud alleelide arv oli palju väiksem (joonis 12A).

50 raku korral õnnestus amplifitseerida keskmiselt 15–27% alleelidest – 27% kahe puuvilltamponi, 22% ühe puuvilltamponi ja 15% nailontamponi meetodit kasutades (joonis 12A). TPH graafikul (joonis 12B) esines sarnane muster, st meetod, mis andis kõige väiksema alleelsete piikide protsendi andis ka kõige madalamad alleelsed piigid (antud juhul oli selleks nailontamponi meetod).

Antud katse tulemusi kokku võttes võib järeldada, et kui rakulist materjali oli palju (4000–16000 rakku), siis andis kõige suurema DNA saagise ühe puuvilltamponi meetod (joonis 10A). Nailontamponi kasutamine andis kõige halvemad tulemused. Väiksemate rakukoguste korral (500 ja 50 rakku) pole võimalik täpset proovivõtu efektiivsust leida, kuna DNA kontsentratsiooni määramisel saadud tulemused jäid allapoole *Quantifiler Human* meetoodika usaldusväärset tööpiirkonda. Seetõttu määrati antud proovidest usaldusväärsete tulemuste saamiseks DNA-profiilid (joonis 12). Ilmnes, et ka siin andsid puuvilltamponi meetodid paremaid tulemusi kui nailontampon. Nailontamponi puhul oli tulemuste kõikuvus oluliselt suurem kui puuvilltamponide puhul. See võib olla tingitud nailontamponi üsnagi keerukast niisutamisest, mis omakorda mõjutab rakkude kogumist tamponile.

Saadud tulemused langevad kokku kirjanduses kirjeldatud üksikute uuringutega (Hansson *et al.*, 2009; Verdon *et al.*, 2014b; Williams *et al.*, 2013), kus nailontamponid andsid võrreldes puuvilltamponidega oluliselt kehvemaid tulemusi. Samuti langevad saadud tulemused kokku kirjanduses kirjeldatud uuringutega (Pang ja Cheung, 2007; Sweet *et al.*, 1997), kus vähesem materjali korral annab kahe puuvilltamponi meetod paremaid tulemusi kui ühe puuvilltamponi meetod. Kuid miks oli suure materjali koguse korral kahe puuvilltamponi meetodi puhul proovivõtu efektiivsus väiksem võrreldes ühe puuvilltamponi meetodiga? Üks võimalikke selgitusi võib seisneda selles, et kui rakulist materjali on väga palju, siis kahe tamponi kasutamisel jääb protsentuaalselt suurem osa rakke tamponi sisse „lõksu“ (Brownlow *et al.*, 2012; Daley *et al.*, 2006; Dalmaso *et al.*, 2008) ning neid ei ole võimalik DNA eraldamise käigus kätte saada.

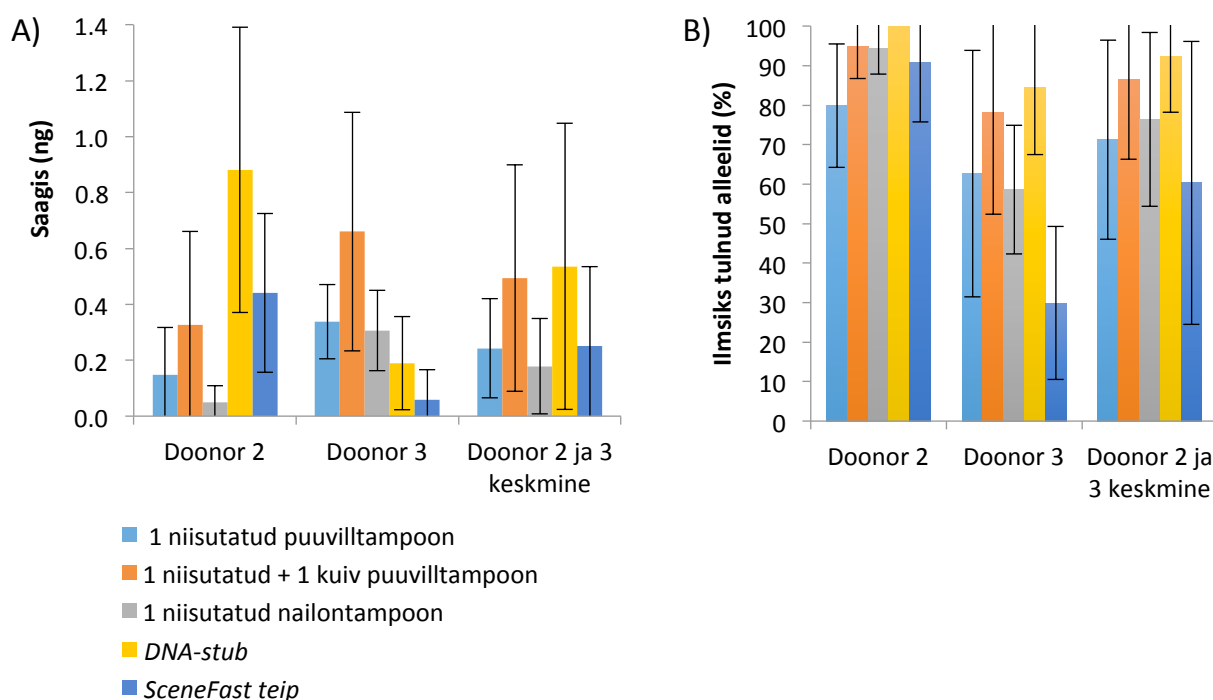
Katsete tulemusena selgus, et antud mudelsüsteem ei sobi teibimeetodite testimiseks, kuna FACSi sorditud rakud kuivavad liiga kõvasti substraadile kinni. Küll aga sobib testitud mudelsüsteem tamponimeetodite testimiseks.

2.3.5. DNA saagis ja DNA-profiil plastikpinnalt võetud kontaktjälgede puhul

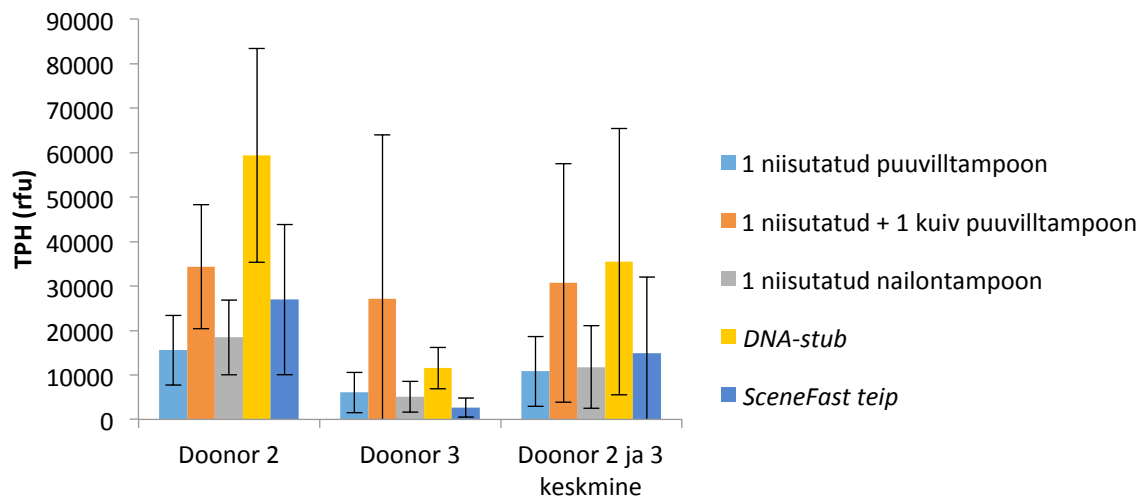
Selleks, et uurida, kas mudelsüsteemis testitud proovivõtu meetodid töötavad n-ö „reaalsete“ proovidega samamoodi, uuriti plastikule tehtud kontaktjälgi. Lisaks mudelsüsteemis testitud meetoditele, testiti siin ka *DNA-stub* ja *Scenesafe Fast mini* teipi. Plastikpinnalet tehtud

kontaktjälgede puhul andsid kõige suurema kahe doonori keskmise DNA saagise kahe puuvillvatitampooni meetod ja *DNA-stubi* kasutamine (joonis 13A). Kahe doonori keskmine saagis oli mõlema meetodi puhul ~0,5 ng. *DNA-stubi* puhul oli doonor 2 ja doonor 3 saagis väga erinev (vastavalt 0,9 ng ja 0,19 ng). Plastikpinnale tehtud kontaktjälgede võtmisel andis kõige väiksema kahe doonori keskmise saagise ühe nailontampooni meetod (0,18 ng DNAd). Kõikide proovide puhul jäi määratud DNA kontsentratsioon allapoole DNA kontsentratsiooni määramisel kasutatud metoodika usaldusväärsset piiri. Seetõttu kontrolliti saadud tulemuse tõepära läbi genotüüpiseerimise.

Kõige kõrgema kahe doonori keskmise ilmsiks tulnud alleelide protsendi andsid plastikpinnale tehtud kontaktjälgede puhul *DNA-stub* (92%) ja kahe puuvilltampooni (86%) meetod (joonis 13B). Doonor 2 puhul andis *DNA-stub* meetod täisprofiili kõigi kuue jälje korral. Kahe doonori keskmist vaadates andis ühe puuvilltampooni meetod keskmiselt 71% alleelidest ja nailontampooni meetod 76% alleelidest. Kõige nõrgemad tulemused andis *Scenesafe Fast mini* teip (60% alleelidest).



Joonis 13. Plastikpinnale tehtud kontaktjälgedest võetud proovide DNA saagised (A) ja ilmsiks tulnud alleelide protsent (B). Katses kasutati doonoreid 2 ja 3 ning proovide võtmiseks kasutati ühe puuvilltampooni, kahe puuvilltampooni, ühe nailontampooni ning kahe teibi (*DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip) meetodeid. Ilmsiks tulnud alleelide protsent näitab, mitu protsenti doonoril esinevatest alleelidest õnnestus amplifitseerida.



Joonis 14. Plastikpinnale tehtud kontaktjälgedest võetud proovide alleelsete piikide totaalsed kõrgused. Alleelsete piikide totaalne kõrgus (TPH) näitab, kui tugeva signaali uuritavad proovid andsid (tugevam signaal viitab suuremale DNA kogusele PCR reaktsioonis). Nii doonor 2 kui ka 3 puhul kasutati proovide võtmiseks ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni, ühte nailontampooni, *DNA-stubi* ja *Scenesafe FAST mini* teipi.

Kui vaadata saadud DNA-profiilide alleelsete piikide totaalset kõrgust (joonis 14), siis tulemused on üsna hästi kooskõlas ilmsiks tulnud alleelide protsendiga (joonis 13B) ning rõhutavad veelgi enam *DNA-stubi* ja kahe puuvilltampooni meetodi paremat tulemust, võrreldes ülejäänud testitud meetoditega.

Kontaktjälgedelt võetud proovidest tuleb selgelt välja, et erinevate doonorite puhul on mahajääv DNA kogus väga varieeruv. Kirjanduses on neid nimetatud „headeks” ja „halbadeks” DNA „jagajateks“ (Bright ja Petricevic, 2004; Farmen *et al.*, 2008; Kiselevsky ja Wickenheiser, 1999; Lowe *et al.*, 2001; Lowe *et al.*, 2002; van Oorschott *et al.*, 1998). Antud uurimistöös läbiviidud katsest selgub, et doonor 2 on „parem” DNA „jagaja” kui doonor 3, sest genotüüpiseerimisel saadi doonor 2 osas kõikide meetodite kasutamisel paremad tulemused – suurem ilmsiks tulnud alleelide protsent (joonis 13B) ja tugevama signaaliga alleelsed piigid (joonis 14).

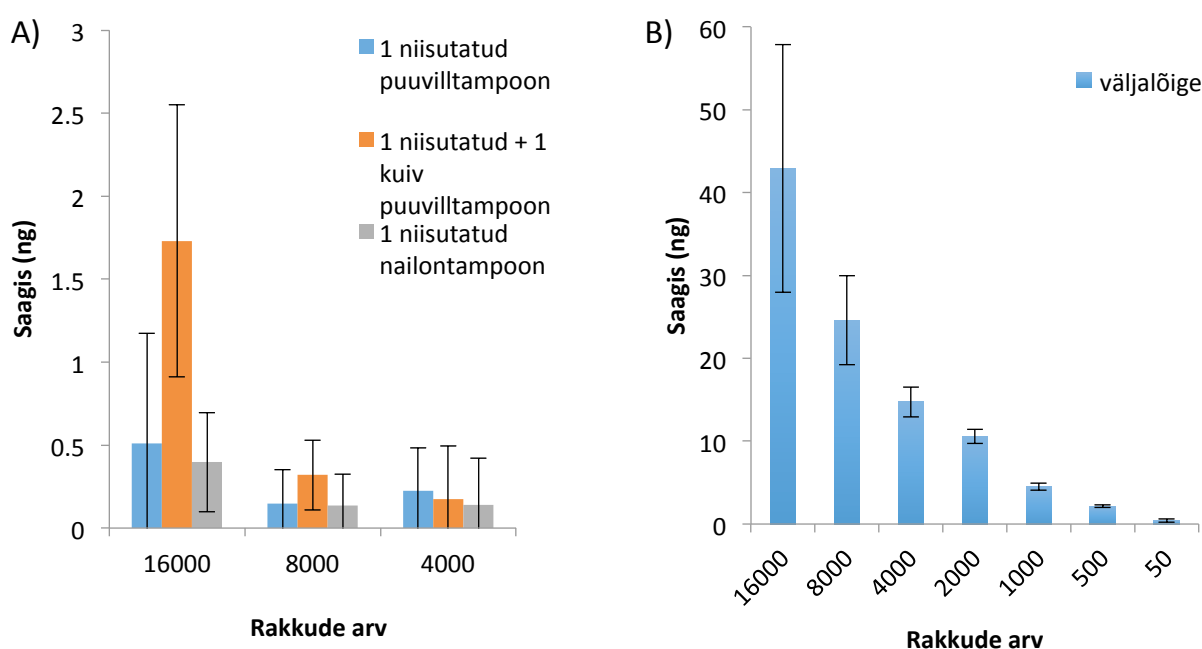
Plastikule loetud 50 raku osas andis ka kahe puuvilltampooni meetod keskmiselt mõnevõrra paremaid tulemusi kui nailontampoon ja üks puuvilltampoon, mis näitab, et tulemused on kooskõlas mudelsüsteemi tulemustega. Kahjuks ei ole antud töös loodud mudelsüsteem kasutatav teipide testimiseks, mistõttu ei ole *DNA-stubi* osas tulemused võrreldavad.

Antud katsetes andis *Scenesafe FAST mini* teip doonor 3 puhul natuke nõrgemad tulemused teiste proovivõtu meetoditega võrreldes. Kirjanduse põhjal on antud teip andnud häid tulemusi ja seda suuresti just tänu tugevamale liimile (võrreldes teiste teipidega), mis võimaldab koguda rohkem rakulist materjali (Forsberg *et al.*, 2015; Verdon *et al.*, 2014a; Zech *et al.*, 2012). Antud katses nõrgemate tulemuste põhjuseks võiski olla tugevam liim, mille

pinnalt materjali kättesaamine võis osutada keeruliseks või sisaldasid erineval ajahetkel ühe ja sama doonori poolt tekitatud jäljed väga erinevas koguses rakulist materjali. Statistiliselt oluliste järelduste tegemiseks tuleks kindlasti proovi doonorite arvu suurendada.

2.3.4. Proovivõtu efektiivsus ja DNA saagis mudelsüsteemis riidelt võetud proovide puhul

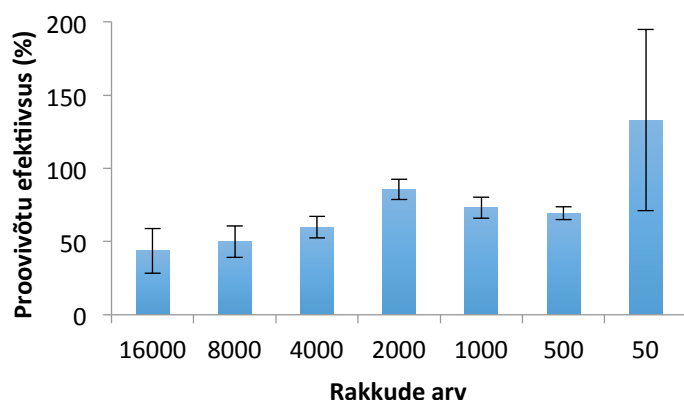
Proovivõtu meetodite efektiivsuse testimiseks loeti FACSi abil puuvillasele riidele kindel arv tuumaga rakke. Riidele sortitud rakkude puhul võeti tampooniga proovid ainult substraadilt, mis sisaldas 16000, 8000 ja 4000 rakku. 4000 raku puhul andis suur osa võetud proove DNA kontsentratsiooniks 0, mistõttu jäeti väiksemad rakukogused analüüsimata. Väljalõigete puhul analüüsiti kõik sortitud rakukogused.



Joonis 15. DNA saagised mudelsüsteemis riidelt tampooniga võetud proovidest (A) ja väljalõigetelt (B). Tampoonimeetodeid kasutati riidelt proovi võtmisel 4000–16000 raku puhul. Kasutati ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni ja ühte nailontampooni. Väljalõikeid tehti riidest, kuhu oli loendatud 50–16000 rakku.

Tampoonimeetoditega võetud proovide DNA saagised on toodud joonisel 15A. 16000 ja 8000 raku puhul andis kõige parema tulemuse kahe vatitampooni meetod, mille keskmine saagis oli vastavalt 1,7 ng ja 0,3 ng. Järgnesid üsna võrdväärselt ühe puuvilltampooni ja ühe nailontampooni meetodid. 4000 raku puhul olid kõik meetodid üsna võrdväärsed ning andsid keskmiseks saagiseks ~0,3 ng DNAd. Kõikidel juhtudel jäid saadud DNA kontsentratsioonid allapoole *Quantifiler Human* meetodika usaldusväärset tööpiirkonda, mistõttu ei pruugi olla nende proovide DNA kontsentratsioonid väga täpselt määratud. Seetõttu ei viidud läbi ka proovivõtmise efektiivsuse arvutusi. Usaldusväärsete tulemuste saamiseks määrati antud proovidest DNA-profiilid (joonis 17).

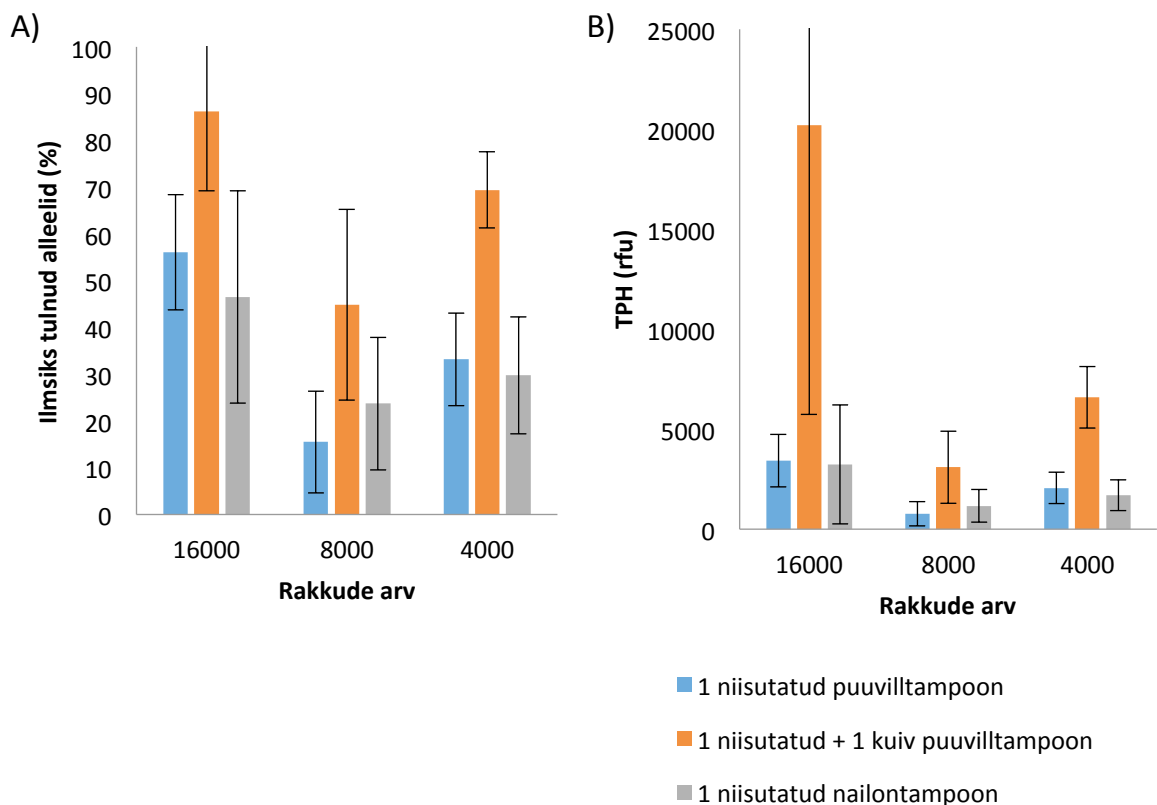
Väljalõike kasutamisel saadud DNA saagised (joonis 15B) saadi kordades suuremad, võrreldes tampooniga võetud proovidega (joonis 15A). Proovivõtu efektiivsus jäi väljalõikel (joonis 16) enamike rakukoguste puhul vahemikku 43–85,6%, v.a 50 raku puhul, kus proovivõtu saagis oli 133%. 50 raku puhul jäi mitmete proovide DNA kontsentratsioon allapoole DNA kontsentratsiooni määramisel kasutatud meetodika usaldusväärset piiri. Seetõttu kontrolliti saadud tulemuse tõepära läbi genotüpiseerimise (joonis 17).



Joonis 16. DNA proovivõtu efektiivsus (%) mudelsüsteemis väljalõike kasutamisel. Proovivõtu efektiivsus näitab, kui palju substraadil olnud bioloogilisest materjalist õnnestus DNA analüüsil kätte saada. Väljalõike tegemisel analüüsiti proovivõtu efektiivsust 50–16000 raku puhul.

Ilmsiks tulnud alleelide protsent (joonis 17A) ja alleelsete piikide kõrgus (joonis 17B) oli kõikidel rakukogustel suurim kahe puuvilltampooni meetodi puhul. Ühe puuvilltampooni ja nailontampooniga võetud proovid andsid võrdväärse kõrgusega alleelseid piike (joonis 17A) – kord õnnestus ühe meetodiga võetud proovide korral amplifitseerida paar alleeli rohkem kui teise meetodiga ja vastupidi.

500 rakust tehtud väljalõigetest saadud DNA proovide amplifitseerimine andis ootuspärase kõrguse (vastas määratud DNA kontsentratsioonile) ja alleelide protsendiga DNA-profiilid. 50 rakust tehtud väljalõiked andsid genotüpiseerimisel osalise DNA-profiili. PCR reaktsiooni lisatud DNA kogus oleks pidanud andma täisprofiilid, st 100% alleelidest ning tugevama signaaliga alleelsed piigid. Saadud tulemus viitab sellele, et DNA kontsentratsiooni määramisel saadud tulemused (ja sellest tulenevalt ka saagised) olid ülehinnatud ning pole kasutatavad järelduste tegemisel.



Joonis 17. Mudelsüsteemis tampoonidega riidelt võetud proovidest ilmsiks tulnud alleelide protsent (A) ning alleelsete piikide totaalne kõrgus (B) 4000–16000 raku puhul. Proovide võtmiseks kasutati ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni ja ühte nailontampooni. Ilmsiks tulnud alleelide protsent näitab, mitu protsenti doonoril esinevatest alleelidest õnnestus amplifitseerida. Alleelsete piikide totaalne kõrgus (TPH) näitab, kui tugeva signaali uuritavad proovid andsid (tugevam signaal viitab suuremale DNA kogusele PCR reaktsioonis).

Riidelt proovide võtmisel selgus, et väljalõikemeetod on teistest võrreldavatest meetoditest vaieldamatult parim ning andis mõnel juhul lausa 20 korda suurema DNA saagise (joonis 15). Antud tulemus on ootuspärane, kuna erinevalt tampoonimeetoditest analüüsitakse väljalõike tegemisel kogu substraadil olev materjal. Tampooni või teipi kasutades võib mingi osa materjali maha jääda. Töö tulemusena selgus, et osa materjali läheb analüüsi käigus kaduma ka väljalõike puhul – kätte saadi ainult 43–85,6% kogu materjalist (joonis 16). Proovide analüüsimisel plaaniti kasutada *Chelex* meetodikat, mis on sisuliselt ilma kadudeta DNA eraldamise meetodika. *Chelex* meetodika kasutamisel jäi proovidesse qPCR reaktsiooni inhibeerivaid ühendeid, mis segasid DNA kontsentratsiooni määramist. Seetõttu tuli valida teisel tehnoloogial baseeruv DNA eraldamise meetodika. Antud proovide puhul kasutati *Prepfilier BTA* puhastussüsteemi, mis baseerub magnetpartiklitel. Kõik magnetpartiklitel põhinevad puhastussüsteemid on seotud mingite kadudega ning see seletab ka antud töös väljalõigetest saadud tulemuste puhul materjali kadu. Lisaks jäi kindlasti mingi osa materjali

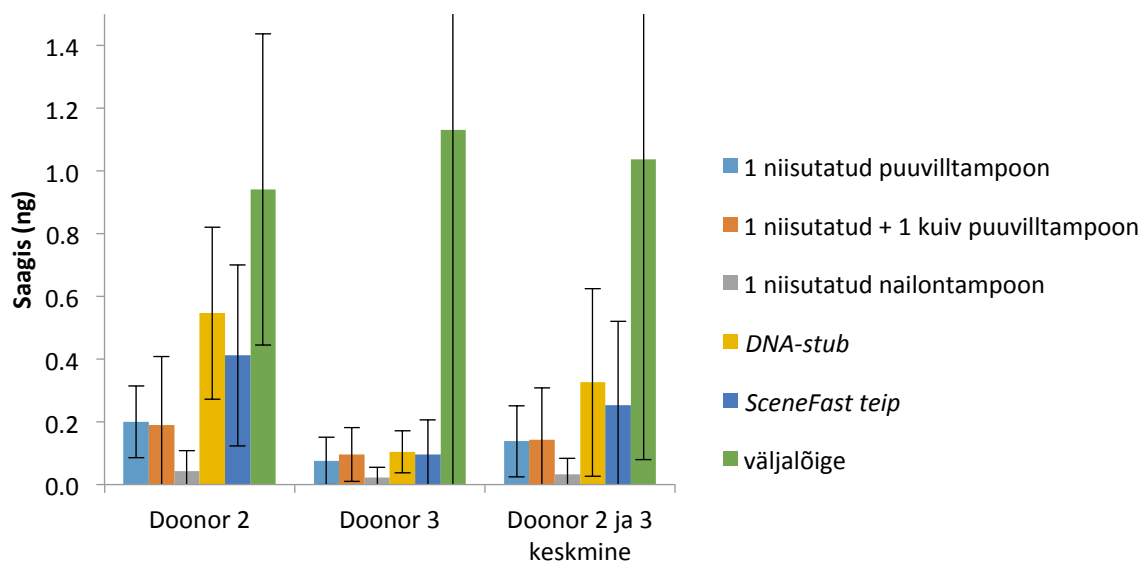
ka riidekiudude vahele. Kuna pole teada, kui suur osa läheb kaduma DNA eraldamise käigus, siis pole võimalik hinnata selle suurust. Antud katses saadi 4000 raku puhul mõnevõrra paremad tulemused kui 8000 raku puhul. See võib olla põhjustatud mitmest faktorist. Ühe võimaliku põhjusena võib välja tuua kangas olevad inhibiitorid, mis võisid mõjutada DNA seondumist magnetpartiklitele (Garrett *et al.*, 2014; Williamson, 2012). Teise võimaliku põhjusena võib välja tuua selle, et rakkude lugemisel sorditakse iga rakk PBSi tilgas. See tähendab, et 8000 raku puhul oli PBSi kogus suurem ning seetõttu võisid rakud kõvemini kanga külge kinni kuivada. Kõige enam rakulist materjali õnnestus koguda kahe puuvilltamponi meetodiga.

Kuna tampoonimeetoditega tehtud katsed näitasid, et FACSiiga loetud rakkude suspensioon oli liiga sügavale riidekiudude vahele läinud ja/või liiga tugevasti riide külge kinni kuivanud, siis sellest tulenevalt otsustati teibimeetodeid mitte testida. Kokkuvõtvalt võib järeldada, et antud mudelsüsteem ei ole sobilik proovivõtmise meetodite testimiseks. Küll aga võivad riidele loetud rakkudega väljalõiked leida rakendust näiteks DNA eraldamise meetodikate testimisel.

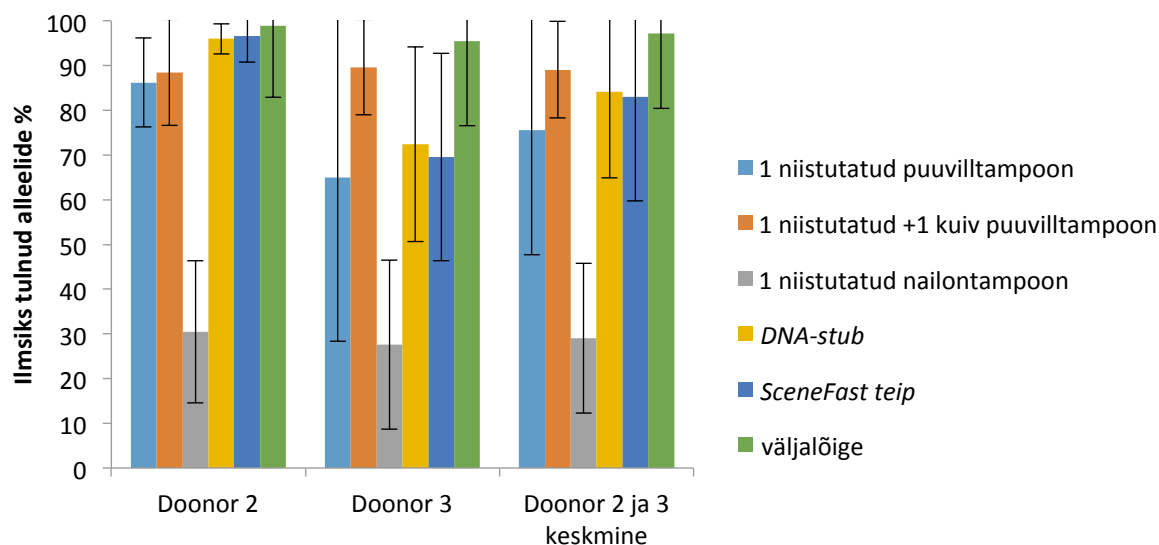
2.3.6. DNA saagis ja DNA-profiil riidelt võetud kontaktjälgede puhul

Selleks, et uurida kas mudelsüsteemis testitud proovivõtu meetodid töötavad n-ö „reaalsete“ proovidega samamoodi, uuriti riidele tehtud kontaktjälgi. Lisaks mudelsüsteemis testitud meetoditele testiti siin ka *DNA-stub* ja *Scenesafe Fast mini* teipi.

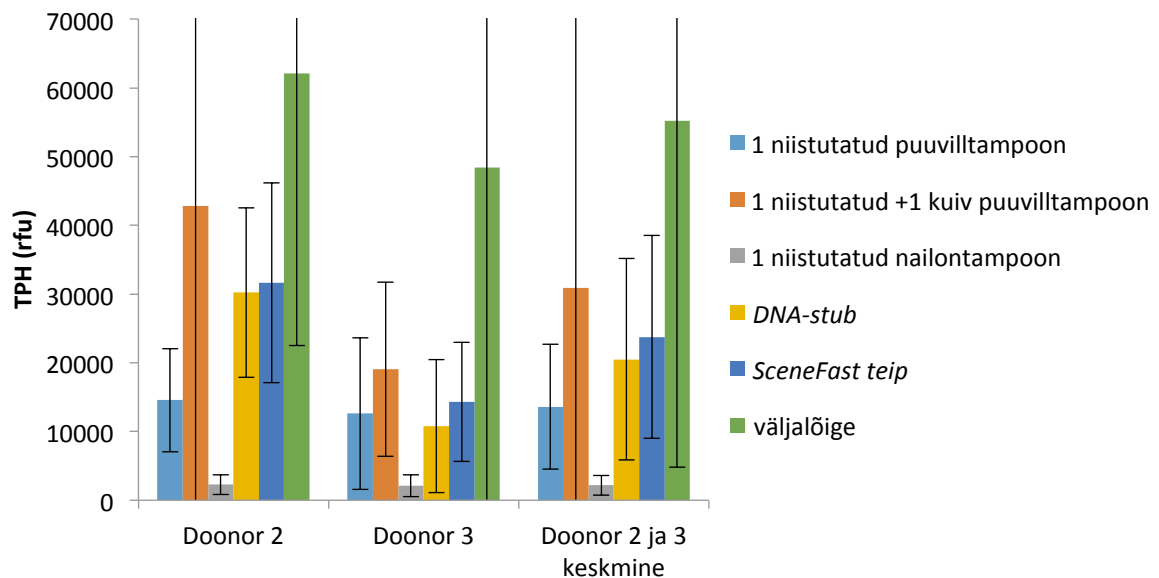
Riidele tehtud kontaktjälgede puhul andis kõige suurema saagise väljalõikemeetod, kuid sealjuures oli tulemuste varieeruvus äärmiselt suur (joonis 18). Selle meetodi puhul oli kahe doonori keskmine saagis ~1 ng DNAd. Järgnesid mõlemad teibimeetodid – *DNA-stub* andis kahe doonori keskmiseks saagiseks 0,3 ng ja *Scenesafe FAST mini* teip 0,26 ng DNAd. Kõige nõrgema tulemuse andis nailontamponi meetod, mille puhul oli kahe doonori keskmine saagis 0,03 ng. Ühe puuvillatamponi ja kahe puuvillatamponi meetodid andsid üsna võrdväärseid tulemusi (~0,15 ng DNAd). Antud katsest selgus, et teibimeetodid olid kahe doonori lõikes väga varieeruvad. Kui doonor 2 puhul andsid mõlemad teibimeetodid üsna häid tulemusi, siis doonor 3 puhul olid teibimeetodi tulemused puuvilltamponi meetoditega üsna sarnased. Võrreldes doonor 2-ga, on tulemused oluliselt nõrgemad. See väljendub ka ilmsiks tulnud alleelide arvus (joonis 19) ja alleelsete piikide totaalses kõrguses (joonis 20).



Joonis 18. Riidele tehtud kontaktjälgedest võetud proovide DNA saagised. Katses uuriti doonorite 2 ja 3 tekitatud kontaktjälgi. Proove võeti ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni, ühte nailontampooni, kahte teibi (*DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip) ning väljalõike meetodeid kasutades.



Joonis 19. Riidele tehtud kontaktjälgedest võetud proovidest ilmsiks tulnud alleelide protsent. Ilmsiks tulnud alleelide protsent näitab, mitu protsenti doonoril esinevatest alleelidest õnnestus amplifitseerida. Uuriti kahe doonori kontaktjälgede proove, mis olid riidelt võetud ühe puuvilltampooni, kahe puuvilltampooni, ühe nailontampooni, kahte teibi (*DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip) ja väljalõike meetodeid kasutades.



Joonis 20. Riidele tehtud kontaktjälgede proovidest ilmsiks tulnud alleelide totaalne piikide kõrgus. Alleelsete piikide totaalne kõrgus (TPH) näitab, kui tugeva signaali uuritavad proovid andsid (tugevam signaal viitab suuremale DNA kogusele PCR reaktsioonis). Kontaktjälgi tekitasid doonorid 2 ja 3 ning proovide võtmiseks kasutati ühte puuvilltampooni, kahte puuvilltampooni, ühte nailontampooni, *DNA-stubi*, *Scenesafe FAST mini* teipi ja väljalõiget.

Ilmsiks tulnud alleelide keskmine protsent (joonis 19) oli kõige kõrgem väljalõikemeetodi puhul, kus kahe doonori keskmiseks saadi 97% alleelidest. Kahe doonori keskmist arvestades järgnes kahe puuvillatampooni meetod 89%, seejärel *DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip vastavalt 84% ja 83% ning 1 niisutatud puuvillatampooni meetod ~75%. Nailontampooni meetod andis teiste meetoditega võrreldes tunduvalt nõrgemad tulemused, kus kahe doonori keskmiseks saadi vaid 29% alleelidest. Saadud kahe doonori keskmine DNA-profiilis esinevate alleelsete piikide totaalne kõrgus (joonis 20) on üsna hästi kooskõlas ilmsiks tulnud alleelide protsendiga (joonis 19).

Sarnaselt plastikule tehtud kontaktjälgedega, ilmneb ka selles katses, et doonor 2 on parem DNA „jagaja“ kui doonor 3. Riidele tehtud kontaktjälgede analüüsimisel ilmnas, et parimaks meetodiks osutus väljalõike tegemine. Häid tulemusi andis ka kahe puuvilltampooni meetod. Need meetodid osutusid parimaks ka mudelsüsteemis. Erinevalt plastikule tehtud kontaktjälgede katsest andis riide puhul *Scenesafe FAST mini* teip täiesti võrdväärseid (ja kohati isegi paremaid) tulemusi *DNA-stubiga*. Riidelt proovi võttes saadakse peamiselt kätte ainult pealmises kihis olev rakuline materjal. Riidekiudude vahel, sügavamal olevad osakesed ei ole teibiga nii kergesti kättesaadavad. (Gunnarson *et al.*, 2010; Williamson, 2012) Samas, mida tugevamalt kleepub teibil olev liim, seda enam ta riidelt rakke korjab. Seetõttu võib tugevama liimiga teip (nagu *Scenesafe FAST mini* teip) anda tekstiili puhul paremaid tulemusi (Zech *et al.*, 2012).

Teistest meetoditest oluliselt nõrgemad tulemused andis nailontampooni kasutamine. Väga mitmed kirjandusallikad on nailontampoone kiitnud (Barkham, 2006; Benschop *et al.*, 2010; Brownlow *et al.*, 2012; Daley *et al.*, 2006; Dalmaso *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2013). Esineb ka üksikuid publikatsioone, mis on jõudnud samale järeldusele antud uurimisööga – võrreldes puuvilltampoonide ja kahe testitud teibiga (*DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip), annavad nailontampoonid DNA analüüsiks proovide võtmisel kehvemaid tulemusi (Hansson *et al.*, 2009; Phetpeng *et al.*, 2015; Verdon *et al.*, 2014b; Williams *et al.*, 2013).

Kirjanduse allikatel on tehtud mitmeid katseid, kus on võrreldud teibimeetodit kahe puuvilltampooni meetodiga. On näidatud, et teibimeetod on kordades efektiivsem kui seda on puuvilltampoonide kasutamine. (Bright ja Petricevic, 2004; Hansson *et al.*, 2009; Kenna *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2013) Antud katses see kinnitust ei leidnud.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada mudelsüsteem proovivõtu meetodite testimiseks, loendades FACSi abil vere mononukleaarsete rakkude suspensioonist kindel arv rakke kahele erinevale substraadile – riidele ja plastikule. Materjalil lasti kuivada ning proovid võeti kolme erinevat tampoonimeetodit kasutades: ühte niisutatud puuvilltampooni, ühte niisutatud ja ühte kuiva puuvilltampooni ning ühte niisutatud nailontampooni. Lisaks võeti proovid, kasutades kahte erinevat teibi meetodit: *DNA-stubi* ja *Scenesafe Fast mini* teipi. Riide puhul kasutati lisaks veel väljalõikemeetodit. Võetud proovide puhul hinnati proovivõtmise efektiivsust ehk seda, kui palju bioloogilist materjali õnnestus proovivõtmise käigus kätte saada ning vaadati, milline testitud meetoditest annab kõige paremaid tulemusi. Lisaks uuriti kahe doonori poolt riidele ja plastikule tekitatud kontaktjälgi (võeti proovid, kasutades eelpool nimetatud meetodeid) ning võrreldi, kas saadud tulemused on kooskõlas mudelsüsteemi kasutamisel saadud tulemustega.

Mudelsüsteemis plastikule loetud rakkude puhul andsid kõige paremaid tulemusi puuvilltampoonid. Suurema rakkude arvu korral (4000–16000 rakku) andis ühe puuvilltampooni kasutamine mõnevõrra suurema DNA saagise, võrreldes kahe tampooniga. Proovivõtu efektiivsus oli sealjuures 8000–16000 raku puhul ühe puuvilltampooni kasutamisel ~60% ja kahe puuvilltampooni korral ~50%. 4000 raku puhul oli aga proovivõtu efektiivsus mõnevõrra suurem, olles ühe puuvilltampooni korral 88% ja kahe puuvilltampooni korral 76%. Väiksema rakkude arvu korral andsid nii ühe kui kahe tampooni meetodid suhteliselt võrdväärseid tulemusi. Oluliselt kehvemaid tulemusi andis nailontampooni kasutamine. Plastikult võeti proove ka *DNA-stub* teibiga, kuid saadud DNA saagised olid äärmiselt madalad. Üheks võimalikuks põhjuseks võis olla rakkude liiga tugev kinnikuivamine plastiku külge. See omakorda viitab asjaolule, et antud meetodika ei sobi teibimeetodite testimiseks ning sellest tulenevalt otsustati teipide testimine antud mudelsüsteemis ära jätta.

Plastikule tehtud kontaktjälgede puhul andis kõige paremaid tulemusi *DNA-stubi* ja kahe puuvilltampooni kasutamine. Ülejäänud testitud meetodid andsid mõnevõrra nõrgemaid, kuid omavahel suhteliselt võrdväärseid tulemusi. Kui mudelsüsteemis andis ühe puuvilltampooni kasutamine vähemalt võrdväärseid (osadel juhtudel ka paremaid) tulemusi kahe puuvilltampooni meetodiga võrreldes, siis selles katses andis kahe tampooni kasutamine oluliselt paremaid tulemusi. See võib viidata asjaolule, et kui rakulist materjali on vähe, siis annab kahe tampooni kasutamine teatud eelise.

Mudelsüsteemis riidele loetud rakkude puhul andis konkurentsilt parima tulemuse väljalõike tegemine. Vaatamata sellele, et DNA saagis tuli suhteliselt kõrge, oli proovivõtmise efektiivsus 44–86% (ei sisalda 50 raku tulemust). See näitab, et väga suur osa rakulist materjali jääb riidekiudude vahele kinni ega vabane DNA eraldamisel lüüsi lahusesse või läheb DNA eraldamise käigus kaduma. Tampooniga võetud proovide puhul saadi äärmiselt väiksed DNA saagised, mis viitab sellele, et FACSiga loetud rakkude suspensioon oli liiga tugevasti riide külge kuivanud või läinud liiga sügavale riidekiudude vahele. Sellest tulenevalt võib järeldada, et antud meetodika ei sobi riide puhul proovivõtu meetodite testimiseks. Riidele tehtud kontaktjälgede puhul andis kõige paremaid tulemusi väljalõike tegemine, mis on hästi kooskõlas mudelsüsteemi tulemustega. Järgnesid kahe puuvilltamponi meetod ning *DNA-stub* ja *Scenesafe FAST mini* teip. Kõige kehvemad tulemused saadi nailontamponi kasutamisel. Saadud tulemused on kooskõlas kirjanduses kirjeldatud väheste uuringutega, mis väitsid, et nailontamponid ei anna häid tulemusi võrreldes puuvilltamponide ja teipidega.

Kokkuvõtvalt võib järeldada, et töö käigus loodud mudelsüsteem plastikpinnal sobib tamponimeetodite testimiseks, kuid ei sobi teibimeetodite testimiseks. Mudelsüsteem riidel ei sobi üldse proovivõtmise meetodite testimiseks.

Efficiency of forensic DNA trace recovery methods

Kerstin Joandi

SUMMARY

DNA analysis is used to get information from biological material found from the crime scenes. In many cases the amount of DNA that is recoverable is often very small. Therefore, it is crucially important to use collection methods, which give the highest DNA yield. One of the most common trace recovery methods involves two cotton swabs. However, in recent years there have been marketed new collection tools, for instance, tape lifting and different swab types. Selecting an appropriate method for sample collection is essential to produce good quality DNA profile. Though, at this time there have not been developed an extensively accepted method, which shows the efficiency of forensic DNA trace recovery methods. It is excessively difficult to obtain samples that have identical number of cells. Additionally, the amount of DNA recovered from different individuals and even from the same person at different times varies. There have been experiments carried out, where blood, saliva and touch samples are being used. Nonetheless, in these cases the number of cells in the samples is unknown, which makes it difficult to evaluate the efficiency of the different sample collection methods. For this reason, a sample that contains a fixed number of cells needs to be generated by using FACS method. If the exact amount of DNA in the sample is confirmed, it could be used to test the efficiency of different forensic DNA trace recovery methods.

The aim of this research was to develop a model system for DNA recovery and find out, which collection method gives the highest DNA yield. For this, FACS was used to sort certain amount of cells from peripheral blood monocyte suspension to two different surfaces – plastic and fabric. The biological material was left to dry. After that, six different methods were used to collect the DNA from fabric and plastic. Those involved one wet cotton swab, two cotton swabs (wet + dry), one wet flocked swab, DNA-stub, Scenesafe FAST minitape and cutting (only for fabric) methods. To conclude, cotton swabs gave the best results from plastic. Although, the number of swabs which gave the best results differed through cell amounts. Namely, if the cell amount was smaller, double swab technique gave better results. However, with bigger cell amounts using only one cotton swab gave slightly better results. The most inefficient was the nylon flocked swab, which gave drastically lower results. Cutting was the best method among the fabric samples. Whereas, swabs and minitapes were not suitable for recovering DNA from fabrics, as the biological material was locked between the fabric fibres and was hard to collect.

To verify if the model system is usable at real crime scenes, two DNA donors deposited fingerprints to the same two different surfaces that were used in the model system. Following, those six previously mentioned collection methods were tested and the results were compared. DNA-stub and cotton swabs gave the best results from fingerprint samples that were collected from plastic. As for the fabric, the cutting method gave the highest DNA yield. Also, cotton swabs and tapelifting gave remarkable results. As it appeared from the model system, nylon flocked swabs were not useful for recovering DNA. As some of the previously published studies say, nylon flocked swabs are not efficient for recovering DNA if there is low amount of biological material.

Overall, the model system that was developed could be used for testing different swab types on plastic surfaces. Nevertheless, this method does not work on fabrics and therefore, different sample collecting methods on fabric surfaces could not be tested.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid geenitehnoloogia vanemteadur PhD Reet Kurge Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudist ja peaekspert Maarja Sadamat Eesti Kohtuekspertiisi Instituudi DNA-osakonnast, kes olid suureks abiks bakalaureusetöö valmimisel. Samuti tänan Eve Toomsood ja Anu Kõiveeri sõbraliku abi eest ning kõiki teisi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudist ja Eesti Kohtuekspertiisi Instituudist, kes aitasid kaasa töö valmimisele.

KASUTATUD KIRJANDUS

Allen R. W., Pogemiller J., Joslin J., Gulick M., Pritchard J. (2008). Identification through typing of DNA recovered from touch transfer evidence: Parameters affecting yield of recovered human DNA. *Journal of Forensic Identification*. 58(1): 33–41.

Barash M., Reshef A., Brauner, P. (2010). The Use of Adhesive Tape for Recovery of DNA from Crime Scene Items. *Journal of Forensic Sciences*. 55: 1058–1064.

Barkham T. (2006). BioRobot EZ1 workstation compares well with manual spin kits for extraction of viral RNA from sera and saves substantial staff time. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 1598.

Benschop C. C. G., Wiebosch D. C., Kloosterman A. D., Sijen T. (2009). Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Science International: Genetics*. 4(2): 115–121.

Bond J. W., Phil D. (2006). Value of DNA Evidence in Detecting Crime. *Journal of Forensic Sciences*. 52(1): 128–136.

Bright J.-A., Petricevic S. F. (2004). Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Science International*. 145(1): 7–12.

Brownlow R. J., Dagnall K. E., Ames C. E. (2012). A Comparison of DNA Collection and Retrieval from Two Swab Types (Cotton and Nylon Flocked Swab) when Processed Using Three QIAGEN Extraction Methods. *Journal of Forensic Sciences*. 57: 713–717.

de Bruin K. G., Verheij S. M., Veenhoven M., Sijen T. (2012). Comparison of stubbing and the double swab method for collecting offender epithelial material from a victim's skin. *Forensic Science International: Genetics*. 6(2): 219–223.

Butler J. M. 2011. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Sample Collection, Storage and Characterization*, p. 29–47. Academic Press, London.

Butler J. M. 2001. *Forensic DNA Typing: Biology & Technology behind STR Markers. Sample collection and preparation (DNA extraction and quantification)*, p. 25–38. Academic Press, London.

Castella V., Mangin P. (2008). DNA profiling success and relevance of 1739 contact stains from caseworks. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 1(1): 405–407.

- Chernesky M., Castriciano S., Jang D., Smieja M. (2006). Use of flocked swabs and a universal transport medium to enhance molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 1084–6.
- Daley P., Castriciano S., Chernesky M., Smieja M. (2006). Comparison of Flocked and Rayon Swabs for Collection of Respiratory Epithelial Cells from Uninfected Volunteers and Symptomatic Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(6): 2265–2267.
- Dalmaso G., Bini M., Paroni R., Ferrari M. (2008) Qualification of high-recovery, flocked swabs as compared to traditional rayon swabs for microbiological environmental monitoring of surfaces. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 62: 191–9.
- Farmen R. K., Jaghø R., Cortez P., Frøyland E. S. (2008). Assessment of individual shedder status and implication for secondary DNA transfer. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 1(1): 415–417.
- Forsberg C., Wallmark N., Hedell R., Jansson L., Ansell R., Hedman J. (2015). Reference material for comparison of different adhesive tapes for forensic DNA sampling. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 5: e454–e455.
- Garofano L., Linarello P., Salvaderi L. (2012) Forensic Devices for Maximizing Crime Scene Sample Procurement. 2012 AAFS Meeting, Atlanta, Georgia.
- Garrett A. D., Patlak D. J., Gunn L. E., Brodeur A. N., Grgicak C. M. (2014). Exploring the Potential Wet-Vacuum Collection System for DNA Recovery. *Journal of Forensic Identification*. 64(5): 429–448.
- Graham E. A. M., Rutty G. N. (2008). Investigation into "normal" background DNA on adult necks: Implications for DNA profiling of manual strangulation victims. *Journal of Forensic Sciences*. 53(5): 1074–1082.
- Gunnarson J., Eriksson H., Ansell R. (2010). Success rate of a forensic tape-lift method for DNA recovery. *Problems of Forensic Sciences*. 83: 243–254.
- Hall D., Fairley M. (2004). A single approach to the recovery of DNA and firearm discharge residue evidence. *Science & Justice*. 44(1): 15–19.
- Hansson O., Finnebraaten M., Heitmann I. K., Ramse M., Bouzga M. (2009). Trace DNA collection — Performance of minitape and three different swabs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2(1): 189–190.

- Kenna J., Smyth M., McKenna L., Dockery C., McDermott S. D. (2010). The Recovery and Persistence of Salivary DNA on Human Skin. *Journal of Forensic Sciences*. 55(1): 170–175.
- Kirk P. L. 1953. *Crime Investigation: Physical Evidence and the Police Laboratory*. Interscience Publishers Inc., New York.
- Kiselevsky A. E., Wickenheiser R. A. (1999). DNA PCR STR profiling of skin transferred through handling. *Journal of the Canadian Society for Forensic Science*. 32: 29.
- Kishore R., Reef H. W., Anderson V. J., Sanchez N. A., Buoncristiani M. R. (2006). Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *Journal of Forensic Sciences*. 51: 1055–61.
- Kobilinsky L. (1992). Recovery and Stability of DNA in Samples of Forensic Science Significance. *Journal of Forensic Sciences*. 4(1): 67–87.
- Kobilinsky L., Liotti T. F., Oeser-Sweat J. 2005a. DNA: Forensic and Legal Applications. *Biochemistry, Genetics, and Replication of DNA*, p. 1–24. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Kobilinsky L., Liotti T. F., Oeser-Sweat J. 2005b. DNA: Forensic and Legal Applications. *Biological Evidence – Science and Criminal Investigation*, p. 25–44. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Lanno Ü., Kaing H., Sadam M., Riikoja A., Rodi K., Randmäe H., Eskor L., Kristjankroon E., Kriiska-Maiväli K., Ivask I., Mei E., Juhe A., Rausberg P., Laanet S., Saarik V., Toomet M., Tõns K., Rebane H., Rodes L., Rump M., Rosin G., Olt O., Lindmäe H., Nõmm O. 2013. *Kriminalistikaekspertiisid. DNA Ekspertiis*, p. 55–124. Paar OÜ, Tallinn.
- Lee J. H., Park Y., Choi J. R., Lee E. K., Kim H. S. (2010) Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*. 51: 104–10.
- Lowe A., Murray C., Richardson P., Wivell R., Gill P., Tully G., Whitaker J. (2001, 28 August–1 September). Use of low copy number (LCN) DNA in forensic inference. in: *Proceedings of the 19th International Congress ISFG, International Society for Forensic Genetics, Munster*.
- Lowe A., Murray C., Whitaker J., Tully G., Gill P. (2002). The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Science International*. 129(1): 25–34.

van Oorschott R.A., Weston R.K., Jones M.K. (1998, 12–16 October). Retrieval of DNA from touched objects. in: Proceedings of the 14th International Symposium on the Forensic Sciences of the Australian and New Zealand Forensic Science Society (ANZFSS), Adelaide.

Pang B. C. M., Cheung B. K. K. (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal Medicine*. 9(4): 181–184.

Phetpeng S., Kitpipit T., Thanakiatkrai P. (2015). Systematic study for DNA recovery and profiling from common IED (*Improvised explosive device*) substrates: From laboratory to casework. *Forensic Science International: Genetics*. 17: 53–60.

Phipps M., Petricevic S. (2007). The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Science International*. 168(2–3): 162–168.

Sadam M. (2015). Metoodika “DNA tüpiseerimine testsüsteemi AmpFISTR® NGM™ abil“ valideerimise protokoll, DNA-MR-T20VP. Versioon 3.0. EKEI, DNA osakond, Tartu.

Santiago R., Caves G., Nelson M., Podini D. (2013). Cotton Swabs vs. 4N6FLOQSwabs™: A Comparative Study for Optimal Recovery of Simulated Touch DNA. 2013 AAFS Annual Meeting – Washington, D.C.

Squassina A., Poli A., Gervasoni A., Castriciano S., Paroni R., Triva D. (2011) Forensic Flocked Collection Devices to Maximize Crime Scene Sample Procurement. 2011 SFG Meeting, Vienna, Austria.

Stanciu C. E., Philpott M. K., Kwon Y. J., Bustamante E. E., Ehrhardt C. J. (2015). Optical characterization of epidermal cells and their relationship to DNA recovery from touch samples [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2015, 4:1360.

Sweet D., Lorente M., Lorente J. A., Valenzuela A., Villanueva E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Sciences*. 42(2): 320–322.

Thomasma S. M., Foran D. R. (2013). The Influence of Swabbing Solutions on DNA Recovery from Touch Samples. *Journal of Forensic Science*. 58: 465–469.

van Oorschot R. A. H., Ballantyne K. N., Mitchell R. J. (2010). Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*. 1(14).

Verdon T. J., Mitchell R. J., van Oorschot R. A. H. (2014a). Evaluation of tapelifting as a collection method for touch DNA. *Forensic Science International: Genetics*. 8(1): 179 – 186.

Verdon T. J., Mitchell R. J., van Oorschot, R. A. H. (2014b). Swabs as DNA Collection Devices for Sampling Different Biological Materials from Different Substrates. *Journal of Forensic Sciences*. 59: 1080–1089.

Wander M. J. (2014). An Investigation of Touch DNA Collection Methods from Clothing: Traditional Cutting Techniques Versus a Wet Vacuum System. University of California, Davis. 52 pages; 1565737.

Williams G., Pandre M., Ahmed W., Beasley E., Omelia E., World O., Yu H. (2013). Evaluation of Low Trace DNA Recovery Techniques from Ridged Surfaces. *Journal of Forensic Research*. 4(4).

Williamson A. L. (2012). Touch DNA: Forensic Collection and Application to Investigations. *ACSR Journal*. 18(1): 1–5.

Wyatt J., Squires T., Norfolk G., Payne-James J. 2011. *Oxford Handbook of Forensic Medicine*. Forensic Science, p. 495–555. Oxford University Press, Oxford.

Zech W.-D., Malik N., Thali, M. (2012). Applicability of DNA Analysis on Adhesive Tape in Forensic Casework. *Journal of Forensic Sciences*. 57: 1036–1041.

Xianhua J. (2009). One method of collecting fallen off epithelial cell. *Forensic Science International Genetics Supplement Series*. 2(1): 193.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

Forensic Science Regulator. Codes of Practice and Conduct. DNA analysis. (2014). The Forensic Science Regulator. Birmingham, UK. URL:

https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/355357/CodePracticeConductDNAanalysisIssue1.pdf (06.05.16)

Handbook of Forensic Services. (2013). An FBI Laboratory Publication Federal Bureau of Investigation. Quantico, Virginia, USA. URL:

<https://www.fbi.gov/about-us/lab/handbook-of-forensic-services-pdf> (04.05.16)

Loci Forensics B.V. Newsletter. (2014). Loci Forensics B.V. Amsderdam, Netherlands. URL:

<http://www.lociforensics.nl/images/Newsletter%20DNA-Stub%202014.pdf> (10.05.16)

M-Vac Systems, Inc. M-Vac Blog. USA. URL:

<https://mvacblog.com> (07.04.16)

Scenesafe – evidence recovery systems. UK. URL:

https://www.scenesafe.co.uk/index.php?route=product/product&product_id=63 (29.01.16)

https://www.scenesafe.co.uk/index.php?route=product/product&product_id=224 (29.01.16)

LISAD

LISA 1

Tabel 5. Töö käigus analüüsitud proovid, DNA eraldamise meetoodika ning amplifitseerimisel kasutatud tsüklite arv.

Bioloogiline materjal	Proovi võtmise meetood	DNA eraldamise meetoodika	PCR tsüklite arv
1. Rakud plastikul (FACS)			
50 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex</i>	32
500 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex</i>	32
1000 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex</i>	32
2000 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex</i>	30 ^a
4000 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon <i>DNA-stub</i>	<i>Chelex</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex/Prepfilier</i>	- ^b
8000 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon <i>DNA-stub</i>	<i>Chelex</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex/Prepfilier</i>	- ^b
16000 rakku	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex</i>	- ^b
2. Rakud riidel (FACS)			
50 rakku	väljalõige	<i>Chelex, Prepfilier</i>	32
500 rakku	väljalõige	<i>Chelex, Prepfilier</i>	32

1000 rakku	väljalõige	<i>Chelex, Prepfiler</i>	32
2000 rakku	väljalõige	<i>Chelex, Prepfiler</i>	32
4000 rakku	väljalõige 1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex, Prepfiler</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i>	32
8000 rakku	väljalõige 1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Chelex/Prepfiler</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i>	32
16000 rakku	väljalõige 1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon	<i>Prepfiler</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i> <i>Chelex</i>	32
3. Kontaktjäljed plastikpinnal			
kontaktjalg	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon <i>DNA-stub</i> <i>Scenesafe FAST mini teip</i>	<i>Prepfiler</i>	32
4. Kontaktjäljed riidel			
kontaktjalg	1 niisutatud puuvilltampoon 1 niisutatud + 1 kuiv puuvilltampoon 1 niisutatud nailontampoon <i>DNA-stub</i> <i>Scenesafe FAST mini teip</i> väljalõige	<i>Prepfiler</i>	32

^aproovide kontsentratsioon oli kõrgem ja seetõttu kasutati 30 PCR tsüklit

^bPCRi ei tehtud ja tulemuste analüüsimisel lähtuti DNA kontsentratsiooni määramisel saadud tulemustest

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kerstin Joandi

(sünnikuupäev: 05.08.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Proovivõtu efektiivsus ja DNA eralduse saagis kohtuekspertiisialaste DNA analüüside puhul”, mille juhendajad on Reet Kurg, PhD ja Maarja Sadam, MSc,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016