

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

SARAH BOURGOIN

PROTOCOLES RAPIDES POUR LA PRÉPARATION D'ADN À PARTIR  
D'ÉCHANTILLONS CARACTÉRISTIQUES DE LA BIOLOGIE JUDICIAIRE

DÉCEMBRE 2000

323/1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Tout au long de ce travail de maîtrise, des gens compétents et disponibles ont gravité autour de moi. Je tiens à les remercier tous : Christine, Diane, Dominique, France G., Francine, François, Jacinthe, Liza, Léo, Jean, Jean-Guy, Michel, Normand, Pauline, Raymond, Sylvie, Sylvain, Vahé, ainsi que les gens faisant partie des autres départements du LSJML, une grande partie de ce mémoire a été réalisée grâce à vous.

Je tiens aussi à remercier le Laboratoire de Sciences Judiciaires et de Médecine Légale et son directeur M. Yves Ste-Marie de même que le gestionnaire de la section biologie/ADN M. Pierre Marchand d'avoir rendu possible l'encadrement d'un étudiant de maîtrise au laboratoire.

Des remerciements spéciaux vont à mon directeur de recherche le Dr Christian Linard qui a non seulement été là dans les moments les plus difficiles et qui en plus a su me faire aller à de merveilleux congrès (le soleil de l'Arizona a particulièrement été apprécié...). Et à une personne bien précieuse dont l'encadrement a été des plus apprécié; Dre France Mailly. Merci France pour m'avoir partagé ton souci de la perfection, l'amour du travail bien fait...

Je désirerais dédier ce mémoire à ma famille et à Jean-François qui m'ont toujours poussée à croire en moi. La réalisation de ce travail me fait vous dire une fois de plus ‘bien oui je suis capable’. Merci à vous d'être mes amis très chers.

## RÉSUMÉ

L'analyse de contenu des 'short tandem repeats' (STRs) par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est maintenant fréquemment utilisée dans le milieu judiciaire. Avec cette technologie, il est possible d'obtenir des profils discriminants à partir de quantités minimes d'ADN par l'amplification simultanée de plusieurs sites STR (PCR multiplex).

Lors des présents travaux, des protocoles d'extraction rapide de l'ADN s'appliquant à différents échantillons caractéristiques de la biologie judiciaire a été élaboré. La méthode suggérée a l'avantage de s'effectuer dans un seul tube, minimisant ainsi les manipulations et par conséquent les risques d'erreurs. De plus, contrairement au protocole d'extraction organique, la méthode d'extraction rapide n'utilise pas de solvants comme le phénol et le chloroforme. Il s'agissait ensuite de démontrer que l'ADN résultant du protocole proposé était de qualité suffisante pour obtenir un produit d'amplification marqué par la fluorescence et détectable par un appareil ABD Genescanner 377.

L'ADN a été préparé à partir de taches de sang et de sperme sur différents substrats rencontrés dans le milieu judiciaire (cuir, bois, denim, etc.), de lavages vaginaux provenant de trousses médico-légales, de mégots de cigarette et de rabats d'enveloppe. Les échantillons ont été incubés dans une solution tampon à laquelle était ajouté divers réactifs (protéinase K, dithiothréitol, détergents non-ionique, sodium dodecyl sulfate et hydroxyde de sodium). La quantité et la qualité de l'ADN obtenu ont été comparés aux résultats obtenus avec la méthode classique d'extraction utilisant des composés organiques.

Pour tous les types d'échantillons, la préparation rapide s'effectue en une à trois heure(s) et produit des rendements généralement comparables ou supérieurs à la méthode de préparation organique. Les cellules sanguines ont été traitées à la protéinase K seulement, alors que du dithiothréitol et de l'hydroxyde de sodium ont été ajoutés au tampon pour les

spermatozoïdes. Pour leur part, les cellules épithéliales nécessitait du SDS et de la protéinase K.

Après l'amplification des solutions d'ADN, l'analyse de l'intensité de fluorescence des différents fragments montre une limite de sensibilité similaire à l'ADN préparé par le protocole standard. Par contre, pour certains échantillons, des modifications doivent être apportés aux étapes d'extraction ou aux conditions d'amplification pour obtenir des résultats satisfaisants. Malgré ces quelques ajustements, nos protocoles simplifiés demeurent plus rapides, nécessitent moins de manipulations et sont moins coûteux que l'extraction organique.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RESUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE UN. INTRODUCTION	1
1.1. L'identification d'un individu: des empreintes digitales aux profils génétiques	1
1.2. Les fondements de l'analyse par l'ADN	3
1.2.1. Structure et fonctions de l'ADN	4
1.2.2. Réplication de l'ADN	6
1.2.3. Nature des régions variables de l'ADN	7
1.2.3.1. Sites possédant un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR)	9
1.2.3.2. Sites possédant de courtes répétitions en tandem (STR)	10
1.3. Méthodes d'analyse de l'ADN	11
1.3.1. Principes de préparation et de dosage de l'ADN	13
1.3.2. Analyse des profils génétiques	16
1.3.2.1. ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’	16
1.3.2.2. ‘Polymerase Chain Reaction’	17
1.3.2.3. Amplification en Multiplex	22

1.4. Analyse d'ADN en milieu judiciaire	24
1.4.1. Buts	24
1.4.2. Pouvoir discriminant et fréquence des profils	24
1.4.3. Caractéristiques et particularités des échantillons judiciaires	25
1.4.4. Nouvelle technologie	28
CHAPITRE DEUX. OBJET DE L'ÉTUDE	33
CHAPITRE TROIS. ARTICLE	
Single tube DNA preparation protocols for commonly-encountered forensic samples	35
Abstract	36
Keywords	37
Introduction	37
Material and methods	40
Sample preparation	40
Single-tube extraction protocol	41
Organic extraction	44
Sephadex purification step	45
DNA quantification	45
DNA preparation for amplification	46
Amplification conditions	46
PCR product analysis	47

Results	49
Effect of lysis solution on amplification	50
Effect of DTT	55
Substrate effects	55
Discussion	63
Acknowledgements	68
References	69
CHAPITRE QUATRE. CONCLUSION	74
BIBLIOGRAPHIE	82

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Caractéristiques des différentes classes d'ADN satellite	9
TABLEAU 3.1	Multiplex primer characteristics	48
TABLEAU 3.2	DNA yield obtained from reference and forensic type samples	52



## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	Organigramme de l'analyse d'échantillons	12
FIGURE 1.2	Amplification par PCR de séquences répétitives spécifiques	20
FIGURE 1.3	Sites STRs amplifiés au LSJML	31
FIGURE 1.4	Électrophorégrammes générés par le logiciel d'analyse Genescan Analysis 2.1	32
FIGURE 3.1	Effect of DNA concentration on the amplification signal	53
FIGURE 3.2	Effect of DTT concentration on DNA amplification	54
FIGURE 3.3	Amplification of DNA from blood deposited on leather or wood substrate	56
FIGURE 3.4	Effect of denim dye on amplification	57
FIGURE 3.5	Amplification of epithelial cell DNA recovered from envelope flaps	59
FIGURE 3.6	Electrophoregram of amplified epithelial and sperm fraction DNA from vaginal lavages	62

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : adénine

ADN ou DNA : acide déoxyribonucléique

AK : adénylate kinase

Amel. : amélogénine

ARN : acide ribonucléique

APS : ammonium persulfate

ATP : adénosine triphosphate

bp : ‘base pair’

BSA : ‘bovine serum albumin’

C : cytosine

CTP : cytosine triphosphate

DTT : dithiothréitol

EAP : acide phosphatase des érythrocytes

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique

FAM : 5-carboxyfluorescéine

G : guanine

GRC : Gendarmerie Royale du Canada

GTP : guanosine triphosphate

JOE : 2',7'-diméthoxy4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescéine

kb : kilobase

LSJML : Laboratoire de Sciences Judiciaires et de Médecine Légale

$\mu$ l : microlitre

M : molaire

mg : milligramme

ml : millilitre

$\mu$ M : micromolaire

mM : millimolaire

ND : détergent non-ionique

ng : nanogramme

NRC : National Research Council

pb : paire de bases

PCR : réaction en chaîne de la polymérase

PGM : phosphoglucomutase

P/C : phénol et chloroforme

p/v : poids par volume

RCMP : voir GRC

RFLP : ‘restriction fragment length polymorphism’

ROX : 6-carboxy-X-rhodamine

SDS : sodium dodecyl sulfate

S-T : ‘single tube’

STR : ‘short tandem repeat’

T : thymine

TBE : Tris, acide borique et EDTA

TE : Tris EDTA

TPP : thimidine triphosphate

Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane

VNTR : ‘variable number of tandem repeats’

## CHAPITRE UN

### INTRODUCTION

#### **1.1. L'identification d'un individu: des empreintes digitales aux profils génétiques**

Les empreintes digitales sont considérées comme étant uniques à chaque individu. Pendant longtemps ce caractère a été le seul à permettre aux forces policières d'affirmer qu'un individu donné s'était trouvé à un endroit où des empreintes avaient été relevées. Les empreintes recueillies sur le lieu d'un crime étant cependant rarement complètes et interprétables, des outils biologiques ont dû être développés. En 1900, Karl Landsteiner a introduit le typage par groupe sanguin ABO. Ce groupage permet de déterminer la probabilité de retrouver des individus ayant les mêmes caractéristiques sanguines (Landsteiner 1901, Landsteiner et Levine 1930). Au début des années 1970, d'autres protéines sanguines et des marqueurs enzymatiques comme les phosphoglucomutases (PGM), les phosphatasases acides des érythrocytes (EAP), les haptoglobines et l'adénylate kinase (AK) ont été ajoutés et ont augmenté la valeur probante des expertises biologiques (Inman et Rudin 1997).

Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle approche a été développée: l'identification par les profils génétiques. Ils permettent d'associer des individus précis à des lieux où des substances biologiques ont été retrouvées (sang, sperme, salive, cheveux, etc.), puisque

l'ensemble des caractéristiques génétiques est unique à chaque personne. Bien qu'elle ne permette pas de différencier des jumeaux identiques, cette nouvelle technologie présente deux avantages sur l'analyse des empreintes digitales. Premièrement, il est possible de déterminer des relations de filiation entre des individus. De plus, la valeur probante des profils génétiques repose sur des bases statistiques bien établies et non sur une approche empirique (Chakraborty et Zhong 1994, Collins et Morton 1994).

Les biologistes judiciaires du Royaume-Uni sont particulièrement réputés pour leurs travaux portant sur l'identification par profil génétique. En 1985, pour la première fois, la méthode 'd'empreintes génétiques' mise sur pied par Alec Jeffrey a été utilisée à des fins judiciaires (Jeffreys et al. 1985b). Suite à la découverte des corps de deux jeunes femmes dans le Nord de l'Angleterre, le laboratoire du Home Office a eu la tâche d'effectuer le typage génétique de tous les hommes âgés entre 13 et 34 ans qui résidaient dans les villages avoisinants, soit environ 4000 personnes. Il s'agissait ensuite de comparer ces profils à ceux obtenus à partir des prélèvements recueillis sur les victimes. Les analyses ont finalement mené à l'arrestation de Colin Pitchfork (Wambaugh 1989).

Depuis lors, les techniques n'ont cessé d'évoluer. En 1993, Kary Mullis recevait le prix Nobel de chimie pour la mise au point de l'amplification d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase ('polymerase chain reaction' PCR) (Saiki et al. 1985, Mullis et Faloona 1987). Cette technique fut utilisée en sciences judiciaires dès 1989 pour l'analyse de la variation

génétique des sites DQ $\alpha$ -HLA (Blake et al. 1992). En 1992, on procédait à l'amplification simultanée de plusieurs sites génétiques (PCR multiplex) (Kimpton et al. 1993). L'analyse des profils génétiques par PCR est de plus en plus sensible et son utilisation largement répandue en Amérique et en Europe (Frégeau et Fourney 1993, Kimpton et al. 1993, Micka et al. 1996).

## 1.2. Les fondements de l'analyse par l'ADN

Le corps humain est composé de cellules qui sont toutes nucléées, mis à part les globules rouges, les plaquettes et les cheveux. À l'intérieur de ces noyaux, on retrouve les 22 paires de chromosomes autosomes en plus des chromosomes sexuels (XX pour une femme et XY pour un homme) qui contiennent l'acide désoxyribonucléique (ADN). Pour chaque paire, un exemplaire provient du père et l'autre de la mère. Seules les cellules germinales, soient les ovules et les spermatozoïdes, ne contiennent qu'une seule copie de chacun des chromosomes (haploïdes).

Afin de définir la nature d'un profil génétique, il faut tout d'abord connaître les propriétés et les fonctions de l'ADN. La revue de littérature qui suit traitera exclusivement de l'ADN contenu dans les noyaux cellulaires et n'abordera pas l'ADN mitochondrial.

### 1.2.1. Structure et fonctions de l'ADN

L'ADN est une molécule linéaire constituée de quatre types de sous-unités appelées nucléotides, chacune possédant une base azotée spécifique, soit Adénine (A), Thymine (T), Cytosine (C) et Guanine (G). Chaque base est liée à un sucre de cinq atomes de carbone, le désoxyribose, lié à son tour à un groupement phosphate. Les bases peuvent être de deux natures soit d'un cycle à cinq atomes de carbone dites pyrimidiques (cytosine et thymine) ou d'un double cycle de cinq atomes de carbone dites puriques (adénine et guanine). La séquence spécifique de ces bases détermine les caractéristiques génétiques d'un organisme vivant. Un brin d'ADN est assemblé par des liens covalents phosphodiester entre les sucres selon une orientation 5'-3'.

L'ADN génomique des cellules eucaryotes se présente sous forme d'une double hélice dont les brins sont liés et orientés de manière antiparallèle par des ponts hydrogènes selon la complémentarité suivante: à chaque A est apparié un T et à chaque C, un G (Watson et Crick 1953). Pour des raisons organisationnelles, l'ADN s'enroule autour d'histones, des protéines de structure, formant ainsi la chromatine qui, une fois condensée, forme les chromosomes.

Au 19<sup>e</sup> siècle, les chromosomes étaient déjà soupçonnés d'être les responsables de l'hérédité. En étudiant les bactéries, les chercheurs ont déterminé au début des années 1940 que les gènes étaient constitués d'ADN (Avery et al. 1944). Aujourd'hui, nous savons que les gènes sont des portions d'ADN chromosomique qui représentent en quelque sorte l'unité

de base de l'hérédité. La position qu'ils occupent sur le chromosome est désignée sous le nom de locus et les différentes formes d'un gène sont appelées allèles. La séquence des nucléotides de l'ADN détermine la production de molécules d'ARN (acide ribonucléique), composées de nucléotides ordonnés en une séquence également précise. À leur tour, ces ARN commandent la séquence des acides aminés des protéines. Ainsi, l'ADN code la séquence des protéines, mais la structure des protéines détermine leur fonction. La plupart des activités d'une cellule sont d'ailleurs définies par les propriétés biochimiques des protéines.

Une grande portion de l'ADN des cellules eucaryotes consiste en des séquences non codantes de nucléotides (Britten et Kohne 1968, Jelinek et Schmid 1982). Parmi ces séquences, il y a l'ADN dit satellite et les éléments transposables. Bien que ces séquences ne codent pas de protéines, on croit qu'elles jouent un rôle de régulation des gènes et de structure (Britten et Kohne 1968, Jelinek et Schmid 1982, Alberts et al. 1994). Les éléments transposables, qui sont des segments d'ADN qui se déplacent dans le génome, constituent plus de 10% du génome eucaryote et il est possible que ces séquences aient contribué entre autres à la diversité génomique (Finnegan 1989, Alberts et al. 1994). L'ADN satellite se situe principalement aux extrémités et dans la région du centromère des chromosomes. Ce type d'ADN est composé de séquences répétitives et constitue environ 10% à 25% du génome des eucaryotes pluricellulaires (Craig-Holmes et Shaw 1971, John et Miklos 1979). Diverses hypothèses ont été avancées pour déterminer la fonction de cet ADN satellite. On a pensé qu'il jouait un rôle dans le pairage des chromosomes ou un rôle dans l'organisation

nucléaire, mais aucune évidence de ces fonctions n'a pu être démontrée (Craig-Holmes et Shaw 1971, John et Miklos, 1979, Alberts et al. 1994).

### 1.2.2. RéPLICATION DE L'ADN

L'ADN se réplique selon un mode semi-conservatif, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN se séparent et que chacun sert de matrice pour la formation d'un nouveau brin antiparallèle au brin parental.

Le processus débute par un déroulement de la double hélice et la séparation des brins complémentaires par des enzymes, les ADN hélicases, qui se déplacent le long de la double hélice. Chez les eucaryotes, la réPLICATION peut débuter à plus de 1000 points en même temps, ce qui forme des bulles de réPLICATION. Une autre enzyme, l'ADN polymérase, synthétise le nouveau brin directeur (leading strand) dans le sens 5'-3' en ajoutant un nucléoside triphosphate à la fois, qui s'apparie à la base exposée du brin matrice orienté 3'-5'. À mesure que les brins s'écartent, il se crée de l'espace pour d'autres molécules d'ADN polymérase sur la matrice 5'-3'. Ainsi, le brin qui sera formé à partir de cette matrice est désigné sous le nom de brin discontinu (lagging strand) et est synthétisé par fragments discontinus appelés fragments d'Okazaki. L'enzyme ADN ligase liera ces fragments pour obtenir un brin continu.

Chez les eucaryotes, un complexe protéique veille à ce que l'appariement des bases soit respecté; les erreurs sont donc relativement rares lors de la réplication (Wevrick et Buchwald 1993, Alberts et al. 1994) . Par contre, il peut arriver que ces erreurs soient sources de mutations tout comme les lésions non corrigées par les enzymes de réparation et le réarrangement spontané. Les mutations peuvent également être causées par des agents mutagènes comme les rayons X, les ultraviolets, certains produits chimiques et les particules radioactives. Elles peuvent se manifester selon différentes formes: substitution; insertion ou délétion d'une ou plusieurs bases; inversion, perte ou insertion d'un fragment; perte, cassure ou copie supplémentaire d'un chromosome (Setlow 1977, Stuy et Walter 1981, Kourilsky 1986).

Si une mutation n'est pas corrigée, elle est copiée lors de la réplication puis transmise aux cellules descendantes de la cellule mutante. Si la mutation a lieu au niveau d'une cellule germinale, cette mutation peut être transmise aux descendants de l'organisme.

### **1.2.3. Nature des régions variables de l'ADN**

Comme nous l'avons décrit précédemment, le génome des cellules eucaryotes contient un type de séquence appelée ADN satellite; cet ADN contient une unité de répétition composée d'un à 250 nucléotides environ. L'ADN satellite a subi un taux de mutation très élevé au cours de l'évolution et a même changé d'emplacement sur les chromosomes. Cette sensibilité aux mutations peut être attribuée à différents facteurs. Tout d'abord, il y a une

corrélation entre la longueur des allèles et le taux de mutation, les allèles plus longs étant davantage susceptibles aux réarrangements (Andreassen et al. 1996, Brinkmann et al. 1998).

La structure d'un site satellite influence aussi le taux de mutation, un site dont l'unité de répétition n'est pas interrompue mute davantage qu'un site dont l'unité de répétition est interrompue par des unités différentes (Andreassen et al. 1996, Brinkmann et al. 1998). La présence d'éléments qui sont actifs en *cis* à proximité des sites satellites peut aussi favoriser l'apparition de mutations (Andreassen et al. 1996). Finalement, puisque l'ADN satellite est principalement non codant pour des protéines, ces mutations n'entraînent pas de pression sélective (Alberts et al. 1994). Cet ADN peut donc être assez différent chez deux espèces étroitement apparentées (Singer et Berg 1991).

Depuis environ 25 ans, les techniques d'analyses de l'ADN se sont grandement développées. La technique de Southern blot (Southern 1975) a rendu possible la détection de séquences spécifiques d'ADN. En 1980, Wyman et White mettaient en évidence une nouvelle classe d'ADN répétitif : il s'agit de séquences particulières de nucléotides dont le nombre de répétitions varie entre les individus et qui représente environ 25% du génome humain (Wyman et White 1980, Weber et May 1989). L'analyse des séquences de ces régions hypervariables montre l'existence de séquences répétées en tandem (Bell et al. 1982, Robertson et al. 1995).

Ces sites polymorphiques sont particulièrement utiles pour effectuer des analyses d'identification en biologie judiciaire, des études d'association à des maladies en génétique

médicale et des tests de filiation (Weber et May 1989, Jeffreys 1993). Ces sites sont de deux types, les VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) qui sont des minisatellites (Jeffreys et al. 1985a) et les sites STR (Short Tandem Repeats) qui sont des microsatellites (Litt et Luty 1989, Weber et May 1989) (Tableau 1.1).

Classe	Position dans le génome	Longueur de la répétition (nucléotides)	Nombre de répétitions
Satellite	Hétérochromatine, région du centromère	1-250	Jusqu'à plusieurs milliers
Minisatellite-VNTR	Variée	10-100	Jusqu'à 1000
Microsatellite-STR	Variée	2-7	3 à 80

TABLEAU 1.1. Caractéristiques des différentes classes d'ADN satellite.

### 1.2.3.1. Sites possédant un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR)

Les sites VNTR sont composés de séquences de 10 à 100 nucléotides en tandem (Nakamura et al. 1987). Le nombre de répétitions varie énormément entre les individus, plus d'une centaine d'allèles sont possibles pour les différents sites analysés. Récemment, il a été noté que l'unité de répétition d'un site VNTR peut varier (Jeffreys 1993). C'est d'abord Alec Jeffreys qui a utilisé les minisatellites pour l'identification humaine en employant des sondes dégénérées qui permettaient l'étude simultanée de plusieurs sites (Jeffreys et al. 1985a, Jeffreys et al. 1985b, Jeffreys et al. 1985c). Aujourd'hui, l'emploi de sondes

spécifiques reconnaissant une seule séquence d'ADN est favorisé (Jeffreys et al. 1989). L'existence d'un grand nombre d'allèles à ces sites offre un grand pouvoir discriminant (Nakamura et al. 1987, Frégeau et Fourney 1993).

#### **1.2.3.2. Sites possédant de courtes répétitions en tandem (STR)**

Les loci génétiques possédant des séquences répétitives de 2 à 7 paires de bases (pb) sont appelées sites STR (Polymeropoulos et al. 1991a, Polymeropoulos et al. 1991b, Edwards et al. 1991, Urquhart et al. 1994). Ils sont abondants et bien distribués dans le génome, ce qui offre une bonne source de marqueurs polymorphiques pour les études de partages de sites génétiques entre des individus (linkage studies) et d'association de génotypes avec des phénotypes (Edwards et al. 1991, Edwards et al. 1992, Murray et al. 1994). Le nombre de sites STR dans le génome humain est estimé à 500 000 (Murray et al. 1994, Frégeau et Fourney 1993). Les séquences STR peuvent être amplifiées par PCR pour générer des amplicons de 100 à 400 pb, ce qui permet l'analyse d'ADN partiellement dégradé (Schumm et al. 1995). Pour des fins d'identification humaine, les STR ayant des répétitions tétramériques sont les plus couramment utilisées en raison de leur abondance et de l'absence relative d'artefacts (Frégeau et Fourney 1993, Kimpton et al. 1993). Le nombre de répétitions pour ces sites STR varient de trois à plus de quarante (Edwards et al. 1992, Urquhart et al. 1994, Barber et al. 1996), c'est-à-dire qu'il y a moins d'allèles possibles que pour les VNTRs. Il est donc nécessaire d'analyser plus de sites STR pour obtenir un pouvoir discriminant équivalent.

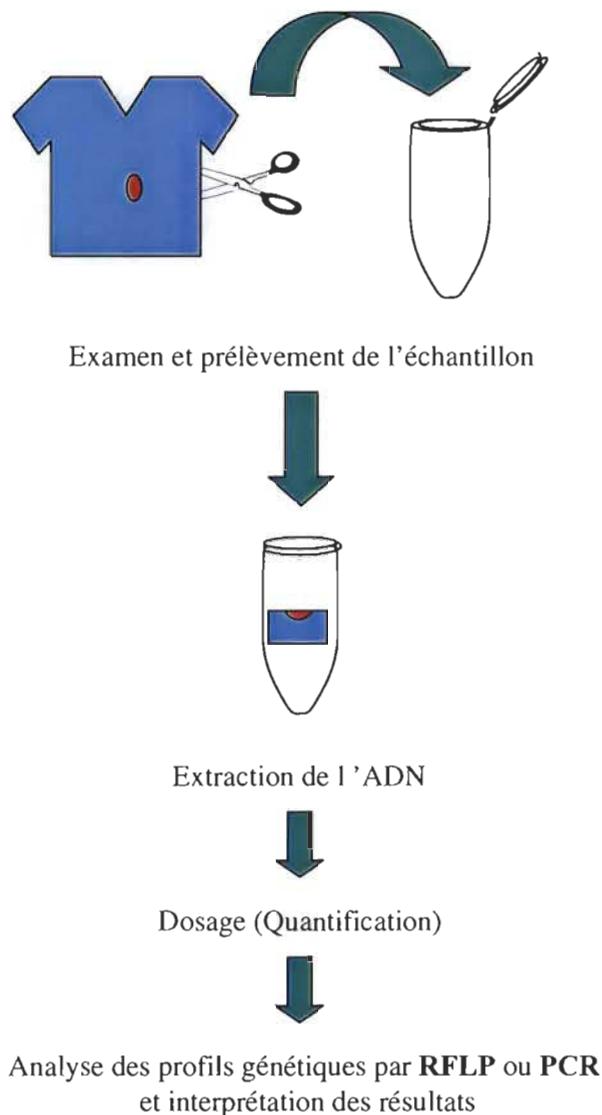
Les répétitions STR peuvent être divisées en trois classes (Urquhart et al. 1994, Rousselet et al. 1997):

- les répétitions simples qui contiennent des unités identiques tel le locus HUMFES/FPS qui est composé de répétitions ATTT.
- les répétitions composées qui comprennent deux séquences adjacentes ou plus comme le site HUMGABRB15 où l'on retrouve les unités  $(GATA)_{5-12}(GATC)_{2-4}(TATC)_{1-2}$ .
- les répétitions complexes qui peuvent contenir plusieurs blocs de répétitions de longueur et de séquences variables, comme le site D21S11 composé comme suit :  $(TCTA)_{4-6}(TCTG)_{5-6}(TCTA)_3TA(TCTA)_3TCA(TCTA)_2TCCATA (TCTA)_{8-16}...TC$ .

Les sites STR comprenant des répétitions complexes comme D21S11 offrent le meilleur pouvoir discriminatoire (Gill et al. 1995).

### 1.3. Méthodes d'analyse de l'ADN

L'analyse de l'ADN en laboratoire judiciaire comporte plusieurs étapes qui sont illustrées à la figure 1.1. La substance biologique est d'abord recueillie, l'ADN est extrait et dosé, puis le profil génétique est établi et interprété. Les sites satellites qui ont été décrits à la section 1.2.3. sont analysés pour déterminer la taille des fragments contenant les séquences répétitives en tandem. Deux approches sont possibles: l'analyse par RFLP pour les minisatellites tel les sites VNTR et l'analyse par la méthode de PCR pour les sites STR ainsi que pour certains sites VNTR comme le site D1S80 (Budowle et al. 1991).



**Figure 1.1. Organigramme de l'analyse d'échantillons.** Suite à la détection d'une substance biologique (sang) sur une pièce soumise pour examen, le spécialiste prélève la région contenant cette substance et la dépose dans un tube contenant la solution de lyse cellulaire. L'ADN sera ainsi extrait et purifié si nécessaire. Suite au dosage, un aliquot de l'ADN obtenu sera analysé par RFLP ou par amplification (PCR) pour en établir le profil génétique. Ce profil pourra être comparé à celui d'une victime ou d'un suspect.

### 1.3.1. Principes de préparation et de dosage de l'ADN

La préparation d'ADN consiste en une digestion des membranes cellulaire et nucléaire des cellules pour libérer l'ADN et le solubiliser. Plusieurs protocoles utilisent la dégradation enzymatique des protéines par la protéinase K dans un tampon contenant du sodium dodécylsulfate (SDS) affaiblissant les membranes (Miller 1988). Les spermatozoïdes et les phanères possèdent des membranes pourvues de ponts disulfures. Elles sont par conséquent plus résistantes à la lyse et nécessitent l'ajout de dithiothréitol (DTT) à la solution de digestion pour le bris des membranes (Gill et al. 1985, Crouse et al. 1993).

La digestion est suivie d'une étape de purification pour éliminer les protéines et les contaminants récupérés avec l'ADN en solution. Cette étape est importante puisque les différents composés de la solution de lyse et les enzymes cellulaires peuvent entraîner la dégradation du matériel génétique ou perturber les analyses ultérieures. Lors de la lyse de cellules sanguines par exemple, l'hémoglobine peut entraîner la dégradation de l'ADN en catalysant le bris des liens phosphodiester (Zamenhof 1957, Berg 1975). La protéinase K inactive l'enzyme Taq polymerase (Higuchi 1989, Del Rio et al. 1996) et de faibles concentrations de SDS entraînent l'inhibition de l'amplification (Gelfand 1989, Goldenberger et al. 1995). L'utilisation du phénol et du chloroforme permet d'extraire certains composés organiques et inorganiques présents dans l'échantillon. L'ADN ainsi récupéré peut ensuite être purifié sur membrane ou précipité à l'éthanol pour éliminer des composés qui n'ont pu l'être lors de l'étape d'extraction organique (Maniatis et al. 1982,

Budowle et Baechtel 1990, Laird et al. 1991, Comey et Budowle 1991). La technique utilisant le phénol et le chloroforme est une méthode classique de préparation d'ADN très utilisée.

Des procédures d'extraction inorganiques peuvent aussi être appliquées. L'une d'elles est l'hydratation et la précipitation des polypeptides hydrolysés avec la protéinase K par une solution saturée en sel (Miller 1988, Dykes 1988, Laitinen et al. 1994). Cependant, l'ADN qui en résulte est de piètre qualité (Bourgoin et al. 1997) tout comme l'ADN obtenu après dénaturation par la formamide suivie de dialyses (Kupeic et al. 1987).

L'utilisation de colonnes purifiantes commerciales faites de poudre de verre, qui retiennent l'ADN en présence d'iodide de sodium, ou de résines qui ont les mêmes propriétés, est de plus en plus répandue. Elles permettent de laver l'ADN lié pour enlever les protéines ou les autres contaminants récupérés en solution (Vogelstein et Gillespie 1979, Walsh et al. 1991). Ces méthodes sont très efficaces et permettent l'obtention d'ADN de haut poids moléculaire qui peut être utilisé pour des analyses ultérieures en RFLP ou en amplification (Walsh et al. 1991). Par contre, elles requièrent plusieurs transferts de tubes et plusieurs lavages. Toutes ces étapes additionnelles peuvent augmenter les risques de mélange d'échantillon ou l'introduction de contaminations. De plus, elles s'avèrent relativement coûteuses lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être traité.

Une méthode de préparation de l'ADN permet de procéder à la lyse cellulaire et à la purification du matériel génétique dans un seul tube. Cette méthode utilise la résine échangeuse d'ions Chelex® 100 et consiste en un bris cellulaire par le chauffage à de hautes températures (100°C) et à la liaison des composés 'non-ADN' à la résine (Walsh et al. 1991). L'ADN résultant est sous forme dénaturée et ne peut être utilisé pour certaines analyses (voir section 1.3.2.1).

Selon Comey et ses coauteurs, la méthode organique s'avère donner des rendements en ADN supérieurs en plus d'être la plus sûre pour obtenir de l'ADN génomique (Comey et al. 1994). De plus, la méthode d'extraction organique suivie par une filtration sur membrane (microconcentrateurs Microcon) est plus efficace pour recueillir de petites quantités que la précipitation d'ADN à l'éthanol (Comey et Budowle 1991).

Une fois l'ADN récupéré, il est possible de déterminer la quantité de matériel génétique disponible. Le dosage par spectrophotométrie à 260 nm peut être effectué si la quantité d'ADN obtenue dépasse le microgramme. L'hybridation avec des sondes radioactives ou chimiluminescentes sera utilisée si la quantité d'ADN est moindre. Il s'agit d'une méthode dite semi-quantitative qui consiste en une évaluation visuelle de l'effet d'ombrage produit par la sonde chimiluminescente ou radioactive sur film. Les échantillons à doser sont comparés à des étalons de concentrations connues (Waye et al. 1989). La méthode est intéressante puisqu'elle permet l'utilisation de sondes spécifiques à des espèces. Par exemple, la sonde D17Z1 détecte uniquement l'ADN humain (Waye et al. 1989).

La quantité de matériel génétique varie en fonction de la densité des cellules nucléées dans les différents liquides biologique. Pour le sang dont seuls les leucocytes sont nucléés, la quantité d'ADN par millilitre est d'environ 20-25 µg si l'extraction est réalisée avec la méthode phénol chloroforme (Baechtel 1988). Pour le sperme, qui possède une densité de cellules nucléées plus importantes, la quantité obtenue par millilitre est de 450 µg selon les travaux de Davidsohn (1991).

### **1.3.2. Analyse des profils génétiques**

Nous décrirons brièvement deux méthodes d'analyse utilisées selon la nature des sites variables étudiés.

#### **1.3.2.1. ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’**

L'analyse de l'ADN par la technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), dépend de la fragmentation de l'ADN génomique par un enzyme de restriction. Selon l'enzyme choisi, celui-ci reconnaît et coupe l'ADN double brin à une séquence spécifique de 4 à 8 nucléotides (Kan et Dozy 1978) encadrant un site contenant des répétitions (site VNTR). Les produits de digestion sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose, les petits fragments migrant plus rapidement vers l'anode. Par la suite, l'ADN est dénaturé et transféré du gel à une membrane de nylon ou de nitrocellulose par la technique de Southern blot (Southern 1975). L'ADN fixé à la membrane est mis en présence d'une sonde radioactive ou chimiluminescente qui s'hybride

aux fragments dont les séquences de nucléotides lui sont complémentaires. L'image des fragments hybridés est révélée sur un film. La longueur des fragments hybridés est évaluée par interpolation grâce à une échelle allélique composée de fragments de tailles connues. Cette échelle est déposée dans deux puits encadrant les échantillons à analyser sur le gel.

Cette technique de RFLP nécessite des fragments de haut poids moléculaire (10-20 kilobases) pour obtenir une analyse complète (Budowle 1988). Une préparation d'ADN partiellement dégradée sera digérée incomplètement par un enzyme ou ne sera pas reconnue par une sonde, surtout si on recherche des fragments de très haut poids moléculaire (Dubeau et al. 1986, Warford et al. 1988). De plus, il est impossible de soumettre l'ADN purifié avec la résine de Chelex<sup>®</sup>100 à l'analyse RFLP, puisqu'il est dénaturé. Malgré ces inconvénients, cette technique a l'avantage d'être simple et de produire des résultats qui sont reproductibles mais requiert au moins une semaine pour compléter les nombreuses étapes de l'analyse.

### **1.3.2.2. ‘Polymerase Chain Reaction’**

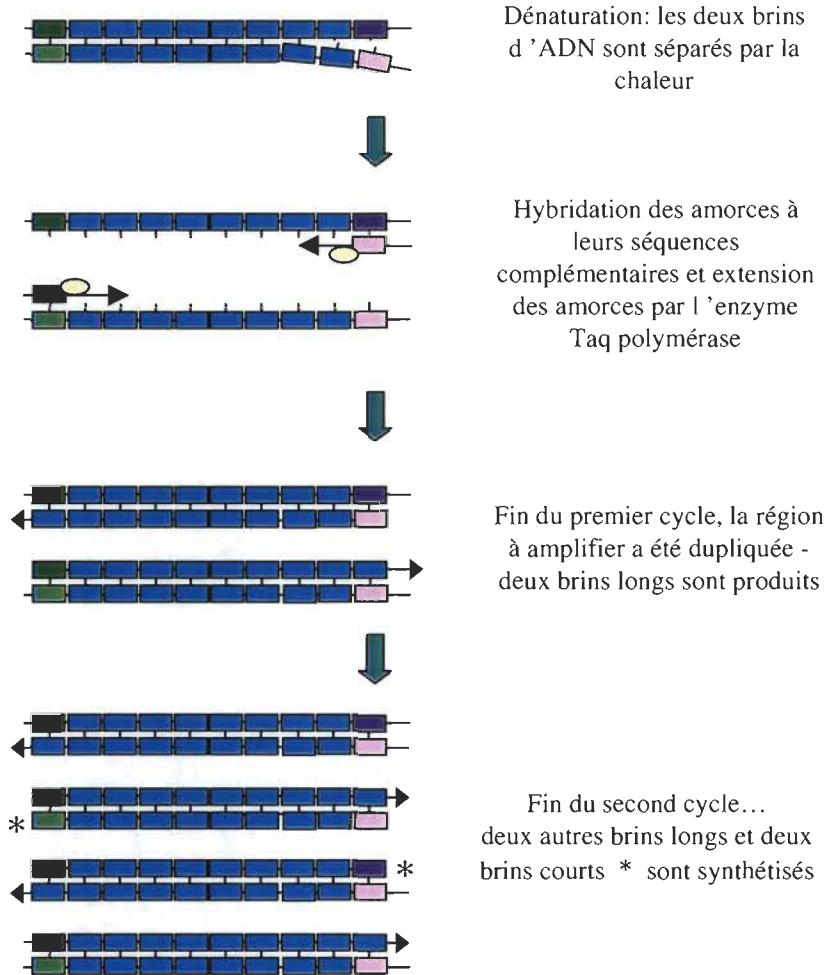
L'amplification d'ADN par PCR (figure 1.2) consiste en la production *in vitro* de copies de séquences d'ADN spécifiques (Saiki et al. 1985, Mullis et Falloona 1987) par une ADN polymérase thermostable isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* (T. aq.) (Saiki et al. 1988). Cette bactérie a été isolée à partir de sources thermales et sa polymérase possède la propriété de résister à plusieurs expositions successives à de hautes températures (jusqu'à 100°C).

Outre l'ADN à amplifier, le processus d'amplification par PCR dépend de la présence de deux oligonucléotides (les amorces) encadrant la région à amplifier, chacun complémentaire à un des brins. S'ajoutent à la réaction les quatre désoxynucléosides triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) en excès, l'ADN polymérase thermostable, le chlorure de magnésium ainsi qu'une solution tampon contenant du chlorure de potassium, du chlorure de sodium et souvent de l'albumine. La réaction consiste en des répétitions de trois étapes thermiques réalisées successivement. La première étape est celle de la dénaturation du double brin d'ADN à 95°C, suivie d'une étape d'hybridation des amorces sur les séquences cibles. La température sélectionnée pour cette étape se situe entre 40 et 70°C, selon la longueur et la composition en nucléotides des amorces. La dernière étape est celle d'elongation des fragments d'ADN par l'ADN polymérase à partir des amorces hybridées. Cette étape s'effectue généralement à 72°C, cette température maximise l'activité de l'enzyme tout en favorisant la fidélité du processus.

La dénaturation vise la rupture des liaisons non covalentes (ponts hydrogènes) entre les bases appariées en utilisant la chaleur (95°C) pour obtenir la séparation des deux brins d'ADN. L'ADN monocaténaire ainsi obtenu servira de matrice pour la synthèse de nouveaux brins. En diminuant la température de la solution à des niveaux favorisant la renaturation de l'ADN, il y a une fixation des amorces à leurs séquences complémentaires sur le brin d'ADN dénaturé. La concentration en molarité des amorces doit être de  $10^6$  supérieure à celle des séquences à amplifier afin de favoriser cette liaison (Wiedbrauk et Farkas 1994). La longueur et la composition en nucléotides des amorces contribuent à la

spécificité de la liaison à la séquence cible. D'une part, les paires G-C sont plus stables que les paires A-T. D'autre part, plus une amorce est longue, plus la probabilité qu'elle soit unique dans le génome est grande. L'elongation s'effectue par l'ajout successif des désoxynucléosides triphosphate à l'extrémité 3' des amorces par l'ADN polymérase thermostable. Chacun des deux brins initiaux sera ainsi recopié dans une orientation 5'-3' selon la séquence dictée par la matrice. Les étapes sont ensuite répétées de 25 à 30 fois. Les ions  $Mg^{++}$  interviennent dans la spécificité de la réaction, soit en favorisant la reconnaissance des nucléotides à l'étape d'hybridation ou en ayant des effets directs sur la polymérase (Saiki 1989).

Lors du premier cycle et des cycles suivants, l'extension du complexe d'hybridation produira une molécule simple brin d'une longueur indéterminée. Ces produits appelés 'brins longs' s'accumulent de manière linéaire. Au cours des cycles, ces brins longs serviront de matrice pour l'une des deux amorces et l'extension par l'enzyme produira des molécules d'ADN de longueur égale à la distance séparant les deux amorces. Ces produits n'apparaîtront pas avant la fin du deuxième cycle et seront eux aussi utilisés comme matrice. Ces produits courts augmentent de façon exponentielle et constituent la grande majorité du produit amplifié (Wiedbrauk et Farkas 1994). En présumant un rendement en amplification de 100%, le facteur d'amplification serait  $2^n$ , où n est le nombre de cycles d'amplification. Mais en pratique, le rendement en amplification est de l'ordre de 50-60% (Saiki et al. 1985, Wiedbrauk et Farkas 1994).



**Figure 1.2. Amplification par PCR de séquences répétitives spécifiques** . Suite à la dénaturation des brins d'ADN, les amores s'hybrident à leurs séquences complémentaires permettant ainsi à l'enzyme Taq polymérase de procéder à l'extension des brins par l'ajout des nucléotides complémentaires à la matrice. La répétition de ces étapes permet une augmentation exponentielle du nombre de copies de la séquence amplifiée.

Le PCR est maintenant couramment utilisé dans les laboratoires de sciences judiciaires (Dimo-Simonin 1997). Ceci est principalement dû à la sensibilité de la technique et la capacité d'analyser de faibles quantités d'ADN. En effet, une quantité de 0.5ng d'ADN est suffisante pour effectuer la réaction de PCR (Saiki et al. 1985, Mullis et Faloona 1987, Saiki et al. 1988, Schumm et al. 1995).

Certains agents affectent la réaction d'amplification et agissent comme des inhibiteurs (Comey et al. 1994, Del Rio et al. 1996, Akane et al. 1996). Les détergents comme le SDS, les composés porphyriques dérivés de l'hème, et la protéinase K en sont des exemples (Higuchi 1989, Akane 1996). Des éléments copurifiés avec l'ADN lors de l'extraction tel les colorants présents dans les vêtements peuvent aussi inhiber l'amplification (Comey et Budowle 1991, Jung et al. 1991, Koblinsky 1992, Del Rio et al. 1996). La présence d'ADN trop dégradé empêche la fixation et l'elongation efficace des amorces rendant l'amplification du fragment impossible. Par contre, la longueur des fragments analysés par PCR n'excède pas quelques centaines de bases, de sorte qu'un ADN partiellement dégradé peut être amplifié (Hagelberg et al. 1990, Hochmeister et al. 1991).

Les applications de la technique d'amplification sont très nombreuses en biologie. Le séquençage, le clonage ou l'analyse de mutations préalablement identifiées ne sont que quelques exemples (Frégeau et Fourney 1993, Alberts et al. 1994). En science judiciaire, elle permet d'identifier des individus par l'analyse de fragments amplifiés à partir de sites hypervariables. Afin de séparer les fragments, il est possible de faire migrer les amplicons sur gel d'agarose lorsque les fragments sont relativement grand (300 à 10 000 pb) et que la

différence de taille entre les fragments est supérieure à 20 pb (Southern 1979, Alberts et al. 1994). Par contre, si les fragments sont plus petits, moins de 500 pb, l'électrophorèse capillaire ou encore les gels de polyacrylamide sont utilisés puisqu'ils permettent de séparer des fragments dont les tailles ne diffèrent que d'un seul nucléotide (Evans 1991, Frégeau et Fourney 1993). Plusieurs méthodes de révélation des amplicons sur gels de polyacrylamide existent, soit la coloration à l'argent, l'utilisation d'amorces marquées par des fluorochromes (Schwartz et al. 1992, Sullivan et al. 1992, Ziegler et al. 1992) ou des isotopes radioactifs. La détection d'amorces marquées avec des fluorochromes nécessite un appareillage particulier. Avec cette nouvelle technologie, il est toutefois possible de déterminer précisément la longueur des allèles puisque des standards internes de tailles connues, marqués à l'aide d'un fluorochrome distinct, sont ajoutés à chaque échantillon permettant d'établir une courbe de calibration individuelle (Carrano et al. 1989). De plus, comme nous le verrons dans les sections suivantes, l'analyse de plusieurs loci peut être combinée.

### **1.3.2.3. Amplification en Multiplex**

Le PCR multiplex consiste en l'amplification simultanée de plusieurs sites STR dans un seul tube. Ainsi, la réaction d'amplification contiendra les paires d'amorces encadrant plusieurs sites génétiques à amplifier. Cette nouvelle façon de procéder pour l'amplification permet de réduire le temps d'analyse ainsi que les coûts et la quantité de matériel génétique pour l'obtention de profils génétiques discriminants (Edwards et al. 1991, Morral et Estivill

1992, Schwartz et al. 1992). C'est au Royaume-Uni en 1992 que le PCR multiplex a été utilisé pour la première fois à des fins judiciaires (Kimpton et al. 1993)

Puisque les concentrations optimales de réactifs, la durée et les températures de réaction sont spécifiques à chaque paire d'amorces, des compromis pour ces différents paramètres sont établis pour que des résultats satisfaisants soient obtenus. À cause de ces compromis, l'amplification de certains sites peut être perturbée considérablement par des variations mineures aux conditions de PCR. Par exemple, l'ajout d'une solution d'ADN contenant une grande concentration de sel pourrait complètement inhiber l'amplification d'un site en particulier sans influencer l'amplification d'autres sites en affectant l'équilibre de liaison des amorces.

L'analyse par PCR multiplex exige que les différents fragments amplifiés soient de tailles différentes afin qu'il soit possible de déterminer de quels sites génétiques ils proviennent. Ceci impose des contraintes sur la position des amorces relativement aux séquences répétitives (Schumm et al. 1995). Il est aussi possible d'utiliser des amorces marquées avec des fluorochromes et émettant à des longueurs d'ondes différentes spécifiques pour chaque site amplifié. Un appareil particulier comme le DNA Sequencer de la compagnie Applied Biosystems est alors nécessaire (voir section 1.5.4.) L'utilisation de plusieurs fluorochromes permet le chevauchement de plusieurs sites génétiques en ce qui a trait à la longueur des fragments (Frégeau et Fourney 1993).

## **1.4. Analyse d'ADN en milieu judiciaire.**

### **1.4.1. Buts**

En biologie judiciaire, l'objectif poursuivi est d'établir une relation entre les échantillons prélevés sur une scène de crime, appelés litigieux puisque de provenance inconnue, et les personnes qui sont susceptibles d'être impliqués dans le crime (victime(s) et agresseur(s)). Pour ce faire, les profils génétiques établis à partir des échantillons litigieux sont comparés à ceux des échantillons dits de référence, fournis volontairement par les personnes concernées ou obtenus suite à une procédure légale. Il est également possible d'établir une relation de filiation entre des personnes pour confirmer l'identité d'un cadavre lorsque les méthodes traditionnelles d'identification (morphologie, fiches dentaires) sont inutilisables.

### **1.4.2. Pouvoir discriminant et fréquence des profils**

L'analyse des profils génétiques doit permettre de distinguer les individus. Il s'agit d'abord d'échantillonner une population de référence pour établir le degré de variabilité et la fréquence relative des allèles pour chacun des sites génétiques. Des calculs de probabilité dépendant du nombre de loci analysés et de la distribution des allèles dans la population permettront d'établir un potentiel discriminatoire pour un ensemble de sites. Les loci ayant

plusieurs allèles dont les fréquences sont semblables offrent le meilleur pouvoir de discrimination.

Lorsqu'un même profil est retrouvé dans plus d'un échantillon, il est nécessaire d'établir la valeur probante de cette concordance. En utilisant les données obtenues dans la population de référence, il est possible d'estimer la fréquence d'un profil par la multiplication entre elles des fréquences associées à chaque allèle de ce profil, suivant le principe de Hardy-Weinberg. Cependant, les loci analysés doivent se retrouver à distance génétique suffisamment grande pour être hérités de façon indépendante. On considère donc qu'il est préférable de choisir des sites retrouvés sur des chromosomes différents. Selon un consensus dans la communauté judiciaire nord-américaine, la rareté du profil doit dépasser 1 sur plusieurs centaines de milliards pour que l'on puisse affirmer que des profils concordants proviennent d'une même source (recommandations du National Research Council II 1996).

#### **1.4.3. Caractéristiques et particularités des échantillons judiciaires**

Les échantillons biologiques analysés en science judiciaire proviennent de sources diverses incluant le sang, le sperme, les cheveux ou poils ayant des racines, les ongles, et des frottis provenant des muqueuses. De plus, certains échantillons présentent un mélange de substances biologiques. Des trousseaux médico-légales sont fréquemment acheminées aux laboratoires judiciaires. Ces trousseaux contiennent les prélèvements effectués sur une victime

d'agression sexuelle selon le type d'agression: il peut s'agir d'un lavage vaginal, des écouvillons vaginaux et/ou buccaux ou des écouvillons cutanés et un tube de sang de la victime pour comparaison. Pour ces types d'échantillons contenant des mélanges de cellules épithéliales et de spermatozoïdes, des digestions séquentielles sont effectuées pour séparer l'ADN provenant des deux types de cellules. Tirant profit de la résistance des membranes des spermatozoïdes, une première lyse sans DTT est effectuée pour digérer les cellules épithéliales. Une fois l'ADN de ces dernières mis en solution, le surnageant est retiré et le culot contenant les spermatozoïdes est traité avec une solution de lyse contenant du DTT (Gill et al. 1985).

Les échantillons judiciaires sont retrouvés sur différents types de substrats comme des tissus, du tapis, du bois, du cuir, des surfaces peintes pour n'en mentionner que quelques-uns. La technique de prélèvement de ces échantillons est adaptée au type de substrat. Les échantillons biologiques qui reposent sur des surfaces comme du tissu ou du papier seront simplement découpés. Par contre, les échantillons qui reposent sur des surfaces plus rigides et poreuses (par exemple le bois) seront grattés tandis que ceux qui sont sur des surfaces rigides et non poreuses seront grattés ou écouvillonnés avec un coton-tige. Les échantillons liquides comme l'urine ou les lavages vaginaux seront centrifugés pour récupérer les culots de cellules avant de procéder à l'extraction.

Les échantillons judiciaires sont souvent soumis à des conditions qui favorisent la dégradation de l'ADN avant d'être acheminés au laboratoire. Plusieurs études ont démontré

que l'exposition aux rayons du soleil (cycle jour/nuit) pendant deux mois suffit à dégrader l'ADN pour que l'analyse par RFLP ne soit plus possible (Adams et al. 1991). Les micro-organismes contenus dans la terre peuvent également dégrader l'ADN et rendre impossible l'obtention de profils génétiques (Gill 1987, McNally et al. 1989a, McNally et al. 1989b, Adams et al. 1991). Des composés associés aux substrats et copurifiés avec l'ADN lors de l'extraction peuvent aussi inhiber l'amplification. Citons en exemple les colorants foncés associés à certains tissus comme le denim qui semble nuire à la réaction d'amplification (Comey et al. 1994, Del Rio 1996). Lors de l'extraction de l'ADN, il est par conséquent important de se débarrasser des contaminants que ces substrats peuvent contenir. L'humidité affecte souvent les échantillons judiciaires et favorise la dégradation du matériel génétique. C'est pourquoi, il est recommandé de sécher un échantillon dès qu'il est recueilli afin de le conserver.

Les échantillons références sont généralement constitués de quelques gouttes de sang prélevées à l'aide d'une légère ponction au bout du doigt et déposées et séchées sur un buvard blanc. Des écouvillons buccaux et des racines de cheveux sont aussi utilisés comme échantillons de références. Parfois, le sang est prélevé en plus grande quantité. Le tube de prélèvement doit contenir de l'EDTA (acide éthylénediamine tétraacétique) pour prévenir les la coagulation et empêcher les enzymes du sang ou les micro-organismes d'endommager l'ADN durant l'entreposage (Baechtel, 1988).

#### 1.4.4. Nouvelle technologie

Suivant la tendance observée dans les dernières années, le Laboratoire de Sciences Judiciaires et de Médecine Légale (LSJML), du ministère de la sécurité publique du Québec utilise maintenant l'amplification de sites STR pour effectuer des expertises par l'analyse par de profils génétiques.

Le LSJML analyse dix sites génétiques en plus du site amélogénine qui permet d'identifier le sexe. L'étendue des tailles des fragments pour chacun des sites est illustrée à la figure 1.3. Les sites sont regroupés et amplifiés par PCR multiplex de la manière suivante:

Multiplex STR1 : D3S1358, HumD21S11, HumFGA

Multiplex STR2 : HumvWAFA31, HumTHO1, HumF13A1, HumFES/FPS

Multiplex STR3 : Amélogénine, HumD5S818, HumD13S317, HumD7S820

Les multiplex STR 1 (Frégeau et al. 1999) et STR 3 (Fourney et al. 1995) ont été développés par le laboratoire de la GRC tandis que le multiplex STR 2 a été mis au point par le Forensic Science Services (FSS) du Royaume Uni (Kimpton et al. 1993). Pour l'amplification, des amorces liées à des fluorochromes sont utilisées, c'est-à-dire qu'une des deux amorces encadrant le site à amplifier porte en son extrémité 5' un composé fluorescent. On utilise principalement deux fluorochromes, le 5-carboxyfluorescéine absorbant à des

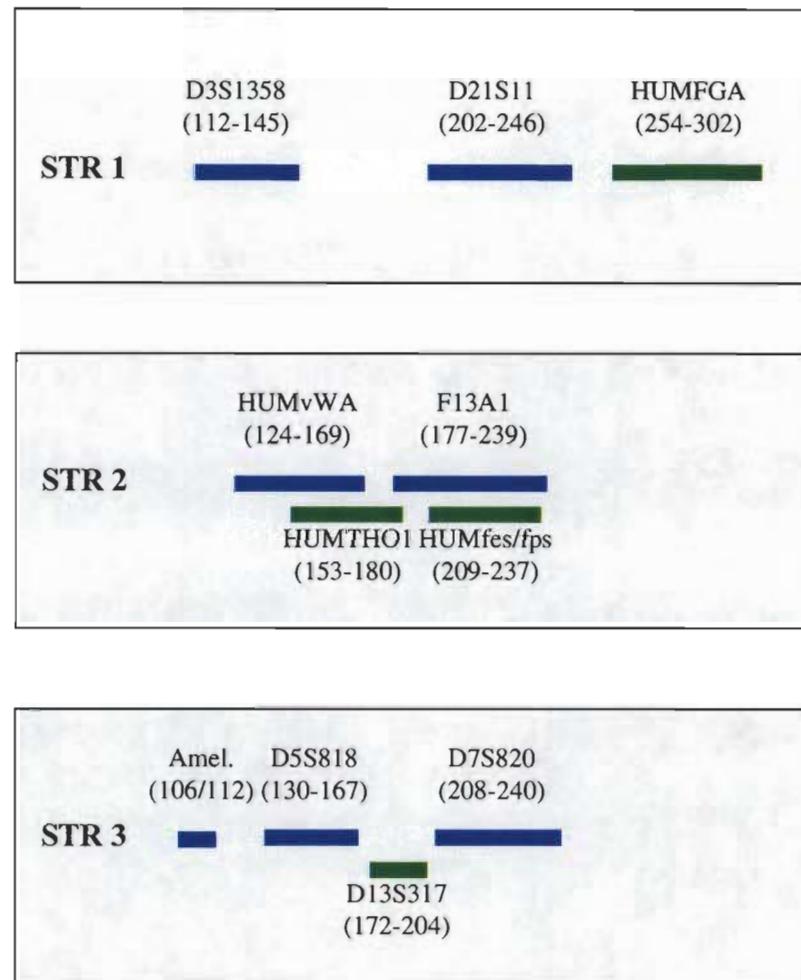
longueurs d'onde de 495 nm et émettant à 525 nm et le 2',7'-dimethoxy 4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescéine absorbant à 525 nm et émettant à 555 nm.

Les amplicons et les standards de tailles connues sont déposés sur un gel de polyacrylamide pour l'électrophorèse verticale. Le gel est placé dans un appareil 377 DNA Sequencer de la compagnie Perkin-Elmer Applied Biosystems. Lorsque les fragments d'ADN atteignent le bas du gel, un laser à l'argon excite les fluorochromes liés aux amorces. La lumière émise est transmise à une caméra qui digitalise le signal, puis séparée par un spectrographe. Le système est lié à un logiciel qui crée une image virtuelle du gel (figure 1.4). Le logiciel d'analyse établi une courbe de régression à partir des fragments standards en associant la longueur au temps écoulé pour atteindre le système de détection. La taille des amplicons est ensuite déterminée par interpolation.

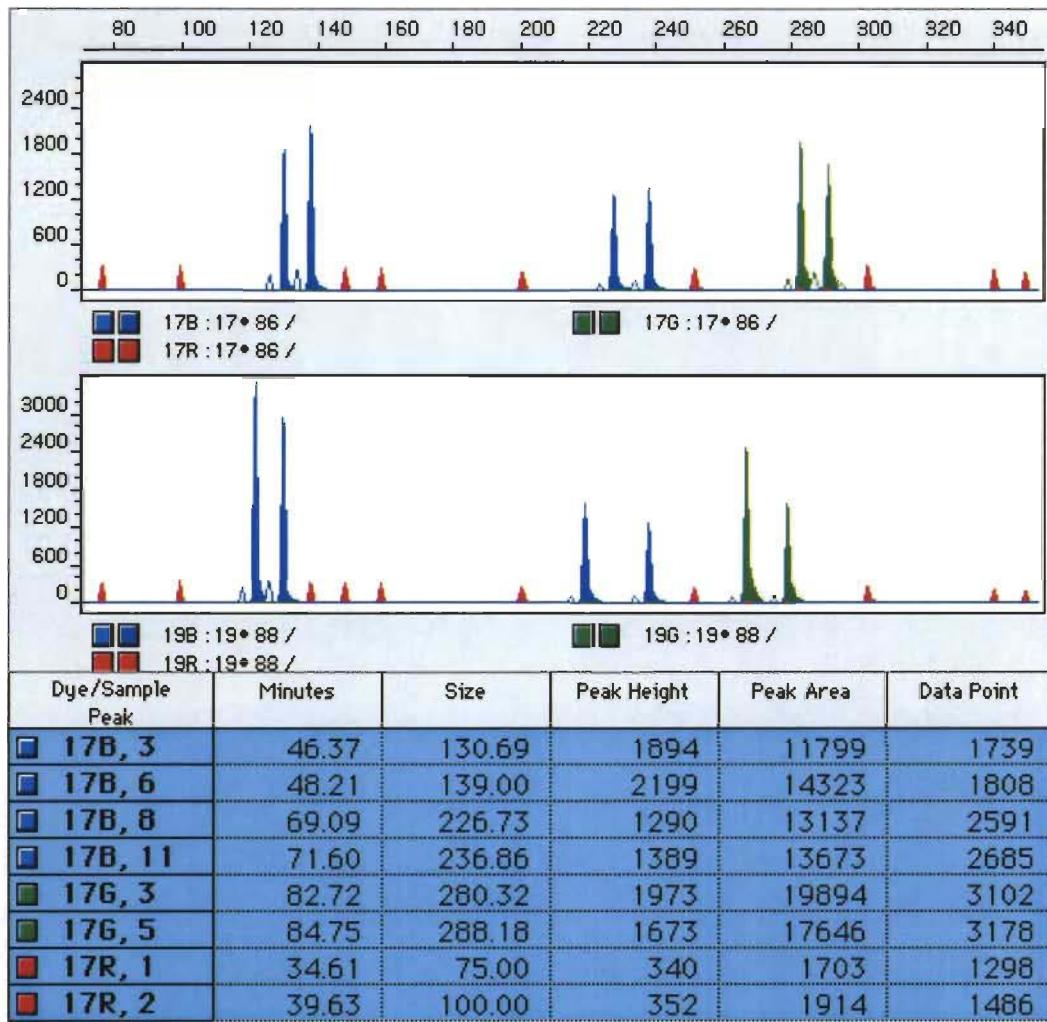
Cette nouvelle technologie permet d'obtenir une excellente résolution des fragments d'ADN et d'établir des profils génétiques dans des délais beaucoup plus courts. L'analyse qui prenait de deux à trois semaines par RFLP peut être effectuée dans un délai de deux jours en produisant des profils tout aussi discriminants.

La technologie continue de se développer et la validation de la trousse commerciale Profiler Plus de la compagnie Perkin-Elmer, permettant l'analyse simultanée de neuf sites génétiques ('neufplex'), vient d'être complétée au LSJML. Ces sites font l'objet d'un consensus puisque la grande majorité des laboratoires judiciaires en Amérique du Nord les

ont adoptés ou le feront prochainement. Par ailleurs, le parlement fédéral a récemment adopté le projet de loi C-3 portant sur la création d'une banque des données contenant les profils génétiques d'individus condamnés pour des crimes violents et les profils provenants de cause non résolues. Ceci facilitera la comparaison de résultats obtenus par les différents laboratoires, un développement non négligeable dans un contexte où la criminalité ne connaît pas de frontières.



**Figure 1.3. Sites STRs amplifiés au LSJML.** L'analyse de ces dix sites génétiques en trois réactions permet l'obtention de profils génétiques dont la fréquence combinée varie de  $1/186 \times 10^6$  à  $1/7 \times 10^{42}$  selon la combinaison d'allèles observés. Le locus 'Amélogénine' (Amél.) du multiplex STR-3 permet de déterminer le sexe. Entre parenthèse est indiquée la longueur des amplicons en nucléotides.



**Figure 3.4. Électrophorégrammes générés par le logiciel d'analyse Genescan Analysis**

**2.1.** Chacun des deux électrophorégrammes représentent un échantillon d'ADN amplifié à l'aide du multiplex STR-1 dont les amplicons ont été séparés sur un appareil Genescanner 377 de Applied Biosystems (ABD). Les allèles des sites D3S1358 et D21S11 apparaissent en bleu et les allèles du site HumFGA en vert, alors que les pics rouges indiquent les fragments de taille connue marqués avec 6-carboxy-X-rhodamine. Les amores fluorescentes incorporées aux amplicons ainsi que les fragments étalons, sont détectés lorsqu'ils passent devant une caméra numérique placée à l'extrême cathodique du gel. Le logiciel d'analyse établi une courbe de régression à partir des fragments étalons en associant la longueur au temps écoulé. La taille des amplicons est ensuite déterminée par interpolation ('size' dans le tableau sous les électrophorégrammes). L'intensité de la fluorescence ('peak height' et 'peak area' reflète la quantité de produit amplifié.

## CHAPITRE 2

### OBJET DE L'ÉTUDE

Le but de ce travail est de mettre au point des protocoles rapides et simples d'extraction de l'ADN provenant de différents types de cellules déposées sur diverses surfaces. Ces protocoles visent à minimiser les manipulations lors de l'extraction et à obtenir des rendements optimaux en ADN. L'ADN obtenu devra être de qualité satisfaisante pour établir un profil génétique par amplification de sites variables. Les résultats seront comparés à ceux obtenus par l'extraction phénol/chloroforme d'ADN suivant le protocole en usage au Laboratoire de Sciences Judiciaire et de Médecine Légale.

Les types d'échantillons biologiques soumis à l'étude sont fréquemment analysés en biologie judiciaire et présentent des problèmes à l'extraction ou à l'amplification. Il s'agit d'échantillons contenant peu de matériel génétique et/ou qui sont retrouvés sur des substrats qui inhibent la réaction d'amplification. Enfin, certains prélèvements contiennent du matériel biologique provenant de plus d'un individu. Pour tous les échantillons étudiés, des alternatives à la méthode d'extraction ou aux conditions d'amplification seront proposées pour qu'il soit possible d'obtenir des profils génétiques interprétables.

En plus de leur rapidité, les protocoles proposés devront être économiques et permettre d'éviter l'utilisation de solvants organiques potentiellement nocifs à la santé. La réduction

du nombre d'étapes d'extraction devrait aussi minimiser les risques d'erreurs et d'inversion de tubes, une préoccupation majeure en biologie judiciaire.

## CHAPITRE TROIS

## ARTICLE

**Title: Single-tube DNA preparation protocols for commonly-encountered forensic samples**

**Submitted to: Journal of Forensic Sciences**

**Authors:**

Sarah Bourgoin, B.Sc. <sup>1, 2</sup>

Christian Linard, Ph.D. <sup>2</sup>

Jean Bergeron, Ph.D. <sup>1</sup>

Vahé Sarafian, Ph.D. <sup>1</sup>

Christine Jolicoeur, Ph.D. <sup>1</sup>

France Mailly, Ph.D. <sup>1, \*</sup>

**Institution :**

1. Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale, Ministère de la sécurité publique, Montréal, Canada
2. Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada

\* Corresponding author

Presented in part at the 8th International Symposium on Human Identification

## ABSTRACT

STR (Short Tandem Repeats) loci are increasingly used to establish genetic profiles in the forensic setting. Highly discriminating profiles can be obtained from minute amounts of DNA through simultaneous amplification of STR sites (multiplex PCR). We have optimized rapid, single-tube DNA preparation protocols for a variety of frequently-encountered forensic-like samples. The aim was to obtain material amenable to multiplex PCR and fluorescent-based detection on the Perkin-Elmer ABD 377 DNA sequencer.

DNA was prepared from various cell types using blood and sperm stains on cotton, buccal swabs, vaginal lavages as well as cigarette butts and envelope flaps. Samples were incubated in standard amplification buffer plus various additives (proteinase K, dithiothreitol, NP-40/Tween® 20, SDS, NaOH). All results were compared to those obtained with the organic extraction protocol.

For all sample types, optimal preparation could be carried out in one to three hours and was generally found to provide a yield comparable or superior to that obtained by organic extraction. Samples containing blood were extracted using proteinase K while spermatozoa were digested with DTT and NaOH. For epithelial cell extraction, SDS and proteinase K were necessary with the addition of Tween®/NP-40 prior to amplification. Successful amplification and profile analysis were achieved using optimum preparations with sensitivity limits similar to organic preparations. This single-tube approach is economical and limits sample handling, thus reducing error risks and sample loss.

## KEYWORDS

Forensic science, single-tube DNA preparation, organic DNA extraction, multiplex PCR, short tandem repeats.

## INTRODUCTION

In forensic sciences, biological samples taken on the crime scene for the purpose of DNA identification are often exposed to conditions that do not favor their integrity. The presence of microorganisms, high humidity levels, exposure to sunlight and delay prior to recovery are factors that contribute to DNA degradation (Adams et al. 1991). In addition, the amount of genetic material to be recovered may be low. Therefore, it may not be possible to obtain genetic profiles from such samples using restriction fragment length polymorphism (RFLP) technology which requires at least 50 ng of high molecular weight DNA (10-20 kb) (Budowle 1988, Budowle and Baechtel 1990). In recent years, much progress has been achieved in characterizing a class of polymorphic DNA loci called short tandem repeats (STR) (Schumm et al. 1995, Urquhart et al. 1994). These can be studied using polymerase chain reaction (PCR) amplification of short (100 to 400 bp) DNA fragments. Minute amounts of partially degraded DNA (1 ng or less) can therefore be amplified to establish genetic profiles (Schumm et al. 1995, Allen et al. 1994).

Thousands of STR loci well distributed throughout the human genome, have been described, thus providing an important source of polymorphic markers (Edwards et al. 1991,

Edwards et al. 1992, Murray et al. 1994). These loci contain repeat sequences of 2-6 base pairs with the number of repeat units varying from a few to more than forty (Urquhart et al. 1994, Barber et al. 1996). Tetrameric repeat sequences have been shown to be particularly suitable for identification purposes. Rather than amplifying loci separately, primer sequences flanking several STR loci can be combined in a single amplification reaction (multiplex PCR) to further reduce the amount of genetic material required (Frégeau and Fourney 1993, Kimpton et al. 1993, Micka et al. 1996). Furthermore, the use of fluorescently labeled primers greatly improves sensitivity (Frégeau and Fourney 1993). For these reasons, multiplex PCR analysis of STR loci has become more widespread in forensic laboratories.

In forensic biology, DNA extraction prior to amplification is particularly critical when samples contain few nucleated cells. Biological material may be deposited on a variety of surfaces, which may impede DNA recovery, or the biochemical processes of the amplification reaction. Ideally, the DNA preparation method used should efficiently extract all of the sample's DNA, avoid numerous manipulations which increase the likelihood of sample mix-up, and eliminate contaminants that may interfere with amplification. Organic extraction using phenol and chloroform followed by a purification/concentration step on microconcentrators is widely used (Comey et al. 1994, Schwartz et al. 1990, Koblinsky 1992) and has generally been shown to give superior results when compared to other protocols of DNA preparation such as Chelex<sup>®</sup>100 resin extraction or commercial DNA purification kits (Jung et al. 1991). However, the organic extraction method requires many steps of sample handling like cell digestion, protein extraction and DNA purification that raise the risk of sample mix-up or sample contamination by crime-laboratory personnel.

Additionally, the use of volatile and potentially harmful solvents is inconvenient. Finally, in spite of the purification step included in the organic extraction protocol, biological material deposited on a variety of substrates (or matrices) is not always amplified satisfactorily. Dark denim, envelope flaps, stamps and cigarette butts are well-known to contain inhibitors of the amplification reaction (Del Rio et al. 1996, Fridez and Coquoz 1996, Sparkes et al. 1996, Comey and Budowle 1991). Additional purification such as the use of ion-exchange resins (Sepharose) may be successfully applied to DNA solutions extracted from dark fabrics to obtain interpretable DNA profiles (Shutler et al. 1999).

In the present study, we have optimized single-tube DNA preparation for reference and forensic-type samples without the use of organic solvents. Bloodstains, semen stains and buccal epithelium were subjected to direct extraction while a multi-step differential extraction procedure was developed for mixed semen and vaginal epithelium samples, allowing the separate recovery of DNA from the male and female contributors. To compare DNA yield, samples were extracted in parallel using the standard organic method while the quality of DNA preparations was evaluated by multiplex amplification of loci D3S1358 (Li et al. 1993), D21S11 (Sharma and Litt 1992) and HumFGA (Mills et al. 1992) as developed by the RCMP Central Forensic Laboratory (Ottawa, Canada) (Frégeau et al. 1997). Our results show that a rapid, single-tube procedure is suitable for a wide range of forensic samples and suggest approaches to reduce the impact of PCR inhibitors that co-purify with DNA.

## MATERIAL and METHODS

### Sample Preparation

#### *Reference-like or control samples*

Different biological substances, representative of those submitted for comparison with questioned forensic samples, were obtained from known donors. Blood collected in EDTA tubes was spotted (2 or 50 µl) on white cotton. Frozen semen was thawed rapidly and also deposited on white cotton (2 µl aliquots). Fresh buccal epithelium was obtained using a cotton swab, followed by soaking at room temperature with agitation in enough PBS to cover the swab (approx. 150-200 µl). After several hours, the suspension was aliquoted and frozen until required. Plucked hair roots with a visible sheath were collected in Eppendorf tubes (root plus 0.5 cm shaft).

#### *Forensic-like samples*

Commonly encountered forensic samples were simulated. EDTA blood was deposited on black denim fabric (2 or 50 µl), natural wood and varnished wood (2 µl). Frozen semen was thawed and spotted (2 µl) on black denim fabric or added to casework vaginal lavages previously shown by microscopy to be sperm negative (1 µl/ml of vaginal lavage). Epithelial cells were recovered from cigarette butts and envelope flaps by soaking the paper matrix at room temperature in approximately 5 mls physiological solution (0.9% NaCl) for 1 hour with some agitation (Liechti-Gallati and Neeser 1996) followed by aliquoting of the

supernatant in known volumes (600  $\mu$ l). True forensic samples included sperm-containing vaginal lavages (confirmed by microscopic detection of sperm cells) and blood (unknown amount) deposited on a piece of leather that was cut in 3 mm<sup>2</sup> pieces.

Blood, semen and epithelial cells deposited on solid supports were air-dried prior to digestion, for both reference and forensic-type samples.

#### Single-tube Extraction Protocols

The composition of the digestion solution and the extraction conditions varied according to the biological sources. The primary digestion solution consisted of PCR buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1  $\mu$ g/ml gelatin) to which proteinase K, non-ionic detergents (Tween® 20/NP-40), sodium dodecyl sulfate (SDS), NaOH or dithiothreitol (DTT) might be added (Higuchi 1989, Richards et al. 1993, Gill et al. 1985, Goldenberger et al. 1995). The final reaction volume for DNA isolation was approximately 100  $\mu$ l. Once extracted, samples were kept at -20°C.

#### *Blood*

Bloodstains on cotton or leather were washed two or three times with a sucrose solution (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100) (Higuchi 1989) to remove hemoglobin released from lysed red blood cells. The cotton was then removed, the lysate spun and the pellet washed once with 600  $\mu$ l of PBS (145 mM NaCl, 66 mM

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0). The digestion solution consisting of approximately 100 µl of PCR buffer with proteinase K (final concentration 30 µg/ml) and Tween® 20/NP40 (0.45% final concentration each) was added to the pellet and incubated one hour at 55°C (Higuchi 1989). Proteinase K was inactivated by heating at 95°C for ten minutes. Bloodstains on wood were recovered by scraping the surface followed by processing as outlined above.

#### *Semen*

Sperm samples on cotton were digested in 90 µl PCR buffer plus 10 µl 40 mM DTT for one hour at 55°C (Gill et al. 1985). Five microliters of 1M NaOH were added to the cell lysate, which was heated at 95°C for five minutes and neutralized thereafter with 10 µl 1M Tris-HCl pH 8.0. Sperm samples spotted on denim were handled similarly except that 1.6 mM DTT was added to the PCR buffer.

#### *Hair roots*

One hundred microliters of PCR buffer with Tween® 20/NP40 (0.45% final concentration each) and proteinase K (final concentration 200 µg/ml) was added to each tube containing a hair root (Higuchi 1989). The digestion was carried out for one hour at 55°C. Following the addition of 1 M NaOH (2.5 µl), the lysate was heated at 95°C for ten minutes and neutralized with 5 µl Tris-HCl pH 8.0.

*Epithelial cells on buccal swabs, envelope flaps and cigarette butts*

Epithelial cell suspensions prepared as described above were digested in 100  $\mu$ l of 50 mM NaOH for five minutes at 95°C and the lysate was neutralized with 5  $\mu$ l 1M Tris-HCl pH 8.0 (Richards et al. 1993).

*Vaginal lavages containing semen*

Vaginal lavages were centrifuged to form a pellet containing epithelial cells and spermatozoa and the supernatant discarded. The digestion solution (100  $\mu$ l) containing PCR buffer, 0.2% SDS and proteinase K (200  $\mu$ g/ml final concentration) (Goldenberger et al. 1995) was added to the cell mixture and incubated one hour at 55°C. Following a centrifugation step (three minutes at 13,000 g), the supernatant containing epithelial cell DNA was recovered and the pellet was digested once more as described above for 20 minutes. Sperm cells were pelleted, the supernatant collected once again and proteinase K was heat inactivated in both supernatants. The pellet containing the spermatozoa was washed three times with PBS and thereafter was digested with PCR buffer and 1.6 mM DTT for one hour at 55°C. This was followed by incubation with NaOH and neutralization as described above.

### Organic extraction

For all biological sources, the composition of the digestion solution was the same (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K) except that DTT (40 mM final concentration) was added to hair roots and sperm-containing samples (Comey et al. 1994, Gill et al. 1985). Digestion was carried out in a 400  $\mu$ l volume. Cells were digested at 56°C overnight except for vaginal lavages where a differential digestion was performed. The pellet containing epithelial cells and spermatozoa was digested for three hours at 37°C in the presence of proteinase K. Following centrifugation, the supernatant containing vaginal cell DNA was retrieved and saved. A second digestion under the same conditions was performed for 20 minutes to ensure that all epithelial cells had been digested. The spermatozoa pellet was washed with PBS then digested overnight at 56°C with a digestion solution containing proteinase K and DTT. Proteins were extracted from the lysates with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24 :1). Tubes were mixed by inversion and centrifuged. The aqueous upper-phase solution containing DNA was retrieved and passed through a Microcon membrane 100 (Microcon<sup>TM</sup> Amicon, Beverly, MA) with DNA being retained on the membrane by virtue of its high molecular weight. Following two washes with water, the membrane was inverted and DNA was eluted in 25  $\mu$ l TE buffer (2.5 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.25 mM EDTA).

### Sepharose purification step

Some DNA samples obtained from biological fluids deposited on dark denim and prepared by the organic or single-tube procedures were further purified. Thiopropyl-Sepharose 6B resin (Pharmacia) was added to samples after DNA extraction (1:1, v/v) (Williamson et al. 1996) and mixed by inversion. The suspension was centrifuged and the supernatant containing the purified DNA was collected. This could be repeated three times or until no more dye was visible in solution.

### DNA quantification

Denatured DNA (2-5  $\mu$ l DNA in 200  $\mu$ l denaturing solution, 0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl) was immobilized on a nylon membrane through the use of a slot blot apparatus (Schleicher and Schuell) (Waye et al. 1991) and hybridized with a human-specific chemiluminescent probe (D17Z1) from a commercial DNA quantification kit (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA). Following exposure on Kodak XAR5 X-ray film, the amount of genetic material was evaluated by comparison of DNA samples with known standards provided with the kit.

### DNA preparation for amplification

Samples prepared with single-tube protocols were not purified unless specified so that lysis reagents potentially detrimental to the amplification process were added to the PCR reaction. To test the effect of lysis reagents on amplification, some of the DNA solutions were diluted with the reagents used for single-tube extraction or with TE 0.25X (for phenol/chloroform extracted samples) to achieve DNA concentrations of 1, 0.5, 0.25 and 0.1 ng/ $\mu$ l.

### Amplification conditions

Unless indicated, 0.5 ng of DNA was amplified. DNA and double distilled water were added to 11  $\mu$ l PCR reaction mixture for a final volume of 16  $\mu$ l. The reaction mixture consisted of 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.001% (w/v) gelatin, 0.13 mM dNTP, 0.082  $\mu$ M oligonucleotide primers D3S1358F and D3S1358R, 0.29  $\mu$ M of primers D21S11F and D21S11R, 0.205  $\mu$ M of primers HumFGAR and HumFGAF, 0.15 mg/ml BSA and 1U AmpliTaq® Gold) for thirty cycles. One primer per pair was tagged with fluorescent dye JOE or FAM (Table 3.1). All unlabelled primers and primers tagged with FAM were purchased from UCDNA (University of Calgary), while D3S1358 primers and those tagged with the dye JOE were purchased from Perkin-Elmer (Foster city, CA). AmpliTaq® Gold polymerase was also obtained from Perkin-Elmer. For samples prepared in the presence of SDS, NP40/Tween® 20 (1:1) at 0.5% was added to the

amplification buffer (Goldenberger et al. 1995). Perkin-Elmer GeneAmp 9600 thermal cyclers were used for amplification. Following initial enzyme activation for 12 minutes at 95°C, thirty cycles of denaturation at 95°C for 45 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 75°C for 30 seconds were carried out. Thereafter, the reaction was held at 60°C for 30 minutes and then at 22°C overnight.

#### PCR product analysis

For DNA fragment separation, 1.5 µl of PCR product was mixed with 4.5 µl of loading buffer which consisted of 108 mg urea and 16 µl GeneScan-350, 6-carboxy-X-rhodamine-labelled size standard (Perkin-Elmer) added to 100 µl 2X TBE, 20 mM EDTA, 20 mg/ml blue dextran. Samples were denatured at 95°C for two minutes and 1.5 µl was loaded on a 0.2 mm denaturing polyacrylamide gel (4% polyacrylamide 19:1, 1X TBE, 0.05% APS, 6 M urea) with a 12 cm well-to-read distance. Electrophoresis was carried out on a ABI Prism™ 377 DNA Sequencer under the control of ABI data collection program version 1.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The GeneScan 2.1 software (Perkin-Elmer Applied Biosystems) was used to detect and size the alleles. Fluorescence intensity (allelic peak heights) was used to evaluate the amplification of DNA. For each locus, peak heights were averaged for heterozygotes or halved for homozygotes and then were corrected for variations in loading volume by standardizing against the fluorescence value assigned to the 200-nucleotide fragment of the size standard.

**TABLE 3.1. Multiplex primer characteristics.** PCR primers tagged with fluorescent dyes FAM (5-carboxyfluorescein) or JOE (6-carboxy-2',7'-dimethoxy-4',5'dichlorofluorescein) are indicated with an asterisk.

Locus	Chromosome location	PCR primers	Repeat unit	Ref.
D3S1358	3p	ABD proprietary, labeled with FAM	<b>AGAT</b>	Li et al. 1993
D21S11	21q21	5' GTGAGTCAATTCCAAG 3' *5' <b>FAM</b> GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC 3'	<b>TCTG/</b> <b>TCTA</b>	Sharma et Litt 1992 GenBank M84567
HumFGA	4q28	*5' <b>JOE</b> CCATAGGTTTGAACTCACAG 3' 5' CTTCTCAGATCCTCTGACAC 3'	<b>TCTT</b>	Mills et al. 1992 GenBank M64982

## RESULTS

The efficiency of single-tube protocols for the recovery of DNA from various cell types was first evaluated by comparison with the organic method. Blood, sperm, hair, buccal cells on cotton swabs and vaginal epithelium samples prepared as described were divided in two categories, reference and forensic-type. DNA quantification results are presented in Table 3.2. Given the limitations of the methodology, differences between the organic and single-tube protocols were considered insignificant when overlaps in range values were observed.

For reference-like samples, DNA yields obtained by either method were approximately equivalent for small quantities of blood and semen on cotton. With large blood stains (50  $\mu$ l), the single-tube extraction protocol gave slightly superior results. In contrast, DNA was recovered less efficiently from buccal swab samples. Yields cannot be readily compared for hair roots because of variation between individual hair but DNA was obtained with both protocols (Table 3.2).

DNA was successfully recovered from simulated, commonly encountered forensic samples involving blood and yields were similar with both methods. These included blood on denim, leather and varnished wood. For sperm deposited on denim, the single-tube protocol appeared slightly superior while no clear differences were detected for sperm or epithelial fractions extracted from vaginal lavages. In contrast, the standard organic method

appears to produce superior results for epithelial cells on envelope flaps substrate (Table 3.2). Finally, insufficient DNA amounts (less than 10 ng) were obtained from cigarette butts with either protocol so that meaningful comparisons could not be carried out. Clearly, DNA-containing cells were not recovered efficiently from the filter paper with the soaking procedure used.

#### *Effect of lysis solution on amplification*

To evaluate the quality of DNA preparations obtained by single-tube protocols, blood, semen and buccal swab samples were subjected to amplification in parallel with organically extracted samples. DNA solutions obtained with single-tube protocols were not further purified so that all lysis reagents used were added to PCR reactions. Amplification signals were compared by plotting the average fluorescence intensity for each locus (after standardizing with ROX 200-nt fragment) as a function of the amount of DNA added to the amplification reaction. Two sets of samples were used: in the first set, the desired DNA amount was prepared in 2  $\mu$ l of the appropriate lysis solution for single-tube samples (and TE for organically extracted samples), in the second set, in 0.25  $\mu$ l. This experiment was designed to identify possible detrimental effects of lysis reagents on the amplification reaction.

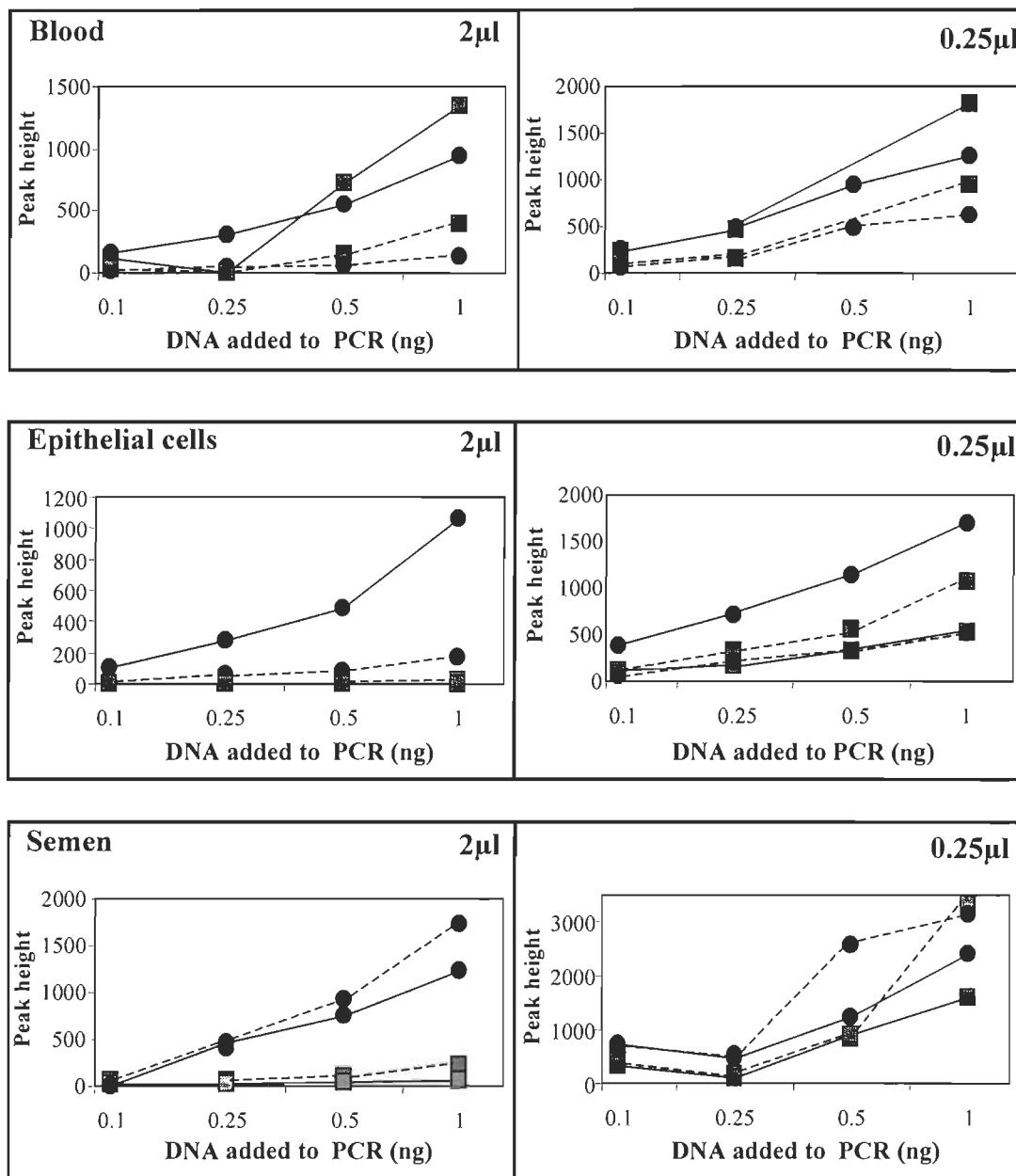
Figure 3.1 shows results obtained at locus D21S11 and D3S1358. Results for locus HumFGA were very similar to those obtained with D21S11 and are not shown for clarity. Fluorescence intensity of PCR products generated from blood DNA is shown in the upper

panels of Figure 3.1. When 2  $\mu$ l of DNA were added to PCR reactions (upper left panel), no differences were observed between the extraction protocols while fluorescence levels were higher at locus D21S11 compared to locus D3S1358. Adding only 0.25  $\mu$ l improved the signal at locus D3S1358 for both protocols although values remain below those obtained for D21S11 (upper right panel).

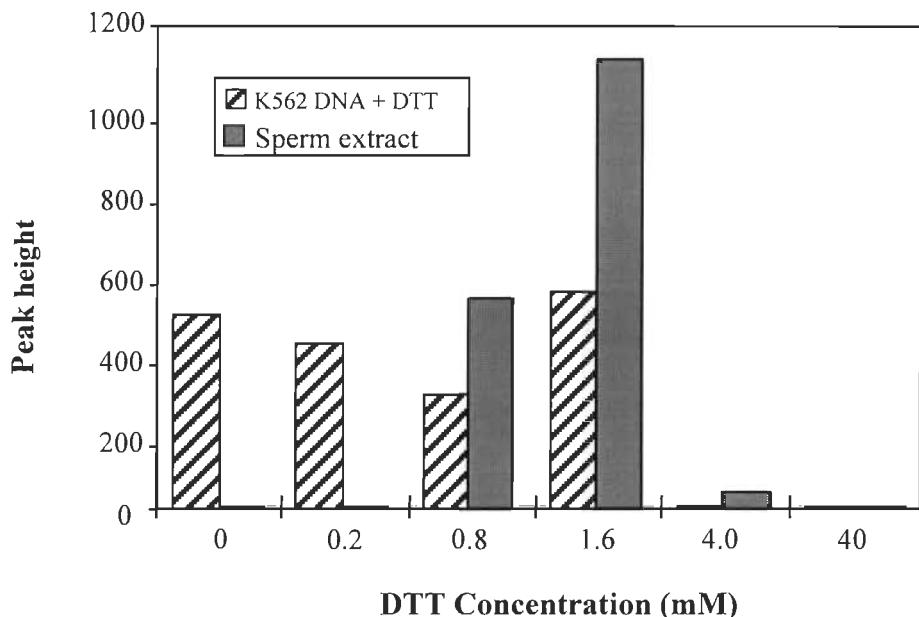
Results obtained with DNA samples prepared from buccal epithelium and semen (Figure 3.1, middle and lower panels) were markedly different than those obtained with blood. When 2  $\mu$ l was added to PCR reactions, both D21S11 and D3S1358 loci failed to amplify in epithelial cell DNA extracts prepared using single-tube protocols (middle left panel) while for semen DNA preparations, the amplification signal was very weak (lower left panel). By comparison, strong amplification signals were obtained for 2  $\mu$ l additions of organic DNA preparations except for locus D3S1358 in epithelial cell DNA (middle and lower left panels). However, the amplification inhibition observed for single-tube DNA preparations was completely reversed by the addition of DNA in a small concentrated volume (0.25  $\mu$ l) with satisfactory to strong fluorescence levels detected for all preparations (middle and lower right panels). Taken together, these results clearly show that some of the lysis reagents used in single-tube preparations hinder the amplification process. For semen samples in particular, high concentrations of DTT, NaOH and Tris-HCl might contribute to the inhibition. While the impact of excess salt on amplification has been documented (Gelfand 1989, Saiki 1989), little is known about the effect of DTT.

**Table 3.2. DNA yield obtained from reference and forensic-type samples.** Comparison of optimum single-tube protocols with the standard organic extraction method. Results are expressed in nanograms of DNA per  $\mu$ l of biological fluid for blood and sperm or per sample for other types of material. Values shown represent the range for a minimum of three separate determinations. Blood and sperm samples (excluding vaginal lavages) originated from single donors and represent replicates.

Samples	Extraction protocols	
	Organic	Single tube
<b>Reference type samples</b>		
Blood on cotton (2 $\mu$ l)	55-70	80-90
Blood on cotton (50 $\mu$ l)	40-60	145-160
Sperm on cotton (2 $\mu$ l)	200-400	150-300
Buccal swabs	550-1050	120-360
Hair roots	Variable	Variable
<b>Forensic type samples</b>		
Blood on jeans (2 $\mu$ l)	40-80	20-60
Blood on jeans (50 $\mu$ l)	60-90	25-60
Blood on leather	200-210	80-230
Blood on varnished wood (2 $\mu$ l)	20-45	35-50
Sperm on jeans (2 $\mu$ l)	125-190	250-420
Cigarette butts	0-9	0-5
Envelope flaps	60-480	15-105
Vaginal lavages	1400-4800	2000-4000
and sperm (1 $\mu$ l/ml of lavage)	215-370	150-270
Vaginal lavages	15-2225	10-2000
and sperm (forensic cases)	0-155	10-265



**Figure 3.1. Effect of DNA concentration on the amplification signal.** Fluorescence intensity (peak height) at loci D3S1358 (dotted lines) and D21S11 (continuous lines) was measured as a function of DNA volume added to the amplification reaction and of source (blood/sperm on cotton and buccal swabs). DNA was extracted by the organic (P/C) (circles) or the single-tube (S-T) (squares) protocol and amplified. Values represent the mean of at least three separate determinations. Results for locus FGA were similar to that obtained with D21S11 and only the latter are shown for convenience.



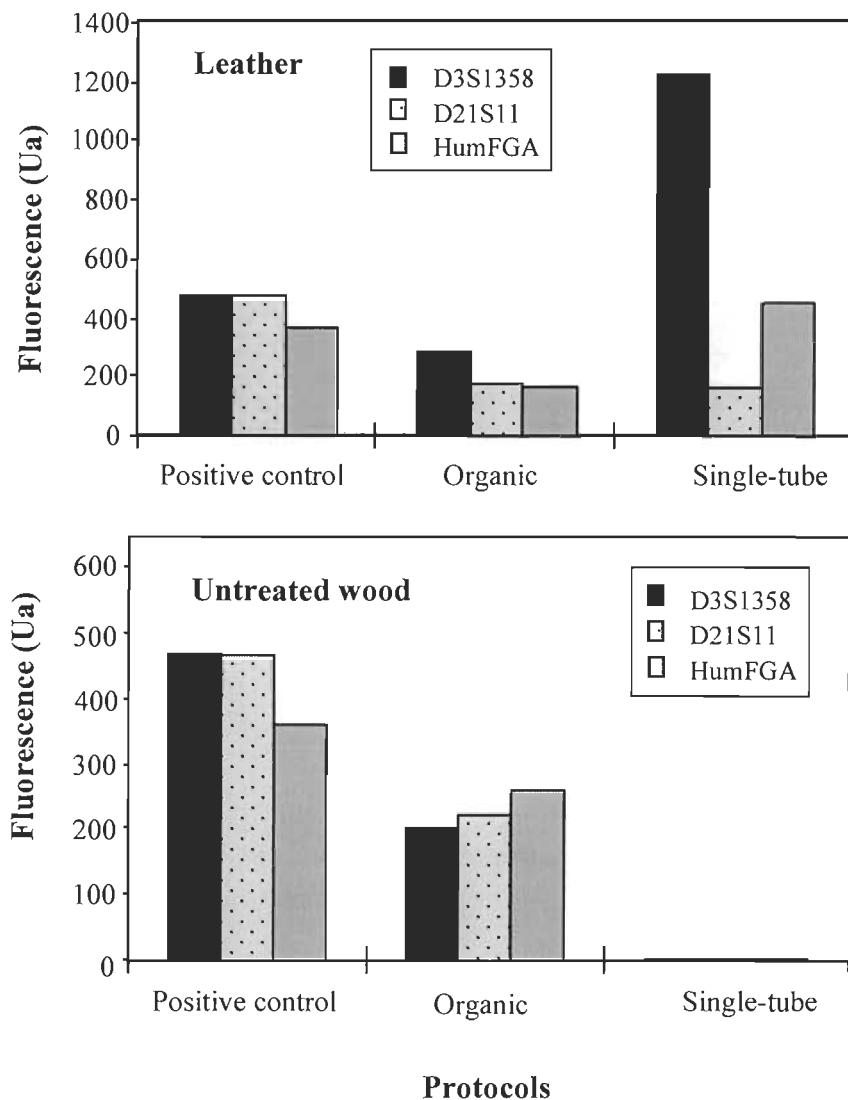
**Figure 3.2. Effect of DTT concentration on DNA amplification.** DNA was prepared from semen on cotton (2  $\mu$ l spots) using the rapid extraction protocol in the presence of increasing amounts of DTT. DNA extracts were then subjected to amplification (filled bars). In parallel, amplification reactions were set up with K562 DNA and increasing amounts of DTT (hatched bars) to match the concentration obtained when amplifying each sperm extract. Peak heights at locus D21S11 were used for comparison.

### *Effect of DTT*

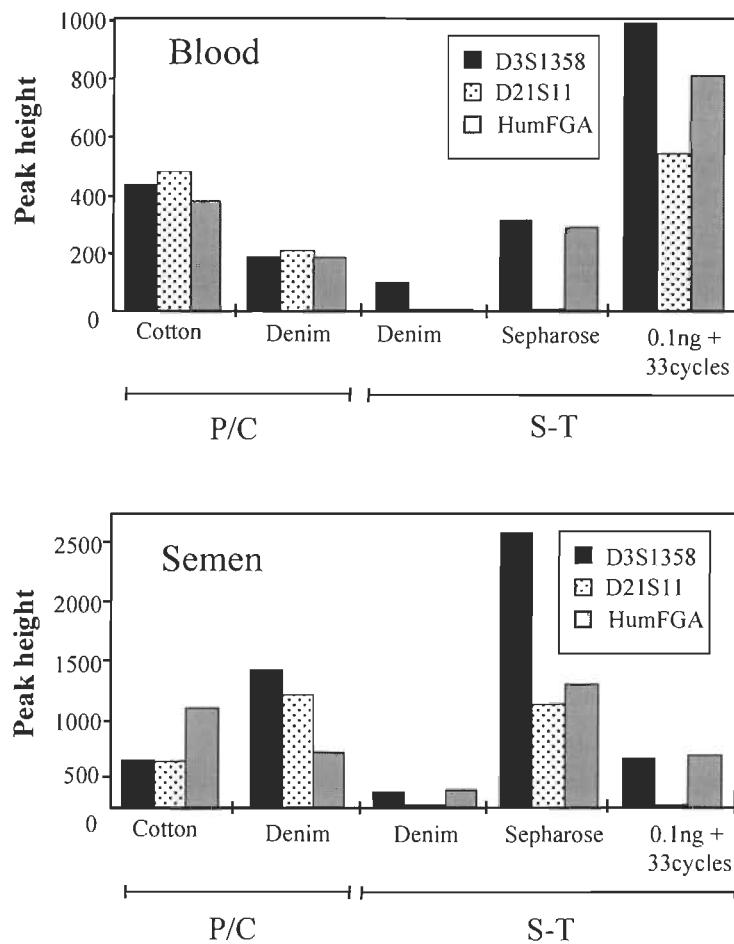
To further evaluate its possible inhibitory action, DTT at six different concentrations (0 to 40 mM) was added to DNA solutions (at 0.1 ng/ $\mu$ l) prepared from the K562 human cell line to mimic lysis conditions. Under these conditions, we determined that a concentration of 4.0 mM or above resulted in inhibition of amplification (Figure 3.2). In parallel, sperm samples spotted on cotton were exposed to the same DTT concentrations and 5  $\mu$ l aliquots were amplified. Sperm cells prepared at concentrations below 0.8 mM failed to amplify, suggesting no cell lysis. Based on these data, 1.6 mM DTT was added to lysis solutions for subsequent experiments as it is sufficient to extract DNA from sperm cells and does not appear to adversely affect amplification.

### *Substrate effects*

Amplification of DNA prepared from blood deposited on wood and leather was attempted. Fluorescence peak heights were compared for single-tube and organic preparations using wood and leather as test substrates. Blood spotted on cotton and subjected to organic extraction was used as a positive control. Successful amplification at all three loci was achieved for both the organic and single-tube DNA solutions obtained from blood on leather (Figure 3.3, upper panel). Fluorescence levels for the organic preparation appeared slightly lower than those observed for the positive control although the difference may not be significant. More importantly however, a marked imbalance in the relative intensity of D3S1358 and D21S11 loci was observed for single-tube preparations



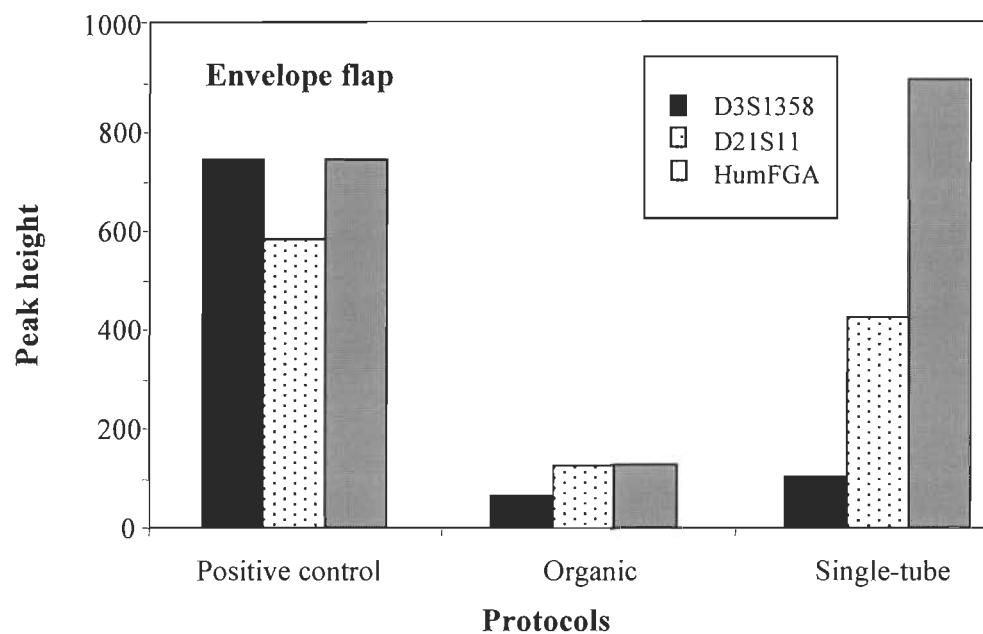
**Figure 3.3. Amplification of DNA from blood deposited on leather or wood substrate.** DNA was recovered from blood stained leather (upper panel) or untreated wood (lower panel) using either the organic or single-tube protocol and amplified. Similar amounts of DNA were recovered with both methods (approx. 40ng). Blood on white cotton extracted using the organic method was used as a positive control. Samples were processed in duplicate.



**Figure 3.4. Effect of denim dye on amplification.** DNA was recovered from blood (upper panel) and semen (lower panel) spotted on black denim using the organic (P/C) or single-tube (S-T) procedure and first amplified under standard conditions. Blood on white cotton extracted using the organic method was used as a positive control. DNA samples prepared with the single-tube method were either purified with Thiopropyl Sepharose 6B resin (Sepharose) or subjected to amplification under modified conditions (0.1ng for 33 cycles)(right-hand side of both panels). Values represent the mean of three separate determinations.

with a large increase in D3S1358 signal compared to the control sample. In some samples, this could lead to loss of D21S11 signal. When varnished wood was used as a substrate, no differences were observed between the control and test samples with all three loci amplifying equally well (data not shown). In contrast, when blood was spotted on untreated wood, amplification products were undetectable for the single-tube preparation even though sufficient DNA had been recovered (Figure 3.3, lower panel). The organic preparation yielded satisfactory amplification signals at all loci, though peak heights were lower compared to control values.

We next tested a commonly-encountered forensic sample. DNA was prepared from blood and semen spotted on dark denim material to evaluate the effect of a dark dye on amplification. PCR data from single-tube preparations were compared with control samples spotted on white cotton or dark denim followed by organic extraction. For single-tube blood samples on dark denim, the amplification signal was markedly poorer compared to organically prepared samples on cotton or denim with no detectable fluorescence at loci D21S11 and HumFGA and a lower peak height value for site D3S1358 (Figure 3.4, upper panel). Similar results were observed for semen samples prepared by the single-tube method, with complete inhibition at site D21S11 and markedly decreased values at loci D3S1358 and HumFGA (Figure 3.4, lower panel). Organic DNA preparations for blood or semen spotted on dark denim produced results that were similar or slightly superior to those obtained with samples on cotton. To improve the amplification of single-tube samples, two



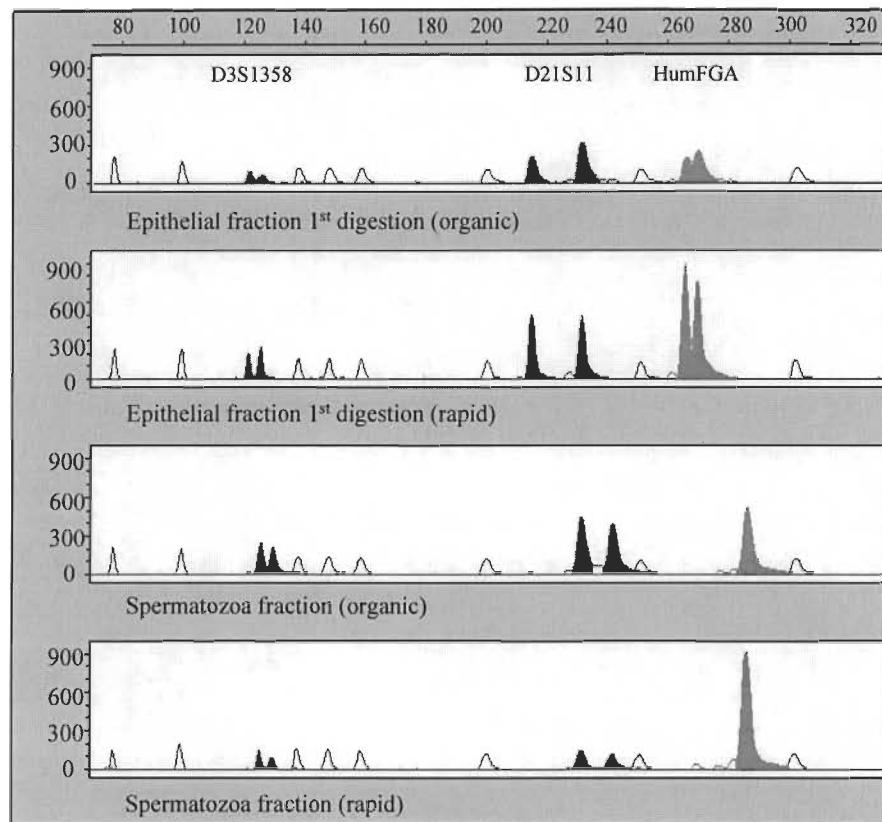
**Figure 3.5. Amplification of epithelial cell DNA recovered from envelope flaps.**  
DNA was extracted with either the organic or the single-tube protocol. DNA preparations (0.1 ng) were subjected to 33 cycles of amplification and compared to control K562 DNA. The data shown represent the mean of three values.

approaches were attempted. Portions of the DNA preparations were purified on Sepharose 6B resin prior to amplification. This compound has the property to bind negatively charged dyes in solution. Alternatively, amplification reactions were set up using 0.1 ng (rather than 0.5) of the original DNA preparations to reduce the input of presumed PCR inhibitors and carried out for thirty-three cycles. For blood preparations, the purification step resulted in control level signals at loci D3S1358 and HumFGA while failing to relieve the observed inhibition on site D21S11. In contrast, the Sepharose purification step markedly improved the amplification of semen preparations at all loci (above control levels). The modification of the amplification protocol (0.1 ng for thirty-three cycles) had the reverse effect: for semen samples, inhibition was still observed at locus D21S11 with some improvement at the other two loci while blood samples showed fluorescence values above control levels at all loci.

DNA preparations obtained from epithelial cells deposited on envelope flaps often fail to produce complete genetic profiles, even following organic extraction. This is often probably due to the fact that a limited amount of genetic material is recovered along with several chemicals presumed to prevent the amplification process. Not surprisingly, we were unable to detect any amplification using 5  $\mu$ l from a dilute (0.08 ng/ $\mu$ l), single-tube preparation under our standard conditions. Another experiment was set up using only 0.1 ng DNA and increasing the number of cycles to thirty-three. Results are shown in Figure 3.5. In these conditions, peak height imbalance between loci was apparent. Loci HumFGA and D21S11 showed peak fluorescence levels comparable to control DNA, slightly above and

below control levels respectively while the D3S1358 signal was greatly reduced. Samples prepared using the organic method produced a low, balanced signal.

Finally, we tested our single-tube approach for its ability to resolve genetic profiles from epithelial and sperm cell mixtures. Vaginal swabs and lavages are among the most frequently encountered samples in forensic biology and the proportion of male to female DNA is often very small. To separate the two cell types and distinguish the contributors, non-probative casework vaginal lavages were subjected to a differential extraction procedure with the single-tube protocol and compared to a differential organic extraction. As described previously, both procedures involved two sequential digestions of the vaginal epithelium fraction, which allowed the efficient removal of female DNA from the sperm-containing fraction. Epithelial cell DNA from the first digestion and sperm DNA were then subjected to amplification. A representative electrophoregram for a single lavage is presented in Figure 3.6 where shaded areas represent allelic peaks from two distinct profiles. As shown in the second and fourth panels, the relative position of allelic peaks on the horizontal axis indicated that complete resolution of the male and female DNA profiles was achieved with the single-tube method. Signal intensity for the single-tube epithelial fraction was greater than the signal in the corresponding organic fraction (first and second panels). Between locus imbalance was apparent for the male DNA profile obtained with the single-tube protocol as seen for other sample types. Differential extraction with the organic method (first and third panels) also allowed the separation of profiles of male and female origin, as expected.



**Figure 3.6. Electrophoregram of amplified epithelial and sperm fraction DNA from vaginal lavages.** DNA was obtained by differential extraction of sperm-positive vaginal lavages with either a differential organic (first and third panels) or single-tube (rapid) (second and fourth panels) protocol as described. Shaded regions represent allelic peaks for D3S1358, D21S11 and HumFGA while the size markers appear as clear peaks. Fluorescence intensity (peak height) is on the y axis and fragment length in bases on the x-axis.

## DISCUSSION

Rapid, single-tube DNA preparation protocols have been combined and modified for the recovery of DNA from small forensic-like samples. The single-tube extraction protocol is particularly attractive in forensic science because it does not require the use of harmful organic solvents and it can reduce the risk of tube mix-ups. In addition, the method allows the production of good quality DNA in a maximum of three hours and is more economical than our standard organic method.

With the exception of buccal swabs and envelope flaps, single-tube protocols produced DNA yields generally equivalent or superior to the organic method. The nature of the cell type from which DNA was to be extracted determined the protocol to be used. While the requirement for DTT to lyse sperm cells is well known (Gill et al. 1985), it is interesting to note that NaOH was also necessary to efficiently extract DNA from sperm cells and epithelial cells in the absence of proteinase K. The protocol for the recovery of DNA from envelope flaps and cigarette butts still needs to be improved to obtain better yields. On cigarette butts, only traces were found with either the organic or single-tube protocols. While the cigarettes may have been obtained from poor donors, it is possible that recovery of the cells from the substrate was not sufficient or that improved cell digestion may be needed. In comparison, DNA recovery from a variety of surfaces including denim, leather and wood produced satisfactory yields.

No purification of single-tube DNA preparations is carried out prior to amplification. As a result, both locus-specific inhibition and amplification signal imbalance have been observed due to this. We have shown that the phenomenon may be caused by the presence of reagents included in the DNA preparation process or inhibitors associated with the matrix upon which the biological fluid was deposited. In either situation, the DNA concentration relative to the inhibitory factor is the critical parameter that should be modulated to achieve successful amplification. This was observed with the reference-like sample of semen and buccal swabs where the addition of a larger volume of DNA solution resulted in PCR inhibition. For most protocols used and providing DNA is not to be recovered from a large surface, the extraction volume could be reduced to 50  $\mu$ l. Additionally, titration of individual lysis reagents (as was done for DTT) could be performed to try and reduce their concentrations.

We specifically tested two approaches for matrix-related problems although these could be applied to inhibition effects caused by lysis reagents. Both the Sepharose treatment and the amplification of less DNA with a concomitant increase in the number of PCR cycles relieved some of the inhibition due to the presence of dark denim dye. These could be applied to other samples where inhibition was apparent, namely leather and wood surfaces. An intriguing result was the opposite effects of Sepharose resin and amplification condition modifications on the amplification signals obtained for blood and sperm samples spotted on denim material. This suggests that distinct inhibition mechanisms are involved, possibly through an interaction between lysis reagents and the denim dye. In this particular

experiment, no inhibition was observed in organic DNA preparations. It is likely that the dye concentration in the fabric sample used was sufficiently low for amplification to occur (Del Rio et al. 1996).

When performing multiplex PCR, the amplification conditions chosen represent the best compromise possible but are obviously not ideal for any of the loci. In our experience and as reported by others, locus D21S11 in particular is very sensitive to the presence of inhibitors, possibly due to a departure from its optimal amplification conditions (Frégeau and Fourney 1993). Using the two approaches outlined previously to relieve inhibition, fluorescence peak levels could not always be restored completely. Moreover, while being occasionally useful, the modification of reaction conditions as described presents a significant drawback inherent to the amplification of less than 0.3 ng of DNA. Below this amount, stochastic effects become important (Taberlet et al. 1996) and unequal amplification of the two alleles at a locus may occur in addition to between loci imbalance. In some cases, one of the alleles may even fall below detection levels, a phenomenon termed allelic dropout (Frégeau and Fourney 1993). Additionally, amplification artifacts such as stutter bands may become more prominent. Taken together, these problems may greatly complicate the interpretation of genetic profiles, particularly in samples containing DNA from more than one contributor.

As an alternative for matrix-associated inhibition, cell recovery from the substrate prior to digestion through surface swabbing may be feasible providing that the substrate is

not too porous. For example, a bloodstained piece of varnished wood could gently be swabbed to recover biological material instead of scraping the surface.

Sexual assault cases represent a significant proportion of cases handled by forensic laboratories. Of major importance is the ability to resolve profiles from multiple donors in sperm/epithelial cell mixtures. The differential single-tube methodology that we developed allowed successful resolution of profiles from the epithelial and the spermatozoa fractions albeit some locus imbalance was observed. Rapid differential DNA extraction has been achieved previously using the Chelex resin (Walsh et al. 1991) but this methodology generally involves a larger reaction volume (at least 200  $\mu$ l) and hence may result in a low DNA concentration which may not be appropriate for the amplification reaction. In contrast, our procedure allows the recovery of DNA in smaller volumes.

In view of the efficacy of SDS for the lysis of vaginal epithelial cells, it may well represent an interesting alternative for the recovery of DNA from envelope flaps and cigarette butts. However, the presence of SDS, a well-known PCR inhibitor (Gelfand 1989), may be problematic for dilute DNA samples where volumes greater than 1  $\mu$ l are added to low-volume amplification reactions, even in the presence of non-ionic detergents (Goldenberger et al. 1995).

In summary, we have shown that single-tube DNA preparation protocols can be applied successfully to a wide range of forensic samples. Even when additional purification

steps are added, this approach is still faster and requires fewer manipulations than the phenol/chloroform extraction. Such protocols may be useful when results have to be obtained very quickly with the dosage step being omitted or when the amount of material is very limited.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the Biology Service of the Laboratoire de Sciences Judiciaires et de Médecine Légale for allowing resources to complete this project.

## REFERENCES

1. Adams DE, Presley LA, Baumstark AL, Hensley KW, Hill AL, Anoe KS, Campbell PA, McLaughlin CM, Budowle B, Giusti AM, Smerick JB, Baechtel FS. Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis by restriction fragment length polymorphisms of blood and other body fluid stains subjected to contamination and environmental insults. *J. Forensic Sci.* 1991; 36: 1284-98.
2. Budowle B. The RFLP technique. *Crime Lab. Digest* 1988;15:97-98.
3. Budowle B, Baechtel FS. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. *Appl. Theor. Electrophoresis* 1990; 1: 181-87.
4. Schumm JW, Lins AM, Sprecher CJ, Micka KA. High throughput systems for analysis of STR loci. *Proceedings from the 6<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification.* 1995: 10-19
5. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequence. A survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int. J. Leg. Med.* 1994; 107:13-20.
6. Allen M, Saldeen T, Gyllensten U. PCR-Based DNA Typing of Saliva on Stamps and Envelopes. *Biotechniques* 1994; 17: 546-52.
7. Edwards A, Hammond L, Jin HA, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-53.

8. Edwards A, Civitello A, Hammond L, Jin HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 746-56.
9. Murray JC, Buetow KH, Weber JL, Ludwigsen S, Scherbier-Heddemann T, Manion F. et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 1994; 265: 2049-54.
10. Barber MD, McKeown BJ, Parkin BH. Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Int. J. Legal Med.* 1996; 108: 180-85.
11. Frégeau CJ, Fourney RM. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques* 1993; 15: 100-19.
12. Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S. and Adams, M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 1993; 3: 13-22.
13. Micka KA, Sprecher CJ, Lins AM, Comey CT, Koons BW, Crouse C et al. Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *J. Forensic Sci.* 1996; 41: 582-90.
14. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel FS. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 1994; 39: 1254-69.
15. Schwartz EI, Khalchitsky SE, Eisensmith RC, Woo SL. Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on guthrie cards. *Lancet* 1990; 336: 639-40.

8. Edwards A, Civitello A, Hammond L, Jin HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 746-56.
9. Murray JC, Buetow KH, Weber JL, Ludwigsen S, Scherbier-Hedde T, Manion F. et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 1994; 265: 2049-54.
10. Barber MD, McKeown BJ, Parkin BH. Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Int. J. Legal Med.* 1996; 108: 180-85.
11. Frégeau CJ, Fourney RM. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques* 1993; 15: 100-19.
12. Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S. and Adams, M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 1993; 3: 13-22.
13. Micka KA, Sprecher CJ, Lins AM, Comey CT, Koons BW, Crouse C et al. Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *J. Forensic Sci.* 1996; 41: 582-90.
14. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel FS. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 1994; 39: 1254-69.
15. Schwartz EI, Khalchitsky SE, Eisensmith RC, Woo SL. Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on guthrie cards. *Lancet* 1990; 336: 639-40.

16. Koblinsky L. Recovery and stability of DNA samples of forensic science significance. *Forensic Science Rev.* 1992; 4: 67-87.
17. Jung JM, Comey CT, Baer DB, Budowle B. Extraction strategy for obtaining DNA from blood stains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ $\alpha$  gene. *Int. J. Leg. Med.* 1991; 104: 145-48.
18. Del Rio SA, Marino MA, Belgrader P. PCR-Based human leukocyte antigen (HLA)DQ $\alpha$  typing of blood stained light and dark blue denim fabric. *J. Forensic Sci.* 1996; 41: 490-92.
19. Fridez F, Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci. Int.* 1996; 78:103-110.
20. Sparkes R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N et al. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II) Artefacts, casework studies and success rates, *Int. J. Leg. Med.* 1996; 109:195-204.
21. Comey CT, Budowle B. Validation studies on the analysis of the HLA DQ $\alpha$  locus using the polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.* 1991; 36: 1633-48.
22. Shutler GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh S, Johnston E, Halverson J. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human stain from a five year old case. *J. Forensic Sci.* 1999; 44:623-26.
23. Li H, Schmidt L, Wei M-H, Hustad T, Lerman MI, Zbar, B, Tory K. Three tetranucleotide polymorphisms for loci :D3S1352, D3S1358, D3S1359. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 1327.

24. Sharma V, Litt M. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1: 67.
25. Mills KA, Even D, Murray JC. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1: 779.
26. Frégeau CJ, Tan-siew WF, Yap, KH, Carmody GR, Chow ST, Fourney RM. Characteristics of the short tandem repeat HumD21S11 and HumFGA loci in eight diverse human populations. In: Proceedings from the Eight International Symposium on Human Identification 1997, Promega Corporation, Madison WI, 1997; 178.
27. Liechti-Gallati S, Neeser D. Efficient and reliable PCR-based detection of the ABO blood group alleles : genotyping on stamps and other biological evidence samples. *J. Forensic Sci.* 1996; 4: 653-57.
28. Higuchi R. Simple and rapid preparation of sample for PCR. In : Erlich HA, editor. *PCR Technology : Principles and applications for DNA amplification*. New York : Stockton Press, 1989; 31-38.
29. Richards B, Skoletsky, J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Molec. Gen.* 1993; 2: 159-63.
30. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 1985; 318: 577-79.
31. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A Single "Universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods and applications* 1995; 4: 368-70.

32. Williamson JM, Waye JS, Newall P, Bing DH, Blake E. The use of a comprehensive approach for neutralization of PCR inhibitors found in forensic samples and its use in a homicide/sexual assault case. In: Proceedings from the Sixth International Symposium on Human Identification 1995, Promega Corporation, Madison WI, 1996; 186-87.
33. Waye JS, Michaud D, Bowen JH, Fourney RM. Sensitive and specific quantification of human genomic Deoxyribonucleic Acid (DNA) in forensic science specimens: casework examples. *J. Forensic Sci.* 1991; 36: 1198-1203.
34. Gelfand DH. Taq polymerase. In Erlich HA, editor. *PCR Technology : Principles and applications for DNA amplification*. New York : Stockton Press, 1989; 17-22.
35. Saiki RK. The design and optimization of the PCR. In Erlich HA, editor. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*. New York : Stockton Press, 1989; 7-16.
36. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escavarage N et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 3189-94.
37. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991; 10: 506-13.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION

Au cours de ces travaux, nous avons tenté de mettre au point des protocoles de préparation d'ADN pour extraire le matériel génétique de différents échantillons biologiques susceptibles d'être soumis à des analyses pour des fins judiciaires. Les protocoles retenus devaient présenter des avantages sur les protocoles d'extraction déjà existants, soit éviter l'utilisation de solvants organiques et minimiser les manipulations pour ainsi réduire les risques d'inversion ou de contamination des échantillons. La production de résultats dans des délais plus courts était aussi un élément recherché dans l'élaboration des protocoles. Il était évidemment nécessaire d'atteindre ces objectifs tout en produisant des rendements en ADN et des profils génétiques comparables à ceux obtenus avec le protocole d'extraction organique.

Certaines méthodes de préparation de l'ADN publiées précédemment présentent les avantages recherchés. Par exemple, l'utilisation de la résine Chelex®-100 ne requiert aucun solvant organique et permet l'obtention, de façon simple et rapide, de résultats satisfaisants (Walsh et al.1991). Par contre, la résine en suspension occupe un volume relativement important (environ 200µl). Il en résulte une solution d'ADN diluée, probablement incompatible avec notre système d'amplification.

Plusieurs protocoles n'utilisant pas de solvants organiques ont été identifiés dans la littérature. Ces protocoles n'avaient pas été appliqués à la préparation d'ADN à partir d'échantillons judiciaires. Nous les avons utilisés pour extraire l'ADN à partir de différents types de cellules (épithéliales, sanguines, spermatozoïdes).

Nous avons comparé les résultats de rendements et d'amplification obtenus avec les protocoles simplifiés retenus et ceux du protocole organique utilisant le phénol et le chloroforme pour extraire les protéines suivi d'une filtration sur membrane. Les rendements en extraction des protocoles rapides sont généralement équivalents ou supérieurs à la méthode d'extraction organique pour des échantillons de type référence, à l'exception des écouvillons buccaux. À l'amplification, des résultats similaires sont obtenus si la concentration des solutions d'ADN préparées par la méthode rapide est supérieure à 2 ng/microlitre.

Des échantillons judiciaires ont été simulés pour vérifier l'efficacité de nos protocoles d'extraction. Les résultats obtenus à partir de ces échantillons montrent que l'utilisation des protocoles rapides permet l'obtention de rendements en ADN comparables à ceux de la méthode organique sauf pour les rabats d'enveloppe. Pour ce type d'échantillon, des modifications devront être apportées à la préparation de l'ADN pour favoriser la récupération du maximum d'ADN. Nous y reviendrons plus loin. Lors de l'amplification, une inhibition de la réaction est observée avec quelques-uns des échantillons simulés. Les mécanismes d'inhibition du PCR peuvent être de diverses natures. L'inhibiteur peut lier l'ADN, affectant ainsi la progression de l'enzyme sur le brin matrice; il peut aussi inactiver directement

l'enzyme ou moduler l'efficacité de liaison des amores (du Toit et al. 1993, Scalice et al. 1994, Tuross 1994). Les concentrations des différents réactifs utilisés pour l'amplification sont également critiques pour l'activité de la Taq, qui est très sensible aux concentrations de sodium, de potassium et de magnésium (Gelfand 1989, du Toit et al. 1993, Rychlik 1995, Weissensteiner et Lanchbury 1996). Donc, tout agent qui capte le magnésium ou d'autres ions (agent chélateur) affecte l'activité de l'enzyme (Wiedbrauk et al. 1995).

Différentes solutions peuvent être apportées pour remédier à ces processus d'inhibition. Il a été démontré que l'ajout d'albumine sérique bovine (BSA) à la réaction d'amplification réduisait l'inhibition causée par le composé d'hème (Akane et al. 1994). Lors de nos travaux, la BSA était ajoutée à toutes les réactions d'amplification. La purification de l'échantillon sur une résine échangeuse d'ions comme le Thiopropyl Sepharose 6B (Shutler et al. 1999) s'est également avérée efficace. L'augmentation de la quantité d'enzyme (Gelfand 1989) et du nombre de cycles d'amplification (couplée à une diminution de la quantité d'ADN cible) sont d'autres alternatives qui améliorent également le rendement en amplification. L'ajout d'une grande quantité d'enzyme serait favorisé lorsqu'on soupçonne qu'un inhibiteur inactive l'enzyme en s'y associant. Par contre, lorsque le contaminant lie l'ADN, l'augmentation du nombre de cycles pourrait permettre d'obtenir une quantité détectable du produit de PCR à partir de l'ADN non lié par l'inhibiteur.

Les échantillons reposant sur des denims noirs présentent certains problèmes; il semble que le colorant utilisé copurifie avec l'ADN lors de l'extraction et nuise à la réaction d'amplification (Del Rio et al. 1996, Larkin et Harbison 1999). Nous avons observé que

l'ajout d'une étape de purification avec la résine de Sépharose permet d'améliorer l'amplification de l'ADN des échantillons de sang sur denim. Cette purification est nécessaire même pour des échantillons extraits au phénol ou avec le Chelex<sup>®</sup>100 (Comey et Budowle 1991, Koblinsky 1992, Jung et al. 1991). Quant aux échantillons de sperme sur denim, il semble que l'augmentation du ratio enzyme : inhibiteur, obtenue en prélevant un volume moindre de solution d'ADN, tout en augmentant le nombre de cycles d'amplification, permette de lever l'inhibition. Toutefois, cette approche peut engendrer quelques inconvénients considérables. Par exemple, l'augmentation du nombre de cycles d'amplification peut engendrer certaines irrégularités, comme la détection de produits de PCR non spécifiques (Erlich 1989). Une diminution de la quantité d'ADN prélevée augmente aussi les chances d'observer des effets stochastiques (Taberlet et al. 1996) qui consistent en l'amplification inégale des deux allèles d'un site. Ceci peut même entraîner la perte d'un allèle, communément appelé 'allele drop out' (Frégeau et Fourney 1993). En prélevant une faible quantité d'ADN, la production de bandes fluorescentes non-spécifiques est également favorisée, indiquant un mauvais amorçage dû à un déséquilibre entre le nombre de molécules d'ADN de départ et le nombre d'amorces (Frégeau et Fourney 1993).

L'ADN extrait de cellules épithéliales prélevées sur des rabats d'enveloppe et des mégots, est réfractaire à l'amplification et ce, même pour les échantillons qui ont été extraits par la méthode organique. Les rendements en ADN pour ces échantillons sont relativement faibles, produisant une solution d'ADN diluée. Pour procéder à la réaction d'amplification, il faut prélever un volume plus grand de solution d'ADN, favorisant ainsi le prélèvement de contaminants provenant des substrats. Des modifications devront donc être apportées à la

méthode de préparation de l'ADN pour obtenir des solutions d'ADN plus concentrées. Une réduction du volume de solution de lyse pourrait être ainsi envisagée. Toutefois, il semble qu'une quantité insuffisante de cellules a pu être détachée des substrats lors de l'étape de trempage. Une récupération plus efficace des cellules améliorerait sans doute significativement les résultats à l'amplification.

Des échantillons contenant les cellules de plusieurs individus, comme par exemple les frottis ou les lavages vaginaux, sont fréquemment analysés au laboratoire. Le protocole d'extraction organique est efficace pour l'obtention de profils distincts. L'utilisation de la résine Chelex®100 ne permet pas de d'effectuer une telle séparation des profils génétiques (Walsh et al. 1991). Nous avons mis au point un protocole d'extraction simplifié comportant des étapes de lyses séquentielles pour ce type d'échantillon. Bien que très semblable et aussi efficace que le protocole organique, la méthode que nous proposons est beaucoup plus rapide puisque seulement deux heures trente sont nécessaires au lieu d'un minimum de sept heures. De plus, ceci inclut une seconde lyse sans DTT de la fraction épithéliale afin de s'assurer que la fraction 'spermatozoïdes' sera exempte d'allèle(s) provenant d'ADN des cellules de l'épithélium. Une analyse du profil obtenu suite à la deuxième lyse nous a permis de conclure que les cellules d'origine vaginales n'avaient pas toutes été digérées lors de la première lyse puisque le seul profil observé était celui de ces cellules (non montré dans les résultats). Cette première digestion incomplète peut s'expliquer par la courte période de lyse et la faible concentration des réactifs par rapport au nombre élevé de cellules contenues dans un lavage vaginal. Par conséquent, la seconde digestion de la fraction épithéliale permettra de simplifier grandement l'interprétation du profil retrouvé dans la fraction 'spermatozoïdes'.

L'utilisation des protocoles rapides pose certains problèmes particuliers, puisque les différents réactifs utilisés pour la digestion cellulaire se retrouvent dans la réaction d'amplification. Aussi, même si la composition de base de cette solution de lyse est similaire à celle du tampon de PCR, l'ajout des divers réactifs (protéinase K, SDS, DTT, NaOH) peut affecter la qualité de l'amplification. Pour améliorer l'amplification de certains échantillons dont les rendements en ADN sont faibles, comme les cellules épithéliales sur rabats d'enveloppe, une diminution de la concentration des réactifs pourrait être envisagée. Nous avons aussi utilisé plusieurs moyens simples pour minimiser les effets inhibiteurs des différents réactifs; la protéinase K est inactivée par chauffage (Higuchi 1989), l'alcalinité du NaOH est neutralisée par l'ajout de Tris-HCl (Richards et al. 1993), et l'ajout de NP40/Tween<sup>®</sup>20 à l'amplification permet de contrer l'effet inhibiteur du SDS (Higuchi 1989, Goldenberger et al. 1995). Pour ce dernier, son effet néfaste sur la réaction d'amplification est largement compensé par son efficacité à libérer l'ADN des cellules vaginales. Les expériences préliminaires avec les lavages vaginaux nous ont permis de constater que la digestion initiale des cellules en présence de détergents moins puissants diminuait grandement le rendement en ADN (Bourgoin et al. 1997, résultats non publiés).

Outre les réactifs utilisés pour la lyse cellulaire, les substrats sur lesquels reposent les échantillons biologiques peuvent affecter la qualité des résultats. Pour réduire l'effet des inhibiteurs sur l'amplification, nous avons tenté de réduire le volume de solution d'ADN prélevé pour le PCR. L'ajout d'une étape de filtration sur membrane pour éliminer les inhibiteurs provenant du substrat permettrait une amélioration des résultats mais augmenterait

aussi les coûts. Une alternative plus économique serait de minimiser le prélèvement du substrat en écouvillonnant la surface ou de diminuer le volume de solution de lyse ajouté et ainsi obtenir une concentration d'ADN plus élevée. Une autre avenue qui n'a pas été exploitée lors des présents travaux est d'augmenter la quantité d'amplicons chargés sur le gel en concentrant le produit d'amplification par évaporation. Des travaux au laboratoire ont démontré qu'il était possible de charger l'équivalent de 50% de la réaction d'amplification après concentration (Jean Bergeron, communication personnelle).

Nos résultats montrent que les effets inhibiteurs des différents substrats sont particulièrement évidents au site D21S11. En effet, ce site s'est avéré très sensible aux inhibiteurs tels les colorants contenus dans le denim foncé. L'amplification en multiplex signifie que les conditions d'amplification choisies (température, concentrations de magnésium) représentent un compromis acceptable pour les différents loci amplifiés. Il est probable que ces conditions soient plus proches d'un seuil au-delà duquel l'amplification du D21S11 sera inefficace. La température d'hybridation optimale des amores au site D21S11 est de 65°C, alors que celle utilisée est de 60°C, favorisant l'amplification aux sites D3S1358 et HumFGA (Frégeau et Fourney 1993).

Lors de ces travaux, des protocoles d'extraction de divers échantillons biologiques ont été développés. Ces protocoles requièrent peu de manipulations entraînant ainsi la diminution des risques d'erreur. Leur utilisation représente également une avenue intéressante du point de vue économique. Outre les coûts de main d'œuvre plus élevés associés au protocole standard, les membranes utilisées pour purifier l'ADN

(microconcentrateur Microcon<sup>TM</sup>) se détaillent à environ deux dollars chacune. Considérant le nombre d'échantillons traités dans un laboratoire judiciaire, ceci représente un déboursé important. Enfin, la production de résultats dans des délais plus courts est aussi un avantage important de nos protocoles. L'exclusion rapide d'une personne innocente gardée en détention ou la confirmation prompte de l'implication d'un accusé dans un crime présentent sûrement des aspects réconfortants pour la population. Des méthodes comme l'amplification directe avec l'utilisation de papiers buvards de type FTA<sup>®</sup> (Roger et Burgoyne 1997) propose une préparation rapide du matériel génétique pour l'amplification par PCR. Par contre, ces méthodes ne permettent pas d'effectuer des extractions différentielles pour obtenir des profils distincts. De plus, les papiers FTA<sup>®</sup> ne sont utiles qu'avec des échantillons de sang liquide, un type d'échantillon qui n'est pas caractéristique des échantillons traités dans le milieu judiciaire. Jumelés à l'efficacité de la nouvelle technologie, nos résultats pourraient permettre d'améliorer certains aspects du système judiciaire tout en réduisant les coûts d'enquête et de procès.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, D.E., Presley, L.A., Baumstark, A.L., Hensley, K.W., Hill, A.L., Anoe, K.S., Campbell, P.A., McLaughlin, C.M., Budowle, B., Giusti, A.M., Smerick, J.B., and Baechtel, F.S. (1991) Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis by restriction fragment length polymorphisms of blood and other body fluid stains subjected to contamination and environmental insults. *J. Forensic Sci.* 36, 1284-1298
- ALLEN, M., Saldeen, T., Gyllensten, U. (1994) PCR-based DNA typing of saliva on stamps and envelopes. *BioTechniques* 17, 546-552
- AKANE, A. (1996) Hydrogen peroxide decomposes the heme compound in forensic specimens and improves the efficiency of PCR. *BioTechniques* 21, 392-394
- ALBERTS, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) Molecular biology of the cell. Third edition. Library of Congress Cataloging-in-publication Data. Garland Publishing, New York. 1294 pp
- ANDREASSEN, R., Egeland, T., Olaisen, B. (1996) Mutation rate in the hypervariable VNTR g3 (D7S22) is affected by allele length and a flanking DNA sequence polymorphism near the repeat array. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 360-367
- AVERY, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79, 137-158
- BAECHTEL, F.S. (1988) Recovery of DNA from Human Biological Specimens. *Crime Lab. Digest* 15, 95-96
- BARBER, M.D., McKeown, B.J., Parkin, B.H. (1996) Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Int. J. Legal Med.* 108, 180-185
- BELL, G.I., Selby, M.J., Rutter, W.J. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 295, 31-35
- BERG, S. (1975) Leichenzerersetzung und Leichenzerstörung, In B Mueller (Ed.). *Gerichtlichen Medizin*. Springer-Verlag, Berlin, p. 62-106
- BLAKE, E., Mihalovich, J., Higuchi, R., Walsh, P.S., Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leucocyte antigen (HLA)-DQ alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples: casework experience. *J. Forensic Sci.* 37, 700-726

- BOURGOIN, S., Bergeron, J., Sarafian, V., Jolicoeur, C., d'Auteuil, M.L., Linard, C., Mailly, F. (1997) Extraction d'ADN et amplification de sites STR sur des échantillons de type judiciaire. Présenté au 65è Congrès de l'ACFAS, Trois-Rivières, Qc
- BRINKMANN, B., Klantschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., Rolf, B. (1998) Mutation in human microsatellites: influence of the structure and length of tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1408-1415
- BRITTEN, R.J., Kohne, D.E. (1968) Repeated sequences in DNA. *Science* 161, 529-540
- BUDOWLE, B. (1988). The RFLP technique. *Crime Lab. Digest* 15, 97-98
- BUDOWLE, B., Baechtel, S. (1990) Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. *Appl. Theor. Electrophoresis* 1, 181-187
- BUDOWLE, B., Chakraborty, R., Giusti, A.M., Eisenberg, A.J., Allen, R.C. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 137-144
- CARRANO, A.V., Lamerdin, J., Ashworth, L.K., et al. (1989) A high-resolution, fluorescence-based, semiautomated method for DNA fingerprinting. *Genomics* 4, 129-136
- CHAKRABORTY, R., Zhong, Y. (1994) Statistical power of an exact test of Hardy-Weinberg proportions of genotyping data at a multiallelic locus. *Human Heredity* 44, 1
- COLLINS, A., Morton, N.E. (1994) Likelihood ratios for DNA identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6007-6011
- COMEY, C.T., Budowle, B. (1991) Validation studies on the analysis of the HLA DQ $\alpha$  locus using the polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.* 36, 1633-1648
- COMEY, C.T., Koons, B.W., Presley, K.W., Smerick, J.B., Sobieralski, C.A., Stanley, D.M., Baechtel, F.S. (1994) DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 39, 1254-1269
- CRAIG-HOLMES, A.P., Shaw, M.W. (1971) Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 174, 702-704
- CROUSE, C.A., Ban, J.D., D'Alessio, J.K. (1993) Extraction of DNA from forensic-Type sexual assault specimens using simple, rapid sonication procedures. *BioTechniques* 15, 642-648
- DAVIDSOHN, I. (1991) Examination of semen . In: Henry JB, editor. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 18<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, pp. 498-503

- DEL RIO, S.A., Marino, M.A., Belgrader P. (1996) PCR-Based human leukocyte antigen (HLA) DQ alpha typing blood stained light and dark blue denim fabric. *J. Forensic Sci.* 41, 490-492
- DIMO-SIMONIN, N., Grang, F., and Brandt-Casadevall, C. (1997) PCR-Based forensic testing of DNA from stained cytological smears. *J. Forensic Sci.* 42, 506-509
- DUBEAU, L., Chandler, L.A., Gralow, J.R., Nichols, P.W., Jones, P.A. (1986) Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res.* 46, 2964-2969
- DU TOIT, R., Victor, T.C., van Helden, P.D. (1993) Empirical evaluation of conditions influencing the polymerase chain reaction: enterotoxigenic *Escherichia coli* as a test case. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* 31, 225-231
- DYKES, D. (1988) The use of biotinylated DNA probes in parentage testing: non-isotopic labeling and non-toxic extraction. *Electrophoresis* 9, 359-368
- EDWARDS, A., Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 746-756
- EDWARDS, A., Hammond, H.A., Jin, T., Caskey, C.T., Chakraborty, R. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 241-253
- ERLICH, H.A. (1989) Basic methodology. In: Erlich HA, editor. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press. pp 1-5
- EVANS, G.A. (1991) Physical mapping of the human genome by pulsed field gel analysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 75-81
- FINNEGAN, S.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5, 103-107
- FOURNEY, R.M., Elliott, J.C., Buoncristioani, M., Robertson, J.M., Bowen, K.L., Leclair, B., Carmody, G.R. (1995) Evaluation of a new STR multiplex (D5S818, D13S317, D7S820) for forensic applications. In: Proceeding from the 6<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification. Scottsdale, Az.
- FRÉGEAU, C.J., Fourney, R.M. (1993) DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques* 15, 100-119

- FRÉGEAU, C.J., Tan-siew, W.F., Yap, K.H., Carmody, G.R., Chow, S.T., Fourney, R.M. (1997) Characteristics of the short tandem repeat HumD21S11 and HumFGA loci in eight diverse human populations. In: Proceeding from the 8th International Symposium on Human Identification. Scottsdale, Az.
- FRÉGEAU, C.J., Bowen, K.L., Fourney, R.M. (1999) Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers. *J. Forensic Sci.* 44, 133-166
- FRIIDEZ, F., Coquoz, R. (1996) PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci. Int.* 78, 103-110
- GELFAND, D.H. (1989) Taq Polymerase. In: Erlich HA, editor. *PCR Technology: Principles and applications* New York: Stockton Press. pp 17-22
- GILL, P., Jeffreys, A.J., Werrett, D.J. (1985) Forensic application of DNA 'Fingerprints'. *Nature* 318, 577-579
- GILL, P. (1987) A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe. *Electrophoresis* 8, 35-38
- GILL, P., Kimpton, C.P., Urquhart, A., Oldroyd, N., Millican, E.S., Watson, S.K., Downes, T.J. (1995) Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework- a strategy for the future. *Electrophoresis* 16, 1543-1552
- GOLDENBERGER, D., Perschil, I., Rixler, M., Altwegg, M. (1995) A Single 'Universal' DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Meth. Appl.* 4, 368-370
- HAGELBERG, E., Sykes, B., Hedges, R. (1990) Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342, 485
- HIGUCHI, R. 1989. Simple and Rapid Preparation of Sample for PCR. In: Erlich HA editor. *PCR Technology: Principles and applications*. New York: Stockton Press. pp 31-38
- HOCHMEISTER, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Eggmann, U., Comey, C.T., Dirnhofer, R. (1991) Typing of DNA extracted from compact bone tissue from human remains. *J. Forensic Sci.* 36, 1649-1661
- INMAN, K., Rudin, N. (1997) An introduction to forensic DNA analysis. New York: CRC Press: pp 1-9
- JEFFREYS, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985a) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73

JEFFREYS, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L. et al. (1985b) Individual specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79

JEFFREYS, A.J., Brookfield, J.F., Semeonoff, R. (1985c) Positive identification of immigration test case using human DNA fingerprint. *Nature* 317, 818-19

JEFFREYS, A.J., Wong, Z., Wilson, V., et al. (1989) Application of multilocus and single locus minisatellite DNA probes in forensic medicine. In *DNA Technology and Forensic Science*, J. Ballantyne, G. Sensebaugh, and J. Witkowski, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

JEFFREYS, A.J., Monckton, D.G., Tamaki, K., Neil, D.L., Armour, J.A., MacLeod, A., Collick, A., Allen, M., Jobling, M. (1993) Minisatellite variant repeat mapping: application to DNA typing and mutation analysis. *EXS.* 67, 125-39

JELINEK, W.R., Schmid, C.W. (1982) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 813-844

JOHN, B., Miklos, G.L.G. (1979) Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 58, 1-114

JUNG, J.M., Comey, C.T., Baer, D.B., Budowle, B. (1991) Extraction strategy for obtaining DNA from blood stains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ $\alpha$  gene. *Int. J. Leg. Med.* 104, 145-148

KAN, Y. W. and Dozy, A. M. (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human  $\alpha$ -globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 5631-5635

KIMPTON, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S., Adams, M. (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of Short Tandem Repeat loci. *PCR Meth. Appl.* 3, 13-22

KOBLINSKI, L. (1992) Recovery and stability of DNA samples of forensic science significance. *Forensic Science Rev.* 4, 67-87

KOURILSKY, P. (1986) Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. *Trends Genet.* 2, 60-63

KUPEIC, J.J., Giron, M.L., Vilette, D., Jeltsch, J.M., Emanoil-Ravier, R. (1987) Isolation of high molecular weight DNA from eukaryotic cells by formamide treatment and dialysis. *Anal. Biochem.* 164, 53-59

LAIRD, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19, 4293

- LAITINEN, J., Samarut, J., Holtta, E. (1994) A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *BioTechniques* 17, 316-322
- LANDSTEINER, K. (1901) Über agglutinationserscheinungen normalen menschlichen blutes. *Wien Klin Wschr.* 14, 1132
- LANDSTEINER, K., Levine, P. (1930) On the inheritance and racial distribution of agglutinable properties of human blood. *J. Immunol.* 18, 37
- LARKIN, A., Harbison, S. (1999) An improved method for STR analyses of bloodstained denim. *Int. J. Legal Med.* 112, 388-390
- LI, H., Schmidt, L., Wei, M.-H., Hustad, T., Lerman, M.I., Zbar, B., Tory, K. (1993) Three tetranucleotide polymorphisms for loci :D3S1352, D3S1358, D3S1359. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1327
- LIECHTI-GALLATI, S., Neeser, D. (1996) Efficient and reliable PCR-based detection of the ABO blood group alleles: genotyping on stamps and other biological evidence samples. *J. Forensic Sci.* 41, 653-657
- LITT, M. and Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401
- MANIATIS, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- MCNALLY, L., Shaler, R.C., Baird, M., Balazs, I., DeForest, P., Kobilinsky, L. (1989a) Evaluation of deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from human bloodstains exposed to ultraviolet light, heat, humidity and soil contamination. *J. Forensic Sci.* 34, 1059-1069
- MCNALLY, L., Shaler, R.C., Baird, M., Balazs, I., Kobilinsky, L., DeForest, P. (1989b) The effects of environment and substrates on deoxyribonucleic acid (DNA): The use of casework samples from New York City. *J. Forensic Sci.* 34, 1070-1077
- MICKA, K.A., Sprecher, C.J., Lins, A.M., Comey, C.T., Koons, B.W., Crouse, C., et al. (1996) Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *J. Forensic Sci.* 41, 582-590
- MILLER, S.A. (1988) A Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215
- MILLS, K.A., Even, D., Murray, J.C. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum. Mol. Genet.* 1, 779

- MORRAL, N., Estivill, X. (1992) Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. *Genomics* 13, 1362-1364
- MULLIS, K.B. and Falloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350
- MURRAY, J.C., Buetow, K.H., Weber, J.L., Ludwigsen, S., Scherbier-Hedema, T., Manion, F. et al. (1994) A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 265, 2049-54
- NAKAMURA, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fudimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL II (1996) The evaluation of forensic evidence. National Academy Press, Washington D.C. pp 136-145
- POLYMEROPoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H., Merril, C.R. (1991a) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucl. Acids Res.* 19, 4306
- POLYMEROPoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H., Merril, C.R. (1991b) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human c-fes/fps proto-oncogene (FES). *Nucl. Acids Res.* 19, 4018
- RICHARDS, B., Skoletsky, J., Shuber, A.P., Balfour, R., Stern, R.C., Dorkin, H.L., et al. (1993) Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Molec. Gen.* 2, 159-163
- ROBERTSON, J.M., Sgueglia, J.B., Badger, C.A., Juston, A.C., Ballantyne, J. (1995) Forensic applications of a rapid, sensitive, and precise multiplex analysis of the four short tandem repeat loci HUMVWF31/A, HUMTHO1, HUMF13A1, and HUMFES/FPS. *Electrophoresis* 16, 1568-1576
- ROGERS, C., Burgoyne, L. (1997) Bacterial typing: storing and processing of stabilized reference bacteria for polymerase chain reaction without preparing DNA an example of an automatable procedure. *Anal. Biochem.* 247, 223-227
- ROUSSELET, F., Pfitzinger, H., Mangin, P. A. (1997) Pentaplex automated fluorescent typing system for forensic identification and French Caucasian population data. *J. Forensic Sci.* 42, 500-503
- RYCHLIK, W. (1995) Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* 18, 84-90

- SAIKI, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B. Horn, G., Erlich, H.A and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- SAIKI, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 329, 487-491
- SAIKI, R.K. (1989) The design and optimization of the PCR. In Erlich HA, editor. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press. pp 7-16
- SCALICE, E.R., Sharkey, D.J., Daiss, J.L. (1994) Monoclonal antibodies prepared against the DNA polymerase *Thermus aquaticus* are potent inhibitors of enzyme activity. *J. Immunol. Methods* 172, 147-163
- SCHWARTZ, L.S., Tarleton, J., Popovich, B., Seltzer, W.K., Hoffman, E.P. (1992) Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 721-729
- SCHUMM, J.W., Lins, A.M., Sprecher, C.J., and Micka, K.A. (1995). High throughput systems for analysis of STR loci. In *Proceedings from the 6<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification*. Scottsdale, Az.
- SETLOW, J.K. (1977) The shape of the ultraviolet inactivation curve for transforming DNA. *Nature* 268, 169-170
- SHARMA, V., Litt, M. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1, 67
- SHUTLER, G.G., Gagnon, P., Verret, G., Kalyn, H., Korkosh, S., Johnston, E., et al. (1999) Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types mixed human-canine stains from a five year old case. *J. Forensic Sci.* 44, 623-626
- SINGER, M, Berg, P. (1991) *Genes and Genomes*, University Science Books, Mill Valley, CA
- SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- SOUTHERN, E.M. (1979) Gel electrophoresis of restriction fragment. *Methods Enzymol.* 68, 152-176
- SPARKES, R., Kimpton, C., Gilbar, S., Carne, P., Andersen, J., Oldroyd, N. et al. (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II) Artefacts, casework studies and success rates. *Int. J. Leg. Med.* 109, 195-204

- STUY, J.H., Walter, R.B. (1981) Addition, deletion, and substitution of long nonhomologous deoxyribonucleic acid segments by genetic transformation of *Haemeophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 148, 565-571
- SULLIVAN, K.M., Pope, S., Gill, P., Robertson, J.M. (1992) Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. *PCR Methods Appl.* 2, 34-40
- TABERLET, P. Griffin, S., Goossens, B. Questiau, S., Manceau, V., Escavavage, N. et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 3189-3194
- TUROSS, N. (1994) The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experimentia* 50, 530-535
- URQUHART, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J., Gill, P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *Int. J. Leg. Med.* 107, 13-20
- VOGELSTEIN, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619
- WALSH, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506-513
- WAMBAUGH, J. (1989) *The bleeding*, New York, NY: William Morrow & Co. Inc.
- WARFORD, A., Pringle, J.H., Hay, J., Henderson, S.D., Lauder, I. (1988) Southern blot analysis of DNA extracted from formol-saline fixed and paraffin wax embedded tissue. *J. Pathol.* 154, 313-320
- WATSON, J.D., Crick, F.H.C. (1953) Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967
- WAYE, J.S. Presley, L.A., Budowle, B., Shutler, G.G., and Fourney, R.M. (1989) A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts. *BioTechniques* 7, 852-855
- WAYE, J.S., Michaud, D., Bowen, J.H., Fourney, R.M. (1991) Sensitive and specific quantification of human genomic Deoxyribonucleic Acid (DNA) in forensic science specimens: casework examples. *J. Forensic Sci.* 36, 1198-1203.
- WEBER, J.L., May, P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396

- WEISSENSTEINER, T. Lanchbury, J.S. (1996) Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *BioTechniques* 21, 1102-1108
- WEVRICK, R., Buchwald, M. (1993) Mammalian DNA-repair genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 470-474
- WIEDBRAUK, D.L. Farkas, D.H. (1994) Molecular methods for virus detection. San Diego, Academic Press. (CA). pp 386
- WIEDBRAUK, D.L., Werner, J.C., Drevon, A.M. (1995) Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2643-2646
- WILLIAMSON, J.M., Waye, J.S., Newall, P., Bing, D.H., Blake, E. (1995) The use of a comprehensive approach for neutralization of PCR inhibitors found in forensic samples and its use in a homicide/sexual assault case. In: Proceeding from the 6th International Symposium on Human Identification 1995, Scottsdale, Az.
- WYMAN, A.R., White, R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6754-6758
- ZAMENHOF, S. (1957) Preparation and assay of deoxyribonucleic acid from animal tissue. In: Colowick, S. P. and Kaplan, O. (eds), *Methods in enzymology* 3, New York, Academic Press. pp 696-704
- ZIEGLE, J.S., Su, Y., Corcoran, K.P., Nie, P.E., Mayrand, L.B., Hoff, L.H., McBride, M.N., et al. (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14, 1026-1031