

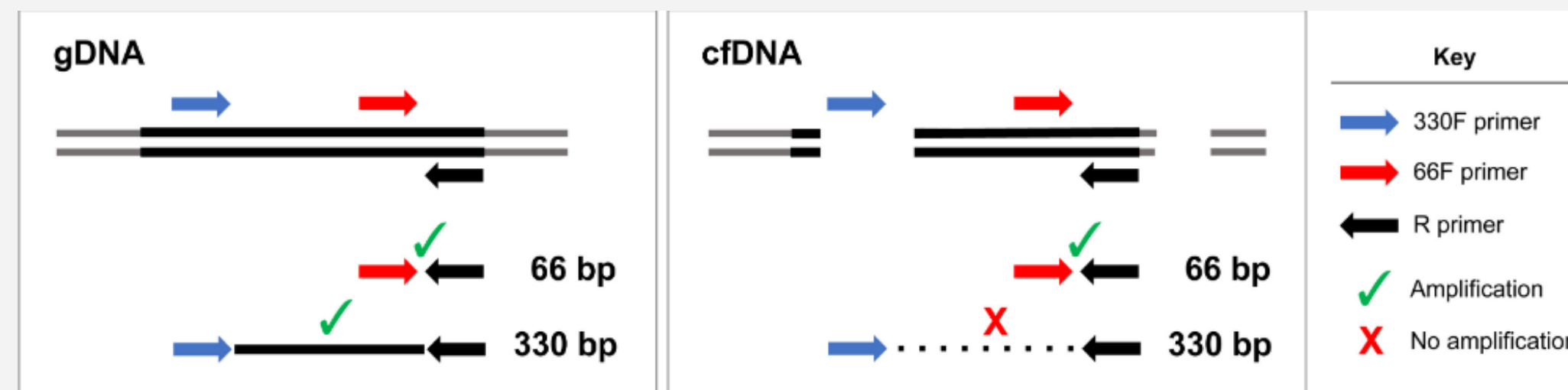
KWALIFICERING VAN DNA UIT VINGERSPOREN: LINE ASSAY

VERSTRAETEN MARIES
AVANS HOGESCHOOL, BREDA



INLEIDING

Bij een politie-onderzoek kan DNA uit vingersporen de doorslaggevende factor zijn voor het vinden van de dader. De hoeveelheid DNA die in het labo uit vingersporen kan verkregen worden, is wisselend per individu. Hierdoor kan het moeilijk zijn om een kwaliteitsvol profiel op te stellen. Het doel van **Long Interspersed Nuclear Elements (LINE)-assay** is om de hoeveelheid fragmentatie van het al beperkt aanwezige DNA, afkomstig van de vingersporen, vast te stellen en zo te kunnen voorspellen of het een betrouwbaar DNA-profiel kan opleveren. De LINE-assay maakt gebruik van drie primers: 66F, 330F en de Reversed primer, die voor beide bovenstaande primers gebruikt wordt. Met deze primers zou het mogelijk zijn om met een **ratio**, de verhouding **intact (330F) en gefragmenteerd (66F) DNA** te onderscheiden op basis van de grootte van het PCR product. In dit onderzoek is het bedoeling om uit te zoeken of de LINE-assay geschikt is voor DNA-onderzoek op vingersporen en of de resultaten van deze assay eventueel een voorbode kunnen zijn voor de kwaliteit van het DNA-profiel.



Figuur 1: Onderscheid tussen gDNA en cfDNA a.b.v. grootte fragmenten tijdens amplificatie bij LINE-assay. (1)

MATERIALEN & METHODE

- VINGERSPOREN & REFERENTIE-MATERIAAL**
De **gespikete vingersporen** van 2 individuen, die opgedampt werden met vier verschillende methodes op drie verschillende ondergronden, worden geswabt van hun ondergrond. Het **referentie-DNA** komt uit plasma van een gezonde donor. Hier is een deel van intact gehouden en een deel van gefragmenteerd.
- DNA-ISOLATIE**
De DNA-isolatie gebeurt met de **NucleoSpin® DNA Forensic kit** van Macherey-Nagel aan de hand van de gebruikshandleiding.
- KWALIFICERING MET LINE ASSAY**
Door middel van de LINE-assay kan met twee amplicons met elk een eigen grootte van 66 en 330 baseparen, een **fragmentatiemaat (ratio)** bepaald worden. Deze maat geeft relatief aan hoeveel DNA er gefragmenteerd is. Dit wordt berekend met de **LinRegPCR software** en kan een indicatie zijn voor de kwaliteit van het opgedampte DNA.
- KWALIFICERING VAN DNA-PROFIEL**
Van de vingersporen wordt er een DNA-profiel opgesteld met de **SeqStudio™ Genetic Analyzer** op basis van de PowerPlex Fusion System die **24 allelen** opspoor. Hiermee is het mogelijk om te kijken hoe kwaliteitsvol het profiel is ten opzichte van de verschillende ondergronden en de verschillende opdamplingsmethodes.

Figuur 2: Materiaal & methode (2)

LINE-assay instellingen

Preincubatie	95°C, 10 min
Amplificatie (45 cycli)	95°C, 10 sec
	51°C, 10 sec
	72°C, 9 sec
Melting	95°C, 5 sec
	65°C, 60 sec 97°C, 5-10 acquisitions
Cooling	40°C, 10 sec

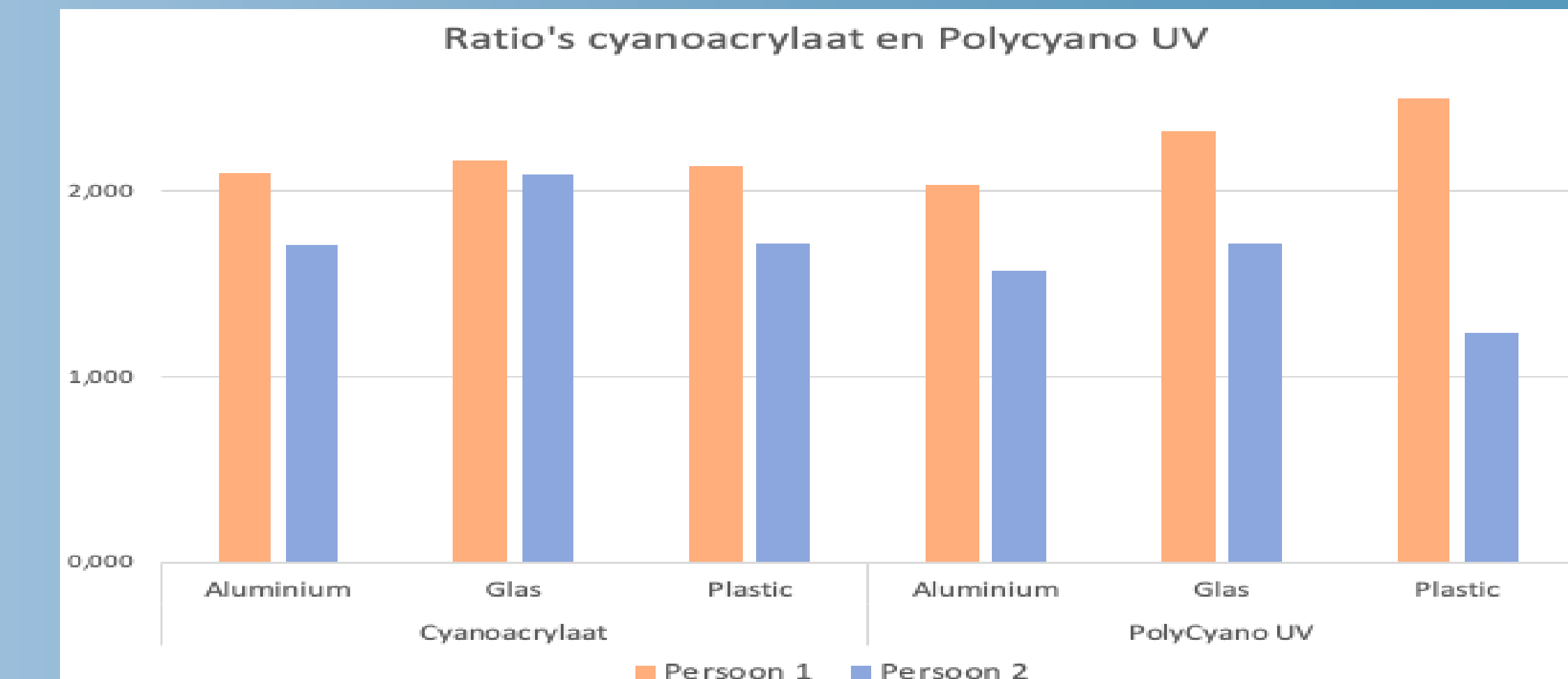
Tabel 1: PCR-instellingen LINE-assay, Lightcycler®96



RESULTATEN

		Ratio	
Methode	Ondergrond	Persoon 1	Persoon 2
Controle gefragmenteerd		0,346	0,208
Controle intact DNA		3,021	3,278
Cyanoacrylaat	Aluminium	2,094	1,706
	Glas	2,164	2,083
	Plastic	2,130	1,717
Polycyano UV	Aluminium	2,029	1,570
	Glas	2,319	1,716
	Plastic	2,496	1,234

Tabel 2: Ratio's per opdamplingsmethode, ondergrond en donor



Figuur 3: Ratio's per opdamplingsmethode, ondergrond en donor

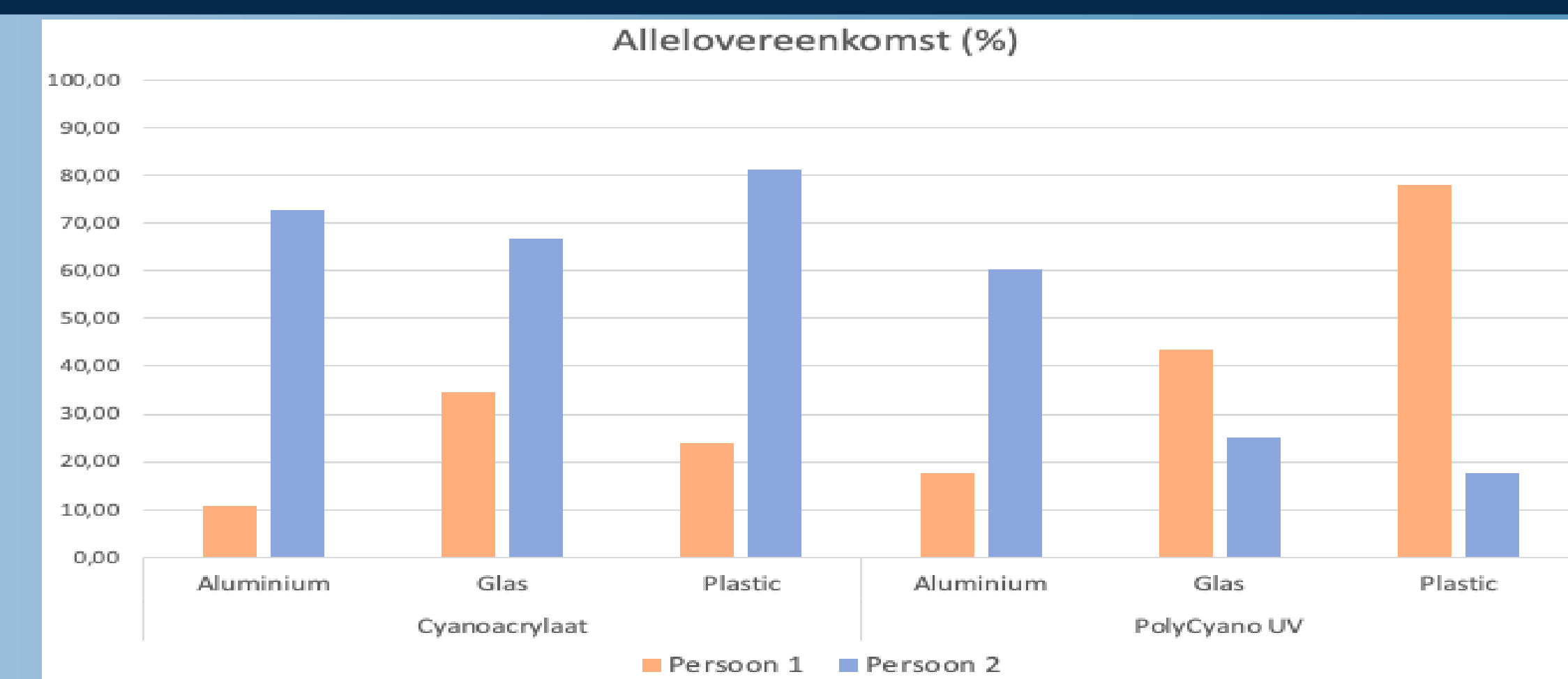
De data-analyse is uitgevoerd met de **LinRegPCR-software**. De ratio weergegeven in tabel 2 wordt berekend op basis van de NO-waarden van 330F-fragmenten (intact) op de NO-waarden van 66F-fragmenten (gefragmenteerd), uitgerekend door deze software.

Hoe hoger de ratio, hoe meer intact DNA aanwezig. Wanneer de ratio <1 is, betekent dit dat het staal meer fragmentatie dan intact DNA bevat. In de bovenste tabel is te zien dat de controles geslaagd zijn bij beide personen. De laagste ratio's per persoon geven dus het meest gefragmenteerd staal weer. Bij persoon 1 zorgt de Polycyano UV-methode gemiddeld (2,281) gezien voor de minste fragmentatie terwijl bij persoon 2 de cyanoacrylaatopdamplingsmethode (1,831) het minst DNA heeft gedegradeerd.

Het **percentage allelovereenskomst** (tabel 3 en figuur) geeft de kwaliteit van het DNA-profiel weer. Deze waarde geeft de hoeveelheid allelen aan die succesvol gedetecteerd zijn tegenover de positieve controle per individu. Hier komt ook dezelfde veronderstelling uit. Bij persoon 1 wijst het erop dat Polycyano UV een kwaliteitsvoller profiel genereert door een gemiddeld hoger percentage allelovereenskomst (46,37%). Bij persoon 2 zijn de DNA-profielen die met cyanoacrylaat zijn opgedampt gemiddeld betrouwbaarder (73,61%).

		Allelovereenskomst (%)	
Methode	Ondergrond	Persoon 1	Persoon 2
Cyanoacrylaat	Aluminium	10,87	72,92
	Glas	34,78	66,67
	Plastic	23,91	81,25
Polycyano UV	Aluminium	17,39	60,42
	Glas	43,48	25,00
	Plastic	78,26	17,50

Tabel 3: Allelovereenskomst (%) per opdamplingsmethode, ondergrond en donor



Figuur 4: Allelovereenskomst (%) per opdamplingsmethode, ondergrond en donor

CONCLUSIE

Bij persoon 1 lijkt het er een verband te zijn tussen de stijgende ratio en stijgende allelovereenskomst. Dit kan een indicatie zijn dat er meer gefragmenteerd staal (lage ratio), een minder kwaliteitsvol DNA-profiel veroorzaakt. De ratio's van persoon 1 en 2 zijn echter erg verschillend. Deze stalen werden afzonderlijk geanalyseerd dus kunnen deze verschillen te wijten zijn aan het feit dat de analyse op onafhankelijke momenten is uitgevoerd. Bij persoon 1 is er algemeen een betere profilering met de Polycyano UV-methode terwijl dit bij persoon 2 cyanoacrylaat betreft. Op basis van dit onderzoek kan er momenteel niet gezegd worden of er een significant verschil is tussen de 2 opdamplingsmethodes vanwege gebrek aan statistische analyse.

Referenties

- Saelee, S. L., Lovejoy, A. F., Hinzmann, B. et al. Quantitative PCR-Based Method to Assess cfDNA Quality, Adjust Input Mass, and Improve Q1 Next-Generation Sequencing Assay Performance. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 12 april 2022. 3. 250-260.
- Verstraeten, M. Materiaal & methode. *Visme*. 12 juni 2022.