

SWGDM VALIDATION STUDY OF THE PROFILER PLUS KIT FOR FORENSIC CASEWORK ANALYSIS

Agnieszka MACIEJEWSKA¹, Ryszard PAWŁOWSKI^{1, 2}

¹ *Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej, Gdańsk*

² *Instytut Ekspertyz Sądowych, Kraków*

ABSTRACT: Studies were performed as recommended by the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM previously known as TWGDM) committee to validate the AmpFLSTR Profiler Plus PCR Amplification Kit for forensic casework applications. Amplification products were detected using the ABIPRISM 310 Genetic Analyser. Various biological traces, stored for various time periods and in different environmental conditions, were examined. They were blood, saliva and semen stains incubated at high temperature and humidity and blood stains on various substrata. The influence of two methods of DNA extraction from biological traces and of various inhibitors on the specificity and efficiency of PCR amplification was also tested. It was shown that the most useful method of DNA extraction from biological traces is the classical phenol-chloroform method, which offers high recovery of pure DNA. It was also observed that the DNA isolation method influences not only the efficiency of DNA extraction, but also the proportion of heterozygous alleles and the reciprocal balance of individual loci of the examined system.

KEY WORDS: ProfilerPlus multiplex; Validation study; SWGDM recommendations.

Problems of Forensic Sciences, vol. LVI, 2003, 76–88

Received 10 November 2003; accepted 18 December 2003

INTRODUCTION

Multiplex PCR systems have been used for establishing identity in forensic medicine since 1993. The first of these systems put into practice in forensic medicine was Quadruplex, containing loci: TC11, VWA, F13A and FES [3, 4]. In the course of time other multiplex systems, which have been applied mainly in forensic genetics, were introduced. In 1997 the decaplex AmpFLSTR Profiler Plus [8] was developed. The kit coamplifies 9 short tandem repeat (STR) loci and the amelogenin gene fragment as a sex marker. In accordance with SWGDM instructions, every system put into practice in forensic genetics requires detailed verification of its usefulness, and ascertainment of factors influencing its credibility and reliability [5, 10, 11]. Population genetics of the 9 Profiler Plus loci in a population sample from north-

ern Poland, the influence of DNA quantity on artefacts being made during Profiler Plus loci amplification and the precision of determining of the dimensions of alleles of the examined system were presented in a previous paper [7]. A variety of environmental studies have been performed, as forensic samples are often exposed to different environmental conditions and substances that may degrade DNA or inhibit the amplification process [1, 9, 12].

The aim of this study was to continue the validation process of the Profiler Plus kit enabling assessment of the influence of the DNA degradation process and substrata type on Profiler Plus loci amplification.

MATERIALS AND METHODS

Biological samples

Human blood and saliva samples were obtained from one female. The same blood sample was used when studying the influence of substratum. The human semen sample originated from a male volunteer.

DNA isolation and quantitation

DNA isolation from experimental biological stains was conducted using the phenol-chloroform (F/CH) and/or Chelex-100 method [2, 13]. In some cases, DNA extracts were purified on Microcon-100 (Millipore) columns. DNA was quantified using the QuantiBlot kit (Perkin-Elmer USA), with use of the chemiluminescent detection method (ECL, Amersham).

Amplification and detection of Profiler Plus system products

Amplification of Profiler Plus loci and separation of PCR products was conducted as described before [7]. The optimal DNA concentration of 1.25ng DNA /25 µl PCR mixture was used for the amplification. Peak height ≥ 150 RFU (relative fluorescence units), was taken as the threshold value of allele presence in the analysed electropherograms.

Influence of extreme environment conditions on blood, saliva and semen stain degradation

Experimental blood, saliva and semen stains deposited on cotton were stored at 56°C and 100% humidity for 30 days. To achieve 100% humidity, stains were kept on Petri dishes floating on the water surface in tight closed water baths. Material for the tests was sampled after 1, 5, 10, 15, 20 and 30 days of incubation.

The influence of substratum type

Twelve experimental blood stains prepared using blood originating from one woman were prepared on various substrata (two stains on each material: jeans fabric, sandy coloured carpet, wood, black calf leather, rusty metal and lumps of damp soil). The stains were stored for two months at room temperature and humidity. One group of stains was extracted with Chelex-100, and the other with the F/Ch method.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of DNA stability in blood, saliva and semen stains stored in extreme environmental conditions

The aim of the experiment was to investigate the influence of extreme conditions (56°C and 100% humidity) on amplification of Profiler Plus loci in various biological stains. In the case of blood stains, a complete DNA profile was obtained after 1 day of incubation only. The achieved peak heights of all Profiler Plus loci alleles exceeded 150 RFU, and calculated alleles ratio for all examined heterozygotes (loci: D3S1358, HUMVWA, HUMFGA, D13S317, D7S820, D21S11, D8S1179 and D18S51) exceeded 70%. After 5 days of blood stain incubation, a drop in the amplification efficiency of long alleles, especially locus D7S820 (RFU < 150), was observed. The influence of temperature and humidity was clearly visible in the case of blood stains incubated for 10 and 15 days. After 10 days only amplification of the amelogenin gene and loci: D3S1358, HUMVWA, D8S1179 and D5S818 (RFU > 150) were achieved, and after 15 days only the amelogenin gene (1408 RFU) and locus D8S1179 (RFU < 150) were amplified (Figure 1). At the same time, there occurred a considerable reduction in proportions of alleles of the heterozygous locus D8S1179 (55.3%), which was not observed in the case of non-degraded material. After 20 days of incubation, no amplification of Profiler Plus loci was obtained.

In the case of the saliva stain, after 1 day of incubation at 56°C, a complete DNA profile was obtained. A correct, proportional alleles ratio of all examined heterozygotes were also observed (over 70%). After 5 days of storing, a decrease in efficiency of Profiler Plus loci amplification, and loss of locus D7S820 was observed. In DNA isolated from the saliva stain incubated for 10 days, identification of the amelogenin gene and both alleles of VWA locus was still possible (Figure 2). After 15 days, no amplification of Profiler Plus loci was observed.

The semen stain was the most stable in the given conditions. After 10 days of incubation, amplification of all Profiler Plus loci was obtained (Figure 3), and proportional heterozygous alleles ratio was over 70%. After

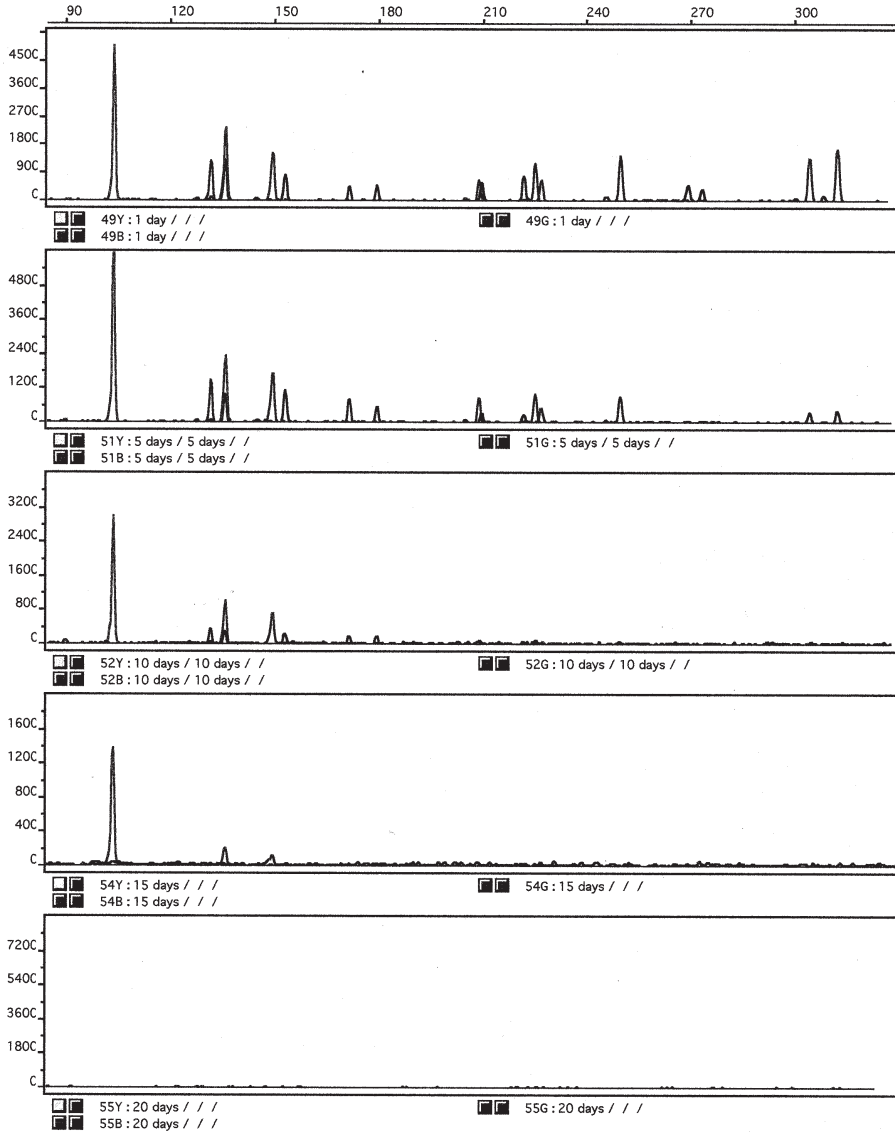


Fig. 1. Influence of extreme conditions on blood stain degradation. Panels from 1–5: 1st, 5th, 10th, 15th and 20th day of degradation, respectively.

15 days of incubation of semen stain, a decrease in amplification efficiency of loci: D21S11, D7S820, D13S317 (RFU < 150) was observed. After 20 days, an amplification signal over 150 RFU was obtained only for the amelogenin gene, and loci: D3S1358, D8S1179, D5S818 and HUMVWA. In the case of HUMVWA, a clear differentiation of heterozygous alleles height ratio (49.7%),

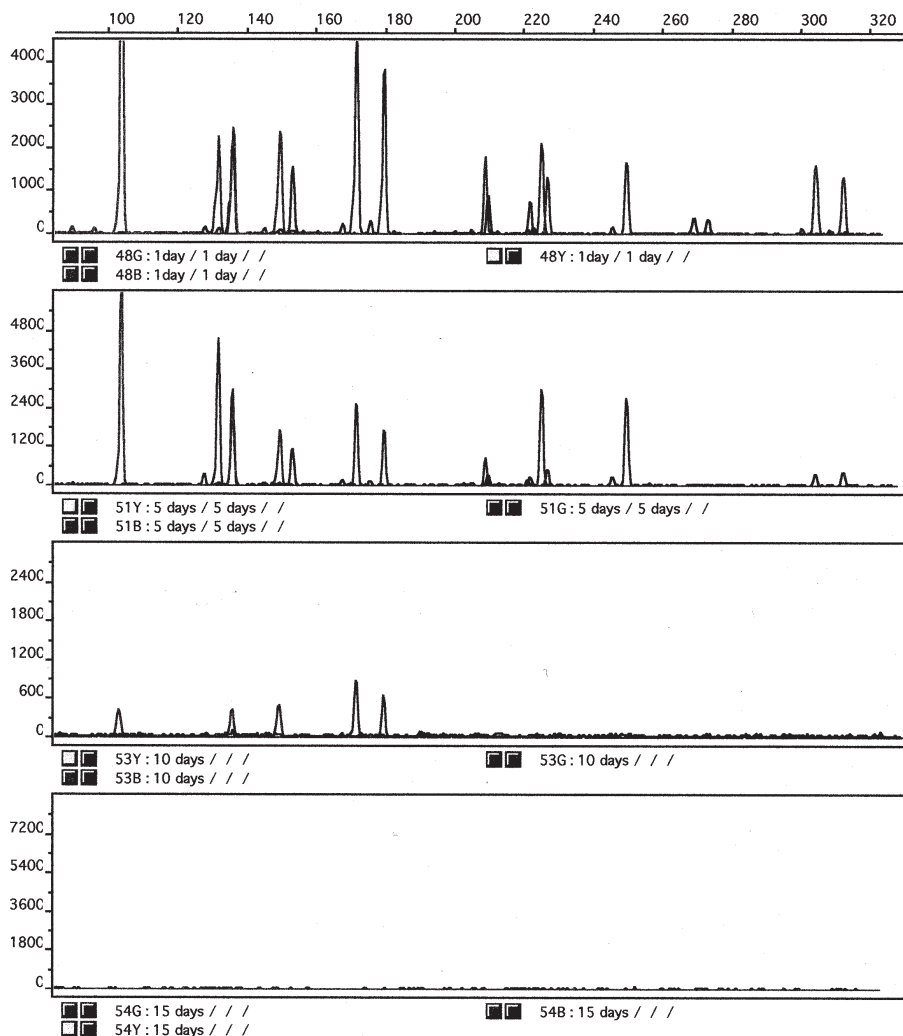


Fig. 2. Influence of extreme conditions on saliva stain degradation. Panels from 1–4: 1st, 5th, 10th, and 15th day of degradation, respectively.

was observed. When degradation time was prolonged to 25 days, the lower allele was only 1/3 of the higher allele. Moreover, after that time, amplification of the amelogenin gene, homozygotes at D5S818, D8S1179 loci and heterozygote D3S1358, for which the calculated proportional alleles ratio equalled 94.6%, was obtained. It seems that the unbalanced amplification signal of heterozygous alleles, resulting from degraded DNA amplification, may depend not only on time, and thus on DNA degradation level, but on the examined locus type (HUMVWA versus D3S1358) as well. This effect may,

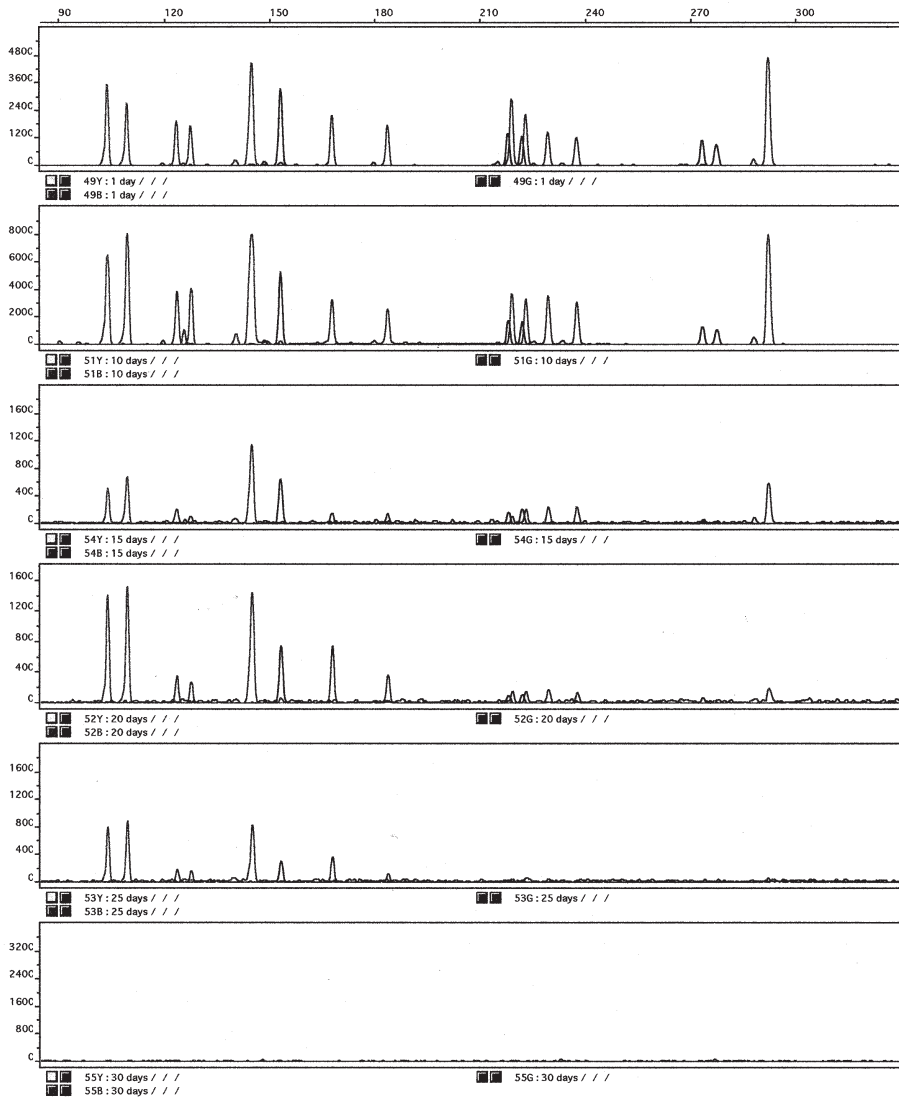


Fig. 3. Influence of extreme conditions on semen stain degradation. Panels from 1–6: 1st, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th day of degradation, respectively.

however, be partially or entirely caused by a stochastic effect. After 30 days of incubation, no amplification signal of Profiler Plus loci was obtained. During the examination, much faster negative results of loci marked with NED (D5S818, D13S317, D7S820) than other loci marked with 5-FAM and JOE were observed.

TABLE I. COMPARISON OF EFFICIENCY OF PROFILER PLUS LOCI AMPLIFICATION IN DNA ISOLATED FROM BLOOD STAINS ON VARIOUS SUBSTRATA

Matrix type	D3S1358	HUM VWA	HUM FGA	AMGXY	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
Jeans fabric*	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Carpet*	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Wood*	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Leather*	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Iron*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iron (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soil*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soil (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chelex-100 method										
Jeans fabric *	++	++	++	++	++	++	-	++	-	-
Carpet*	++	+	+	++	++	+	-	++	+	-
Carpet (Microcon 100)	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++
Wood*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wood (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leather*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leather (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iron*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iron (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soil*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soil (Microcon 100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- lack of amplification; + unbalanced amplification signal of heterozygous alleles (ratios of heterozygous alleles < 70%); ++ balanced amplification signal of heterozygous alleles (ratios of heterozygous alleles > 70%). MiCon 100 - microcon 100 additional purification; * - no additional microcon 100 purification.

Similar phenomena, such as reduction of amplification signal, lack of amplification of the longest alleles and locus drop-outs were also observed as a result of controlled treatment of DNA with DNA-ase I [6].

Influence of substratum and isolation method type on amplification of DNA isolated from blood stains

The influence of the matrix type and the DNA extraction method on Profiler Plus loci amplification was tested. Analysis of amplification products showed that in the case of DNA isolated using the phenol-chloroform method from blood stains prepared on jeans fabric, carpet, leather and wood, a complete and balanced DNA profile of 10 loci (Table I) was obtained. The calculated alleles ratio for all heterozygotes present in the analysed sample was over 70%. In the case of the Chelex-100 method, a decrease in the efficiency of the examined loci amplification, as compared to the phenol-chloroform method, strong inhibition of long DNA fragments amplification (loci: D13S317, D7S820, D18S51) and change in heterozygous alleles relation (under 70%) (Table I), were often observed.

For DNA isolated from blood stains deposited on metal and soil, no positive amplification result was obtained by either of the used methods, even with the additional purification of extracts with Microcon-100. This effect is probably caused by the presence of strong PCR reaction inhibitors, such as metal ions or humic acid, in DNA extracts. It is also possible that, during two months storage of the blood stains on wet soil, considerable DNA degradation, hindering the amplification of even short DNA fragments (about 100bp), took place.

References:

1. Frégeau C. J., Bowen K. L., Fournery R. M., Validation of highly polymorphic fluorescent Multiplex Short Tandem Repeat Systems using two generations of DNA, *Journal of Forensic Sciences* 1999, vol. 44, pp. 133–166.
2. Gill P., Jeffreys A. J., Werrett P. J., Forensic application of DNA fingerprints, *Nature* 1985, vol. 318, pp. 577–579.
3. Kimpton C. P. [et al.], Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci, *PCR Methods and Applications* 1993, vol. 3, pp. 13–22.
4. Kimpton C. P., Fisher D., Watson S. [et al.], Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex of four tetrameric STR loci, *International Journal of Legal Medicine* 1994, vol. 106, pp. 302–311.
5. Lygo J. E., Johnson P. E., Holdaway D. J. [et al.], The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework, *International Journal of Legal Medicine* 1994, vol. 107, pp. 77–89.

6. Maciejewska A., Pawłowski R., Wpływ degradacji matrycowego DNA na amplifikację loci zestawu Profiler Plus, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2001, t. 51, s. 217–226.
7. Pawłowski R., Maciejewska A., Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in Northern Poland, *International Journal of Legal Medicine* 2000, vol. 114, pp. 45–49.
8. Perkin-Elmer: Applied Biosystem. ser's manual, AmpFISTR Profiler Plus, PCR Amplification Kit, 1997.
9. Sparkes R., Kimpton C., Watson S. [et al.], The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I) Mixtures, ageing, degradation and species studies, *International Journal of Legal Medicine* 1996, vol. 109, pp. 186–194.
10. Technical Working Group on DNA Analysis Methods: Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis, *Crime Laboratory Digest* 1995, vol. 22, pp. 21–43.
11. Wallin J. M., Walsh P. S., Buonocristiani R. [et al.], TWGDAM validation of the AmpFISTR Blue PCR Amplification Kit for forensic casework analysis, *Journal of Forensic Sciences* 1998, vol. 43, pp. 854–870.
12. Walsh S., Higuchi R., PCR inhibition and bloodstains, Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis, Quantico, 19–23 June 1989, pp. 281–328.
13. Walsh S., Metzger D. A., Higuchi R., Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Bio-techniques* 1991, vol. 10, pp. 506–513.

WALIDACJA ZESTAWU PROFILER PLUS DO CELÓW SĄDOWYCH NA PODSTAWIE ZASAD SFORMUŁOWANYCH PRZEZ GRUPĘ ROBOCZĄ SWGDAM

Agnieszka MACIEJEWSKA, Ryszard PAWŁOWSKI

WSTĘP

Metody umożliwiające jednoczesną amplifikację wielu układów DNA (ang. multiplex PCR) stosowane są w badaniach identyfikacyjnych prowadzonych w medycynie sądowej od roku 1993. Pierwszy zestaw służący do tego celu zawierał cztery *loci*: TC11, VWA, F13A i FES [3, 4]. Z biegiem czasu opracowano kolejne zestawy umożliwiające jednoczesną amplifikację wielu *loci*, które wykorzystywano głównie w genetyce sądowej. W roku 1997 opracowano zestaw AmpFLSTR Profiler Plus umożliwiający jednoczesną amplifikację dziesięciu układów DNA [8]. Zestaw zapewnia amplifikację 9 *loci* typu STR oraz fragmentu genu amelogeniny w charakterze markera płci. Zgodnie z zaleceniami grupy roboczej zrzeszającej naukowców zajmujących się analizą DNA – SWGDAM (ang. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods), każdy nowy system wprowadzany do rutynowego zastosowania w genetyce sądowej wymaga szczegółowej weryfikacji pod względem jego użyteczności, a także określenia czynników wpływających na jego wiarygodność i niezawodność [5, 10, 11]. W odrębnej publikacji przedstawiono wyniki dotyczące genetyki populacyjnej 9 *loci* typu STR zestawu Profiler Plus dla populacji Polski północnej, wpływu stężenia DNA na powstawanie artefaktów podczas amplifikacji z zastosowaniem zestawu Profiler Plus oraz precyzji oznaczania długości alleli badanych układów DNA [7]. W związku z tym, iż próbki będące przedmiotem badań sądowych często narażone są na działanie różnych warunków środowiskowych oraz substancji, które mogą prowadzić do degradacji DNA lub hamowania procesu amplifikacji [1, 9, 12], przeprowadzono szereg eksperymentów określających wpływ tego typu czynników na uzyskiwane wyniki. Celem niniejszych badań była kontynuacja procesu walidacji zestawu Profiler Plus umożliwiająca ocenę wpływu procesu degradacji DNA i rodzaju podłoża na amplifikację *loci* wchodzących w skład tego zestawu.

MATERIAŁY I METODY

Próbki biologiczne

Próbki krwi ludzkiej oraz śliny pochodziły od jednej kobiety. Tę samą próbkę krwi wykorzystano również w doświadczeniach nad wpływem podłoża. Próbka nasienia człowieka wykorzystana w badaniach pochodziła od jednego ochotnika.

Izolacja i pomiar stężenia DNA

Izolację DNA z przygotowanych śladów biologicznych prowadzono z zastosowaniem metody fenolowo-chloroformowej (F/CH) i (lub) metody opartej na zastosowa-

niu żywicy Chelex-100 [2, 13]. W niektórych przypadkach ekstrakty DNA oczyszczano przy pomocy kolumnenek Microcon-100 (Millipore). Pomiar ilości DNA prowadzono z zastosowaniem zestawu QuantiBlot (Perkin-Elmer, Stany Zjednoczone) i chemiluminescencyjnej metody detekcji (ECL, Amersham).

Amplifikacja i detekcja produktów PCR zestawu Profiler Plus

Amplifikację *loci* wchodzących w skład zestawu Profiler Plus i rozdział elektroforetyczny produktów PCR prowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [7]. Reakcję amplifikacji prowadzono, stosując optymalne stężenie 1,25 ng matrycy DNA w 25 μ l całkowitej objętości mieszaniny PCR. Jako wartość progową obecności alleli w analizowanych widmach elektroforetycznych przyjęto wysokość pików ≥ 150 RFU (ang. relative fluorescence unit).

Wpływ ekstremalnych warunków środowiskowych na degradację plam krwi, śliny oraz nasienia

Doświadczalne plamy krwi, śliny i nasienia przygotowane na bawełnie przechowywano w temperaturze 56°C przy jednoczesnej 100% wilgotności powietrza przez 30 dni. Warunki 100% wilgotności zapewniono, umieszczając plamy w płytkach Petriego pływających po powierzchni szczelnie zamkniętych łaźni wodnych. Próbkę badawczą pobierano po 1, 5, 10, 15, 20 i 30 dniach inkubacji.

Wpływ rodzaju podłoża

Dwanaście doświadczalnych plam krwi pochodzącej od jednej kobiety przygotowano na różnych podłożach (po dwie plamy na każdym materiale: tkanina dżinsowa, dywan w kolorze piaskowym, drewno, czarna skóra wołowa, zardzewiały metal, grudki wilgotnej soli). Plamy przechowywano przez dwa miesiące w temperaturze i wilgotności pokojowej. Jedna grupa plam poddana została ekstrakcji metodą z zastosowaniem żywicy Chelex-100, druga metodą fenolowo-chloroformową.

WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

Porównanie stabilności DNA w plamach krwi, śliny i nasienia przechowywanych w ekstremalnych warunkach środowiskowych

Celem niniejszego eksperymentu była ocena wpływu ekstremalnych warunków (56°C i 100% wilgotności powietrza) na amplifikację *loci* wchodzących w skład zestawu Profiler Plus w różnych plamach biologicznych. W przypadku plam krwi, kompletny profil DNA uzyskano wyłącznie po 1 dniu inkubacji. Wysokości pików przekroczyły wartość 150 RFU w przypadku wszystkich alleli *loci* zestawu Profiler Plus, a obliczone wartości proporcji wysokości alleli dla wszystkich analizowanych układów heterozygotycznych (*loci*: D3S1358, HUMVWA, HUMFGA, D13S317, D7S820, D21S11, D8S1179 i D18S51) przekroczyły 70%. Po 5 dniach inkubacji plam krwi zaobserwowano obniżenie wydajności amplifikacji długich alleli, zwłaszcza w przypadku lokus D7S820 (RFU < 150). Wpływ temperatury i wilgotności był wyraźnie widoczny w przypadku plam krwi poddanych 10 i 15 dniowej inkubacji. Po 10 dniach pozytywne wyniki amplifikacji uzyskano wyłącznie dla genu amelogeniny oraz *loci*:

D3S1358, HUMVWA, D8S1179 i D5S818 (RFU > 150). Po 15 dniach pozytywny sygnał amplifikacji uzyskano wyłącznie dla amelogeniny (1408 RFU) oraz lokus D8S1179 (RFU < 150) – rycina 1. W przypadku tej próbki zaobserwowano znaczącą redukcję wartości proporcji wysokości alleli heterozygotycznego lokus D8S1179 (55,3%), czego nie obserwowano w przypadku materiału nie narażonego na degradację. Po 20 dniach inkubacji nie uzyskano amplifikacji dla żadnego układu DNA zestawu Profiler Plus.

W przypadku plamy śliny po jednym dniu inkubacji w temperaturze 56°C uzyskano kompletny profil DNA w zakresie *loci* zestawu Profiler Plus. Zaobserwowano również prawidłowe, współmierne proporcje alleli wszystkich badanych układów heterozygotycznych (wartości przekraczały 70%). Po 5 dniach przechowywania odnotowano obniżenie wydajności amplifikacji *loci* zestawu Profiler Plus oraz brak amplifikacji lokus D7S820. W ekstraktach DNA plamy śliny poddanej 10 dniowej inkubacji wciąż możliwa była amplifikacja lokus amelogeniny oraz obu alleli lokus VWA (rycina 2). Po 15 dniach inkubacji nie uzyskano pozytywnego sygnału amplifikacji dla żadnego układu zestawu Profiler Plus.

Najbardziej stabilna w badanych warunkach okazała się plama nasienia. Po 10 dniach inkubacji uzyskano pozytywne wyniki amplifikacji dla wszystkich układów zestawu Profiler Plus (rycina 3), a wartość stosunku wysokości alleli heterozygot przekraczała 70%. Po 15 dniach inkubacji badanej plamy nasienia, zaobserwowano obniżenie wydajności amplifikacji w przypadku *loci*: D21S11, D7S820, D13S317 (RFU < 150). Po 20 dniowej inkubacji sygnał amplifikacji przewyższył wartość 150 RFU wyłącznie w przypadku genu amelogeniny oraz *loci*: D3S1358, D8S1179, D5S818 i HUMVWA. Dla heterozygotycznego układu HUMVWA odnotowano wyraźne zróżnicowanie stosunku wysokości alleli, którego wartość wyniosła 49,7%. Po przedłużeniu czasu inkubacji do 25 dni wysokość allela niższego nie przekroczyła 1/3 wysokości allela wyższego. Po tym czasie uzyskano pozytywne wyniki amplifikacji dla genu amelogeniny, homozygot w *loci* D5S818 i D8S1179 oraz heterozygoty w lokus D3S1358, dla którego obliczona wartość proporcji obu alleli wyniosła 94,6%. Oznacza to, iż nierównoważony sygnał amplifikacji alleli dla *loci* heterozygotycznych, związany z amplifikacją zdegradowanego DNA, może wynikać nie tylko z samego czasu narażenia na degradację, a zatem stopnia jej zaawansowania, ale może być również zależny od typu lokus (HUMVWA *versus* D3S1358). Nie można jednak wykluczyć, iż taki wynik może być częściowo lub całkowicie wywołany efektem stochastycznym. Po 30 dniach inkubacji uzyskano negatywny wynik amplifikacji dla wszystkich *loci* wchodzących w skład zestawu Profiler Plus. Przeprowadzone eksperymenty wykazały również znacznie wcześniejsze uzyskiwanie negatywnych wyników amplifikacji w przypadku *loci* znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym NED (D5S818, D13S317, D7S820) w porównaniu do innych *loci* znakowanych barwnikami 5-FAM i JOE.

Podobne zjawiska, jak obniżenie sygnału amplifikacji, brak amplifikacji dłuższych alleli oraz całych układów obserwowano także w eksperymentach, w których DNA poddawano degradacji w sposób kontrolowany z zastosowaniem DNA-zy I [6].

Wpływ podłoża i metody izolacji na amplifikację DNA izolowanego z plam krwi

W doświadczeniu ocenie poddano wpływ rodzaju podłoża oraz metody ekstrakcji DNA na amplifikację *loci* zestawu Profiler Plus. Analiza produktów amplifikacji wykazała, że w przypadku DNA izolowanego z zastosowaniem metody fenolowo-chloroformowej z plam krwi przygotowanych na tkaninie dżinsowej, dywanie, skórze i drewnie uzyskano kompletny i dobrze zbalansowany profil DNA w zakresie wszystkich 10 *loci* (tabela I). Skalkulowane wartości proporcji alleli układów heterozygotycznych analizowanej próbki przekroczyły 70%. W przypadku metody ekstrakcji polegającej na zastosowaniu żywicy Chelex-100 zaobserwowano obniżenie wydajności amplifikacji badanych *loci* w porównaniu do próbek izolowanych z zastosowaniem metody fenolowo-chloroformowej, jak również negatywne efekty w postaci silnego zahamowania amplifikacji długich fragmentów DNA (*loci* D13S317, D7S820, D18S51) oraz zmiany proporcji siły sygnału alleli *loci* heterozygotycznych (poniżej 70%) – tabela I.

Dla DNA izolowanego z plam krwi naniesionych na metal oraz sól w przypadku obu zastosowanych metod ekstrakcji uzyskano negatywny wynik amplifikacji. Poprawy nie uzyskano nawet po zastosowaniu dodatkowego oczyszczania próbek z zastosowaniem kolumnienek Microcon-100. Efekt ten jest prawdopodobnie wywołany obecnością w ekstraktach DNA silnych inhibitorów reakcji PCR, takich jak jony metali lub kwas huminowy. Nie można również wykluczyć, że podczas dwóch miesięcy doszło do znaczącej degradacji DNA zawartego w plamach krwi naniesionych na wilgotną sól, co uniemożliwiło amplifikację nawet krótkich (ok. 100 pz) fragmentów DNA.