Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for kjemi, bioteknologi og
matvitenskap (IKBM).

Masteroppgave 2014
60 stp

Uttesting av ny sporsikringsmetode for epitelceller fra tekstiler.

Examination of a new method to recover epithelial cells from textile surfaces.

Merete Ramse

Forord

Denne masteroppgaven er gjennomført som en del av masterstudiet bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven er utført i samarbeid med Avdeling for biologiske spor (RESP), Folkehelseinstituttet (FHI).

Arbeidet med denne oppgaven har vært utrolig spennende og lærerikt. Det har vært veldig gøy å teste ut en ny sporsikringsmetode som viser seg å gi bedre resultater enn dagens metode ved sporavdelingen. På denne måten vil den nye metoden kunne bidra til høyere suksessrate ved sikring av biologisk materiale i form av epitelceller på tekstiler i kriminalsaker.

Først vil jeg takke Avdeling for biologiske spor ved avdelingsdirektør Bente Mevåg for at hun lot meg gjennomføre denne masteroppgaven ved hennes avdeling. Jeg vil også rette en stor takk til mine utrolig dyktige veiledere; Thore Egeland (NMBU), Helen Johannessen (RESP) og Per Hoff-Olsen (RESP) som har gitt meg veldig god veiledning både under den praktiske gjennomføringen av prosjektet og ved oppgaveskrivingen. I tillegg vil jeg takke Karianne Molema som har vært svært hjelpsom under laboratoriearbeidet.

Videre vil jeg takke vår frivillige forsøksperson ved sporavdelingen og alle de frivillige ved Oslo politidistrikt som har bidratt til at denne oppgaven ble mulig å gjennomføre. Jeg vil også takke resten av de ansatte ved sporavdelingen som har vært tålmodige og hjelpsomme under gjennomføringen av prosjektet.

Til slutt vil jeg spesielt takke min samboer, datter og mor som har motivert meg og gitt meg arbeidsro. Uten dem ville ikke dette vært mulig å gjennomføre.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, 06.05.14

_____

Merete Ramse

Sammendrag

I straffesaker benyttes blant annet biologiske spor, som epitelceller, hår, blod etc., til å identifisere eventuelle mistenkte, vitner og fornærmede. I dagens rutine ved Avdeling for biologiske spor (RESP), Folkehelseinstituttet (FHI), sikres mulig cellemateriale fra ulike gjenstander (f.eks. et klesplagg, en skrutrekker etc.) i hovedsak ved vattpinneavstryk eller ved direkte utklipp fra materialet. En alternativ sporsikringsmetode er å bruke en kommersiell mini-tape som er produsert med sporsikring som formål.

Hensikten med dette prosjektet var å sammenlikne dagens vattpinnemetode mot sporsikring med mini-tape ved sikring av epitelceller fra ulike tekstiloverflater. På bakgrunn av resultatene, brukervennlighet og pris skulle det vurderes om sporsikring med mini-tape er en bedre egnet sporsikringsmetode enn vattpinne ved sikring av epitelceller fra tekstiler, og om denne metoden dermed bør implementeres i rutinen ved sporavdelingen.

I første del av prosjektet ble to ulike mini-taper testet; Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit», som begge er laget spesielt med tanke på sikring av biologiske spor. Tapetypene ble benyttet på tre ulike tekstiloverflater og DNAet ble ekstrahert med to ulike ekstraksjonsmetoder, hhv. 5 % Chelex-løsning (Chelex® 100 Resin) og QIAamp (Qiagen). Mini-tapen og ekstraksjonsmetoden som ut fra en samlet vurdering var best egnet for sporsikring ble benyttet videre i prosjektet. Det ble benyttet standard statistiske metoder, inkludert variansanalyse, og de fleste beregningene ble utført i statistikkprogrammet ”R” og overbygningen ”R Commander”.

Ved sammenlikning av de to tapetypene viste typeresultatene for Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit» ingen signifikante forskjeller, og prisen på de to tapetypene var tilnærmet lik. Scenesafe FAST™ fremsto imidlertid som mer brukervennlig, både ved sporsikring og ekstraksjon, da den var mindre klebrig enn WA Products «1 tape kit». Ved sammenlikning av ekstraksjonsmetodene ga Chelex-ekstraksjon signifikant bedre typeresultater enn ekstraksjon med QIAamp. I tillegg var Chelex-ekstraksjon både en billigere og raskere metode å anvende i rutinen. På bakgrunn av disse resultatene ble det bestemt å benytte mini-tapen Scenesafe FAST™ og ekstrahering av DNA med Chelex videre i prosjektet.

I andre del av prosjektet ble sporsikring av epitelceller fra ulike tekstiloverflater med mini-tape (Scenesafe FAST™) ekstrahert med Chelex sammenliknet mot dagens rutinemetode ved Avdeling for biologiske spor som er vattpinne (Tubed Sterile Dryswab™ Wood Shaft, MWE)

ekstrahert med Chelex. Begge sporsikringsmetodene ble benyttet for å sikre epitelceller fra tre ulike tekstiloverflater.

Sporsikring med mini-tape ga signifikant høyere DNA-kvantiteringsverdier enn sporsikring med vattpinne. Ved å vurdere typeresultatene ut fra styrke i form av allellhøyde, ga prøvene sikret med mini-tape signifikant sterkere typeresultater enn prøvene sikret med vattpinne. På grunnlag av dette er det rimelig å konkludere at sporsikring på tekstiler med mini-tape vil gi bedre typeresultater enn sporsikring med vattpinne, også i rutinen ved sporavdelingen i reelle saker. Ved den praktiske sporsikringen var mini-tapen enkel å bruke, og foretrukket fremfor vattpinnen. Imidlertid ble tapen noe statisk da den skulle overføres til prøverøret.

På bakgrunn av resultatene fra dette forsøket, samt vurderingene rundt brukervennlighet og pris har sporsikring med mini-tape (Scenesafe FAST™) og påfølgende DNA-ekstraksjon med Chelex i hovedsak erstattet vattpinneavstryk ved sikring av epitelceller fra tekstiler ved Avdeling for biologiske spor.

Abstract

In criminal cases biological material, such as epithelial cells, hair, blood etc., are often used to identify suspects, victims and witnesses. The Department of Forensic Biology, Norwegian Institute of Public Health, mainly uses cottonswab or directly cutting as a sampling method to collect possible cellular material from different objects (for example clothing, screwdriver etc.). An alternative method is to use a commercial minitape produced with the purpose of recovering biological material from surfaces in criminal cases.

The purpose of this project was to compare the current cottonswab method with the tape-lifting method for recovering of epithelial cells from different textile surfaces. Based on the outcome of the tests, the ease of use and costs of the different methods it was evaluated whether tape-lifting is a better method compared to swabbing when recovering epithelial cells from textiles. Further, it was evaluated if tape-lifting should be implemented in the routine at the department.

In the first part of the project two different minitapes were tested; Scenesafe FAST™ and WA Products «1 tape kit». Both tapes are made with the purpose of recovering biological material in casework. The minitapes were tested on three different types of fabrics, and the DNA was extracted with two different methods; 5 % Chelex solution (Chelex® 100 Resin) and QIAamp (Qiagen). The minitape and the method of extraction that, based on an overall assessment, were best suited to recover these epithelial cells were used further in the project. Standard statistical methods, including Analysis of variance, were used and most analyses were performed using “R”. When the different minitapes were compared, the results were not showing any significant differences between Scenesafe FAST™ and WA Products «1 tape kit», and the price of the two tapes was approximately equal. However, Scenesafe FAST™ appeared more user friendly as it was less sticky than WA Products «1 tape kit». When the two different extraction methods were compared, the extraction with Chelex gave significant better results than extraction with QIAamp. Also, the Chelex extraction is a quicker method as well as less expensive to use in the routine. Based on these results it was decided to use Scenesafe FAST™ with Chelex extraction further in the project.

In the second part of the project the minitape (Scenesafe FAST™) followed by DNA extraction with Chelex were compared to the current method at the department, which was cottonswab (Tubed Sterile Dryswab™ Wood Shaft, MWE) also extracted with Chelex, to recover epithelial cells from different types of fabrics. Both methods were used to recover epithelial cells from similar areas on a t-shirt, cap, and wristband used by ten volunteers. The results of the tests demonstrate significantly higher DNA concentrations from the samples collected with minitape

compared to the samples collected with cottonswab. By assessing the DNA profiles by strength in terms of allele height, the samples collected with minitape gave stronger profiles than the samples collected with cottonswab. Based on this it is reasonable to assume that recovering of epithelial cells from textiles will provide more and better DNA profiles when collected with minitape than cottonswab, also in the routine work at the department (i.e. real casework). On the practical aspects, minitape was easy to use, and preferred to swabbing, as a sampling method. However, it did appear to be slightly static when transferring the tape fragments to the DNA tubes.

Based on the results from this experiment, as well as opinions about usability and price, the minitape (Scenesafe FAST™) with subsequent Chelex extraction has mainly replaced the cottonswabs in the routine work at the Department of Forensic Biology when collecting epithelial cells from textiles.

Innholdsfortegnelse

Forord 1

Sammendrag 2

Abstract 4

1. Innledning 9

2. Teori 11

2.1. Sporsikring 11

2.1.1. Generell sporsikring med vattpinne 11

2.1.2. Generell sporsikring med mini-tape 12

2.2. DNA-ekstraksjon 12

2.3. DNA-kvantitering 13

2.4. DNA-amplifisering 14

2.4.1. Short tandem repeats (STR) 16

2.5. Kapillærelektroforese (fragmentlengdeanalyse) 17

2.6. DNA-typing 18

2.7. Statistiske fremstillinger og tester 21

2.7.1. Boksplott 21

2.7.2. Variansanalyse 22

2.7.3. Kjikvadrattesten 24

2.7.4. Paret/uparet sammenlikning 24

2.7.5. Binomisk sannsynlighetsfordeling 25

3. Materialer og Metoder 26

3.1. Innsamling av tekstiler og sporsikring (mini-tape/ vattpinne) 26

3.1.1. Materialer 26

3.1.2. Utstyr 27

3.1.3. Generell metode for sporsikring med mini-tape 27

3.1.4. Generell metode for sporsikring med vattpinne 27

3.1.5. Fremgangsmåte for bruk av og sikring på tekstiler 28

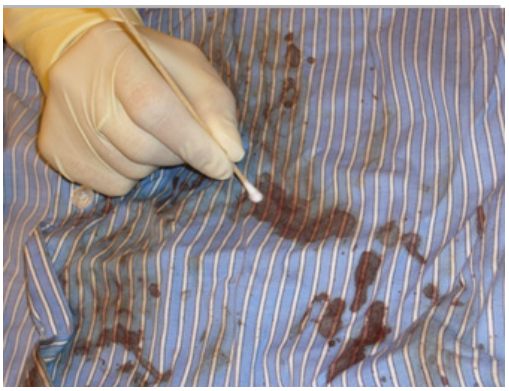
3.2. Ekstraksjon av DNA fra epitelceller ved bruk av Chelex 29
3.2.1. Materiale 29
3.2.2. Utstyr 29
3.2.3. Reagenser 29
3.2.4. Metode 29
3.3. Ekstraksjon av DNA fra epitelceller ved bruk av QIAamp®DNA Mini kit 31
3.3.1. Materiale 31
3.3.2. Utstyr 31
3.3.3. Reagenser 31
3.3.4. Metode 31
3.4. Kvantitering av DNA med Quantifiler Duo 33
3.4.1. Materiale 33
3.4.2. Utstyr 33
3.4.3. Reagenser 33
3.4.4. Metode 33
3.5. Amplifisering av sporprøver med ESX 17 35
3.5.1. Materiale 35
3.5.2. Utstyr 35
3.5.3. Reagenser 35
3.5.4. Metode 35
3.6. Fragmentlengdeanalyse av sporprøver på 3500xl Analyzer 37
3.6.1. Materiale 37
3.6.2. Utstyr 37
3.6.3. Reagenser 37
3.6.4. Metode 38
4. Resultater 39
4.1. Del 1 – Sammenlikning av mini-taper og ekstraksjonsmetoder 39
4.1.1. DNA-kvantiteringsresultater 39
4.1.2. DNA-typeresultater 42

4.2. Del 2 – Sammenlikning av sporsikring med mini-tape og vattpinne 44
4.2.1. DNA-kvantiteringsresultater 44
4.2.2. DNA-typeresultater 49
5. Diskusjon 54
5.1. Del 1 – Sammenlikning av mini-tape og ekstraksjonsmetoder 54
5.1.1. DNA-kvantiteringsresultater 54
5.1.2. DNA-typeresultater 55
5.1.3. Fordeler/ulemper ved sporsikring og ekstraksjon av mini-tapene 56
5.1.4. Kostnad 56
5.2. Del 2 – Sammenlikning av mini-tape og vattpinne 57
5.2.1. DNA-kvantiteringsresultater 57
5.2.2. DNA-typeresultater 58
5.2.3. Fordeler/ulemper ved sporsikring og ekstraksjon med mini-tape og vattpinne ... 59
5.2.4. Kostnad 60
5.3. Eventuelle svakheter ved prosjektet 60
6. Konklusjon 63
7. Litteraturliste 64
8. Appendix 66

1. Innledning

Rettsgenetikk omfatter genetisk kunnskap og vitenskap anvendt i sivil- og strafferettslig sammenheng. Ved rettsgenetikk i kriminalsaker mottar Avdeling for biologiske spor (RESP) ved Folkehelseinstituttet (FHI), beslag og gjenstander med anmodning fra politi og påtalemyndighet om undersøkelse med tanke på biologiske spor i form av vev og/eller kroppsvæsker fra menneske. Undersøkelsene ved sporavdelingen består i hovedsak av forundersøkelser og DNA-undersøkelser. Forundersøkelser brukes for å kartlegge hvilken type cellemateriale som sikres. Ulike forprøvningsmidler benyttes for å påvise ulike kroppsvæsker som blod, sæd etc. For epitelceller finnes det foreløpig ingen forprøvningsmetode. Etter forundersøkelsene kommer selve DNA-undersøkelsen der cellematerialets opphav om mulig identifiseres i form av en DNA-profil. Cellematerialet avsettes i form av epitelceller fra hud og slimhinner, blod, sæd, hår etc. I dagens rutine ved sporavdelingen sikres mulig cellemateriale i hovedsak ved vattpinneavstryk eller ved direkte utklipp fra materialet (f.eks. en genser eller bukse). Ved sporsikring med vattpinne dryppes en dråpe sterilt vann på tuppen av vattpinnen (bomullsvatten) før den gnis mot det aktuelle området eller flekken på materialet, se figur 1.1 og 1.2.

Figur 1.1: Vattpinneavstryk fra området på materiale som skal undersøkes.



Figur 1.2: Vattpinneavstryk fra flekkområde på materiale som skal undersøkes.

Tuppen av vattpinnen, der avstryket er gjennomført, klippes av og overføres til et sterilt eppendorfrør. Direkte utklipp kan utføres der underlaget tillater det, og benyttes i hovedsak når det er synlige flekker eller områder som indikerer for eksempel sæd, blod eller spytt. Utklippet overføres direkte til et sterilt eppendorfrør. Sporavdelingen har tidligere testet ut en alternativ sporsikringsmetode der hjemmelagde mini-taper ble benyttet for å sikre epitelceller fra ulike overflater. Disse mini-tapene fungerte ikke optimalt, hverken ved sporsikring eller DNA-ekstraksjon, da de var for klebrige.

I den senere tid har det kommet flere kommersielle mini-taper på markedet som er produsert med sporsikring i kriminalsaker som formål. Ved mange anerkjente, europeiske fagmiljøer har slike mini-taper erstattet vattpinneavstryk som sporsikringsmetode fra flere typer overflater [1,2]. Sporavdelingen har gjennomført et forsøk der sporsikring med tre ulike vattpinner, samt én hjemmelaget og én kommersiell mini-tape produsert av Scenesafe (Scenesafe FAST™ mini-tape) ble sammenliknet [3]. Den hjemmelagde mini-tapen var imidlertid ikke egnet for ekstraksjonsmetoden som ble brukt, Chelex-ekstraksjon [4], og tapen ble dermed ikke benyttet videre i forsøket. Den kommersielle mini-tapen ga bedre resultater enn de tre vattpinnene ved sporsikring på tekstiler. På grunnlag av erfaringer fra tidligere prosjekter ved sporavdelingen samt erfaringer fra andre laboratorier er målet med dette prosjektet å gjennomføre en grundigere uttesting som eventuelt kan bidra til implementering av mini-tape som rutinesporsikringsmetode for epitelceller fra tekstiloverflater ved Avdeling for biologiske spor.

Prosjektet er delt inn i to deler:
I første del skal to ulike mini-taper produsert av henholdsvis Scenesafe og WA Products sammenliknes mot hverandre. Disse to mini-tapene anvendes av rettsgenetiske miljøer i blant annet England, Skottland og Irland. Mini-tapene skal benyttes ved sporsikring på plagg med ulike tekstiloverflater, og DNAet skal ekstraheres med to ulike metoder, Chelex og QIAamp [2,5]. Videre skal prøvene analyseres etter dagens rutiner ved sporavdelingen. Mini-tapen og ekstraksjonsmetoden som ut fra en samlet vurdering er best egnet for sporsikring benyttes videre i prosjektet.
I andre del skal sporsikring med mini-tape og sporsikring ved vattpinneavstryk på ulike tekstiloverflater sammenliknes. Her benyttes mini-tapen og ekstraksjonsmetoden som ga best resultater i første del, samt sporsikring på vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft, MWE) med påfølgende Chelex-ekstraksjon som er dagens rutinemetode ved sporavdelingen. Med i hovedsak vekt på de statistiske beregningene for typeresultatene vil det bli vurdert hvilken metode som er best egnet til sporsikring av epitelceller på tekstiler.

2. Teori

2.1. Sporsikring

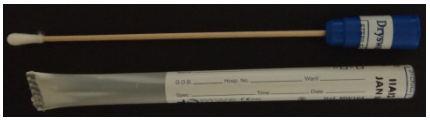
Genomisk DNA finnes i alle celler med cellekjerner, og humant biologisk materiale avsatt på åsteder kan dermed benyttes til identifisering. Ved sporsikring i kriminalsaker sikres mulig cellemateriale fra et område (f.eks. skaftet på et skrujern) eller en flekk (f.eks. blodflekk på en skjorte) på en gjenstand ved hjelp av vattpinneavstryk eller direkte utklipp før videre analyse. På åstedet kan sporsikringen skje ved at politiet selv sikrer mulig cellemateriale på en vattpinne som sendes inn til sporavdelingen for videre analyse. Eventuelt kan politiet som undersøker et åsted sende inn den aktuelle gjenstanden i original slik at sporsikring fra gjenstanden utføres ved sporavdelingen. Kun få celler kan være tilstrekkelig for å oppnå DNA-resultater, og det er derfor viktig å unngå kontaminering; utilsiktet forurensing fra annet biologisk materiale. Kontaminering kan skje i perioden fra det anmeldte forholdet har funnet sted til åstedet/materialet undersøkes, under sporsikringen eller ved analysene. Det er derfor viktig å bruke riktig utstyr og fremgangsmåter for å redusere denne faren.

I dette forsøket ble alle nyinnkjøpte tekstiler (t-skjorter og bomullsvanter i del 1, og alle tekstilene i del 2) bestrålt med UV-lys før de ble delt ut til forsøkspersonene for å minimere mengden biologisk materiale som kan ha vært avsatt på tekstilene før forsøkets start. Tekstiler som kun var benyttet av forsøkspersonen selv før forsøkets start (vanter med fleecefôr i del 1) ble ikke UV-bestrålt. For å forhindre kontaminering fra ansatte som jobber ved undersøkelsesrommene og/eller laboratoriene ved sporavdelingen ble det valgt forsøkspersoner som ikke benytter disse rommene. På denne måten kan eventuell kontaminering fra personer som håndterer tekstilene under sporsikringen og/eller ved videre analyse av prøvene lettere observeres i resultatene. Riktig påkledning (frakk, hette, munnbind, hansker og enkelte ganger skotrekk) ble brukt i alle fasene av sporsikring og analyse.

2.1.1. Generell sporsikring med vattpinne

Sporsikring med vattpinne, se figur 2.1, er i dag en av de mest brukte sporsikringsmetodene ved sporavdelingen og hos politiet. Denne metoden brukes til å sikre alle typer celler, både fra tekstiler med ulike overflater og andre typer gjenstander, samt fra personer. Tuppen av vattpinnen fuktes med sterilt vann og gnis over det aktuelle området på materialet som skal undersøkes. Ved hjelp av kapillærkrefter i bomullen overføres eventuelle celler til

bomullsvatten på vattpinnen. Videre klippes tuppen på vattpinnen av og overføres til et sterilt eppendorfrør i påvente av videre analyser.



Figur 2.1: Vattpinne fra Medical Wire & Equipment (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft).

2.1.2. Generell sporsikring med mini-tape

Sporsikring med mini-tape, se figur 2.2 og 2.3, benyttes for å sikre flere ulike typer celler, men i hovedsak epitelceller. Mini-tapen trykkes gjentatte ganger mot området på materialet som skal undersøkes. På denne måten fester eventuelle celler seg til limet i tapen. Videre klippes mini-tapen i biter og overføres til et sterilt eppendorfrør i påvente av videre analyser.

Figur 2.2: Mini-tape fra WA Products (WA products "1 tape kit").

Figur 2.3: Mini-tape fra Scenesafe (Scenesafe FAST™).

2.2. DNA-ekstraksjon

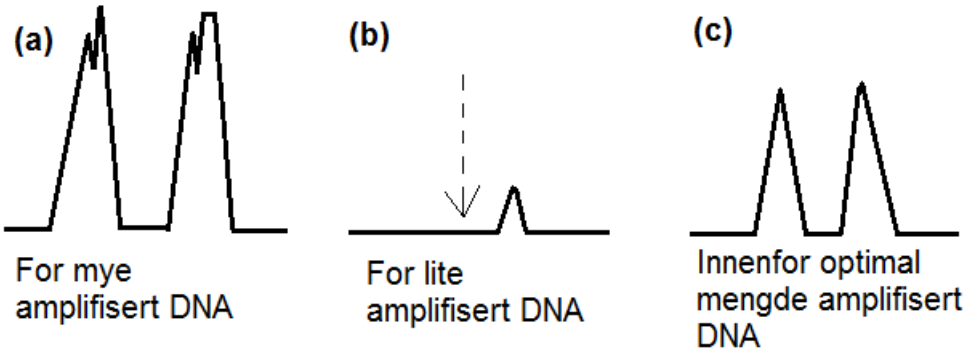
Etter sporsikringen ekstraheres DNAet i prøvene med den hensikt å isolere DNA-molekylene. Under ekstraksjonen lyseres cellene slik at DNA-molekylene frigjøres, samtidig som inhibitorer (proteiner og annet cellulært materiale etc.) som kan hemme Polymerase Chain Reaction (PCR) fjernes.

Det finnes flere ulike teknikker for DNA-ekstraksjon. Metoden som i hovedsak benyttes ved sporavdelingen i dag er ekstraksjon med 5 % Chelex-løsning. Chelex er en ionebytter som har høy affinitet for ioner med +2-ladning, for eksempel magnesium. Ved å fjerne magnesiumionene inaktiveres ensymet nuklease som degraderer DNA. Chelex-løsning tilsettes det sikrede prøvematerialet og inkuberes ved 56°C for at cellene skal lysere og DNAet frigjøres. Videre inkuberes prøvene ved 95°C for å denaturere DNAet og ødelegge celleproteinene [6]. Siden DNAet befinner seg i en løsning med Chelex vil det ikke degraderes. Chelex er imidlertid hemmende for PCR-reaksjonen og supernatanten med DNA-molekylene overføres til et nytt rør før videre analyse [4].

En alternativ og nyere utviklet metode for DNA-ekstraksjon er ekstraksjon ved bruk av QIAamp spinn kolonner. I kolonnene er det en fast membran av silikapartikler. Før prøvene blir overført til hver sin kolonne blir cellemembranen og kjernemembranen lysert ved bruk av 1 M DTT (dithiothreitol) og proteinase K i gitt buffer. Deretter blir løsningen overført til kolonnen og DNAet binder seg til silikamembranen som et resultat av affiniteten mellom de negativt ladde DNA-molekylene og de positivt ladde silikapartiklene. Dermed kan uønsket forurensning vaskes vekk. Ved hjelp av to vaskesteg fjernes inhibitorer (divalente kationer og proteiner) som hemmer PCR-reaksjonen. Etter vasketrinnene blir DNAet som er festet til silika-membranen eluert ut ved hjelp av enten vann eller buffer [2,7].

2.3. DNA-kvantitering

Etter DNA-ekstraksjon kvantiteres prøvene i henhold til dagens rutiner ved sporavdelingen [8,9]. Ved DNA-kvantitering påvises mengden DNA i prøven for å optimalisere input DNA ved amplifisering. Leverandøren (Promega) anbefaler en uttaksmengde/templatmengde på 0,5 ng. (I forsøksperioden var denne mengden imidlertid økt til 0,75 ng ved sporavdelingen i håp om bedre resultater. Pga. økt problem med artefakter («opptrekk») ble denne grensen justert tilbake til 0,5 ng etter forsøkets slutt). Ved å justere uttaksmengden av prøven slik at konsentrasjonen for amplifisering blir optimal kan problemer knyttet til for mye eller for lite DNA i prøven unngås, se figur 2.4 [10]. For å sikre at kun humant DNA detekteres må kvantiteringsmetoden være humanspesifikk.



Figur 2.4: Illustrasjon av forskjellige resultater ved DNA-typing ved ett locus der det kun er én bidragsyter med (a) for mye DNA, slik at toppene blir for høye og ofte splittet, (b) for lite DNA der den stiplede pilen peker på det ene allelet som faller ut (allel dropout) og (c) riktig mengde DNA slik at begge allel-toppene er balanserte og i riktig høydeskala [10].

Ved sporavdelingen benyttes det kommersielle kvantiteringskittet Quantifiler Duo kit (Life Technologies). Ved denne metoden amplifiseres tre DNA sekvenser samtidig; én sekvens spesifikk for humant DNA, én sekvens spesifikk for mannlig DNA, samt én syntetisk DNA

sekvens (IPC, intern PCR kontroll). Det benyttes en TaqMan-probe, som er en genspesifikk probe merket med en reporter, i dette tilfellet fluorofor, nær 5'enden og en quencher nær 3'enden. Quencheren sørger for at reporteren ikke avgir noe signal så lenge de sitter sammen på proben. Proben vil hybridisere mellom primersetene på en komplementær DNA sekvens. Først når DNA-fragmentet syntetiseres vil DNA polymerasen kutte reporteren fra proben og reporteren vil avgi signal (økning i fluoresens). Ettersom flere og flere DNA fragmenter syntetiseres øker mengden DNA, og dermed signalet. Ved å analysere endringen i fluoresens fra sykel (eng; cycle, benytter sykel på norsk) til sykel kan DNA-konsentrasjonen i prøven ved start bestemmes. PCR-prosessen deles inn i tre faser; eksponensiell, lineær og platå/utflatende. I den eksponensielle fasen er alle komponenter tilstrekkelig til stede og effektiviteten er tilnærmet 100 % der mengden DNA dobles for hver sykel. Det er optimalt å måle fluoresens mot antall sykler i denne fasen da forholdet mellom produkt og tilført DNA er tilnærmet konstant. I den lineære fasen begynner komponentene (primere etc.) å ta slutt, og effektiviteten avtar. Da de ulike komponentene avtar i ulike hastigheter er denne fasen ikke like konsekvent fra prøve til prøve og er dermed et dårligere sammenlikningsgrunnlag. I den utflatende fasen tar samtlige komponenter slutt og effektiviteten synker. For å kunne beregne konsentrasjonene i prøvene benytter sporavdelingen 7500 SDS software for først å beregne en regresjonslinje ut fra en standardrekke med kjente konsentrasjoner. Regresjonslinjen er utgangspunktet for beregningen av konsentrasjonen i prøvene. Ut i fra mengden DNA i prøvene bestemmes hvilke prøver som er egnet for videre analyse, og hvor stort prøvevolum som skal tilsettes PCR-blandingen for å oppnå en optimal DNA-mengde på ca. 0,75 ng ved amplifiseringen. Prøver som har en DNA-konsentrasjon under 0,004 ng/µL blir ikke videre analysert, i henhold til daværende rutine ved sporavdelingen [8,11].

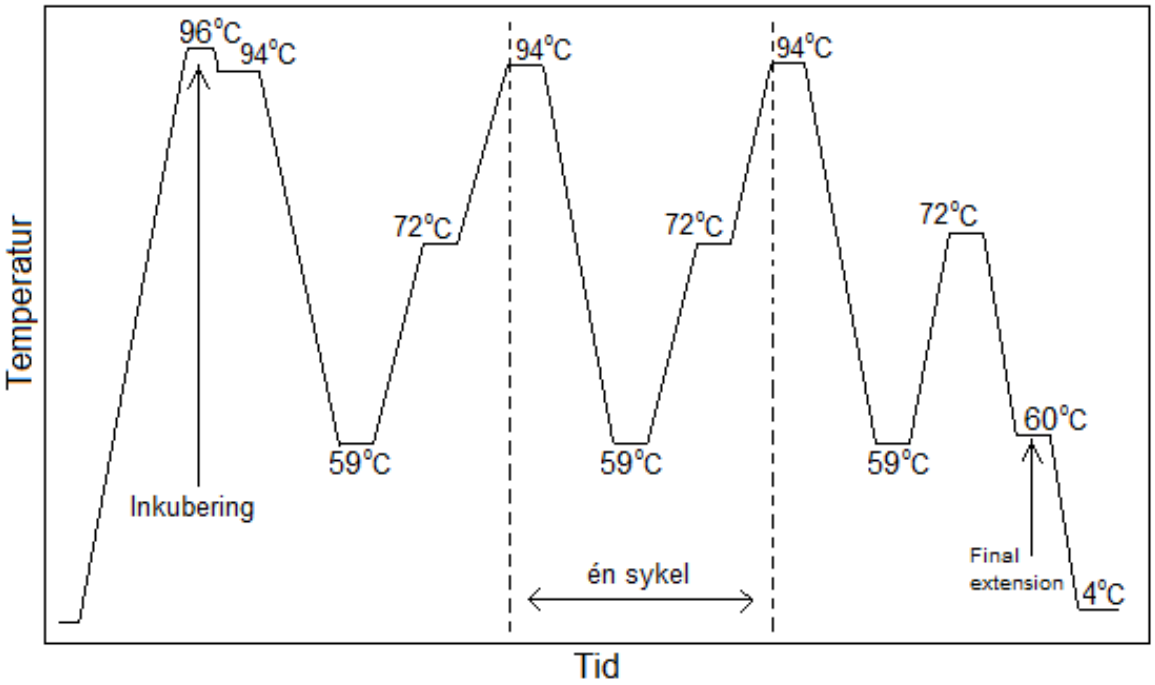
2.4. DNA-amplifisering

Etter DNA-kvantitering amplifiseres prøvene som er egnet for videre analyse i henhold til dagens rutiner ved sporavdelingen. Ved DNA-amplifisering benyttes PCR for å amplifisere spesifikke DNA-sekvenser ved bruk av spesifikke primere. Ved sporavdelingen benyttes PowerPlex® ESX 17 System som er et kommersielt kit bestående av 16 autosomale STR (short tandem repeats)-markører i tillegg til kjønnsmarkøren Amelogenin. En PCR-mix bestående av en reaksjonsmix (med Taq polymerase) og en primermix tilsettes prøvene før de settes i PCR-maskinen [12]. Primermixen inneholder én primer i hvert primerpar som er merket med en fluoreserende farge. På denne måten blir spesifikke DNA-sekvenser fluoreserende merket og kan detekteres med lys i riktige bølgelengder. Ved å bruke

fluoreserende merking som kan skilles fra hverandre på bakgrunn av farger, øker antall DNA-sekvenser som kan analyseres samtidig. Plasseringen til primerne og avstanden mellom dem angir lengden til PCR-produktet (også kalt amplikon), mens fluoresensmerkingen angir hvilket amplikon som detekteres [13].

Prøvene som er tilsatt PCR-mix settes i PCR-maskinen. PCR består i hovedsak av tre trinn som repeteres 30 ganger, se figur 2.5 [12]:

1. Denaturering: ved 94°C i 30 sekunder denatureres DNA til to enkelttråder (ssDNA).
2. Annealing: ved 59°C i 2 minutter bindes primeren til ssDNA.
3. Extension: ved 72°C i 1,5 minutter starter DNA polymerase syntetiseringen i 3'enden av den nye DNA-tråden ved å benytte den gamle tråden som templat.



Figur 2.5: Temperaturprofilen for PCR ved bruk av PowerPlex® ESX 17 System [12].

Først inkuberes prøven ved 96°C i 2 minutter før de neste 30 syklene følger trinnene 1-3. Ved siste extension er temperaturen 60°C i 45 minutter for å sikre fullstendig adenylering, før prøvene kjøles til 4°C [12]. Ved adenylering fester Taq polymerase en ekstra adenosin til 3'-enden av PCR produktet mens templat-tråden kopieres. På denne måten blir PCR produktet et basepar lenger enn den opprinnelige sekvensen. Ved å sikre fullstendig adenylering ved siste extension vil det ikke oppstå splittede topper, der PCR-produktet mangler den ekstra basen og dermed er et basepar kortere enn målsekvensen [14].

2.4.1. Short tandem repeats (STR)

”Short tandem repeats” (videre benyttes forkortelsen STR) er ikke-kodende områder på DNAet (2-7 bp lange) som er repetert x antall ganger. STR-markørene som benyttes ved menneskelig identitetstesting nedarves uavhengig av hverandre, og antallet repetisjoner kan variere mye fra person til person. Dette reduserer sannsynligheten for tilfeldig match, og gjør STR-markørene godt egnet for identifisering. En annen fordel med STR-markører er at de er korte og lette å amplifisere. De er derfor godt egnet for bruk innenfor rettgenetikk da det ofte arbeides med degradert og/eller små mengder humant DNA. STRene består vanligvis av fullstendig repeterte enheter, men det finnes også såkalte mikrovarianter. Mikrovarianter er alleler hvor de repeterte enhetene er ufullstendige. Et eksempel på dette er allelet 9.3 i TH01-markøren, se tabell 2.1. Dette allelet består av ni fullstendig repeterte enheter av nukleotidene AATG, i tillegg til én ufullstendig repetert enhet der kun tre av de fire nukleotidene forekommer [15].

STR-markørene blir i hovedsak navngitt på to ulike måter. Dersom markøren er en del av eller faller innenfor et gen benyttes gen-navnet i designasjonen av markøren. Et eksempel er STR-markøren TH01 som kommer fra det menneskelige genet tyrosin hydroksylase som er lokalisert på kromosom 11. «01» betegner den repeterte regionens posisjon, det vil si at den befinner seg innenfor intron 1 i tyrosin hydroksylase genet. Dersom STR-markøren faller utenfor genet blir markørens kromosomale posisjon benyttet i designasjonen [16]. Et eksempel er STR-markøren D2S441, hvor;
D: DNA
2: kromosom 2
S: enkel kopisekvens
441: locus nummer 441 beskrevet på kromosom 2.

For å kunne sammenlikne DNA-profiler på kryss av landegrensene foregår det et standardiseringsarbeid i regi av Interpol (International Criminal Police Organization) og ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes). Markørene som benyttes er anbefalt for Europa og tillater sammenlikning med databaser basert på det gamle markørsettet samtidig som det tillater sammenlikning over landegrensene. De 16 STR-markører (i tillegg til kjønnsmarkøren) som benyttes ved menneskelig identitetstesting ved sporavdelingen er gitt i tabell 2.1 [12].

Tabell 2.1: Power Plex® ESX 17 kit loci med repeterende enhet og antall observerte repeterte enheter [12].

STR locus	Repetert sekvens (5'→3')	Observerte repeterte sekvenser
AMELOGENIN[1]	Kjønnsmarkøren	X, Y
D3S1358	TCTA Complex	9-20
TH01	AATG	3-9, 9.3, 10-11, 13.3
D21S11	TCTA Complex	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2,30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34,34.2, 35, 35.2, 36–38
D18S51	AGAA	7–10, 10.2, 11–13, 13.2, 14–27
D10S1248	GGAA	8–19
D1S1656	TAGA Complex	9–14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3,18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
D2S1338	TGCC/TTCC	10, 12, 14–28
D16S539	GATA	4–16
D22S1045	ATT	7–20
vWA	TCTA Complex	10-24
D8S1179	TCTA Complex	7-19
FGA	TTTC Complex	14–18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22,22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26–30, 31.2,32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 48.2, 50.2
D2S441	TCTA	8–11, 11.3, 12–17
D12S391	AGAT/AGAC Complex	14–17, 17.3, 18, 18.3, 19–27
D19S433	AAGG Complex	5.2, 6.2, 8–12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15,15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2
SE33	AAAG Complex	4.2, 6.3, 8–20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23.2, 24.2,25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2,34.2, 35-37, 39, 42

[1]Amelogenin er kjønnsmarkøren og ikke en STR-markør.

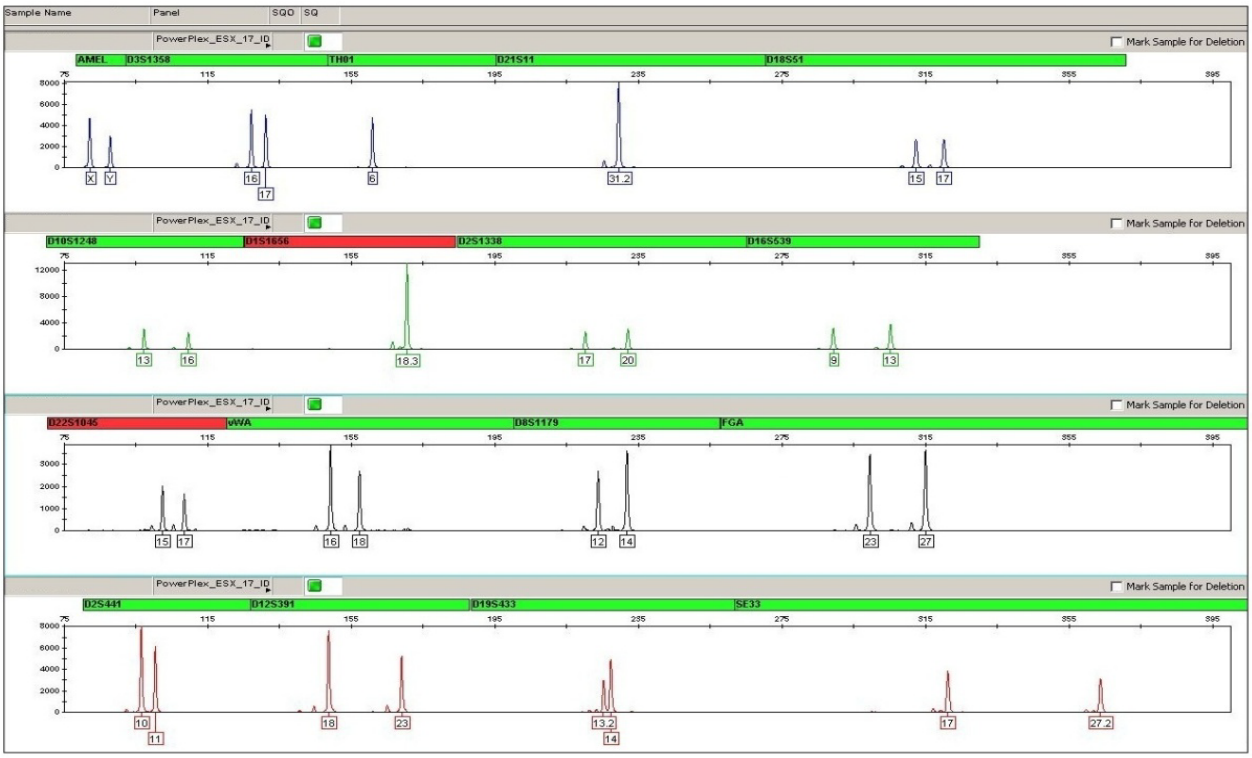
2.5. Kapillærelektroforese (fragmentlengdeanalyse)

De ferdig DNA-amplifiserte prøvene sendes videre til kapillærelektroforese, også kalt fragmentlengdeanalyse, i henhold til dagens rutiner ved sporavdelingen. Avdelingen benytter en 3500xl Genetic Analyzer med kittet PowerPlex® ESX 17 System. Kapillærelektroforese er den vanligste metoden for å separere og detektere DNA-fragmenter etter amplifisering, innenfor kriminalsaker. Før prøvene injiseres på instrumentet overføres de til et brett der hver prøve tilsettes en blanding av formamid og internstige [12]. Formamiden bidrar til å denaturere DNA-molekylene (holde DNA-trådene "single stranded"), redusere saltnivået og holde prøven flyktig, mens internstigen benyttes for å bestemme lengden på fragmentene. I tillegg til

prøvene og kontrollene, analyseres også en allelstige som brukes til å bestemme hvilke alleler som finnes i prøven. Allelstigen inneholder de fleste kjente observerte fragmentstørrelsene (allelene) som detekteres ved bruk av PowerPlex® ESX 17 System kit. For å sikre at DNA-trådene er denaturert etter tilsetting av formamid varmes prøvene på varmeblokk ved 95°C i 3 minutter, før de avkjøles raskt på isblokk i minimum 3 minutter og injiseres på kapillærelektroforese-maskinen. Når prøvene injiseres migrerer de negativt ladde DNA-molekylene gjennom kapillærene som følge av en spenningsforskjell mellom elektrodene i hver ende. Innsiden av kapillærene er dekket med silika fylt med polymer. Polymeren danner en matrix som sørger for at lange fragmenter beveger seg saktere gjennom kapillærene enn korte fragmenter. DNA-fragmentene er kjemisk merket med fluoreserende farger. Fluoresensen detekteres når fragmentene passerer en laserstråle [17]. Instrumentet har 24 kapillærer og i første injeksjon kan det injisere 21 prøver av gangen, i tillegg til positiv kontroll, negativ kontroll og allelstige. Dette defineres som én injeksjon. Da den negative kontrollen kun settes opp på første injeksjon, kan det injiseres 22 prøver på de øvrige injeksjonene. Når prøvene er kjørt på kapillærelektroforesen, kan resultatene analyseres og types/rapporteres.

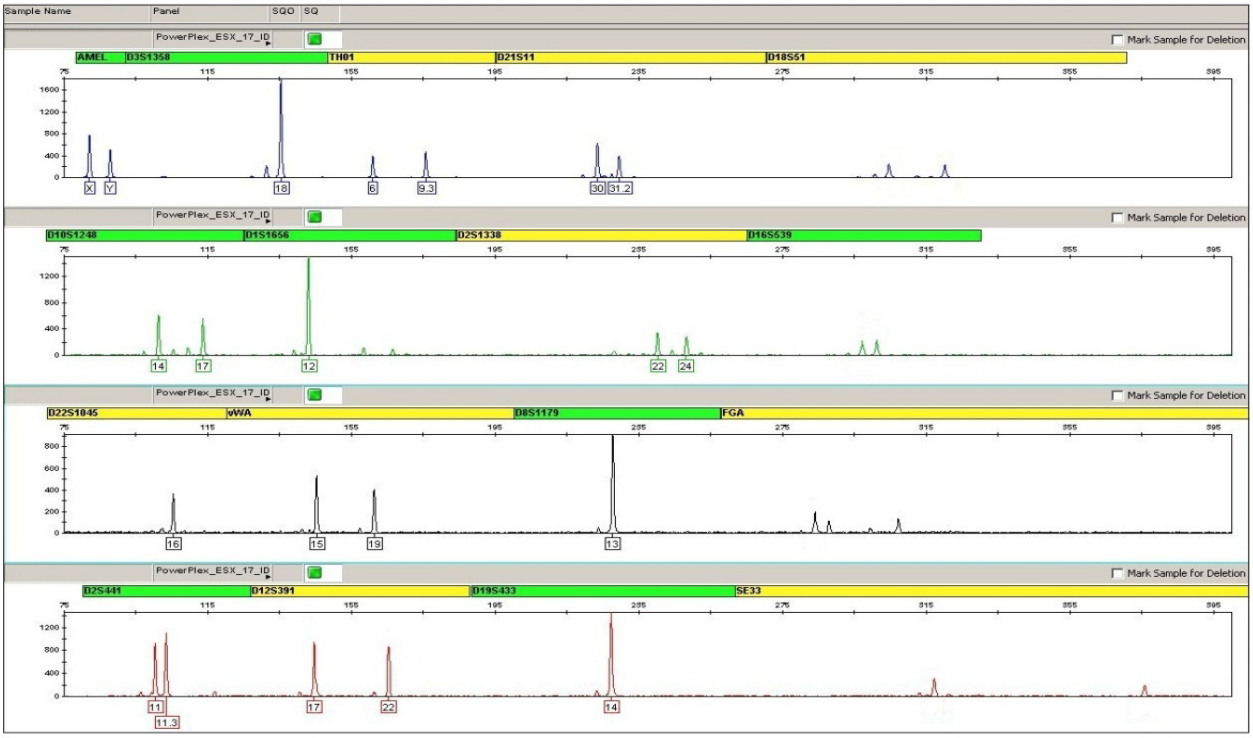
2.6. DNA-typing

Ved DNA-typing benyttes typeresultatene fra fragmentlengdeanalysen. Resultatene leses som topper i et diagram. I fullverdige prøver fra én person (DNA-profil), se figur 2.6, representerer hver topp ett allel dersom markøren er heterozygot (forskjellige alleler fra mor og far), og to alleler om den er homozygot (samme allel fra mor og far). Markørnavnet og området allelene til markøren observeres i er markert over toppene. Høyden på allelene er angitt langs y-aksen til venstre i diagrammet, og er oppgitt i rfu (relative fluorescence unit) som er et mål på hvor mye fluoresens som blir avgitt. X-aksen representerer antall basepar markørene består av, der antall repeterte enheter er angitt for hvert allel. Ved sporavdelingen er ”limit of detection” (LOD) satt til 200 rfu, der allelet må overskride denne grensen for å bli detektert.



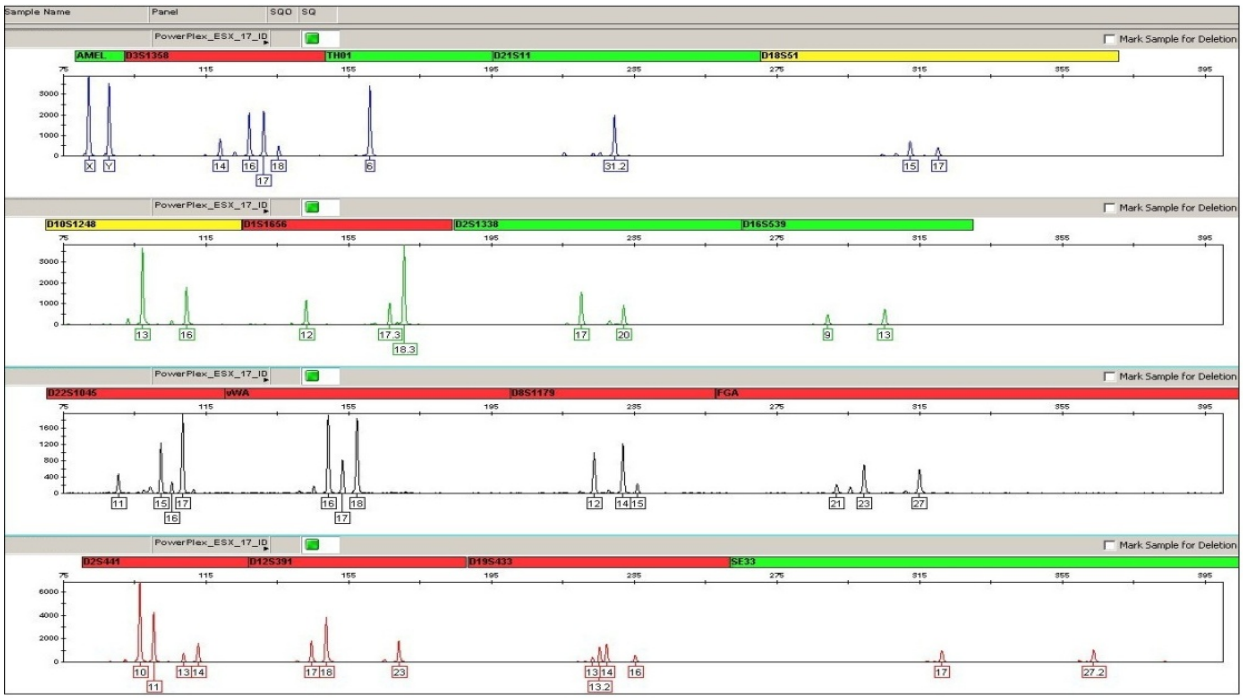
Figur 2.6: En fullverdig DNA-profil, der ett (homozygot) eller to (heterozygot) alleler kommer til uttrykk i hver markør. Markørnavnet og området allelene til markøren observeres i er markert over toppene. Y-aksen representerer høyden på allelene angitt i rfu, mens x-aksen representerer antall basepar markørene består av der antall repeterte enheter er angitt for hver markør.

Typeresultatene for prøver fra én person der ikke alle allelene blir uttrykt (allel drop-out) kalles en delprofil, se figur 2.7.



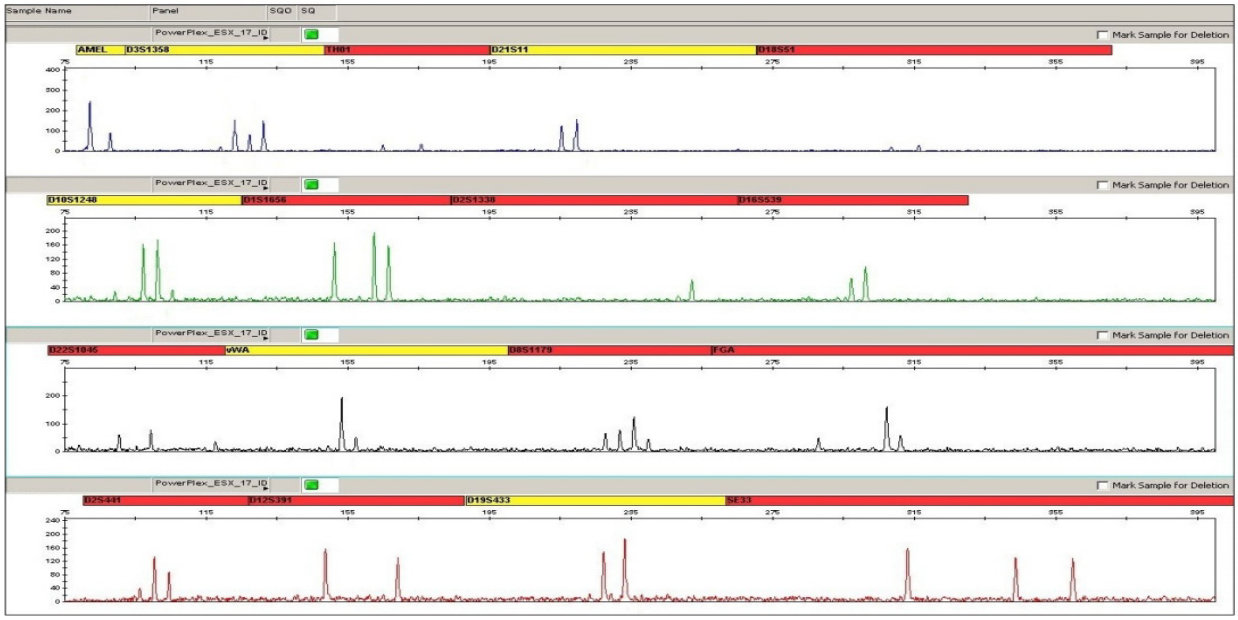
Figur 2.7: En delprofil, der ett (homozygot) eller to (heterozygot) alleler kommer til uttrykk i kun noen av markørene. Markørnavnet og området allelene til markøren observeres i er markert over toppene. Y-aksen representerer høyden på allelene angitt i rfu, mens x-aksen representerer antall basepar markørene består av der antall repeterte enheter er angitt for hver markør.

Dersom en prøve inneholder DNA fra mer enn én person kalles den en blandingsprøve. Det vil da observeres mer enn to alleler og/eller en tydelig høydeforskjell mellom de fremkommende alleler i én eller flere markører, se figur 2.8.



Figur 2.8: Et blandingsresultat, der det observeres mer enn to alleler og/eller en tydelig høydeforskjell mellom de fremkommende alleler i én eller flere markører. Markørnavnet og området allelene til markøren observeres i er markert over toppene. Y-aksen representerer høyden på allelene angitt i rfu, mens x-aksen representerer antall basepar markørene består av der antall repeterte enheter er angitt for hver markør.

I prøver som ikke gir typeresultater (negative) observeres det ingen alleler eller allelene er for lave og/eller av for dårlig kvalitet, se figur 2.9.



Figur 2.9: Et negativt typeresultat, der ingen alleler observeres eller allelene er for lave og/eller av for dårlig kvalitet. Markørnavnet og området allelene til markøren observeres i er markert over toppene. Y-aksen representerer høyden på allelene angitt i rfu, mens x-aksen representerer antall basepar markørene består av.

Typeresultatene fra fragmentlengdeanalysen bearbeides, og hvert enkelt allel vurderes om det er reelt. Her blir det tatt hensyn til såkalte stuttere (topper som i hovedsak kommer til uttrykk én repetisjon lavere enn det reelle allelet), allel drop-out (alleler som ikke leses) og liknende. Det endelige typeresultatet forenkles i form av en tabell og rapporteres, se tabell 2.2.

Tabell 2.2: Fremstilling av DNA-profilen i figur 2.6 side 19 i tabellformat, der antall repeterte enheter for hvert allel i hver markør er angitt.

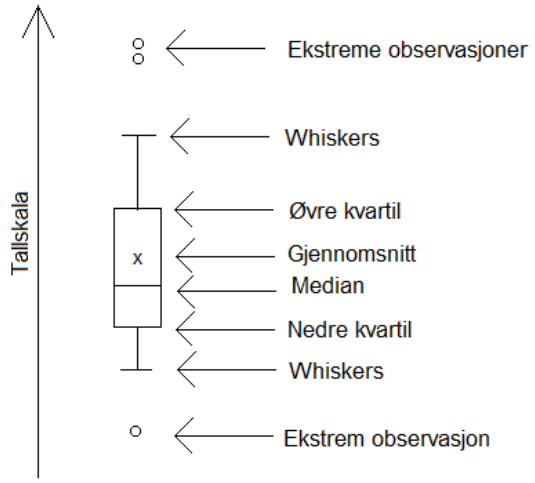
AMEL	D3S 1358	TH 01	D21S 11	D18S 51	D10S 1248	D1S 1656	D2S 1338	D16 S539	D22S 1045	vWA	D8S 1179	FGA	D2S 441	D12S 391	D19S 433	SE 33
X	16	6	31.2	15	13	18.3	17	9	15	16	12	23	10	18	13.2	17
Y	17	6	31.2	17	16	18.3	20	13	17	18	14	27	11	23	14	27.2

Typeresultatene kan videre sammenliknes med DNA-profiler til antatte gjerningsmenn, vitner og andre impliserte i en gitt sak. Om sporprofilen ikke er blitt identifisert og vurderes til å kunne knyttes til den kriminelle handlingen, samt at typeresultatene oppfyller gitte kvalitetskrav, kan den oversendes Kripos med anmodning om registrering i DNA-registeret for spor. Her vil den bli søkt opp mot alle uidentifiserte spor som ligger i sporregisteret, samt mot alle personer som er registrert i personregisteret (identitets- eller etterforskningsregisteret).

2.7. Statistiske fremstillinger og tester

2.7.1. Boksplott

Et boksplott er en grafisk fremstilling som viser fordelingen av observasjonene i et datasett. I et boksplott vises den minste og den største observasjonen sammen med gjennomsnittet, medianen, nedre kvartil (25-prosentilet) og øvre kvartil (75-prosentilet), se figur 2.10. Gjennomsnittet er markert som et kryss i boksen, mens medianen er markert som en linje. Ved nedre kvartil ligger 25 % av observasjonene enten under eller på kvartilet, mens ved øvre kvartil ligger 75 % av observasjonene enten under eller på kvartilet. I tillegg består boksplot av vertikale linjer, såkalte ”whiskers”, som indikerer variasjonen henholdsvis nedenfor og ovenfor nedre og øvre kvartil. Denne linjen er vanligvis 1,5 ganger boksens lengde. Verdier som er høyere eller lavere enn dette (”outliers”) er plottet som ytterpunkter (sirkler). Disse sirklene viser ekstreme observasjoner, dvs. observasjoner som er mye større eller mindre enn det som normalt observeres [18,19].



Figur 2.10: En illustrasjon av et boksplott.

I noen tilfeller avviker ”outliere” betydelig fra de øvrige observasjonene. Dette kan skyldes at denne ene observasjonen rett og slett avviker veldig fra de andre observasjonene, eller at det er feil i dataene. Det kan derfor være interessant i tillegg å plotte dataene og gjøre beregningene uten denne ”outlieren” for å se om konklusjonen i begge tilfeller blir den samme. Dersom konklusjonen forblir den samme styrkes konklusjonen, mens dersom konklusjonene i de to tilfellene blir forskjellig må det tas stilling til hvordan resultatene skal vurderes.

2.7.2. Variansanalyse

ANOVA

Variansanalysen ANOVA (fra engelsk; *analysis of variance*) benyttes for å sammenlikne forventet verdi (μ) i to eller flere grupper (i) samtidig for å se om det er signifikante forskjeller mellom gruppene. Analysen baserer seg på tre antakelser:

1. Uavhengighet
2. Konstant varians
3. Normalfordeling

Det er vanlig å bruke to hypoteser, der nullhypotesen kan forkastes om det er signifikante forskjeller mellom gruppene;

H_0 (nullhypotesen): Gruppene er like, dvs. det er ingen forskjell mellom resultatene for de ulike gruppene som testen utføres på → de forventede verdiene (μ) er like, $\mu_1=\mu_2=...=\mu_i$.

H_1: Gruppene er ulike, dvs. det er forskjell mellom resultatene for de ulike gruppene som testen utføres på → ikke alle forventningene (μ) er like, minst to er forskjellige.

Ved bruk av ANOVA beregnes en F-verdi, der variasjonen mellom gruppene (S_G^2) og variasjonen innad i gruppene (S_E^2) (engelsk; *mean sum of squares* (MS)) sammenliknes, se likning 1;

(1) $$F = \frac{varians\ mellom\ gruppene}{varians\ innad\ i\ gruppene} = \frac{S_G^2}{S_E^2}$$

Dersom F-verdien er tilstrekkelig høy, altså at variansen mellom gruppene er signifikant høyere enn variansen innad i gruppene, kan nullhypotesen forkastes. Dette avgjøres ved å sammenlikne den beregnede F-verdien med fisherfordelingens kvantiler. En tommelfingerregel er at dersom vi har ti eller flere observasjoner kan nullhypotesen forkastes dersom F>5 [20]. Denne regelen er imidlertid ikke lenger nødvendig da det har kommet flere statistikkprogrammer som gir de eksakte beregningene. Fremgangsmåten ved bruk av ANOVA er gitt i eksempel 1, se appendix 1 side 67.

I dag gjøres beregning av signifikante forskjeller sjeldent for hånd. Det er flere forskjellige statistikkprogrammer som er utviklet for dette formålet. I beregningene for dette prosjektet benyttes det gratis tilgjengelige statistikkprogrammet ”R” (http://www.r-project.org/) og overbygningen ”R Commander” (http://repository.umb.no/R/). Dette programmet oppgir en p-verdi i tillegg til verdiene som kan beregnes for hånd. Ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kan nullhypotesen forkastes dersom p-verdien er lavere enn 0,05.

I del 2 av prosjektet innføres en såkalt ”random factor” ved beregning med ANOVA i ”R Commander”. Ved bruk av denne faktoren korrigeres det for avhengighet i observasjonene fra samme individ. Denne faktoren kan imidlertid ikke benyttes i del 1 da det kun er én forsøksperson [21].

Kruskal-Wallis test

Dersom observasjonene i et forsøk ikke er normalfordelte eller man er usikker på dette kan Kruskal-Wallis test benyttes. Dette er en ikke-parametrisk test som ikke krever normalfordeling av observasjonene. Hensikten med testen er å finne ut om gruppene som sammenliknes har tilnærmet like medianer, eller om en av gruppene har høyere eller lavere medianverdier [22]. Kruskal-Wallis test kan kun benyttes på én faktor, mens denne begrensningen ikke gjelder for variansanalysen ANOVA beskrevet i forrige avsnitt. På denne måten kan ikke gruppene i Kruskal-Wallis test sammenliknes kontrollert for andre egenskaper. To hypoteser defineres;

H_0 (nullhypotesen): medianene i gruppene er like.

H_1: minst to medianer er ulike.

Dersom nullhypotesen kan forkastes er medianverdiene forskjellig i minst to grupper.

Bruker man ANOVA og er usikker på om observasjonene er normalfordelte nok kan det være interessant i tillegg å prøve Kruskal-Wallis test for å se om konklusjonen blir den samme.

En alternativ metode er å transformere dataene, f.eks. ved bruk av logaritmen, for om mulig å oppnå en bedre normalfordeling av dataene. Deretter kan ANOVA benyttes, og gruppene kan sammenliknes kontrollert for andre egenskaper. Denne metoden er imidlertid ikke benyttet i dette prosjektet.

2.7.3. Kjikvadrattesten

Kjikvadrattesten (x^2), også kalt uavhengighetstest, er en analysemetode som i denne oppgaven benyttes for tabeller. På samme måte som ved beregninger med ANOVA er det vanlig å bruke to hypoteser, der den presise formuleringen av hypotesene varierer mellom anvendelsene.

Fremgangsmåten ved bruk av kjikvadrattesten er gitt i eksempel 2, se appendix 2 side 69, men det er både enklere og raskere å benytte ”R Commander”.

2.7.4. Paret/uparet sammenlikning

Ved bruk av variansanalyser og kjikvadrattester kan observasjonene i alle tilfeller sammenliknes uparet slik det er utført i eksemplene 1 og 2. Som i eksempel 1 blir det ved en uparet sammenlikning ikke tatt hensyn til hvilken motorsykkel de ulike dekkene er testet på. I dette eksempelet sitter det imidlertid ett dekk av hver type på hver motorsykkel, og disse dekkene er dermed brukt like mye og under samme forhold. Observasjonene i dette eksempelet kan dermed også sammenliknes paret. Ved en slik type sammenlikning gjøres beregningene på differansen i slitasjen på dekkene festet på samme motorsykkel. Fordelen med denne sammenlikningen er at det blir tatt hensyn til hvilken motorsykkel de ulike dekkene er testet på, og dermed reduseres effekten av den tilfeldige variasjonen mellom motorsyklene. Dersom det er mulig å gjennomføre en paret sammenlikning på observasjonene i et forsøk kan det være interessant å prøve både en paret og en uparet sammenlikning for å se om konklusjonen blir den samme.

2.7.5. Binomisk sannsynlighetsfordeling

En binomisk sannsynlighetsfordeling benyttes for å finne antall ganger en bestemt hendelse inntreffer i løpet av et visst antall uavhengige forsøk [23]. For å kunne benytte en binomisk sannsynlighetsmodell må tre krav være oppfylt:

1. Forsøket har kun to utfall; enten inntreffer hendelsen eller ikke.
2. Sannsynligheten for at hendelsen inntreffer er den samme i alle forsøkene.
3. Forsøkene er statistisk uavhengige av hverandre, der utfallet for et forsøk ikke påvirker utfallet for det neste forsøket.

Et eksempel på binomisk sannsynlighetsfordeling er myntkasting der utfallene er enten krone eller mynt [24]. ”R Commander” oppgir et konfidensintervall i tillegg til p-verdien.

3. Materialer og Metoder

3.1. Innsamling av tekstiler og sporsikring (mini-tape/ vattpinne)

3.1.1. Materialer

Del 1:

- 2 stk. t-skjorter i bomull, se figur 3.1.
- 1 par hansker i bomull, se figur 3.2.
- 1 par hansker i ull med fleecefôr, se figur 3.3,

Figur 3.1: T-skjorte i bomull.

Figur 3.2: Hansker i bomull.

Figur 3.3 Hansker i ull med fleecefôr.

Del 2:

- 10 stk. t-skjorter i bomull, se figur 3.4.
- 10 stk. capser i tettvevd bomull, se figur 3.5.
- 10 stk. svettebånd til håndledd i bomull/nylon, se figur 3.6.

Figur 3.4: T-skjorte i bomull.

Figur 3.5: Caps i tettvevd bomull.

Figur 3.6: Svettebånd i bomull/nylon.

3.1.2. Utstyr

- PC med strekkodeleser, etikettskriver og Laboratory Information Management System (LIMS)
- UV-maskiner, CL-1000 Ultraviolet Crosslinker og UVP Multiple-Ray Lamp
- Sporsikringsposer
- Benkepapir
- Mini-taper; Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit»
- Vattpinner; Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- Prøvestativ
- Sterilt H_2O
- Sterile sakser og pinsetter
- 70 % sprittørk

3.1.3. Generell metode for sporsikring med mini-tape

1. Materialet som skulle undersøkes ble pakket opp og lagt på et rent benkepapir.
2. Prøver som skulle sikres fra materialet ble registrert ifølge sporavdelingen sine rutiner i datasystemet, og sporposen til materialet samt eppendorfrøret prøven skulle sikres i ble merket med like strekkodeetiketter.
3. Beskyttelseslaget på mini-tapen ble fjernet, og tapen ble presset gjentatte ganger ned mot området på materialet som skulle undersøkes.
4. Mini-tapen ble klippet i mindre biter (ca. 4 x 5 stk.) og overført til det merkede eppendorfrøret i påvente av videre undersøkelser.

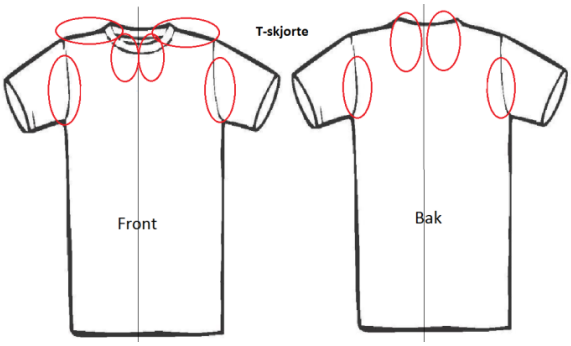
3.1.4. Generell metode for sporsikring med vattpinne

1. Materialet som skulle undersøkes ble pakket opp og lagt på et rent benkepapir.
2. Prøver som skulle sikres fra materialet ble registrert ifølge sporavdelingen sine rutiner i datasystemet, og sporposen til materialet samt eppendorfrøret prøven skulle sikres i ble merket med like strekkodeetiketter.
3. En dråpe sterilt H_2O ble dryppet på tuppen av vattpinnen før den ble strøket grundig over området på materialet som skulle undersøkes.
4. Tuppen av vattpinnen (der avstryket var utført) ble klippet av og overført til det merkede eppendorfrøret i påvente av videre undersøkelser.

3.1.5. Fremgangsmåte for bruk av og sikring på tekstiler

Del 1:

1. Tekstilene som var nyinnkjøpte (t-skjorter og bomullsvanter) ble UV-bestrålt, mens tekstilene som tilhørte forsøkspersonen (fleecehansker) ble ikke bestrålt med UV-lys.
2 Tekstilene ble pakket i rene sporsikringsposer som ble registrert ifølge sporavdelingen sine rutiner i datasystemet og merket med tilhørende strekkodeetiketter.
3 Én forsøksperson fikk utdelt tekstilene og skulle benytte hver av dem i 8-9 timer.
4 Etter at tekstilene var brukt ble de lagt tilbake i hver sin sporsikringspose før de ble samlet inn for videre undersøkelse ved sporavdelingen.
5 Det ble sikret totalt 20 prøver med de to ulike mini-tapene (Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit") fra ulike områder på vrangsiden av hver tekstiltype, hhv. 10 med hver mini-tape (totalt 60 prøver; til sammen 20 prøver sikret fra t-skjortene i bomull, 20 prøver sikret fra vantene i bomull og 20 prøver sikret fra vantene i fleece), se figur 3.7 og 3.8 der sirklene markerer områdene prøvene ble sikret fra.



Figur 3.7: Sporsikring på vrangside av t-skjorte, der sirklene markerer områdene prøvene ble sikret fra.

Figur 3.8: Sporsikring på vrangside av hanske, der sirklene markerer områdene prøvene ble sikret fra.

Del 2:

1. Alle tekstilene ble UV-bestrålt.
2. Tekstilene ble pakket i rene sporsikringsposer som ble registrert ifølge sporavdelingen sine rutiner i datasystemet og merket med tilhørende strekkodeetiketter.
3. Ti forsøkspersoner fikk utdelt én t-skjorte, én caps og ett svettebånd hver, der hvert plagg skulle benyttes på vanlig måte i 8-9 timer.
4. Etter at plaggene var brukt ble de lagt tilbake i hver sin sporsikringspose før de ble samlet inn for videre undersøkelse ved sporavdelingen.
5. Det ble totalt sikret 2 prøver fra hver tekstil, hhv. én med mini-tape og én med vattpinne (totalt 60 prøver). Prøvene ble sikret fra like store områder på vrangsiden av halslinningen på t-skjorten, vrangsiden av svettebremmen på capsen og hele vrangsiden av svettebåndet på en måte som forutsetter "vanlig bruk".

3.2. Ekstraksjon av DNA fra epitelceller ved bruk av Chelex [4]

3.2.1. Materiale

- Eppendorfrør med materiale fra sporsikringen som antas å inneholde epitelceller.

3.2.2. Utstyr

- PC med strekkodeleser, etikettskriver og LIMS
- Benkepapir
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- Prøvestativ
- Pipetter
- Filterspisser
- 2 varmeblokker (hhv. 56°C og 95°C), Eppendorf Thermomixer Comfort
- Magnetrører
- Sentrifuge, EppendorfCentrifuge 5430
- 70 % sprittørk

3.2.3. Reagenser

- 5 % Chelex-løsning, se appendix 3 side 71.

3.2.4. Metode

1. Ekstraksjonsoppsettet (EX-oppsettet) ble klargjort i sporavdelingens LIMS-system og det ble skrevet ut arbeidsark sammen med strekkodeetiketter og topplokklapper.
2. Varmeblokkene ble satt på 56°C og 95°C.
3. DNA-prøvene som skulle ekstraheres ble satt i et prøvestativ i henhold til EX-oppsettet, og det ble utført oppsettskontroll for å sikre at riktig prøve sto på riktig plass. Negativ kontroll står alltid sist på ekstraksjonsoppsettet.
4. Chelex-løsningen ble satt på magnetrører, og 200 µL 5 % Chelex-løsning (250 µL ved ekstraksjon av mini-tape) ble tilsatt hvert prøverør. Chelex-løsning ble tilsatt negativ kontrollen til slutt.
5. Prøvene ble inkubert på varmeblokk ved 56°C og 600 rmp i minimum 30 minutter, før de ble blandet ved å øke hastigheten på ristingen på varmeblokken til 1400 rpm i 30 sekunder.

6. Prøvene ble deretter inkubert på varmeblokk ved 95°C i 8 minutter. De siste 30-60 sekundene ble varmeblokken satt på maksimal risting (1400 rpm).
7. Prøvene ble sentrifugert ved 13100 rcf i 3 minutter.
8. Prøvene ble satt tilbake i prøvestativet, og ny oppsettskontroll ble utført.
9. Mest mulig av supernatanten ble forsiktig pipettert over til et nytt eppendorfrør med lik merking uten å få med Chelexpartikler.
10. De ferdig ekstraherte prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 2-6°C i påvente av videre undersøkelser.

3.3. Ekstraksjon av DNA fra epitelceller ved bruk av QIAamp®DNA Mini kit [2]

3.3.1. Materiale

- Eppendorfrør med materiale fra sporsikringen som antas å inneholde epitelceller.

3.3.2. Utstyr

- PC med strekkodeleser, etikettskriver og LIMS
- Benkepapir
- Prøvestativ
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- QIAamp spinnkolonner
- Pipetter
- Filterspisser
- 2 varmeblokker (56°C og 85°C), Thermomixer Comfort
- Vortexer, Lab dancer VWR
- Sentrifuge, Centrifuge 5417C eppendorf

3.3.3. Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit inneholdende:
    - QIAamp AL-buffer
    - QIAamp proteinase K
    - AW1-buffer (vaskebuffer 1)
    - AW2-buffer (vaskebuffer 2)
- 1M DTT-løsning, se appendix 4 side 72.
- TE-buffer (pH 8), se appendix 5 side 73.
- 96 % etanol

3.3.4. Metode

Dag 1:

1. Ekstraksjonsoppsettet (EX-oppsettet) ble klargjort i sporavdelingens LIMS-system, og det ble skrevet ut arbeidsark sammen med strekkodeetiketter og topplokklapper.
2. Varmeblokkene ble satt på 56°C og 85°C.

3. DNA-prøvene som skulle ekstraheres ble satt i et prøvestativ i henhold til EX-oppsettet, og det ble utført oppsettskontroll for å sikre at riktig prøve sto på riktig plass. Negativ kontroll står alltid sist på ekstraksjonsoppsettet.
4. 280 µL QIAamp AL-buffer ble tilsatt hver prøve.
5. Prøvene ble satt på varmeblokk ved 85°C i 15 minutter.
6. 15 µL QIAamp proteinase K (20 µg/mL) og 30 µL 1M DTT-løsning ble tilsatt hver prøve før vortexing i 15 sekunder.
7. Prøvene ble inkubert over natten ved 56°C og 600 rpm.

Dag 2:

1. 200 µL AL-buffer ble overført til nye, merkede eppendorfrør. Det ble utført oppsettskontroll før eluatet fra prøverørene ble overført til de nye rørene som igjen ble satt på varmeblokk ved 56°C og 600 rpm i 15 minutter.
2. 200 µL 96 % etanol ble tilsatt prøvene, for deretter å overføre all væsken til merkede spinnkolonner med samlerør som ble sentrifugert i 1 minutt ved 8000 rpm.
3. Spinnkolonnene ble overført til nye samlerør og tilsatt 500 µL AW1-buffer før sentrifugering i 1 minutt ved 8000 rpm.
4. Spinnkolonnene ble overført til nye samlerør og tilsatt 500 µL AW2-buffer før sentrifugering i 3 minutt ved 14000 rpm.
5. Spinnkolonnene ble plassert i nye, merkede eppendorfrør som var kontrollert med oppsettskontroll.
6. 75 µL TE-buffer ble tilsatt spinnkolonnene for å eluere ut DNAet. Bufferen fikk stå og trekke inn i membranen/filteret i 5 minutter før sentrifugering i 1 minutt ved 8000 rpm.
7. Spinnkolonnene ble fjernet fra eppendorfrørene og lokkene på rørene ble lukket.
8. De ferdig ekstraherte prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 2-6°C i påvente av videre undersøkelser.

3.4. Kvantitering av DNA med Quantifiler Duo [8,9]

3.4.1. Materiale

- Ekstrahert DNA fra spormaterialet.

3.4.2. Utstyr

- PC med strekkodeleser og LIMS
- Optical Tube 8x strip
- Optical 8-Cap strip, MicroAmp™
- Pipetter
- Filterspisser
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- Mikrosentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5430
- Vortexer, Lab dancer VWR
- LAF-benk
- Prøvestativ
- 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems
- Mikrosentrifuge til strips, Mini Star silverline VWR

3.4.3. Reagenser

- Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit inneholdende:
    - QuantifilerDuo™ PCR Reaction Mix (reaksjonsmix)
    - QuantifilerDuo™ Primer Mix (primermix)
- Standardrekke, se appendix 6 side 74.

3.4.4. Metode

1. Kvantiteringsoppsettet (KA-oppsettet) ble klargjort i sporavdelingens LIMS-system, og arbeidsarket ble skrevet ut.
2. Instrumentet 7500 Real Time PCR System ble slått på, og KA-oppsettet ble importert på maskinen.
3. DNA-prøvene som skulle kvantiteres ble satt i et prøvestativ i henhold til KA-oppsettet, og det ble utført oppsettskontroll for å sikre at riktig prøve sto på riktig plass.

4. Standardrekken ble vortexet og sentrifugert, og satt i samme prøvestativ som DNA-prøvene i henhold til KA-oppsettet. I KA-oppsettet var det i tillegg holdt av plass til positiv kontroll (standard 3, 1,85 ng/µL) og negativ kontroll (kun PCR-mix).
5. PCR-mixen ble laget i et 1,5 mL eppendorfrør (ved fullt oppsett, 96 prøver, må mixen lages i to 1,5 mL eppendorfrør):
   For hver prøve skulle det være: 10,5 µL primermix
   12,5 µL reaksjonsmix
6. Ferdiglaget PCR-mix ble vortexet og sentrifugert raskt.
7. 23 µL PCR-mix ble fordelt i hvert prøverør.
8. 4 µL av standardene, positiv kontrollen og DNA-prøvene ble tilsatt rørene i henhold til KA-oppsettet.
9. Lokkene ble satt på fortløpende, og nummerert fra 1-12 på venstre side.
10. Rørene ble sentrifugert godt i ca. 20 sekunder for å fjerne luftbobler, før de ble satt inn i Real Time PCR-maskinen.
11. Kjøringen ble startet og lagret. Innstillingene er gitt i tabell 3.1, der målingen gjøres ved 60^0C.

Tabell 3.1: Innstillinger for Real Time PCR-maskinen ved kvantitering.

	1 repetisjon		40 repetisjoner	
Temperatur (^{0}C)	50	95	95	60
Tid	2 min	10 min	15 sek	1 min

12. DNA-prøvene ble videre oppbevart i kjøleskap ved 2-6 ^{o}C i påvente av videre undersøkelser.

3.5. Amplifisering av sporprøver med ESX 17 [12]

3.5.1. Materiale

- Ekstrahert og kvantitert DNA fra spormateriale.

3.5.2. Utstyr

- PC med strekkodeleser og LIMS-system
- 96-brønn GeneAmp® PCR System 9700 PCR-maskin
- 0,2 mL Microamp® enkle reaksjonsrør
- Microamp™ 8-strips lokk
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- Pipetter
- Filterspisser
- Vortexer, Lab dancer VWR
- Mikrosentrifuge til strips, Mini Star silverline VWR
- LAF-benk
- Prøvestativ

3.5.3. Reagenser

- PowerPlex® ESX 17 System Pre-amplification Components Box (Promega) inneholdende:
    - PowerPlex® ESX 5X Master Mix (inkludert hot-start Taq DNA Polymerase)
    - PowerPlex® ESX 10X Primer Pair Mix
    - 2800M Control DNA 10 ng/µL (positiv kontroll)
    - Water, Amplification Grade

3.5.4. Metode

1. Amplifiseringsoppsettet (TA-oppsettet) ble klargjort i sporavdelingens LIMS-system og arbeidsarket ble skrevet ut.
2. DNA-prøvene som skulle amplifiseres ble satt i et prøvestativ i henhold til TA-oppsettet, og det ble utført oppsettskontroll for å sikre at riktig prøve sto på riktig plass.
3. PCR-rørene ble merket i henhold til TA-oppsettet. I tillegg ble første og siste PCR-rør i hver rad merket med TA-oppsettnummer. Én plass per injeksjon (ved én injeksjon plass nr. 24) skulle ikke ha PCR-rør da de ble benyttet til internstige.

4. Vann ble tilsatt PCR-rørene for å ha likt prøvevolum (det tilsettes alltid vann til negativ kontroll til slutt);

   Mengde vann = 17,5 µL – templatmengde/positiv kontroll.

   Mengden templat-DNA som skulle tilsettes hvert av PCR-rørene ble oppgitt på TA-oppsettarket, og var beregnet ut fra kvantiteringsresultatene.
5. Rørene med Master Mix og Primer Pair Mix ble sentrifugert raskt og vortexet i minimum 15 sekunder før PCR-mixen ble laget i et 1,5 mL eppendorfrør:

   For hver prøve skulle det være: 5 µL Master Mix
   2,5 µL Primer Pair Mix
6. PCR-mixen ble blandet på vortexer i minimum 15 sekunder før 7,5 µL av mixen ble tilsatt hvert PCR-rør.
7. Prøvene ble overført til hvert sitt PCR-rør i henhold til TA-oppsettsarket. Fortynnet positiv kontroll ble vortexet i 15 sekunder og 5 µL ble tilsatt ett rør per injeksjon (ved én injeksjon plass nr. 1).
8. PCR-rørene ble lukket med Microamp™ 8-strips lokk med en gang alle rørene i en rad var tilsatt prøve.
9. Strips-lokkene ble merket med TA-nummer på venstre side, og nummeret på siste PCR-rør i raden på høyre side.
10. PCR-maskinen ble slått på, og PCR-rørene ble sentrifugert raskt for å fjerne luft før de ble satt inn i maskinen.
11. PCR-maskinen ble startet, og PCRen ble kjørt på innstillingene gitt i tabell 3.2.

Tabell 3.2: Innstillinger for PCR-maskinen ved amplifisering.

	Inkubering	30 sykler			Final extension	Final hold
		Denaturering	Annealing	Extension		
Temperatur (°C)	96	94	59	72	60	4
Tid	2 min	30 sek	2 min	1 min 30 sek	45 min	∞

12. Prøverørene ble videre oppbevart i kjøleskap ved 2-6 °C, mens PCR-produktene ble oppbevart i kjøleskap frem til fragmentlengdeanalysen.

3.6. Fragmentlengdeanalyse av sporprøver på 3500xl Analyzer [12]

3.6.1. Materiale

- PCR-produkter fra prøvene som var amplifisert med PowerPlex®ESX 17 System Kit.

3.6.2. Utstyr

- PC med analysemodul GeneMapperIDX
- Kapillærelektroforese-maskin; 3500*xl* Genetic Analyzer med PC med 3500 Series Data Collection-program
- Sentrifuge for PCR-brett, Eppendorf Centrifuge 5804
- Mikrosentrifuge, Mini Star silverline VWR
- Pipetter, 8-kanal-pipette
- Automatpipette
- Pipettespisser
- 1,5 mL sterile «Safelock» eppendorfrør
- Vortexer, Lab dancer VWR
- Axygen PCR Microplate PCR-96M2-HS-C (PCR-brett)
- Axymat 96-silicone septa mat AM-96-SEPTA-3100 (grågummimatte)
- Autosamplerkassett
- Easycap
- LAF-benk
- Varmeblokk; Techne DRI-BLOCK DB.2A
- Isblokk
- 70 % sprittørk

3.6.3. Reagenser

- PowerPlex® ESX 17 System Post- amplification Components Box (Promega) inneholdende:
    - CC5 Internal Lane Standard 500 (internstige)
    - PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix (allelstige)
- Hi-Di Formamid

3.6.4. Metode

1. Kapillærelektroforese-instrumentet ble slått på, og innstillingene ble kontrollert. Instrumentet ble satt på forvarming til 60°C (anbefales å forvarme instrumentet i minimum 30 minutter).
2. Rørene med internstige og allelstige ble sentrifugert kort og blandet godt på vortexer før bruk.
3. Rør med ønsket mengde formamid ble funnet frem og tint.
4. Internstige ble tilsatt formamiden som angitt i tabell 3.3.

Tabell 3.3: Oversikt over mengden internstige og formamid som trengs per injeksjon.

Antall injeksjoner	Blandingsforhold
1 injeksjon (24 prøver)	28 µL internstige til 280 µL formamid
2 injeksjoner (48 prøver)	52 µL internstige til 520 µL formamid

5. Røret med formamid og internstige ble vortexet i 10-15 sekunder.
6. PCR-brett ble funnet frem og merket med riktig oppsettsnummer på kanten.
7. 11 µL formamid tilsatt internstige ble fordelt i brønnene som inngikk i oppsettet.
8. Lokkene på PCR-produktene ble fjernet forsiktig for å unngå søl.
9. 1 µL PCR-produkt, 1 µL positiv kontroll, 1 µL negativ kontroll og 1 µL allelstige ble tilsatt brønnene i PCR-brettet i henhold til kjørearket.
10. En ren gummimatte ble satt på PCR-brettet, og det ble merket med oppsettsnummer og hvilke rader som var i bruk.
11. PCR-brettet ble sentrifugert raskt for å fjerne luftbobler.
12. Prøvene ble denaturert på varmeblokk ved ca. 95°C i 3 minutter.
13. Brettet ble avkjølt på isblokk i minimum 3 minutter.
14. PCR-brettet ble satt i en autosamplerkassett, og det ble trykket på «Tray» på kapillærelektroforese-instrumentet for å kjøre frem autosampleren.
15. Autosamplerkassetten ble satt i riktig posisjon i autosampleren i maskinen før instrumentet ble startet. Det ble benyttet en injeksjonstid på 10 sekunder.

4. Resultater

4.1. Del 1 – Sammenlikning av mini-taper og ekstraksjonsmetoder

Biologisk materiale, i form av epitelceller, ble sikret fra to utgaver av tre tekstiltyper med ulike overflater innhentet fra én forsøksperson; to t-skjorter i bomull, et par hansker i bomull og et par hansker i fleece. Det ble sikret totalt 20 prøver fra hver tekstiltype med to ulike mini-taper (Scenesafe Fast™ og WA Products ”1 tape kit”), hhv. 10 med hver mini-tape, se avsnitt 3.1 side 26. Deretter ble DNAet i prøvene ekstrahert. To ulike ekstraksjonsmetoder ble testet ut; Chelex, se avsnitt 3.2 side 29, og QIAamp, se avsnitt 3.3 side 31. Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products ”1 tape kit”) ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp. Videre ble prøvene kvantitert, se avsnitt 3.4 side 33, og amplifisert, se avsnitt 3.5 side 35, før videre kapillærelektorforese, se avsnitt 3.6 side 37, i henhold til dagens rutiner ved sporavdelingen.

Ved resultatbehandlingen ble kun resultatene for sporsikringsmetodene og ekstraksjonsmetodene vurdert. Siden hensikten med denne delen av prosjektet var å finne hvilken mini-tape og hvilken ekstraksjonsmetode som samlet ga best resultater ble resultatene ikke vurdert avhengig av type tekstil.

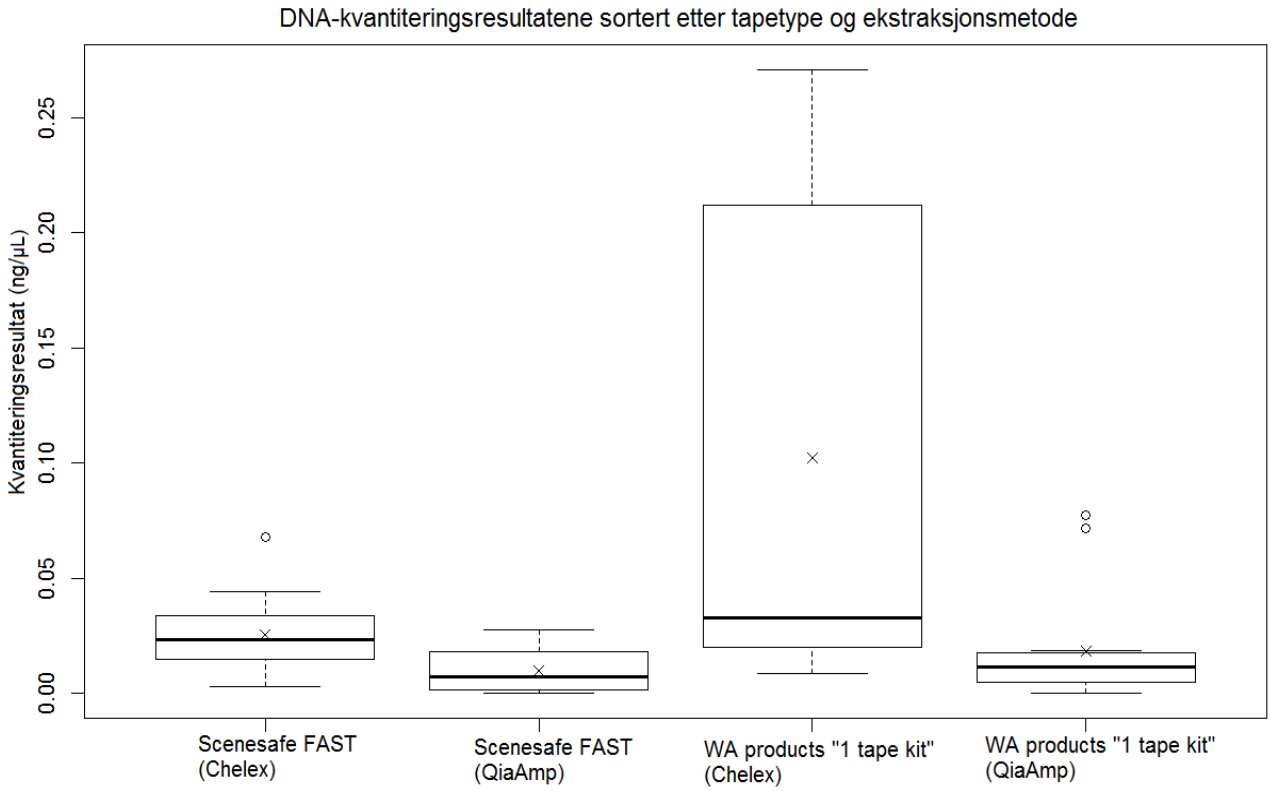
Sporsikringen med de to tapetypene på hver tekstiltype ble gjennomført på forskjellige plagg, samt på forskjellige områder. Derfor kunne det i dette tilfellet bare utføres uparet sammenlikning ved vurderingen av DNA-kvantiterings- og DNA-typeresultatene.

4.1.1. DNA-kvantiteringsresultater

DNA-kvantiteringsresultatene for prøvene var antatt uavhengige, men siden prøvene var sikret fra plagg brukt av en og samme forsøksperson kunne uavhengigheten mellom prøvene påvirkes. Da alle observasjonene var fra samme forsøksperson kunne imidlertid ikke ”random effects model” i ”R Commander” korrigere for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ. Kvantiteringsresultatene ble plottet i ”R Commander” som viste at resultatene var tilnærmet normalfordelte med tilnærmet lik varians. Kvantiteringsresultatene ble vurdert ut fra hvilken sporsikringsmetode (Scenesafe FAST™ eller WA Products ”1 tape kit”) som var benyttet avhengig av hvilken metode som var brukt ved ekstraksjonen (Chelex eller QIAamp), se tabell 4.1 og figur 4.1

Tabell 4.1: DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikring med Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit» på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter) ekstrahert med Chelex og QIAamp, samt de beregnede gjennomsnittene av kvantiteringsresultatene for hver av sporsikrings- og ekstraksjonsmetodene i tillegg til gjennomsnittet av alle resultatene. Det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

		Ekstraksjonsmetode		
		Chelex	QIAamp	Gjennomsnitt
Sporsikringsmetode	Scenesafe FAST™	0,0169	0,0040	0,0177
		0,0233	0,0000	
		0,0420	0,0145	
		0,0028	0,0014	
		0,0339	0,0000	
		0,0074	0,0080	
		0,0679	0,0233	
		0,0235	0,0277	
		0,0119	0,0090	
		0,0341	0,0259	
		0,0203	0,0005	
		0,0245	0,0013	
		0,0440	0,0023	
		0,0195	0,0073	
		0,0124	0,0216	
	WA products «1 tape kit»	0,0329	0,0063	0,0604
		0,0119	0,0000	
		0,0086	0,0032	
		0,0808	0,0034	
		0,0180	0,0000	
		0,1810	0,0103	
		0,0222	0,0773	
		0,0127	0,0124	
		0,0267	0,0180	
		0,0240	0,0108	
		0,0894	0,0140	
		0,2680	0,0188	
		0,2430	0,0115	
		0,2710	0,0174	
		0,2470	0,0717	
Gjennomsnitt		0,0641	0,0141	0,0391



Figur 4.1: DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikring med Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit» på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter) ekstrahert med Chelex og QIAamp. Det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

Figur 4.1 viser at sporsikring med WA Products «1 tape kit» ekstrahert med Chelex hadde en større variasjon og et høyere gjennomsnitt i kvantiteringsresultatene i forhold til de øvrige sporsikrings- og ekstraksjonskombinasjonene. Medianen lå imidlertid lavere, og var nærmere de øvrige sporsikrings- og ekstraksjonskombinasjonene. I tillegg viser figuren at både gjennomsnittet og medianen for kvantiteringsresultatene i prøvene ekstrahert med Chelex var høyere enn ved ekstraksjon med QIAamp.

For å sammenlikne kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene kontrollert for ekstraksjonsmetode og for ekstraksjonsmetodene kontrollert for sporsikringsmetode ble variansanalysen ANOVA benyttet. Se tabell 4.2 for de beregnede verdiene.

Tabell 4.2: Beregnede verdier ved bruk av ANOVA der DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikringsmetodene (Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit") er kontrollert for ekstraksjonsmetodene (Chelex og QIAamp) og motsatt. Sporsikringen ble utført på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter), og det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

	SS	Frihetsgrader	MS	F-verdi	p-verdi
Sporsikringsmetode (S)	0,0274	1	0,0274	8,2366	0,0058
Ekstraksjonsmetode (EX)	0,0375	1	0,0375	11,2873	0,0014
Avvik	0,1892	57	0,0033		
Total	0,2541	59			

Som det fremgår av tabell 4.2 ga kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene en p-verdi = 0,0058 når det ble kontrollert for ekstraksjonsmetode, mens kvantiteringsresultatene for ekstraksjonsmetodene ga en p-verdi = 0,0014 når det ble kontrollert for sporsikringsmetode. Ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kunne dermed nullhypotesen forkastes i begge tilfellene.

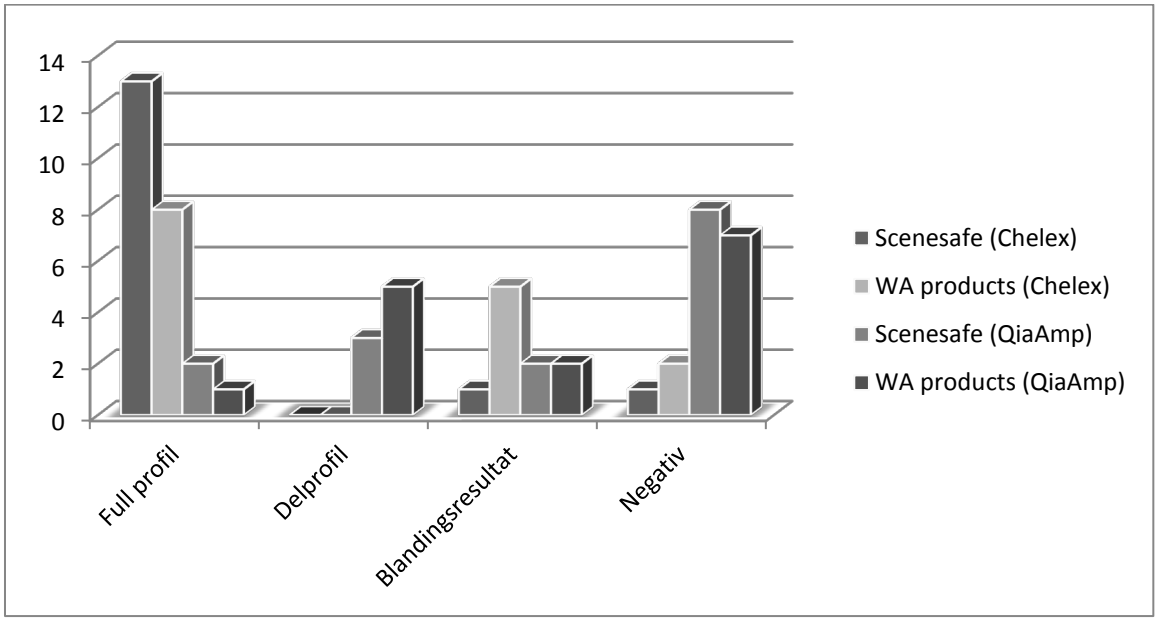
Ut fra et normalplott av kvantiteringsresultatene (figur utelatt) fremsto de som tilnærmet normalfordelte, men da det kunne være tvil om de var normalfordelte nok ble i tillegg Kruskal-Wallis test benyttet. Ved å sammenlikne kvantiteringsresultatene for ekstraksjonsmetodene og sporsikringsmetodene uten å kontrollere for hverandre oppga "R Commander" en p-verdi = 2.763e-05 for ekstraksjonsmetodene og en p-verdi = 0,1432 for sporsikringsmetodene. For ekstraksjonsmetodene kom man dermed frem til samme konklusjonen som over, mens for sporsikringsmetodene kom man frem til en annen konklusjon da nullhypotesen ikke kunne forkastes.

4.1.2. DNA-typeresultater

Fordelingen av typeresultatene for sporsikring med Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit" kontrollert for ekstraksjonsmetode er gitt i tabell 4.3 og figur 4.2.

Tabell 4.3: Fordelingen av typeresultatene (full profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikringsmetodene (Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit") kontrollert for ekstraksjonsmetode (Chelex og QIAamp) med beregnede prosenter oppgitt i parentes. Sporsikringen ble utført på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter), og det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

	Full profil	Delprofil	Blandingsresultat	Negativ
Scenesafe (Chelex)	13 (21,7 %)	0 (0,0 %)	1 (1,7 %)	1 (1,7 %)
WA products (Chelex)	8 (13,3 %)	0 (0,0 %)	5 (8,3 %)	2 (3,3 %)
Scenesafe (QIAamp)	2 (3,3 %)	3 (5,0 %)	2 (3,3 %)	8 (13,3 %)
WA products (QIAamp)	1 (1,7 %)	5 (8,3 %)	2 (3,3 %)	7 (11,7 %)



Figur 4.2: Fordelingen av typeresultatene (full profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikringsmetodene (Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit") kontrollert for ekstraksjonsmetode (Chelex og QIAamp). Sporsikringen ble utført på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter), og det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

Figur 4.2 viser at sporsikring med Scenesafe FAST™ etterfulgt av DNA-ekstraksjon med Chelex ga flest fulle DNA-profiler. Sporsikring med Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit" ekstrahert med QIAamp ga færrest fulle DNA-profiler, og flest negative resultater.

Kjikvadrattesten ble benyttet for å sammenlikne summen av prøvene som ga typeresultater (full DNA-profil, delprofil og blandingsresultat) for sporsikringsmetodene kontrollert for ekstraksjonsmetodene. Videre ble samme testen brukt for å sammenlikne fordelingen av typeresultatene (full DNA-profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikringsmetodene og ekstraksjonsmetodene uten å kontrollere for hverandre. De beregnede p-verdiene er gitt i tabell 4.4.

Tabell 4.4: Beregnet p-verdi for summen av prøvene som ga typeresultater (full DNA-profil, delprofil og blandingsresultat) for sporsikringsmetodene (Scenesafe FAST™ og WA Products "1 tape kit") kontrollert for ekstraksjonsmetodene (Chelex og QIAamp). I tillegg er de beregnede p-verdiene for fordelingen av typeresultatene (full DNA-profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikrings- og ekstraksjonsmetodene uten å kontrollere for hverandre oppgitt. Sporsikringen ble utført på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, bomullsvanter og fleecevanter) og det ble sikret ti prøver med hver tapetype fra hver tekstiltype (totalt 60 prøver). Halvparten av prøvene sikret fra hver tekstiltype (hhv. 5 stk. sikret med Scenesafe FAST™ og 5 stk. sikret med WA Products "1 tape kit") ble ekstrahert med Chelex, og den resterende halvparten med QIAamp.

	p-verdi
Sporsikringsmetodene kontrollert for ekstraksjonsmetodene	0,74
Sporsikringsmetodene uten å kontrollere for ekstraksjonsmetode	0,31
Ekstraksjonsmetodene uten å kontrollere for sporsikringsmetode	1,45e-06

Tabell 4.4 viser at ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kunne nullhypotesen bare forkastes der kvantiteringsresultatene mellom ekstraksjonsmetodene ble sammenliknet uten å kontrollere for sporsikringsmetode.

4.2. Del 2 – Sammenlikning av sporsikring med mini-tape og vattpinne

Biologisk materiale, i form av epitelceller, ble sikret fra tre typer plagg med ulike overflater innhentet fra ti forsøkspersoner; én t-skjorte i bomull, én caps i tettvevd bomull og et svettebånd i bomull/nylon fra hver person. Det ble sikret totalt to prøver fra hvert plagg, hhv. én med mini-tape (Scenesafe FAST™) og én med vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft), se avsnitt 3.1 side 26.

DNAet i prøvene ble deretter ekstrahert med 5 % Chelex-løsning, se avsnitt 3.2 side 29, før videre kvantitering, se avsnitt 3.4 side 33, amplifisering, se avsnitt 3.5 side 35, og kapillærelektroforese, se avsnitt 3.6 side 37, i henhold til dagens rutiner ved sporavdelingen.

Siden hensikten med denne delen av prosjektet var å finne hvilken sporsikringsmetode som var best egnet for hvilke type tekstiler ble resultatene for både sporsikringsmetodene og tekstiltypene vurdert ved resultatbehandlingen. Da det på hvert plagg var sikret én mini-tape og én vattpinne fra samme type område, der det var forventet å være avsatt tilnærmet like mengder epitelceller, ble det utført både uparet og paret sammenlikning av DNA-kvantiterings- og DNA-typeresultatene.

4.2.1. DNA-kvantiteringsresultater

DNA-kvantiteringsresultatene for prøvene var antatt uavhengige, men siden flere av prøvene var sikret fra plagg brukt av en og samme forsøksperson (totalt 6 prøver fra hvert individ) kunne uavhengigheten mellom prøvene bli påvirket. Da prøvene var sikret fra ti forskjellige forsøkspersoner ble det korrigert for mulig avhengighet i observasjonene fra samme individ i ”R Commander” ved bruk av ”random effects model”. Kvantiteringsresultatene ble plottet i ”R Commander” som viste at resultatene var tilnærmet normalfordelte med tilnærmet lik varians.

1. Uparet sammenlikning:

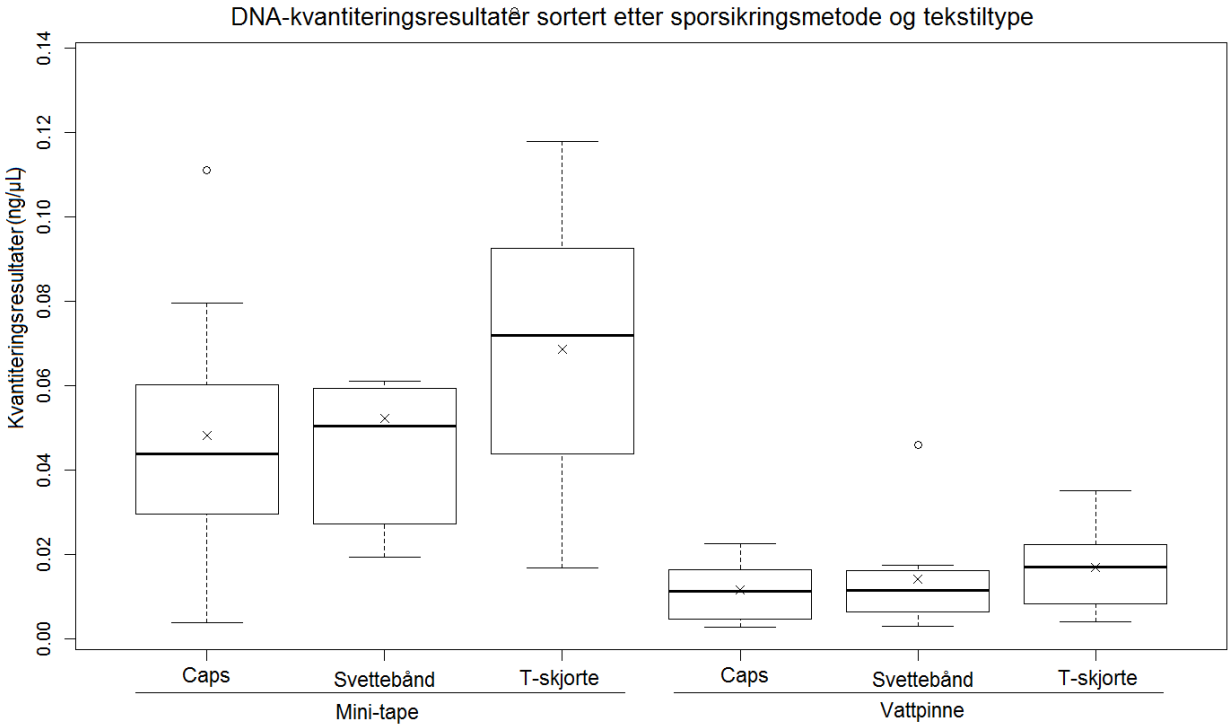
DNA-kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) avhengig av hvilken type tekstil (t-skjorter i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) sporsikringen ble utført på er gitt i tabell 4.5.

Tabell 4.5: DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikring med mini-tape (Scenesafe FAST™) og vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft) på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) ekstrahert med Chelex, samt de beregnede gjennomsnittene av kvantiteringsresultatene for hver av sporsikringsmetodene og tekstiltypene i tillegg til gjennomsnittet av alle resultatene. Det ble sikret to prøver fra like områder på vrangsiden av hvert plagg, hhv. én med hver sporsikringsmetode (totalt 60 prøver).

		Tekstil			
		T-skjorte	Caps	Svettebånd	Gjennomsnitt
Sporsikringsmetode	Mini-tape	0,1090	0,0297	0,0586	0,0670
		0,0439	0,0603	0,0359	
		0,0168	0,0228	0,0218	
		0,0926	0,1110	0,0594	
		0,0689	0,0039	0,0272	
		0,0355	0,0340	0,0193	
		0,1180	0,0797	0,3690	
		0,0751	0,0535	0,1360	
		0,0499	0,0349	0,0612	
		0,0779	0,0530	0,0505	
	Vattpinne	0,0351	0,0112	0,0147	0,0143
		0,0184	0,0048	0,0082	
		0,0073	0,0119	0,0077	
		0,0169	0,0225	0,0160	
		0,0237	0,0028	0,0030	
		0,0224	0,0116	0,0163	
		0,0167	0,0165	0,0460	
		0,0173	0,0109	0,0175	
		0,0040	0,0193	0,0065	
		0,0083	0,0042	0,0059	
	Gjennomsnitt	0,0429	0,0299	0,0490	0,0406

Ut fra tabell 4.5 fremkommer det for én av prøvene sikret med mini-tape fra svettebånd en ”outlier” med et betydelig høyere kvantiteringsresultat (0,369 ng/µL) enn for de øvrige prøvene. Dette resultatet blir videre angitt som O_{max}. Kvantiteringsresultatene for sporsikring med mini-

tape og vattpinne kontrollert for tekstiltype, ekskludert O_{max}, er gitt i figur 4.3.



Figur 4.3: DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikring med mini-tape (Scenesafe FAST™) og vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft) på tre ulike tekstiltyper (t-skjorter i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) ekstrahert med Chelex, ekskludert O_{max}. Det ble sikret to prøver fra like områder på vrangsiden av hvert plagg, hhv. én med hver sporsikringsmetode (totalt 60 prøver).

Figur 4.3 viser at ved sporsikring med mini-tape var både gjennomsnittene og medianene for DNA-kvantiteringsresultatene høyere enn ved sporsikring med vattpinne, uavhengig om det ble kontrollert for tekstiltype eller ikke.

ANOVA ble benyttet for å sammenlikne kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltype og for tekstiltypene kontrollert for sporsikringsmetode. Det ble i tillegg korrigert for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ. Beregningene ble utført både med og uten O_{max}. De beregnede verdiene er gitt i tabell 4.6, der verdiene uten O_{max} er angitt i parentes.

Tabell 4.6: Beregnede verdier ved bruk av ANOVA der DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) er kontrollert for tekstiltypene (t-skjorter i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) og motsatt. Det ble i tillegg korrigert for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ, og verdiene oppgitt i parentes er beregningene utført uten O_{max}. Det ble sikret to prøver fra like områder på vrangsiden av hvert plagg, hhv. én med hver sporsikringsmetode (totalt 60 prøver).

	SS	Frihetsgr.	MS	F-verdi	p-verdi
Sporsikringsmetode (S)	0,042 (0,027)	1 (1)	0,042 (0,0273)	23,07 (64,54)	< 0,0001 (< 0,0001)
Tekstiltype (TX)	0,004 (0,002)	2 (2)	0,002 (0,0009)	1,05 (2,04)	0,3570 (0,1418)
Forsøkspersoner (ID)	0,039 (0,012)	9 (9)	0,004 (0,0013)	2,38 (3,11)	0,0263 (0,0053)
Avvik	0,085 (0,019)	47 (46)	0,002 (0,0004)		
Total	0,170	59 (58)			

Som det fremgår av tabell 4.6 ga kvantiteringsresultatene inkludert O_{max} en p-verdi < 0,0001 for sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltype, mens kvantiteringsresultatene for tekstiltypene kontrollert for sporsikringsmetode ga en p-verdi = 0,3570. Ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kunne nullhypotesen for sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltype forkastes, mens for tekstiltypene kontrollert for sporsikringsmetode kunne nullhypotesen imidlertid ikke forkastes. Ut fra tabellen kommer det i tillegg frem at når resultatene ble plottet uten O_{max} forble konklusjonen den samme i begge tilfellene.

Ut fra et normalplott av kvantiteringsresultatene (figur utelatt) fremsto de som tilnærmet normalfordelte, men da det kunne være tvil om de var normalfordelte nok ble Kruskal Wallis test benyttet i tillegg. Ved å sammenlikne kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene og tekstiltypene uten å kontrollere for hverandre oppga ”R Commander” en p-verdi = 1,01e-08 for sporsikringsmetodene og en p-verdi = 0,4022 for tekstiltypene. Dermed kom man i begge tilfellene frem til samme konklusjonen som over, riktignok for noe forskjellige modeller.

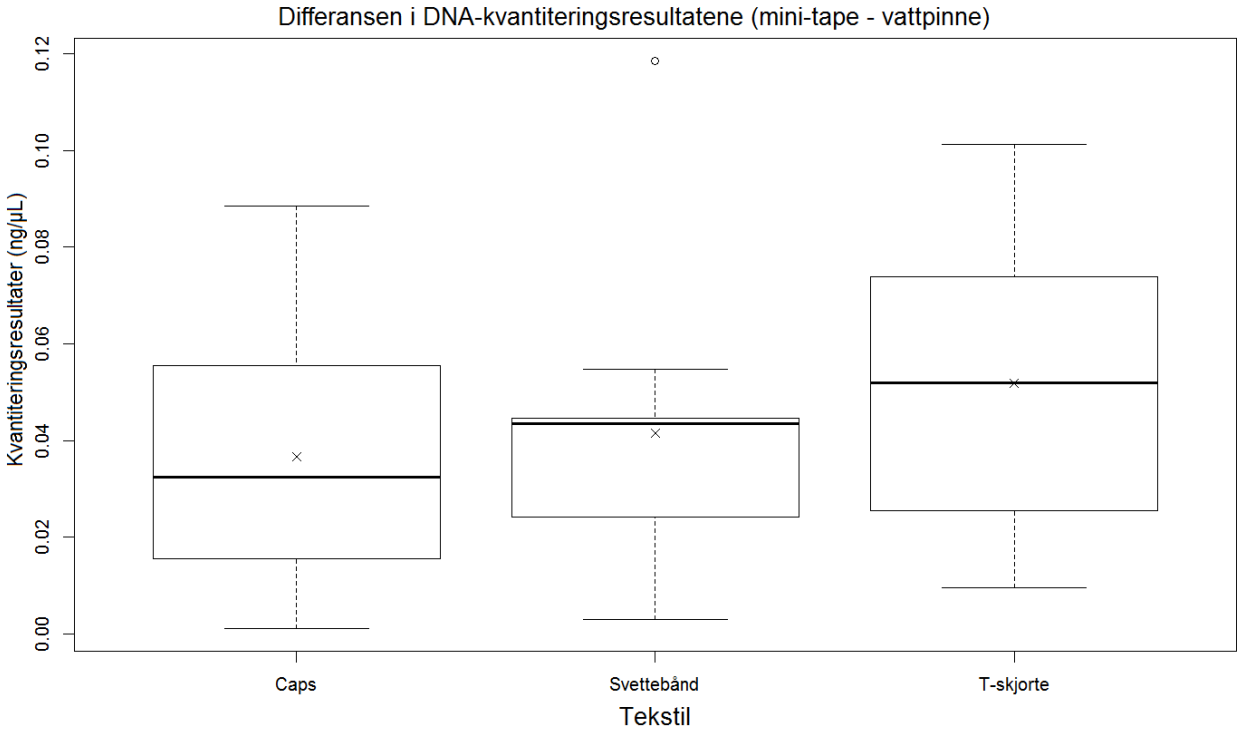
2. Paret sammenlikning:

Ved en paret sammenlikningen (totalt 30 sammenlikninger) av DNA-kvantiteringsresultatene ble differansen i kvantiteringsresultatene mellom sporsikring med mini-tape og sporsikring med vattpinne på samme tekstil beregnet, der resultatet for vattpinnen ble trukket fra resultatet for mini-tapen (mini-tape – vattpinne). Differansene er gitt i tabell 4.7.

Tabell 4.7: Differansen i DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) for prøvene sikret med hhv. mini-tape og vattpinne på samme plagg (t-skjorte, caps og svettebånd), der resultatet for vattpinnen er trukket fra resultatet for mini-tapen. Det ble sikret to prøver fra like områder på vrangsiden av hvert plagg, hhv. én med hver sporsikringsmetode (totalt 30 sammenlikninger).

	Differansen i DNA-kvantiteringsresultatene (mini-tape – vattpinne)									
T-skjorte	0,0739	0,0255	0,0095	0,0757	0,0452	0,0131	0,1013	0,0578	0,0459	0,0696
Caps	0,0185	0,0555	0,0109	0,0885	0,0011	0,0224	0,0632	0,0426	0,0156	0,0488
Svettebånd	0,0439	0,0277	0,0141	0,0434	0,0242	0,0030	0,3230	0,1185	0,0547	0,0446

Ut fra tabell 4.7 fremkommer det ved sporsikring på svettebånd for én av forsøkspersonene en ”outlier” med en betydelig høyere differanse i kvantiteringsresultatene (0,323 ng/µL) enn for de øvrige forsøkspersonene og plaggene. Dette resultatet blir videre angitt som D_{max}. Differansen i kvantiteringsresultatene ved den parvise sammenlikningen, ekskludert D_{max}, er gitt i figur 4.4.



Figur 4.4: Differansen i DNA-kvantiteringsresultatene (ng/µL) mellom prøvene sikret med hhv. mini-tape og vattpinne på samme plagg (t-skjorter, caps og svettebånd), ekskludert D_{max}, der resultatet for vattpinnen er trukket fra resultatet for mini-tapen. Det ble sikret to prøver fra like områder på vrangsiden av hvert plagg, hhv. én med hver sporsikringsmetode (totalt 30 sammenlikninger).

Som det fremgår av figur 4.4 ga sporsikring med mini-tape høyere kvantiteringsresultater enn ved sporsikring med vattpinne. Det ble ikke observert tilfeller der sporsikring med vattpinne ga høyere eller lik konsentrasjon i forhold til sporsikring med mini-tape i noen av de 30 parvise sammenlikningene. Binomisk test ble benyttet, der 30 av 30 tekstiler ga høyest kvantiteringsresultat ved sporsikring med mini-tape. Testen viste at i minst 88 % av tilfellene vil sporsikring med mini-tape gi høyere kvantiteringsresultater enn sporsikring med vattpinne når

beregningen er basert på et 95 % konfidensintervall. I dette tilfellet ga sporsikring med mini-tape høyere kvantiteringsresultater enn sporsikring med vattpinne i 100 % av tilfellene. I tillegg ble det beregnet en p-verdi = 1.863e-09, som viste at det var signifikant forskjell i antallet prøver som ga høyest kvantiteringsresultat ved sporsikring med mini-tape sammenliknet med vattpinne.

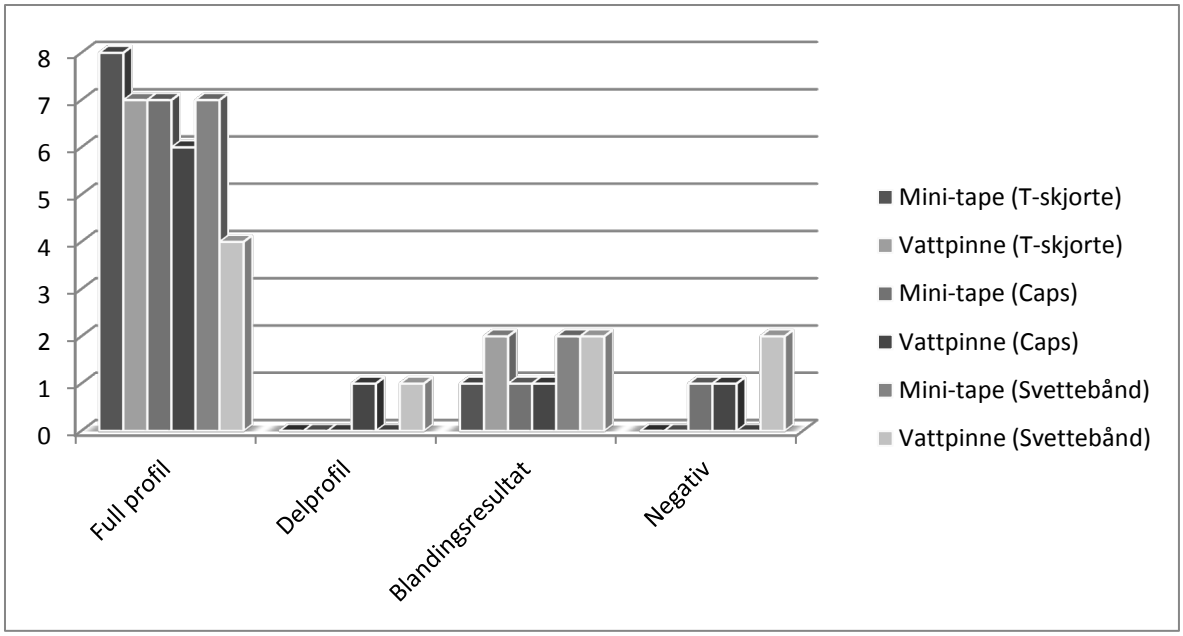
4.2.2. DNA-typeresultater

I DNA-typeresultatene for én av de ti forsøkspersonene fremkom det for begge sporsikringsmetodene, for alle tre tekstiltypene, en betydelig mengde DNA av annen opprinnelse enn forsøkspersonen selv (trolig en nær slektning). Dette vanskeliggjorde vurderingen av tilstedeværelsen av forsøkspersonen i typeresultatene, og prøvene fra denne forsøkspersonen ble derfor ekskludert ved den videre resultatbehandlingen. Dermed baserer de videre beregningene seg på 54 prøver.

Fordelingen av typeresultatene for de to sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltype er gitt i tabell 4.8 og figur 4.5.

Tabell 4.8: Fordelingen av typeresultatene (full profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) med beregnede prosenter oppgitt i parentes. Det ble sikret to prøver, hhv. én med hver sporsikringsmetode, fra vrangsiden av hvert plagg (totalt 54 prøver).

	Full profil	Delprofil	Blandingsresultat	Negativ
Mini-tape (T-skjorte)	8 (14,8 %)	0 (0,0 %)	1 (1,9 %)	0 (0,0 %)
Vattpinne (T-skjorte)	7 (13,0 %)	0 (0,0 %)	2 (3,7 %)	0 (0,0 %)
Mini-tape (Caps)	7 (13,0 %)	0 (0,0 %)	1 (1,9 %)	1 (1,9 %)
Vattpinne (Caps)	6 (11,1 %)	1 (1,9 %)	1 (1,9 %)	1 (1,9 %)
Mini-tape (Svettebånd)	7 (13,0 %)	0 (0,0 %)	2 (3,7 %)	0 (0,0 %)
Vattpinne (Svettebånd)	4 (7,4 %)	1 (1,9 %)	2 (3,7 %)	2 (3,7 %)



Figur 4.5: Fordelingen av typeresultatene (full profil, delprofil, blandingsresultat og negativ) for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon). Det ble sikret to prøver, hhv. én med hver sporsikringsmetode, fra vrangsiden av hvert plagg (totalt 54 prøver).

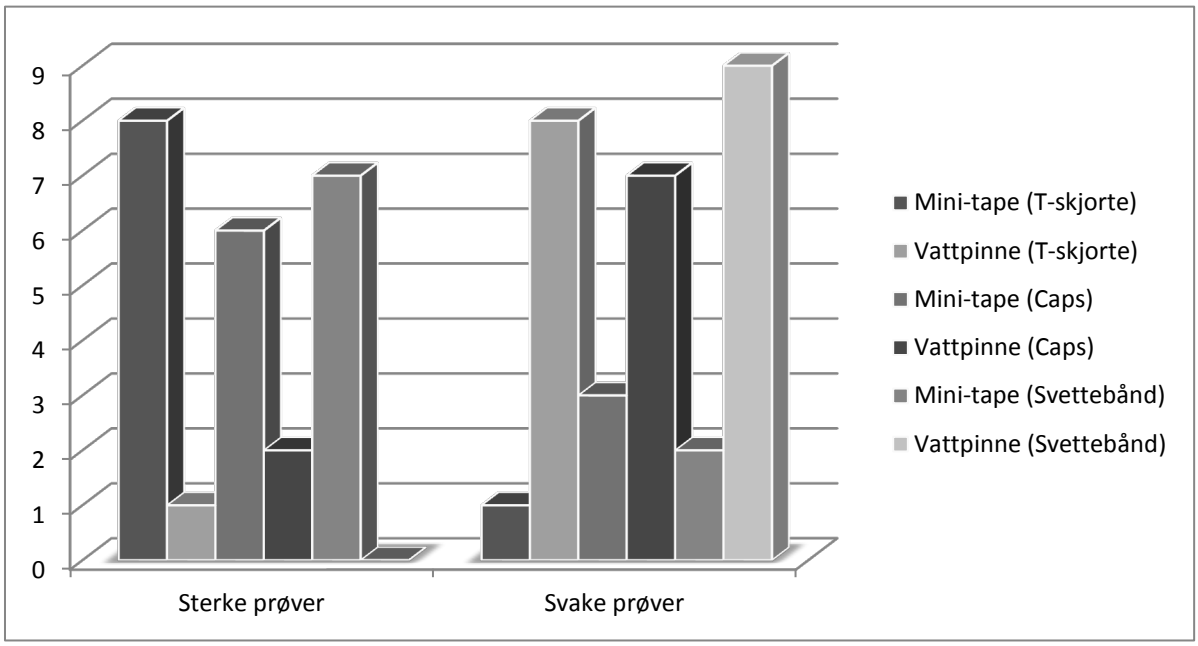
Figur 4.5 viser ingen store forskjeller i typeresultatene ved sammenlikning av sporsikring med mini-tape og vattpinne, hverken når det kontrolleres for tekstiltype eller ikke. Ved vurdering av rådata ble det imidlertid observert store forskjeller i kvaliteten på resultatene, herunder bl.a. styrke (rfu). Typeresultatene ble derfor videre klassifisert ut fra styrken på prøvene. En sterk prøve ble angitt som en prøve der ni eller flere markører hadde begge allelene over 4000 rfu. De øvrige prøvene (inkl. de som ga negative resultater) ble regnet som svake prøver.

1. Uparet sammenlikning:

Fordelingen av typeresultatene ut fra styrke er gitt i tabell 4.9 og figur 4.6.

Tabell 4.9: Fordelingen av sterke og svake typeresultater for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon) med beregnede prosenter oppgitt i parentes. Det ble sikret to prøver, hhv. én med hver sporsikringsmetode, fra vrangsiden av hvert plagg (totalt 54 prøver).

	Sterke prøver	Svake prøver
Mini-tape (T-skjorte)	8 (14,8 %)	1 (1,9 %)
Vattpinne (T-skjorte)	1 (1,9 %)	8 (14,8 %)
Mini-tape (Caps)	6 (11,1 %)	3 (5,6 %)
Vattpinne (Caps)	2 (3,7 %)	7 (13,0 %)
Mini-tape (Svettebånd)	7 (13,0 %)	2 (3,7 %)
Vattpinne (Svettebånd)	0 (0,0 %)	9 (16,7 %)



Figur 4.6: Fordelingen av sterke og svake typeresultater for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon). Det ble sikret to prøver, hhv. én med hver sporsikringsmetode, fra vrangsiden av hvert plagg (totalt 54 prøver).

Figur 4.6 viser at sporsikring med mini-tape ga flere sterke typeresultater enn sporsikring med vattpinne både ved sporsikring på t-skjorte, caps og svettebånd.

Kjikvadrattesten ble benyttet for å sammenlikne styrken på typeresultater mellom sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltype, der antallet prøver som ga sterke typeresultater ble benyttet. Videre ble samme testen brukt for å sammenlikne fordelingen av sterke og svake typeresultatene for sporsikringsmetodene og tekstiltypene uten å kontrollere for hverandre. De beregnede p-verdiene er gitt i tabell 4.10.

Tabell 4.10: Beregnet p-verdi for styrken på typeresultatene for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon), der summen av prøvene som ga sterke typeresultatene ble benyttet. I tillegg er de beregnede p-verdiene for fordelingen av sterke/svake typeresultatene for sporsikringsmetodene og tekstiltypene uten å kontrollere for hverandre oppgitt.

	p-verdi
Sporsikringsmetodene kontrollert for tekstiltypene	0,34
Sporsikringsmetodene uten å kontrollere for tekstiltype	8,24e-07
Tekstiltypene uten å kontrollere for sporsikringsmetode	0,80

Tabell 4.10 viser at ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kan nullhypotesen kun forkastes der styrken på typeresultatene mellom sporsikringsmetodene ble sammenliknet uten å kontrollere for tekstiltype.

2. Paret sammenlikning:

Ved paret sammenlikningen (totalt 27 sammenlikninger) ble styrken på typeresultatene benyttet, se tabell 4.11 der prøvene som ga sterke typeresultater er uthevet.

Tabell 4.11: Styrken på typeresultatene (sterk/svak) for sporsikringsmetodene (mini-tape og vattpinne) kontrollert for tekstiltype (t-skjorter i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon), der prøvene som ga sterke typeresultater er uthevet, samt en oppsummering av hvilken metode som ga sterkest resultat.

	Mini-tape	Vattpinne	Sporsikringsmetoden som gir best typeresultat.
T-skjorte	**Sterk**	Svak	Mini-tape
	Svak	Svak	Likt
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	**Sterk**	Likt
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
Caps	**Sterk**	Svak	Mini-tape
	Svak	Svak	Likt
	Sterk	**Sterk**	Likt
	Svak	Svak	Likt
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Svak	Svak	Likt
	Sterk	**Sterk**	Likt
	Sterk	Svak	Mini-tape
Svettebånd	Svak	Svak	Likt
	Svak	Svak	Likt
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape
	Sterk	Svak	Mini-tape

Tabell 4.11 viser at sporsikring med mini-tape ga sterkere typeresultater enn sporsikring med vattpinne for 18 av tekstilene. For de øvrige 9 tekstilene ga sporsikringsmetodene tilnærmet like styrker på typeresultatene. Det var ingen tilfeller der mini-tape ga svakere typeresultater enn vattpinne. Ved bruk av binomisk test ble kun sammenlikningene der mini-tape og vattpinne ga forskjellig styrke på typeresultatene (svak/sterk) benyttet. De tilfellene der mini-tape og vattpinne ga tilnærmet like styrker ble ikke tatt med i beregningene. Dataene ble plottet i ”R Commander”, og binomisk test ble benyttet der 18 av 18 tekstiler ga sterkest typeresultat ved sporsikring med mini-tape. Testen viste at i minst 81 % av tilfellene vil sporsikring med mini-tape gi sterkere typeresultater enn sporsikring med vattpinne når beregningen er basert på et 95 % konfidensintervall. I dette tilfellet ga sporsikring med mini-

tape sterkere typeresultater enn sporsikring med vattpinne i 100 % av tilfellene (sett bort fra de 9 tekstilene som ga tilnærmet like sterke typeresultater). I tillegg ble det beregnet en p-verdi = 7,629e-06, som viste at det var signifikant forskjell i antallet prøver som ga sterkest typeresultater ved sporsikring med mini-tape sammenliknet med vattpinne.

5. Diskusjon

I dette kapittelet vil de viktigste resultatene relatert til hensikten med oppgaven, se side 10, diskuteres. I første del vil resultatene som ligger til grunn for valg av hvilken type mini-tape og hvilken type ekstraksjonsmetode som skulle benyttes videre i prosjektet bli gjennomgått. I neste del vil resultatene fra sammenlikningen av sporsikring med mini-tape og vattpinne bli gjennomgått, for om mulig å vurdere om sporsikring med mini-tape gir bedre resultater enn dagens vattpinneavstryk.

5.1. Del 1 – Sammenlikning av mini-tape og ekstraksjonsmetoder

Formålet med denne delen av prosjektet var å sammenlikne sporsikring av epitelceller fra ulike tekstiloverflater med to ulike mini-tapetyper (Scenesafe FAST™ og WA Products «1 tape kit») ekstrahert med to ulike ekstraksjonsmetoder (Chelex og QIAamp). I denne delen ble det benyttet effekter fra kun én forsøksperson, der det ble sikret totalt 60 prøver. Det ble antatt at prøvene var uavhengige og at antallet prøver var nok for å trekke statistiske slutninger. Resultatene ble sammenliknet på bakgrunn av suksessrate, brukervennlighet og pris. Mini-tapen og ekstraksjonsmetoden som samlet var best egnet ble benyttet videre i del 2 for sammenlikning med dagens sporsikringsmetode ved sporavdelingen som var vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft) ekstrahert med Chelex.

5.1.1. DNA-kvantiteringsresultater

Som det fremgår av tabell 4.1 side 40 og figur 4.1 side 41 ga prøvene ekstrahert med Chelex signifikant høyere kvantiteringsresultater enn prøvene ekstrahert med QIAamp når det ble kontrollert for sporsikringsmetode (ANOVA, p=0,0014). Dette kan skyldes at ekstraksjon med QIAamp består av flere vasketrinn enn Chelex-ekstraksjon. Dette kan resultere i at mer cellemateriale forsvinner under ekstraksjonen, og mengden DNA i prøvene reduseres. I tillegg kan det skyldes at noe av limet i tapen (selv om det er vannløselig) festet seg til kolonnene, og dermed forhindret at DNA-molekyler fikk festet seg. Videre viser figur 4.1 og tabell 4.1 at prøvene sikret med WA Products «1 tape kit» ga signifikant høyere kvantiteringsresultater enn prøvene sikret med Scenesafe FAST™ når det ble kontrollert for ekstraksjonsmetode

(ANOVA, p=0,0058). Dette kan skyldes at WA Products «1 tape kit» var mer klebrig enn Scenesafe FAST™, og dermed festet til seg mer cellemateriale ved sporsikringen.
Da det kunne være tvil om resultatene var normalfordelte nok ble Kruskal-Wallis test benyttet i tillegg. Forskjellen i kvantiteringsresultatene mellom de to ekstraksjonsmetodene ble dermed mer signifikant (Kruskal-Wallis test, p=2,763e-05) når det ikke ble kontrollert for sporsikringsmetode. Forskjellen i kvantiteringsresultatene mellom de to sporsikringsmetodene ble imidlertid ikke signifikant (Kruskal-Wallis test, p=0,1432) når det ikke ble kontrollert for ekstraksjonsmetode.

Grunnen til at konklusjonen for sporsikringsmetodene varierer avhengig av om ANOVA eller Kruskal-Wallis test ble benyttet kan skyldes at ved beregninger med ANOVA benyttes gjennomsnittene mens ved beregninger med Kruskal-Wallis test benyttes medianene. Figur 4.1 side 41 viser at prøvene sikret med WA Products ”1 tape kit” ekstrahert med Chelex hadde et høyt gjennomsnitt, mens medianen lå lavere og dermed nærmere medianene til de andre sporsikrings- og ekstraksjonskombinasjonene.

5.1.2. DNA-typeresultater

Resultatene fra DNA-typingen, se figur 4.2 side 43, viste at ekstraksjon med Chelex ga signifikant flere og bedre typeresultater enn ved ekstraksjon med QIAamp når det ikke ble kontrollert for sporsikringsmetode (kjikvadrattest, p=1,45e-06). Dette kan skyldes det samme som ved kvantiteringen, at prosedyren for ekstraksjon med QIAamp inneholder flere vasketrinn enn Chelex-ekstraksjon, i tillegg til at limet i tapen kan sette seg fast i QIAamp-kolonnene. Det ble imidlertid ikke observert signifikante forskjeller i fordelingen av typeresultatene mellom de to sporsikringsmetodene når det ikke ble kontrollert for ekstraksjonsmetode (kjikvadrattest, p=0,31). Likeledes ble det ikke observert signifikante forskjeller for hverken sporsikringsmetodene eller ekstraksjonsmetodene når de ble kontrollert for hverandre (kjikvadrattest, p=0,74).

Selv om sporsikring med WA Products ”1 tape kit” ga signifikant høyere kvantiteringsresultater ved bruk av ANOVA enn sporsikring med Scenesafe FAST™ når det ikke ble kontrollert for ekstraksjonsmetode ga den ikke bedre typeresultater. Det kan skyldes at ved beregninger med ANOVA, slik det ble gjort for kvantiteringsresultatene, ble gjennomsnittene benyttet. Figur 4.1 side 41 viser at prøvene sikret med WA Products ”1 tape kit” ekstrahert med Chelex hadde et høyt gjennomsnitt, mens medianen lå lavere og dermed nærmere medianene til de andre sporsikrings- og ekstraksjonskombinasjonene. På bakgrunn av dette kan kun noen få prøver med et høyt kvantiteringsresultat påvirke beregningene ved bruk av ANOVA. Ved beregning på typeresultatene ble imidlertid kjikvadrattesten med kategoriske data som ikke påvirkes på

samme måten benyttet.

5.1.3. Fordeler/ulemper ved sporsikring og ekstraksjon av mini-tapene

Ved sporsikringen på de ulike tekstilene var WA Products «1 tape kit» mer klebrig og klissete enn Scenesafe FAST™, og dermed vanskeligere å klippe og få ned i prøverøret. Scenesafe FAST™ var imidlertid mer statisk enn WA Products «1 tape kit», men likevel lettere å jobbe med da det var lettere å få samlet den i nedre del av prøverøret.

Ved ekstraksjon oppsto det samme problemet som under sporsikringen. WA Products ”1 tape kit” var svært klebrig og dermed vanskelig å få helt ned i prøverøret. Scenesafe FAST™ var i motsetning mindre klebrig, men mer statisk. Denne tapen var likevel mye lettere å jobbe med under ekstraksjonen da den lettere samlet seg i bunnen av prøverøret og sjeldent måtte dyttes ytterligere ned etter sporsikringen. WA Products «1 tape kit» måtte i motsetning oftere dyttes lengre ned i prøverøret ved ekstraksjon, og på grunn av klebrigheten til denne tapen resulterte dette flere ganger i at tapen satte seg fast i pipettespissen og måtte lirkes av igjen.

Hverken ekstraksjon med Chelex eller QIAamp viste fordeler for kun én tapetype. Ekstraksjon med Chelex var imidlertid en mindre tidkrevende metode enn ekstraksjon med QIAamp. Ved ekstraksjon av et fullt oppsett tok Chelex-ekstraksjon ca. 1-2 timer. Ekstraksjon med QIAamp gikk imidlertid over to dager, der det tok ca. 1 time å forberede prøvene den første dagen før ca. en halv dags arbeid dag nummer to. QIAamp benyttet til fordel flere vasketrinn enn Chelex, men resultatene i dette forsøket viste ingen klare fordeler med dette.

5.1.4. Kostnad

Ved gjentatte forespørsler oppga hverken Scenesafe eller WA Products pris på produktene. Dermed foreligger det ikke et reelt prisgrunnlag som kan benyttes ved vurderingen av de to mini-tapene. Ifølge en rapport skrevet av Ricky Ansell (Statens kriminaltekniska laboratorium, Sverige, 2010), der bruk av mini-tape i ulike ENFSI-land sammenliknes, er pris per tape fra WA Products oppgitt til £ 0,50 (dvs. ca. 4,50 nkr.) og Scenesafe £ 0,45 (dvs. ca. 4 nkr.) [25]. På grunnlag av dette antas det at prisdifferansen mellom de to mini-tapene vil være minimal for sporavdelingen, og er dermed ikke avgjørende for valg av typen mini-tape.

Prisen på ekstraksjon med QIAamp er ca. 30 nkr. per prøve. Ekstraksjon med Chelex er imidlertid en mye rimeligere metode, der én boks med Chelex koster 1750 nkr. Denne boksen kan brukes til tusenvis av prøver, og prisen for ekstraksjon av én prøve vil dermed være minimal i forhold til ekstraksjon med QIAamp.

5.2. Del 2 – Sammenlikning av mini-tape og vattpinne

Formålet med denne delen av prosjektet var å sammenlikne sporsikring av epitelceller fra ulike tekstiler med den best egnede mini-tapen fra første delen av prosjektet (Scenesafe FAST™) mot vattpinne (Tubed sterile dryswab™ Wood Shaft) som var dagens rutinemetode ved sporavdelingen. Mini-tapen ble ekstrahert med Chelex som var den mest optimale ekstraksjonsmetoden fra første del av prosjektet. Da Chelex var dagens rutinemetode for ekstraksjon ved sporavdelingen ble denne metoden også benyttet ved ekstraksjon av prøvene sikret med vattpinne. Begge sporsikringsmetodene ble benyttet for å sikre epitelceller fra tre ulike tekstiloverflater: glatt bomull (t-skjorte), ru bomull/nylon (svettebånd) og tettvevd bomull (caps). Plaggene var på forhånd brukt av ti frivillige personer (tjenestemenn ved Oslo politidistrikt), der det ble korrigert for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ. Resultatene ble først og fremst sammenliknet på bakgrunn av suksessrate, men brukervennligheten ble også overveid. Ut fra dette ble det vurdert hvilken metode som var best egnet til sporsikring av epitelceller på tekstiler.

5.2.1. DNA-kvantiteringsresultater

Som det fremgår av figur 4.3 side 46, lå kvantiteringsresultatene for prøvene sikret med mini-tape signifikant høyere enn prøvene sikret med vattpinne når det ble kontrollert for tekstiltype (ANOVA, $p<0,0001$). I kvantiteringsresultatene ble det imidlertid observert et kvantiteringsresultat som var en del høyere enn de øvrige resultatene, omtalt som O_{max} i resultatdelen. Grunnen til dette kan være at denne prøven rett og slett inneholdt mye mer DNA enn de øvrige prøvene eller det kan skyldes feil i dataene. Dersom de samme beregningene ble utført uten O_{max} kom man frem til samme konklusjonen som når O_{max} ble inkludert. Dette styrker konklusjonen med tanke på at O_{max} ikke avviker nok til å endre konklusjonen. Figur 4.3 viser i tillegg at det ikke var signifikant forskjell i kvantiteringsresultatene mellom de ulike tekstiltypene når det ble kontrollert for sporsikringsmetode (ANOVA, $p=0,3570$). Dette viser at mini-tapen ga best kvantiteringsresultater på alle tekstilene den ble prøvd ut på. Ut fra kvantiteringsresultatene behøver det dermed ikke tas hensyn til hva slags tekstiltype det sikres fra for om sporsikringen burde utføres med mini-tape eller med vattpinne.
Videre ble Kruskal-Wallis test benyttet da det kunne være tvil om resultatene var normalfordelte nok. Denne beregningen sammenliknet kvantiteringsresultatene for sporsikringsmetodene og tekstiltypene uten å kontrollere for hverandre, og ga samme konklusjon som ANOVA der resultatene ble sammenliknet kontrollert for hverandre.

Da det på hvert tekstil ble sikret én vattpinne og én mini-tape fra samme type område der det var forventet å finne tilnærmet like mengder epitelceller ble det i tillegg gjennomført en parvis sammenlikning. Ut fra tabell 4.7 side 48 og figur 4.4 side 48 viste den parvise sammenlikningen at kvantiteringsresultatene for prøvene sikret med mini-tape i alle tilfellene var høyere enn de tilsvarende prøvene sikret med vattpinne. Ved å utføre en binomisk test på den parvise sammenlikningen ga sporsikring med mini-tape signifikant høyere kvantiteringsresultater enn sporsikring med vattpinne (binomisk test, p=1,863e-09). Dette kan skyldes at mini-tapen festet til seg mer cellemateriale ved sporsikringen enn det bomullsvatten på vattpinnen gjorde. I tillegg er det mulig at mini-tapen lettere avga cellematerialet ved ekstraksjon enn vattpinnen. Siden limet på tapen er vannløselig ville limet løse seg opp og dermed frigjøre alt cellematerialet i løsningen ved ekstraksjon. Ved ekstraksjon av bomullsvatten kunne cellematerialet ha vanskeligere for å frigjøre seg fra vatten, og man kunne risikere at ikke alt cellematerialet ble med i løsningen videre.

Da prosjektet ble gjennomført var kvantiteringsgrensen for å gå videre til DNA-typing 0,004 ng/µL i henhold til rutinen. Dette resulterte i at én prøve sikret med mini-tape og én prøve sikret på vattpinne ikke ble videre analysert etter kvantitering. Fra og med 1. november 2013 ble kvantiteringsgrensen økt til 0,008 ng/µL i rutinen. Dvs. at prøver med en konsentrasjon på under 0,008 ng/µL vil bli stanset etter kvantitering. Ved å legge den nye kvantiteringsgrensen til grunn ville ytterligere syv prøver sikret på vattpinne ikke blitt videre DNA-analysert. For mini-tape ville de samme prøvene gått videre til DNA-analyse, tross høyere kvantiteringsgrense. Det er rimelig å anta at sporsikring med mini-tape vil gi flere prøver med DNA-konsentrasjon egnet for DNA-analyse enn tilsvarende prøver sikret på vattpinne.

5.2.2. DNA-typeresultater

Figur 4.5 side 50 viser at det var liten forskjell i fordelingen av typeresultatene for sporsikringsmetodene når det ble kontrollert for tekstiltype. Det ble imidlertid observert store forskjeller i kvaliteten på resultatene, og prøvene ble videre klassifisert som svake og sterke, se side 50 i resultatdelen. Figur 4.6 side 51 viser at prøvene sikret med mini-tape ga flere sterke typeresultater på alle tekstiloverflatene enn prøvene sikret med vattpinne. Disse forskjellene var imidlertid ikke signifikante når det ble kontrollert for tekstiltype (kjikvadrattest, p=0,34). Ved sammenlikning av styrken på typeresultatene for de ulike sporsikringsmetodene, uten at det ble kontrollert for tekstiltype, ga prøvene sikret med mini-tape signifikant sterkere typeresultater enn prøvene sikret med vattpinne (kjikvadrattest, p-verdi=8,24e-07). Det ble imidlertid ikke observert signifikante forskjeller i styrken på typeresultatene mellom de ulike

tekstiltypene når det ikke ble kontrollert for sporsikringsmetode (kjikvadrattest, p=0,80). Dette viser at på bakgrunn av typeresultatene (og kvantiteringsresultatene som tidligere nevnt) ga mini-tape sterkest resultater uavhengig av hva slags type tekstil sporsikringen ble utført på. Da det på samme måte som for kvantiteringsresultatene var sikret én vattpinne og én mini-tape fra samme type område på hvert tekstil, der det var forventet å finne tilnærmet like mengder epitelceller, ble det i tillegg gjennomført en parvis sammenlikning på styrken til prøvene. Tabell 4.11 side 52 viser at sporsikring med mini-tape ga signifikant sterkere typeresultater enn sporsikring med vattpinne (binomisk test, p=7,629e-06).

Grunnen til at mini-tapen ga bedre resultater enn vattpinnen kan på samme måte som for kvantiteringsresultatene skyldes at mini-tapen lettere festet til seg mer cellemateriale ved sporsikringen enn det bomullsvatten på vattpinnen gjorde. I tillegg er det mulig at mini-tapen lettere avga cellematerialet enn vattpinnen ved ekstraksjon.

Som beskrevet over var det liten forskjell i fordelingen av typeresultatene mellom de to sporsikringsmetodene. Dette kan skyldes at forsøkspersonene har avgitt så mye cellemateriale at de fleste prøvene, uavhengig av sporsikringsmetode, ga gode typeresultater. Likevel var det såpass store forskjeller i kvaliteten på prøvene at de videre kunne klassifiseres ut fra styrke. Hadde det imidlertid vært avsatt mindre cellemateriale (i dette tilfellet færre celler) på effektene ville det kanskje blitt observert større forskjeller i typeresultatene mellom de to sporsikringsmetodene.

5.2.3. Fordeler/ulemper ved sporsikring og ekstraksjon med mini-tape og vattpinne

Selve sporsikringen på de ulike tekstilene var enklest å gjennomføre med mini-tape. På grunn av friksjon ved avstryket satte vattpinnen seg lettere fast i tekstilets overflate, mens ved bruk av mini-tape slapp man dette da den kun skulle trykkes mot overflaten (ikke gnis). Ved overføring til eppendorfrør var imidlertid vattpinnen lettere å jobbe med da denne vanligvis ble klippet av i én del som kunne overføres rett til røret. Mini-tapen derimot måtte klippes opp i flere biter før den ble overført til røret. I tillegg hadde mini-tapen lettere for å bli statisk og var dermed vanskeligere å få ned i røret.

Ved ekstraksjon av både mini-tape og vattpinne ble Chelex-ekstraksjon benyttet. Da mini-tapen tok litt større plass i prøverøret måtte den tilsettes en litt større mengde Chelex (250 mL) enn vattpinnen (200 mL) for å dekke alt prøvematerialet. Ved ekstraksjon var både tapen og vattpinnen vanligvis like enkle å jobbe med, der både mini-tapen og vattpinnen av og til trengte en ekstra dytt med pipettespissen for å bli samlet langt nok ned i prøverøret. Denne ekstra dytten var imidlertid noe hyppigere for prøvene sikret med mini-tapen.

5.2.4. Kostnad

Kostnaden for mini-tapen og vattpinnen nevnes, selv om den ikke var avgjørende for valget av sporsikringsmetode.

Leverandøren av Scenesafe FAST™ har som tidligere nevnt ikke oppgitt noen eksakt pris per mini-tape. I rapport skrevet av Ansell er det oppgitt en pris tilsvarende ca. 4 nkr. [25]. Vattpinnene som brukes rutinemessig ved sporavdelingen koster ca. 0,4 nkr. Med utgangspunkt i disse prisene er sporsikring med mini-tape en dyrere metode en sporsikring med vattpinne.

Som tidligere nevnt koster det 1750 nkr. for en boks med Chelex som holder til tusenvis av prøver. Selv om ekstraksjon av mini-tapen krever en litt større mengde Chelex-løsning enn vattpinnen blir denne prisdifferansen minimal, og er ikke avgjørende for valget av sporsikringsmetode.

5.3. Eventuelle svakheter ved prosjektet

Ved planleggingen av prosjektets del 1 ble det bestemt å utføre sporsikringen på tre utvalgte tekstiltyper; t-skjorte i bomull, vanter i bomull og vanter i fleece. Disse tre tekstiltypene hadde noe ulike overflater, men utvalget kunne vært større og tekstilene kunne hatt mer varierende overflater. Da hensikten med denne delen av prosjektet kun var å sammenlikne ulike tapetyper og finne den tapetypen som totalt sett var best, uavhengig av tekstiltype, antas det derfor at et større utvalg av tekstiltyper og/eller andre typer tekstiloverflater ikke ville endret konklusjonen.

På samme måte ble det i prosjektets del 2 bestemt å utføre sporsikringen på tre utvalgte tekstiltyper; t-skjorte i bomull, caps i tettvevd bomull og svettebånd i bomull/nylon. Likeledes som i del 1 kunne utvalget vært større og tekstilene kunne hatt mer varierende overflater. Det antas at antallet og utvalget av tekstiltyper er representativt nok, og at et større utvalg av tekstiltyper og/eller andre typer tekstiloverflater ikke ville endret konklusjonen. Da det finnes utallige ulike tekstiltyper vil mini-tape, dersom den innføres som ny rutinesporsikringsmetode på tekstiler ved sporavdelingen, følges nøye opp for å få bekreftet over tid at denne metoden er bedre enn sporsikring med vattpinne, også i rutinen. Det vil jevnlig bli utført statistikker på suksessraten for prøvene sikret med mini-tape. Disse suksessratene vil bli sammenliknet med suksessratene for da vattpinne var rutinesporsikringsmetoden på tekstiler ved sporavdelingen. Samtidig må alle ansatte som sikrer prøver med mini-tape ved sporavdelingen følge med på resultatene og rapportere dersom det oppdages uvanligheter. Med tanke på overflaten til tekstiltypene det sikres fra må det også gjøres en vurdering før sporsikringen, der det vurderes

om sporsikring med vattpinne i noen tilfeller kan være mer hensiktsmessig enn sporsikring med mini-tape. Dette kan være ved sporsikring på tekstiler med store overflater (f.eks. laken) der limet på mini-tapen ikke holder til overflaten det skal sikres fra eller ved sporsikring på plagg med veldig rufsete overflate (eks. mohairgensere) slik at limet på tapen blir brukt opp for fort. På bakgrunn av dette antas antallet og typen tekstiler å være tilfredsstillende for sammenlikningen som ble utført i prosjektets del 2.

Det kan også settes spørsmålstegn rundt antallet og typen mini-taper og ekstraksjonsmetoder som ble sammenliknet, samt antallet forsøkspersoner som ble benyttet. Både for mini-tapene og ekstraksjonsmetodene ble det gjort et utvalg på bakgrunn av tidligere forsøk ved sporavdelingen, samt erfaringer fra andre europeiske fagmiljøer. Det antas derfor at det ikke ville blitt oppnådd signifikant bedre resultater dersom det hadde vært benyttet andre typer mini-tape eller ekstraksjonsmetoder. Når det gjelder antall forsøkspersoner ble det kun benyttet én forsøksperson i prosjektets del 1. Dette kan påvirke uavhengigheten mellom prøvene, og det er ikke mulig å korrigere for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ. Da det ble sikret relativt mange prøver med hver tapetype (totalt 30 prøver med hver), og da hensikten med denne delen av prosjektet kun var å avgjøre hvilken type mini-tape og hvilken type ekstraksjonsmetode som samlet ga best resultater, ble det vurdert at kun én forsøksperson var nok for dette formålet. Dersom antallet forsøkspersoner hadde vært høyere antas det ikke at konklusjonen rundt hvilken mini-tape og hvilken ekstraksjonsmetode som samlet sett ga best resultater ville endres. I del 2 ble det imidlertid benyttet ti forsøkspersoner slik at det ble større bredde i dataene de statistiske beregningene og vurderingene ble utført på. Denne bredden var viktig i del 2 da det ut fra resultatene skulle vurderes om sporsikring med mini-tape er en bedre egnet sporsikringsmetode enn vattpinne ved sikring av epitelceller fra tekstiler, og dermed burde implementeres i rutinen ved sporavdelingen. Ved å benytte flere forsøkspersoner ble det korrigert for eventuell avhengighet i observasjonene fra samme individ. Beregningene på kvantiteringsresultatene ble utført på alle prøvene sikret fra de ti forsøkspersonene. For typeresultatene for én av de ti personene fremkom det imidlertid for begge sporsikringsmetodene, for alle tre tekstiltypene, en betydelig mengde DNA av annen opprinnelse enn forsøkspersonen selv. Dette vanskeliggjorde vurderingen av tilstedeværelsen av forsøkspersonen i typeresultatene, og prøvene fra denne personen ble derfor ekskludert ved den videre resultatbehandlingen. Da dette kun gjaldt prøvene sikret fra denne ene personen (totalt 6 prøver), og resultatene for de øvrige ni forsøkspersonene var såpass entydige, antas ikke dette å påvirke resultatbehandlingen på typeresultatene i del 2 nok til å kunne endre konklusjonen i forhold til om prøvene fra denne ene forsøkspersonen kunne vært inkludert i beregningene.

Ved resultatbehandlingen kan et generelt problem oppstå når det brukes flere statistiske beregninger som gir flere p-verdier. Dette øker sjansen for falske funn. I denne oppgaven ligger imidlertid de sentrale p-verdiene nær null, og det utføres derfor ingen korreksjoner med tanke på eventuelle falske funn.

6. Konklusjon

Hovedmålet med dette prosjektet var å sammenlikne sporsikring med mini-tape og sporsikring med vattpinne ved sikring av epitelceller på tekstiler med ulike overflater. I første del av prosjektet ble det besluttet å videre bruke mini-tapen Scenesafe FAST™, som følge av brukervennligheten, med påfølgende Chelex-ekstraksjon, som følge av brukervennligheten, typeresultatene og pris. I andre delen ble det, på bakgrunn av i hovedsak typeresultatene, vurdert at sporsikring med mini-tape (Scenesafe FAST™) ekstrahert med Chelex er en bedre egnet sporsikringsmetode ved sikring av epitelceller fra tekstiler enn sporavdelingens rutinesporsikringsmetode som er vattpinne (Tubed Sterile Dryswab™ Wood Shaft) ekstrahert med Chelex.

På grunnlag av dette ble Scenesafe FAST™ ekstrahert med Chelex fra og med 16. desember 2013 innført som ny rutinesporsikringsmetode ved Avdeling for biologiske spor ved sikring av epitelceller fra tekstiler. Mini-tapen har primært erstattet dagens vattpinneavstryk, men det må vurderes ut fra tekstilets størrelse og overflate om vattpinneavstryk i enkelttilfeller kan være mer hensiktsmessig.

Det bør videre gjennomføres flere forsøk for å undersøke om sporsikring med mini-tape kan gi bedre resultater enn vattpinneavstryk på andre typer materialer (eks. harde gjenstander som skrutrekkere, hammere etc.) og celletyper (eks. sæd, blod etc.).

7. Litteraturliste

1 Barash, M., Reshef, A., Brauner, P., The use of adhesive tape for recovery of DNA from crime scene items, *Journal of forensic sciences* 2010, 55, 1058-1064.

2 Hall D., Fairley M., A single approach to the recovery of DNA and firearm discharge residue evidence, *Science and Justice*, Vol 44, No. 1 *(*2004), s. 15-19.

3 Hansson, O., Finnebraaten, M., Heitmann, I.K., Ramse, M., Bouzga, M., Trace DNA collection—Performance of minitape and three different swabs, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2009, 189-190.

4 Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques 30th Anniversary Gem* 2013, Vol 54, s. 134-139. (Reprinted from *BioTechniques* 10(4): 506-513 (April 1991).

5 Greenspoon, S.A., Scarpetta, M.A., Drayton, M.L., Turek, S.A., QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework, *Journal of forensic sciences* 1998, 43, 1024-1030.

6 Butler, J.M., 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing:* Methodology, Academic press, s. 29-33.

7 Qiagen sin hjemmeside: http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/QIAamp-dna-mini-kit#productdetails

8 Quantifiler® Duo DNA Quantification kit user's manual, Life Technologies Corporation, Applied Biosystems, 2012.

9 ABI 7500 (for Software Version 13:0) technical note, SA Bioscienses™.

10 Butler, J.M., 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing:* Methodology, Academic press, s. 49-50.

11 Butler, J.M., 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing:* Methodology, Academic press, s. 55-58.

12 PowerPlex® ESX 17 System technical manual, Promega Corporation, USA, 2013.

13 Butler, J.M., 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*, Academic press, s. 71.

14 Butler, J.M, 2005, *Forensic DNA typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, Second edition, Academic press, s. 127-129.

15 Butler, J.M, 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology, Academic press, s. 99-101.*

16 Butler, J.M, 2005, *Forensic DNA typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, Second edition, Academic press, s. 23-24.

17 Butler, J.M., 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*, Academic press, s. 141-152.

18 Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 36.

19 Montgomery, D.C., 2009, *Design and Analysis of Experiments*, 7th edition, Wiley, s. 25-26.

20 Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 324-328.

21 Montgomery, D.C., 2009, *Design and Analysis of Experiments*, 7th edition, Wiley, s. 505-507.

22 Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 334-341.

23 Store Norske Leksikon sin hjemmeside: http://snl.no/binomisk_fordeling

24 Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 158.

25 Ansell, R. *Adhesive mini-tapes for recovery of forensic DNA traces – a small inventory* (2010).

8. Appendix

Appendix 1: Eksempel 1 - Fremgangsmåte ved beregning med ANOVA.....67
Appendix 2: Eksempel 2 - Fremgangsmåte ved beregning med kjikvadrattesten 69
Appendix 3: Fremgangsmåte for tillaging av 5 % Chelex-løsning 71
Appendix 4: Fremgangsmåte for tillaging av 1M DTT-løsning.....72
Appendix 5: Fremgangsmåte for tillaging TE-buffer, pH 8,0 73
Appendix 6: Fremgangsmåte for tillaging av standardrekke for DNA-kvantitering.....74

Appendix 1: Eksempel 1 - Fremgangsmåte ved beregning med ANOVA

Vi vil sammenlikne slitestyrken til to ulike motorsykkeldekk fra to ulike produsenter. Dekkene skal testes på fem ulike motorsykler, der hver sykkel blir utstyrt med ett dekk av hver type. Dekkene skal brukes over en firemåneders periode. Dekkslitasjen (målt i mm) etter fire måneder er gitt i tabell 1.

Tabell 1: Dekkslitasjen (målt i mm) etter fire måneder.

Dekknr.	Motorsykkelnr. (blokknr.)					
(gruppenr.)	1	2	3	4	5	Gj.snitt
1	1,20	1,43	1,90	1,74	1,87	1,628
2	1,32	1,57	2,00	1,72	2,05	1,732
Gj.snitt	1,26	1,50	1,95	1,73	1,96	1,68

For å beregne F-verdiene til dekkene må først de ulike kvadratsummene beregnes, der; SS_{total} (fra engelsk; *total sum of* squares) er summen av kvadratene mellom observasjonene og det totale gjennomsnittet, se likning 2. SS_{dekk} og $SS_{motorsykkel}$ er summen av kvadratene mellom dekk-/motorsykkelgjennomsnittene og det totale gjennomsnittet, der SS_{dekk} er kvadratsummen for variasjon forårsaket av dekktype, se likning 3, og $SS_{motorsykkel}$ er kvadratsummen for variasjon forårsaket av motorsyklene, se likning 4.

(2) $$SS_{total} = \sum\sum\left(\bar{y}_{ij} - \bar{y}\right)^2 = (1{,}20 - 1{,}68)^2 + (1{,}43 - 1{,}68)^2 + \cdots + (1{,}72 - 1{,}68)^2 + (2{,}05 - 1{,}68)^2 = 0{,}76360$$

(3) $$SS_{dekk} = n_{motorsykkel}\sum(\bar{y}_i - \bar{y})^2 = 5\left((1{,}628 - 1{,}68)^2 + (1{,}732 - 1{,}68^2)\right) = 0{,}02704$$

(4) $$SS_{motorsykkel} = n_{dekk}\sum\left(\bar{y}_j - \bar{y}\right)^2 = 2((1{,}26 - 1{,}68)^2 + (1{,}50 - 1{,}68)^2 + (1{,}95 - 1{,}68)^2 + (1{,}73 - 1{,}68)^2 + (1{,}96 - 1{,}68)^2) = 0{,}72520$$

Sammenhengen mellom disse kvadratsummene og SS_{error} er gitt i likning 5.

(5) $$SS_{total} = SS_{dekk} + SS_{motorsykkel} + SS_{error}$$

SS_{error} (fra engelsk; *error sum of* squares) er kvadratsummen for variasjon forårsaket av tilfeldigheter mellom gruppene, se likning 6.

(6) $$SS_{error} = SS_{total} - SS_{motorsykkel} - SS_{dekk} = 0{,}01136$$

For å kunne beregne F-verdiene, benyttes kvadratsummene videre for å beregne variansene delt på frihetsgrader (eng. ”mean sum of squares”, MS), se likningene 7-9.

(7) $$MS_{dekk} = \frac{SS_{dekk}}{n_{dekk}-1} = \frac{0{,}02704}{2-1} = 0{,}02704$$

(8) $$MS_{motorsykkel} = \frac{SS_{motorsykkel}}{n_{motorsykkel}-1} = \frac{0{,}72520}{5-1} = 0{,}18130$$

(9) $$MS_{error} = \frac{SS_{error}}{(n_{dekk}-1)(n_{motorsykkel}-1)} = \frac{0{,}01136}{4} = 0{,}00284$$

Deretter benyttes MS for å beregne F-verdien til henholdsvis dekktype og motorsykkel, se likningene 10-11.

(10) $$F_{dekk} = \frac{S^2_{dekk}}{S^2_{error}} = \frac{0{,}02704}{0{,}00284} = 9{,}52$$

(11) $$F_{motorsykkel} = \frac{S^2_{motorsykkel}}{S^2_{error}} = \frac{0{,}18130}{0{,}00284} = 63{,}84$$

Da vi har ti observasjoner og F>5 i begge tilfellene kan nullhypotesen forkastes og det er signifikante forskjeller i slitasjen på de to ulike dekktypene og på de ulike motorsyklene [a].

Dersom statistikkprogrammet ”R Commander” benyttes oppgir programmet en p-verdi for hver av gruppene (dekktype/motorsykkel) i tillegg til verdiene beregnet i dette eksempelet. De beregnede verdiene kan enkelt fremstilles i en såkalt ANOVA-tabell, se tabell 2.

Tabell 2: Beregnede verdier ved variansanalyse med bruk av ANOVA i ”R Commander”.

	SS	Frihetsgrader	MS	F-verdi	p-verdi
Dekktype	0,02704	1	0,02704	9,52	0,03673
Motorsykkel	0,72520	4	0,18130	63,84	0,00071
Error	0,01136	$(n_{dekk}-1)(n_{motorsykkel}-1)=4$	0,00284		

Ved et 5 % signifikansnivå (α=0,05) kan nullhypotesen forkastes dersom p-verdien er lavere enn 0,05.

[a] Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 324-328.

Appendix 2: Eksempel 2 - Fremgangsmåte ved bruk av kjikvadrattesten.

Vi vil undersøke om det er sammenheng mellom ulike bilmerker og antall bilulykker i Norge. Vi vil se på tre ulike bilmerker, angitt som A, B og C, over en ettårs periode, der alvorlighetsgradene på bilulykkene kategoriseres etter; dødsfall, alvorlige skader og lettere skader. De innhentede dataene oppsummeres i en såkalt krysstabell, se tabell 3.

Tabell 3: Alvorlighetsgrad på bilulykker kontrollert for bilmerke, samt beregnede prosenter.

		Alvorlighetsgrad			
		Dødsfall	Alvorlige skader	Lettere skader	Rad total
Bil merke	A	11 (4,4 %)	19 (7,5 %)	43 (17,1 %)	73 (29,0 %)
	B	17 (6,7 %)	21 (8,3 %)	42 (16,7 %)	80 (31,7 %)
	C	22 (8,7 %)	28 (11,1 %)	49 (19,4 %)	99 (39,3 %)
Kolonne total		50 (19,8 %)	68 (27,0 %)	134 (53,2 %)	252 (100,0 %)

For å finne den totale x^2-verdien må det beregnes en x^2-verdi for hvert observerte resultat, se likning 12.

(12) $$x^2 = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{k}\frac{\left(X_{ij}-E_{ij}\right)^2}{E_{ij}} = \sum_{alle\ celler}\frac{(observert-forventet)^2}{forventet}$$

Den forventede verdien er gitt i likning 13.

(13) $$(forventet) = \frac{(rad\ total \cdot kolonne\ total)}{summen\ av\ rad/kolonne\ total}$$

De beregnede x^2-verdiene for hvert observerte resultat er angitt i tabell 4, der de forventede verdiene er oppgitt i parentes [b].

Tabell 4: x^2-verdiene for alvorlighetsgrad korrigert for bilmerke, der de forventede verdiene er oppgitt i parentes.

		Alvorlighetsgrad		
		Dødsfall	Alvorlige skader	Lettere skader
Bil merke	A	0,84 (14,48)	0,02 (19,70)	0,45 (38,82)
	B	0,08 (15,87)	0,02 (21,59)	0,01 (42,54)
	C	0,28 (19,64)	0,06 (26,71)	0,25 (52,64)

[b] Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 342-344.

x^2-verdiene summeres, og vi får en total x^2 = 2,01 med antall frihetsgrader = (antall rader-1)*(antall kolonner-1) = (3-1)(3-1) = 4. x^2-verdien sammenliknes med en tabell over oppgitte x^2-verdier, se tabell 5.

Tabell 5: Utdrag fra kjikvadratfordelingens kvantiltabell [c].

α / (n-1)	0,050	0,025	0,010	0,005
1	3,84	5,02	6,63	7,88
2	5,99	7,38	9,21	10,60
3	7,81	9,35	11,34	12,84
4	9,49	11,14	13,28	14,86
5	11,07	12,83	15,09	16,75

Ut fra tabell 5 er den oppgitte x^2 = 9,49 ved et 5 % signifikansnivå (α = 0,05) med 4 frihetsgrader. Da den beregnede x^2 er lavere enn dette kan nullhypotesen ikke forkastes, og det er ingen signifikante forskjeller mellom antall bilulykker og bilmerke.

[c] Løvås, G.G., 2005, *Statistikk for universiteter og høgskoler*, 2. Utgave, Universitetsforlaget, s. 485.

Appendix 3: Fremgangsmåte for tillaging av 5 % Chelex-løsning

Materialer

- Autoklavert flaske med magnetrører
- Vekt
- Magnetrører
- Pipetter
- Stripetter
- pH-papir

Reagenser

- Chelex® 100 Resin
- Autoklavert Milli-Q vann

Metode

1. Vei opp 15 g Chelex i en flaske med magnetrører.
2. Tilsett 75 mL autoklaver Milli-Q vann og bland løsningen forsiktig på magnetrører i ca. 30 sekunder.
3. La Chelex synke til bunnen, og avpippeter supernatanten med stripette. Supernatanten kastes.
4. Tilsett autoklavert Milli-Q vann opp til 75 mL, og gjenta vaskeprosessen 2 ganger.
5. Mål pH ved hjelp av pH-indikator strips. Det er viktig for ekstraksjonen at pH er mellom 9-11. Mål aldri oppi flasken pga. kontamineringsfaren.
6. Sett flasken med den tillagede Chelex-løsningen (20 %) på magnetrører.
7. Tilsett 37,5 mL autoklavert Milli-Q vann og 12,5 mL 20 % Chelex-løsning til en ny flaske med magnetrører.
8. Mål pH ved hjelp av pH-indikator strips. Det er viktig for ekstraksjonen at pH er mellom 9-11. Mål aldri oppi flasken pga. kontamineringsfaren.

Viktig: På grunn av kontamineringsfaren bør både 5 % og 20 % Chelex-løsning kun brukes i en uke fra den datoen flasken er åpnet. Løsningene må oppbevares i kjøleskap.

Appendix 4: Fremgangsmåte for tillaging av 1M DTT-løsning

Materialer

- Autoklaverte rør
- Magnetrører
- 100 mL målekolbe
- Vekt
- Pipette
- Begerglass
- 15 mL engangsrør

Reagenser

- DTT (Dithiothreitol)
- Natriumacetat-Trihydrat
- Eddiksyre 100 %
- Autoklavert Milli-Q vann
- Autoklavert deionisert vann

Metode

1. Overfør 80 mL autoklavert Milli-Q vann til et begerglass med magnet.
2. Tilsett 13,6 g Natriumacetat-Trihydrat og bland på magnetrører.
3. Juster pH til 5,2 med eddiksyre (ca. 2 mL).
4. Hell over på en 100 mL målekolbe, og tilsett Milli-Q vann opp til 100 mL.
5. Løsningen (1 M natriumacetat, pH 5,2) fordeles i 15 mL engangsrør.
6. Overfør 250 mg DTT til et nytt begerglass, og løs det i 1620 µL deionisert vann.
7. Tilsett 16 µL av den tillagede natrium acetat-løsningen.
8. Løsningen fordeles i autoklaverte rør og oppbevares i ÷20°C.

Viktig: DTT er farlig ved inntak og lokalirriterende ved innånding og hudkontakt. Bruk hansker og vekt i avtrekkskap. Fordelt DTT er holdbart i 3 mnd.

Appendix 5: Fremgangsmåte for tillaging TE-buffer, pH 8,0

Materialer

- Pipetter
- Begerglass
- Flaske

Reagenser

- Tris-HCl eller Trizma-HCl, 1 M pH 8,0
- EDTA, 0,5 M (Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt solution)
- Milli-Q vann

Metode

1. 990 mL Milli-Q vann overføres til et begerglass.
2. Tilsett 10 mL Tris-HCl og 0,2 mL EDTA, og bland.
3. Løsningen fordeles i flasker og autoklaveres.

Oppbevares i romtemperatur eller i kjøleskap.

Appendix 6: Fremgangsmåte for tillaging av standardrekke for DNA-kvantitering

Materialer

- 1,5 mL eppendorfsrør
- Mikrosentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5430
- Vortexer, Lab dancer VWR
- Pipetter
- Filterspisser
- LAF benk

Reagenser

- Quantifiler®Duo DNA Dilution Buffer
- Quantifiler®Duo DNA standard 200 ng/µL

Metode

1. Finn frem Quantifiler®Duo DNA Dilution Buffer og Quantifiler®Duo DNA standard fra kjøleskapet og tin de helt før bruk.
2. Merk 8 eppendorfsrør til standardene: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
3. Bland Quantifiler®Duo DNA Dilution Buffer på vortexer og sentrifuger kort.
4. Fordel buffer til eppendorfrørene i henhold til tabell 6 side 75.
5. Bland Quantifiler®Duo DNA standard på vortexer og sentrifuger kort.
6. Pipetter 100 µL Quantifiler®Duo DNA standard til røret som er merket 1 (standard 1).
7. Bland standard 1 på vortexer og sentrifuger kort.
8. Tilsett 400 µL fra standard 1 til rør merket 2 (standard 2).
9. Bland standard 2 på vortexer og sentrifuger kort før neste standard i rekken fortynnes.
10. Lag fortynningsrekken videre i henhold til tabell 6 side 75, og oppbevar den i fryser.

Tabell 6: Oppgitte volumer som skal tilsettes de ulike standardene for å oppnå ønsket konsentrasjonen ved tillaging av standardrekke for DNA-kvantitering.

Standard	Kons. (ng/µL)	Volumer for fortynning	Faktor
Std. 1	16,700	100 µL [200 ng/µL Quantifiler Duo DNA standard] + 1100 µL dilution buffer	12x
Std. 2	5,560	400 µL [Std.1] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 3	1,850	400 µL [Std.2] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 4	0,620	400 µL [Std.3] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 5	0,210	400 µL [Std.4] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 6	0,068	400 µL [Std.5] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 7	0,023	400 µL [Std.6] + 800 µL dilution buffer	3x
Std. 8	0,0115	400 µL [Std.7] + 400 µL dilution buffer	2x

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no