

# DNA:n saannon optimointi ammuttujen messinkihylsyjen pinnalta

Erika Ojala

Pro gradu -tutkielma  
Oulun yliopisto  
Biologian tutkinto-ohjelma  
Huhtikuu 2024

## Tiivistelmä

Vuonna 2018 Keskusrikospoliisi tutki 32000 rikospaikoilta kerättyä DNA-näytettä. Toisinaan rikostutkimuksissa DNA-näytteitä saatetaan tutkia ampuma-aseiden hylsyistä, jotka on useimmiten valmistettu messingistä. Messingin sisältämän kuparin ja sinkin on epäilty mahdollisesti vaurioittavan DNA:ta ja inhiboivan DNA:n monistukseen käytettyä polymeerasiketjureaktiota. Myös aseiden laukeamisessa syntyvä kuumuus ja paine voivat vaikuttaa negatiivisesti DNA:n määrään hylsyn pinnalla. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää parantavatko vaihtoehtoiset menetelmät DNA:n saantoa ja DNA-tunnisteita ammutuista messinkihylsyistä. Ampumattomien 9mm patruunoiden pinnalle pipetoitiin 5 µl vapaaehtoisen henkilön posken limakalvoilta kerättyä DNA:ta laimennettuna. Sama vapaaehtoinen latasi patruunat paljain käsin lippaisiin DNA:n lisäyksen jälkeen. Ammunnat suoritettiin asetukijan toimesta Keskusrikospoliisin ampumaradalla. Hylsyjen pinnalta taltioitiin DNA:ta viskoosipuikoilla ja nylonnukatuilla puikoilla. Taltiointipuskurina käytettiin puhdasta vettä, 0,9-prosenttista NaCl-liuosta tai BTmixiä. Jälkimmäinen on BSA:n (engl. bovine serum albumin) ja GGH:n (Gly-Gly-His-tripeptidi) yhdistelmä. DNA:n eristykseen käytettiin EZ1 investigator kittiä EZ1 Advanced XL -laitteella tai Casework Direct -suoraeristystä. Eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin kaupallisella kitillä ja monistettiin polymeerasiketjureaktion avulla mikrosatelliittilokuksia monistavalla kitillä. Monistetun DNA:n alleelit jaoteltiin kapillaarielektroforeesissa 3500xL Genetic Analyzer -laitteistolla lokuksittain vertailtavan tunnisteiden määrittämiseksi, jota verrattiin vapaaehtoisen tunnisteeseen. Suurimman DNA:n saannon antoivat nylonnukatut puikot NaCl kanssa käytettynä ja eristettynä CWD-menetelmällä. Tuloksia saannon osalta voi selittää nylonnukattujen puikkojen avoin rakenne, joka estää epiteelisolujen imeytymisen puikon sisään. Parhaat DNA-tunnisteet antoivat nylonnukatut puikot, kun taltiointiin käytettiin BTmixiä ja näytteet eristettiin EZ1-menetelmällä. Eroja tunnisteissa voi selittää BTmixin metalleja ja epäpuhtauksia kelatoiva vaikutus sekä EZ1 Advanced XL -laitteiston DNA:ta puhdistava eristystekniikka. Vaihtoehtoisten menetelmien ansiosta DNA:n saanto ja määritetyt tunnisteet parantuivat verrattuna viskoosipuikon ja veden yhdistelmään.

# Sisällysluettelo

<b>1. Johdanto .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Aineisto ja menetelmät.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Koeala .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Aineisto.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Menetelmät .....</b>	<b>10</b>
<u>2.3.1 Taltiointipuskurien valmistus.....</u>	<u>10</u>
<u>2.3.2 DNA-näytteiden taltiointi .....</u>	<u>11</u>
<u>2.3.3 DNA:n eristys .....</u>	<u>14</u>
<u>2.3.4 DNA:n kvantifiointi.....</u>	<u>15</u>
<u>2.3.5 DNA:n monistus .....</u>	<u>17</u>
<u>2.3.6 DNA:n erottelu kapillaarielektroforeesilla .....</u>	<u>18</u>
<u>2.3.7 Aineiston analysointi .....</u>	<u>20</u>
<b>3. Tulokset.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Pohdinta .....</b>	<b>28</b>
<b>5. Yhteenveto .....</b>	<b>34</b>
<b>6. Kiitokset.....</b>	<b>35</b>
<b>7. Kirjallisuus .....</b>	<b>36</b>
<b>Liite 1. Parittainen Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi menetelmille</b>	<b>41</b>
<b>Liite 2. Menetelmien onnistumisprosenttien ominaisuuksien yhteenveto...</b>	<b>42</b>

## 1. Johdanto

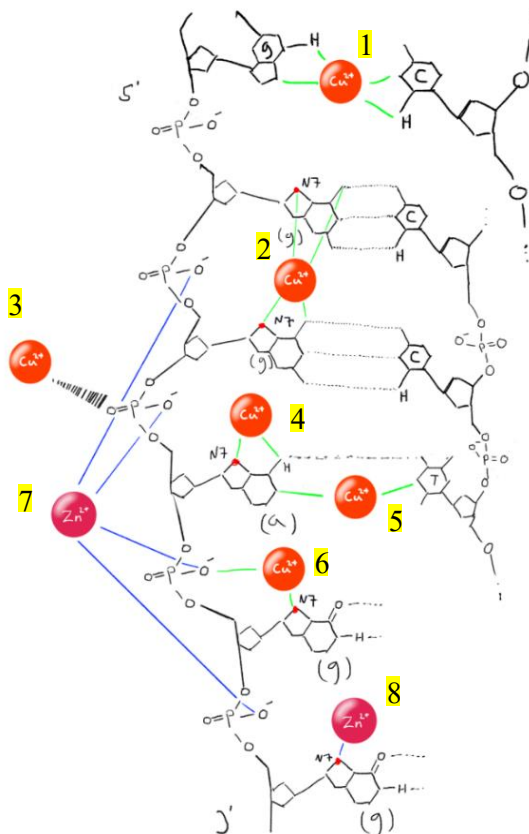
DNA:n käyttö todisteena rikostutkimusten osana alkoi 1980-luvun puolivälissä, kun Sir Alec Jeffreys kehitti ensimmäisen DNA:ta hyödyntävän menetelmän henkilötunnisteen luomiseksi vuonna 1985 (Butler, 2005a, s. 2–3). Jeffreysin menetelmä käytti multi-lokus RFLP (restriction fragment length polymorphism) koettimia yksilöllisten toistuvien tandemjaksojen erittelyyn DNA:sta (Butler, 2005a, s. 2–3). Butlerin (2005a) mukaan ratkaisevaksi todisteeksi rikostutkinnassa DNA nousi ensimmäistä kertaa 1986 Lynda Mannin ja Dawn Ashworthin henkirikosten tutkinnassa. Mannin ja Ashworthin epäiltiin joutuneen saman henkilön uhreiksi vuosina 1983 ja 1986 Narborough'n kylässä Englannissa. Rikosten tekijäksi ilmoitettiin paikallinen mies, joka ei kuitenkaan sopinut saatavilla olevaan todistusaineistoon. Englannin poliisi päätti kokeilla DNA:n käyttöä todisteena keräämällä verinäytteet kolmen paikallisen kylän miehiltä ja vertaamalla niistä saatuja tunnisteita rikospaikalta löytyneisiin siemennestetahroihin. Yksikään näytteistä ei vastannut rikospaikalta löytynyttä, mutta sattuman kautta poliisi sai tietää yhden henkilöstä huijanneen seulonnoissa. Poliisi otti yhteyttä henkilöön, jolta kerättiin uusi verinäyte. Näytteen tunniste vastasi rikospaikalta löytynyttä, jonka seurauksena kyseinen henkilö tuomittiin kahdesta murhasta elinkautiseen vankeusrangaistukseen. Tämä oli ensimmäinen kerta, jolloin DNA:ta käytettiin onnistuneesti näyttönä rikostutkinnassa. Samalla estettiin väärä tuomio tutkinnan alussa annetun aiheettoman tunnustuksen takia (s. 3).

Suomessa DNA:n käyttö todisteena alkoi yleistyä 1990-luvun alusta, kun Leena Palotien johdolla Kansanterveyslaitoksen molekyyli-genetiikan laboratoriossa aloitettiin polymeraasiketjureaktioon (jäljempänä PCR) pohjautuvan menetelmän kehitystyö DNA:n käyttämiseksi oikeusgeneettisissä tutkimuksissa (Sajantila, 2010). Rikostutkimuksissa PCR-reaktion pohjalta kehitetyt menetelmät otettiin rutiinikäyttöön vuoden 1991 alkupuolella ja uudistuneen pakkokeinolain myötä luodun DNA-tunnisteen tallennus Keskusrikospoliisin rekisteriin mahdollistui heinäkuussa 1997 (Sajantila, 2010). DNA:n käyttö todisteena rikospaikkatutkinnassa on vuosien varrella entisestään yleistynyt ja vuonna 2018 Suomessa DNA-tutkimuksiin liittyviä toimeksiantoja saapui Keskusrikospoliisille 12462 kappaletta. Kokonaisuudessaan vuonna 2018 tutkittiin 32000 rikospaikoilta kerättyä DNA-näytettä. Näiden lisäksi Keskusrikospoliisi tutkii henkilörekisterinäytteitä, joita vuonna 2018 tutkittiin yli 12000 kappaletta (Keskusrikospoliisi, 2018).

Vaikka DNA-tutkimuksista on tullut rutiininomainen osa rikostutkintaa, ovat jotkin näytetyypit edelleen haastavampia kuin toiset. Yksi näistä on rikospaikoilta tavatut ampumaseiden hylsy. Hylsy ovat haastava kohde DNA-tutkimuksille, sillä ammutuista hylsyistä

saadaan harvoin vertailukelpoista DNA-tunnistetta (Bille et al., 2020). Ongelmat tunnisteiden määrittämisessä johtuvat metallien DNA:ta vaurioittavasta ja DNA:n monistusta inhiboivasta vaikutuksesta. Erityisen vaikeiksi ovat osoittautuneet ampuma-aseiden hylsytyt, jotka on valmistettu messingistä. Messinki on kuparin ja sinkin metalliseos ja hylsyjen valmistusmateriaaleista yleisin (National Institute of Justice, 2023a). Muiden metallien ja messingin välillä on osoitettu olevan selkeä ero, kun tuloksia messinkihylsyistä verrattiin alumiinista (Holland et al., 2019) tai nikkelistä (Elwick et al., 2022) valmistettuihin hylsyihin.

Messingin sisältämän kuparin on havaittu vaurioittavan DNA:ta (Aruoma et al., 1991; Bolognesi et al., 1999; Moreno & McCord, 2017). Kuparin ionien ( $\text{Cu}^{2+}$ ) on myös ehdotettu muodostavan hydroksyyliiradikaaleja ( $\cdot\text{OH}$ ) niiden sitoutuessa DNA:han (Aruoma et al., 1991). Kupari-ionien sitoutumisen DNA:han (kuva 1) on havaittu tehostuvan DNA:n denaturoitussa yksijuosteiseksi sekä aiheuttavan itse DNA:n kemikaalista denaturaatiota sitoutumalla emäsryhmiin (Govindaraju et al., 2013).



Kuva 1: Kupari- ja sinkki-ionien mahdolliset sitoutumisalueet DNA:ssa. Kuparin muodostamat sidokset 1–6: 1) kuparin sidos glykosidisidoksen ympäri kääntyneen guaniinin ja vastejuosteen sytosiinin välillä, 2) kuparin sidos kahden perättäisen guaniinin N7 ja O6 positioiden välillä, 3) kuparin ja fosfaattiryhmän hapen välinen sidos, 4) kuparin sidos adeniinin N7 ja O6 positioiden välillä, 5) kuparin sidos adeniinin N1 position ja vastejuosteen tyymiinin N3 position välillä, 6) kuparin guaniinin N7 ja fosfaattiryhmän hapen välinen sidos (Andrushchenko et al., 2003). Sinkin muodostamat sidokset 7–8: 7) sinkin ja neljän fosfaattiryhmän hapen välinen sidos, 8) sinkin ja guaniinin N7 position välinen sidos (Anastassopoulou, 2003).

Denaturaation seurauksena syntynyt yksijuosteinen DNA sekä kupari-ionien hapetus-pelkistysominaisuudet luovat edellytykset vaurioita aiheuttavien reaktiivisten happilajien (engl. reactive oxygen species, ROS) muodostumiselle (Bonsu et al., 2020). Kuparin on DNA:n vaurioittamisen ohella osoitettu haittaavan DNA:n monistusta PCR:llä inhiboimalla siinä käytettyjä polymeerasientsyymejä (Kuffel et al., 2021) sekä muodostamalla DNA:han ristsidoksia (Nackerdien et al., 1991).

Kuparin ohella messingin sisältämän sinkin on osoitettu inhiboivan käytettäviä polymeerasientsyymejä sekä havaitun inhibition olevan pienemmillä pitoisuuksilla voimakkaampaa kuin kuparilla (Kuffel et al., 2021). Sinkin läsnäolon on myös ehdotettu entisestään lisäävän DNA:n vaurioita messinkiammusten pinnalla (Czado et al., 2022) johtuen sinkki-ionien ( $Zn^{2+}$ ) sitoutumisesta DNA:ssa eri alueeseen kuin kuparin (kuva 1). Metalliseosten valmistajakohtaisista eroista huolimatta messingistä valmistetut hylsyvät aina sisällään kuparia ja sinkkiä. Messinki materiaalina on halpa ja kestävä, minkä takia monet ammusvalmistajat suosivat sitä.

Hylsyjen metallien lisäksi aseiden laukeamisessa syntyvä kuumuus (Prasad et al., 2022) sekä ruudin palamisesta johtuvat savukaasut (Jansson et al., 2020) ja paine (Mawlood et al., 2015) voivat vaikuttaa negatiivisesti DNA:n saantoon, sillä DNA:n määrän ammuttujen hylsyjen pinnalta on osoitettu olleen 34 % pienempi kuin ampumattomien patruunoiden pinnalta (Elwick et al., 2022).

Ampuma-aseiden hylsyistä taltioitavan DNA:n määrään ja laatuun vaikuttaa useita tekijöitä, joten on ymmärrettävää, että ammuttuja hylsyjä ei kaikkialla tutkita rutiininomaisesti DNA:n varalta (Bille et al., 2020). Mikäli hylsyt kuitenkin läpikäyvät DNA-tutkimukset, voidaan onnistuneesti taltioidusta DNA:sta muodostaa tunniste 2–7 emäsparin (engl. base pair, jäljempänä bp) mittaisen ei-koodaavien lyhyiden tandem-toistojaksojen (engl. short tandem repeat, jäljempänä STR) analyysin avulla (engl. STR analysis) (Butler, 2012). Lyhyet tandemtoistojaksot tunnetaan myös nimellä mikrosatelliitit. DNA-tunnisteen määrittämiseen käytetyissä STR-lokuksissa esiintyy yksilöiden välillä suuria eroja toistojaksojen määrien osalta (National Institute of Justice, 2011). Käytetyt lokukset on valikoitu myös niin, ettei niistä käy ilmi yksilön ilmiäsuun vaikuttavia tekijöitä (Yang et al., 2022). Luotua yksilöllistä tunnistetta voidaan käyttää todisteena rikostutkimuksissa vertaamalla sitä aiemmin määritettyihin.

Vaikka käytetyt kaupalliset PCR-kitit monistavat lyhyitä ja keskipitkiä STR-lokuksia, analysoitujen alleelien määrä ei välttämättä täytä laboratorion vaatimuksia vertailukelpoisesta tunnisteesta (Jansson et al., 2020; Montpetit & O'Donnell 2015; Prasad et al., 2022). STR-

lokuksia monistaessa pitkät PCR-tuotteet putoavat DNA:n degradaation takia pois ensimmäisenä analysoitavasta tunnisteesta (Uzair et al., 2017). Tämän takia hylsyistä taltioitua DNA:ta monistaessa monistuvien tuotteiden koko olisi hyvä huomioida, kun valitaan käytettävää PCR-kittiä. Vaurioituneelle ja määrältään pienemmälle DNA:lle on suositeltu käytettäväksi pienelle saannolle tarkoitettua PCR-kittiä (Lopes et al., 2009; Montpetit & O'Donnell, 2015; Uzair et al., 2017). Rikosteknisten laboratorioiden käyttämät PCR-kitit seuraavat STR-lokusten osalta suosituksia kansainvälisiltä organisaatioilta kuten ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) (ENFSI, 2016). Monet suositusten mukaiset kitit ovat niin kutsuttuja multiplex-kittejä (Welch et al., 2012), jotka monistavat samanaikaisesti useita erimittaisia lokuksia (Butler, 2005b). Multiplex-kitit pitävät sisällään siis myös lyhyitä lokuksia. Esimerkiksi Promegan PowerPlex ESX 17 multiplex-kitin ENFSIn suositusten mukaisiin lyhyisiin lokuksiin (Gill et al., 2006) kuuluvat erityisen lyhyet mini-STR lokukset (< 150 bp) D2S441, D10S1248 ja D22S1045 sekä keskipitkät midi-STR lokukset (< 250 bp) D1S1656 ja D12S391 (Tucker et al., 2012).

Kuparin ja sinkin aiheuttamien DNA:n degradaation ja PCR:n inhibition ehkäisemiseksi sekä saannon parantamiseksi on kehitetty useita ratkaisuja. Monet niistä liittyvät käytettyihin taltiointimenetelmiin ja puskureihin. Tavanomaisimmin rikostekniset laboratoriot käyttävät DNA-näytteiden taltiointiin pumpuli- (Hedman et al., 2021; Moore et al., 2021) tai viskoosipuikkoja (Bonsu et al., 2021; Prasad et al., 2022) veteen kastettuna. Erityisesti pumpulipuikot ovat olleet pitkään tärkeä osa rikostutkimuksia niiden halvan hinnan ja monikäyttöisyyden takia (Hedman et al., 2021). Kyseinen kiedotun kuitupuikon (engl. wound fiber swab) ja veden taltiointitapa on kuitenkin osoittautunut ilmeisen puutteelliseksi messinkihylsyjen kohdalla (Holland et al., 2019; Prasad et al., 2020; Prasad et al., 2022).

Muita käytettyjä menetelmiä DNA:n taltiointiin hylsyistä ovat muun muassa DNA-näyteteippi, jonka avulla DNA taltioidaan teipin liimapintaa käyttäen (Prasad et al., 2020; Prasad et al., 2022); suora-PCR (engl. direct PCR), jossa taltioitu näyte siirretään sellaiseen PCR:ään DNA:n hävikin minimoimiseksi (Templeton et al., 2015); näytteen upotus suoraan solujen hajotuksessa (jäljempänä lyysaus) käytettyyn puskuriin (Moore et al., 2021; Prasad et al., 2022); sekä näytteen huuhtelu ja penslaus (Bille et al., 2020), jossa näytteen huuhdeltu pinta käydään läpi kuivalla taltiointipuikolla.

Kuvatuista taltiointimenetelmistä ammuttujen ja ampumattomien hylsyjen pinnalta steriiliä 3M DNA-teippiä (Lovell Surgical Solutions) käytävä taltiointitapa (engl. tape lifting) sekä hylsyn upottaminen lyysauksessa käytettävään ATL-puskuriin (QIAGEN) ja sitä seuraava penslaus Copanin viskoosipuikolla (engl. soaking) ovat antaneet lupaavia tuloksia (Prasad et

al., 2022). Tape lifting- ja soaking-taltiointitavat antoivat enemmän DNA:ta kuin pelkkä näytteen penslaaminen viskoosipuikoilla (Medical Wire & Equipment) ja steriilillä vedellä. Tape lifting- ja soaking-metodien välillä itsessään ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (Prasad et al., 2022). Tape lifting -metodilla saatujen tulosten syyksi on esitetty PCR-inhibiittorien pienempää määrää taltioiduissa näytteissä (Prasad et al., 2022) sekä metallien ja DNA:n vuorovaikutusta helpottavan taltiointinesteen puuttumista (Prasad et al., 2020).

Myös vaihtoehtoisten puikkojen käytön on osoitettu antavan parempia tuloksia taltioitaessa näytteitä messinkihylsyistä (Jansson et al., 2020) tai messingin pinnalta (Bonsu et al., 2021) kuin pumpulipuikolla. Kolmea eri puikkotyyppiä vertailevassa tutkimuksessa Selefä Cotton -pumpulipuikolla (OneMed), Foam VWR Critical -näytepuikolla (VWR, Radnor) ja nylonnukatulla 4N6FLOQSwabs Crime Scene -näytepuikolla (3509C, Copan) taltioitiin näytteitä messinkihylsyistä. Puikkojen kostutukseen käytettiin 0,9-prosenttista NaCl-liuosta. Nylonnukatun puikon ja NaCl:n yhdistelmän todettiin antavan paremman DNA:n saannon ja enemmän käyttökelpoisia tunnisteita kuin kahta pumpulipuikkoa (NaCl:lla kostutettua ja kuivaa) käyttävä menetelmä (Jansson et al., 2020). Syyksi paremmalle DNA:n saannolle nylonnukatulla puikoilla on esitetty niiden rakennetta, jonka ansiosta DNA vapautuu puikoista tehokkaammin (Dadhania et al., 2013). Messinkihylsyistä taltioitujen näytteiden lisäksi nylonnukatujen puikkojen on osoitettu antavan pumpulipuikkoja paremman DNA:n saannon seksuaalirikosten uhreilta kerätyistä sisänäytteistä (Benschop et al., 2010).

Taltiointiin käytetyn nesteen (jäljempänä taltiointipuskuri) on osoitettu myös vaikuttavan DNA:n laatuun ja määrään taltioitaessa näytteitä messinkihylsyistä (Bille et al., 2020; Elwick et al., 2022; Jansson et al., 2020). Erityisesti naudan veriseerumin albumiinin (engl. bovine serum albumin, BSA) ja Gly-Gly-His-tripeptidin (GGH) seoksen eli BTmixin (Bille et al., 2020) käyttö taltioinnissa on osoittanut lupaavia tuloksia. Seoksen komponenteista GGH on kehitetty imitoimaan ihmisen verialbumiinin aluetta, joka sitoo kuparin  $\text{Cu}^{2+}$  ioneja (Lau et al., 1974) ja sen on osoitettu inhiboivan hydroksyyliiradikaalien muodostumista kelatoimalla kupari-ioneja (Hu et al., 2016). BTmixiä hyödyntävä menetelmä kehitettiin ATF:lle (United States Bureau of Alcohol, Tobacco, Firearms and Explosives) rikospaikoilta kerättyjen hylsyjen DNA-tutkimuksia varten (Bille et al., 2020). BTmixillä huuhdelluista ja kuivalla puikolla penslatuista (engl. rinse and swab) hylsyistä saatuja tuloksia verrattiin kahden, puskuriin kastetun ja kuivan, puikon tekniikalla (engl. double swabbing) taltioituihin. BTmixin käytön veden sijasta double swabbing -metodilla todettiin parantavan DNA:n saantoa, mutta havaittu ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Bille et al., 2020). Rinse and swab -metodi BTmixillä käytettynä antoi kolme kertaa enemmän DNA:ta kuin double swabbing vedellä



(Bille et al., 2020). BSA:n ja GGH:n käyttö erillään omina taltiointiliuksinaan double swabbing -metodilla ei parantanut taltioitun DNA:n määrää tilastollisesti merkitsevästi verrattuna veteen, mutta degradaatioindeksi oli molemmilla pienempi kuin vedellä (Bille et al., 2020). BTmixin vaikutusta rinse and swab -metodilla taltioitaessa on tutkittu toisessakin tutkimuksessa (Elwick et al., 2022). Rinse and swab -metodin ei todettu eroavan tilastollisesti merkitsevästi soaking-metodilla saaduista tuloksista, mutta BTmixin käytön esitettiin mahdollisesti parantavan taltioitun DNA:n määrää rinse and swab -metodilla sekä osoitettiin laskevan messinkihylsystä taltioitujen näytteiden degradaatioindeksiä (Elwick et al., 2022).

Taltiointimenetelmien ohella käytettyjen eristysmenetelmien vaikutusta DNA:n saantoon on tarkasteltu eri tutkimuksissa (da Rocha Marques et al., 2022; Moreno & McCord, 2017). Kuparia sisältävistä näytteistä DNA:ta eristettäessä EZ1-eristysmenetelmän (EZ1 Investigator, QIAGEN) osoitettiin olevan orgaanisia yhdisteitä käyttäviä eristysmenetelmiä tehokkaampi (Moreno & McCord, 2017). Promegan CWD-suoraeristyskitillä (Casework Direct System, Promega) taas osoitettiin olevan DNA:n saantoa parantava vaikutus tutkittaessa kosketusnäytteitä (de Oliveira Francisco et al., 2020). CWD-suoraeristykseen on osoitettu olevan vaihtoehto vähäisten DNA määrien eristämiseksi PCR-reaktiota varten (Dierig et al., 2020).

Aiempien näytetaltiointia käsittelevien vertailututkimusten ja messingin ominaisuuksien valossa päädyttiin asettamaan kaksi tutkimuskysymystä. Tutkimuskysymys 1. antavatko vaihtoehtoiset näytetaltiointimenetelmät paremman DNA-saannon ammuttujen messinkihylsysten pinnalta verrattuna perinteiseen veden ja kiedotun kuitupuikon yhdistelmään tai vaikuttaako niiden käyttö positiivisesti tunnisteiden määrittämiseksi monistettujen alleelien määrään ja tunnisteiden laatuun? Tutkimuskysymys 2. onko DNA:n eristykseen käytetyllä menetelmällä vaikutusta DNA:n saantoon tai määritettyjen lokusten määrään ja luodun tunnisteiden vertailukelpoisuuteen? Vertailtavia menetelmiä valittaessa kriteereiksi asetettiin saatavilla olevat resurssit, menetelmien hinta, työn määrä ja siihen kuluva aika sekä menetelmän soveltuvuus käytettäväksi laajamittaisissa tutkimuksissa.

Taltiointimenetelmien vertailuja varten nollahypoteesin taltiointimenetelmäksi valittiin penslaus rikospaikoille soveltuvilla, ISO 18385:2016 standardin mukaisilla, MWDES/P Double Ended Swab Round Tip -viskoosipuikoilla (Medical Wire & Equipment) ja DNA-vapaalla vedellä (water amplification grade, Promega), jäljempänä vesi. Testattaviksi vaihtoehtomenetelmiksi päätettiin valita NFC:n (Nationellt Forensiskt Centrum) käyttöön kehitetty penslaus Copanin nylonnukatuilla puikoilla ja 0,9-prosenttisellä NaCl-liuksella (Jansson et al., 2020) sekä penslaus BTmixillä (Bille et al., 2020) ja Copanin nylonnukatuilla puikoilla. BTmix valittiin käytettäväksi taltiointipuskurina NaCl ohella, sillä sen ennustettiin

parantavan DNA:n saantoa sekä parantavan saatujen tunnisteiden laatua ehkäisemällä DNA:n vaurioita myös nylonnukattujen puikkojen kanssa käytettynä. NFC:n menetelmästä (Jansson et al., 2020) poiketen nylonnukatuiksi puikoiksi valittiin 4N6FLOQSwabs Genetics -puikko (jäljempänä genetics-puikko) Crime Scene -puikon sijaan. Genetics-puikot valittiin käytettäväksi, sillä toisin kuin Crime Scene -puikot, ne eivät sisällä antimikrobisia aineita. Puikkoja vertailevissa testeissä antimikrobisten aineiden on katsottu ehkäisevän mikrobien kasvua, mutta niiden ei todettu parantavan DNA:n säilyvyyttä (Eriksson, 16.1.2024). Crime Scene -puikkojen käyttöä ei näin nähty aiheelliseksi.

Tutkittavina näytteinä käytettiin Magtechin 9mm ammuttuja messinkihylsyjä, joiden pinnalle oli ennen ampumista pipetoitu pieni määrä vapaaehtoisen henkilön posken limakalvolta kerättyjä epiteelisoluja, jäljempänä epiteeli-DNA. Epiteelisolut luovuttanut vapaaehtoinen myös lipasti eli latasi käytetyt patruunat lippaisiin paljain käsin, jotta hylsyjen pinnalle saataisiin myös mahdollisesti kosketuksen kautta siirtynyttä DNA:ta (jäljempänä kosketus-DNA). Näytteiden käsittelyn paljain käsin oli tarkoitus myös imitoida rikospaikoilta kerättyjä näytteitä, sillä niissä voi mahdollisesti esiintyä käsistä siirtyneitä rasvoja ja muita kehon eritteitä. Epiteeli-DNA:n lisäys patruunoiden pinnalle koettiin tarpeelliseksi, sillä pelkän kosketuksen kautta siirtyneen DNA:n määrän epäiltiin jäävän liian alhaiseksi riittävän monen vertailukelpoisen tuloksen saamiseksi. DNA:n määrän vaihtelua hylsyjen pinnalla haluttiin rajoittaa ja tutkimusnäytteistä tehdä tasalaatuisempia, sillä kosketuksen kautta siirtyvän DNA:n määrä voi vaihdella huomattavasti (Vaahtera, 15.2.2024). Siirtyvän DNA:n määrän on lisäksi osoitettu olevan matalampi, jos henkilö on koskettanut useaa pintaa ennen tutkimusnäytteen käsittelyä (Burrill et al., 2019), jonka takia ensimmäiset lipastetut patruunat olisivat voineet sisältää enemmän DNA:ta.

Kerätyt DNA-näytteet eristettiin käyttäen menetelmiä, jotka täyttivät kriteerit työn määrän ja siihen kuluvan ajan, hinnan sekä laajamittaisiin tutkimuksiin soveltuvuuden osalta. Puolet näytteistä eristettiin käyttäen EZ1 Advanced XL -eristyslaitetta (QIAGEN) yhdistettynä EZ1 Investigator -eristykettiin (QIAGEN), jäljempänä EZ1-eristys. Menetelmä valittiin asetettujen kriteerien lisäksi sen DNA:ta puhdistavan vaikutuksen takia. Vaikutus perustuu DNA:n sitomiseen näytteestä DNA:n negatiivisen sähkövarauksen avulla ja pesupuskurin useaan vaihtoon, jonka ansiosta vähemmän epäpuhtauksia seuraa eristetyn näytteen mukana. EZ1-eristyksen rinnalle toiseksi vertailtavaksi menetelmäksi valittiin CWD-suoraeristys (Casework Direct System, Promega) sillä aiemmin saatujen tulosten valossa (de Oliveira Francisco et al., 2020; Dierig et al., 2020). CWD-suoraeristyksen toimivuutta messinkihylsyistä taltioidun DNA:n eristykseen päätettiin kokeilla, sillä menetelmä on verrattain nopea DNA:n

puhdistusvaiheen puuttumisen ansiosta. Tämän ansiosta DNA:ta ei myöskään teoriassa menetetä puhdistuksen aikana, jonka takia DNA:n määrän näytteissä odotettiin olevan suurempi kuin EZ1:lla eristetyissä. DNA pyrittiin eristämään näytteistä taltioinnin jälkeen mahdollisimman pian. Näytteiden sisältämien solujen on osoitettu vaurioituvan messinkihylsyjen pinnalla ajan kuluessa (Bille et al., 2020) sekä näytteiden varastointiin käytetyn ajan mahdollisesti vaikuttavan saadun DNA:n määrään (Elwick et al., 2022).

## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Koeala

Tutkimus toteutettiin Keskusrikospoliisin rikosteknisen laboratorion tiloissa yhteistyössä DNA- ja asetutkimusten kanssa. Kokeet suoritettiin heinä-syyskuussa 2023. Vapaaehtoisen posken limakalvosta kerättiin epiteeli-DNA:ta lisättäväksi patruunoiden pinnalle. Kerätyn DNA:n laimennos suoritettiin DNA-laboratorion puhdastilassa, mutta epiteeli-DNA:n pipetointi ampumattomien patruunoiden pinnalle suoritettiin DNA:n luovuttaneen vapaaehtoisen työhuoneessa. Huoneessa ei ollut pipetoinnin aikaan paikalla muita henkilöitä ristikontaminaation välttämiseksi. Käytetty huone ei ollut puhdastila, eikä käytettyjä pintoja puhdistettu tausta-DNA:sta. Laimennettua epiteeli-DNA:ta pipetoitiin jokaisen patruunan pinnalle 5 µl. Pipetoinnin jälkeen patruunoiden annettiin kuivua pöydällä noin tunti, jonka jälkeen vapaaehtoinen lipasti patruunat. Valmistellut lippaat siirrettiin kaksi päivää myöhemmin pahvilaatikossa ampumaradalle. Ammuntojen aikaan tilassa läsnä olivat ammunnat suorittanut asetutkija ja hylsy kerännyt DNA-tutkimusten suorittaja. Ampumaradan lattiaa ei puhdistettu tai peitetty, sillä aikaisemmin suoritettua pienimuotoista pilottikokeen perusteella hylsujen kontaminaatoriskiä lattiasta ei pidetty huomattavana.

Ammutat ja kerätyt hylsy varastoitiin laboratorion tiloihin odottamaan DNA:n taltiointia kierrekorkillisissa DNA-vapaissa putkissa. Hylsyistä taltioitiin DNA:ta seuraavien kolmen päivän aikana DNA-laboratorion puhdastilassa, jossa on säännöllinen puhtaudenseuranta. DNA-näytteet hylsyistä taltioitiin näyteputkiin, jotka siirrettiin toiseen puhdastilaan eristystä ja jatkokäsittelyä varten puhtaissa kannellisissa näytetelineissä. Työvaiheiden välillä ja tutkimusten lopuksi DNA-näytteet säilöttiin pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan (vaihteluväli -16...-24 °C). Samaan pakastimeen säilöttiin myös negatiiviset kontrollinäytteet käytetyistä nesteistä ja reagensseista sekä vapaaehtoisen positiiviset kontrollinäytteet. Kerätyt kontrollinäytteet säilytettiin pakastimessa omassa puhtaassa kannellisessa näytetelineessään erillään hylsyistä taltioituista DNA-näytteistä.

DNA-näytteiden eristys, DNA:n pitoisuuden määrittäminen, DNA:n monistus ja DNA:n erittely kapillaarielektroforeesilla suoritettiin puhdastiloissa, joissa on säännöllinen seuranta kontaminaatioiden varalta. Näytteiden käsittelyyn tarkoitetut puhdastilojen pinnat puhdistettiin DNA:n varalta ennen ja jälkeen näytteiden käsittelyn. Tutkimuksissa käytetyt laitteet puhdistettiin käyttäen Milli-Q puhdistettua vettä (Milli-Q puhdistuslaite, Merck, jäljempänä MilliQ-vesi) ja 70-prosenttista etanolia tai samoja puhdistusaineita kuin käytetyille työpinoille. Pukeutumisen osalta puhdastiloissa työskentelyssä noudatettiin DNA-laboratorion sisäisiä puukeutumisohteja.

## 2.2 Aineisto

Tutkitut DNA-näytteet taltioitiin ammuttujen messinkihylsyjen pinnalta. Ammuntoihin käytettiin käsiaseen kaliiperin 9mm patruunoita (9mm Luger 124gr FMJ 9B, Magtech). Ammuttuja hylsyjä kerättiin ampumaradalta 200 kpl, joista 192 kpl valittiin tutkimuksia varten. DNA-näytteitä taltioitiin yksi hylsyä kohden. Tutkittavat näytteet jaettiin 32 kpl sarjoihin taltiointi- ja eristysmenetelmän mukaan (taulukko 1.). DNA-näytteet taltioitiin penslaamalla hylsyjen pinta käyttäen viskoosipuikkoja ja vettä, genetics-puikkoja ja 0,9-prosenttista NaCl-liuosta sekä genetics-puikkoja ja BTmixiä. DNA-eristettiin EZ1- tai CWD-menetelmällä. Eristetyistä DNA-näytteistä mitattiin vertailuja varten DNA:n konsentraatio. Eristetty DNA monistettiin PCR:n avulla kahteen kertaan erillisille PCR-levyille. DNA:n rinnakkainen monistus kahdelle levyille suoritettiin tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Monistettu DNA eroteltiin kapillaarielektroforeesilla. Yhteensä rinnakkaisten PCR-levyjen kapillaarielektroforeesista määritettiin lokusten alleelit ja alleelien fluoresenssia mittaavat RFU-arvot (engl. relative fluorescence unit) 384 reaktiolle. Lokusten alleelit, niiden koot emäspareina ja RFU-arvot analysoitiin GeneMapper IDX -ohjelmassa (Applied Biosystems), jäljempänä GeneMapper.

Taulukko 1. Ammutut hylsyet ja niistä taltioidut näytteet

Taltiointimenetelmä	Näytteet EZ1-eristykseen kpl, käytetty näyteputki	Näytteet CWD-eristykseen kpl, käytetty näyteputki
Viskoosipuikko + vesi	32, eppendorf 1,5 ml	32, Lyse&Spin 2,0 ml
0,9-prosenttinen NaCl + genetics-puikko	32, Lyse&Spin 2,0 ml	32, Lyse&Spin 2,0 ml
BTmix + genetics-puikko	32, Lyse&Spin 2,0 ml	32, Lyse&Spin 2,0 ml

## 2.3 Menetelmät

### 2.3.1 Taltiointipuskurien valmistus

Genetics-puikkojen kanssa taltioinnissa käytettyjen 0,9-prosenttisen NaCl:n ja BTmixin tilavuudeksi valittiin 30 µl aiempien tutkimusten pohjalta (Bille et al., 2020; Jansson et al., 2020). Veden tilavuudeksi viskoosipuikkojen kanssa valittiin 100 µl, jotta vain puikon pään kostuttaminen olisi helpompaa. Taltiointipuskurit jaettiin laminaarissa 1,5 ml DNA LoBind -putkiin (Eppendorf), jäljempänä 1,5 ml:n eppendorf-putki. Viskoosipuikoilla

taltiointia varten vettä jaettiin 100 µl:n annoksia 64 kpl sekä kaksi annosta positiivisen kontrollin taltioimiseksi eristysmenetelmien vertailua varten.

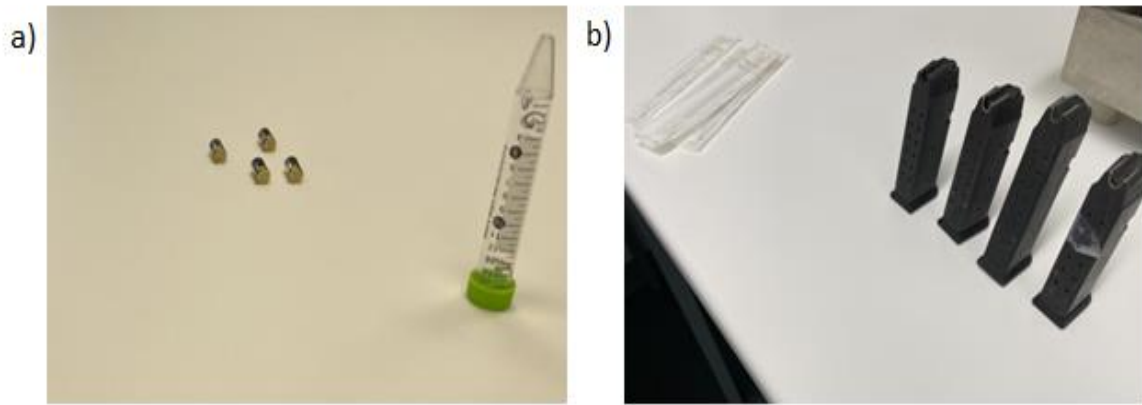
0,9-prosenttinen NaCl-liuos valmistettiin liuottamalla MilliQ-veteen puhtaudeltaan  $\geq 99,5$ -prosenttista natriumkloridia (CAS: 7647-14-5, NaCl, BioXtra,  $\geq 99,5\%$  (AT), Sigma-Aldrich). Valmiista 0,9-prosenttisesta NaCl-liuoksesta jaettiin laminaarissa 30 µl:n annoksia 1,5 ml:n eppendorf-putkiin 64 kappaletta taltiointia varten sekä kaksi kappaletta eristyksen negatiivisiksi kontrolleiksi liuoksen puhtauden varmistamiseksi. Lisäksi eristysmenetelmien vertailuun jaettiin kaksi annosta positiivisten kontrollinäytteiden taltioimiseksi.

BTmix valmistettiin ja jaettiin puhdistetussa laminaarissa samalla laimennoksella ja sekoitussuhteella kuin ohjeena käytetyssä tutkimuksessa (Bille et al., 2020). Käytetty BSA (CAS: 9048-46-8, Sigma-Aldrich) laimennettiin pipetoimalla jokaista 64 µl laimentamatonta BSA:ta (konsentraatio 50 mg/ml) kohden 736 µl vettä (water amplification grade, Promega). Laimennetun BSA:n lopullinen konsentraatio tällä laimennossuhteella oli 4 mg/ml. GGH (CAS: 7451-76-5, Sigma-Aldrich) laimennettiin pipetoimalla jokaista 100 mg GGH:ta kohden 743 µl vettä (water amplification grade, Promega). GGH:n lopullinen konsentraatio tällä laimennossuhteella oli 125 mg/ml. Laimennetuista komponenteista sekoitettiin valmis BTmix suhteella 1:1, josta jaettiin taltiointia varten 1,5 ml:n eppendorf-putkiin 30 µl:n annoksia 64 kappaletta. Lisäksi seoksen puhtauden varmistamiseksi jaettiin kaksi 30 µl:n annosta negatiivisiksi kontrolleiksi eristykseen sekä kaksi annosta positiivisen kontrollin taltioimiseksi eristysmenetelmien vertailuun.

### 2.3.2 DNA-näytteiden taltiointi

Ammuntoihin käytettiin 9x19 Parabellum kaliiperin Glock 17 ja 9x19 Parabellum kaliiperin Glock 19 käsiaseita. Käytettyjä ammuksia, lippaita tai aseita ei puhdistettu tausta-DNA:sta rikospaikan imitoimiseksi. Samaa asetelmaa tiedetään käytetyn aiemmissä tutkimuksissa (Jansson et al., 2020). Lippaista otettiin kuitenkin 4 kpl kontrollinäytteitä tausta-DNA:n määrän selvittämiseksi käyttäen 4N6FLOQSwabs Crime Scene -puikkoja (3509C, Copan Diagnostics) ja vettä (kuva 2b).

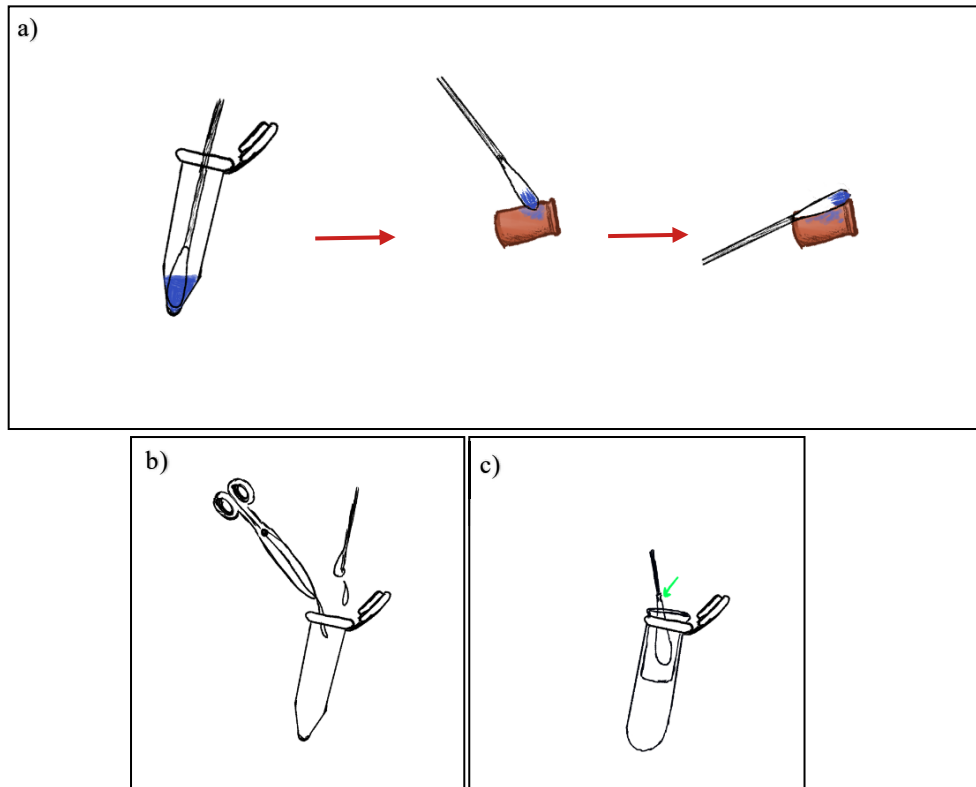
Ammutut hylsyet kerättiin käyttäen puhtaita pinsettejä, kaksia kertakäyttökäsineitä ja hengityssuojaa. Hylsyet kerättiin 3–5 kpl ryhminä 15 ml:n Falcon-putkiin (Falcon Centrifuge tubes, Corning). Puhdastilassa hylsyet siirrettiin puhdistetulle pöytäpinnalle 1 putki kerrallaan (kuva 2a).



Kuva 2: a) 4 hylsyä puhdistetulla pöydällä odottamassa taltiointia, b) yksittäispakattuja nylonnukattuja puikkoja (Copan Diagnostics) ja 4 kpl lippaita (Glock) lippaiden tausta-DNA:n määrän selvittämiseksi.

Hylsyistä taltioitiin puhdastilassa DNA-näytteitä käyttäen viskoosipuikkoja ja vettä 64 kpl, genetics-puikkoja ja 0,9-prosenttista NaCl-liuosta 64 kpl sekä genetics-puikkoja ja BTmixiä 64 kpl. Ammutut hylsyet sekä niistä taltioidut näytteet menetelmittain on esitetty kappaleessa 2.2 taulukossa 1.

Näytteitä taltioitaessa ainoastaan puikon pää kastettiin taltiointipuskuriin. Hylsyn pinta penslattiin ensin puikon kostealla kärjellä pitäen puikkoa optimaalisessa 60°:n kulmassa näytteen pintaan nähden (Hedman et al., 2021). Kauttaaltaan kostealla päällä penslattu hylsy käytiin uudelleen läpi puikon kuivalla osalla. Puikkoa pidettiin pitkittäissuunnassa hylsyn pintaan nähden samalla pyörittäen puikkoa sormissa (kuva 3a). Penslaus sekä kostealla että kuivalla osalla suoritettiin hylsyn pintaan jääneen taltiointipuskurin ja potentiaalisen DNA:n keruun optimoimiseksi. Penslauksessa käytettyjen puikkojen päät tai puikon kuidut kerättiin näyteputkiin DNA:n eristystä varten (kuva 3b; kuva 3c).



Kuva 3: a) hylsyn penslauksen vaiheet vasemmalta oikealle: puikon pään kastelu, penslaus puikon kostutetulla päällä, penslaus puikon kuivalla osalla, b) näyttemateriaalin leikkaaminen kirurgisilla saksilla 1,5 ml:n eppendorf-putkeen, c) katkaistavan genetics-puikon katkaisu 2,0 ml:n Lyse&Spin-putkeen

Eristysmenetelmien erojen vuoksi viskoosipuikoilla taltioituja näytteitä kerättiin kahdenlaisiin putkiin. Eristystä varten viskoosipuikon kuituosa leikattiin irti puikon päästä kirurgisilla saksilla (kuva 3b). Kuidut pyrittiin leikkaamaan irti puikosta yhtenä kappaleena helpottamaan jatkokäsittelyä. Kuituosa leikattiin EZ1-eristystä varten 1,5 ml:n eppendorf-putkiin 32 viskoosipuikosta ja CWD-eristystä varten 2,0 ml:n Lyse&Spin-putkiin 32 viskoosipuikosta (taulukko 1). 1,5 ml:n eppendorf-putkia käytettiin EZ1-eristyksellä viskoosipuikkojen kanssa, jotta lyysauksen läpikäyneistä kuidusta saataisiin puristettua talteen mahdollisimman paljon nestettä pipetoitavaksi eristykseen.

Kaikki käytetyt genetics-puikot kerättiin 2,0 ml:n Lyse&Spin-putkiin (taulukko 1) katkaisemalla puikon pää varren katkaisukohtasta putken sisään. Katkaisua varten puikon pää asetettiin avatun putken sisään sen sisältämään koriin. Putken kansi painettiin puikon katkaisukohtaa vasten (kuva 3c) pitäen samalla putkesta tukevasti kiinni ja kääntämällä puikon vartta, kunnes puikko katkesi katkaisukohtasta. Putki suljettiin ja puikon katkaistu pää jäi putken sisään putken koriin. 1,5 ml:n eppendorf-putket ja 2,0 ml:n Lyse&Spin-putket sisältävät



rasiat säilöttiin pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan (vaihteluväli -16...-24 °C) kahden viikon ajaksi odottamaan eristystä.

Näytteiden lisäksi jokaiselle menetelmälle taltioitiin positiiviset kontrollit käytettäväksi DNA:n eristyksessä. Positiivisia kontroleja taltioitiin yhteensä kuusi kappaletta. Kaksi taltiointimenetelmää kohden, joista toinen eristettiin käyttäen EZ1-eristystä ja toinen CWD-eristystä. Käytetyt positiiviset kontrollit valmistettiin laminaarissa pipetoimalla ja levittämällä mikroskooppilasille 5 µl samaa DNA:ta kuin ammuntoja varten patruunoiden pinnalle. DNA:n annettiin kuivua mikroskooppilasin pintaan, josta se penslattiin samoilla taltiointimenetelmillä kuin tutkittavat näytteet hylsyistä.

### 2.3.3 DNA:n eristys

Taltioiduista näytteistä eristettiin DNA:ta käyttäen CWD-suoraeristystä tai EZ1-eristyksellä, jolla eristettiin myös lippaista 4 kpl kontrollinäytteitä. Kontrollinäytteet lippaista eristettiin DNA-näytteiden rinnalla, mutta käsiteltiin näytteiden jälkeen näytteiden kontaminaatoriskin eliminoimiseksi. Ennen työskentelyn aloitusta kaikki pinnat puhdistettiin vieraan DNA:n varalta kontaminaatoriskin eliminoimiseksi.

Ennen varsinaista DNA:n eristystä EZ1-menetelmällä näytteet lysattiin solukalvojen hajottamiseksi ja DNA:n vapauttamiseksi nesteeseen. Lyysauksessa käytetty reaktioseos (jäljempänä lyysiseos) valmistettiin käyttäen yhtä näytettä kohden 285 µl G2-puskuria (G2, general lysis buffer, QIAGEN) ja 15 µl proteinaasi K:ta (proteinase K, QIAGEN). Lyysiseosta sekoitettiin kääntelemällä valmistukseen käytettyä putkea muutamia kertoja rauhallisesti ylös- alas. Yhtä näytettä kohden seosta pipetoitiin 200 µl näytteen sisältävään 1,5 ml:n eppendorf-putkeen tai 2 ml:n Lyse&Spin-putken koriin. Eristyksen negatiiviseksi kontrolliksi lyysiseosta pipetoitiin 200 µl puhtaisiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Positiivisena kontrollina eristysarjalle käytettiin 10 µl 1:50 seossuhteella laimennettua ihmisverta, johon pipetoitiin 200 µl lyysiseosta.

Lyysaus suoritettiin lämpöravistelijalla (ThermoMixer Comfort, Eppendorf), jossa näytteitä sekoitettiin 60 minuuttia 56 °C:n lämpötilassa sekoitusnopeudella 1150 rpm (revolutions per minute). Lyysauksen jälkeen näytteitä sentrifugoitiin nopeudella 13000 rpm 1 minuutti, jos taltioinnissa käytettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkia tai 5 minuuttia, jos taltiointiin käytettiin 2 ml:n Lyse&Spin-putkia. Sentrifugoinnin jälkeen 2 ml:n Lyse&Spin putkien kiintoaineen sisältävät korit poistettiin putkista. Lysaattia pipetoitiin sentrifugoiduista putkista eristystä varten 200 µl puhtaisiin 1,5 ml:n kierrekorkillisiin eluutioputkiin (Elution Tube 1,5 ml, Sarstedt). Eluutioputkia sentrifugoitiin 13000 rpm nopeudella 1 minuutti ennen niiden

lastaamista EZ1-eristyslaitteelle, jolla käytettiin EZ1 Investigator -kitin käyttöohjeen suositeltuja asetuksia. Trace TD protokolla, eluointi TE-puskurissa (Tris-EDTA) ja 50 µl eluutiotilavuus (QIAGEN, 2022). Eristyksen negatiivinen kontrolli sijoitettiin EZ1-laitteen neljästätoista näytepaikasta viimeiseen. Jokainen eristyssarja piti sisällään yhden positiivisen kontrollinäytteen. Lisäksi EZ1-menetelmällä eristettiin kontrollit 0,9-prosenttisesta NaCl:sta ja BTmixistä niiden puhtauden varmistamiseksi, vertailunäyte käytetystä epiteeli-DNA:sta sekä jokaisen taltiointimenetelmän positiivinen näyte. EZ1-eristyksen jälkeen valmiit näyteputket siirrettiin kannellisessa näyterasiassa pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan (vaihteluväli -16...-24 °C) kahden viikon ajaksi odottamaan kvantifiointia.

CWD-suoraeristystä varten näytteille ei valmistettu erillistä lysisseosta vaan suoraeristyksen reaktioseos toimi myös lysisseoksena. Reaktioseokseen pipetoitiin yhtä näytettä kohden 200 µl CWD reagenssia (CWD Reagent, Promega) ja 1 µl kymmenesosaan laimennettua 1-tioglyserolia (1-Thioglycerol, Promega) valmistajan ohjeen mukaisesti (Promega, 2020). Valmistusta reaktioseosta pipetoitiin 2 ml:n Lyse&Spin-näyteputken koriin 200 µl per näyte. Positiivisena kontrollina käytettiin 10 µl 1:50 seossuhteella laimennettua ihmisverta, johon pipetoitiin 200 µl reaktioseosta. Negatiivisena eristyskontrollina käytettiin 150 µl reaktioseosta sen puhtauden varmistamiseksi. Pipetoinnin jälkeen näyteputkia sekoitettiin vortexilla kevyesti, jonka jälkeen ne siirrettiin lämpöravistelijalle (ThermoMixer C, Eppendorf). Lämpöravistelijalla näytteitä sekoitettiin lyysausta ja eristystä varten 30 minuuttia 70 °C:n lämpötilassa 750 rpm pulssisekoituksella (1 minuutti päällä, 1 minuutti pois). Lopuksi putkia sentrifugoitiin maksiminopeudella 14680 rpm 5 minuuttia tai kunnes kaikki reaktioseos oli suodattunut korin läpi putken pohjalle. Näytteiden kiintoaineen sisältävä kori poistettiin ja eristetyn näytteen sisältävät putket siirrettiin kannellisessa näyterasiassa pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan (vaihteluväli -16...-24 °C) kahden viikon ajaksi odottamaan kvantifiointia.

#### 2.3.4 DNA:n kvantifiointi

DNA:n pitoisuuden määrittämiseksi suoritettu kvantitatiivinen PCR (qPCR, jäljempänä kvantifiointi) tapahtui käyttäen Investigator Quantiplex Pro RGQ -kittiä (QIAGEN), jäljempänä RGQ-kitti, ja Rotor-Gene Q -laitteistoa (QIAGEN) RGQ-ohjelmiston versiolla 2.3.1, jäljempänä rotor-gene-laite. Käytetyn RGQ-kitin reaktioseos pitää sisällään DNA:n monistusta ja mahdollisia PCR-inhibiittoreita tarkkailevan sisäisen kontrollin. Kontrolli on 434 bp mittainen DNA-sekvenssi, jonka monistumista seurataan rotor-gene-laitteen karmiininpunaisella kanavalla (engl. crimson channel) (QIAGEN, 2018).

Reaktioseoksen sisäisen kontrollin lisäksi kvantifioinnissa käytettiin tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi kitin mukana tullutta M1 kontrolli-DNA:ta (Control DNA M1, QIAGEN, jäljempänä M1). M1:stä ja kitin laimennospuskurista luotiin standardisuora neljään 1,5 ml:n eppendorf-putkeen valmistajan ohjeen mukaisesti (QIAGEN, 2018). Positiivisena kontrollinäytteenä käytettiin 0,1 ng/μl pitoisuuteen laimennettua NIST SRM 2372a kontrollia (Human DNA quantitation standard, NIST SRM 2372a, Sigma-Aldrich). Negatiivisena kontrollina käytettiin puhdasta MilliQ-vettä. Kvantifioinnissa käytetty reaktioseos valmistettiin sekoittamalla kitin alukeseosta (Quantiplex Pro Primer Mix, QIAGEN) ja reagenssiseosta (Quantiplex Pro Reaction Mix, QIAGEN) valmistajan ohjeen mukaisesti seossuhteella 1:1 (QIAGEN, 2018).

Rotor-gene-laitteella käytetylle reaktiorengaalle (Rotor-Disc 100, QIAGEN) näytteet ja kontrollit pipetoitiin QIAgility-pipetointirobotilla (QIAGEN). Pipetointiin käytettiin QIAgilityn ohjelmistoversiota 4.7.1 ja laitevalmistajan ohjeella (QIAGEN, 2020a) luotua pohjaa. Ennen pipetointia näytteitä sekoitettiin kevyesti vortexilla ja sentrifugoitiin 13000 rpm nopeudella 30 sekuntia. Näytteet, standardisuora, reaktioseos, kontrollit ja reaktiorengas lastattiin laitteelle kvantifiointia varten luodun templaatin osoittamille paikoille. Reaktiorengaalle pipetoitiin kahtena kappaleena standardisuora, positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Näytteet pipetoitiin renkaalle vain kerran. Reaktioseosta pipetoitiin renkaan kaivoihin 18 μl, joihin lisättiin standardisuoraa, kontrolleja tai näytteitä niille varatuille paikoille 2 μl. Reaktiorengas sinetöitiin käyttäen muovikalvoa (Rotor-Disc Heat Sealing Film, QIAGEN) ja lämpösinetöijää (Rotor-Disc Heat Sealer, QIAGEN). Valmis ja sinetöity reaktiorengas siirrettiin kvantifioitavaksi esilämmitetylle rotor-gene-laitteelle.

Rotor-gene-laitteella seurattavaksi DNA:n konsentraation mittasuureeksi valittiin ng/μl. Kvantifiointi suoritettiin 40 syklin ohjelmalla, jonka aikana laite seurasi DNA:n konsentraatiota reaaliajassa havainnoimalla monistuvan DNA:n fluoresenssia. Ohjelman lopuksi tuloksista varmistettiin kontrollien arvojen olevan suositeltujen rajojen sisällä (Applied Biosystems, 2004; Institute of research in immunology and cancer, 2011; QIAGEN, 2018). Standardien ja positiivisen kontrollin ero tunnettuun arvoon kokonais-DNA:ta mittaavalla keltaisella kanavalla (engl. yellow channel) tuli olla  $\leq 25\%$ . Standardikäyrän korrelaatiokertoimen  $r^2$  tuli olla  $> 0,98$  ja negatiivisista kontrolleista toisen tuli olla puhdas. Karmininpunaiselta kanavalta tarkistettiin kitin sisäisen kontrollin monistuminen sekä, että näytteiden monistumista kuvaavat käyrät seurasivat samaa linjaa. Tuloksissa katsottiin olevan viitteitä PCR:n inhibitiosta, mikäli käyrissä havaittiin voimakasta hajontaa.

### 2.3.5 DNA:n monistus

Näytteiden DNA monistettiin PCR-menetelmällä käyttäen PCR-laitetta (ProFlex, Applied Biosystems) ja kaupallista PowerPlex ESX 17 Fast -kittiä (Promega), jäljempänä ESX-kitti. Näytteille valmistettiin PCR-reaktioseos ESX-kitin mukana tulleista 5X Master Mix -reagenssiseoksesta ja 10X Primer Pair -alukeseoksesta. Komponentteja sekoitettiin suhteessa 2 osaa reagenssiseosta ja 1 osa alukeseosta. Valmista PCR-reaktioseosta pipetoitiin PCR-levylle 6 µl per kaivo. PCR-levyinä käytettiin MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well Reaction Plates -levyjä (Applied Biosystems), jäljempänä endura-levy. Negatiivisena kontrollina DNA:n monistukseen käytettiin MilliQ-vettä ja positiivisena kontrollina kitin 2800M kontrolli-DNA:ta (Promega) laimennettuna 10 ng/µl pitoisuuteen. Monistettavaa näytettä tai kontrollia pipetoitiin levylle 14 µl sille varattuun kaivoon. Kaivot paikoilla 8. ja 48. jätettiin tyhjiksi kapillaarielektroforeesin alleeliladderia varten. Pipetointiin käytettiin samaa QIAgility-pipetointirobottia ja QIAgilityn ohjelmistoversiota kuin kvantifioinnissa. Pipetointirobotilla käytetty templaatti luotiin samalla ohjeella kuin kvantifioinnissa. Endura-levyt pipetoitiin kahteen kertaan jokaista näytesarjaa kohden. Näin näytteistä luotiin tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi kaksi replikaattia, jotta kapillaarielektroforeesi oli mahdollista suorittaa kahtena. Pipetoinnin lopuksi levyt suljettiin liimapintaisella alumiinifoliokalvolla (Microseal F Foil, Bio Rad).

Valmiita endura-levyjä sentrifugoitiin (Centrifuge 5804, Eppendorf) 20–40 sekuntia 3000 rpm nopeudella nesteen saattamiseksi kaivojen pohjalle sekä ravisteltiin 3 minuuttia nopeudella 1150 rpm. Sentrifugoidut ja ravistellut levyt lastattiin PCR-laitteelle, jolle valittiin ennalta ohjelmoitu protokolla käytettäväksi DNA:n monistukseen (taulukko 2.). Käytetty 30:n syklin protokolla DNA:n monistamiseksi ohjelmoitiin käytetyn PCR-kitin ohjeella (Promega, 2023). Protokollan lopuksi levyt siirrettiin pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan (vaihteluväli -16...-24 °C) odottamaan kapillaarielektroforeesia.

Taulukko 2. käytetty PCR-protokolla, syklit ja niiden lukumäärä.

Syklit, lukumäärä	Lämpötila, °C	Aika, sekuntia
1	96	60
30	96, 60, 72	5, 35, 5
1	60	120
1	4	∞

∞ = loputon, lämmitys jatkuu, kunnes protokolla lopetetaan manuaalisesti.

### 2.3.6 DNA:n erottelu kapillaarielektroforeesilla

Ennen DNA:n erottelua kapillaarielektroforeesilla näytteet ja kontrollit sisältävät endura-levyt esikäsiteltiin ravistelemalla huoneenlämmössä 3 minuuttia ja sentrifugoimalla lyhyesti. Esikäsitellyt levyt lastattiin automatisoituun nesteiden käsittelyyn tarkoitettuun Fluent Liquid Handler -pipetointirobotiin (Tecan), jäljempänä fluent-pipetointiroboti. Fluent-pipetointirobotille lastattiin näytteet sisältävien endura-levyjen lisäksi kapillaarielektroforeesiin tarkoitetut MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate -reaktiolevyt (Applied Biosystems), jäljempänä optical-levy sekä alleeliladderi PowerPlex ESX 17 Fast Allelic Ladder (Promega). Pipetointirobotille lastattiin myös formamidi-WEN-seos, joka oli valmistettu ennalta 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. Käytetty seossuhde oli 665 µl formamidia ja 35 µl WEN ILS 500 ESS -standardia (Promega). Seosta ravisteltiin kevyesti ennen lastausta laitteelle. Seoksen valmistuksessa käytetty WEN ILS 500 ESS on ESX-kitin mukana toimitettu kapillaarielektroforeesin sisäinen standardi, jota käytetään monistettujen DNA-juosteiden koon määritykseen sekä parantamaan analyysien tarkkuutta (Promega, 2023).

Formamidi-WEN-seosta pipetoitiin fluent-pipetointirobotilla optical-levylle 10 µl per kaivo. Näytteitä, kontroleja tai alleeliladderia pipetoitiin 1 µl niille varattuihin kaivoihin. Pipetoitujen optical-levyjen kaivot suljettiin kumisella septalla (Septa for 96-Well Plates, for 3500/SeqStudio Flex, Applied Biosystems) ja levyjä denaturoitiin kuivahauteessa 95 °C:n lämpötilassa 3 minuuttia. Lämmitystä seurasi välitön jäähditys 4 °C:n lämpötilaan, jossa levyjä pidettiin vähintään 3 minuuttia. Denaturoinnin jälkeen levyjä sentrifugoitiin ennen siirtoa monistetun DNA:n erotteluun tarkoitettulle ABI 3500 xL -laitteelle (Applied Biosystems). DNA:n analysointiin käytettiin ABI 3500 xL -laitteen kanssa GeneMapperia ohjelmistoversiolla 1.5. Monistettu DNA eroteltiin juosteiden koon ja lokusten mukaan järjestykseen. ESX-kitin STR-lokusten alleelit leimautuivat, eli saivat arvon, sen perusteella kuinka monta toistojaksoa havaittu alleeli piti sisällään (taulukko 3.).

Taulukko 3. ESX 17 Fast -kitin monistamat lokukset ja niiden alleelit (Promega, 2023).

Lokus	Pituus, emäsparia, bp	STR-lokusten potentiaaliset alleelit
AMEL	89, 95	X, Y*
D10S1248	83-127	8-19**
D2S441	88-124	8-11, 11.3***, 12-17
D22S1045	79-118	7-20
D3S1358	103-147	9-20
D12S391	130-182	14-17, 17.3, 18, 19.3, 19-27
D1S1656	137-184	9-14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
vWA	124-180	10-24
TH01	152-195	3-9, 9.3, 10-11, 13.3
D21S11	203-259	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
D8S1179	203-251	7-19
D19S433	193-245	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
D2S1338	197-269	10, 12, 14-28
D16S539	273-321	4-16
FGA	264-410	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
D18S51	286-366	7-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27
SE33	267-417	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

\* AMEL lokuksen potentiaaliset alleelit X tai Y. \*\* STR-lokusten potentiaaliset alleelit on luokiteltu alleelissa esiintyvien toistojaksojen määrän osalta, lokuksen D10S1248 alleeli 19 sisältää 19 tandem-toistoa. \*\*\* STR-toistot, jotka sisältävät myös osittaisen toistojakson päättyvät .1, .2 tai .3 ESX-kitin käyttämän neliosajärjestelmän mukaan.

Alleelien leimautumisen leikkuurajaksi (RFU cut-out) asetettiin 100 RFU eli tämän alle jääneet alleelipiikit poistettiin tuloksista automaattisesti GeneMapperin toimesta. Leikkuurajan suositus käytetylle GeneMapperin versiolle on 50–200 RFU (QIAGEN, 2010). 100 RFU:n raja valittiin, koska pienemmillä arvoilla menetelmien taustakohina kävi liian ilmeiseksi ja nostamalla leikkuurajaa alleeleita leimautui huomattavasti vähemmän. GeneMapperilta vietiin tilastollisia testejä varten tekstitiedosto, joka piti sisällään leimautuneet alleelit per näyte sekä alleelien koot emäspareina ja mitatut RFU-arvot.

### 2.3.7 Aineiston analysointi

Taltioiduille DNA-näytteille ja kontrollinäytteille suoritettiin tilastollinen vertailu DNA:n konsentraation osalta. Neljälle lippaista taltioidulle kontrollinäytteelle laskettiin konsentraation keskiarvo kuvaamaan tausta-DNA:n määrää. Lippaista saatuja tunnisteita verrattiin manuaalisesti näytteiden alleleihin, jotka eivät täsmänneet vapaaehtoisen tunnisteseen. Lasilevyiltä taltioituja positiivisia kontrollinäytteitä vertailtiin keskenään ja taltiointimenetelmät asetettiin järjestykseen DNA:n konsentraation osalta.

Menetelmiä vertailtaessa nollahypoteesiksi valittiin CWD-eristys ja viskoosipuikko-vesi-taltiointi. Muodostettu aineisto analysoitiin käyttäen R-kielen graafista käyttöliittymää Rstudiota (versio 2023.9.1.494, Posit Software). DNA:n konsentraation sisältävälle aineistolle suoritettiin Shapiro-Wilkin testi aineiston normaalijakautuneisuuden testaamiseksi komennolla `shapiro.test(data$x)` sekä Levenen testi varianssien homogeenisyyden testaamiseksi komennolla `levneTest(y ~ g, data = )`. Käytetty Shapiro-Wilkin testi löytyy stats-paketista (R Core Team, 2023) ja Levenen testi paketista `car` (Fox & Weisberg, 2019). Shapiro-Wilkin ja Levenen testien pohjalta aineiston ei havaittu olevan normaalijakautunutta ( $p < 0,05$ ) eikä varianssien homogeenisiä ( $p < 0,05$ ). Tuloksille DNA:n konsentraation osalta kokeiltiin suorittaa logaritmimuunnos aineiston normalisoimiseksi, mutta muunnoksesta luovuttiin, sillä muunnettu data ei ollut normaalijakautunutta.

DNA:n konsentraation tuloksille suoritettiin stats-paketin Kruskalin-Wallis testin testi (jäljempänä KW-testi) komennolla `kruskal.test(y ~ g, data = )` (R Core Team, 2023), koska data ei ollut normaalijakautunutta eivätkä varianssit taltiointi- ja eristysmenetelmien välillä olleet yhtä suuria ja otoskoko oli  $\geq 30$ . KW-testin vastemuuttujana käytettiin DNA:n konsentraatiota ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) ja sitä selittävinä muuttujina taltiointimenetelmiä, eristysmenetelmiä sekä näiden yhdistelmiä.

KW-testin jälkeen tuloksille suoritettiin tilastollisen merkitsevyyden havainnoinnin jälkeen post hoc -testinä z-muunnettu Wilcoxonin-Mannin-Whitneyn testi, jäljempänä z-muunnettu WMW-testi (Neuhäuser, 2011), koska KW-testi itsessään ei kerro minkä menetelmien välillä tilastollisesti merkitsevä ero havaittiin. Käytetyn z-muunnetun WMW-testin versio `wilcoxon_test` löytyy `coin`-paketista. Testi suoritettiin komennolla `wilcoxon_test(y ~ g, data =, distribution = "exact")` (Hothorn et al., 2008). Z-muunnetun WMW-testin vastemuuttujana käytettiin tulosten DNA:n konsentraatiota ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) ja selittävinä muuttujina vertailtavia taltiointimenetelmiä ja eristysmenetelmiä.

DNA:n konsentraation tilastollisten vertailujen jälkeen GeneMapperilta tuoduista tuloksista laskettiin jokaiselle näytteelle leimautuneiden alleelien RFU-arvojen keskiarvot

lokuksittain. Mikäli leimautuneita alleeleja ei lokuksen kohdalla havaittu, annettiin RFU-keskiarvoksi 0. Havaitut RFU-keskiarvot eivät olleet normaalijakautuneita (Shapiro-Wilk in testi,  $p$ -arvo  $< 0,05$ ), eivätkä homogeenisiä varianssin osalta (Levenen testi,  $p$ -arvo  $< 0,05$ ). Tämän perusteella RFU-keskiarvoille valittiin käytettäväksi KW-testi ja post hoc -testinä z-muunnettu WMW-testi. Vertailtaville menetelmille suoritettiin lisäksi parittainen Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi näytteiden lokusten RFU-keskiarvojen osalta (liite 1).

RFU-keskiarvojen ohella näytteille ja lokuksille laskettiin onnistumisprosentit leimautuneiden alleelien määrän perusteella. Onnistumisprosentin laskemiseksi aineistosta suodatettiin vapaaehtoisen tunnistetta vastaavat alleelit. Tunnisteen 16 lokusta olivat alleelien osalta heterotsygootteja ja lokus D10S1248 oli homotsygootti. Onnistumisprosentti näytteelle laskettiin kaavalla  $m/66*100$  jossa  $m$  on vapaaehtoisen tunnistetta vastaavien leimautuneiden alleelien määrä GeneMapperissa ja 66 on enimmäismäärä tunnisteen alleeleille. Näytteen alleelien enimmäismäärä saatiin kaavalla  $16*2*2+1*2$ , jossa 16 on heterotsygoottien lokusten määrä kerrottuna kahdella potentiaalisella alleelilla, kerrottuna kahdella rinnakkaisella replikaatilla, johon lisätään homotsygootti lokus kerrottuna kahdella rinnakkaisella replikaatilla. Lokusten onnistumisprosentti laskettiin heterotsygooteille lokuksille kaavalla  $j/(k*2*2)*100$ , jossa  $j$  on havaittujen alleelien määrä ja  $k$  näytteiden määrä menetelmittain, joka kerrotaan kahdella rinnakkaisella replikaatilla ja kahdella potentiaalisella alleelilla. Homotsygooteille lokuksille onnistumisprosentti laskettiin kaavalla  $j/(k*2)*100$ , koska potentiaalisia alleeleja on vain yksi.

ESX-kitin monistamat lokukset järjestettiin RStudioissa nousevaan järjestykseen leimautuneiden alleelien koon keskiarvon mukaan. Lokukset nousevassa järjestyksessä olivat AMEL, D10S1248, D2S441, D22S1045, D3S1358, D12S391, D1S1656, vWA, TH01, D21S11, D8S1179, D19S433, D2S1338, D16S539, FGA, D18S51, SE33. Koon perusteella järjestykseen asetetuilla lokuksilla muodostetuista kuvaajista haettiin visuaalisen tarkastelun avulla viitteitä DNA:n degradaatiosta tai PCR-reaktion inhibitiosta. Mikäli kooltaan pienempien alleelien lokukset olivat yliedustettuina kuvaajissa, katsottiin degradaation tai inhibition olevan mahdollista.

Näytteet järjestettiin menetelmittain laskevaan järjestykseen näytteiden alleelien onnistumisprosenttien mukaan. Suuruusjärjestykseen järjestettyä dataa käsiteltiin ordinaalisena ja sille suoritettiin KW-testi ja post hoc -testinä z-muunnettu WMW-testi. Z-muunnettu WMW-testi valittiin onnistumisprosentin post hoc -testiksi, sillä kerätty aineisto ei täyttänyt normaali-, binomi- tai poisson-jakauman määritelmiä. Hypoteesitestausta jakauman uskottavuusosamäärän perusteella tai regressioanalyysillä ei voitu luotettavasti hyödyntää.



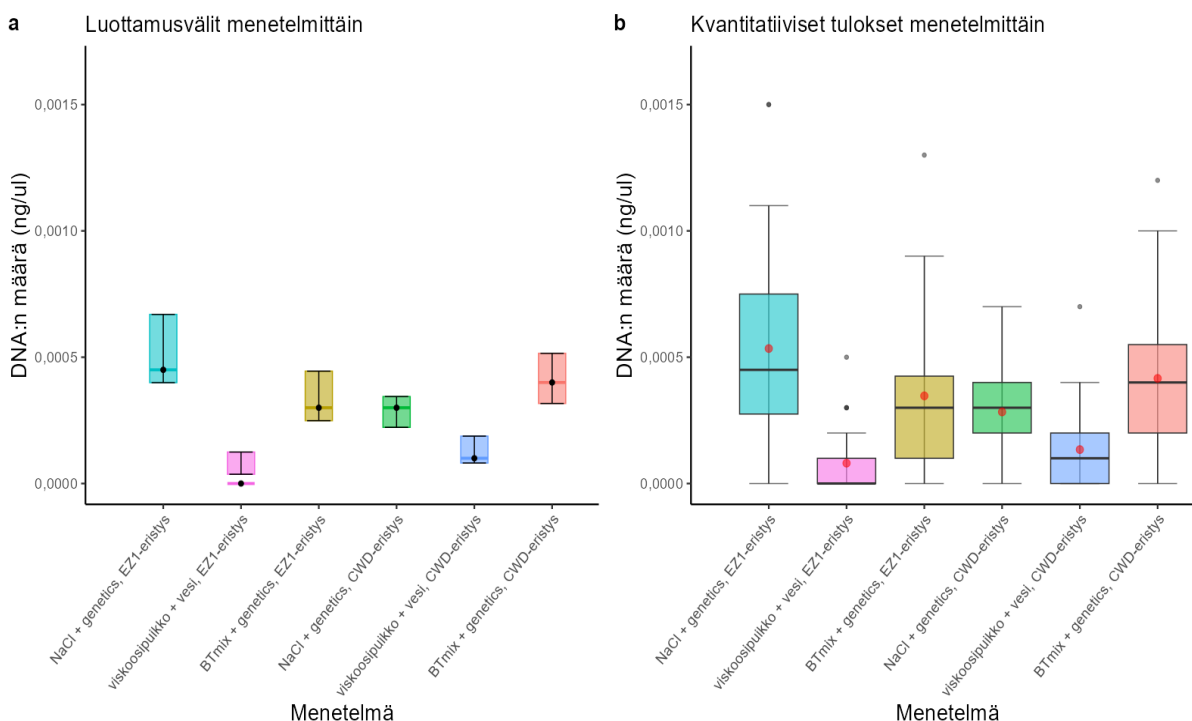
Syynä olivat suuret varianssit ja erot leimautuneiden alleelien määrissä näytteiden ja menetelmien välillä. Kirjallisuuden perusteella z-muunnettu WMW-testi oli tilanteessa käyttökelpoinen aineiston edellä kuvattujen ominaisuuksien mukaan (MacFarland & Yates, 2016, s. 103).

Tilastollisten testien lisäksi DNA:n konsentraatiolle, RFU-arvoille ja leimautuneiden alleelien onnistumisprosentteille laskettiin 95 % luottamusvälit menetelmittäin keskeisen rajavolauheen perusteella kaavalla  $(\bar{x}-z^*(s/\sqrt{n}))$ ,  $(\bar{x}+z^*(s/\sqrt{n}))$ , vaikka tutkittava aineisto ei noudattanut normaalijakaumaa (Pek et al., 2017). Luottamusvälien erojen katsottiin tukevan havaintoa tilastollisesta merkitsevyydestä, mikäli vaihtoehtoisten menetelmien 95 % luottamusvälit eivät sisältäneet nollahypoteesia (Motulsky, 2018, s. 157–159).

### 3. Tulokset

Tutkimusnäytteessä esiintyneen DNA:n konsentraatio ja monistuneet alleelit saatiin analysoitua 188 näytteelle 192:sta. Neljässä näytteessä havaittiin kontaminaatio, jonka lähdettä ei pystytty varmentamaan. Kontaminoituneista näytteistä saatiin muodostettua vertailtavat tunnisteet, joista yksikään ei sopinut DNA:n taltioinnin ja laboratoriotutkimusten suorittajaan. Jokainen tunniste oli yksilöllinen eikä toistunut kontaminaatioiden välillä. Kontaminoituneet näytteet pudotettiin pois tutkimuksesta, sillä näytteiden ei katsottu olevan vertailukelpoisia. Yksi näytteistä oli huomattavan vahva, joka voi viitata kontaminaation tapahtuneen asean laukeamisen jälkeen. Tunnetun tausta-DNA:n määrän osalta neljästä lippaasta taltioidun DNA:n pitoisuuden keskiarvo oli 0,0044 ng/μl. Lippaista taltioitujen näytteiden tunnisteissa ei nähty viitteitä vapaaehtoisen DNA:sta, vaikka henkilö oli käsitellyt lippaita ilman suojaruustusta.

Eniten DNA:ta per mikrolitra saatiin genetics-puikoilla ja 0,9-prosenttisella NaCl-liuoksella taltioidusta näytteistä, jotka eristettiin EZ1-menetelmällä (keskiarvo 0,0005 ng/μl). Pienimmän konsentraation tuottivat viskoosipuikolla ja vedellä taltioidut ja EZ1-menetelmällä eristetyt näytteet (keskiarvo 0,00008 ng/μl). Eristetyn DNA:n pitoisuudessa oli havaittavissa selkeitä eroja käytettyjen menetelmien välillä (kuva 4b).



Kuva 4: a) DNA:n konsentraation keskiarvojen 95 % luottamusväli ja mediaani, b) laatikko-jana-kuvio DNA:n konsentraatiolle, mediaani, laatikon 2. ja 3. kvartaali, sekä janan 1. ja 4. kvartaali. Punainen piste kuvaa DNA:n konsentraation keskiarvoa.

Molemmat vaihtoehtoiset taltiointimenetelmät (NaCl ja genetics-puikko, BTmix ja genetics-puikko) antoivat suuremman DNA:n konsentraation eristetyissä näytteissä kuin nollahypoteesin viskoosipuikko ja vesi. Erot DNA:n konsentraatiossa taltiointimenetelmien välillä olivat KW-testin perusteella tilastollisesti merkitseviä (taulukko 4.). Eristysmenetelmien osalta tilastollista merkitsevyyttä ei havaittu DNA:n konsentraation eroissa (taulukko 4.). Taltiointimenetelmistä NaCl ja genetics-puikko antoi parhaat tulokset (keskiarvo 0,00041 ng/μl, keskihajonta 0,00033 ng/μl). BTmix ja genetics-puikko oli menetelmistä toiseksi paras (keskiarvo 0,00038 ng/μl, keskihajonta 0,00028 ng/μl). Pienimmät tulokset DNA:n konsentraation osalta taltiointimenetelmistä antoi viskoosipuikko ja vesi (keskiarvo 0,00011 ng/μl, keskihajonta 0,00014 ng/μl). Erot DNA:n konsentraatiossa olivat z-muunnetun WMW-testin perusteella tilastollisesti merkitseviä verrattaessa nollahypoteesin menetelmää vaihtoehtoisiin menetelmiin (taulukko 5.). Tilastollista merkitsevyyttä ei kuitenkaan havaittu verrattaessa vaihtoehtoisia taltiointimenetelmiä toisiinsa (taulukko 5.). Z-muunnetun WMW-testin perusteella erot eristysmenetelmissä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (taulukko 5.), vaikka EZ1-menetelmällä eristettyjen näytteiden DNA:n konsentraatio (keskiarvo 0,00032 ng/μl, keskihajonta 0,00034 ng/μl) oli suurempi kuin CWD-menetelmällä eristettyjen (keskiarvo 0,00028 ng/μl, keskihajonta 0,00024 ng/μl). DNA:n saannon  $H_0$  hypoteesi hylättiin taltiointimenetelmien osalta, sillä ero nollahypoteesin viskoosipuikko-vesi-yhdistelmän ja vaihtoehtoisten menetelmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä (taulukko 5.).

Taulukko 4. H = Kruskalin-Wallis testin tuloksille, df = degrees of freedom.

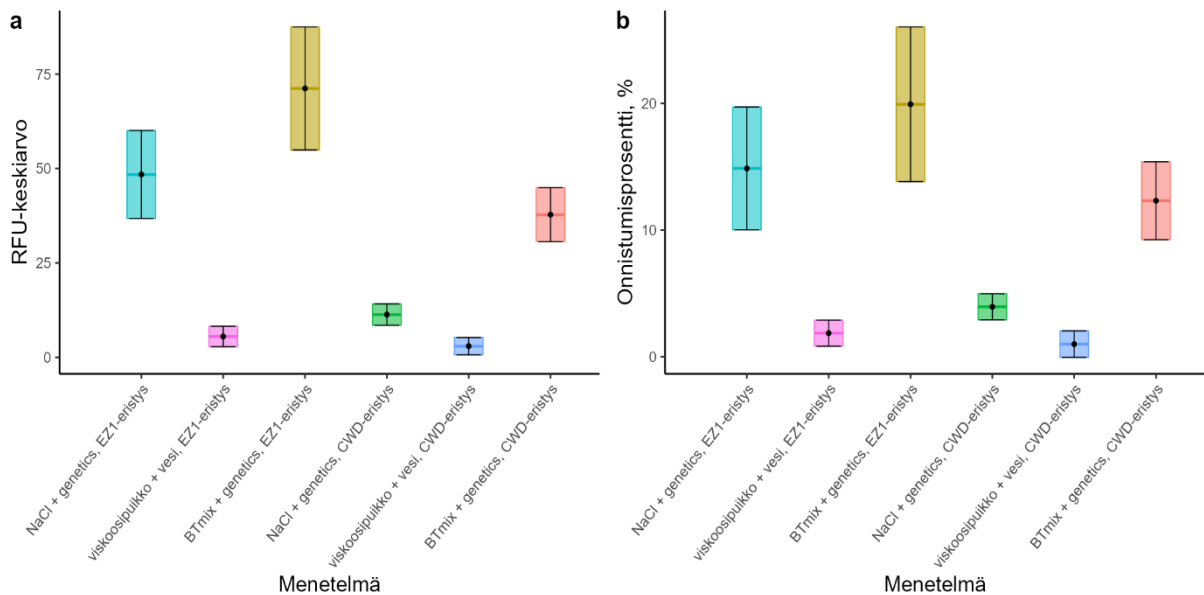
Vertailtava muuttuja	H, df	p
Taltiointimenetelmä	H = 58,411, df = 2	< 0,0001 ***
Eristysmenetelmä	H = 0,0089988, df = 1	0,9244 ns
Taltiointi-eristys-yhdistelmä	H = 65,404, df = 5	< 0,0001 ***

ns, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Taulukko 5. Z = z-muunnettu Wilcoxonin-Mannin-Whitneyn testi DNA:n konsentraation perusteella taltiointi- ja eristysmenetelmille.

Vertailtavat menetelmät	Z, n1, n2	p
BTmix + genetics - NaCl + genetics	-0,44332, 63, 62	0,6595 ns
BTmix + genetics - viskoosipuikko + vesi	6,6301, 63, 63	< 0,0001 ***
viskoosipuikko + vesi - NaCl + genetics	-6,6493, 62, 62	< 0,0001 ***
CWD-eristys - EZ1-eristys	-0,094862, 93, 95	0,9251 ns

ns, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .



Kuva 5: a) näytteiden RFU-keskiarvojen 95 % luottamusväli, b) taltiointi- ja eristysmenetelmän yhdistelmien onnistumisprosentin 95 % luottamusväli.

Kapillaarielektroforeesista saatujen tulosten RFU-arvojen ja leimautuneiden alleelien osuuden odotettiin noudattavan pitkälti DNA:n konsentraatiosta saatuja tuloksia. Konsentraatituloksista poiketen RFU-arvojen (kuva 5a.) ja onnistumisprosentin (kuva 5b.) luottamusvälit olivat suuremmat EZ1-eristetyille näytteille kuin CWD-eristetyille. Tarkemmat tulokset menetelmittäin on esitetty liitteessä 2.

Taltiointimenetelmistä suurimmat RFU-arvot antoi BTmixin ja genetics-puikon yhdistelmä (keskiarvo 54,8 RFU, keskihajonta 54,0 RFU). Heikoimmin taltiointimenetelmistä suoriutui viskoosipuikon ja veden yhdistelmä RFU-arvon osalta (keskiarvo 4,2 RFU, keskihajonta 10,2 RFU). Eristysmenetelmistä EZ1-eristys antoi selkeästi suuremmat RFU-arvot (keskiarvo 42,1 RFU, keskihajonta 54,8 RFU) verrattuna CWD-eristykseen (keskiarvo 17,3 RFU, keskihajonta 23,8 RFU). Tulosten perusteella RFU-arvojen  $H_0$  hypoteesi hylättiin taltiointi- ja eristysmenetelmän osalta, sillä havaitut erot menetelmissä olivat KW-testin (taulukko 6.) ja z-muunnetun WMW-testin perusteella tilastollisesti merkitseviä (taulukko 7).

Taulukko 6. H = Kruskalin-Wallis testin testitulos ABI 3500xL kapillaarielektroforeesin leimautuneiden alleelien piikkien RFU-keskiarvoille, df = degrees of freedom.

Vertailtava muuttuja	H, df	p
Taltiointimenetelmä	H = 165,33, df = 2	< 0,0001 ***
Eristysmenetelmä	H = 19,457, df = 1	< 0,0001 ***
Taltiointi-eristys-yhdistelmä	H = 193,44, df = 5	< 0,0001 ***

ns, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Taulukko 7. Z = z-muunnettu Wilcoxonin-Mannin-Whitneyn testi ABI 3500xL kapillaarielektroforeesin RFU-keskiarvojen perusteella taltiointi- ja eristysmenetelmille.

Vertailtavat menetelmät	Z, n1, n2	p
BTmix + genetics - NaCl + genetics	5,0314, 126, 124	< 0,0001 ***
BTmix + genetics - viskoosipuikko + vesi	12,135, 126, 126	< 0,0001 ***
viskoosipuikko + vesi - NaCl + genetics	-9,3002, 126, 124	< 0,0001 ***
CWD-eristys - EZ1-eristys	-4,411, 93, 95	< 0,0001 ***

<sup>ns</sup>, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Parhaat tulokset näytteiden onnistumisprosentin osalta verrattavista taltiointimenetelmistä antoi BTmixin ja genetics-puikkojen yhdistelmä (keskiarvo 16,2 %, suurin arvo 63,6 %, keskihajonta 14,4 %, luottamusväli 12,6–19,7 %). Pienimmät onnistumisprosentit antoi viskoosipuikon ja veden yhdistelmä (keskiarvo 1,42 %, suurin arvo 16,7 %, keskihajonta 3,0 %, luottamusväli 0,7–2,2 %). Eristysmenetelmistä EZ1 tuotti suuremmat onnistumisprosentit (keskiarvo 12,3 %, suurin arvo 63,6 %, keskihajonta 15,1 %, luottamusväli 9,3–15,4 %) kuin CWD-suoraeristys (keskiarvo 5,7 %, suurin arvo 34,8 %, keskihajonta 7,4 %, luottamusväli 4,2–7,2 %). Näytteiden onnistumisprosentin  $H_0$  hypoteesi hylättiin taltiointi- ja eristysmenetelmien osalta, sillä havaitut erot menetelmien välillä olivat KW-testin (taulukko 8.) ja z-muunnettun WMW-testin perusteella tilastollisesti merkitseviä (taulukko 9). Havaintoa tuki nollahypoteesin puuttuminen vaihtoehtoisten menetelmien luottamusväleissä (liite 2).

Taulukko 8. H = Kruskalin-Wallis testin leimautuneiden alleelien onnistumisprosentteille, df = degrees of freedom.

Vertailtava muuttuja	H, df	p
Taltiointimenetelmä	H = 92,597, df = 2	< 0,0001 ***
Eristysmenetelmä	H = 9,6463, df = 1	0,0019 **
Taltiointi-eristys-yhdistelmä	H = 106,37, df = 5	< 0,0001 ***

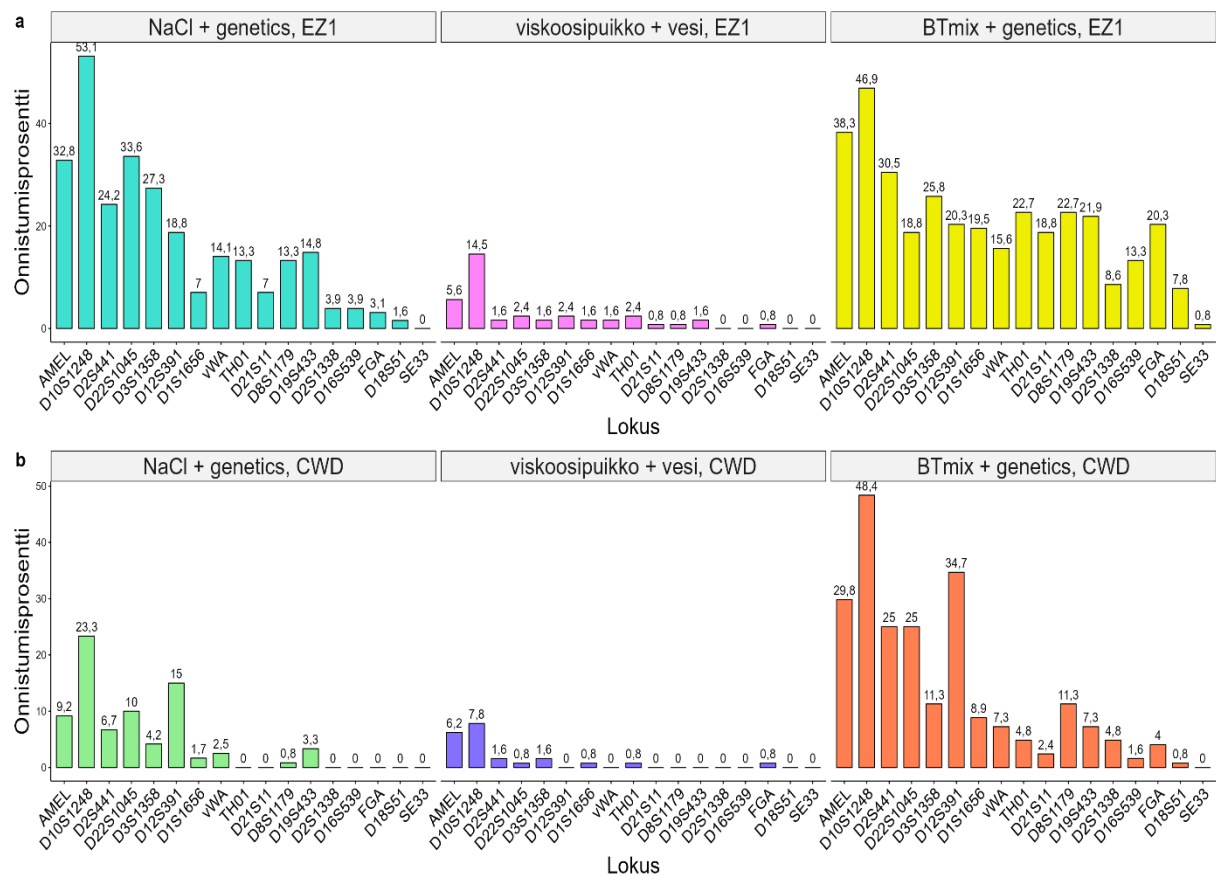
<sup>ns</sup>, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

Taulukko 9. Z = z-muunnettu Wilcoxonin-Mannin-Whitneyn testi taltiointi- ja eristysmenetelmittain leimautuneiden alleelien onnistumisprosentin perusteella näytteittäin.

Vertailtavat menetelmät	Z, n1, n2	p
BTmix + genetics - NaCl + genetics	3,7757, 63, 62	0,0001 ***
BTmix + genetics - viskoosipuikko + vesi	8,8679, 63, 63	< 0,0001 ***
viskoosipuikko + vesi - NaCl + genetics	-7,0868, 63, 62	< 0,0001 ***
CWD-eristys - EZ1-eristys	-3,1058, 93, 95	0,0018 **

<sup>ns</sup>, ei tilastollista merkitsevyyttä / \*,  $p \leq 0.05$  / \*\*,  $p \leq 0.01$  / \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

NaCl + genetics-puikolla taltioidut ja CWD-menetelmällä eristetyt näytteet tuottivat huomattavasti vähemmän vapaaehtoisia tunnistettavia vastaavia leimautuneita alleleita kuin DNA:n konsentraation perusteella olisi voinut odottaa (kuva 6b). Leimautuneiden alleelien osuuksissa oli silmänmääräisesti havaittavissa laskeva trendi onnistumisprosentin ja monistetun tuotteen koon välillä. Poikkeuksena BTmixin + genetics-puikon yhdistelmä EZ1-eristyksellä (kuva 6a). Menetelmä antoi enemmän onnistuneesti leimautuneita alleleita pitkien tuotteiden osalta, eikä yhtä jyrkkää laskua onnistumisprosentissa ollut havaittavissa lokusten alleelien pidentyessä. Lyhyiden tuotteiden onnistumisprosentin osalta kolmen parhaan menetelmän välillä (BTmix + genetics-puikko EZ1-eristyksellä, NaCl + genetics-puikko EZ1-eristyksellä ja BTmix + genetics-puikko CWD-eristyksellä) ei havaittu suuria eroja.



Kuva 6: a) EZ1-eristetyt näytteet taltiointimenetelmittain, b) CWD-eristetyt näytteet taltiointimenetelmittain. Y-akselilla alleelien onnistumisprosentti menetelmälle per lokus, x-akselilla lokukset vasemmalta oikealle nousevassa järjestyksessä lokuksissa havaittujen alleelien koon mukaan.

## 4. Pohdinta

Saatujen tulosten pohjalta vertailtavista menetelmistä BTmixin ja Copanin nylonnukattujen genetics-puikkojen yhdistelmä eristettynä EZ1-menetelmällä oli toimivin. Ensimmäiseen tutkimuskysymykseen antavatko vaihtoehtoiset taltiointimenetelmät paremman DNA:n saannon tai laadukkaampia tunnisteita kuin viskoosipuikko ja vesi saatiin vastaus. Vaihtoehtoiset taltiointimenetelmät antavat kvantifioinnin perusteella paremman DNA:n saannon ja kapillaarielektroforeesista saadut tunnisteet ovat laadukkaampia, sillä monistetuista tunnisteista useampi alleeli leimautui onnistuneesti. Lisäksi leimautuneiden alleelien RFU-arvot olivat vaihtoehtoisilla menetelmillä suurempia.

Oikeaa rikospaikkaa imitoivan tilanteen, jossa ympäristö ei ole vapaa DNA:sta hylsyjä valmisteltaessa ja ammuntojen aikana, ei havaittu tuottavan tutkimusnäytteisiin kontaminaatiota suurissa määrin. Myös suojavarustus näytteitä tutkittaessa oli riittävä, sillä näytteissä ei havaittu viitteitä DNA-tutkimusten suorittajasta. Tutkimuksiin kuluneesta pitkästä ajasta huolimatta taltioituista näytteistä saatiin onnistuneesti monistettua vapaaehtoisen tunnistetta vastaavia alleleja. Näytteiden prosessointiin ammunnoista kapillaarielektroforeesiin kului kokonaisuudessaan puolitoista kuukautta. Aikaa kului yksistään taltioinnin ja DNA:n eristyksen välillä yli kaksi viikkoa, joka on voinut vaikuttaa tutkittavaan DNA:han negatiivisesti. Aiempi tutkimus rikospaikoilta kerätyistä hylsyistä on antanut viitteitä siitä, että viiveet näytetaltioinnissa ja näytteiden käsittelyssä voivat heikentää saatuja tunnisteita ja niiden määrää (Bille et al., 2020). Tulevaisuudessa taltioinnin ja eristyksen välisen ajan vaikutusta tuloksiin olisi suotavaa tutkia aikapisteiden avulla. Nämä voisivat olla esimerkiksi päivä, kaksi päivää, viikko, kaksi viikkoa ja kuukausi.

Käsittelyyn kuluneen pitkän ajan lisäksi näytteiden säilytykseen käytetyn pakastimen ovi jäi yhden viikonlopun aikana raolleen, jolloin lämpötila pakastimen sisällä pääsi nousemaan 0 °C:seen. Näytteiden sulattamisen ja uudelleen jäädytyksen on ehdotettu vaikuttavan DNA:n laatuun (Chung et al., 2017), joten pakastimen sulamisen vaikutusta näytteisiin ei voida täysin poissulkea. Tutkittujen näytteiden pinnalla oli lähtötilanteessa odotettavasti enemmän DNA:ta epiteeli-DNA:n lisäyksen ansiosta, kuin jos näytteitä olisi käsitelty vain paljain käsin. On mahdollista, että saadut tulokset olisivat heikompia näytteistä, joihin DNA:ta on siirtynyt vain kosketuksen kautta. Tällöin näytteiden taltiointi ja eristys tulisi suorittaa viivytyksettä, jotta näytteistä saataisiin monistettua mahdollisimman laadukkaat tunnisteet.

Rajallisten resurssien puitteissa genetics-puikkoja ei testattu vettä taltiointipuskurina käyttäen. Aiempien tutkimusten perusteella nylonnukattujen puikkojen tiedetään kuitenkin antavan paremman saannon DNA-näytteitä taltioitaessa kuin pumpuli- (Benschop et al., 2010,

Jansson et al., 2020) tai viskoosipuikkojen (Bruijns et al., 2018), kun käytetty taltiointipuskuri on sama. Syyksi eroille DNA:n saannossa on esitetty nylonnukatun puikon avointa rakennetta, jonka ansiosta DNA:n on ehdotettu vapautuvan tehokkaammin, sillä solut eivät jää jumiin puikon kuitujen joukkoon (Dadhania et al., 2013; Jansson et al., 2020). Avoimesta rakenteestaan huolimatta nylonnukatut puikot imevät itseensä nestettä tiiviisti pakkautuneiden nylonkuitujen luoman kapillaari-ilmiön avulla (Dadhania et al., 2013).

Messinkihylsyjen ominaisuudet tai DNA:n pieni määrä eivät estäneet genetics-puikkojen käyttöä. Nylonnukatuilla puikoilla taltioiduista näytteistä mitattiin suurempi DNA:n konsentraatio kuin viskoosipuikolla taltioiduista. Nylonnukattuja puikkoja voi siis suositella käytettäväksi näytteiden taltiointiin, kun on tarpeen saada talteen mahdollisimman paljon DNA:ta tai tutkittavan näyttemateriaalin ominaisuudet ovat haastavat, kuten messinkihylsyillä.

Messingin lisäksi muita hylsyjen valmistusmateriaaleja ei otettu mukaan testeihin, sillä aiempien tutkimusten perusteella messingin tiedetään olevan materiaaleista haastavin. Ampumattomien patruunoiden messinkihylsyjen pinnalta pumpulipuikoilla ja vedellä taltioiduissa näytteissä degradaatiosuhteen on osoitettu olevan suurempi kuin pelkkää kuparia sisältävien luotien tai alumiinista valmistettujen hylsyjen (Holland et al., 2019). Vastaava havainto on tehty verrattaessa viskoosipuikolla messinki- ja nikkelihylsyistä taltioituja näytteitä (Prasad et al., 2020). Näyteprofiilien osalta alumiinista vedellä taltioiduista näytteistä 100 % on todettu tuottavan kokonaisen mtDNA MPS-profiilin (engl. massively parallel sequencing), mutta kuparista taltioiduista 36,1 % ja messingistä taltioiduista vain 33,3 % (Holland et al., 2019). Myös nikkelihylsyistä on osoitettu saatavan enemmän käyttökelpoisia tai täysiä profiileja kuin messinkihylsyistä (Prasad et al., 2020). DNA:n saannon osalta nikkelihylsyistä, joiden pinnalle oli lisätty HEKa soluja, saatiin soaking- ja rinse and swab -tekniikoilla taltioitua 9,4 % DNA:sta, mutta messingistä valmistetuista hylsyistä vain 1,5 % (Elwick et al., 2022). Ero saannossa nikkeli- ja messinkihylsyjen välillä on havaittu myös käytettäessä DNA:n lisäykseen sylkeä (Prasad et al., 2020). Eri metalleilla saatujen aiempien tulosten perusteella tässä tutkielmassa messingille toimiviksi todettujen menetelmien odotettiin olevan käyttökelpoisia myös muille metalleille.

Puikon lisäksi käytettävällä taltiointipuskurilla osoitettiin olevan merkitystä. BTmix antoi paremmat tulokset monistettujen alleelien osalta kuin NaCl, kun molemmille käytettiin samaa eristysmenetelmää. BTmixin toimivuus korostui etenkin pitkien alleelien osalta, jotka monistuivat paremmin kuin NaCl taltioiduissa näytteissä. NaCl-liuoksen käyttöä taltiointipuskurina puoltaa sen laaja saatavuus, säilyvyys ja edullinen hinta verrattuna BTmixin komponentteihin. 0,9-prosenttisen NaCl-liuoksen käytön museonäytteiden esikäsittelyssä on



myös todettu parantavan eristetyn DNA:n puhtautta ja laatua verrattuna veteen (Huang et al., 2019) ja ehkäisevän RNA:n degradaatiota vähintään 24 tunnin ajan mahdollisesti tukemalla solukalvoa (Vincek et al., 2003). On mahdollista, että 0,9-prosenttisen NaCl-liuoksen RNA:ta suojaava vaikutus ehkäisee myös DNA:n degradaatiota. NaCl-liuokselta puuttuu kuitenkin BTmixin kuparia kelatoiva vaikutus, joten sen kanssa suositellaan käytettävän eristysmenetelmää, jolla epäpuhtaudet saadaan puhdistettua näytteestä DNA:n eristyksen aikana.

Tässä tutkielmassa saatujen tulosten perusteella nylonnukatut genetics-puikot ovat käyttökelpoisia sekä NaCl-liuoksen että BTmixin kanssa EZ1- ja CWD-eristyksellä. Kummankaan menetelmän kohdalla puikkojen tai taltiointipuskureiden ei todettu aiheuttavan ongelmia eristysprosessiin. Eristysmenetelmien osalta nollahypoteesi, jonka mukaan eristysmenetelmien välillä ei ole eroja, hylättiin tunnisteiden osalta. EZ1-eristys antoi keskimäärin enemmän alleeleja tunnisteiden muodostamiseksi kaikilla taltiointimenetelmillä ja leimautuneiden alleelien RFU-arvot olivat suuremmat kuin CWD-eristettyjen. Tulokset voivat selittyä eristysmenetelmien eroilla, jolloin CWD-eristettyjen näytteiden DNA:n degradaatio tai PCR-reaktion inhibitio on ollut suurempaa. Saannon osalta CWD-eristys antoi suuremman DNA:n konsentraation, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. CWD-suoraeristyksen näytteen lopputilavuus ja DNA:n kokonaismäärä oli kuitenkin suurempi kuin EZ1-eristyksen, jonka ansiosta tutkittavaa näytemateriaalia riittää tarvittaessa useampaan PCR-monistukseen. Näytteen tilavuus on skaalattavissa käytetyn puskurin määrällä. Vaikutus DNA:n konsentraatioon tulee kuitenkin ottaa huomioon näytteillä, jotka sisältävät vain vähän DNA:ta. Tilavuuden skaalattavuuden lisäksi CWD-eristyksen eduksi voidaan tietyillä näytteillä katsoa eristysmenetelmän näytteiden puhdistuksen puute. DNA:ta ei suoraeristyksellä menetetä samaa määrää kuin näytettä puhdistettaessa (de Oliveira Fransisco et al., 2020), mutta tällöin epäpuhtaudet, kuten metallit, seuraavat näytteen mukana eristyksestä jatkokäsittelyyn. Näytteissä mahdollisesti esiintyvät PCR-inhibiittorit voivat siirtyä näytteen mukana PCR-reaktioon ja vaikuttaa näin negatiivisesti monistuvien alleelien määrään (Elwick et al., 2022). Metallin läsnäolon CWD-eristettävässä näytteessä voi odottaa vaikuttavan tuloksiin negatiivisesti, jos metallin on raportoitu sitoutuvan DNA:han tai inhiboivan PCR-reaktiota. Esimerkiksi kadmiumin on sitoutuessaan osoitettu aiheuttavan DNA:n rakenteellisia muutoksia ja vaurioita (Anastassopoulou, 2003, Bolognesi et al., 1999) sekä tina ja raudan inhiboivan DNA:n monistusta (Kuffel et al., 2021). Vertailua metallien vaikutuksesta CWD-menetelmällä eristettyihin näytteisiin ei ollut mahdollista muodostaa kirjallisuuden pohjalta, sillä kattavaa tutkimusta aiheesta ei ollut saatavilla tutkielmaa tehdessä.

CWD-menetelmällä eristettyjen näytteiden voidaan odottaa sisältäneen kuparia, sillä BTmixillä taltioiduissa ja CWD-menetelmällä eristetyissä näytteissä havaittiin selvä vaaleanpunainen sävy. GGH:n tiedetään muodostavan kuparin ionimuodon kanssa kompleksin, jonka vaaleanpunainen väri on havaittavissa paljaalla silmällä (Ding & Yang, 2015). Koska muutos oli havaittavissa yhdessä näytesarjoista, voidaan kuparia odottaa esiintyneen myös muissa näytteistä. Samankaltainen vaaleanpunainen väri havaittiin myös EZ1-eristyksessä lippaista 2. ja 3. taltioiduissa tausta-DNA:n kontrollinäytteissä. Kyseisissä näytteissä taltiointipuskurina käytettiin kuitenkin vettä, joten varmuutta värin syntymekanismista ei ole. On mahdollista, että vaaleanpunainen väri on syntynyt lippaiden sisältämän raudan ionien (Jung et al., 2016) reagoitessa EZ1-kitin G2 puskurin komponenttien kanssa. Vaikka CWD-menetelmän käytöstä on raportoitu positiivisia tuloksia rikospaikkaa simuloiville näytteille (de Oliveira Francisco et al., 2020), ei CWD-suoraeristystä tämän tutkielman tulosten valossa voi suositella käytettäväksi messinkihylsyle.

EZ1-eristuksen parempia tuloksia leimaautuneiden alleelien osalta voi selittää menetelmän käyttämä DNA:n puhdistus ja DNA:n sitominen magneettipartikkeleihin eristuksen aikana. Menetelmän vaikutuksista on aiemmin raportoitu verrattaessa EZ1-eristystä orgaaniseen eristykseen, jossa käytettiin fenolia tai kloroformia. Kuparipitoisuuden noustessa orgaanisen eristuksen teho laski huomattavasti, mutta EZ1-eristyksellä käyttökelpoisia profiileja saatiin 0,75 M kuparipitoisuuteen asti (Moreno & McCord, 2017). Tutkimusnäyteinä käytetyt Magtechin 9mm messinkihylsyt ovat Companhia Brasileira de Cartuchos yhtiön valmistamia, jonka tietoturvaselosteessa käsiaseiden patruunoiden ilmoitetaan pitävän sisällään 12–65-prosenttisesti kuparia ja 5–28-prosenttisesti sinkkiä (CBC, 2014). Hylsyissä käytetyn messingin kuparin ja sinkin suhde on tavanomaisesti 70:30 ja siitä käytetään nimitystä patruunamessinki (engl. cartridge brass) (National Institute of Justice, 2023b). Tutkimusnäytteisiin liuenneen kuparin tarkkaa määrää ei ollut mahdollista selvittää, sillä kuparipitoisuuden määrittämiseen käytettäviä menetelmiä ja laitteita ei tutkimuksen rajojen puitteissa ollut saatavilla.

Otos eristysmenetelmien vertailujen osalta oli kohtalaisen kapea, sillä käytettävät resurssit rajasivat voimakkaasti menetelmien valintaa. Jatkoa ajatellen QIAmp DNA Investigator -kitin, jäljempänä QIAmp-kitti, ottamista mukaan eristysmenetelmien vertailuun suositellaan harkittavan sillä saatujen tulosten perusteella. Eristysmenetelmän tehosta raportoineessa tutkimuksessa 7,62mm hylsyjen pinnalta taltioidut ja QIAmp-kitillä eristetyt näytteet sisälsivät 9,2 % vapaaehtoisen tunnisteiden alleeleista ja EZ1-eristetyt näytteet 2,5 % (da Rocha Marques et al., 2022). Harkittaessa QIAmp-eristysmenetelmän ottamista vertailuihin tulee

kuitenkin ottaa huomioon menetelmän vaatima aika ja työn määrä, jos eristys suoritetaan käsin (QIAGEN, 2020b, s. 17–21). Käsin eristettäessä etuna on näytemäärien skaalattavuus, mutta menetelmä on myös mahdollista automatisoida käyttäen QIACube Connect -laitteistoa (QIAGEN, 2020b). Tällöin laitteen kapasiteetti kuitenkin rajaa tutkittavien näytteiden määrää.

Multiplex-kittien tiedettiin kirjallisuuden perusteella suoriutuvan pitkien alleelien monistuksesta heikommin näytteillä, jotka sisältävät kuparia ja sinkkiä. Tästä huolimatta ESX 17 Fast -kitin toimivuutta vertailluille menetelmille päätettiin kokeilla. Kapillaarielektroforeesista saatujen tulosten perusteella pitkät tuotteet monistuivat heikommin ja monistettujen lokusten onnistumisprosentti per menetelmä laski suhteessa alleelien kokoon muilla kuin EZ1-eristetyillä ja BTmixillä taltioiduilla näytteillä. Tämä voi olla seurausta inhibitiosta PCR-reaktion aikana tai DNA:n degradaatiosta. Kvantifiointiin käytetyn rotor-gene-laitteen karmininpunaisella kanavalla ei kuitenkaan havaittu viitteitä inhibitiosta. Kanava mittaa inhibitiota seuraamalla 434 bp mittaisen sisäisen kontrollin monistumista (QIAGEN, 2018). Inhibitiota on aiemmin esitetty syyksi epäonnistuneille tunnisteille näytteistä, joiden sisäinen kontrolli monistui ongelmitta (Patterson et al., 2021), joten DNA:n monistumisen inhibitio on mahdollisesti jäänyt kvantifioinnin puutteiden takia havaitsematta. Sisäinen kontrolli mittaa reaktioseoksessa vapaana esiintyviä inhibiittoreita, jolloin DNA:han jo sitoutuneet inhibiittorit jäävät raportoimatta (Patterson et al., 2021). Lisäksi käytetyn RGQ-kitin sisäisen kontrollin ja näytteiden pipetointi reaktiorenkalle tapahtui juuri ennen kvantifiointia. Tällöin näytteiden sisältämän kuparin ja sinkin vaikutusaika on jäänyt verrattain lyhyeksi. Toisaalla inhibitiolla ei kuitenkaan ole raportoitu olleen suurta vaikutusta messinkihylsystä taltioitujen näytteiden analysointiin (Bille et al., 2020), mutta siitä huolimatta yksin rotor-gene-laitteen karmininpunaiselta kanavalta saatujen tulosten perusteella inhibition mahdollisuutta ei voida sulkea pois.

Kvantifioidun DNA:n degradaatiota ei arvioitu rotor-gene-laitteella, vaikka tämä on laitteen ja käytetyn RGQ-kitin avulla teoriassa mahdollista. RGQ-kitin reaktioseoksen sisältämä polymeerasi monistaa ihmisen autosomaalisen DNA:n lokusta 4NS1C, jossa esiintyvän 91 bp mittaisen alueen monistumista seurataan keltaisella kanavalla (QIAGEN, 2018). Monistettavan alueen pienen koon ansiosta laite raportoi kokonais-DNA:n konsentraation näytteestä, vaikka mitattava DNA olisi degradoitunutta. Laitteella voidaan mitata myös pidempien DNA-tuotteiden konsentraatiota näytteissä seuraamalla punaisella kanavalla saman 4NS1C lokuksen monistumista, mutta suuremman 353 bp mittaisen alueen osalta (QIAGEN, 2018). Näytteistä olisi ollut mahdollista havainnoida DNA:n degradaation tilaa vertaamalla keltaisen ja punaisen kanavan tuloksia (QIAGEN, 2018). Rotor-gene-laitteella

pidempien tuotteiden havainnointiin tarkoitettu punainen kanava ei kuitenkaan ollut tutkimusten aikaan käytettävissä.

Pitkien alleelien puuttuminen tuloksissa rajaa vertailtujen menetelmien käyttökelpoisuutta ESX 17 Fast -kittiä käytettäessä. Laadukasta tunnistetta varten tulisi määrittää mahdollisimman monen lokuksen alleelit. Tulosten perusteella kittiä voi suositella käytettäväksi messinkihylsyistä taltioiduille näytteille vain, mikäli metallien ja epäpuhtauksien läsnäolo näytteissä saadaan minimoitua esimerkiksi BTmixiä hyödyntämällä. Vaihtoehtoisten PCR-kittien käyttöä voi harkita tilanteissa, joissa tämä ei ole mahdollista. Erityisesti lyhyille tuotteille tarkoitettujen kittien, kuten AmpFLSTR MiniFiler (Applied Biosystems) käyttöä kannattaa selvittää niillä raportoitujen tulosten perusteella (Horsman-Hall et al., 2009; Lopes et al., 2009). Lyhyitä tuotteita monistavia kittejä voi suositella harkittavaksi erityisesti, jos tutkittavat näytteet sisältävät vain vähän tai erityisen vaurioitunutta DNA:ta. Myös PCR-reaktiossa käytettävän polymeerasientsyymien valintaa voi tarkastella, sillä kuparin inhibition tiedetään vaikuttavan voimakkaammin Taq- ja Q5-polymeeraaseihin kuin KOD-polymeeraasiin (Kuffel et al., 2021).

## 5. Yhteenveto

Messinkihylsyistä saatiin onnistuneesti monistettua vapaaehtoisen tunnistetta vastaavia alleleja eri menetelmillä taltioiduista näytteistä. Käytettäviä menetelmiä valittaessa DNA:n degradaation ehkäisy ja epäpuhtauksien puhdistus tulisi priorisoida taltioinnista lähtien. DNA:n vaurioituminen prosessin pitkittyessä ja inhibiittorien läsnäolo voidaan minimoida, kun prosessi suunnitellaan huolella alusta loppuun. Huomiota menetelmien valintaan tulee kiinnittää erityisesti, jos näytteissä epäillään olevan pelkän kosketuksen kautta siirtynyttä DNA:ta tai DNA:n tiedetään olevan valmiiksi vaurioitunutta.

Kysymykseen antavatko vaihtoehdot näytetaltiointimenetelmät paremman DNA:n saannon ammuttujen messinkihylsyjen pinnalta saatiin selkeä vastaus. Vaihtoehdoisten taltiointimenetelmien käyttö auttoi parantamaan DNA:n saantoa ja antoi enemmän käyttökelpoisia tunnisteita kuin perinteisellä kiedotulla kuitupuikolla ja vedellä taltioitaessa. Erityisesti metalleja ja epäpuhtauksia kelatoivan BTmixin käyttö nylonnukattujen puikkojen kanssa johti useamman alleelin leimautumiseen ja pidempien DNA-tuotteiden monistumiseen. Myös käytetyn eristysmenetelmän vaikutuksesta DNA:n määrään tai määritettyjen alleelien osuuksiin ja tunnisteiden vertailukelpoisuuteen saatiin vastaus. EZ1-eristyksellä määritettiin onnistuneesti useamman lokuksen monistuneet alleelit kuin CWD-suoraeristyksellä. Määritetyt tunnisteet olivat myös kokonaisempia EZ1-eristyksellä. DNA:n määrän osalta suoraeristuksen todettiin antavan suuremman konsentraation, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä.

Esitettyjen tulosten ja kirjallisuuden pohjalta viskoosipuikon ja veden yhdistelmää CWD-menetelmällä eristettynä ei voida suositella käytettäväksi DNA-tutkimuksissa ammutuista messinkihylsyistä. Näytteen puhdistuksen puute suoraeristyksellä yhdistettynä taltiointipuskuriin, joka ei kelatoi epäpuhtauksia ja viskoosipuikon suljettu rakenne luovat yhdistelmän, jossa messingin negatiivisia vaikutuksia DNA:han ja sen monistukseen ei saada ehkäistyä.

## 6. Kiitokset

Haluaisin kiittää kaikkia tutkimuksessa avustaneita tahoja. Kiitos ohjauksesta Heikki Helanterä ja Lauri Vaahtera. Piditte hienosti huolta, että tulokset pitivät sisällään vain oleellisen eikä turhaa rönsyilyä päässyt syntymään. Kommenttinne olivat korvaamaton apu kirjoittamisessa ja tutkielman lopullisen version saavuttamisessa. Kiitos tutkimuksissa minua avustanut rikosteknisen laboratorion henkilökunta. Ilman teitä näytteiden tuotto ja käsittely ei olisi ollut mahdollista. Kiitos Essi vertaistukena toimimisesta ja loistavasta palautteesta tiivistelmän kieliasusta. Erityiskiitos Memelle, joka pidit huolta, että muistin nukkua ja syödä tuloksia läpikäydessä ja tutkielmaa kirjoittaessa. Kiitos myös rakkaat vanhempani, jotka tarjositte mahdollisuuden paeta kirjoittamisen paineita kotiin jouluksi.

## 7. Kirjallisuus

- Anastassopoulou, J. (2003). Metal–DNA interactions. *Journal of Molecular Structure*, 651–653, 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00625-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00625-7)
- Andrushchenko, V., Van De Sande, J. H., & Wieser, H. (2003). Vibrational circular dichroism and IR absorption of DNA complexes with Cu<sup>2+</sup> ions. *Biopolymers*, 72(5), 374–390. <https://doi.org/10.1002/bip.10439>
- Applied Biosystems. (2004). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Applied Biosystems. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_042380.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042380.pdf)
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., & Dizdaroglu, M. (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 273(3), 601–604. <https://doi.org/10.1042/bj2730601>
- Bille, T. W., Fahrig, G., Weitz, S. M., & Peiffer, G. A. (2020). An improved process for the collection and DNA analysis of fired cartridge cases. *Forensic Science International: Genetics*, 46, 102238. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102238>
- Benschop, C. C. G., Wiebosch, D. C., Kloosterman, A. D., & Sijen, T. (2010). Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Science International: Genetics*, 4(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.07.003>
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., & Viarengo, A. (1999). Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(4), 287–292. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)33:4<287::AID-EM5>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:4<287::AID-EM5>3.0.CO;2-G)
- Bonsu, D. O. M., Higgins, D., & Austin, J. J. (2020). Forensic touch DNA recovery from metal surfaces – A review. *Science & Justice*, 60(3), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2020.01.002>
- Bonsu, D. O. M., Higgins, D., Henry, J., & Austin, J. J. (2021). Evaluation of the efficiency of Isohelix™ and Rayon Swabs for recovery of DNA from metal surfaces. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 17, 199–207. <https://doi.org/10.1007/s12024-020-00329-x>
- Brujns, B. B., Tiggelaar, R. M., & Gardeniers, H. (2018). The extraction and recovery efficiency of pure DNA for different types of swabs. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1492–1499. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13837>
- Burrill, J., Daniel, B., & Frascione, N. (2019). A review of Trace “Touch DNA” deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.019>
- Butler, J. M. (2005a). *Forensic DNA typing biology, technology, and genetics of STR markers*. (Second Edition). Academic Press.
- Butler, J. M. (2005b). Constructing STR multiplex assays. Teoksessa A. Carracedo (toim.), *Methods in molecular biology*, 297. (s. 53–66). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-867-6:053>
- Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>
- CBC. (2014). *Small Arms Ammunition Centerfire Pistol & Revolver and Rifle Cartridges – All Calibers up to .500. SDS N.º: 001 - Rev. 08*. Magtech Ammunition. <https://magtechammunition.com/wp-content/uploads/2018/08/SDS-001-Handgun-and-Rifle-Cartridges-All-calibers-up-to-.500.pdf>
- Chung, W. J., Cui, Y., Chen, C. S., Wei, W. H., Chang, R. S., Shu, W. Y., & Hsu, I. C. (2017). Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension. *Journal of biological physics*, 43, 511–524. <https://doi.org/10.1007/s10867-017-9466-3>
- Czado, N., Houston, R., & Hughes, S. (2022). Comparison of metal ions recovered during DNA analysis of brass ammunition and effects of copper and zinc ions on DNA profiling. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 8, 162–164. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2022.10.021>

- Dadhania, A., Nelson, M., Caves, G., Santiago, R., & Podini, D. (2013). Evaluation of Copan 4N6FLOQSwabs™ used for crime scene evidence collection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), 336–337. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.171>
- da Rocha Marques, B. C., Alem, L., de Melo, L. S., Nogueira, T. L., & da Silva, D. A. (2022). Comparison of three DNA extraction methods for three different types of fired and unfired ammunition. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 8, 59–61. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2022.09.022>
- de Oliveira Francisco, D., Lopez, L. F., de Toledo Gonçalves, F., & Fridman, C. (2020). Casework direct kit as an alternative extraction method to enhance touch DNA samples analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 47, 102307. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102307>
- Dierig, L., Schwender, M., & Wiegand, P. (2020). Looking for the pinpoint: Optimizing identification, recovery and DNA extraction of micro traces in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102191. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102191>
- Ding, X., & Yang, K. L. (2015). Quantitative serine protease assays based on formation of copper(II) - oligopeptide complexes. *The Analyst*, 140(1), 340–345. <https://doi.org/10.1039/c4an01731e>
- Elwick, K., Gauthier, Q., Rink, S., Cropper, E., & Kavlick, M. F. (2022). Recovery of DNA from fired and unfired cartridge casings: comparison of two DNA collection methods. *Forensic Science International: Genetics*, 59, 102726. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102726>
- ENFSI DNA Working Group. (2016). *DNA Database Management Review and Recommendations*. ENFSI. [https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/final\\_version\\_enfsi\\_2016\\_document\\_on\\_dna-database\\_management\\_0.pdf](https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/final_version_enfsi_2016_document_on_dna-database_management_0.pdf)
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R companion to applied regression*. (3rd Edition). SAGE Publications.
- Gill, P., Fereday, L., Morling, N., & Schneider, P. M. (2006). The evolution of DNA databases — recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International*, 156(2–3), 242–244. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.05.036>
- Govindaraju, M., Shekar, H. S., Sateesha, S. B., Vasudeva Raju, P., Sambasiva Rao, K. R., Rao, K. S. J., & Rajamma, A. J. (2013). Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(5), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.03.003>
- Hedman, J., Akel, Y., Jansson, L., Hedell, R., Wallmark, N., Forsberg, C., & Ansell, R. (2021). Enhanced forensic DNA recovery with appropriate swabs and optimized swabbing technique. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102491. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102491>
- Holland, M. M., Bonds, R. M., Holland, C. A., & McElhoe, J. A. (2019). Recovery of mtDNA from unfired metallic ammunition components with an assessment of sequence profile quality and DNA damage through MPS analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.008>
- Horsman-Hall, K. M., Orihuela, Y., Karczynski, S. L., Davis, A. L., Ban, J. D., & Greenspoon, S. A. (2009). Development of STR profiles from firearms and fired cartridge cases. *Forensic Science International: Genetics*, 3(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.02.007>
- Hothorn, T., Hornik, K., van de Wiel, M. A., & Zeileis, A. (2008). Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. *Journal of Statistical Software*, 28(8), 1–23. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i08>
- Hu, X., Zhang, Q., Wang, W., Yuan, Z., Zhu, X., Chen, B., & Chen, X. (2016). Tripeptide GGH as the Inhibitor of Copper-Amyloid- $\beta$ -Mediated Redox Reaction and Toxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(9), 1255–1263. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00145>
- Huang, W., Xie, X., Liang, X., Wang, X., & Chen, X. (2019). Effects of Different Pretreatments of DNA Extraction from Dried Specimens of Ladybird Beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Insects*, 10(4), 91. <https://doi.org/10.3390/insects10040091>
- Jansson, L., Forsberg, C., Akel, Y., Dufva, C., Ansell, C., Ansell, R., & Hedman, J. (2020). Factors affecting DNA recovery from cartridge cases. *Forensic Science International: Genetics*, 48, 102343. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102343>



- Keskusrikospoliisi. (2018). *Keskusrikospoliisin toimintakertomus 2018*. Poliisi.  
<https://poliisi.fi/documents/25235045/27076143/Keskusrikospoliisin-toimintakertomus-2018.pdf/41c59436-f146-0833-ab6c-d82e3de546ec/Keskusrikospoliisin-toimintakertomus-2018.pdf?t=1594279145995>
- Kuffel, A., Gray, A., & Daeid, N. N. (2021). Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02363-4>
- Lau, S.-J., Kruck, T. P. A., & Sarkar, B. (1974). A Peptide Molecule Mimicking the Copper(II) Transport Site of Human Serum Albumin: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE SYNTHETIC SITE AND ALBUMIN. *Journal of Biological Chemistry*, 249(18), 5878–5884. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)79900-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)79900-X)
- Lopes, V., Andrade, L., Carvalho, M., Serra, A., Balsa, F., Bento, A. M., Batista, L., Oliveira, C., Corte-Real, F., & Anjos, M. J. (2009). Mini-STRs: A powerful tool to identify genetic profiles in samples with small amounts of DNA. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 121–122. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2009.08.064>
- MacFarland, T. W., & Yates, J. M. (2016). *Introduction to nonparametric statistics for the Biological Sciences using R*. Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30634-6>
- Mawlood, S., Dennany, L., Watson, N., & Pickard, B. (2015). Analysis of DNA from Fired Cartridge Casings. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 9(8), 926–933.
- Montpetit, S., & O'Donnell, P. (2015). An optimized procedure for obtaining DNA from fired and unfired ammunition. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.012>
- Moore, D., Beaumont, D., Brown, M., Clayton, T., Coleman, K., Subhani, Z., & Thomson, J. (2021). An investigation of two methods of DNA recovery from fired and unfired 9mm ammunition. *Science & Justice*, 61(2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2020.11.002>
- Moreno, L. I., & McCord, B. R. (2017). Understanding metal inhibition: The effect of copper (Cu<sup>2+</sup>) on DNA containing samples. *Forensic Chemistry*, 4, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2017.03.005>
- Motulsky, H. (2018). *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*. (Fourth Edition) Oxford University Press.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M. A., Gajewski, E., & Dizdaroglu, M. (1991). Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, 30(20), 4873–4879. <https://doi.org/10.1021/bi00234a006>
- National Institute of Justice. (2011). *What Is STR Analysis?*. National Institute of Justice. <https://nij.ojp.gov/topics/articles/what-str-analysis>
- National Institute of Justice. (2023a). *Firearms examiner training: Alternate materials*. National Institute of Justice. <https://nij.ojp.gov/nij-hosted-online-training-courses/firearms-examiner-training/module-05/alternate-materials>
- National Institute of Justice. (2023b). *Firearms examiner training: Finishing*. National Institute of Justice. <https://nij.ojp.gov/nij-hosted-online-training-courses/firearms-examiner-training/module-05/finishing>
- Neuhäuser, M. (2011). Wilcoxon–Mann–Whitney Test. Teoksessa M. Lovric, (toim.), *International Encyclopedia of Statistical Science* (s. 1656–1658). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2\\_615](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_615)
- Patterson, C., Gray, S., Wendt, F. R., & Roy, R. (2021). Inhibition of DNA amplification caused by metal in extracted bloodstains and in direct amplification. *Forensic Science International: Genetics*, 55, 102598. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102598>
- Pek, J., Wong, A. C. M., & Wong, O. C. Y. (2017). Confidence intervals for the mean of non-normal distribution: Transform or not to transform. *Open Journal of Statistics*, 7(3), 405–421. <https://doi.org/10.4236/ojs.2017.73029>

- Prasad, E., Hitchcock, C., Raymond, J., Cole, A., Barash, M., Gunn, P., McNevin, D., & van Oorschot, R. A. H. (2020). DNA recovery from unfired and fired cartridge cases: A comparison of swabbing, tape lifting, vacuum filtration, and direct PCR. *Forensic Science International*, 317, 110507. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110507>
- Prasad, E., Hitchcock, C., Raymond, J., Cole, A., Barash, M., McNevin, D., & van Oorschot, R. A. H. (2022). Touch DNA recovery from unfired and fired cartridges: Comparison of swabbing, tape lifting and soaking. *Forensic Science International*, 330, 111101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111101>
- Promega. (2020). *Casework Direct System Instructions for Use of Products DC4560 and DC4561*. Promega. [https://fi.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/casework-direct-system-protocol-tmd067.pdf?rev=e552bcc03c9a420c8a1cc2c5a2eca2e2&sc\\_lang=en](https://fi.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/casework-direct-system-protocol-tmd067.pdf?rev=e552bcc03c9a420c8a1cc2c5a2eca2e2&sc_lang=en)
- Promega. (2023). *PowerPlex® ESX 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers*. Promega. [https://fi.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/powerplex-esx-17-fast-system-protocol.pdf?sc\\_lang=en?la=en](https://fi.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/powerplex-esx-17-fast-system-protocol.pdf?sc_lang=en?la=en)
- QIAGEN. (2010). *Investigator™ Template Files for GeneMapper® ID-X User Guide*. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=53fc83ee-7865-4099-b776-b750f7ffc271&lang=en>
- QIAGEN. (2018). *Investigator® Quantiplex® Pro RGQ Kit Handbook*. QIAGEN <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=57497d59-7a43-4eaf-8c94-086e88742e86&lang=en>
- QIAGEN. (2020a). *QIAgility® Version 4.18 User Manual*. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=565fa5ff-eb86-4141-9188-fa8e76e75eef&lang=en>
- QIAGEN. (2020b). *QIAamp® DNA Investigator Handbook*. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=26ef8f2c-7c2a-49e6-b2d2-39d4e130b3cc&lang=en>
- QIAGEN. (2022). *EZ1&2® DNA Investigator® Kit Handbook*. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=46064856-1b88-4b27-a825-d3f616e06c08&lang=en>
- R Core Team (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>
- Sajantila, A. (2010). DNA-sormenjäljistä DNA-tunnisteisiin. *Duodecim*, 126(19), 2321–2328. <https://www.duodecimlehti.fi/duo99115>
- Templeton, J. E. L., Taylor, D., Handt, O., Skuza, P., & Linacre, A. (2015). Direct PCR Improves the Recovery of DNA from Various Substrates. *Journal of Forensic Sciences*, 60(6), 1558–1562. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12843>
- Tucker, V. C., Hopwood, A. J., Sprecher, C. J., McLaren, R. S., Rabbach, D. R., Ensenberger, M. G., Thompson, J. M., & Storts, D. R. (2012). Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 systems. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.03.009>
- Institute of research in immunology and cancer. (2011). *Information on qPCR results*. University of Montreal. [https://genomique.irc.ca/resources/files/How\\_to\\_deal\\_with\\_qPCR\\_results.pdf](https://genomique.irc.ca/resources/files/How_to_deal_with_qPCR_results.pdf)
- Uzair, A., Rasool, N., & Wasim, M. (2017). Evaluation of different methods for DNA extraction from human burnt bones and the generation of genetic profiles for identification. *Medicine, science, and the law*, 57(4), 159–166. <https://doi.org/10.1177/0025802417723808>
- Vincek, V., Nassiri, M., Knowles, J., Nadji, M., & Morales, A. R. (2003). Preservation of tissue RNA in normal saline. *Laboratory Investigation*, 83(1), 137–138. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000047490.26282.cf>

- Welch, L. A., Gill, P., Phillips, C., Ansell, R., Morling, N., Parson, W., Palo, J. U., & Bastisch, I. (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Science International: Genetics*, 6(6), 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.03.005>
- Yang, J., Chen, J., Ji, Q., Li, K., Deng, C., Kong, X., Xie, S., Zhan, W., Mao, Z., Zhang, B., Yu, Y., Li, D., Cao, Y., Ye, K., Liu, Q., Wu, M., Chen, F., & Chen, P. (2022). Could routine forensic STR genotyping data leak personal phenotypic information? *Forensic Science International*, 335, 111311. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111311>

En ole käyttänyt tuottavaa tekoälyä tai tekoälyavusteista teknologiaa opinnäytetyöni suunnittelussa ja kirjoittamisessa. Otan täyden vastuun opinnäytetyöni sisällöstä.

## Liite 1. Parittainen Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi menetelmille

Parittainen Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi RFU-arvojen keskiarvoille menetelmittain. P arvon korjaus: Bonferroni-Holm.

	BTmix + genetics, CWD	BTmix + genetics, EZ1	viskoosi-puikko + vesi, CWD	viskoosi-puikko + vesi, EZ1	NaCl + genetics, CWD
BTmix + genetics, EZ1	0,018 *	-	-	-	-
viskoosipuikko + vesi, CWD	<0,001 ***	<0,001 ***	-	-	-
viskoosipuikko + vesi, EZ1	<0,001 ***	<0,001 ***	0,089 <sup>ns</sup>	-	-
NaCl + genetics, CWD	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	-
NaCl + genetics, EZ1	0,676 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***

ns, ei tilastollista merkitsevyyttä/ \*,  $p \leq 0.05$ / \*\*,  $p \leq 0.01$ / \*\*\*,  $p \leq 0.001$

## Liite 2. Menetelmien onnistumisprosenttien ominaisuuksien yhteenveto

Menetelmien onnistumisprosenttien tilastollisten ominaisuuksien taulukko, var = varianssi, CIL = 95 % luottamusvälin alaraja, CIU = 95 % luottamusvälin yläraja.

Menetelmä	n	keski- arvo	mediaani	keski- hajonta	var	pienin arvo	suurin arvo	CIL	CIU
BTmix + genetics, CWD	31	12,3	10,6	8,74	33,2	3,03	34,8	9,24	15,4
viskoosi- puikko + vesi, CWD	32	0,99	0	3,02	3,97	0	16,7	-0,05	2,04
NaCl + genetics, CWD	30	3,94	3,03	2,89	3,63	0	10,6	2,91	4,97
BTmix + genetics, EZ1	32	19,9	15,9	17,6	135,4	0	63,6	13,8	26,0
viskoosi- puikko + vesi, EZ1	31	1,86	0	2,92	3,71	0	9,09	0,83	2,89
NaCl + genetics, EZ1	32	14,9	9,85	14,0	85,4	0	59,1	10,0	19,7