

Taller de Análisis Forense de ADN

John M. Butler, PhD
 Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de E.U.

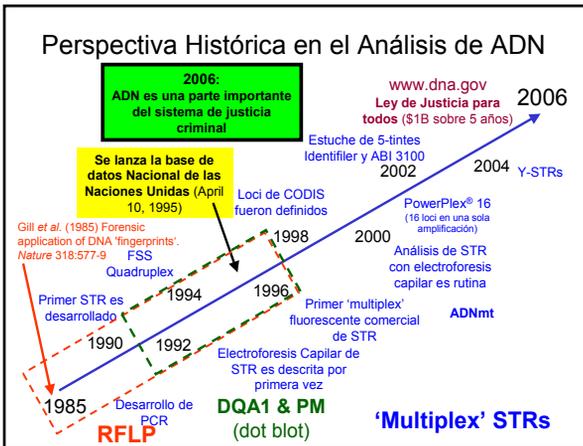
CONGRESO INTERNACIONAL DE GENÉTICA FORENSE
 Un enfoque en la tecnología del ADN
 16, 17 y 18 DE AGOSTO DEL 2006
 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
 HOTEL CAMINO REAL
 ORGANIZA: FISCALÍA GENERAL DEL ESTADO, CHIAPAS
<http://www.fge.chiapas.gob.mx/congresoforense/default.asp>

Contorno de Presentación

- **Análisis de ADN y STRs**
 - Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 51(2): 253-265.

RECESO

- **Electroforesis Capilar**
 - Butler, J.M., Buel, E., Crivellente, F., McCord, B.R. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis: using the ABI Prism 310 and 3100 Genetic Analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25: 1397-1412.



National Commission on the Future of DNA Evidence

•Reporte publicado en Nov 2000

•Se pidió estimara cual sería el estatus de análisis de ADN en 2, 5, y 10 años futuros

Conclusiones

Análisis de STR está aquí para quedarse por algunos años gracias a las bases de datos

<http://www.ojp.usdoj.gov/nij/pubs-sum/183697.htm>

'National DNA Index System' (NDIS)

<http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/index1.htm>

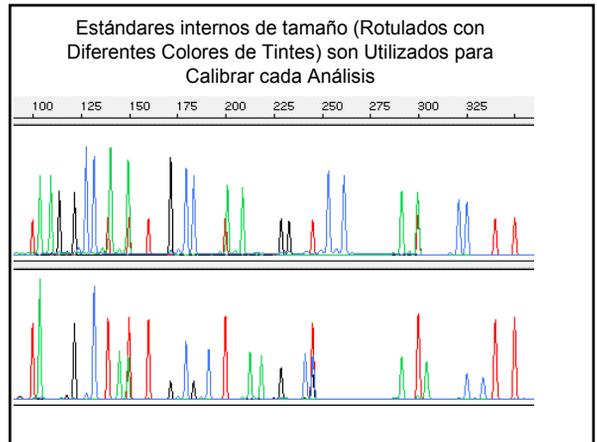
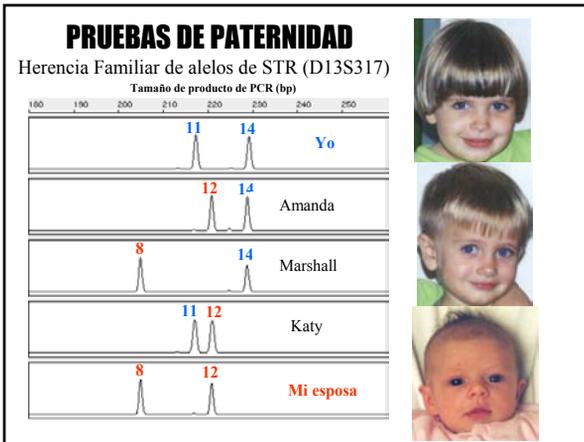
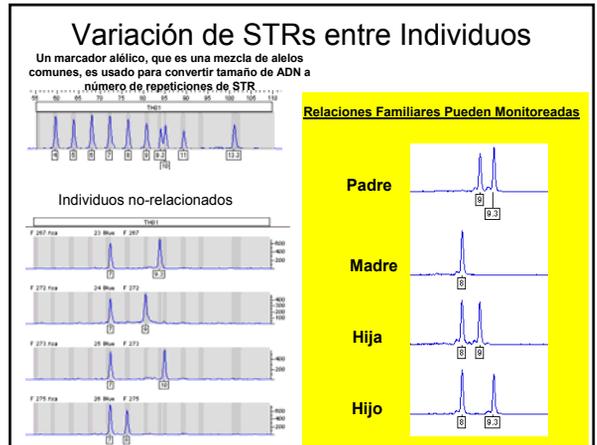
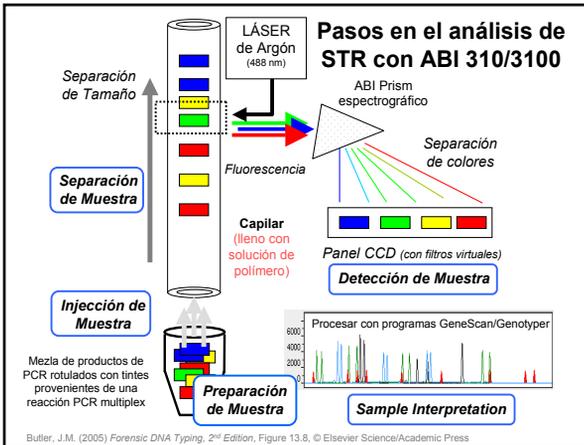
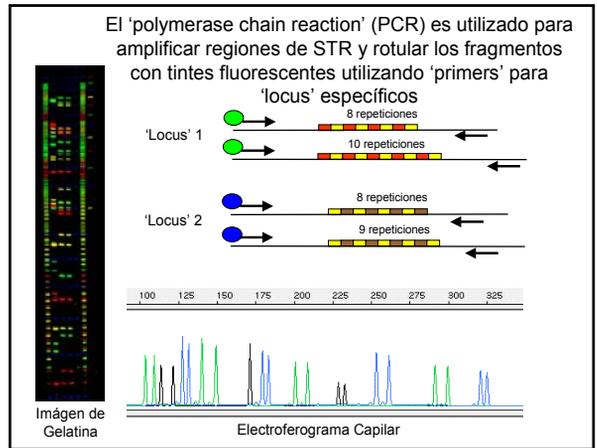
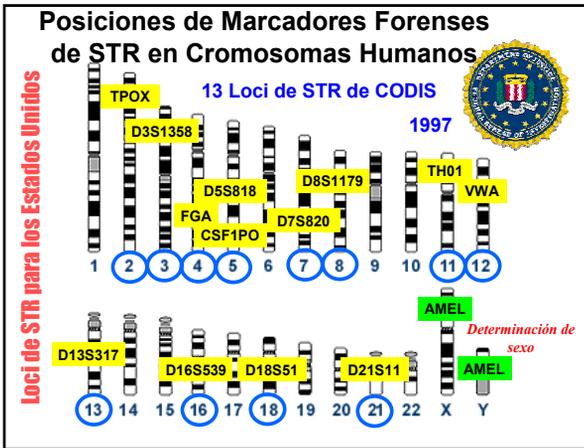
'Combined DNA Index System' (CODIS)

Creado en 1998 ahora conecta a todos los 50 estados
 Utilizado para conectar crímenes en serie y casos no resueltos con ofensores repetitivos
 Ofensores convictos y muestras de casos forense en adición a índice de personas desaparecidas
Requiere 13 marcadores de STR
 Ha ayudado en >36,000 investigaciones a través de la nación hasta Junio 2006
 Contiene más de 3.4 millones de perfiles de ADN

Aplicaciones del Análisis de Identidad Humana

- **Resolución de crimen** – establecer compatibilidad entre sospechoso y evidencia ...
- **Víctimas de Accidentes** – luego de accidente de avión...
- **Soldados en la guerra** – quien es el soldado "desconocido" ...
- **Pruebas de Paternidad** – quien es el padre ...
- **Reclamos de herencia** – quien obtiene el dinero ...
- **Investigaciones de personas desaparecidas** – de quien es el cuerpo ...
- **Base de datos de ofensores convictos** – resolución de casos archivados ...

Implica generación de perfiles de ADN usualmente con los mismos marcadores de STRs ('short tandem repeat') y luego COMPARAR A MUESTRA DE REFERENCIA



Análisis de Genotipo de STR por comparación a marcador alélico

- Genotipos son generados por comparación de tamaños de productos de PCR de los alelos de STR con marcadores alélicos compuesto de variantes comunes observados en la población

Áreas sombreadas son +/- 0.5 bp así que para un fragmento de D7S820 sea designado un alelo "12" este debe caer en el rango de 281.80 a 282.80 bp (ya que el alelo 12 en el marcador alélico es 282.30 bp)

1 en 837 trillones (probabilidad de que este perfil ocurra al azar)

Tipos de Unidades de Repeticiones de STR

Require separación de ADN basada en tamaño para distinguir los alelos el uno del otro

- 'Stutter' Alto
 - D**inucleótido (CA)(CA)(CA)(CA)
 - T**rinucleótido (GCC)(GCC)(GCC)
 - T**etra nucleótido (AATG)(AATG)(AATG)
 - P**enta nucleótido (AGAAA)(AGAAA)
- 'Stutter' Bajo
 - H**exa nucleótido (AGTACA)(AGTACA)

'Short tandem repeat' (STR) = microsatélite = repeticiones simples de secuencia (SSR)

Categorías para Marcadores STR

Categoría	Ejemplo de Estructura de Repetición	13 Loci de CODIS
Repeticiones Simples – contiene unidades de tamaño y secuencia idénticos	(GATA)(GATA)(GATA)	TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D16S539
Repeticiones Simples con alelos sin consenso (e.g., TH01 9.3)	(GATA)(GAT-)(GATA)	TH01, D18S51, D7S820
Repeticiones Compuestas – abarca dos ó más repeticiones simples adyacentes	(GATA)(GATA)(GACA)	VWA, FGA, D3S1358, D8S1179
Repeticiones Complejas – contiene varios bloques de repeticiones de unidades de tamaño variables	(GATA)(GACA)(CA)(CATA)	D21S11

Estas categorías fueron descritas por primera vez por Urquhart et al. (1994) Int. J. Legal Med. 107:13-20

¿Cuántos STRs hay en el genoma humano?

- Los esfuerzos del Proyecto del Genoma Humano han aumentado el conocimiento relacionado al genoma humano, y por lo tanto, existen ahora muchos más 'loci' de STR disponibles en comparación a hace 10 años atrás cuando los 13 'loci' de CODIS fueron seleccionados
- Más de 20,000 tetranucleótidos de loci de STR han sido caracterizados en el genoma humano (Collins et al. An exhaustive DNA micro-satellite map of the human genome using high performance computing. Genomics 2003;82:10-19)
- Puede que haya más de un millón de loci de STR presentes dependiendo en cómo sean contados (Elegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Rev Genet 2004;5:435-445).
- Secuencias de STR explican aproximadamente 3% del total del genoma humano (Lander et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921).

Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. J. Forensic Sci. 51(2):253-265.

'Multiplex' PCR (Procesamiento de muestras en paralelo)

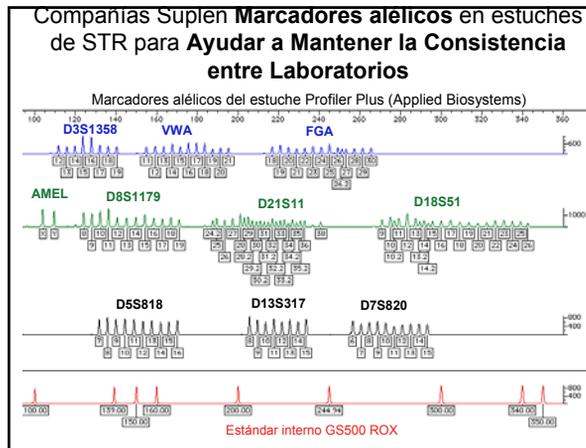
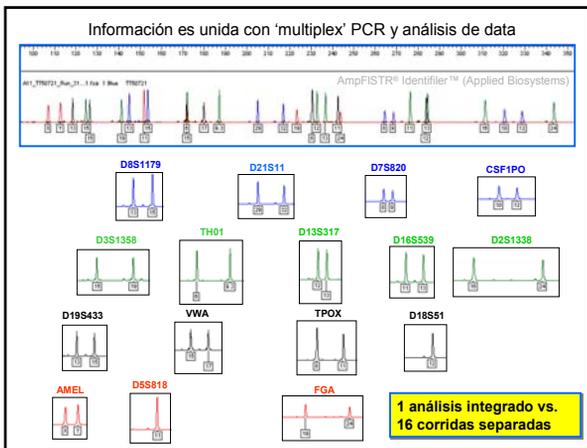
- 'Primers' compatibles son la llave para una reacción de 'multiplex' PCR exitosa
- Estuches de STR están disponibles comercialmente
- 15 ó más loci de STR pueden ser amplificados simultáneamente

Retos de 'Multiplexing'

- Diseño de 'primer' para encontrar 'primers' compatibles (no existe un programa)
- reacción de optimización es altamente empírica y a veces tarda meses

Ventajas de 'Multiplex' PCR

- Aumenta la información obtenida por unidad de tiempo (aumenta poder de discriminación)
- Reduce labor para obtener resultados
- Reduce plantilla de ADN requerida (menos muestra consumida)



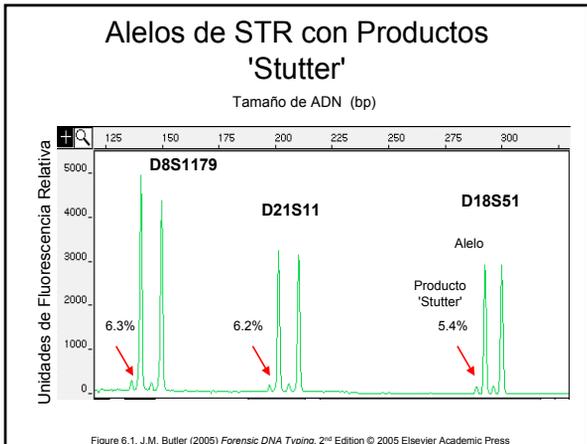
'Artefactos' Biológicos de Marcadores de STR

- Productos 'Stutter'
- Adición de nucleótidos 'Non-template'
- Microvariantes
- Patrones tri-alélicos
- Alelos Nulos
- Mutaciones

Capítulo 6 cubre estos temas en detalle

Productos 'Stutter'

- Picos que aparecen primordialmente una repetición menos que el alelo verdadero como resultado de 'resbalamiento' de la cadena durante la síntesis de AND
- 'Stutter' es menos pronunciado con unidades de tamaño más grandes (dinucleótidos > tri- > tetra- > penta-)
- Regiones de repeticiones largas generan más 'stutter'
- Cada producto de 'stutter' consecutivo es menos intenso (alelo > repetición-1 > repetición-2)
- Picos de 'stutter' hacen análisis de mezclas más complicados



Formación de Producto 'Stutter'

Unidades de repetición sobresale hacia afuera cuando ocurre 'respiración' de la cadena durante el proceso de replicación

Típicamente 5-15% de alelo verdadero en repeticiones tetranucleótidas de loci de STR

Deleción causada por 'resbalamiento' en la cadena copiada (inferior)

Insertión causada por 'resbalamiento' de la cadena copiante (superior)

Adición 'Non-Template'

- Polimerasa usualmente añade un nucleotido extra al final del producto de PCR; casi siempre una "A" (proceso llamado adenilación)
- Dependiente del extremo 5' del 'primer' de reversa; una "G" puede ser colocada al final del 'primer' para promover la adición 'non-template'
- Puede ser realizada con un aumento en la extensión al final del ciclo de PCR (ej., 15-45 min @ 60 ó 72 °C) – para darle más tiempo a la polimerasa
- Cantidades excesivas de plantilla de ADN en la reacción de PCR puede resultar en adenilación incompleta (no hay suficiente polimerasa para la reacción)

Mejor si NO hay una mezcla de picos "+/- A" (deseable tener adenilación completa para prevenir picos divididos)

D8S1179

Impacto del Nucleótido 5' en Adición 'Non-Template'

5'-ACAAG...
 Última Base para 'primer' con rotulación de tinte opuesta
 (Condiciones de PCR son las mismas para estas dos muestras)

5'-CCAAG...
 Promega incluye una secuencia ATT en el extremo 5' de muchos de sus 'primers' PP16 no rotulados para promover adenilación see Krenke et al. (2002). J. Forensic Sci. 47(4): 773-785
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/PP16primers.htm>

Altos Niveles de ADN Llevan a Adenilación Incompleta

Tamaño de ADN (bp)

Fluorescencia Relativa (RFUs)

10 ng plantilla (sobrecargado)

2 ng plantilla (nivel sugerido)

Figure 6.5. J.M. Butler (2005) Forensic DNA Typing, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

Impacto de Cantidad de ADN en PCR

Razón por la cual la cuantificación de ADN es importante antes de una amplificación 'multiplex'

Generalmente 0.5 – 2.0 ng de plantilla de ADN es mejor para estuches de STR

- Demasiado DNA
 - Picos fuera de escala
 - Picos divididos (+/-A)
 - Desbalance entre 'locus'
- Muy poco ADN
 - Desbalance de picos heterocigotos
 - Decaimiento alélico
 - Desbalance entre 'locus'

Efecto estocástico cuando se amplifican bajos niveles de ADN produce decaimiento alélico

Alelos Microvariantes "Fuera del Marcador"

- Definidos como alelos que no son múltiplos exactos de la repetición básica ó variantes de secuencia de la repetición ó ambos
- Alelos con unidades de repetición parciales designadas por el número de repeticiones completas y luego un punto decimal seguido del número de bases en la repetición parcial (Bar et al. Int. J. Legal Med. 1994, 107:159-160)
- Ejemplo: Alelo TH01 9.3: [TCAT]₄-CAT [TCAT]₅

Delección de T

Patrones de Tres Picos

Clayton et al. (2004) A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. J Forensic Sci. 49(6):1207-1214

"Tipo 1"
 Suma de alturas de dos de los picos es igual al tercero
 Más común en D18S51 y

"Tipo 2"
 Alturas de picos balanceadas
 Más común en TPOX y D21S11

Alelos Variantes Catalogados en STRBase

http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/var_tab.htm

Alelos fuera de marcador Patrones Tri-Alélicos

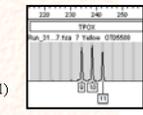
328 total variants reported as of 10/04/05

80 total patterns reported as of 11/03/05

- CSF1PO (15)
- D2S1338 (5)
- D3S1358 (23)
- D5S818 (7)
- D7S820 (23)
- D8S1179 (6)
- D13S317 (13)
- D16S539 (12)
- D18S51 (32)
- D19S433 (12)
- D21S11 (24)
- FES/FPS (1)
- FGA (83)
- F13A01 (1)
- HUMTH01 (11)
- Penta D (23)
- Penta E (16)
- TPOX (14)
- VWA (7)

Actualmente 328
 en 13/13 loci de CODIS + F13A01, FES/FPS, Penta D, Penta E, D2S1338, D19S433

- CSF1PO (3)
- D3S1358 (4)
- D5S818 (2)
- D7S820 (6)
- D8S1179 (5)
- D13S317 (4)
- D16S539 (4)
- D18S51 (9)
- D21S11 (7)
- FGA (12)
- FES/FPS (1)
- HUMTH01 (1)
- TPOX (13)
- VWA (9)



Alelos Nulos

- Alelo está presente en muestra de ADN pero no es amplificado debido a un cambio en nucleótido en el lugar de enlace del 'primer'
- Decaimiento alélico es un problema porque muestras heterocigotas aparecen como falsos homocigotas
- Dos grupos de 'primers' de PCR pueden producir diferentes resultados en muestras que se originan de la misma fuente
- Este fenómeno impacta las bases de datos de ADN
- Estudios de concordancia son llevados a cabo típicamente antes del uso de nuevos estuches de STR

Para más información, vea J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2ª Edición, pp. 133-138

Concordancia entre grupos de 'primers' de STR es importante para bases de datos de ADN

PowerPlex 16



Alelo 18 decae

17,18

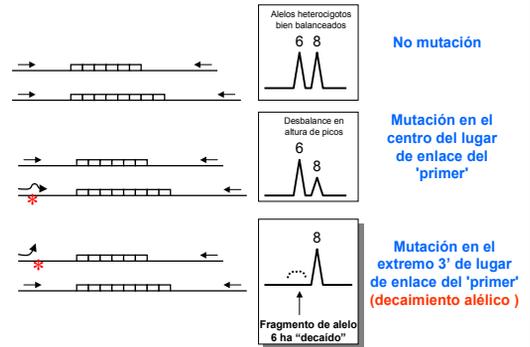
17,17

Base de Datos de ADN

Búsqueda resulta en un falso negativo (no ve muestras que deben ser compatibles)

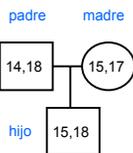
Bajar la rigurosidad de compatibilidad es una solución común

Impacto de Variación en Secuencia de ADN en el lugar de enlace de 'Primer' en PCR

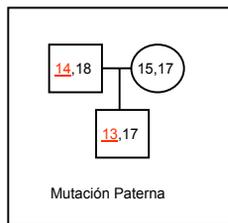


Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2ª Edición, Figure 6.9, ©Elsevier Academic Press

Mutación Observada en Trio Familiar



Transmisión Normal de Alelos (No Mutación)



Mutación Paterna

Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 6.9, ©Academic Press

Porcentos de Mutación de STR

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/mutation.htm>

"Locus" de STR	Meiosis Materna (%)	Meiosis Paterna (%)	Cualquier Padre	Total de mutaciones	Porcentaje
CSF1PO	70/179,353 (0.04)	727/504,342 (0.14)	303	1,100,683,695	0.16%
FGA	134/238,378 (0.06)	1,481/473,924 (0.31)	495	2,110,712,302	0.30%
TH01	23/189,478 (0.01)	29/346,518 (0.008)	23	75/535,996	0.01%
TPOX	16/299,186 (0.005)	43/328,067 (0.01)	24	83/627,253	0.01%
VWA	133/400,560 (0.03)	907/646,851 (0.14)	628	1,668/1,047,411	0.16%
D3S1358	37/244,484 (0.02)	429/336,208 (0.13)	266	732/580,692	0.13%
D5S818	84/316,102 (0.03)	537/468,366 (0.11)	303	924/784,468	0.12%
D7S820	43/334,886 (0.01)	550/461,457 (0.12)	218	811/796,343	0.10%
D8S1179	54/237,235 (0.02)	396/264,350 (0.15)	225	675/501,585	0.13%
D13S317	142/348,395 (0.04)	608/435,530 (0.14)	402	1,152/783,925	0.15%
D16S539	77/300,742 (0.03)	350/317,146 (0.11)	256	683/617,888	0.11%
D18S51	83/130,206 (0.06)	623/278,098 (0.22)	330	1,036/408,304	0.25%
D21S11	284/258,795 (0.11)	454/306,198 (0.15)	423	1,161/564,993	0.21%
Penta D	12/18,701 (0.06)	10/15,088 (0.07)	21	43/33,789	0.13%
Penta E	22/39,121 (0.06)	58/44,152 (0.13)	55	135/83,273	0.16%
D2S1338	2/25,271 (0.008)	61/81,960 (0.07)	31	94/107,231	0.09%
D19S433	2/228,027 (0.08)	16/38,983 (0.04)	37	75/67,010	0.11%
F13A01	1/10,474 (0.01)	37/85,347 (0.06)	3	41/75,821	0.05%
FES/FPS	3/18,918 (0.02)	79/149,028 (0.05)	Ninguno reportado	82/167,946	0.05%
F13B	2/13,157 (0.02)	8/27,183 (0.03)	1	11/40,340	0.03%
LPL	0/8,821 (<0.01)	9/16,943 (0.05)	4	13/25,764	0.05%
SE33 (ACTBP2)	0/30 (<0.30)	330/51,610 (0.64)	Ninguno reportado	330/51,940	0.64%

*Data used with permission from American Association of Blood Banks (AABB) 2002 Annual Report.

Resumen de Mutaciones de STR

Mutaciones impactan pruebas de paternidad e investigaciones de personas desaparecidas pero no afectan evidencia forense o compatibilidad entre evidencia-sospechoso...

- Mutaciones ocurren y necesitan ser consideradas
- Usualmente 1 en ~1000 meiosis
- Paternal normalmente mayor que maternal
- VWA, FGA, y D18S51 tienen los niveles más altos
- TH01, TPOX, y D16S539 tienen los niveles más bajos

Artículo de Repaso en Principales 'Loci' de STR

J. Forensic Sci., March 2006, Vol. 51, No. 2
 doi:10.1111/j.1556-8029.2006.00866.x
 Available online at: www.blackwell-synergy.com

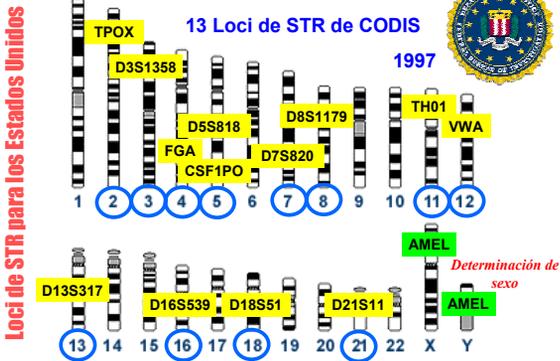
John M. Butler,¹ Ph.D.

Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing

Journal of Forensic Sciences 2006, 51(2): 253-265

- Repasa los estudios de STR, localizaciones genómicas, porcentos de mutación, potencial de relación genética, y variantes alélicas conocidos para STR autosomal y loci de Y-STR
- **Cubre características de 18 'loci' autosomales (13 loci principales CODIS, D2, D19, Penta D, Penta E, SE33) y 11 loci de Y-STR recomendados por SWGDAM**

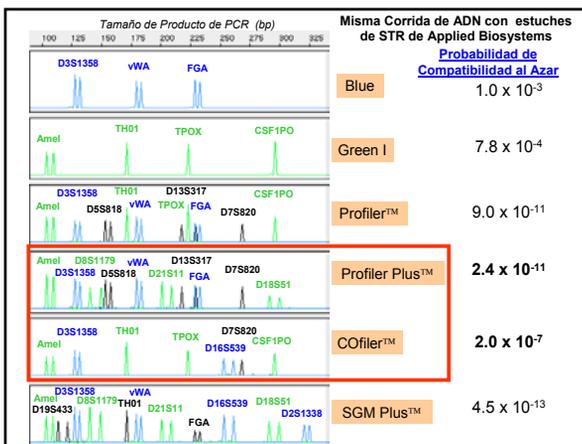
Posiciones de Marcadores Forenses de STR en Cromosomas Humanos



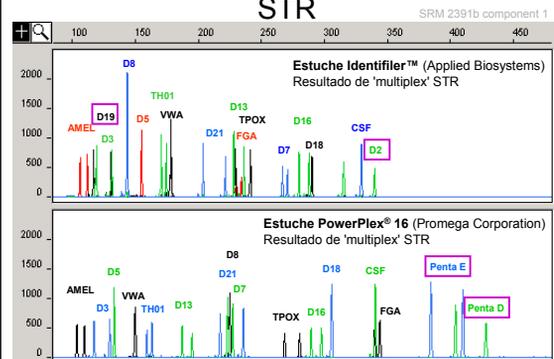
Características de Principales 'Loci' de STR

'Locus'	Localización Cromosomal	Posición Física (May 2004; NCBI construyó 35)
TPOX	2p25.3 thyroid peroxidase, 10 th intron	Chr 2; 1.472 Mb
D3S1358	3p21.31	Chr 3; 45.557 Mb
FGA	4q31.3 alpha fibrinogen, 3 rd intron	Chr 4; 155.866 Mb
D5S818	5q23.2	Chr 5; 123.139 Mb
CSF1PO	5q33.1 c-fms proto-oncogene, 6 th intron	Chr 5; 149.436 Mb
D7S820	7q21.11	Chr 7; 83.433 Mb
D8S1179	8q24.13	Chr 8; 125.976 Mb
TH01	11p15.5 tyrosine hydroxylase, 1 st intron	Chr 11; 2.149 Mb
VWA	12p13.31 von Willebrand Factor, 40 th intron	Chr 12; 5.963 Mb
D13S317	13q31.1	Chr 13; 81.620 Mb
D16S539	16q24.1	Chr. 16; 84.944 Mb
D18S51	18q21.33	Chr 18; 59.100 Mb
D21S11	21q21.1	Chr 21; 19.476 Mb

Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 51(2): 253-265



Estuches Comerciales 16plex de STR



From Butler, J.M. (2005) Constructing STR multiplex assays. *Methods in Molecular Biology: Forensic DNA Typing Protocols* (Carracedo, A., ed.), Humana Press: Totowa, New Jersey, 297: 63-66.

Valor de Estuches de STR

Ventajas

- Control de calidad de materiales está en manos del fabricante (ahorra tiempo para el usuario final)
- Mejora consistencia en resultados en laboratorios a través – mismo marcador alélico utilizado
- 'Loci' y condiciones de PCR comunes utilizadas – ayuda en los esfuerzos de base de datos de ADN
- Más fácil para el usuario obtener resultados

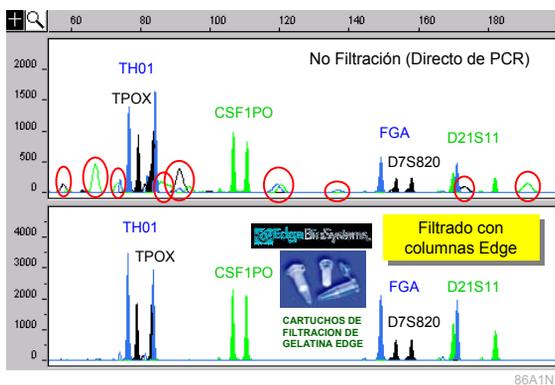
Desventajas

- Contenidos pueden no ser conocidos para el usuario (ej., secuencia de 'primers')
- Alto costo para obtener resultados

Síntesis de 'Primers' y 'Gotas' de Tinte

- 'Primers' de oligonucleótidos son sintetizados en dirección 3'-a-5' en soportes de fase sólida utilizando química de fosoramidita
- El tinte fluorescente es enlazado al extremo 5' del 'primer' (este es el último componente a ser añadido)
- La reacción de acoplamiento en cada paso de la síntesis de 'primer' no es 100%, lo que puede llevar a algunas impurezas de baja importancia
- Las moléculas del tinte que sobran y que no son removidas en el proceso de purificación post-síntesis pueden ser cargadas a través de la amplificación por PCR e inyectadas en el capilar para producir gotas de tinte ó artefactos de tinte en los electroferogramas de electroforesis capilar (alelos más anchos de lo normal)

Problemas con Artefactos de Tinte de 'Primers' Fluorescentes



Impacto de Muestras de ADN Degradadas

- Comparación a un número telefónico (hilera de 13 números)

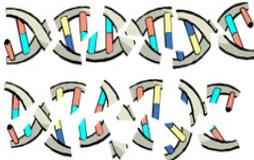
001-301-975-4049

- Si sólo tuviera "4049"...esta información tendría un valor limitado ya que no sería tan específica (y podría ser compatible con otros números telefónicos con diferentes códigos de área)

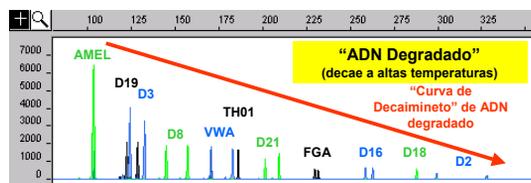
- Los perfiles de ADN son esencialmente una hilera de números – **si el ADN es dañado, entonces la hilera de números es más corta y menos informativa...**

-----4049 ó -----301-9-----

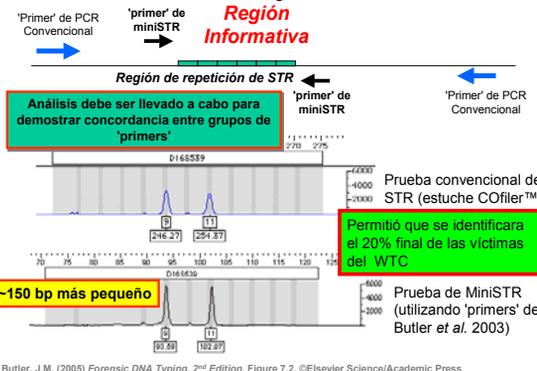
ADN Degradado



Segmentos más largos de ADN no pueden ser recuperados cuando las moléculas de ADN están fragmentadas en pedazos pequeños (causado por calor, agua ó bacterias)



Un miniSTR es un fragmento de STR de tamaño reducido que permite alta recuperación de información de muestras de ADN degradadas

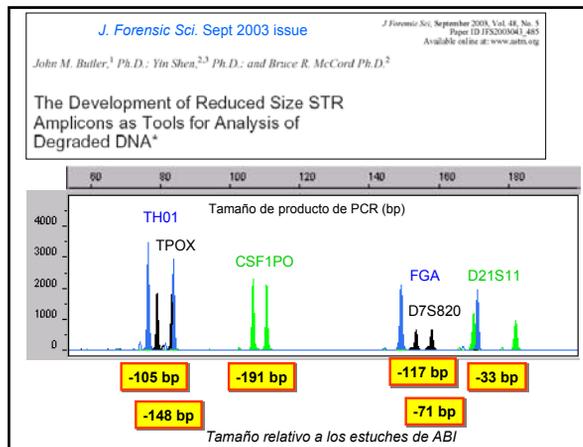


Butler, J.M. (2005) Forensic DNA Typing, 2nd Edition, Figure 7.2, ©Elsevier Science/Academic Press

'Timeline' para miniSTRs y Demostración del Valor de la Utilización de Fragmentos de Tamaño Reducido para ADN Degradado

- 1994 – FSS encuentra que los 'loci' de STR más pequeños trabajan mejor con restos de huesos quemados y tejidos del fuego de Branch Davidian
- 1997 – Nuevos 'primers' desarrollados para espectrometría de masa 'time-of-flight' para hacer fragmentos de STR más pequeños
- 2001 – Trabajo en NIST y la Universidad de Ohio con los STRs de CODIS; BodePlexes utilizados en investigación de WTC comenzando en 2002
- 2004 – Trabajo en NIST con non-CODIS (NC) miniSTRs
- 2006 – Applied Biosystems lanza un estudio de miniSTR 9plex

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/miniSTR/timeline.htm>

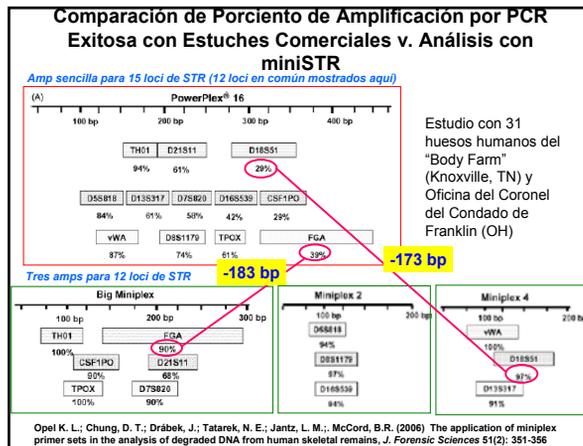


La Comisión Internacional de Personas Desaparecidas (ICMP) ahora utiliza miniSTRs

100s de huesos son analizados cada semana con miniSTRs para ayudar en la re-asociación de restos

Miniplex 02
 D21S11, D13S317, D7S820, CSF1PO, vWA and D8S1179

(Tom Parsons, comunicación personal)



Ejercicio EDNAP en ADN Degradado

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Forensic Science International

Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise

L.A. Dixon^{a,*}, A.E. Dobbins^a, H.K. Pulker^a, J.M. Butler^b, P.M. Vallone^b, M.D. Coble^b, W. Parson^c, B. Berger^c, P. Grubwieser^c, H.S. Mogensen^d, N. Morling^d, K. Nielsen^d, J.J. Sanchez^d, E. Petkovski^e, A. Carracedo^f, P. Sanchez-Diz^f, E. Ramos-Luis^f, M. Brion^f, J.A. Irwin^g, R.S. Just^g, O. Loreille^h, T.J. Parsons^h, D. Syndercombe-Court^h, H. Schmitterⁱ, B. Stradmann-Bellinghausenⁱ, K. Bender^j, P. Gill^k

Mezclas de 'primers' de MiniSTR y marcadores alélicos fueron provistos por el NIST

Artículo Reciente Abogando por los miniSTRs

Ellos recomiendan que los miniSTRs sean "adoptados como el camino a aumentar ambos la robustez y sensibilidad del análisis."

Forensic Science International 156 (2006) 242–244

Short communication

The evolution of DNA databases—Recommendations for new European STR loci

Peter Gill^{a,*}, Lyn Freeday^b, Niels Morling^c, Peter M. Schneider^d

*Forensic Science Service, Birmingham, UK
^bForensic Science Service, London, UK
^cDepartment of Forensic Genetics, Institute of Biomedical Sciences, University of Copenhagen, Denmark
^dInstitute of Legal Medicine, University of Cologne, Germany

Ellos recomiendan que los laboratorios europeos adopten tres nuevos loci de mini-STR: D10S1248, D14S1434 y D22S1045. (D14 sustituido por D2S441)

Identificando Víctimas de Desastres en Masa

Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing, 2nd Edition*, Chapter 24

POLICY FORUM
 EPIDEMIOLOGY

DNA Identifications After the 9/11 World Trade Center Attack

Leslie G. Biesecker,* Juan E. Bailey-Wilson, Jack Edlantyn, Howard Forman, Frederick R. Bieber, Charles Brenner, Bruce Budowle, John M. Butler, George Carroby, P. Michael Conneally, Barry Doolman, Arthur Eisenberg, Lisa Forman, Kenneth H. Kidd, Kenneth Lasker, Steven Nigro, Thomas J. Parsons, Elizabeth Pugh, Robert Shaler, Stephen T. Sherry, Amanda Sizer, Anne Walsh

Science (2005) 310: 1122-1123

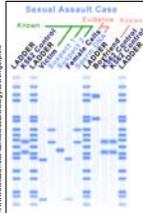
ADN altamente degradado fue obtenido de los restos humanos recuperados




Caso Forense más Grande de la Historia
 ~20,000 fragmentos de hueso fueron procesados
 >6,000 muestras de referencia provenientes de familia y efectos personales fueron analizadas

El Campo de ADN Sigue Hacia Adelante ...

El Pasado



RFLP

500 – 25,000 bp

El Presente



STRs

100 - 500 bp

El Futuro



miniSTRs

50 - 150 bp

STRBase

Base de Datos de Short Tandem Repeat de ADN en Internet
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>

Información General	Data de Interés Forense	Info Suplementaria
•Intro a STRs	•'Loci' de CODIS del FBI	•Lista de Referencia >2500
•Hoja de Hechos de STR	•Estándares de DAB	•Repaso de Tecnología
•Información de secuencia	•NIST SRMs 2391	•Direcciones para Científicos
•Estuches de 'Multiplex' STR	•Primers de PCR Publicados	•Enlaces a otros sitios en la red
•Reportes de Alelos Variantes	•STRs del cromosoma Y	•Cuantificación de ADN
•Diapositivas de Entrenamiento	•Data de población	•ADNmt
	•Estudios de Validación	•Nuevos STRs
	•miniSTRs	

Información nueva es añadida regularmente ...

RECESO

Pasos en el Análisis de ADN

Usualmente proceso de 1-2 días (un mínimo de ~5 horas)

Pasos Envueltos

Colectación

Almacenaje de Especimen

Extracción

Cuantificación

PCR Multiplex

Análisis de STR

Interpretación de Resultados

Base de Datos Almacenaje y Búsqueda

Cálculo de Probabilidad de Compatibilidad



Biología
 Mancha de Sangre, Isopo bucal, Colectación y Almacenaje de Muestras

Extracción y Cuantificación de ADN

Tecnología
 Amplificación por 'Multiplex' PCR, Separación de ADN, Análisis de STR

Si hay compatibilidad, comparación del perfil de ADN a frecuencias de alelos de la población para generar un reporte de caso con probabilidad de compatibilidad al azar con un individuo no relacionado

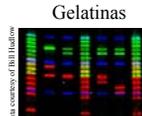
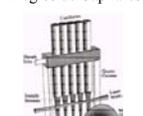
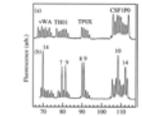
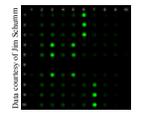
Búsqueda en Base de Datos de ADN

Hombr: 13,14-15,16-12,13-10,13-15,16

Interpretación de Resultados

Tecnologías de Análisis de STR

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/tech.htm>

<p>Gelatinas</p>  <p><i>J. Forensic Sci. (1998) 43: 1168-1180</i></p>	<p>Electroforesis Capilar</p>  <p><i>Electrophoresis. (1998) 19: 86-93</i></p>	<p>Arreglos de Capilares</p>  <p><i>Nucleic Acids Res. (1999) 27: e36</i></p>
<p>EC por 'Microchip'</p>  <p><i>PNAS (1997) 94: 10273-10278</i></p>	<p>Espectrometría de Masas</p>  <p><i>Int. J. Legal Med. (1998) 112: 45-49</i></p>	<p>Pruebas de Hibridización</p>  <p><i>Nucleic Acids Res. (2000) 28: e17</i></p>

Instrumentos Típicos Utilizados para el Análisis de STR

Termociclizador para amplificación por PCR

GeneAmp 9700



Instrumentos de electroforesis capilar para separar productos de PCR

Un capilar **Arreglo de 16-capilares**

ABI 310 **ABI 3100**



Artículo de Repaso en STRs y EC

pdf disponible de <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm>

Electrophoresis 2004, 25, 1397-1412

Review

John M. Butler¹
 Eric Buefl²
 Federica Crivellente^{3*}
 Bruce R. McCord³

Forensic DNA using the AB for STR anal

¹National Institute of Standards and Technology, Biotechnology Division, Gaithersburg, MD, USA
²Vermont Forensic Laboratory, Waterbury, VT, USA
³Ohio University, Department of Chemistry, Athens, OH, USA

DNA typing with short applications including such as the ABI Prims for many laboratories ing sample preparat results using CE syst ered in the context throughput and ease

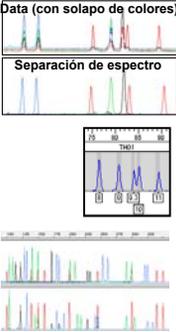
Contents

1	Introduction	1397
1.1	General aspects	1397
1.2	Early work with CE	1400
2	Sample preparation and injection	1401
3	Sample separation	1402
3.1	The polymer separation matrix	1403
3.2	The buffer	1403
3.3	The capillary	1404
4	Sample detection	1405
5	Sample interpretation	1406
5.1	Software used	1406
5.2	Assessing resolution of DNA separations	1406
6	Applications of forensic DNA testing	1407
6.1	Forensic casework	1407
6.2	DNA databasing	1408
7	Increasing sample throughput	1408
7.1	Capillary array electrophoresis systems	1408
7.2	Microchip CE systems	1409
7.3	Future methods for DNA typing with STR markers	1410
8	References	1410

Requerimientos Analíticos para el Análisis de STR

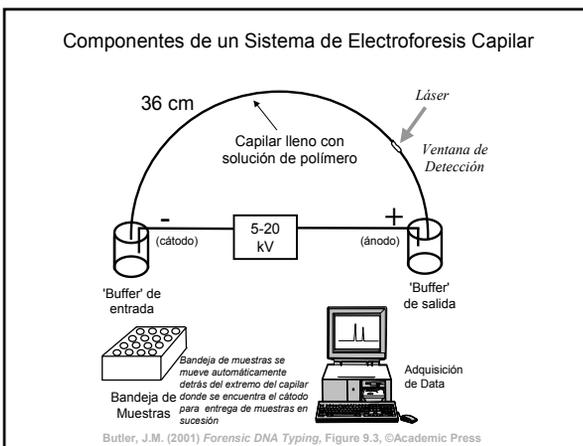
Butler et al. (2004) Electrophoresis 25: 1397-1412

- Tintes fluorescentes deben estar **separados en el espectro** para poder distinguir los diferentes rotulos (tintes) en los productos de PCR
- Productos de PCR deben estar **separados en espacio**—deseable tener resolución de una base hasta >350 bp para poder distinguir alelos variantes
- Alta **precisión entre corridas** — un estándar de tamaño interno es utilizado para calibrar cada corrida y poder comparar data a través del tiempo



Porqué Utilizar EC para Análisis de ADN?

- Inyección, separación, y detección son automatizadas.
- Separaciones rápidas son posibles
- Sensibilidad y resolución excelentes
- El tiempo en el cual cualquier banda eluye es determinado con precisión
- Información de picos es almacenada automáticamente



A principios de los 1990s la pregunta real era como transicionar de gelatina a capilar

- Capilares llenos de gelatina de acrilamida reticulada fueron tratados primero
- Reusables?
 - Formación de burbujas
 - Degradación termal
- Alternativa era no utilizar una gelatina en lo absoluto
 - Polímeros de tamizar rellenables
 - De todas formas, resolución era pobre desde el principio

Trabajos con EC y STRs

- Grupo de Barry Karger's (1988-1990)
 - Utilizaron capilares llenos de gelatina para separar ADN de cadena sencilla
 - Polímeros de tamizar introducidos en la forma de poliacrilamida lineal para separar fragmentos obtenidos utilizando enzimas de restricción
- Beckman P/ACE 2050 es introducido en 1992 como el primer sistema de EC disponible comercialmente unido a un láser para permitir detección por fluorescencia
- John Butler y Bruce McCord (1993-1995)
 - Primer análisis de STR con un sistema de EC de color utilizando tintes intercalantes y estándares de tamaño internos
- Grupo Rich Mathies' (1995)
 - Primer análisis de STR con sistema de EC multi-color (y multi-capilar) utilizando 'primers' rotulados con tintes
- ABI 310 es introducido en Julio de 1995 como el primer EC multi-color disponible comercialmente

Primer Análisis Rápido de STR con Electroforesis Capilar

Detección de un color con estándares de tamaños internos duales

Butler et al. (1994) *BioTechniques* 17: 1062-1070



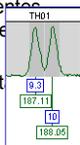
Llevado a cabo en diciembre 1993

Implementación de tecnología conlleva tiempo – el FBI no comenzó a correr muestras de casos utilizando STRs y EC hasta enero del 1999

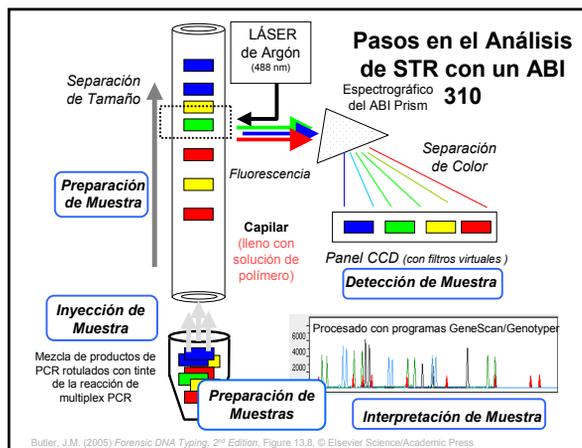
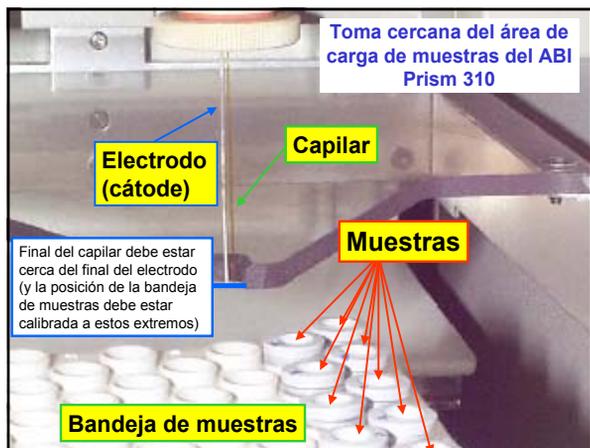
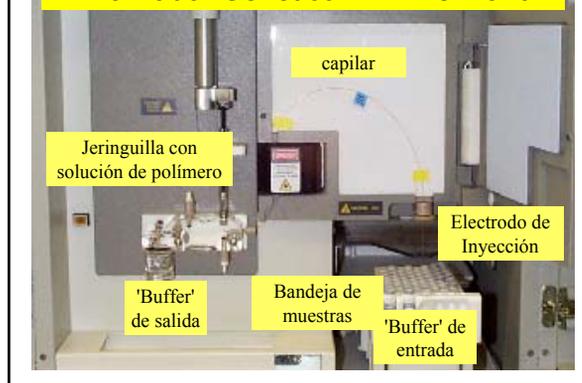
Requerimientos para Análisis de STR Confiables

Butler et al. (2004) *Electrophoresis* 25: 1397-1412

- Otorgamiento de tamaño confiable en una región de 75-500 pares de bases
- Alta precisión entre corridas entre muestras procesadas para permitir comparación de marcadores alélicos y muestras de STR procesadas en secuencia
- Separaciones de color efectivas utilizando diferentes grupos de tintes usadas para prevenir sangramiento entre 4 ó 5 colores diferentes
- Resolución de por lo menos 1 par de bases hasta >350 pares de bases para permitir detección confiable de alelos microvariantes



Analizador Genético ABI Prism 310



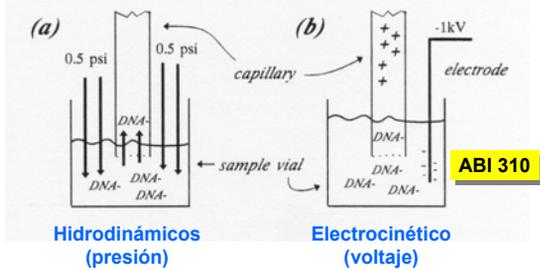
Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing, 2nd Edition*, Figure 13.8, © Elsevier Science/Academic Press

Proceso de Análisis Utilizando el 310/3100

- **Inyección**
 - Proceso de inyección electrocinética (formamide, agua)
 - Importancia de apilamiento de muestras
- **Separación**
 - Capilar – 50um de silica fundida, 43 cm
 - Polímero POP-4 – Polidimetil acrilamida
 - 'Buffer' - TAPS pH 8.0
 - Denaturantes – urea, pirolidinone
- **Detección**
 - Tintes fluorescentes con rasgos d excitación y emisión
 - CCD con filtros virtuales definidos producidos asignando ciertos pixeles

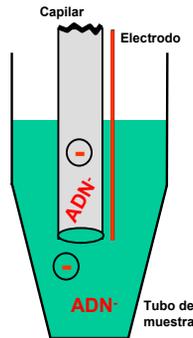
Inyección

Métodos de Inyección de EC



Ulfelder K. J.; McCord, B. R. (1996) Capillary Electrophoresis of DNA, In *Handbook of Capillary Electrophoresis* (Landers, J., ed.), CRC Press: NY, pp. 347-378.
 Butler, J.M. (1997) Effects of sample matrix and injection on DNA separations. *Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis* (Heller, C., ed.), Vieweg: Germany, Chapter 5, pp. 125-134

Proceso de Inyección Electrocinética



Cantidad de ADN inyectado es inversamente proporcional a la fuerza iónica de la solución

Muestras saladas resultan en inyecciones pobres

Conductividad de la Muestra Impacta la Cantidad Inyectada

$$[ADN_{iny}] = \frac{Et(\pi r^2) (\mu_{ep} + \mu_{eof}) [ADN_{muestra}] (\lambda_{buffer})}{\lambda_{muestra}}$$

[ADN_{iny}] cantidad de muestra inyectada

[ADN_{muestra}] concentración de ADN en la muestra

E fuerza eléctrica aplicada

λ_{buffer} conductividad del buffer

t tiempo de inyección

$\lambda_{muestra}$ conductividad de la muestra

r el radio del capilar

μ_{ep} la movilidad de las moléculas de la muestra

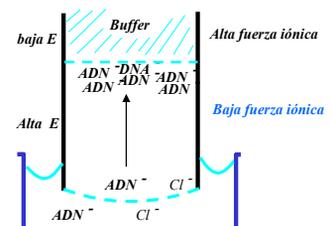
Iones de Cl⁻ y otros iones del 'buffer' presentes en la reacción de PCR contribuyen a la conductividad de la muestra y por lo tanto competirán con el ADN para ser inyectados en el capilar

μ_{eof} movilidad electroosmótica

Butler et al. (2004) Electrophoresis 25: 1397-1412

Dos efectos Mayores del Apilamiento de Muestras

1. Muestra es preconcentrada. Efecto es inversamente proporcional a fuerza iónica
2. Muestra es enfocada. Iones paran de moverse en campo eléctrico bajo
3. Movilidad de la muestra = $\mu_{ep} = \text{velocidad} / \text{campo eléctrico}$



Típica Preparación de Muestras para ADN de cadena sencilla

1. Llevar a cabo PCR con 'primers' rotulados con tintes
2. Diluir 1 µL del producto de PCR con 24 µL de **formamide desionizado**; añadir 1 µL de estándar interno de tamaño rotulado con ROX
3. Denaturar 2 minutos a 95 °C con el termociclizador
4. Enfríe a 4 °C en el termociclizador ó baño de hielo
5. La muestra permanecerá denaturada por al menos 3 días

Comentarios en cuanto a Preparación de Muestras

- Utilice 'formamide' de alta calidad (<100 µS/cm!)
 - ABI vende Hi-Di 'formamide'
 - Se puede aumentar pureza de 'Formamide' regular con resina de intercambio de iones
- Agua Desionizada vs. 'formamide'
 - Biega y Ducean (1999) *J. Forensic Sci.* 44: 1029-1031
 - Crivellente, *Journal of Capillary Electrophoresis* 2002, 7 (3-4), 73-80.
 - Agua funciona bien pero las muestras no igual de estables que cuando se utiliza 'formamide'; el agua tambien se evapora con el tiempo...
- Denaturación con calentamiento y enfriamiento
 - Utilice un termociclizador para calentar y un bloque de aluminio para enfriar
 - El paso de denaturación por calentamiento/enfriamiento es necesario sólo si el 'formamide' fue sustituido por agua...

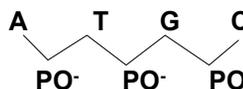
Separación

ADN y Electroforesis

“Desde un punto de vista práctico, el hecho de que la Electroforesis no pueda ser utilizada para fraccionar ó analizar ADN en base a tamaño es decepcionante”
 Olivera, *Biopolymers* 1964, 2, 245

$$\mu_{ep} = q/6\pi\eta r$$

iones pequeños con carga alta se mueven más rápido

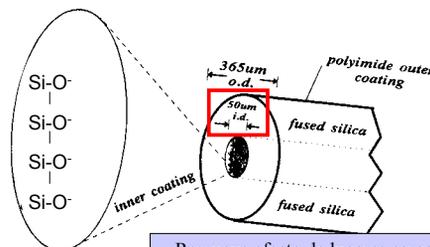


A medida que aumenta el tamaño, aumenta la carga!

Problemas de Separación

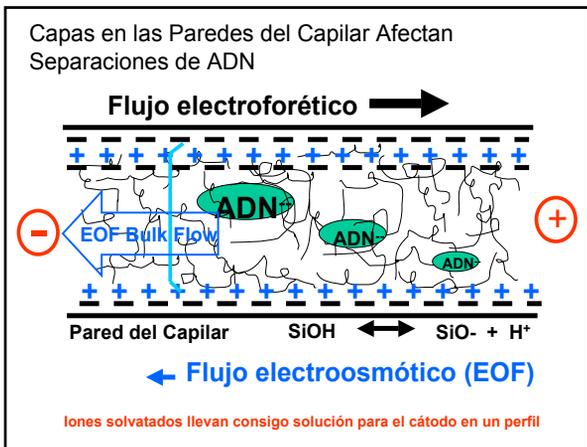
- **Capa en la pared del Capilar** -- capa dinámica con polímero
 - Paredes cargadas están enmascaradas por metil acrilamida
- '**Buffer**' de Electroforesis –
 - Urea para denaturar y viscosidad
 - 'Buffer' para pH consistente
 - Pírolidinone para denaturar el ADN
 - EDTA para proveer estabilidad y metales quelantes
- **Solución de Polímero** -- POP-4 (pero otros tambien funcionan)
- **Temperatura de Corrida** -- 60 °C ayuda a reducir las estructuras secundarias en el ADN y mejora la precisión. (Control de temperatura afecta la otorgación de tamaños de ADN)

Capa del Capilar



Remueve efecto de lugares cargados-elimina EOF, adsorción de la muestra

Capa dinámica de sitios cargados en un capilar de silica fundida es logrado con polímero POP-4



¿Qué hay en el POP-4 y el 'Buffer' del Analizador Genético?

© 1997 Oxford University Press Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 19 3925-3929

Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis
 Barnett B. Rosenblum*, Frank Oaks, Steve Menchen and Ben Johnson

PE Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94040, USA
 Received May 29, 1997; Revised and Accepted August 6, 1997

Ver también Wenz et al. (1998) *Genome Research* 8: 69-80

POP-4 (4% poly-dimetilacrilamide, 8 M urea, 5% 2-pirrolidinone)
 Patente de los EU 5,552,028 cubre síntesis de POP-4

*'Buffer' de corrida contiene 100 mM TAPS y 1 mM EDTA (ajustado a pH 8.0 con NaOH)
 TAPS = N-Tris-(hidroximetil)metil-3-aminopropano-ácido sulfónico

- ¿Cómo Mejorar la Resolución?**
1. Menor poder de fuerza de campo
 2. Aumenta largo del Capilar
 3. Aumentar Concentración de Polímero
 4. Aumentar largo de polímero
- Todos estos conllevan aumentar el tiempo de separación

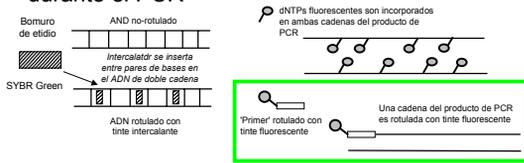
Detección

- Problemas de Detección**
- Tintes fluorescentes
 - Solapado de emisiones espectrales
 - Niveles relativos en 'primers' utilizados para rotular productos de PCR
 - 'gotas' de tinte (tinte libre)
 - Filtros Virtuales
 - 'hardware' (cámara CCD)
 - 'software' (matriz de color)
- Filtros determinan que largos de onda de luz son grabados de la cámara CCD

- Láser Utilizado en ABI 310**
- Láser del ion argón
 - 488 nm y 514.5 nm para tintes de excitación
 - Poder de 10 mW
 - Largo de vida ~5,000 horas (1 año de uso continuo)
 - Costo de reemplazo ~\$5,500
 - Lleva al más alto nivel de variabilidad entre instrumentos y es la parte más reemplazada
 - Separación de matriz de color es específico al láser utilizado en el instrumento

Métodos para Rotulación Fluorescente de ADN

- Tintes intercalantes (post-PCR)
- Inserción de nucleótidos rotulados con tinte durante el PCR
- Inserción de 'primers' rotulados con tinte durante el PCR

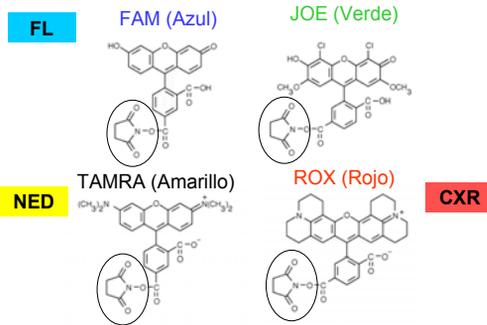


Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 10.2, ©Academic Press

Rotulación Fluorescente de Productos de PCR

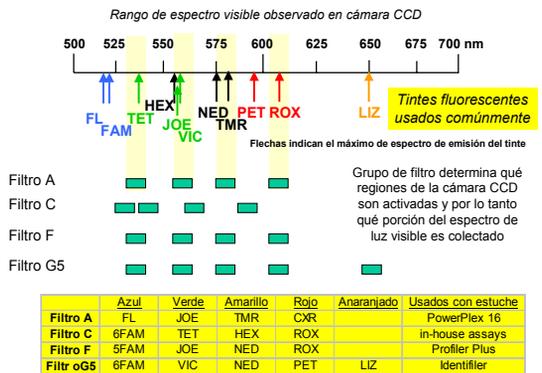
- Tintes son unidos a un 'primer' en un par utilizado para amplificar un marcador de STR
- Tintes son unidos a oligonucleótidos ('primers') por medio de enlaces NHS-esters y aminas en el extremo 5' del 'primer': tinte-(CH₂)₆-'primer'
- Oligonucleótidos rotulados con tinte son incorporados durante amplificación 'multiplex' proveyendo un marcador de color específico para cada producto de PCR
- Productos de PCR son distinguidos utilizando el sistema de imagen CCD en el 310

Tintes Fluorescentes Utilizados en Detección de 4-Colores

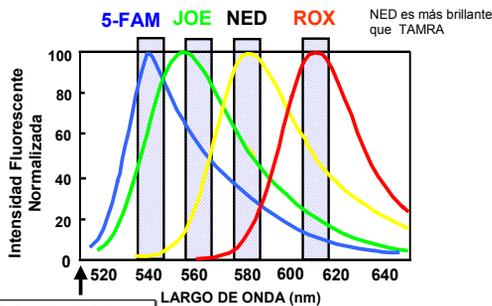


Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 10.3, ©Academic Press

Filtros Virtuales Utilizados en ABI 310



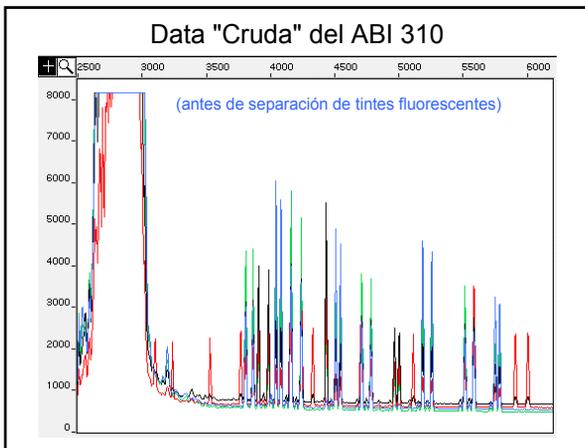
Espectro de Emisión Fluorescente para Tintes de ABI



Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing*, Figure 10.4, ©Academic Press

Atención!

- No hay filtros en el 310
- Es sólo la selección de píxeles en el detector CCD
- Toda la luz del 'grating' es colectada
- Usted seleccionará sólo algunos píxeles

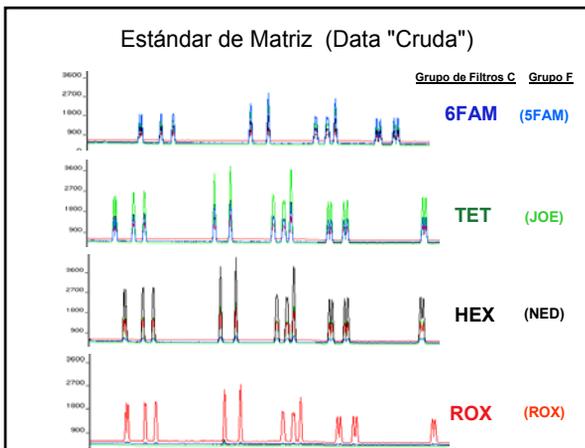


¿Porqué Hacer una Matriz?

La matriz es la solución a un problema:
 ¿Cuál es la contribución de cada tinte para cualquier largo de onda (grupo de filtros)?

Existen 4 tintes

- ¿Recuerdan el algebra de escuela superior?
- Para resolver un problema con 4 desconocidos, necesita 4 ecuaciones



Por Ejemplo

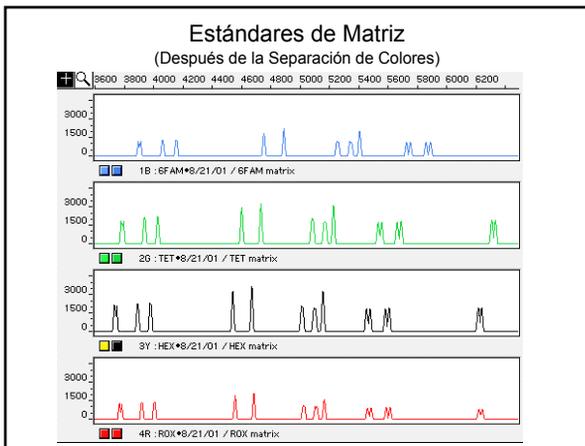
$I_{540} = bx_b + gy_b + yz_b + rw_b$ intensidad de azul
 $I_{560} = bx_g + gy_g + yz_g + rw_g$ intensidad de verde
 $I_{580} = bx_y + gy_y + yz_y + rw_y$ intensidad de amarillo
 $I_{610} = bx_r + gy_r + yz_r + rw_r$ intensidad de rojo

Donde
 b es el % de ADN rotulado azul
 g es el % de ADN rotulado verde,
 etc.

x,y,z,w son los números en la matriz (sensibilidad para cada color)

POP-4STR-MODF				
Reactions				
	B	G	Y	R
B	1.0000	0.8502	0.1380	0.0009
G	0.8300	1.0000	0.7622	0.0051
Y	0.6416	0.8324	1.0000	0.1102
R	0.4493	0.6484	0.7851	1.0000

Si resuelve xyzw para cada tinte individual, entonces puede determinar la contribución del tinte de cualquier mezcla



Comentarios en Matrices (Análisis Multi-Componente)

- Asegúrese de que el grupo de filtros y la matriz correctas sean aplicados cuando se colecte la data
- Usted siempre puede aplicar otra matriz a una muestra colectada en el ABI 310 pero esta debe ser corrida con el grupo de filtros correcto (matriz debe ser corrida primero en el ABI 3100)
- Es importante actualizar las matrices regularmente (dependiendo del uso) debido a diferencias en poder del láser a través del tiempo
- Un buen indicador de cuando correr una matriz nueva es la observación de 'pull-up' entre los colores de tinte cuando los picos no sobrepasan ~4,000 RFUs

Mismo Grupo de Tintes y Filtro F con Diferentes ABI 310

POP-451RM-000F				
Reactions				
	B	G	V	R
B	1.0000	0.9502	0.1390	0.0004
G	0.8500	1.0000	0.7622	0.0051
V	0.6416	0.8324	1.0000	0.1102
R	0.4493	0.6484	0.7851	1.0000

SFRM_J0E_NEO_N0R_POP4				
Reactions				
	B	G	V	R
B	1.0000	0.6444	0.0407	0.0010
G	0.6027	1.0000	0.5556	0.0061
V	0.3421	0.6146	1.0000	0.1060
R	0.1690	0.3478	0.5791	1.0000

El láser del instrumento hace una gran diferencia

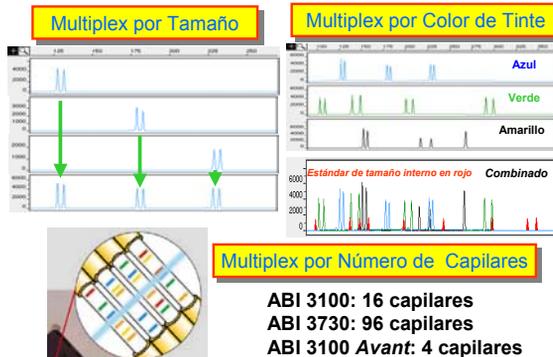
Lista de Inyección en 'Software' de Colección de Data

- Liste muestras a ser analizadas (repeticiones se pueden llevar a cabo fácilmente)
- Alista filtros virtuales en cámara CCD
- Alista tiempo de electroforesis y voltaje
- Alista tiempo de inyección y voltaje
- Alista temperatura de corrida
- Si es necesario, análisis de muestras pueden ser programado para separación automatizada de colores de matriz y otorgación de tamaño con estándares internos utilizando parámetros de análisis definidos

Maneras de Aumentar Rendimiento de Muestra

- Corra más gelatinas (método FMBIO)
- Aumentar velocidad de análisis de una muestra (sistema de microficha de EC)
- Multiplex tintes fluorescentes de diferentes colores ('Multiplexes' de PCR de niveles más altos)
- **Separaciones en paralelo utilizando arreglos de capilar** (ej., ABI 3100 ó 3130)
- Nuevas tecnologías de detección (Espectrometría de masa MALDI-TOF)

Métodos Para Procesamiento de Muestras en Paralelo



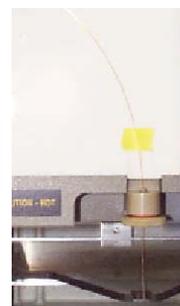
Análisis de STR de Alto Rendimiento en el ABI 3100 (arreglo de 16 capilares)



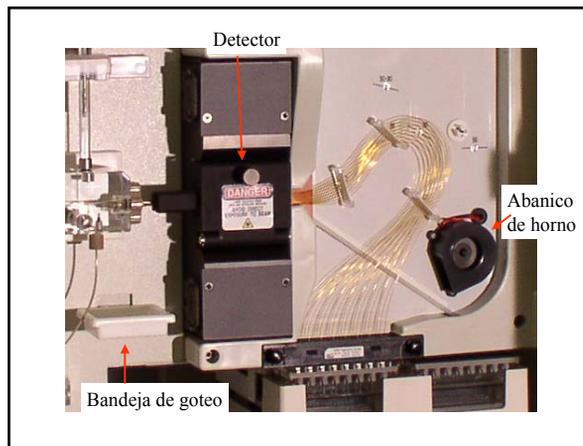
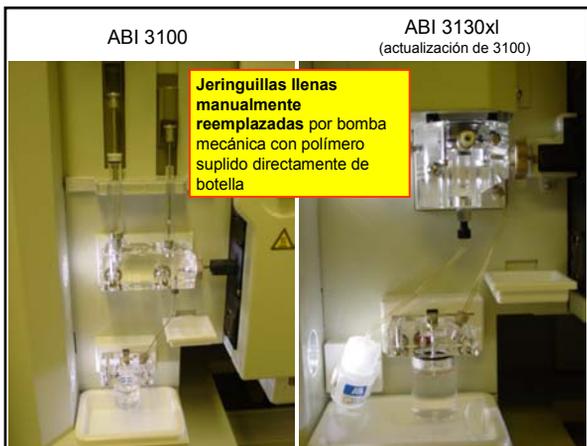
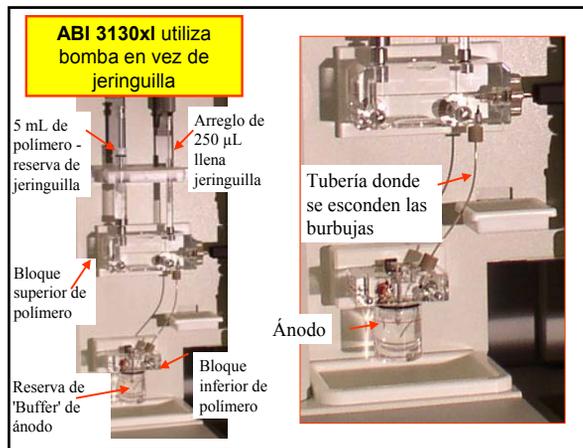
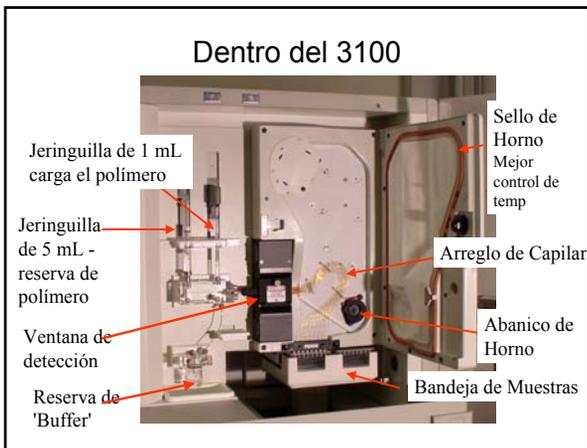
Aumentando el Rendimiento de la Muestra con Procesamiento Paralelo

ABI 3100 arreglo de 16 capilares

ABI 310 Un capilar



Diferencias sutiles en formación de matriz y algoritmos de tamaño– NO es directamente equivalente a 310



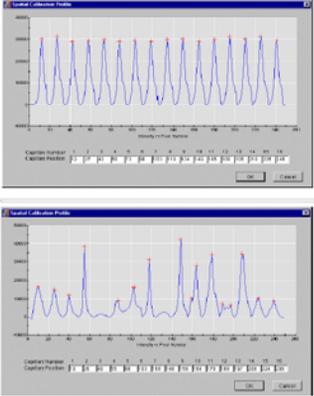
Calibración Espacial

Llevada a cabo después de:

- Instalar ó reemplazar un arreglo de capilares
- Remoción del arreglo del bloque de detección,
- (Debido al diseño, para remover el bloque superior del polímero para limpiar, debe remover el arreglo de la ventana de detección)

Información Provista:

Posición de la fluorescencia desde cada capilar en la cámara CCD



Resultados Espaciales

Buenos Resultados

Resultados Malos
Trate otra vez

Mantenimiento de ABI 3100

- Jeringuilla – goteo causa que capilar no se llene apropiadamente
- Almacenamiento y lavado de capilar – **si se seca, muere!**
- Bloque de bombeo – limpieza asegura que se llene correctamente
- Cambie el bloque de corrida regularmente

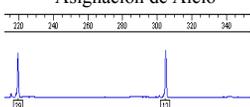
USTED DEBE SER LIMPIO ALREDEDOR DE UN SISTEMA DE EC!

Calibración de Espectro

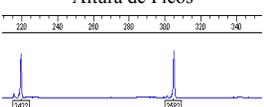
- Llevado a cabo:
 - Nuevo grupo de tintes en el instrumento
 - Después que láser ó cámara CCD ha sido realineada
 - Usted comienza a ver una disminución en la separación del espectro ('pull-up', 'pull-down')
- Usted debe tener una separación de matriz válida en el instrumento antes de correr las muestras

Problema de 'Pull-up'

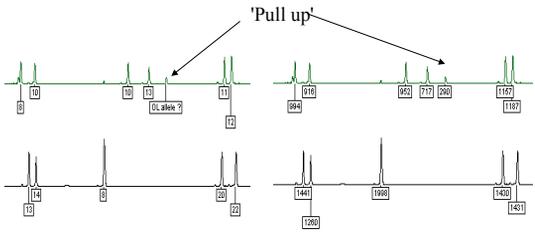
Asignación de Alelo



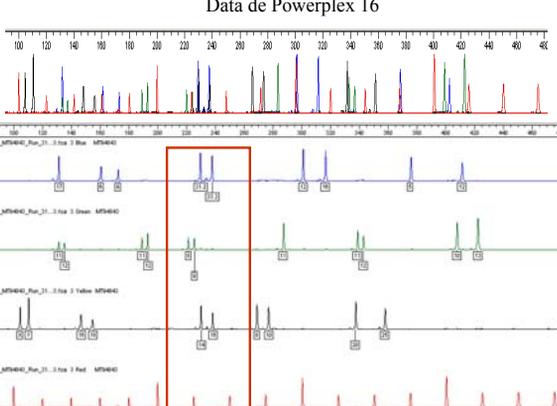
Altura de Picos



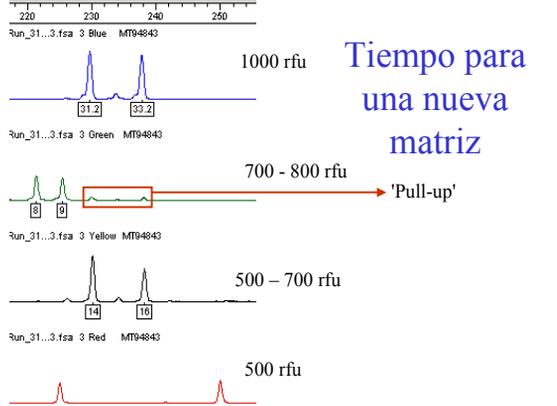
'Pull up'



Data de Powerplex 16



Tiempo para una nueva matriz

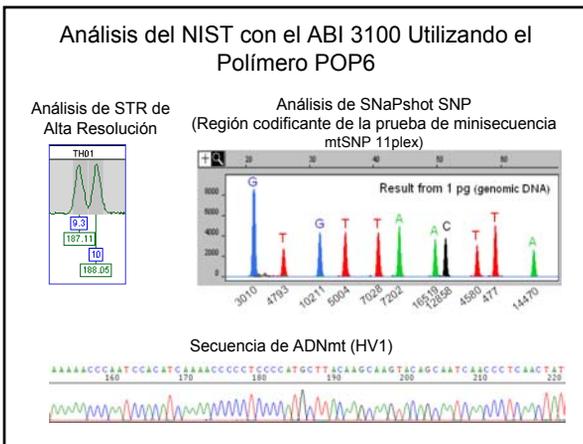
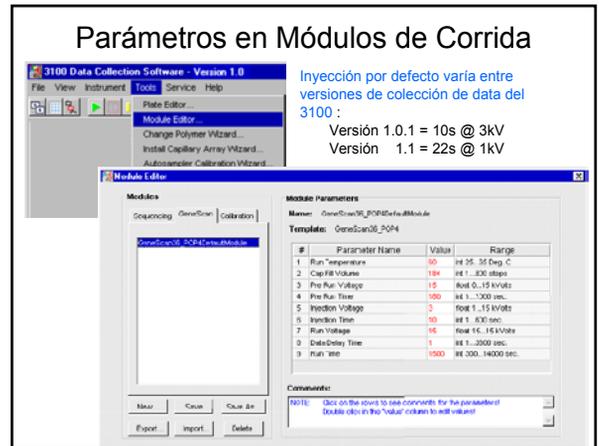
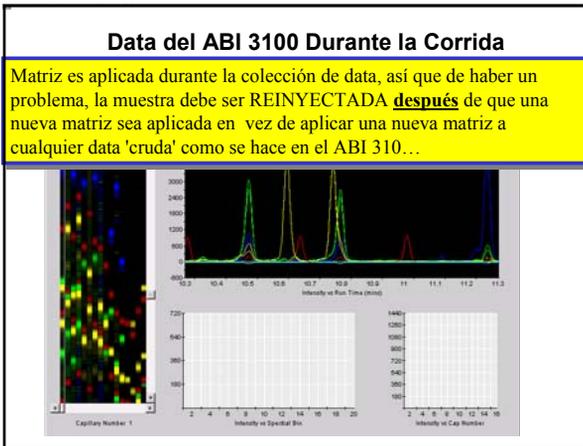
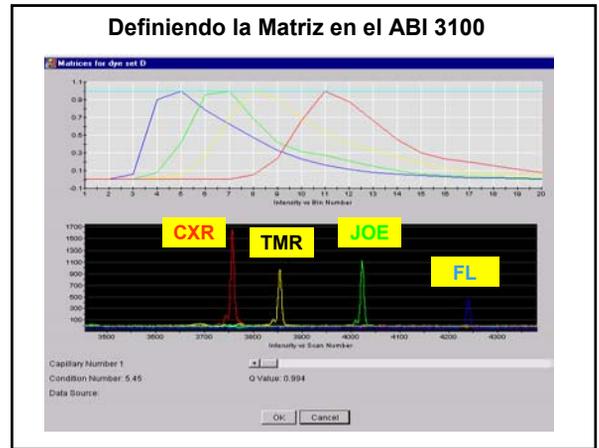
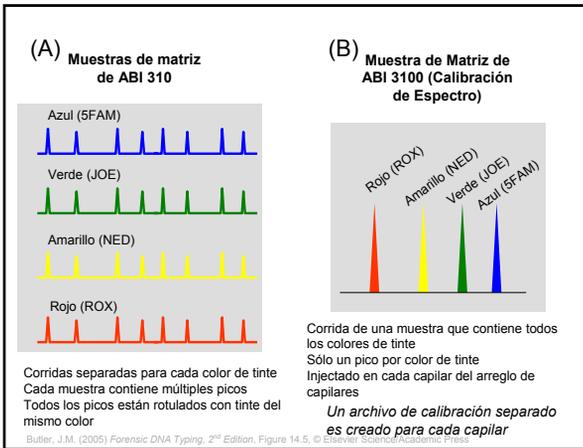


1000 rfU

700 - 800 rfU → 'Pull-up'

500 - 700 rfU

500 rfU



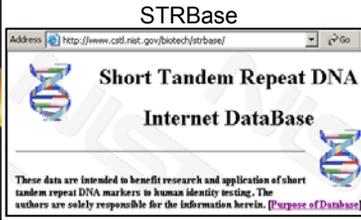
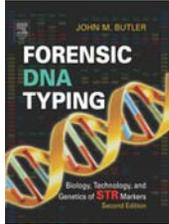
Conclusiones

Análisis de ADN por electroforesis capilar incluye:

- 1) El uso de buffers de polímeros entangled
- 2) Inyección por apilamiento de muestra
- 3) Fluorescencia multicanal inducida por láser
- 4) Calibración interna y externa

Si desea conocer más...

- *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*
- Página en la red del NIST:
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>
- John Butler email: john.butler@nist.gov



Agradecimientos

Equipo del Proyecto de Identidad Humana del NIST



John Butler (Lider) Margaret Kline Pete Vallone Jan Redman Amy Decker Becky Hill Dave Duewer

Funding from interagency agreement 2003-IJ-R-029 between the National Institute of Justice and the NIST Office of Law Enforcement Standards

Many wonderful collaborators from industry, university, and government laboratories.

Bruce McCord (Florida International University) por muchas de las diapositivas

Traducción al Español: Lilliana Moreno (Florida International University)

Gracias por su atención...

Our team publications and presentations are available at:
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm>

Questions?



<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>
john.butler@nist.gov