

Variación de perfiles genéticos obtenidos por PCR con y sin extracción de ADN a partir de manchas de sangre

Variation of the genetic profiles obtained by PCR with and without DNA extraction from blood stain

Mónica M. Villa-Loaiza^{1, 5}, Juan D. Granda-Agudelo^{2, 6}, Leonor Gusmão^{3, 7},
Adriana A. Ibarra-Rodríguez^{4, 8}

Resumen

La PCR sin extracción es una herramienta clave en investigaciones forenses, tratándose de una de las opciones a elegir cuando se tienen muestras con baja cantidad o calidad del ADN. El objetivo de este estudio fue determinar si hay diferencias entre los perfiles genéticos obtenidos por PCR i) en muestras de ADN extraídas con Chelex[®] 100, ii) en muestras de ADN obtenidas con el reactivo de purificación de muestras en tarjetas FTA, y iii) por la PCR muestras sin extracción, empleando el *kit* comercial AmpFLSTR[®] Identifiler[®], utilizado de rutina en el laboratorio IdentiGEN de la Universidad de Antioquia. Manchas de sangre almacenadas en tarjetas FTA[™] Genecard Whatman[™], papel de Cromatografía y papel filtro, se amplificaron por PCR sin extracción utilizando los *buffers* Ezway[™], PCRboost[™], STRboost[™] y Buffer 5X Colorless Go Taq[®] Flexi. Los perfiles obtenidos se analizaron por medio de electroforesis capilar. Los resultados muestran que con los *buffers* utilizados se obtiene la amplificación de todos los marcadores STRs de las muestras almacenadas en los tres diferentes soportes. Esto permite concluir, que utilizando la PCR sin extracción, además de reducirse los costos y el tiempo de procesamiento de las muestras, se logra obtener perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, generando resultados de manera más eficiente al no ser necesario realizar la extracción y purificación del ADN.

Palabras claves: PCR sin extracción, extracción de ADN, genética forense.

Abstract

The PCR without extraction is a key tool in forensic investigation, being a good option when samples with small amounts or degraded DNA are available. The objective of this study was to compare genetic profiles obtained by PCR using: i) DNA samples extracted using Chelex[®] 100, ii) DNA samples extracted using an FTA purification reagent, and iii) samples without extraction using the commercial kits AmpFLSTR[®] Identifiler[®], routinely employed in the laboratory IdentiGEN of the University of Antioquia. Blood stains were collected in FTA cards Genecard Whatman[™], chromatography paper, and in filter papers. PCR without extraction was performed using the buffers Ezway[™], PCRboost[™], STRboost[™], and Buffer 5X Colorless Go Taq[®] Flexi. The profiles were obtained by capillary electrophoresis. The results show that, using the above-mentioned buffers, all STR markers were amplified, for samples collected in the three different types of support. In conclusion, the PCR without extraction, apart from reducing the cost and time needed for processing the samples, it allows obtaining genetic profiles that meet the quality criteria established by the laboratory, in a more efficiently way, since DNA extraction and purification steps are eliminated.

Key words: DNA extraction, forensic genetics, PCR without extraction

Recibido: diciembre 2015; aceptado: abril 2017.

¹ Bióloga Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

² Analista, Laboratorio de Identificación Genética-IdentiGEN. Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

³ Investigadora Senior Instituto de Patología e Inmunología Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP). Brasil.

⁴ Directora, Laboratorio de Identificación Genética IdentiGEN Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: ⁵ <monicamarcelavillaloaiza@gmail.com>; ⁶ <juangranda225@gmail.com>; ⁷ <Leonor.gusmao@outlook.com>;

⁸ <adriana.ibarra@udea.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

La extracción del ADN, es el paso inicial en los procedimientos de un laboratorio de genética, consiste en aislar la molécula de ADN de cualquier tipo de célula nucleada, en condiciones de alta calidad, pureza y buena cantidad, que permita su caracterización genética (Chacon-Cortes et al. 2012); se utilizan diferentes metodologías como el Chelex® 100 y QIAGEN DNA Investigator Kit (Phillips et al. 2012, Ps et al. 1991) o el reactivo de purificación FTA (de Vargas Wolfgramm et al. 2009, entre otros).

Los métodos de extracción no recuperan todo el ADN contenido en la muestra; se han reportado pérdidas de hasta 75%, lo que se puede deber a los sustratos en que se encuentran y la metodología que se usa (Oorschot et al. 2010).

La PCR sin extracción del ADN ha sido ampliamente utilizada en microbiología desde principios de 1990, donde se conoce más comúnmente como colonia PCR. En ese mismo año Mercier et al. (1990), publicaron la descripción de un método para amplificar ADN directamente a partir de muestras de sangre entera (fresca o congelada), sin ninguna purificación.

Muchos autores (Barbaro et al. 2011, Kitpipit et al. 2013, 2014 a, b, Laurin et al. 2012, Linacre et al. 2010, Mercier et al. 1990, Myers et al. 2012, Ottens et al. 2013 a, b, Stene et al. 2011, Swaran y Welch 2012, Vallone et al. 2011, Verheij et al. 2011, Wang et al. 2009, Yang et al. 2007, Zhang et al. 2010) concluyen que la PCR directa, al no requerir de extracción o purificación del ADN, optimiza tiempo, es más sensible, no hay pérdida de muestra, no hay riesgo de contaminación, se disminuyen los costos en el procesamiento y es el mejor camino cuando se tienen evidencias trazas.

En caso que se presenten problemas en la amplificación de ADN, se pueden adicionar soluciones amortiguadoras que mejoran la especificidad y/o rendimiento de la PCR. Las que más se utilizan son betaina, sulfoxido de dimetilo, formamida, entre otros (Marshall et al. 2014, Schnoor et al. 2004). Para este estudio, se emplearon cuatro diferentes *buffers*: EzWay™, STRboost™, PCRboost™ y 5X Colorless Go Taq® Flexi Buffer.

Este estudio se enfocó en la comparación de los métodos para hacer PCR sin extracción con los *buffers* ya mencionados, así como la comparación de obtener perfiles genéticos de buena calidad, característica que se evaluó por

la altura de los picos en los electroferogramas, utilizando el *kit* comercial de identificación humana, Identifiler®, en muestras almacenadas en tarjetas FTA™ Genecard Whatman™, papel de cromatografía (Chromatography paper Whatman™) y papel de filtro (Rundfilter/Filter paper circles 125 mm).

MATERIALES Y MÉTODOS

Consentimiento informado. Cada individuo dentro del estudio firmó un consentimiento informado antes de proceder a la toma de muestra; para los individuos menores de edad firmó un representante legal (anexo 1).

Toma de muestras. Se analizaron en total 10 muestras de hombres, mujeres y niños. Se realizó la toma de muestras sanguíneas mediante una punción digital con lanceta en un dedo como lo indica el instructivo de toma de muestras I-SE-01-V09 del laboratorio Identigen; las tomas de sangre fueron depositadas en tres tipos de papeles en tarjetas FTA™ Genecard Whatman™, papel de Cromatografía (Chromatography paper Whatman™) y papel filtro (Rundfilter/Filter paper circles 125 mm).

Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó por los métodos de Chelex® 100 para el *kit* Identifiler®, siguiendo los Instructivo I-SE-09 validados del Laboratorio de identificación Genética-Identigen de la Universidad de Antioquia.

Amplificación de ADN. Se realizó PCR con extracción (utilizando los protocolos validados del Laboratorio de identificación Genética-Identigen de la Universidad de Antioquia I-SE-16V05) y sin extracción de ADN para la totalidad de los individuos muestreados en los diferentes tipos de soporte para los *kits* comerciales Identifiler®.

De cada uno de los soportes, con un sacabocado, se extrajo un círculo con 1 mm de diámetro y se lavó por cinco minutos con agua desionizada para EzWay™, 5x Colorless Go Taq® Flexi Buffer y por 10 minutos para STRboost™, PCRboost™; luego se secaron a 60 °C. En la tabla 1 se observan el perfil térmico y el volumen para cada una de las PCR sin extracción, motivo de este estudio. Se utilizó el termociclador 2720 Thermal Cycler de la casa comercial Applied Biosystem.

Detección por electroforesis capilar. Los productos de PCR fueron preparados para su posterior análisis utilizando 0,9 µl

Anexo 1. Formulario del consentimiento informado para la toma de muestra de sangre

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1949</p>	<p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES INSTITUTO DE BIOLOGIA LABORATORIO DE IDENTIFICACION GENETICA- IdentiGEN</p>	
<p>Estimación de la variación de los perfiles genéticos obtenidos por PCR directa y PCR convencional en el Laboratorio de Identificación Genética-IdentiGEN.</p>		
<p>CONSENTIMIENTO INFORMADO</p>		
<p>El análisis del ADN es una herramienta clave para los investigadores, ya que proporciona información única de cada individuo. El perfil genético de un individuo es único y no varía a lo largo de la vida, por este motivo es el estándar de oro para la identificación humana.</p>		
<p>La metodología para obtener un resultado de perfil genético incluye la extracción de ADN seguida de la amplificación por la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), terminando con la genotipificación de las muestras en un analizador genético. La extracción del ADN genera pequeñas pérdidas de la molécula de ADN lo que puede no obtener un resultado en evidencias forense.</p>		
<p>La PCR directa no requiere de purificación o extracción del ADN presente en una muestra de sangre, saliva u otras muestras biológicas, por lo que se optimiza tiempo, no hay pérdida de muestra o contaminación, además, es el mejor camino cuando se tienen muestras con cantidades escasas de ADN, como en las investigaciones de identificación humana y criminalística, lo que la convierte en una herramienta clave para los investigadores proporcionando una clara evidencia en la investigación forense.</p>		
<p>El objetivo de este estudio es determinar si hay diferencia entre los perfiles genéticos obtenidos mediante los métodos de extracción y perfiles obtenidos por PCR directa. Para cumplir con este objetivo necesario utilizar muestras a partir de diferentes matrices biológicas (sangre y frotis de mucosa oral) almacenadas en tarjetas FTA, papel de cromatografía y papel de filtro.</p>		
<p>La toma de sangre se realiza de la siguiente forma: por punción digital en el dedo con lanceta y realizando una mancha en tarjetas FTA, papel de cromatografía y papel filtro, los riesgos al tomar esta muestra son mínimos, pueden ser sangrado excesivo o hematoma.</p>		
<p>Si usted ingresa a este estudio es por voluntad propia, no le genera costo alguno, es una contribución al desarrollo de la ciencia y el conocimiento científico.</p>		
<p>Se mantendrá la confidencialidad, su nombre no será revelado en ninguna publicación o presentación de resultados de este estudio. Se respetara su participación de acuerdo a la resolución N° 008430 DE 1993 Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.</p>		
<p>Al firmar esta autorización usted acepta participar en el estudio, y que su información sea utilizada anónimamente en este estudio.</p>		
<p>Nombre y apellido del participante:</p> <p>_____</p>		
<p>Tipo de identificación: _____</p>		
<p>Número de identificación: _____</p>		
<p>Edad: _____</p>		
<p>Fecha y lugar de nacimiento: _____</p>		
<p>Nombre y apellido de la persona responsable (Si aplica):</p> <p>_____</p>		
<p>Tipo de identificación: _____</p>		
<p>Número de identificación: _____</p>		
<p>Edad: _____</p>		
<p>Fecha y lugar de nacimiento: _____</p>		
<p>_____</p> <p style="text-align: right;">Firma del participante o del responsable legal.</p>		
<p>Responsable de la investigación: <u>Monica Marcela Soto Villa.</u> Número de identificación: <u>CC. 1128274637</u> Teléfono: <u>320 702 8722</u> Email: <u>moniklui18@gmail.com</u></p>		
<p>_____</p> <p style="text-align: right;">Firma del responsable de la investigación.</p>		

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR sin extracción de ADN en el Laboratorio de Identificación Genética-IdentiGEN de la Universidad de Antioquia (Vol = volumen en µl; T° = temperatura en °C; Ti = tiempo; Buffer mg = Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi)

Buffers						
Condiciones	Buffer EzWay™			Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi		
	Reactivo	Vol		Reactivo	Vol	
Mezcla	Agua desionizada	4,4		Agua desionizada	2,1	
	Buffer EzWay™	2		Buffer mg	1,4	
	dNTPs	1		dNTPs	1	
	Primer	1		Primer	1	
	Gentaq	0,2		MgCl ₂	0,68	
				Gentaq	0,08	
	Volumen total	8,6		Volumen total	6,26	
Perfil térmico	Etapa	T°	Ti	Etapa	T°	Ti
	Etapa 1	80	15 min	Etapa 1	80	15 min
	Etapa 2	95	11 min	Etapa 2	95	11 min
	Etapa 3: 25 ciclos	94	20 seg	Etapa 3: 25 ciclos	94	20 seg
		59	3 min		59	3 min
	Etapa 4	60	25 min	Etapa 4	60	25 min
Etapa 5	4	Final	Etapa 5	4	Final	
Buffers						
	Buffer PCRboost™			Buffer STRboost™		
	Reactivo	Vol		Reactivo	Vol	
Mezcla	Buffer PCRboost™	2,1		Agua desionizada	2,1	
	Buffer mg	1,4		Buffer STRboost™	2,5	
	dNTPs	1		Buffer mg	1,4	
	Primer	1		dNTPs	1	
	MgCl ₂	0,68		Primer	1	
	Gentaq	0,08		MgCl ₂	0,68	
			Gentaq	0,08		
	Volumen total	6,26		Volumen total	8,76	
Perfil térmico	Etapa	T°	Ti	Etapa	Tem	Ti
	Etapa 1	96	2 min	Etapa 1	96	2 min
		94	1 min		94	1 min
	Etapa 2: 10 ciclos	60	1 min	Etapa 2: 10 ciclos	60	1 min
		70	1 min		70	1 min
		90	1 min		90	1 min
Etapa 3: 16 ciclos	60	1 min	Etapa 3: 16 ciclos	60	1 min	
	70	1,30 min		70	1,30 min	

de ADN amplificado, con 10 µl de formamida desionizada (Amresco Biosystems) más 0,1 µl de marcador de peso LIZ 500 para Identifiler® (Life Technologies). Para el análisis de los perfiles genéticos se utilizó el analizador genético ABI PRISM 3130, con el *Software Genmapper* versión 3.2.

Análisis estadístico. Se utilizó estadística no paramétrica a través de contrastes de homogeneidad de dos muestras independientes como lo son la prueba U de Mann-Whitney y prueba de Kolmogorov-Smirnov; así se compararon cada uno de los reactivos para PCR sin extracción, con la PCR con extracción por Chelex® 100. También se utilizó contrastes para K-muestras independientes: ANOVA de Kruskal-Wallis en la comparación de todos los reactivos utilizados para la amplificación de cada una de las muestras. Las diferentes pruebas estadísticas y gráficos obtenidos se realizaron a través del Software Rwizard con la aplicación StatR (Guisande et al. 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos realizados con los cuatro *buffers* descritos en materiales y métodos permitieron determinar la eficiencia de cada uno de ellos en la PCR sin extracción. Además, se hizo estandarización de los protocolos con las condiciones de amplificación con las cuales se obtienen los que permiten obtener productos amplificados (perfiles) libres de interferencia, exactos, confiables, precisos y completos, que cumplan con los estándares de calidad establecidos en el laboratorio.

Amplificación de ADN según el diámetro del círculo. Para sacar la muestra de sangre almacenada en los papeles analizados, inicialmente se empleó un sacabocado (*micropunch*) con una boquilla de 2 mm de diámetro; sin embargo, no se logró obtener perfiles genéticos o se obtenían perfiles genéticos incompletos, ya que solo amplificaban algunos marcadores genéticos, lo cual indicaba que posiblemente se presentaba una inhibición en la PCR por la presencia de la hemoglobina (Akane et al. 1994), probablemente se presentó por debido a excesiva cantidad de hemoglobina como consecuencia del diámetro del círculo que se estaba usando (2 mm de diámetro). Al cambiar el diámetro de la boquilla a 1 mm de diámetro y realizar lavados previos con agua, se logró tener éxito en la PCR.

Los resultados observados cuando se emplea un círculo de 1 mm de diámetro son perfiles genéticos completos y sin ninguna interferencia para todos los *buffers* (EzWay™,

STRboost™, PCRboost™, y Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi) utilizados para amplificar muestras almacenadas en los soportes FTA™, papel de cromatografía y papel filtro utilizando el *kit* Identifiler® (figura 1).

Aunque muchos autores no mencionan el diámetro del círculo utilizado, Wang et al. (2009) y Stene et al. (2011) establecen que el diámetro empleado para obtener las muestras de manchas de sangre es un factor crucial para obtener resultados eficientes. Es así, que los datos obtenidos en este estudio confirman que el diámetro del círculo es factor importante para la amplificación del ADN por PCR sin extracción.

Amplificación por PCR sin extracción utilizando los diferentes *buffers* y soportes para las muestras. Se comparó los resultados obtenidos en la amplificación de ADN sin extracción realizada con los diferentes *buffers* y el Chelex® 100.

Se observó que con el *buffer* EzWay™ se produce mayor altura de los picos que en los perfiles obtenidos por PCR con extracción realizada con Chelex® 100 en los tres tipos de soportes utilizados (FTA™, papel de Cromatografía y papel filtro), mientras que el STRboost™ no mejora significativamente la altura en los picos de los perfiles genéticos de manchas de sangre almacenadas en papel de cromatografía y papel filtro comparado con la PCR con extracción por Chelex® 100 (figura 2). El reactivo con el que mejor se obtienen productos de amplificación en comparación con la PCR con extracción por Chelex® 100 es el PCRboost™; y en segundo lugar, los mejores perfiles son los obtenidos con el Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi (figura 2).

Las ANOVAS de Kruskal-Wallis determinan estadísticamente que, si se encuentran diferencias significativas entre los *buffers* a comparar, el resultado del test para cada uno de los soportes es inferior a 0,01 (p -valor < 0,001), lo que evidencia que hay diferencias significativas entre los *buffers* utilizados para cada uno de los soportes donde está almacenada la muestra (tabla 2).

Posteriormente, se analizó la comparación de los resultados de la amplificación según los soportes en donde se almacenan las muestras, para todos los reactivos utilizados para la amplificación. Se observa que las tarjetas FTA™ Genecard Whatman™ (figura 3) presentan mejores perfiles genéticos, puesto que muestran mayor altura de los picos; esto posiblemente es debido a que estas tarjetas están diseñadas e impregnadas con fórmula

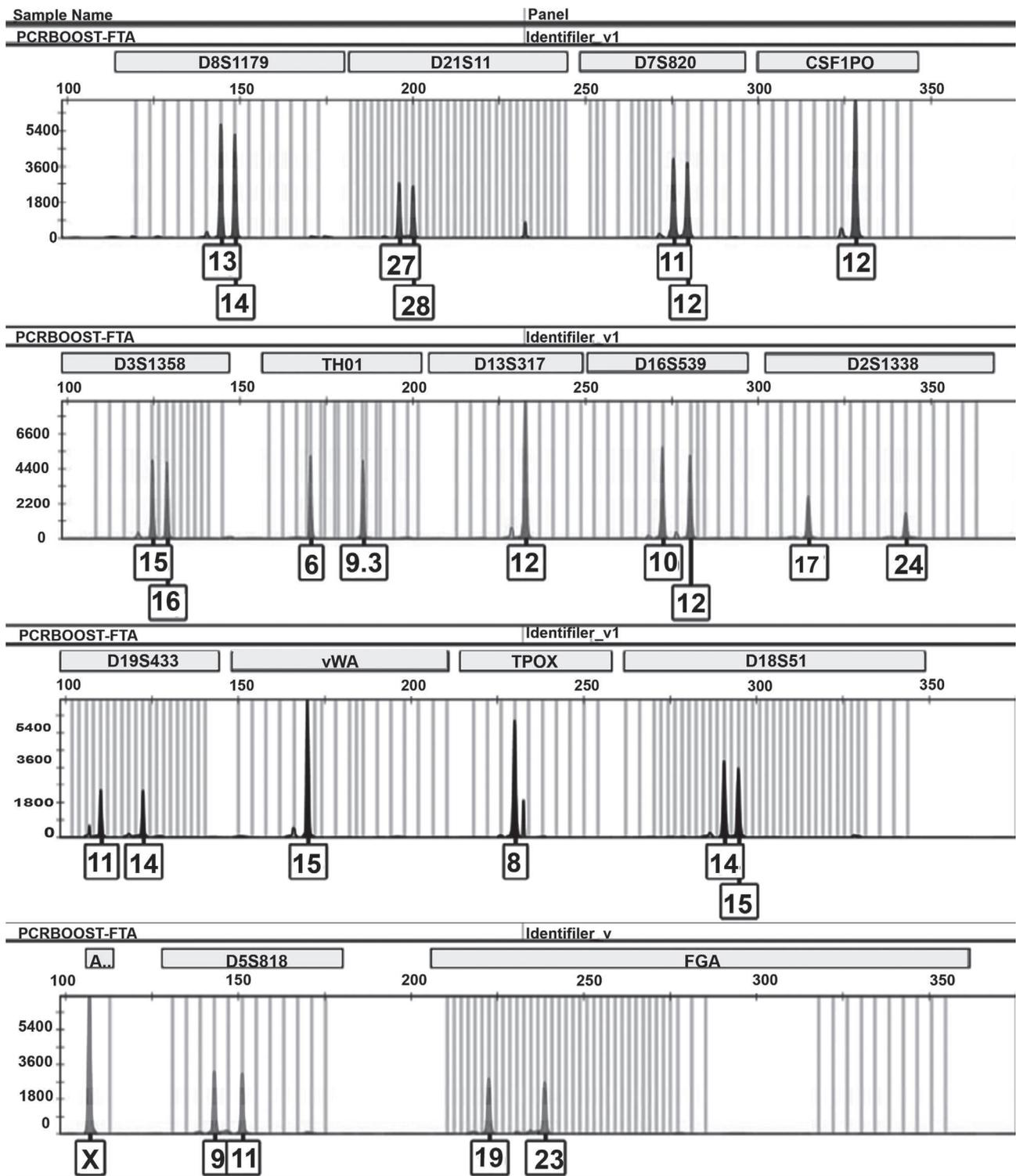


Figura 1. Electroferograma perfil genético utilizando el buffer PCRboost™, mancha de sangre almacenada en tarjetas FTA™.

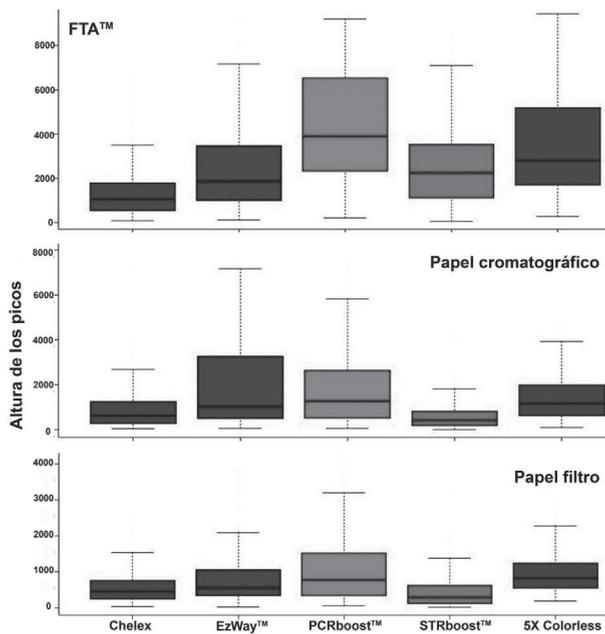


Figura 2. Comparación de los perfiles genéticos amplificados por PCR sin extracción y PCR con extracción, para muestras almacenadas en tarjetas FTA™, papel de cromatografía y papel filtro.

química patentada que lisa las membranas celulares y desnaturaliza las enzimas que degradan el ADN, y el ADN queda atrapado en la matrix de celulosa protegido de las condiciones ambientales (de Vargas Wolfgramm et al. 2009). A diferencia de las tarjetas FTA, las tarjetas papel de cromatografía (Chromatography paper Whatman™) y papel filtro (Rundfilter/Filter paper circles 125 mm) contienen soluciones químicas para lisa las células y conservar el ADN; es probable que por esta razón la altura del pico es menor. Además, los soportes utilizados poseen diferente espesor; el que mayor espesor tiene son las tarjetas FTA™ seguidas del papel de cromatografía y por último el papel filtro, por la tanto la capacidad de almacenar el ADN con respecto a la cantidad es diferente.

De los resultados observados se puede concluir que el *buffer* con el cual se obtienen electroferogramas con mayor altura de los picos es el PCRboost™, probablemente debido a que este *buffer* mejora la sensibilidad y especificidad durante la amplificación del ADN (Biomatrica 2014b). En segundo lugar, el *buffer* 5X Colorless Go Taq® Flexi produce perfiles genéticos de buena calidad.

Implementar un protocolo para PCR sin extracción, permite procesar alto número de muestras al mismo tiempo

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre los cuatro *buffer* (EzWay™, STRboost™, PCRboost™, y Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi) para cada uno de los soportes: FTA™ Genecard Whatman™, papel de Cromatografía (Chromatography paper Whatman™) y papel filtro (Rundfilter/Filter paper circles 125 mm)

Tarjeta	Prueba de Kruskal-Wallis
FTA™	Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 381,4802 df = 4, p-valor < 0,001
Papel de cromatografía	Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 232,2073 df = 4, p-valor < 0,001
Papel filtro	Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 217,7487 df = 4, p-valor < 0,001

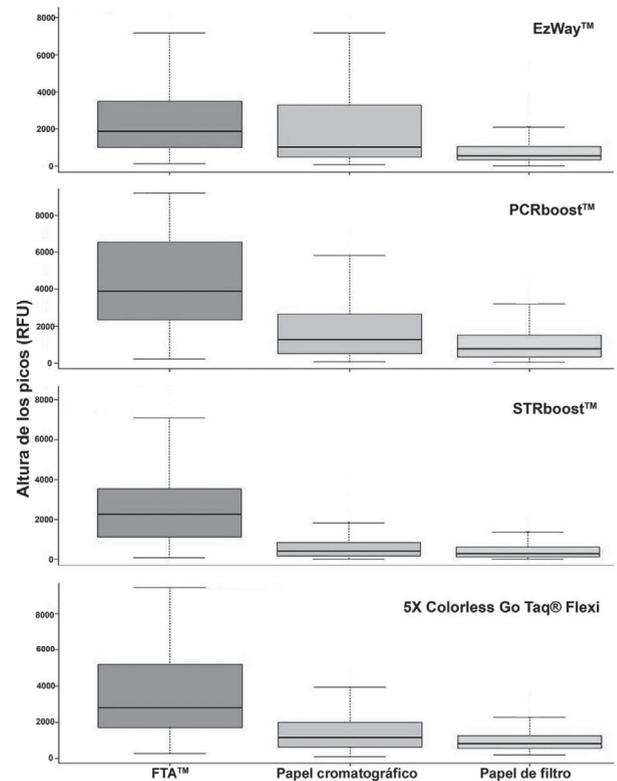


Figura 3. Altura de los picos de los perfiles genéticos amplificados por PCR sin extracción utilizando el *buffer* EzWay™, STRboost™, PCRboost™, y Buffer 5X Colorless Go Taq® Flexi. En los tres tipos de soporte.

disminuyendo procesos de extracción que consumen tiempo y reactivos; además, al eliminar el procedimiento de extracción se reduce la manipulación de las muestras evitando la pérdida de ADN y el riesgo de contaminación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Patricia Pelayo por su asesoría estadística, a todo el personal del Laboratorio de Identificación Genética-IdentiGEN de la Universidad de Antioquia y a la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Sciences*, 39: 362.
- Barbaro A, Cormaci P, Votano S. 2011. Direct PCR by the AmpFISTR NGMTM kit for database purpose. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3: 103-104. Doi:10.1016/j.fsigss.2011.08.051
- Biomatrix [Internet]. 2014b. PCRboost™: A Novel PCR Amplification Enhancer. Fecha de acceso: 17 de agosto de 2014. Disponible en: <<http://www.biomatrix.com/media/perboost/PCRboost%20-%20App%20note%201.pdf>>.
- Chacon-Cortes D, Haupt L, Lea R, Griffiths L. 2012. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. *Molecular Biology Reports*, 39: 5961-5966. Doi:10.1007/s11033-011-1408-8
- de Vargas Wolfgramm E, de Carvalho F, da Costa Aguiar V, De Nadai Sartori M, Hirschfeld-Campolongo G, Tsutsumida W, Louro I. 2009. Simplified buccal DNA extraction with FTA® Elute Cards. *Forensic Science International: Genetics*, 3: 125-127. Doi:10.1016/j.fsigen.2008.11.008
- Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. 2014a. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. *Forensic Science Medicine and Pathology*, 10: 29-38. Doi:10.1007/s12024-013-9521-8
- Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. 2014b. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chem. Forensic Science Medicine and Pathology*, 163: 77-82. Doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.062
- Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Linacre A, Lapwong Y, Chotigeat, W. 2013. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4: 71-72. Doi:10.1016/j.fsigss.2013.10.036
- Laurin N, DeMoors A, Frégeau C. 2012. Performance of Identifiler Direct and PowerPlex 16 HS on the Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer for processing biological samples archived on FTA cards. *Forensic Science International: Genetics*, 6: 621-629. Doi:10.1016/j.fsigen.2012.02.003
- Linacre A, Pekarek V, Swaran, Y, Tobe S. 2010. Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics*, 4: 137-141. Doi:10.1016/j.fsigen.2009.07.006
- Marshall P, King J, Budowle B. 2015. Utility of amplification enhancers in low copy number DNA analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 129 (1): 43-52. Doi:10.1007/s00414-014-1021-1
- Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. 1990. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Research*, 18: 5908.
- Myers B, King J, Budowle B. 2012. Evaluation and comparative analysis of direct amplification of STRs using PowerPlex® 18D and Identifiler® Direct systems. *Forensic Science International: Genetics*, 6: 640-645. Doi:10.1016/j.fsigen.2012.02.005
- Oorschot R, Ballantyne K, Mitchell R. 2010. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*, 1: 1-17. Doi:10.1186/2041-2223-1-14
- Ottens R, Taylor D, Abarno D, Linacre A. 2013a. Optimising direct PCR from anagen hair samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4: 109-110. Doi:10.1016/j.fsigss.2013.10.056
- Ottens R, Templeton J, Paradiso V, Taylor D, Abarno D, Linacre A. 2013b. Application of direct PCR in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4: 47-48. Doi:10.1016/j.fsigss.2013.10.024
- Phillips K, McCallum N, Welch L. 2012. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics*, 6: 282-285. Doi:10.1016/j.fsigen.2011.04.018
- Ps W, Da MRH. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10: 506-513.
- Schnoor M, Voß P, Cullen P, Böking T, Galla H, Galinski E, Lorkowski S. 2004. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 322: 867-872. Doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.200
- Stene M, Buchard A, Børsting C, Morling N. 2011. Validation of the AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR Amplification kit in a laboratory accredited according to the ISO17025 standard. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3: 165-166. Doi:10.1016/j.fsigss.2011.08.083
- Swaran Y, Welch L. 2012. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Science International: Genetics*, 6: 407-412. Doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.007
- Tack L, Thomas M, Reich K. 2007. Automated Forensic DNA Purification Optimized for FTA Card Punches and Identifiler STR-based PCR Analysis. *Clinics Laboratory Medicine Laboratory Automation*, 27: 183-191. Doi:10.1016/j.cll.2006.12.009

- Vallone P, Hill C, Butts E. 2011. Concordance study of direct PCR kits: PowerPlex 18D and Identifiler Direct. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3: 353-354. Doi:10.1016/j.fsigs.2011.09.039
- Verheij S, Gorp A, Benschop C, Harteveld J, Matai A, Sijen T. 2011. Implementation and first case results of a rapid DNA profiling service. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3: 427-428. Doi:10.1016/j.fsigs.2011.09.075
- Wang D, Chang C, Oldroyd N, Hennessy L. 2009. Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2: 113-114. Doi:10.1016/j.fsigs.2009.08.069
- Yang Y, Kim J, Song Y, Kim D. 2007. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Clinica Chimica Acta*, 380: 112-117. Doi:10.1016/j.cca.2007.01.019
- Zhang Z, Kermekchiev M, Barnes W. 2010. Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq. *The Journal Molecular Diagnostics*, 12: 152-161. Doi:10.2353/jmoldx.2010.090070