

Rapport Final : SER029-17

Dossier : #: SER029-17

Date : 04 mai 2017

Rapport des Experts

Noms des experts : Stephen Fratpietro, M.Sc., B.Ed.

Titre : Directeur Technique de , Paleo-DNA Laboratory

Je, soussigné, mandaté par Thierry Jamin, Président de l'Institut Inkari-Cusco, soumettre mon opinion professionnelle en référence à la question suivante : Examen des pièces justificatives pour une analyse de l'ADN (ancien). Acide désoxyribonucléique

Points examinés : Les éléments suivants (voir tableau 1) ont été soumis par Thierry Jamin, de l'Institut Inkari-Cusco pour une analyse génétique. Ces échantillons ont été désignés le cas suivant et le numéro de l'échantillon par le laboratoire Paleo-DNA (PDL) :

PDL Désignation	PDL Désignation de l'échantillon	Types d échantillons	Commentaires
SER029-17	1	Tissu inconnu	Échantillon éventuel de biomatériaux de l'encéphale crânienne
SER029-17	2	Os et tissus	Échantillons d'os extraits d'une main (éventuellement non humaine)

Tableau 1. Echantillons soumis au laboratoire Paleo-DNA.

Examen demandé : Analyse de l'ADN ancien : extraction de l'ADN, test de faisabilité de l'ADN mitochondrial et nucléaire, universel d'Identification et l'identification du sexe.

Exigences demandées : Déterminer si toute information génétique pouvait être extraite de l'échantillon. Sauf si autrement indiqué, l'extraction de standard de l'industrie, les protocoles de purification et d'amplification devaient être utilisées et tentées dans ce cas. Le laboratoire Paleo-DNA a convenu de travailler sur le projet conformément à des normes scientifiques et professionnelles élevées, mais comme ils n'ont pas été impliqués dans la collecte et le stockage de l'échantillon, l'inspection de l'échantillon, ni l'évaluation de l'état de l'échantillon, le laboratoire Paleo-DNA n'a pas réussi à atteindre le résultat souhaité.

Le laboratoire Paleo-DNA a entrepris ce projet sans donner de garantie d'ADEQUATION à un usage particulier, ou toute autre garantie, expresse ou implicite, sur les résultats de votre projet ou les essais effectués conformément à votre projet. Cela n'inclut aucune garantie ni ne garantit que le protocole recommandé atteindra les résultats désirés.

MÉTHODE D'EXAMEN :

Tous les échantillons d'ADN sont préparés pré-amplifiés dans une salle dédiée spécifiquement aux échantillons d'ADN en quantité limitée. Cet environnement est surveillé tous les trimestres spécifiquement pour la présence d'ADN. Il a un accès restreint et nécessite un équipement de protection devant être porté en tout temps : combinaison Tyvek couvrant la tête et pieds, gants, filet à cheveux, un masque. Toutes les personnes entrant dans ce laboratoire ont leur ADN enregistré et gardé pour les comparer ultérieurement.

Préparation des échantillons : Tous les échantillons d'ADN sont stérilisés avec deux lavages d'eau stérile et un lavage de l'éthanol à 70 %. Chaque échantillon est séparément broyé en une fine poudre à l'aide d'un broyeur mélangeur.

Extraction de l'ADN :

Déminéralisation totale (Loreille et al, 2007)

Approximativement 1-2 g d'échantillon de poudre a été mélangé avec 9.0 ML EDTA, 150 uL 20% Lauryl Sarcosinate, and 100 uL Proteinase K (20mg/mL) dans un tube stérile 15.0mL. Cette réaction a incubé une nuit à 56° C avec agitation douce. Le surnageant qui en résulte est transféré à l'étape suivante.

Purification de perles de silice [mis à jour Boom en 1990] :

Le surnageant est mélangé avec de la silice Thiocyanate et 15uL Guanidinium de 4M 18mL. Repos de la solution pendant 4 heures à 4° C pour permettre à l'ADN de se lier à la silice], après quoi le surnageant est supprimé et le reste de la silice lavé avec un tampon de lavage (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM EDTA, éthanol anhydre) et 100 % d'éthanol, puis laisser pour sécher. La silice est remise en suspension dans l'eau stérile 55uL et incubé pendant 1 heure à 56° C afin de permettre à l'ADN de supprimer la liaison de silice et de se dissoudre dans l'eau. Le surnageant qui en résulte est transféré à l'étape suivante.

Taille Exclusion de la colonne de Purification [Matheson et al., 2009] :

L'extrait d'ADN purifié est filtré à l'aide de colonnes chromatographiques de Biorad Micro Bio-Spin P30 selon les instructions du fabricant.

Rapport Final : SER029-17

**** Il est important de noter qu'un contrôle d'extraction (négatif) se fait par le biais de ce processus tout entier comme un contrôle de la qualité mesure.* ***

Amplification par PCR

L'ADN est amplifié dans les réactions de 25uL à l'aide de Quanta Biosciences™ AccuStart™ II PCR Supermix (2 X) avec 12.5uL de AccuStart II PCR Supermix (2 X), 0.25uL de 10uM chaque amorce, 3uL modèle. Paramètres : démarrage à chaud de 94° pendant 2 minutes et 50 cycles de 94° C pendant 30 s, 60° C pendant 1 min., 72° C pendant 2 min.

La taille de l'amplicon varie en longueur et se distingue les uns des autres. Les amorces utilisées amplifient les régions 16 s, mt16191-16420 et 12 s de l'ADN mitochondrial.

Première information :

16s6	5'-TTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAG-3'	Poinar et al. 2001. PNAS. 98(8): 4317-4322
16sB	5'-CTCCGGTTTGAAGTCAGATC-3'	Xiong and Kocher 1991. Genome 34: 306-311
16191F	5'-CCC ATG CTT ACA AGC AAG TA-3'	Kolman et al. 2000. Am. J. Phys. Anthropol. 111(1): 5-23
16420R	5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG-3'	Vigilant et al. 1989. PNAS. 86: 9350-9354
12sF	5'-ACTGGGATTAGATACCCCACTATG-3'	Melton T, Holland C. 2007 J. Forensic Sci. 52, 1305–1307
12sO	5'-GTCGATTA AGGACAGGTTCTCTA-3'	Poinar et al. 1998. Science 281(5375): 402-6

Amplicons et longueur pour l'analyse de l'ADN.

16s6 – 16sB = 270bp

16191F – 16420R = 229bp

12sF – 12sO = 150bp

Chaque lot de réaction PCR inclut un contrôle PCR positif et négatif ainsi que le contrôle négatif d'extraction. Chaque amplicon est amplifié au moins deux fois pour la réplication.

Quantification

L'ADN nucléaire est obtenue à l'aide du kit de Quantification de l'ADN humain Technologies Quantifiler™ selon les instructions du fabricant et fonctionne sur les Céphéides Smart Cycloer® II.

Électrophorèse sur GEL

Les produits PCR sont mélangés avec un colorant et chargés sur un 6 % Gel de Polyacrylamide (PAGE) qui utilise l'électricité pour séparer des produits d'ADN produites par la réaction de PCR. Le gel est coloré avec du bromure d'éthidium qui se lie à l'ADN contenu dans le gel et produit une fluorescence sous la lumière ultraviolette. Une photo est prise pour une vérification visuelle des produits d'amplification présents pendant la réaction PCR. Chaque région apprêt produira une bande d'ADN d'une taille spécifique si l'ADN est présent.

Les Produits PCR réussis sont purifiés par 20uL mélange du produit PCR avec 2uL Exo je nucléase [Lucigen] et 4uL de crevettes alcaline Phosphatase (SAP) [Thermo Fisher]. Le mélange est incubé à 37 ° c pendant 15 minutes, puis les enzymes sont désactivées à 80 ° c pendant 15 minutes.

Séquençage

Les produits PCR purifiés sont directement séquencés avec la v3.1 Life Technologies Big Dye Terminator Ready dans le Kit de réaction d'avant en arrière. 0.5µl big Ready Mélange de réaction Dye Terminator v3.1, 0.25uL 10uM amorce, 2uL 5 x grand Dye Terminator séquençage tampon, 4.2uL d'eau stérile et 3uL de produit de PCR purifié.

Paramètres :

Départ à chaud 96° C pendant 60 s ; 15 cycles de 96° C pendant 10 secondes, 50° C pendant 5 secondes, 60° C pendant 75 ans ; 5 cycles de 96° C pendant 10 secondes, 50° C pendant 5 secondes, 60° C pendant 90 s ; et 5 cycles de 96° C pendant 10 secondes, 50° C pendant 5 secondes, 60° C pendant 2 min.

Les produits de séquençage sont purifiés avec une précipitation d'acétate/éthanol de sodium selon Applied Biosystems automatisé ADN séquençage chimie-Guide pédagogique. Les produits de séquençage sont ensuite resuspendues dans 15uL Hi-Di Formamide et placés sur le 3130xl ABI pour analyse de la séquence.

La séquence d'ADN est comparée à la base de données Jet (outil de recherche de base alignement local) pour une correspondance la plus proche. La base de données Jet est une vaste collection de différentes séquences de l'ADN. Un bonus de 100 % signifie que 100 % de la séquence acquise pour qu'un échantillon obtienne une correspondance complète à celui identifié dans la base de données.

Un résultat de 95 % signifie que seulement 95 % de la séquence acquise pour cet échantillon a obtenu la correspondance la plus proche identifiée dans la base de données). Lorsque plus d'une famille ou d'un genre présentent des correspondances, cela signifie que la séquence acquise pour l'échantillon a obtenu des correspondances pour toutes les familles identifiées (familles/genres) même niveau de confiance et qui a obtenu la correspondance la plus proche qui a pu être trouvée dans la base de données. Il y a une chance égale que cela puisse appartenir à l'une de ces familles/genres.

Rapport Final : SER029-17

Les données de séquençage mitochondriales sont éditées et alignées sur la séquence de référence révisée de Cambridge en utilisant les codes de gène setrempier™ Software v 4.10.1

Analyses de fragments

La région de l'amélogénine (sexage) est amplifiée dans les réactions de 25uL à l'aide de Quanta Biosciences™ AccuStart™ II PCR Supermix (2 X) avec 12.5uL de AccuStart II PCR Supermix (2 X), 0.25uL de 10uM chaque amorce, 3uL modèle.

Paramètres : démarrage à chaud de 94° pendant 2 min et 40 cycles de 94° C pendant 30 s, 60° C pendant 1 min., 72° C pendant 2 min et une finale 72° C pendant 80 minutes. Ce lot de réaction PCR comprend un masculin positif, les témoins féminins positifs et négatifs PCR. Chaque locus est amplifié au moins deux fois pour la réplication.

Primer Information : Sullivan et al. 1993. Biotechniques. 15(4): 636-641

Amel 1 F 5'-(6FAM) CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'

Amel 1 R 5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3

RÉSULTATS : Les résultats ci-dessous ne concernent que les éléments mis à l'essai.

ID universelle – de région 12

Une séquence d'ADN a été produite à partir du matériel biologique du cerveau crânial (1)

TACGTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCATCGGGATGTC
CTGATCCAACATCGAGGTCGTAAACCCTATTGTTGATATGGACTCTAGAATAGGATTGCGCT
GTTATCCCTAGGGTAACTTGTTCCGTTGGTCAAGTTATTGGATCAATTGAGTATAGTAGTTCTG
CTTGACTGGTGAAGTCTTAGCATGTACTGCTCGGAGGTTGGGTTCTG

La branche la plus proche de la séquence 16 s lisible, utilisant une base de données génétique (Centre national d'information de biotechnologie (NCBI) Blast, outil de base de recherche d'alignement local, base de données de nucléotides) a été identifiée comme une branche de 100% à l'Homo sapiens (humain).

Une séquence d'ADN a été produite à partir de l'OS extrait à la main (2).

ACGTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCATGGGATGTCC
TGATCCAACATCGAGGTCGTAAACCCTATTGTTGATATGGACTCTAGAATAGGATTGCGCTG
TTATCCCTAGGGTAACTTGTTCCGTTGGTCAAGTTATTGGATCAATTGAGTATAGTAGTTCTG
TTTGACTGGTGAAGTCTTAGCATGTACTGCTCGGAGGTTGGGTTCTG

La branche la plus proche de la séquence 16 s lisible, utilisant une base de données génétique (Centre national d'information de biotechnologie (NCBI) Blast, outil de base de recherche d'alignement local, base de données de nucléotides) a été identifiée comme une branche de 100% à l'Homo sapiens (humain).

ID universelle – mt16191-16420

Une séquence d'ADN a été produite à partir du matériel biologique du cerveau crânial (1).

ACAGCAANCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACT
AGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACAT
AGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGNGTCCCT TGAC

Cette séquence contenait des dommages sur l'ADN. La correspondance la plus proche de séquence lisible, en utilisant une base de données génétique (National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST, base Local Alignment Search Tool, nucléotides de base de données) a été identifiée avec une correspondance de 99 % à l'Homo sapiens (humains). La différence de 1 % est due à des lésions de l'ADN entraînant une incompatibilité.

Une séquence d'ADN a été produite pour l'OS extrait à la main (2).

TACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCANCTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCAC
TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAANAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACA
TAGCACATNACAGTCAAATCCCTTCTCGNCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCC CTTGA

Cette séquence contenait des dommages sur l'ADN. La correspondance la plus proche de séquence lisible, en utilisant une base de données génétique (National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST, base Local Alignment Search Tool, nucléotides de base de données) a été identifiée avec une correspondance de 99 % à l'Homo sapiens (humains). La différence de 1 % est due à des lésions de l'ADN entraînant une incompatibilité.

D'après les résultats, la preuve indique que la source ADN de la matière biologique du cerveau crânial (1) et l'OS extrait à la main (2) appartient à l'Homo sapiens (humain).

.....
Les résultats de l'essai de faisabilité de l'ADN nucléaire humain ont été positifs. Il y avait suffisamment d'ADN nucléaire détecté pour effectuer d'autres essais.

Identification Sexes

Le test amélogénine pour l'identification du sexe a trouvé :

- Le matériel biologique du cerveau crânien (1) appartient à un individu mâle.
- L'os extrait d'une main (2) appartient à un individu mâle.

Rapport Final : SER029-17

La combinaison de la réplication, des tailles de fragments obtenues, des procédures en place pour la stérilisation en laboratoire et l'élimination des profils d'ADN de laboratoire paléo-ADN suggèrent que les résultats sont authentiques et non pas de contamination. Toutefois, aucun échantillon de comparaison moderne n'a été présenté avec ce lot auprès des archéologues ou de tout autre individu qui aurait pu manipuler l'échantillon et potentiellement l'avoir contaminé. Par conséquent, nous ne pouvons pas garantir que ces profils sont authentiques et non pas un gestionnaire précédent.

Notes: les contrôles ont été exécutés à chaque étape de l'analyse et ont donné les résultats escomptés. Cette analyse est conforme aux exigences demandées par le client. Les détails des procédures expérimentales et l'analyse de cette affaire se trouvent dans le dossier du laboratoire paléo-DNA, numéro de cas SER029-17. Vos commentaires sont importants pour nous! Veuillez remplir notre sondage auprès des clients à <http://Lucas.lakeheadu.ca/customersurvey>.