



SER066-17 Final Report

File #: SER066-17

Date: 26 January 2018

Report of Expert

Expert's Name: Stephen Fratpietro, M.Sc., B.Ed.
Title: Technical Manager, Paleo-DNA Laboratory

I, the undersigned, as requested by Thierry Jamin, Instituto Inkari-Cusco, submit my professional opinion in reference to the following matter: This examination of exhibits is connected to an ancient DNA analysis.

ITEMS EXAMINED:

The following items (see Table 1) were submitted for genetic analysis by Thierry Jamin, Instituto Inkari-Cusco. These samples were designated the following case and sample number by the Paleo-DNA Laboratory (PDL):

PDL Case Designation	PDL Sample Designation	Sample Type	Comments
SER066-17	1	Tissue and Bone	Palm of right hand, Maria
SER066-17	2	Tissue and Bone	Finger of left foot, Maria
SER066-17	3	Bone	Coccyx 1, Maria
SER066-17	4	Bone	Left arm, Maria
SER066-17	5	Bone	Coccyx 2, Maria
SER066-17	6	Bone	Vertebrae, Maria

Table1. Samples submitted to the Paleo-DNA Laboratory.

EXAMINATION REQUESTED: Ancient DNA Analysis: extraction of DNA, nuclear DNA feasibility test, and autosomal DNA profiling

REQUIREMENTS REQUESTED: Determine if any genetic information could be extracted from the sample. Unless otherwise discussed, the industry standard extraction, purification and amplification protocols were to be used and attempted in this case.

The Paleo-DNA Laboratory agreed to work on the project in accordance with high scientific and professional standards, but as we had not been involved with the collection and storage of the sample, nor have we inspected the sample, nor have we assessed the condition of the sample, the Paleo-DNA Laboratory did not promise success in achieving any desired result. The Paleo-DNA Laboratory undertook this project giving no warranty of fitness for a particular purpose, or any other warranty,



SER066-17 Final Report

expressed or implied, on the results of your project or the tests carried out pursuant to your project. This includes no guarantee or warranty that the recommended protocol will achieve your desired results.

EXAMINATION METHODOLOGY:

All aDNA samples are prepared pre-amplification in a room dedicated specifically to limited quantity DNA samples. This environment is monitored quarterly for the presence of DNA. This lab has restricted access and requires protective gear to be worn at all times: tyvek suit covering head and feet, gloves, hairnet, facemask. All persons entering this lab have their DNA profiled and kept for future comparison.

Sample Preparation

All aDNA samples are rinsed in ethanol and allowed to dry. Each specimen is separately milled and dissolved into extraction buffer

DNA Extraction

TNE Extraction [Hansen et al, 1974]: Sample 1 to 5

Extraction buffer is made fresh consisting of 2175uL TNE [10mM Tris, 100mM Sodium Chloride(NaCl), 1mM Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution(EDTA)], 300uL 20% sodium dodecyl sulphate, 300uL 0.39M Dithiothreitol, 30uL 20mg/mL Proteinase K, and 195uL sterile water. This buffer is incubated with the sample overnight at 56°C for 500rpms agitation. The resulting supernatant is transferred to the *Silica Bead Purification*.

Total Demineralization [Loreille et al, 2007]: Sample 6

Approximately 1-2g of sample powder is mixed with 9.0mL 0.5M EDTA, 150uL 20% Lauryl Sarcosinate, and 200uL Proteinase K (20mg/mL) in a sterile 15.0mL tube. This reaction is incubated overnight at 56°C with gentle agitation. The resulting supernatant is transferred to the *Silica Bead Purification*.

Silica Bead Purification [modified Boom et al, 1990]:

The supernatant is mixed with 18mL 4M Guanidinium Thiocyanate and 15uL silica. This is allowed to sit for 4 hours at 4°C [to allow DNA to bind to silica] after which the



SER066-17 Final Report

supernatant is removed and the remaining silica washed with Working Wash Buffer (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM EDTA, anhydrous ethanol) and 100% ethanol, then allowed to dry. The silica is resuspended in 55uL sterile water and incubated for 1 hour at 56°C to allow DNA to unbind from silica and dissolve in the water. The resulting supernatant is transferred to the next step.

Size Exclusion Column Purification [Matheson et al, 2009]:

The purified DNA extract is further filtered using Biorad Micro Bio-Spin P30 Chromatography Columns as per manufacturer's instructions.

****It is important to note that an extraction control (negative) is carried through this entire process as a quality control measure.****

Quantification

Nuclear DNA is targeted using Life Technologies Quantifiler™ Human DNA Quantification kit as per manufacturer's instructions run on the Cepheid Smart Cycler® II.

Fragment Analysis

Autosomal DNA is amplified in 10uL reactions using the Promega PowerPlex® 21 System using manufacturer's cycling parameters. This PCR reaction batch includes a positive and negative PCR control. Each locus is amplified at least twice for replication.



SER066-17 Final Report

RESULTS: The results below relate only to the items tested.

The results for the nuclear DNA feasibility test were as follows:

Sample	Nuclear DNA Feasibility
Palm of right hand, Maria (1)	positive
Finger of left foot, Maria (2)	positive
Coccyx 1, Maria (3)	negative
Left arm, Maria (4)	negative
Coccyx 2, Maria (5)	negative
Vertebrae, Maria (6)	positive

A positive result indicates that there is sufficient nuclear DNA in the extract to proceed to further autosomal DNA testing.

Autosomal Analysis

Autosomal analysis was performed on the following samples from 'Maria': Palm of right hand (1), Finger of left foot (2), vertebrae (6). Each analysis was performed in triplicate. Two pieces of numerical information are produced for each DNA marker analyzed. Since half of the biological mother's and half of the biological father's DNA are passed onto the child, one piece of information from each marker comes from each biological parent.



SER066-17 Final Report

DNA Markers Analyzed	Palm of right hand (1)	Finger of left foot (2)	Vertebrae (6)
AMEL	X [Y]	X [Y]	X,Y
D3S1358	15,16,17	15,16 [17]	14,15,16,17
D1S1656	11,14	13,14,15	13,14,15
D6S1043	11	14,21.3 [11,18,19,20.3]	14,17,21.3
D13S317	10,14	9,11,12	10,11,12
Penta E	NR	17	15,17
D16S539	11 [10,12]	10,11	10,11,12
D18S51	13,14,17,18 [20]	14,17,18 [13,16]	17,18,20
D2S1338	17,19	17,19,20	19,20,23 [22]
CSF1P0	NR	10,11,12	12
Penta D	11	NR	10,14 [11]
TH01	7,9.3	7 [9.3]	7 [6,9.3]
vWA	16 [18,19]	16 [14,15,17,19]	14,16
D21S11	29,32.2	32.2	29,30,32.2 [31.2]
D7S820	10	11	11
D5S818	11,12	7,11,12	11
TPOX	11	11	8,11
D8S1179	10,14 [8,16]	10,14 [11,12,13,16]	10,12,14
D12S391	[16,18]19,20,21	16,19 [21]	16,19 [18,21]
D19S433	14[13,15,21]	13,15,17	13,14,15 [15.2]
FGA	24,25,26	21,25,26	21,26

Summary of results from three distinct analyses. In some cases more than two alleles were present at one marker. Results from the three analyses of each sample were combined. Any and all major (high level) alleles are stated as such. Any and all minor (low level) alleles are denoted with '[]'. 'NR' means no results were obtained.

The following conclusions were drawn from the data obtained:


- There is evidence of DNA contamination.
- Palm of right hand (1) contains DNA from more than one individual.
- Finger of left foot (2) contains DNA from more than one individual.
- Vertebrae (6) contains DNA from more than one individual.
- The Amelogenin marker [AMEL] (the marker used for sex identification within this genotyping kit) shows that for each of the three samples tested, there is a major component of female DNA and a minor component of male DNA.
- For each of the samples tested, there is a presence of, at least, one female individual and one male individual.
- Finger of left foot (2) and Vertebrae (6) show evidence of sharing a common source of DNA.
- There is not sufficient data to include nor exclude Palm of right hand (1) having a common source of DNA to Finger of left foot (2) and Vertebrae (6) with any confidence.



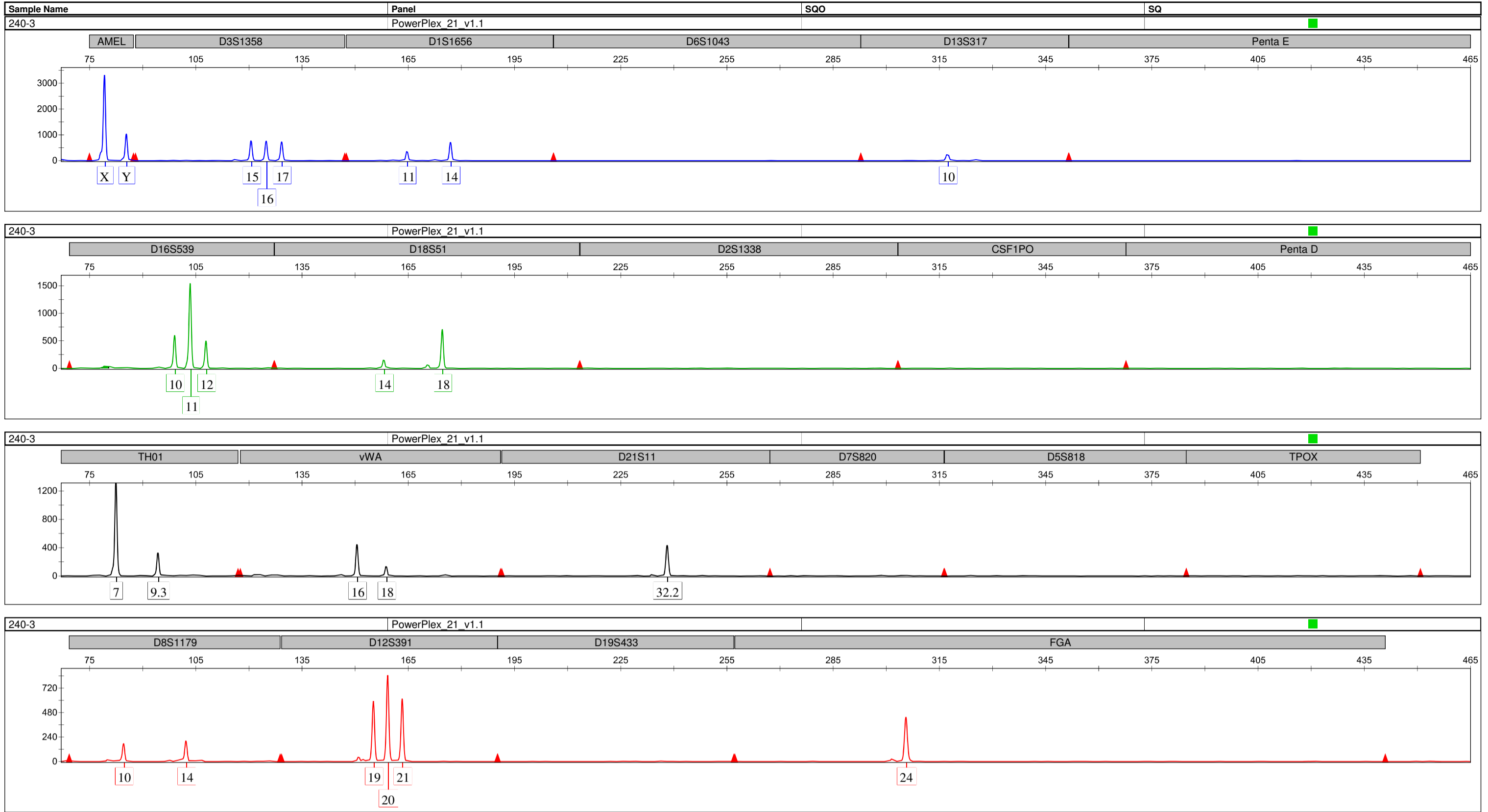
SER066-17 Final Report

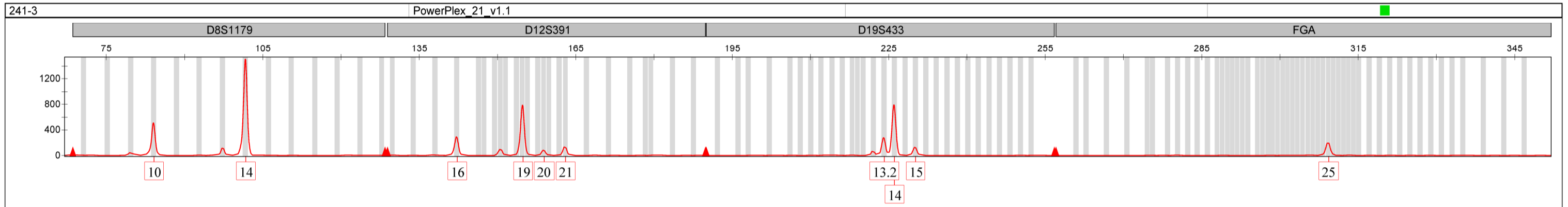
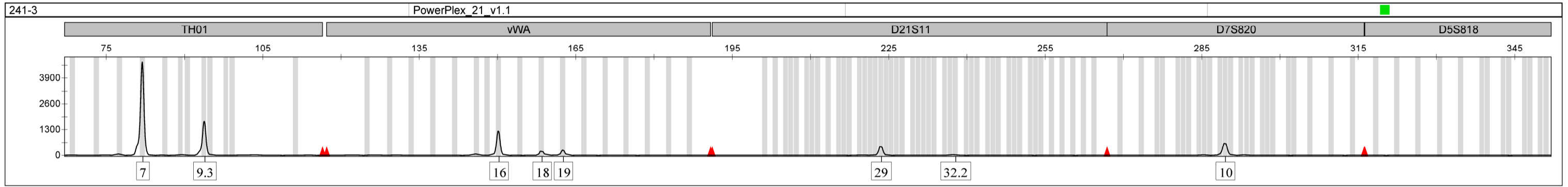
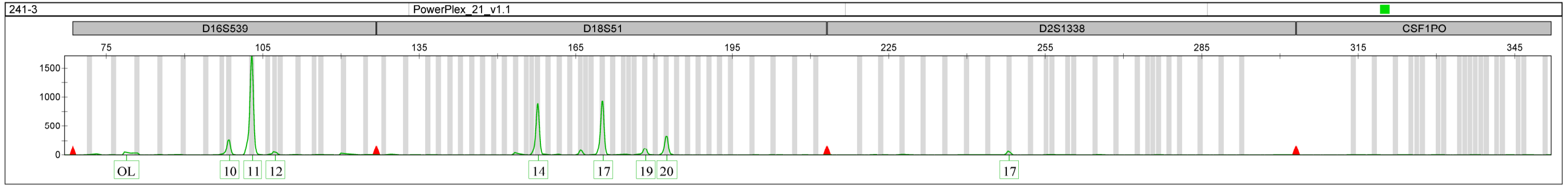
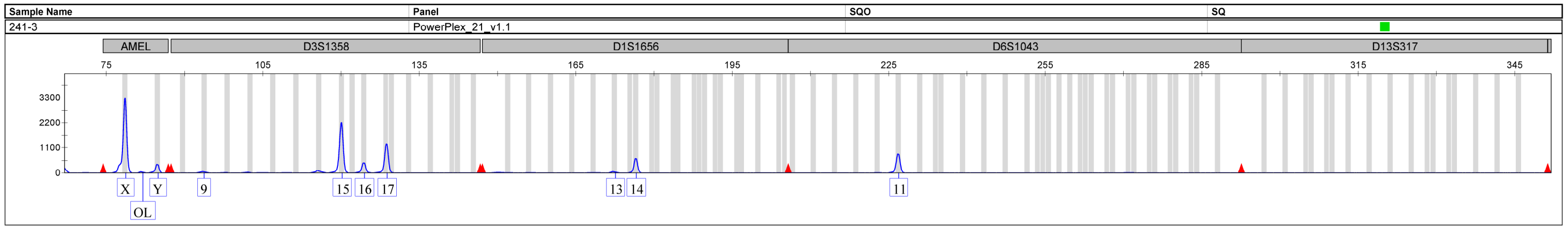
NOTES:

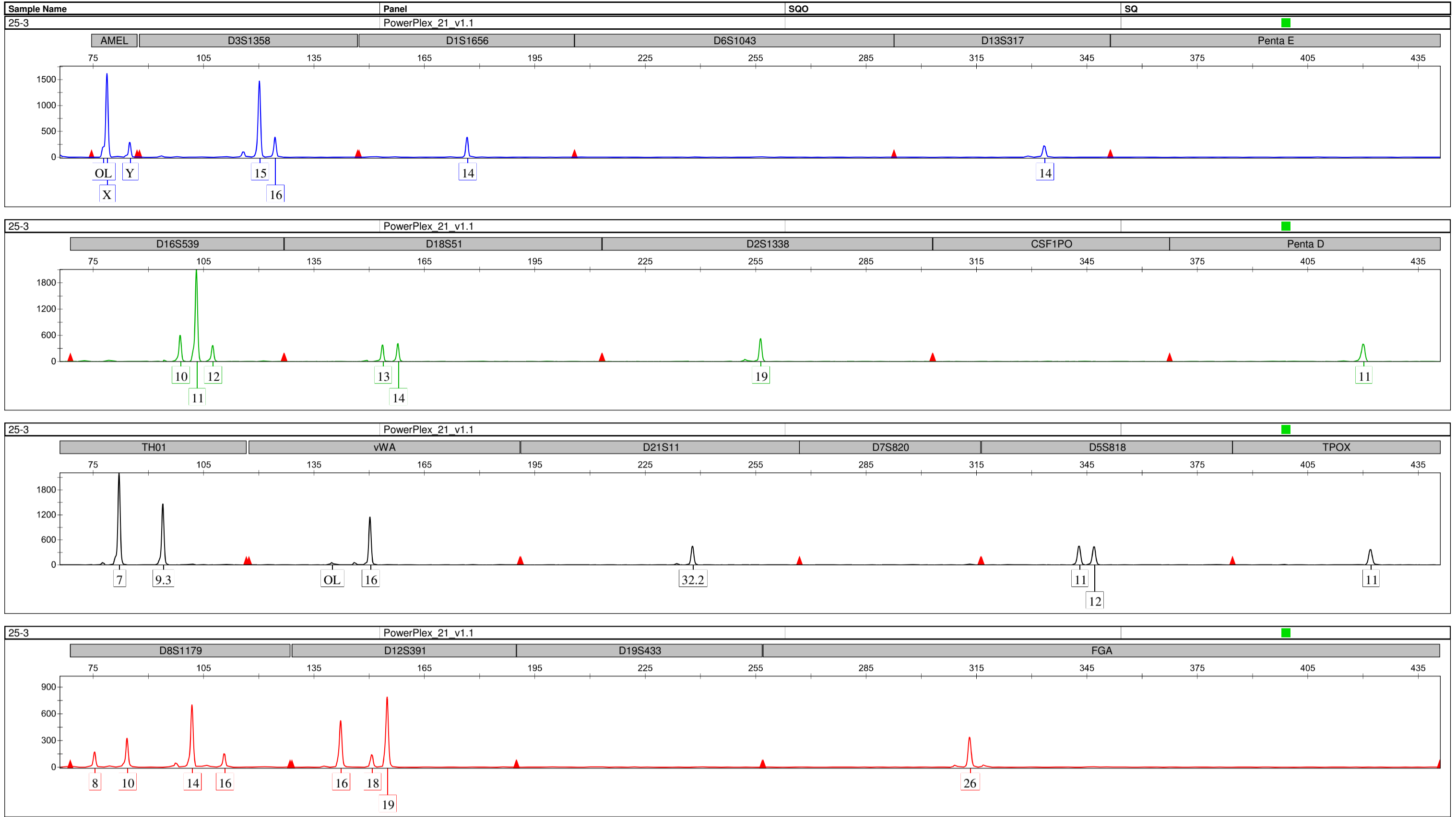
Controls were run at every step of the analysis and gave expected results. The above profiles do not match any staff member or laboratory user at the Paleo-DNA Laboratory, past or present. This analysis complies with the requirements requested by the client. Details of the experimental procedures and analysis of this case are found in the case file of the Paleo-DNA laboratory, case number SER066-17. Your feedback is important to us! Please fill out our customer survey at <http://lucas.lakeheadu.ca/customer-survey>.

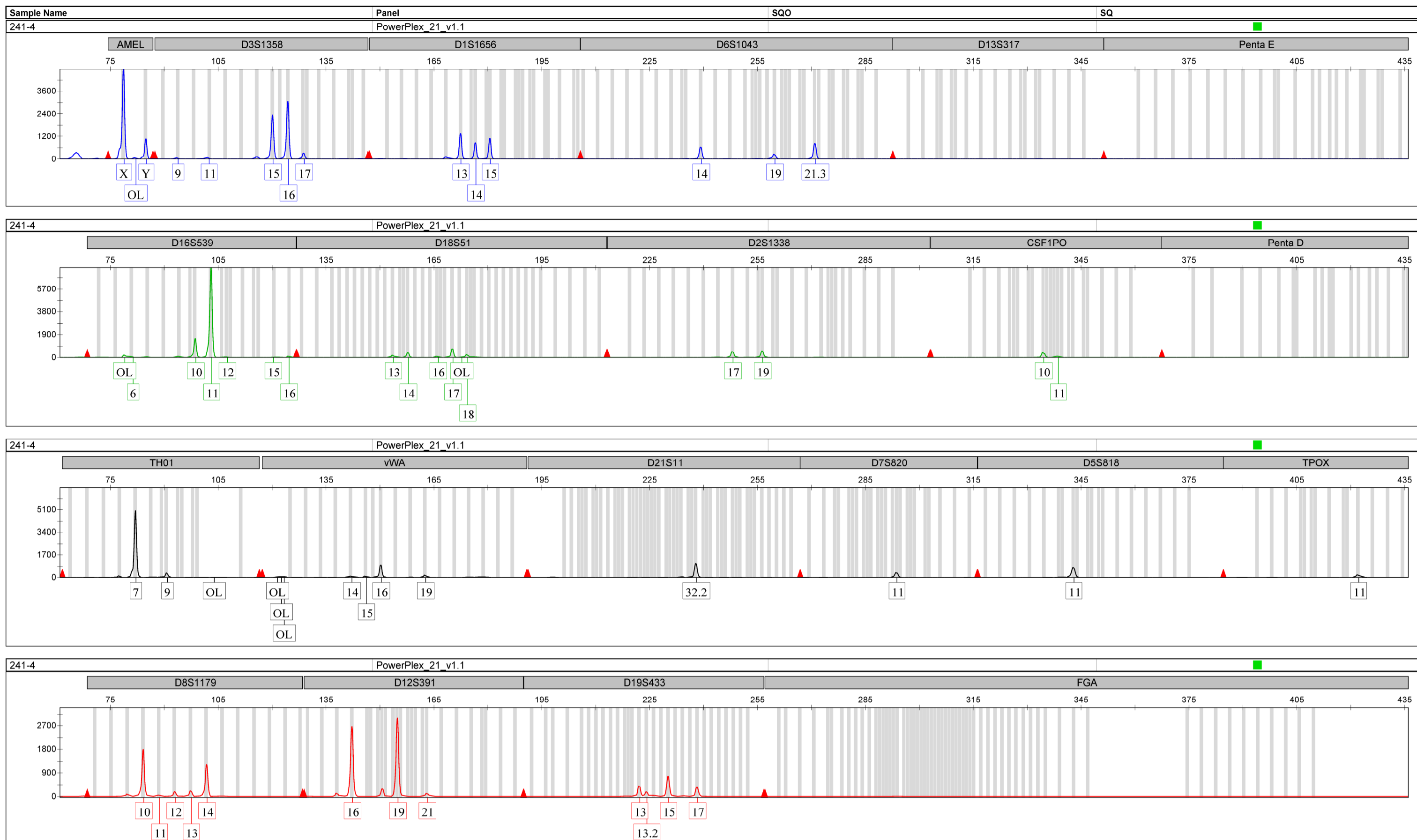
Technical Manager: 
Stephen Fratpietro

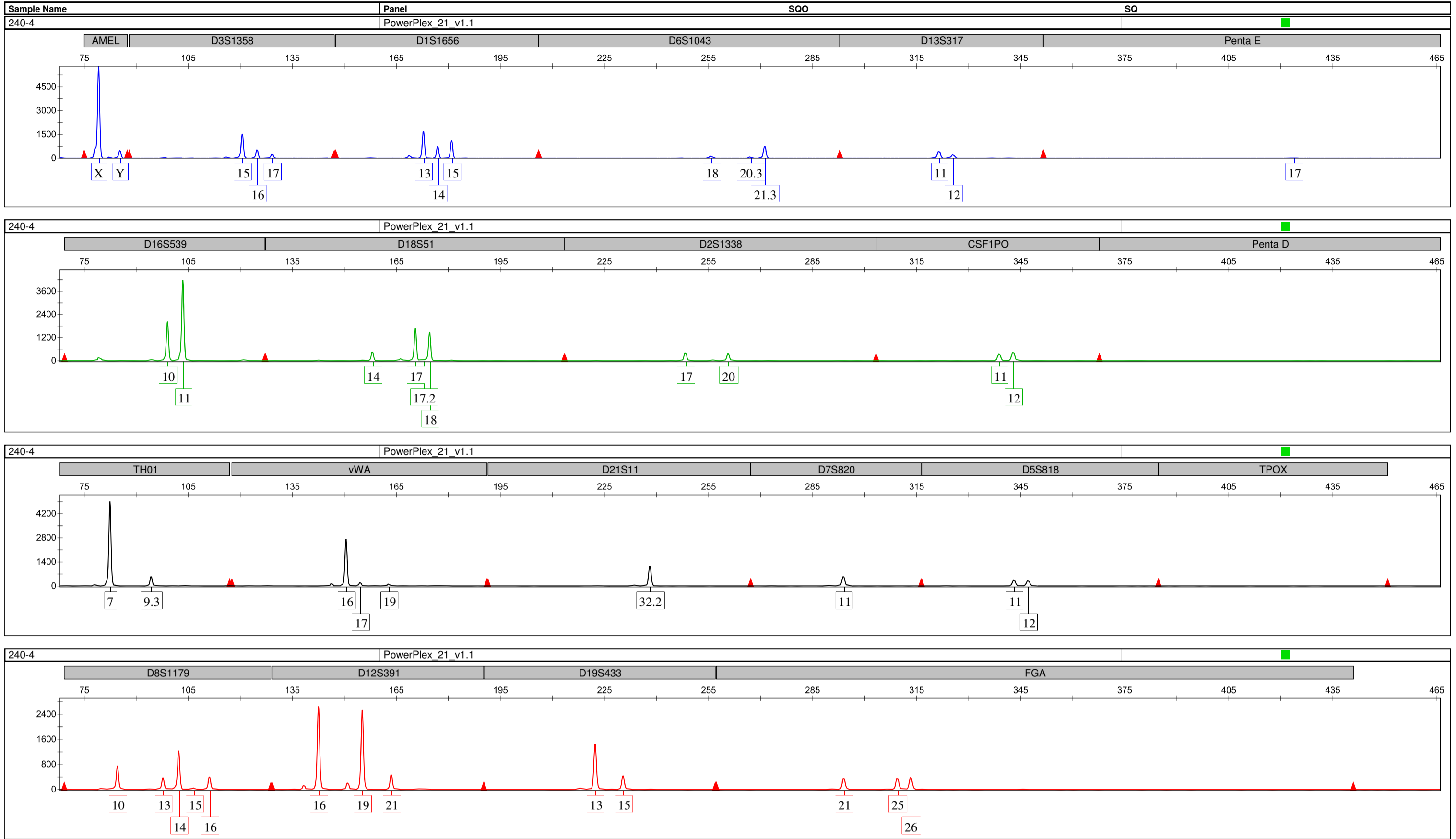
Date: 06 Feb 2018

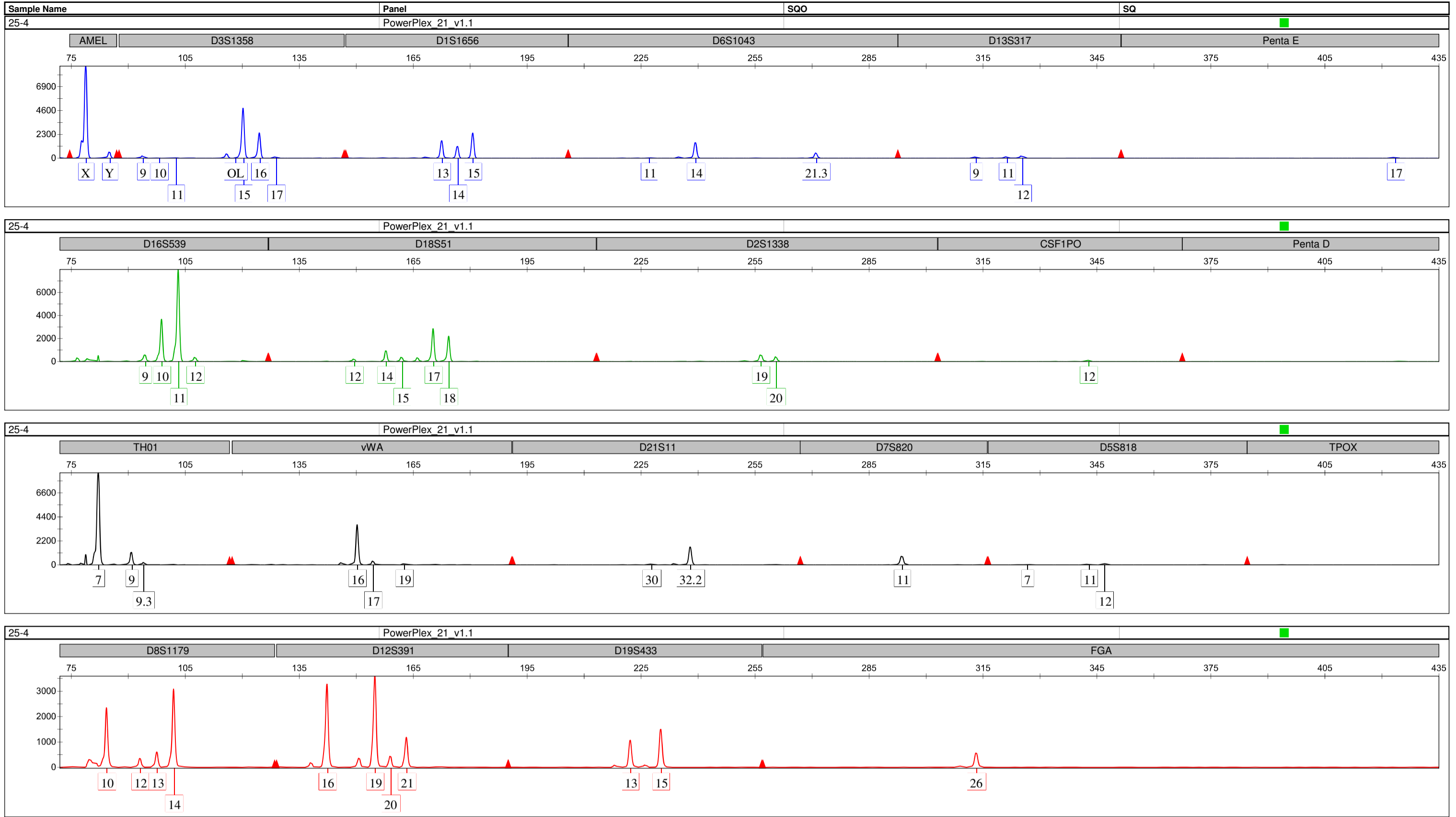


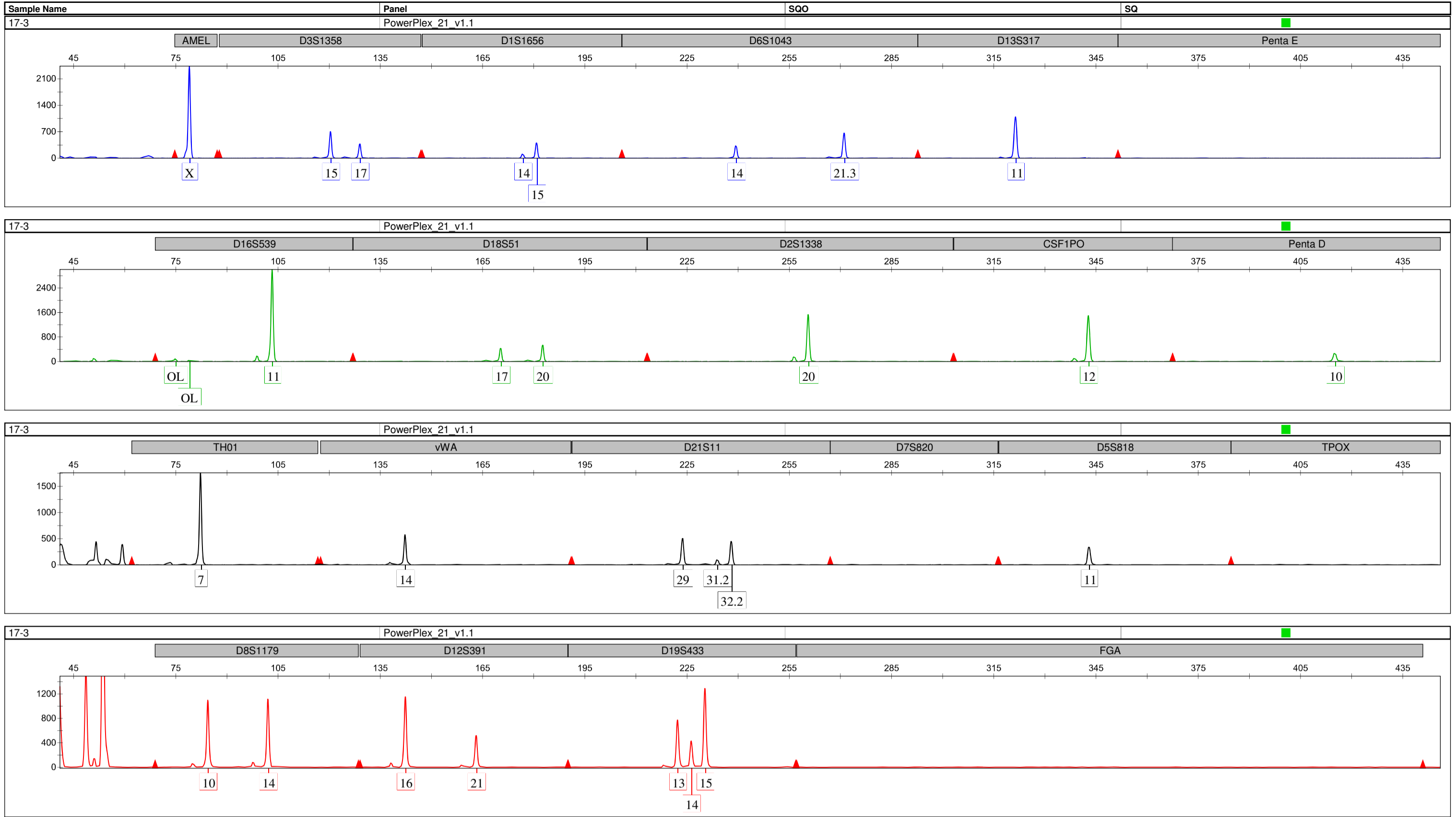


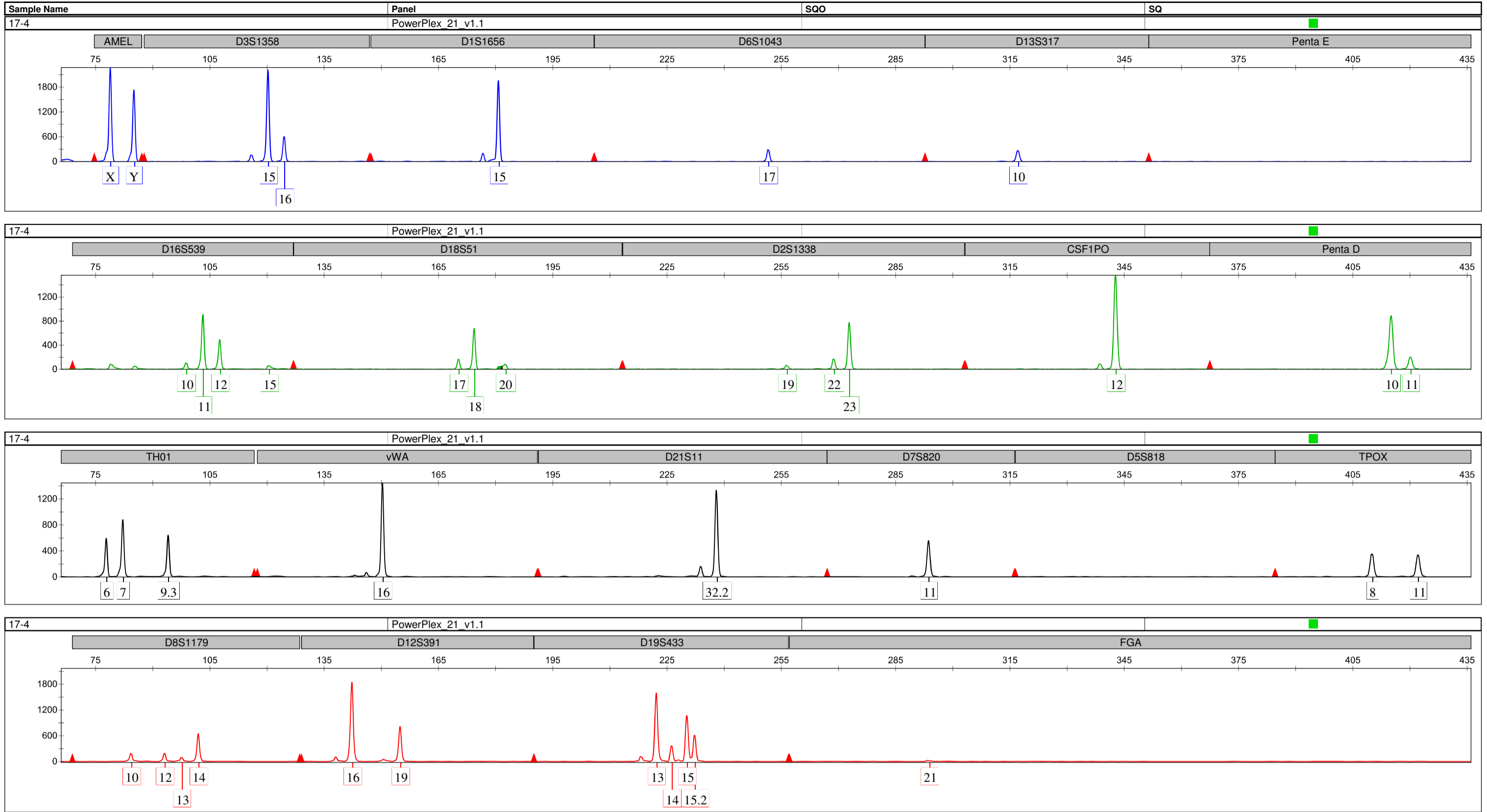


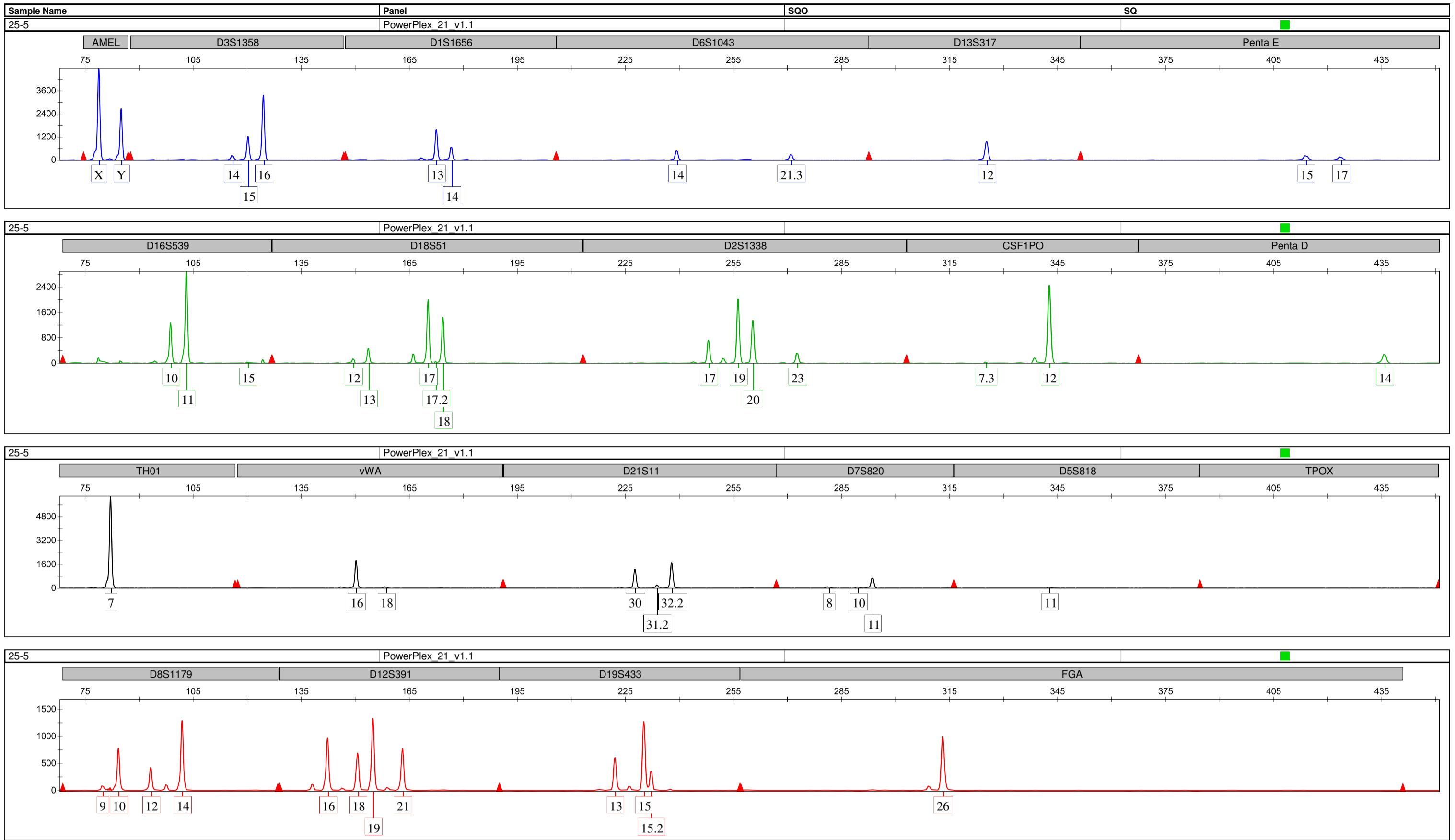














SER066-17 Rapport FINAL

Dossier #: SER066-17

Date: 26 janvier 2018

Rapport de l'expert : Nom de l'expert: Stephen Fratpietro, M.Sc., B.Ed.

Titre: Directeur technique, Paleo-DNA Laboratory

Je, soussigné (e), à la demande de Thierry Jamin, Institut Inkari-Cusco, soumetts mon opinion professionnelle sur le sujet suivant : Cet examen des sujets exposés est relié à une analyse d'ADN ancien.

POINTS EXAMINÉS:

Les éléments suivants (voir le tableau 1) ont été soumis pour analyse génétique par Thierry

Jamin, Institut Inkari-Cusco. Ces échantillons ont été désignés comme indiqué ci-après avec les numéros d'échantillon par le laboratoire de Paléo-DNA (PDL) :

PDL Dénomination du cas	PDL Dénomination de l'échantillon	Type d'échantillon	Commentaires
SER066-17	1	Tissu et os	Paume de main droite, Maria
SER066-17	2	Tissu et os	Doigt de pied gauche, Maria
SER066-17	3	Os	Coccyx 1, Maria
SER066-17	4	Os	Bras gauche, Maria
SER066-17	5	Os	Coccyx 2, Maria
SER066-17	6	Os	Vertèbre, Maria

Tableau 1 : Echantillons soumis au Laboratoire Paleo-DNA

EXAMEN DEMANDÉ : Analyse d'ADN ancien : extraction de l'ADN, test de faisabilité de l'ADN nucléaire et profilage de l'ADN autosomique.

EXIGENCES DEMANDÉES : Déterminer si une information génétique pourrait être extraite de l'échantillon. Sauf indication contraire, les protocoles de la norme standard industrielle d'extraction, de purification et d'amplification devaient être utilisés et essayés dans ce cas.

Le laboratoire Paléo-ADN a accepté de travailler sur le projet conformément aux normes scientifiques et professionnelles de haut niveau, mais comme nous n'avons pas participé à la collecte et au stockage de l'échantillon, ni avons-nous inspecté l'échantillon, ni avons-nous évalué l'état de l'échantillon, le laboratoire Paléo-ADN n'a promis aucun succès dans la réalisation du résultat souhaité. Le laboratoire Paléo-ADN a entrepris cette projet en ne donnant aucune garantie d'adéquation à un usage particulier, ni aucune autre garantie, explicite ou implicite, sur les résultats de votre projet ou sur les tests effectués conformément à votre projet. Ceci ne comprend aucune garantie que le protocole recommandé donnera les résultats que vous souhaitiez.



METHODOLOGIE D'EXAMEN:

Tous les échantillons d'ADN sont préparés par pré-amplification dans une salle dédiée à une quantité limitée d'échantillons d'ADN. Cet environnement est contrôlé trimestriellement pour la présence de l'ADN. Ce laboratoire a un accès restreint et nécessite le port d'équipement de protection en tout temps : costume en Tyvek couvrant la tête et les pieds, gants, filet pour les cheveux, masque facial. Toutes les personnes entrant dans ce laboratoire ont leur ADN enregistré et conservé pour une comparaison future.

La préparation des échantillons

Tous les échantillons d'ADNc sont rincés à l'éthanol et mis à sécher. Chaque spécimen est broyé séparément et dissous dans un tampon d'extraction.

Extraction d'ADN

Extraction TNE [Hansen et al, 1974] : échantillons 1 à 5.

Le tampon d'extraction est renouvelé à chaque fois et contient 2175 uL de TNE [Tris 10 mM, Sodium 100 mM], Chlorure (NaCl), solution de sel disodique d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1 mM], 300 uL de sulfate dodécyl de sodium à 20%, 300 uL de dithiothréitol 0,39 M, 30 uL de 20 mg / ml Protéinase K et eau stérile de 195uL. Ce tampon est incubé avec l'échantillon pendant une nuit à 56 ° C pour une agitation de 500 tr / min. Le surnageant résultant est transféré à la purification de perles de silice.

Déminéralisation totale [Loreille et al, 2007] : échantillon 6

Environ 1-2 g d'échantillon de poudre sont mélangés à 9,0 ml d'EDTA 0,5 M, 150 ul 20% Lauryl Sarcosinate et 200 µL de Protéinase K (20 mg / mL) dans un tube stérile de 15,0 mL. Cette réaction est incubée pendant une nuit à 56 ° C avec une légère agitation. Le surnageant résultant est transféré à la purification des billes de silice.

Purification des billes de silice [modifié Boom et al, 1990]:

Le surnageant est mélangé à 18 ml de thiocyanate de guanidinium 4 M et à 15 ul de silice. Cela est laissé au repos pendant 4 heures à 4 ° C [pour permettre à l'ADN de se lier à la silice], après quoi le surnageant est éliminé et la silice restante lavée avec un tampon de lavage de travail (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, éthanol anhydre) et 100% d'éthanol, puis mis à sécher. La silice est remise en suspension dans 55 uL d'eau stérile et incubée pendant 1 heure à 56 ° C pour permettre à l'ADN de se dissocier de la silice et de se dissoudre dans l'eau. La résultante surnageante est transféré à l'étape suivante.



Purification de la colonne d'exclusion de taille [Matheson et al, 2009]:

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

** Il est important de noter qu'un contrôle d'extraction (négatif) est appliqué à travers tout ce processus en tant que mesure de contrôle de la qualité. **

Quantification

L'ADN nucléaire est ciblé à l'aide du kit de quantification de l'ADN humain Life Technologies Quantifiler™ sur le Cepheid Smart Cycler® II conformément aux instructions du fabricant.

Analyse de fragment

L'ADN autosomal est amplifié dans des réactions de 10 uL à l'aide du Système Promega PowerPlex® 21 selon les paramètres de cyclage du fabricant. Ce lot de réaction PCR comprend un contrôle PCR positif et négatif. Chaque locus est amplifié au moins deux fois pour la réplication.



RÉSULTATS : Les résultats ci-dessous concernent uniquement les éléments testés.

Les résultats de l'essai de faisabilité de l'ADN nucléaire sont les suivants :

Echantillon	Viabilité ADN Nucléaire
Paume de la main droite, Maria (1)	positif
Doigt du pied gauche, Maria (2)	positif
Coccyx 1, Maria (3)	négatif
Bras gauche, Maria (4)	négatif
Coccyx 2, Maria (5)	négatif
Vertèbre, Maria (6)	positif

Un résultat positif indique que l'extrait contient suffisamment d'ADN nucléaire pour procéder à d'autres tests d'ADN autosomal.

Analyse autosomique

Une analyse autosomique a été réalisée sur les échantillons suivants de «Maria» : Paume de la main droite (1), doigt du pied gauche (2), vertèbres (6). Chaque analyse était réalisée en triple. Deux informations numériques sont produites pour chaque marqueur ADN analysé. La moitié de l'ADN de la mère biologique et la moitié du l'ADN du père biologique est transmis à l'enfant, un élément d'information provenant de chaque marqueur provient de chaque parent biologique.



Marqueurs ADN analysés	Paume de la main droite (1)	Doigt du pied gauche (2)	Vertèbre (6)
DNA Markers Analyzed	Palm of right hand (1)	Finger of left foot (2)	Vertebrae (6)
AMEL	X [Y]	X [Y]	X,Y
D3S1358	15,16,17	15,16 [17]	14,15,16,17
D1S1656	11,14	13,14,15	13,14,15
D6S1043	11	14,21.3 [11,18,19,20.3]	14,17,21.3
D13S317	10,14	9,11,12	10,11,12
Penta E	NR	17	15,17
D16S539	11 [10,12]	10,11	10,11,12
D18S51	13,14,17,18 [20]	14,17,18 [13,16]	17,18,20
D2S1338	17,19	17,19,20	19,20,23 [22]
CSF1P0	NR	10,11,12	12
Penta D	11	NR	10,14 [11]
TH01	7,9.3	7 [9.3]	7 [6,9.3]
vWA	16 [18,19]	16 [14,15,17,19]	14,16
D21S11	29,32.2	32.2	29,30,32.2 [31.2]
D7S820	10	11	11
D5S818	11,12	7,11,12	11
TPOX	11	11	8,11
D8S1179	10,14 [8,16]	10,14 [11,12,13,16]	10,12,14
D12S391	[16,18]19,20,21	16,19 [21]	16,19 [18,21]
D19S433	14[13,15,21]	13,15,17	13,14,15 [15.2]
FGA	24,25,26	21,25,26	21,26

Résumé des résultats de trois analyses distinctes. Dans certains cas, plus de deux allèles étaient présent à un marqueur. Les résultats des trois analyses de chaque échantillon ont été combinés. Tout et tous les allèles majeurs (de haut niveau) sont indiqués en tant que tels. Tous les allèles mineurs (de bas niveau) sont désignés par « [] ». «NR» signifie qu'aucun résultat n'a été obtenu.

Les conclusions suivantes ont été tirées des données obtenues:

- Il y a une contamination évidente de l'ADN.
- La paume de la main droite (1) contient l'ADN de plus d'un individu.
- Le doigt du pied gauche (2) contient l'ADN de plus d'un individu.
- Les vertèbres (6) contiennent de l'ADN de plus d'un individu.
- Le marqueur Amélogénine [AMEL] (le marqueur utilisé pour l'identification du sexe dans ce kit de génotypage) montre que pour chacun des trois échantillons testés, il y a un composant majeur d'ADN féminin et un composant mineur d'ADN mâle.
- Pour chacun des échantillons testés, il y a présence d'au moins un individu féminin et un individu masculin.
- Le doigt du pied gauche (2) et la vertèbre (6) montrent l'évidence de partager une source commune d'ADN.
- Il n'y a pas assez de données pour inclure ou exclure la paume de la main droite (1) ayant une source commune d'ADN avec le doigt du pied gauche (2) et les vertèbres (6) en toute certitude.



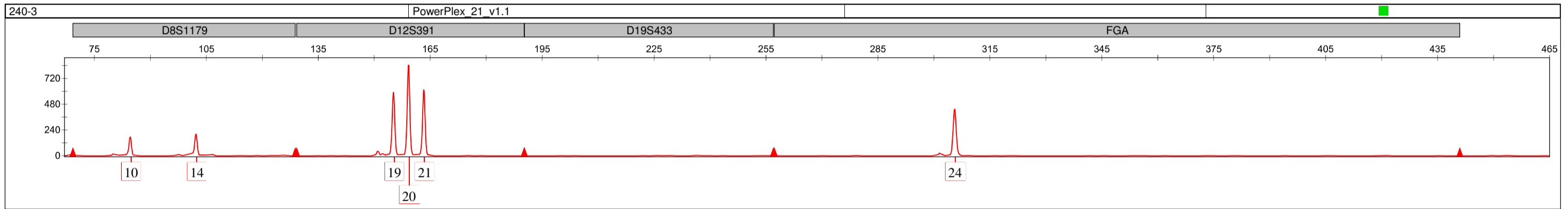
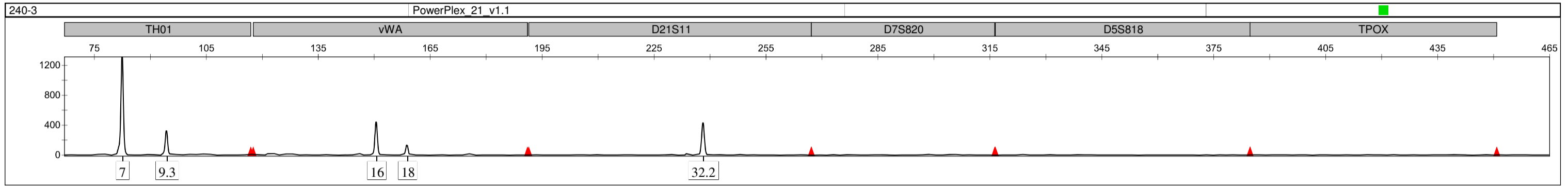
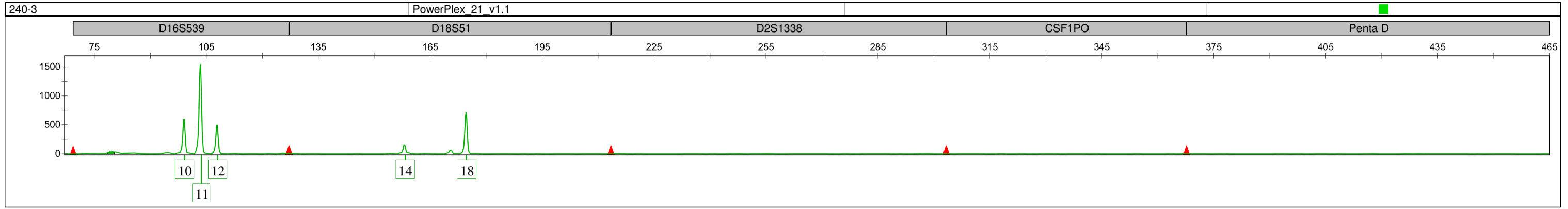
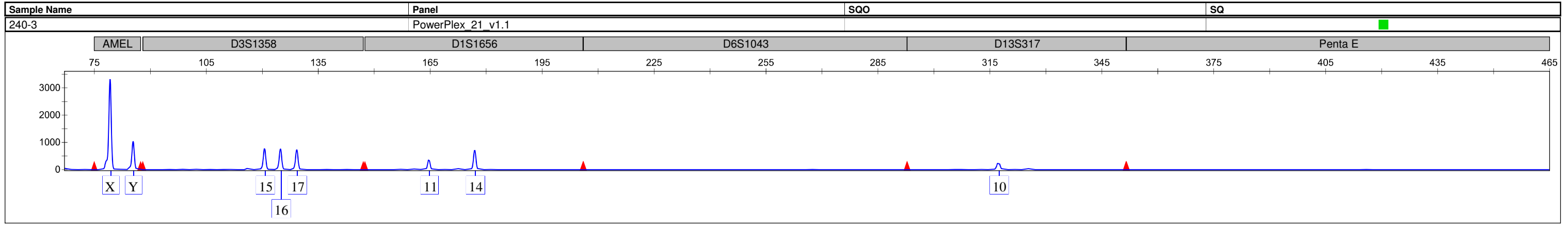
REMARQUES:

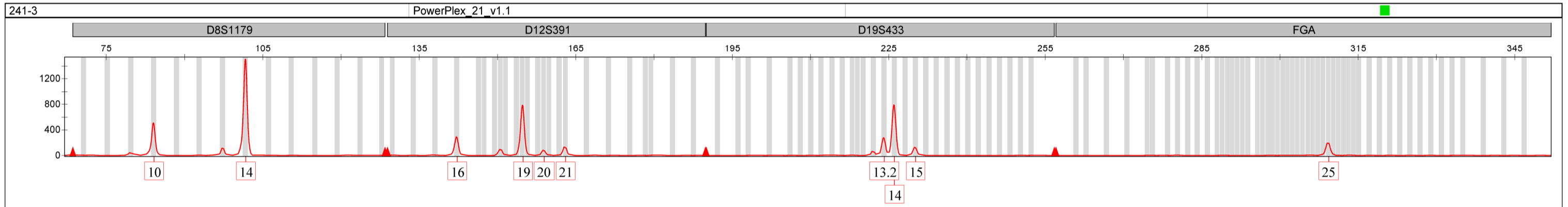
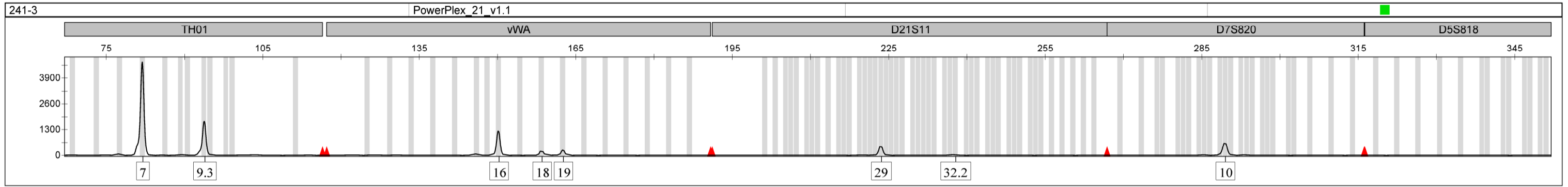
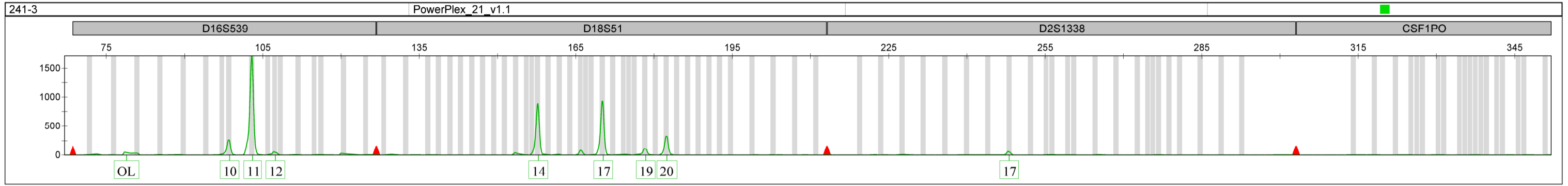
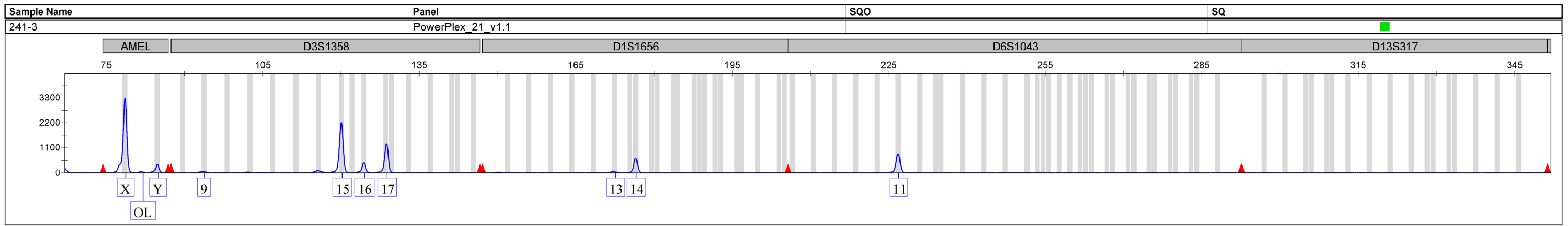
Des contrôles ont été effectués à chaque étape de l'analyse et ont donné les résultats attendus.

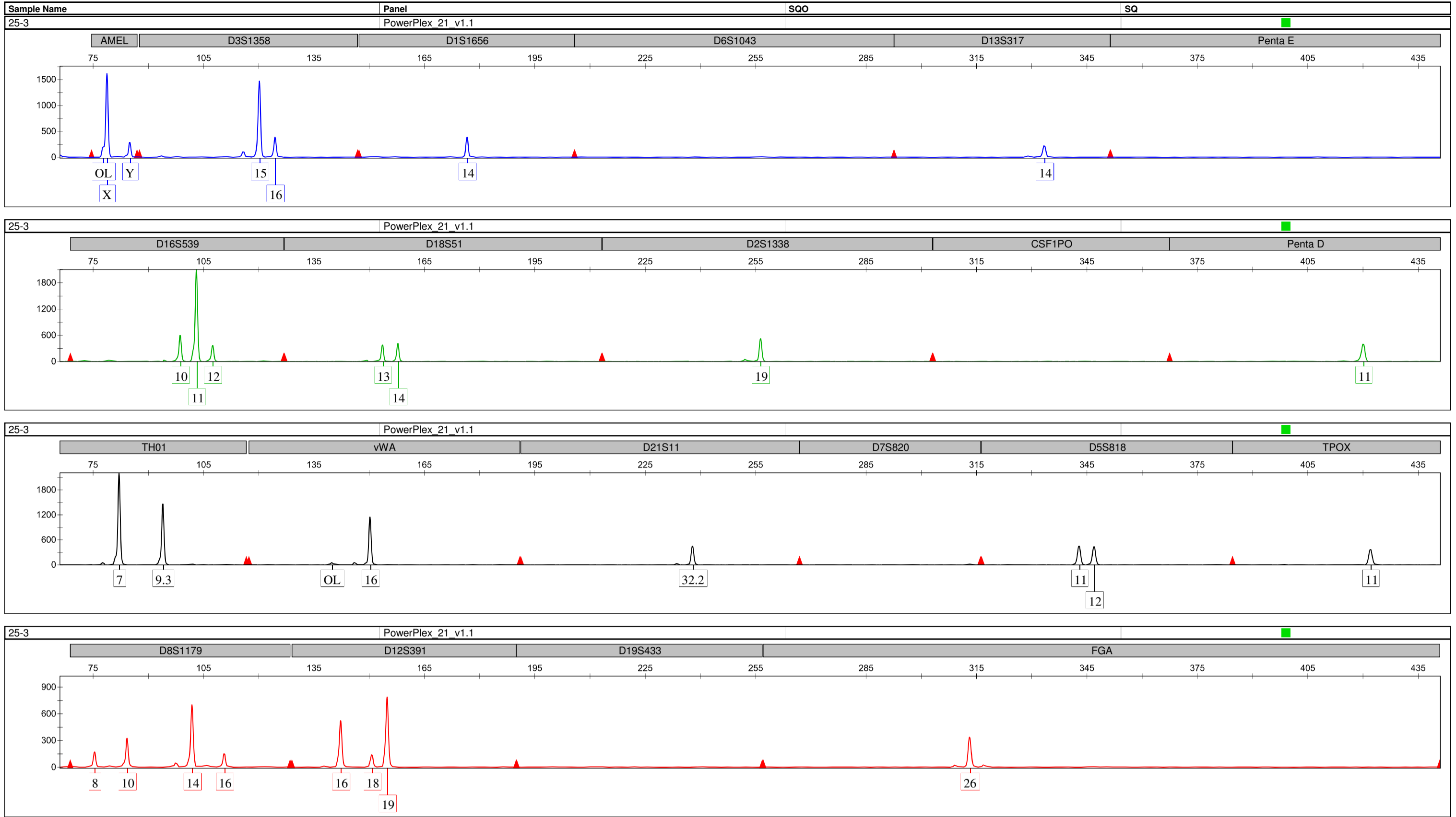
Les profils ci-dessus ne correspondent à aucun membre du personnel ni à aucun utilisateur du laboratoire Paléo-DNA, passé ou présent. Cette analyse est conforme aux exigences demandées par le client. Les détails des procédures expérimentales et analyses de ce cas se trouvent dans le dossier du laboratoire Paléo-ADN, numéro de cas SER066-17. Votre avis est important pour nous ! S'il vous plaît remplir notre client sondage à <http://lucas.lakeheadu.ca/customer-survey>.

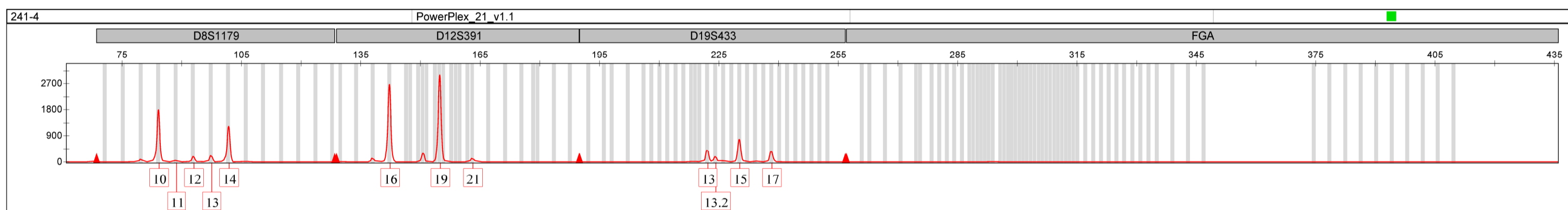
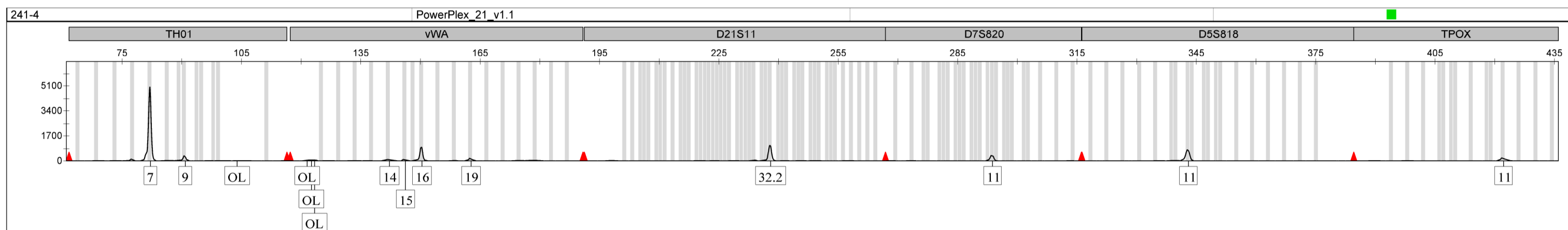
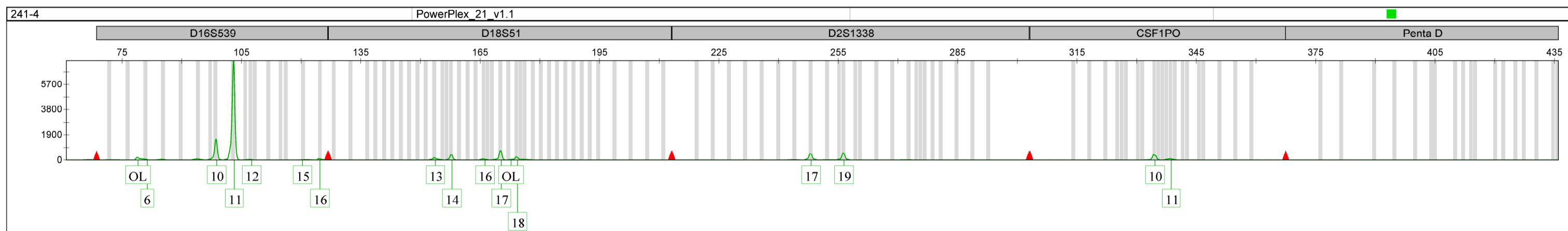
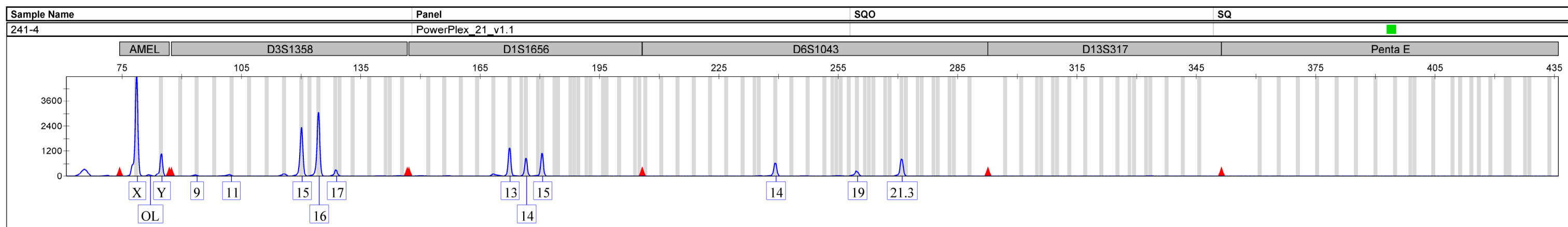
Directeur technique : Stephen Fratpietro
6 février 2018

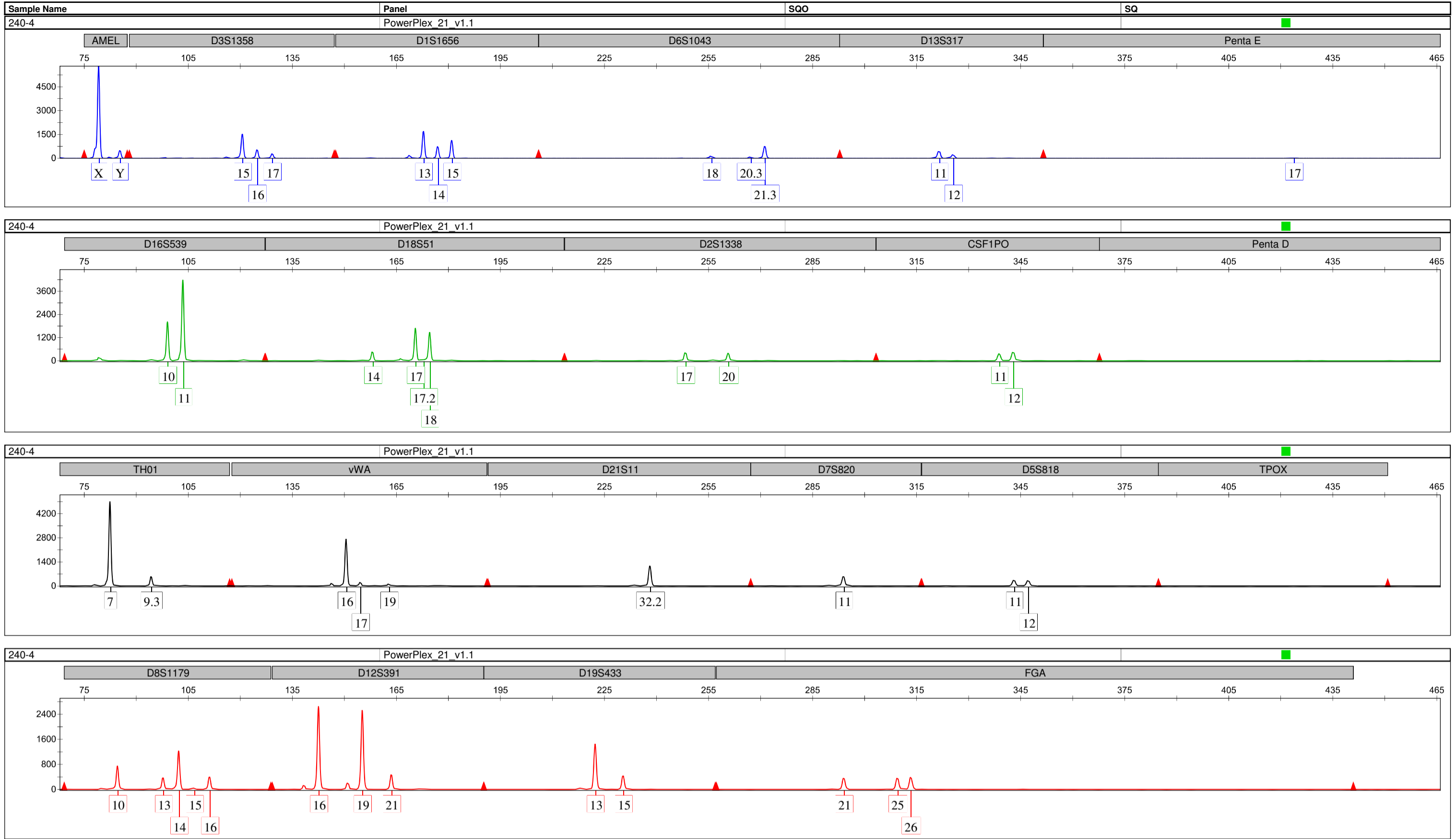
Traduit par Catherine Rayer

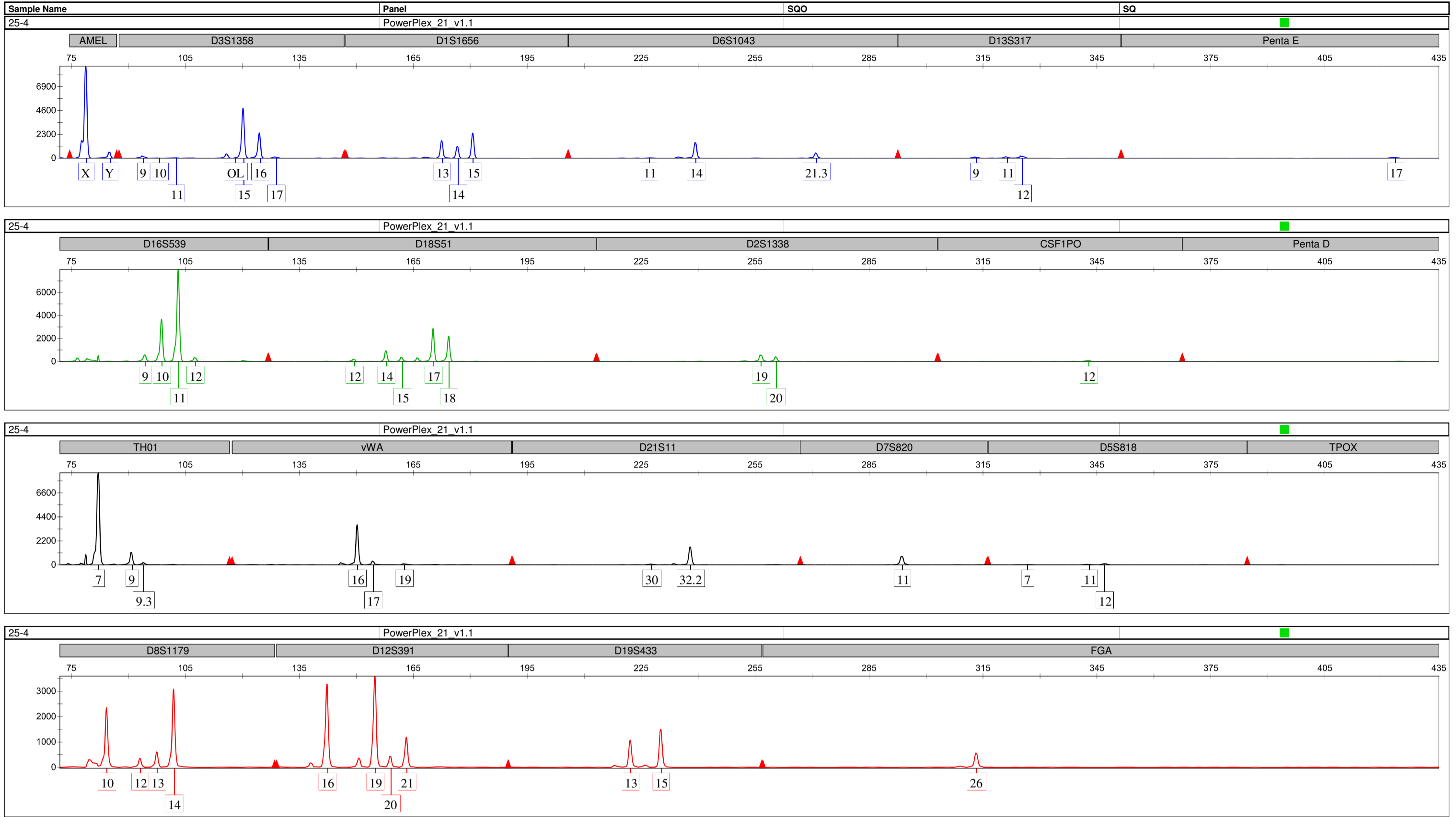


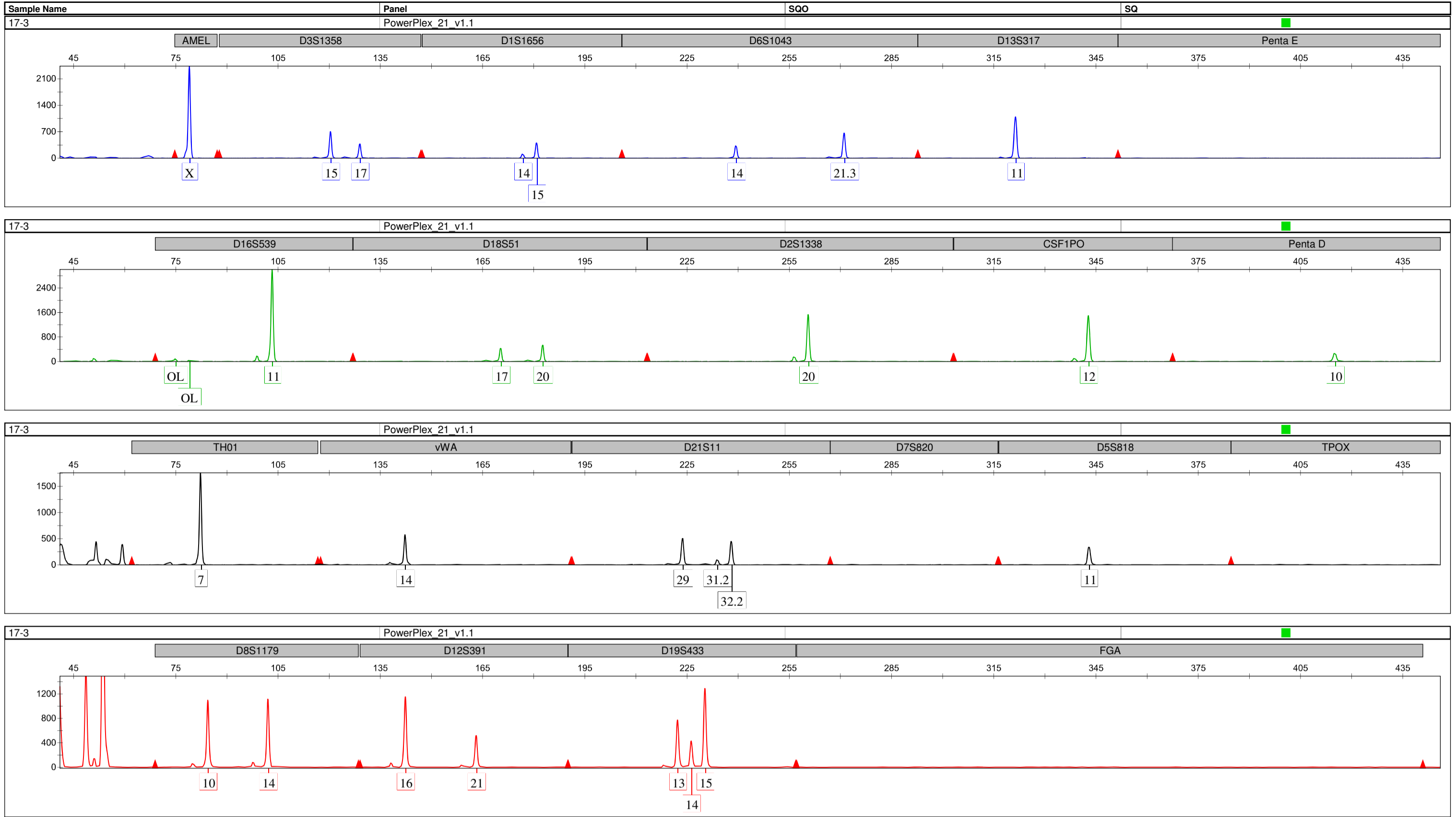


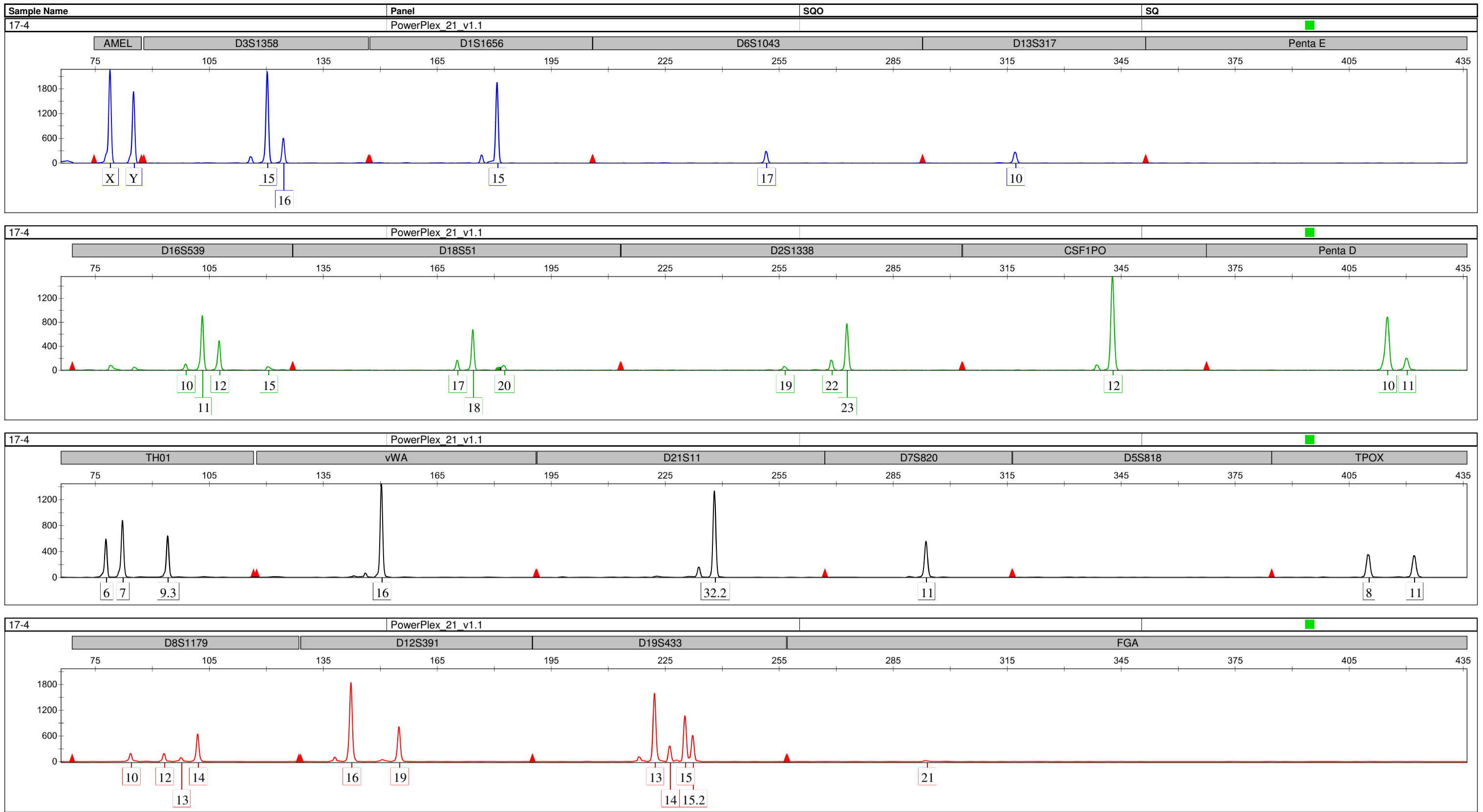


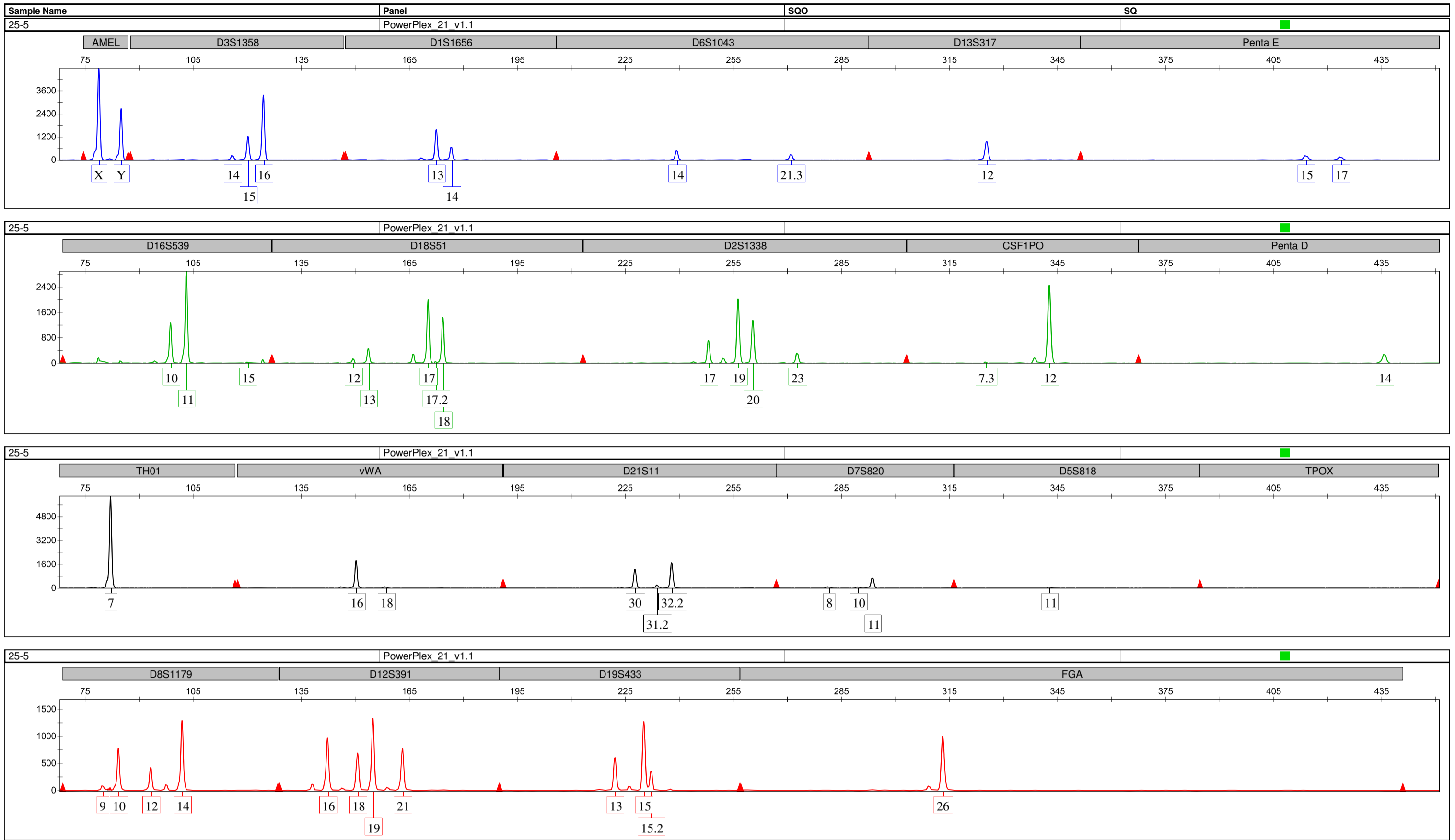












GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

PRELIMINARY REPORT Ancient DNA

October 16th 2017

Our Ref No: GC 4516/23/09/2017

Preliminary report 1 on DNA analysis

A sealed cardboard box containing five plastic vials was received by us on 23rd September 2017. Seals of the cardboard box was found to be intact at the time of receipt.

Plastic vials with the following items (Table: 01) were submitted for genetic analysis by Vitaly Safarov for genetic analysis.

Five samples were designated the following code numbers prior testing by Genetech.

Table: 01

Genetech code number	Label on the container	comments
GC 4516/S1/TB	Sample 1 MARIA Tail Bone	A brownish colour material
GC 4516/S2/MF	Sample 2 MARIA FOOT	Light brownish colour particles
GC 4516/S2-B/HT	Sample 2-A MARIA Hand tissue	brownish colour particles
GC 4516/T8/SB	Tube 8 Baby SPINE BONE	A small fragment of a hard material
GC 4516/T9/H	Tube 7 Baby HAIR	15 small hair shafts

Background to the analysis

Chromosomal DNA (nuclear DNA) testing: amplification of DNA loci on human chromosomal DNA which exhibit a high degree of variation between individuals. These loci contain Short Tandem Repeat (STR) units of DNA and the number of repeats varies between individuals. The variable numbers of repeating units in the population observed for a given locus are referred to as "alleles", and the alleles are named after the number of repeating units that they contain. Each individual inherits two alleles (or two copies of one allele) from his/her biological mother and father. Following PCR, the products are genotyped and alleles are visualized as DNA profiles. The allelic profile with respect to each STR locus is referred to as the DNA profile of an individual. Each person's DNA profile is different from that of every other individual. The only exception is identical twins, who share 100 percent identical DNA.

All samples are prepared and extracted in a room dedicated to biological samples that are having limited quantity of DNA. High scientific and professional standards were strictly adhered when handling the samples in order to ensure the quality of the test results.

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

- **DNA extraction** : Column based DNA purification method of DNA extraction. QIAGEN, Germany.
- **PCR amplification**: AmpF/STR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA)
The DNA locations in AmpF/STR Identifiler kit are **specific to primates**.
- **Genotyping**: 3500xL Automated Genetic Analyzer. (Applied Biosystems, USA)
- **Data analysis**: GeneMapper ID-X Software. (Applied Biosystems, USA)

Results:

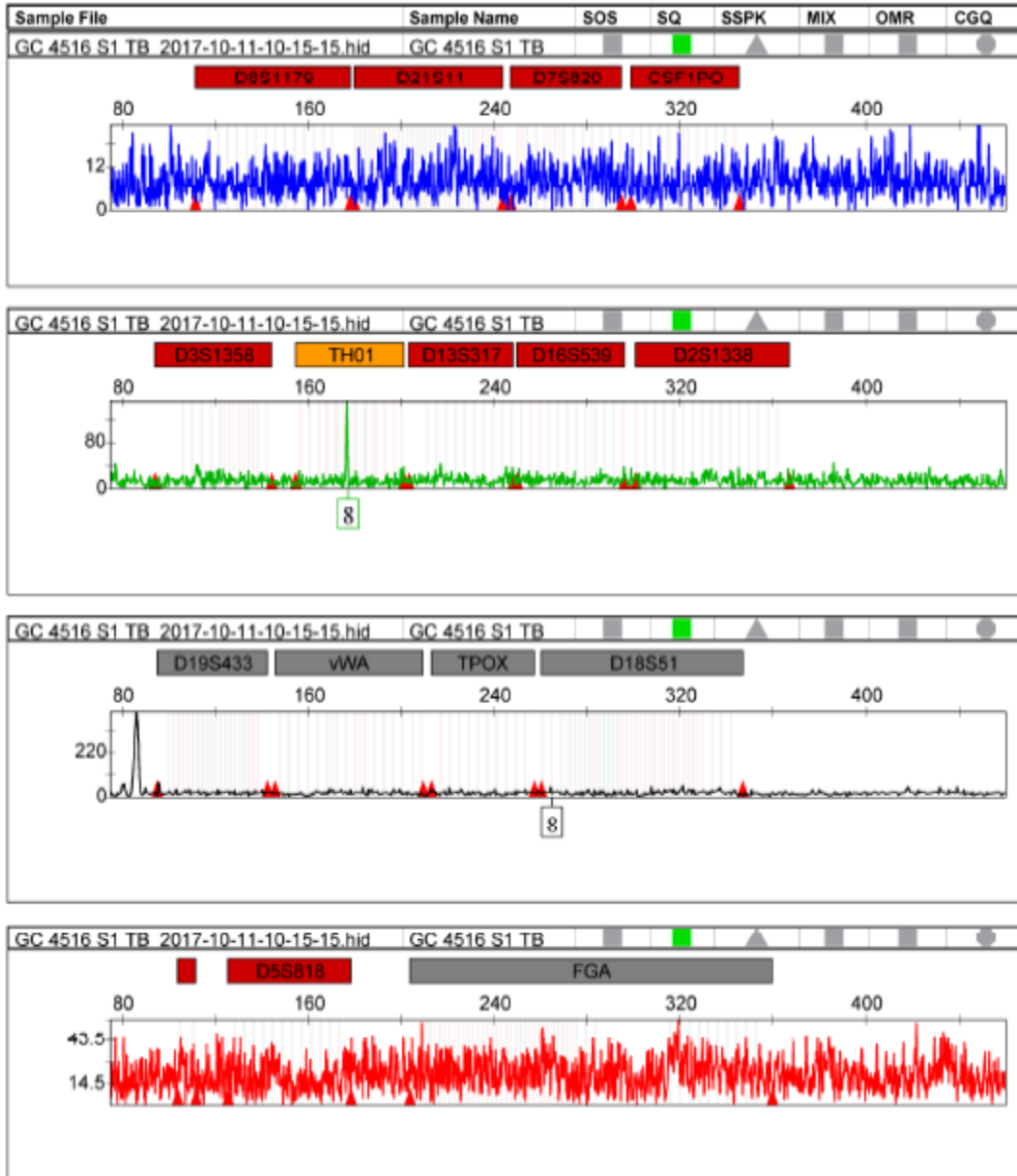
Sample label: **MARIA Tail Bone**

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

GeneMapper® ID-X 1.5



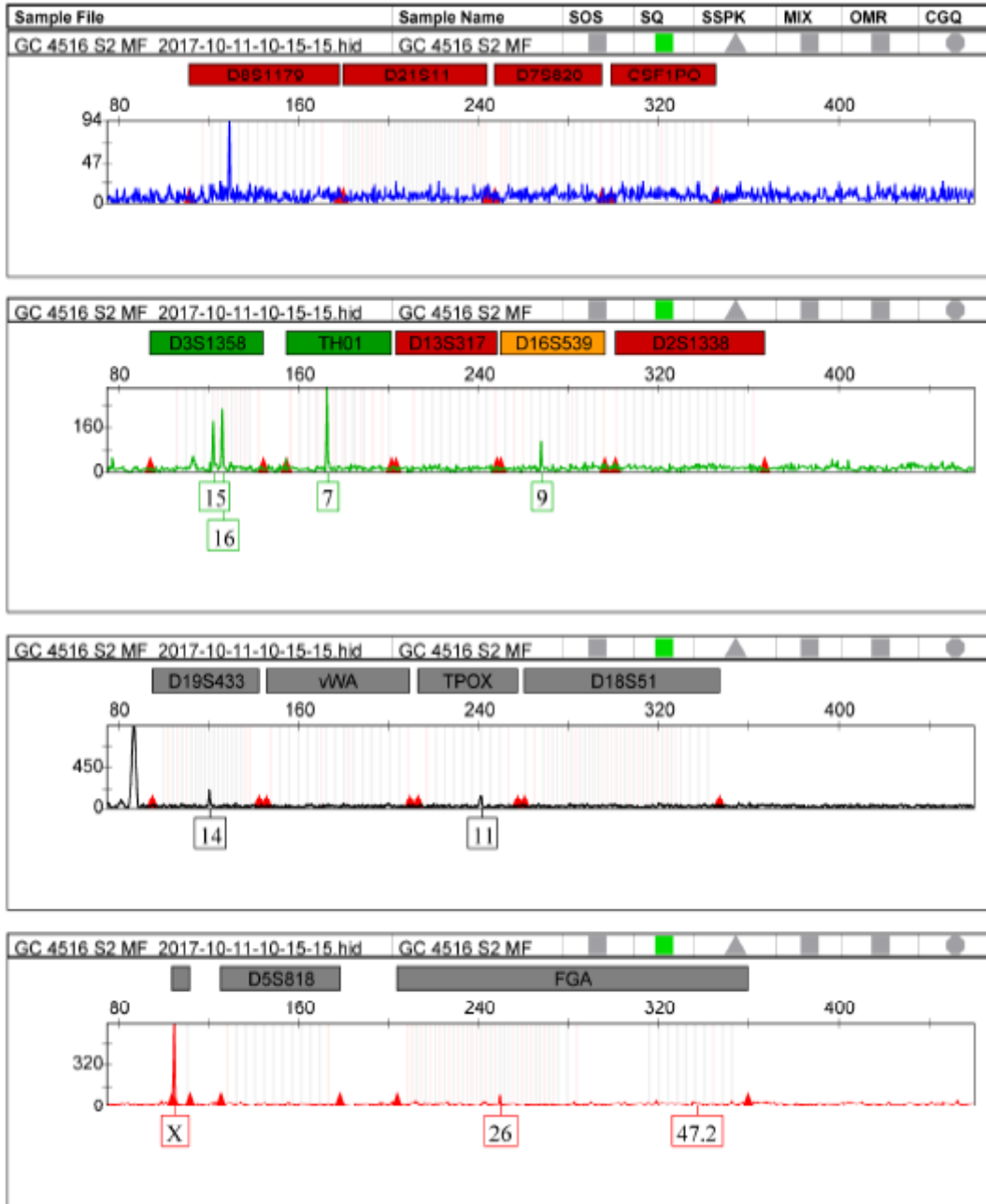
Sample label: **MARIA FOOT**

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetechn@slt.lk

GeneMapper® ID-X 1.5



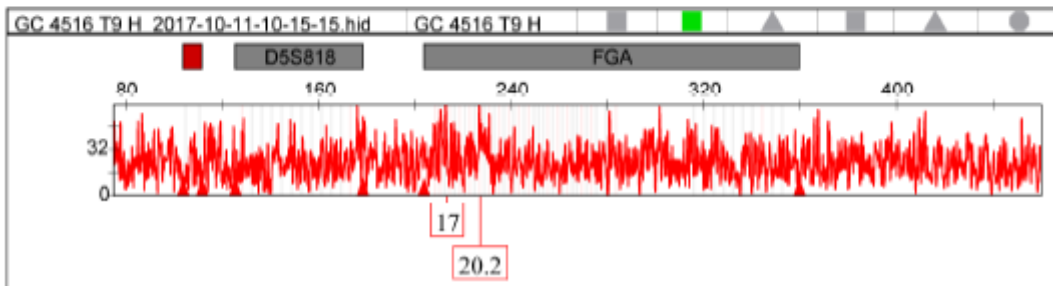
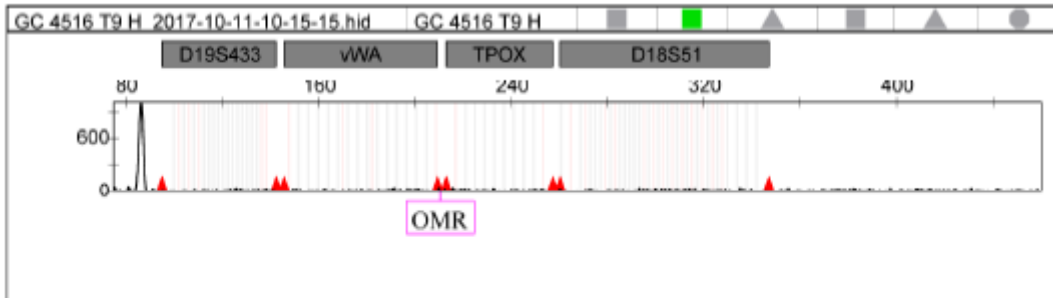
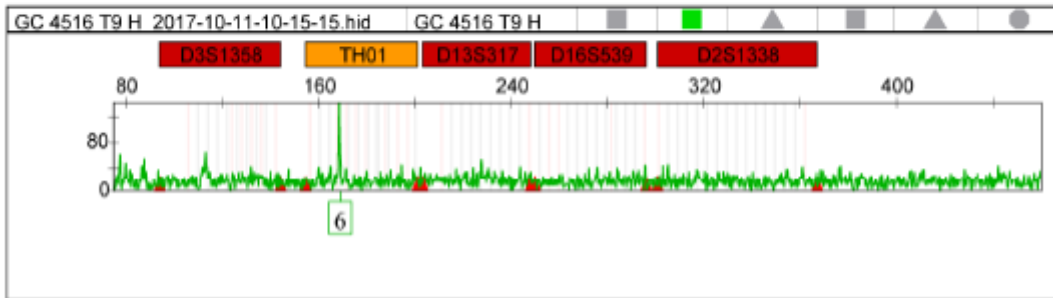
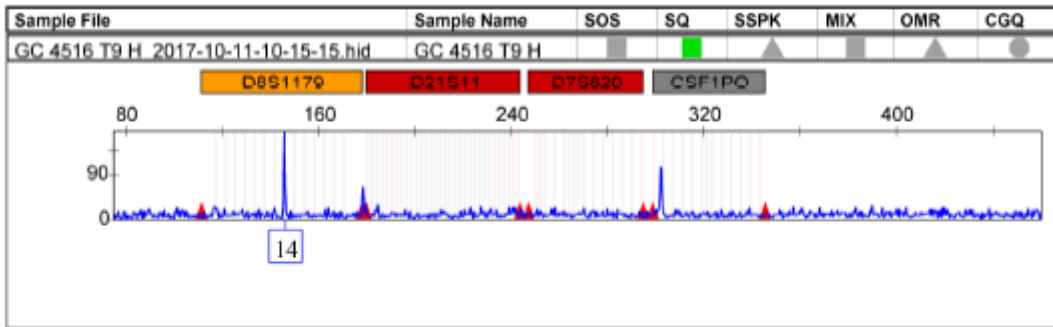
GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

Sample label: **Baby HAIR**

GeneMapper® ID-X 1.5



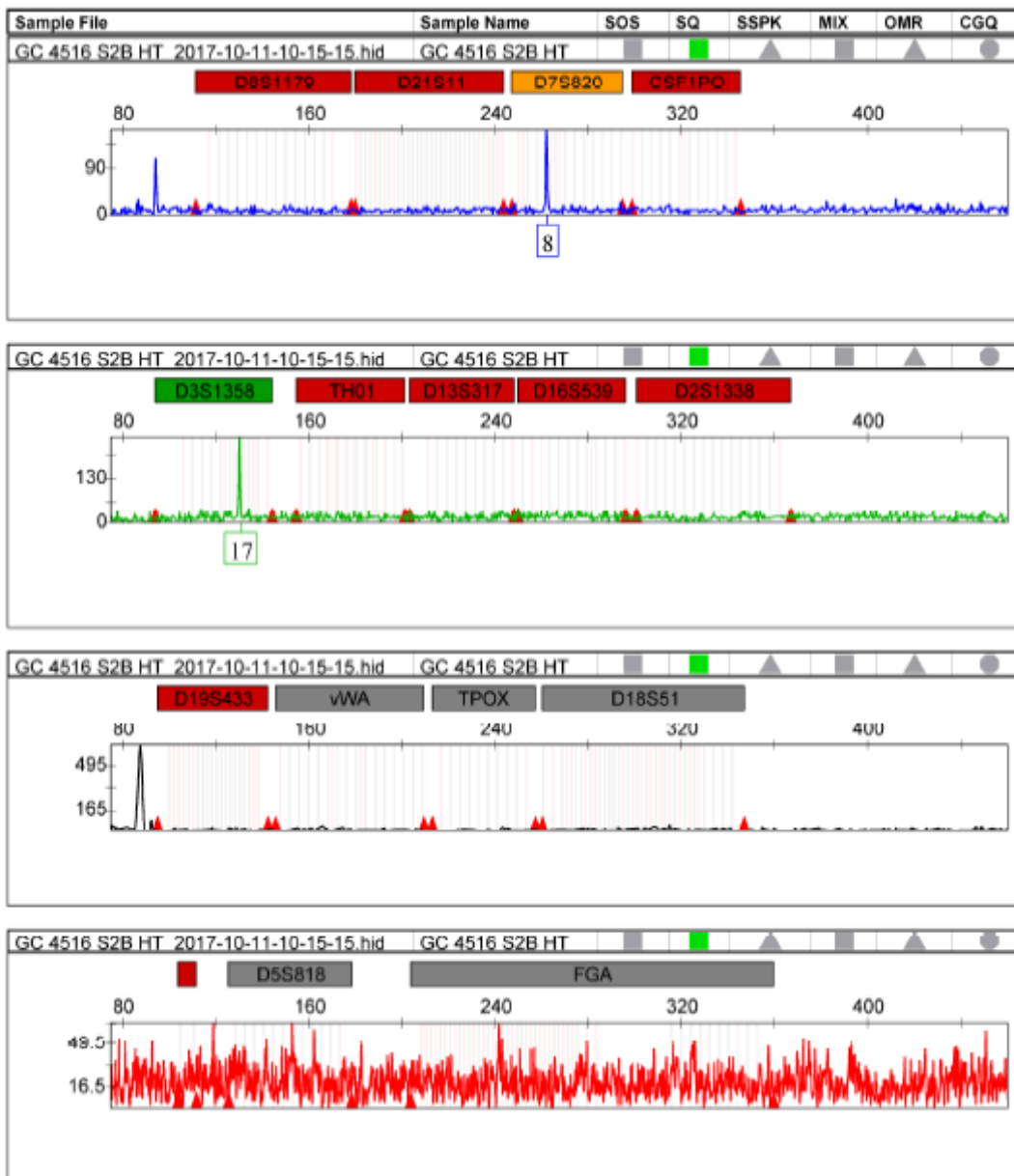
Sample label: **MARIA Hand tissue**

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

GeneMapper® ID-X 1.5



Baby SPINE BONE: Quality of nuclear DNA was found to be not satisfactory to perform testing. Sample is being re-analyzing.

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetechn@slit.lk

Interpretation:

1. MARIA FOOT

MARIA FOOT generated a partial DNA profile having allelic data from only five (05) out of 15 Non-sexchromosomal DNA locations tested.

This result indicates that the sample MARIA FOOT contain DNA. However DNA contained in MARIA FOOT may have been partially destroyed.

The reason for the above maybe due to prolong exposure to environmental conditions such as high humidity and high temperature.

The amelogenin test for sex determination (testing of the sex chromosomes) found that sample MARIA FOOT belongs to a **FEMALE individual**.

Overall results suggests that **MARIA FOOT belongs to a primate**.

2. MARIA Tail Bone, Baby HAIR and MARIA Hand tissue

Nuclear DNA or chromosomal DNA (DNA inside the nucleus of the cells) in the samples; MARIA Tail Bone, Baby HAIR and MARIA Hand tissue was found to be significantly destroyed.

The reason for the above maybe due to MARIA Tail Bone, Baby HAIR and MARIA Hand tissue may have been subjected to degradation due to prolonged exposure to environmental conditions such as high humidity and high temperature and also the amount of biological material present may have been insufficient to be typed.

Every reasonable endeavour was made to obtain a successfully amplified PCR product. The extractions were subjected to dilution, concentration and purification techniques in order to make them typable. However the failure to amplify the DNA by PCR, despite the use of these techniques, indicates that nuclear /chromosomal DNA contained in the above samples may have been degraded beyond the point of being typable.

3. **Baby SPINE BONE:** Results of nuclear DNA (chromosomal DNA) was found to be not satisfactory for analysis. Sample is being re-analyzing.

DNA tests targeting several locations which resist against DNA degradation on the mitochondrial genome (DNA found outside the nucleus of the cells) are being conducted for all samples.

Procedures in place for laboratory sterilization and elimination and the use of controls suggest that the above results contained authentic DNA allelic data and not contamination. All the data were screened against an elimination database to identify any contamination from lab staff of Genetech. However the possibility of contamination by a previous handler prior submitting the samples to Genetech cannot be excluded.

Investigators:

Dr. Ruwan Illeperuma

Mr. Manju Fernando

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

RAPPORT PRÉLIMINAIRE ADN ancien

16 Octobre 2017

Our Ref No: GC 4516/23/09/2017

Rapport préliminaire 1 sur l'analyse de l'ADN

Nous avons reçu une boîte en carton scellée contenant cinq flacons en plastique le 23 septembre 2017. Les sceaux de la boîte en carton étaient intacts au moment de leur réception.

Les flacons en plastique contenant les éléments suivants (tableau 01) ont été soumis à Vitaly Safarov aux fins d'analyse génétique.

Cinq échantillons ont été désignés par les numéros de code suivants avant d'être testés par Genetech.

Numéro de code Genetech	Étiquette sur le conteneur	Commentaires
GC 4516/S1/TB	Echantillon 1 MARIA coccyx	Un matériau de couleur brunâtre
GC 4516/S2/MF	Echantillon 2 MARIA pied	Particules de couleur brunâtre pâle
GC 4516/S2-B/HT	Echantillon 2-A MARIA tissus de la main	Particules de couleur brunâtre
GC 4516/T8/SB	Tube 8 Bébé – Os colonne vertébrale	Un petit fragment d'un matériau dur
GC 4516/T9/H	Tube 7 Bébé – cheveux	15 petits fragments de cheveux

Contexte de l'analyse

Tests d'ADN chromosomique (ADN nucléaire): amplification de loci d'ADN sur l'ADN chromosomique humain présentant un degré élevé de variation entre les individus. Ces loci contiennent des unités d'ADN en répétition tandem courte (STR) et le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre. Les nombres variables d'unités répétitives dans la population observée pour un locus donné sont appelés «allèles», et les allèles sont nommés d'après le nombre d'unités répétitives qu'ils contiennent. Chaque individu hérite de deux allèles (ou deux copies d'un allèle) de ses père et mère biologiques. En suivant le PCR, les produits sont génotypés et les allèles sont visualisés sous forme de profils d'ADN. Le profil allélique par rapport à chaque locus STR est appelé profil ADN d'un individu. Le profil ADN de chaque personne est différent de celui de chaque autre individu. La seule exception concerne les jumeaux identiques, qui partagent un ADN identique à 100%.

Tous les échantillons sont préparés et extraits dans une salle réservée aux échantillons biologiques contenant une quantité limitée d'ADN. Des normes scientifiques et professionnelles élevées ont été rigoureusement respectées lors de la manipulation des échantillons afin de garantir la qualité des résultats des tests.

GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

- **DNA extraction** : Column based DNA purification method of DNA extraction. QIAGEN, Germany.
- **PCR amplification**: AmpF/STR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA)

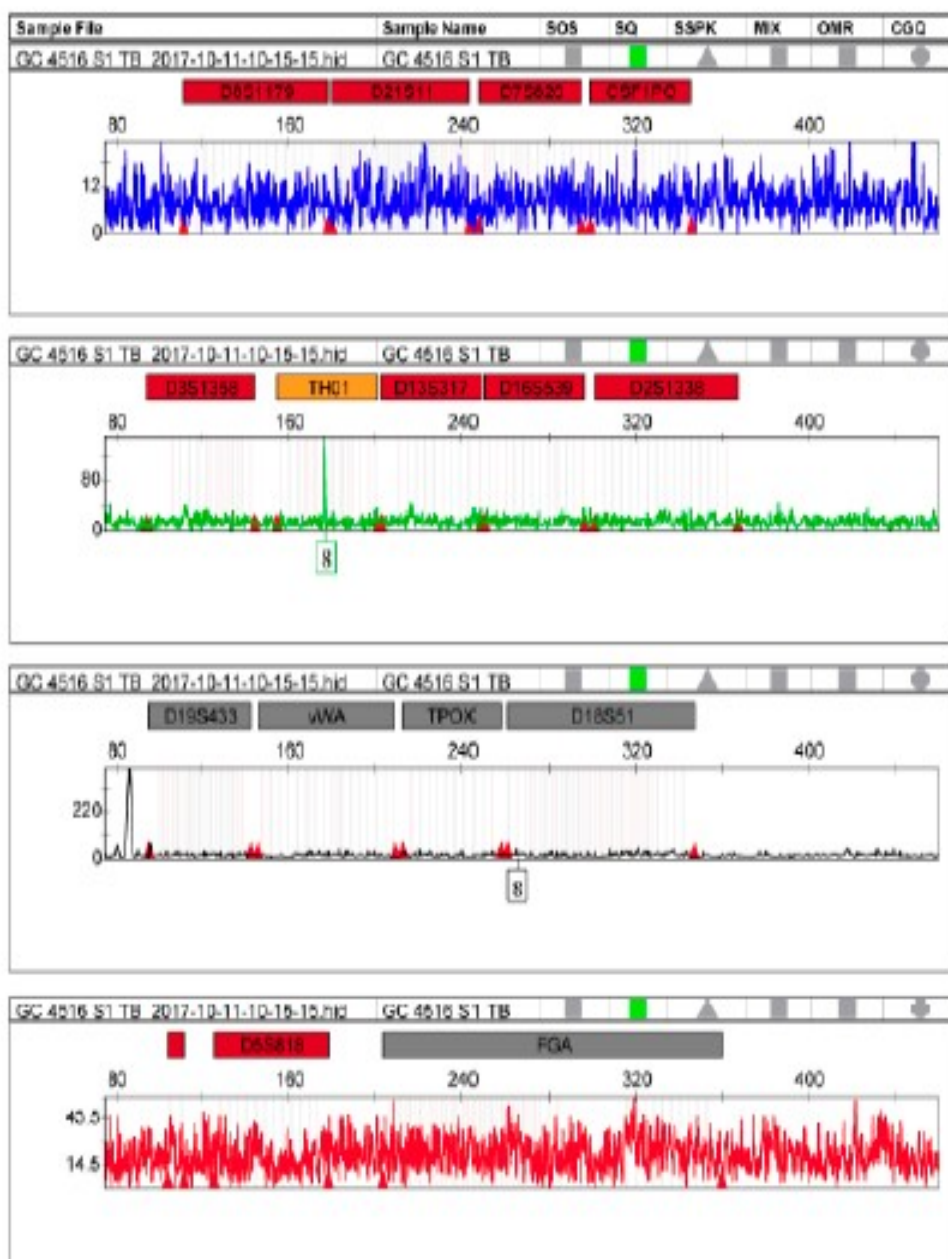
The DNA locations in AmpF/STR Identifiler kit are **specific to primates**.

- **Genotyping**: 3500xL Automated Genetic Analyzer. (Applied Biosystems, USA)
- **Data analysis**: GeneMapper ID-X Software. (Applied Biosystems, USA)

Résultats ;

Etiquette de l'échantillon : coccyx de Maria

GeneMapper® ID-X 1.5



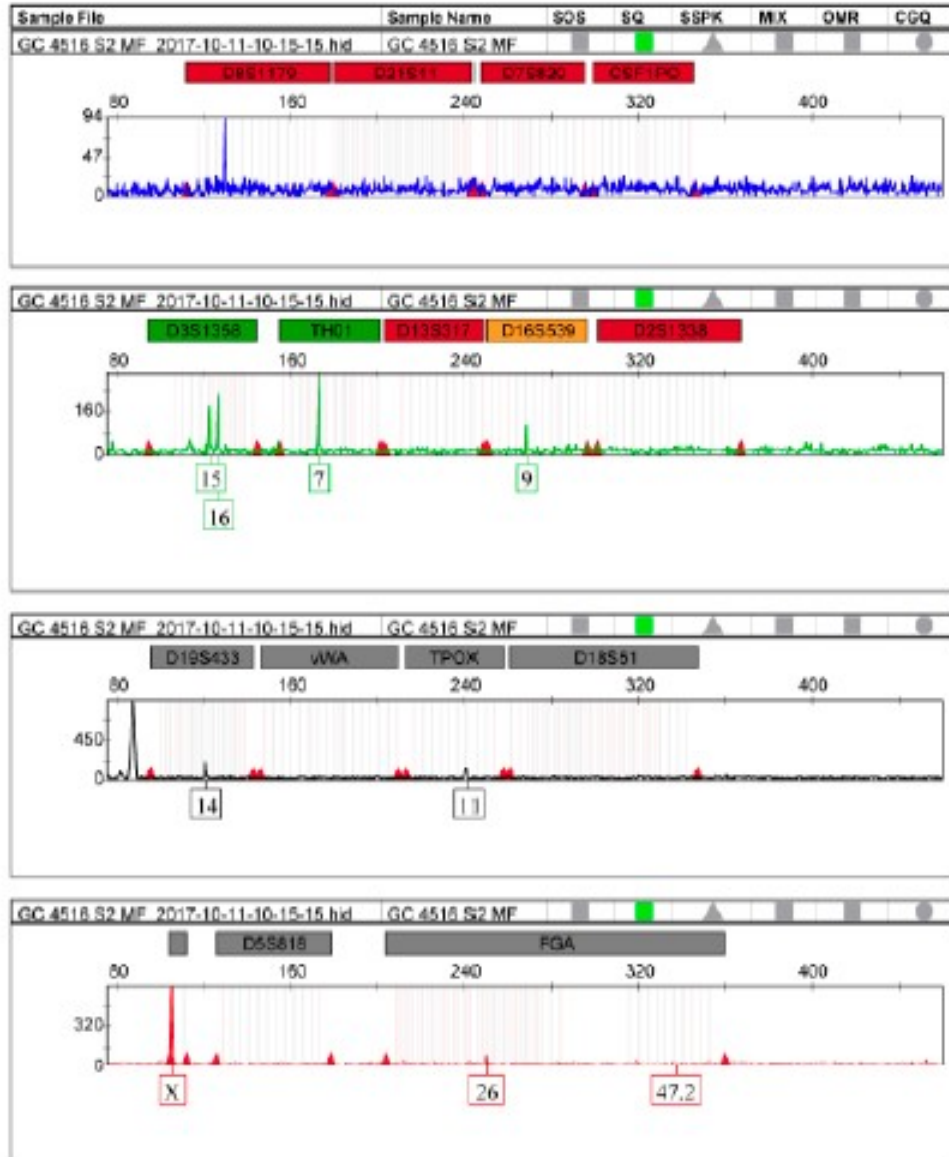
GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

Etiquette de l'échantillon : pied de Maria

GeneMapper® ID-X 1.5



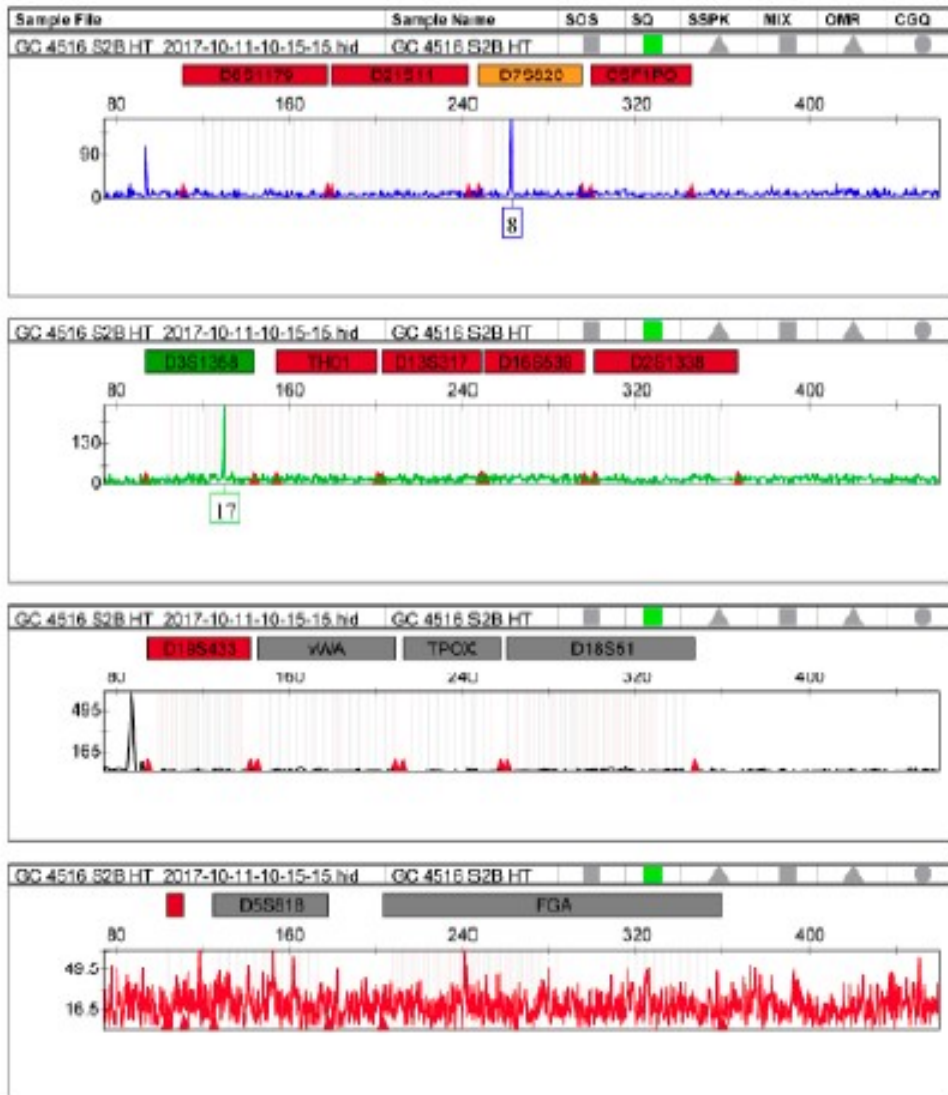
GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genotech@slt.lk

Etiquette de l'échantillon : tissus de la main de Maria

GeneMapper® ID-X 1.5



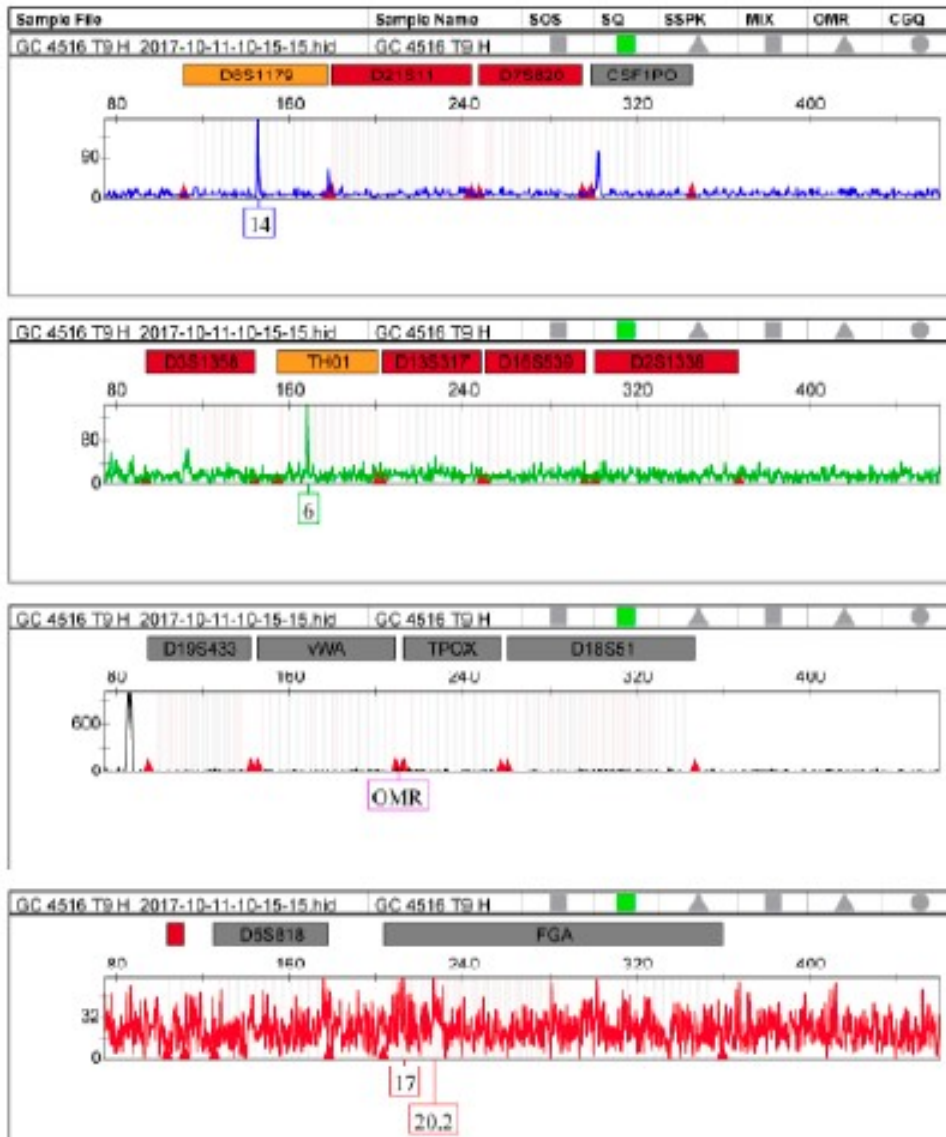
GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

Etiquette de l'échantillon : cheveux du bébé

GeneMapper® ID-X 1.5



GENETECH

54 Kitulwatte Road, Colombo 08, Sri Lanka. CO 00800

Phone: +94 11 2696992, +94 11 5839553, +94 11 5840814. Fax: +94 11 2686137. Email: genetech@slt.lk

Interprétation:

1. PIED DE MARIA

Le PIED DE MARIA a généré un profil d'ADN partiel contenant des données alléliques provenant de seulement cinq (05) des 15 sites d'ADN non sexchromosomiques testés.

Ce résultat indique que l'échantillon du pied de MARIA contient de l'ADN. Cependant, l'ADN contenu dans le pied de MARIA peut avoir été partiellement détruit.

La raison de ce qui précède peut être due à une exposition prolongée à des conditions environnementales telles qu'une humidité élevée et une température élevée.

Le test à l'amélogénine pour la détermination du sexe (test des chromosomes sexuels) a révélé que l'échantillon du pied de MARIA appartient à une personne de sexe féminin.

Les résultats globaux suggèrent que le pied de MARIA appartient à un primate.

2. Os du coccyx de MARIA, Cheveux du bébé et tissus de la main de MARIA

ADN nucléaire ou ADN chromosomique (ADN à l'intérieur du noyau des cellules) dans les échantillons; l'os du coccyx de MARIA, les cheveux du bébé et les tissus de la main de MARIA ont été trouvés dans un état de destruction significatif.

La raison invoquée ci-dessus est peut-être due à ce que l'os du coccyx de MARIA, les cheveux du bébé, et les tissus de la main de MARIA peuvent avoir été soumis à une dégradation en raison d'une exposition prolongée à des conditions environnementales telles qu'une forte humidité et des températures élevées. De plus, la quantité de matériel biologique présente peut avoir été insuffisante pour être typée.

Tous les efforts raisonnables ont été déployés pour obtenir un produit de PCR amplifié avec succès. Les extractions ont été soumises à des techniques de dilution, de concentration et de purification afin de les rendre typables. Cependant, l'incapacité à amplifier l'ADN par PCR, malgré l'utilisation de ces techniques, indique que l'ADN nucléaire / chromosomique contenu dans les échantillons ci-dessus peut avoir été dégradé au-delà du point de pouvoir être typé.

3. Os de la colonne vertébrale du bébé : Les résultats de l'ADN nucléaire (ADN chromosomique) se sont avérés non satisfaisants pour l'analyse. L'échantillon est en cours de ré-analyse.

Des tests ADN ciblant plusieurs sites qui résistent à la dégradation de l'ADN du génome mitochondrial (ADN trouvé en dehors du noyau des cellules) sont en cours pour tous les échantillons.

Les procédures en place en laboratoire pour la stérilisation, l'élimination et l'utilisation de contrôles suggèrent que les résultats ci-dessus contenaient des données alléliques à l'ADN authentiques et non une contamination. Toutes les données ont été analysées dans une base de données d'élimination afin d'identifier toute contamination du personnel de laboratoire de Genetech. Cependant, la possibilité d'une contamination par un ancien manipulateur avant de soumettre les échantillons à Genetech ne peut être exclue.

Chercheurs :

Dr. Ruwan Illeperuma

Mr. Manju Fernando