

**KHẢO SÁT TẦN SUẤT ALEN CỦA 15 LOCUS STR
TRÊN NHIỄM SẮC THỂ THƯỜNG TRONG QUẦN THỂ NGƯỜI MUÔNG
SỐNG Ở TỈNH HÒA BÌNH, VIỆT NAM**

Đến tòa soạn 11 – 6 – 2015

Trần Trọng Hội, Lê Thị Bích Trâm

Viện Kỹ thuật Hóa-Sinh và Tài liệu nghiệp vụ - Tổng cục Hậu cần - Kỹ thuật – Bộ Công an

Phạm Đăng Khoa, Hồ Quang Huy

Đại học Y Hà Nội

Trịnh Đình Đạt

Khoa Sinh học - ĐH Khoa học Tự nhiên - ĐH Quốc gia Hà Nội

Nguyễn Văn Hà

Viện Khoa học hình sự - Tổng cục Cảnh sát - Bộ Công an

SUMMARY

**ALLELE FREQUENCIES OF 15 AUTOSOMAL STRs LOCI IN MUONG
POPULATION LIVING IN HOA BINH PROVINCE OF VIETNAM**

In this study, fifteen autosomal STRs loci were analyzed from 104 unrelated healthy individuals of Muong population living in Hoa Binh Province, Vietnam. The whole blood samples were collected from these studied individuals and stored at -20°C . Genomic DNA was extracted from blood samples using salting out Miller's method. These samples were amplified simultaneously 15 STR loci (D3S1358, TH01, D21S11, D18S11, PentaE, D5S818, D13S313, D7S820, D16S359, CSF1PO, PentaD, vWA, D8S1179, TPOX and FGA) using a multiplex PCR systems which had been published in our recent research results. The PCR products were separated together with Internal Lane Standard 600 (Promega, DG1071) on the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analysed by GeneMapper® ID software v 3.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instruction. Allele frequencies and statistical parameters for 15 studied loci were calculated by EasyDNA_PopuData software which is developed by Wing K. Fung, Yue-Qing Hu and Hong Lee, The University of Hong Kong. The statistical parameters which were analysed by this software are observed heterozygosity (OH), expected heterozygosity (EH), standard error of expected heterozygosity (EH_SE), power of discrimination (PD), probability of excluding a random man from paternity (PE), chi-square test statistic for the Hardy-

Weinberg equilibrium (HWE) of the locus (CHI), 5% critical value of the chi-square test (CHI(c)) and p-value of the exact test under HWE of the locus (P1). The agreement with HWE was confirmed for 15 studied loci (based on the χ^2 -test only). The combined power of discrimination (CPD) and the combined power of exclusion (CPE) for the 15 studied loci were 0,99999999999999998 and 0.999998, respectively.

The data in this study can be used for the field of Forensic DNA Casework, DNA Databases, Missing Persons, Parentage and Kinship Testing,

Keywords: Autosomal STRs loci; Muong population; Multiplex PCR.

1. MỞ ĐẦU

Trong những kết quả nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã thực hiện thành công việc tối ưu thành phần multiplex PCR cho 16 cặp mồi gắn huỳnh quang đặc hiệu cho 15 locus STR trên nhiễm sắc thể (NST) thường (D3S1358, TH01, D21S11, D18S11, PentaE, D5S818, D13S313, D7S820, D16S359, CSF1PO, PentaD, vWA, D8S1179, TPOX và FGA) và 1 locus Amelogenin xác định giới tính trong cùng một phản ứng nhân gen trên máy GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) và sản phẩm PCR được phân tích trên hệ thống điện di mao quản PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [1]. Trong số 16 locus gen kể trên có 13 locus gen thuộc hệ CODIS (Combined DNA Index System) của Cục Điều tra Liên bang Mỹ (FBI-Federal Bureau of Investigation) đang sử dụng thường quy trong phòng thí nghiệm [2, 10, 11]. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để tiến hành nghiên cứu sản xuất thành công bộ KIT 16 gen sử dụng mồi gắn huỳnh quang tại Việt Nam phục vụ cho công tác giám định, xây dựng cơ sở dữ liệu tàng thư ADN, nghiên cứu sự đa dạng di truyền trong quần thể

người Việt Nam và các nhu cầu dân sinh khác.

Phát triển theo hướng ứng dụng kết quả nghiên cứu trên vào việc xác định sự đa dạng di truyền trong quần thể người Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “*Khảo sát tần suất alen của 15 locus STR trên nhiễm sắc thể thường trong quần thể người Mường sống ở tỉnh Hòa Bình, Việt Nam*”. Mục tiêu của nghiên cứu là: Xây dựng được bảng tần suất alen và các chỉ số thống kê cho 15 locus STR trên NST thường của 104 cá thể người Mường khỏe mạnh, không có quan hệ huyết thống và sống tại tỉnh Hòa Bình, Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

1.1. Nguồn mẫu khảo sát

Nguồn mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này là mẫu máu toàn phần, được lấy từ tĩnh mạch của 104 cá thể người Mường (gồm 63 nam và 41 nữ), khỏe mạnh, không có mối quan hệ huyết thống và sống tại tỉnh Hòa Bình, Việt Nam. Tất cả những người được lấy mẫu đều phải trải qua một cuộc phỏng vấn để đảm bảo về nguồn gốc dân tộc của mình và cung cấp thông tin cá nhân theo mẫu phiếu quy định. Các mẫu máu được chống đông bằng EDTA, đựng trong ống lấy

máu chuyên dụng và được bảo quản ở -20°C.

1.2. Hóa chất và vật tư tiêu hao dùng cho tách chiết ADN: Sử dụng của hãng Sigma, Promega, Invitrogen và Corning.

1.3. Hóa chất và vật tư tiêu hao dùng cho phản ứng PCR:

- Hỗn hợp môi (HQ 16 Primer Mix) có thành phần nồng độ mỗi môi như sau: 12μM FGA; 5μM TPOX; 7μM D8S1179; 6,5μM vWA; 2μM Amelogenin; 12μM Penta E; 12μM D18S51; 4μM D21S11; 5μM TH01; 2,5μM D3S1358; 10μM Penta D; 3,5μM CSF1PO; 5μM D16S539; 5μM D7S820; 3μM D13S317 và 2,5μM D5S818. Bảo quản ở -20°C [1].

- Hóa chất dùng cho PCR (sử dụng của hãng Promega-Mỹ): 100mM dNTP set (Cat. no.: U1420); GoTaq® Hot Start polymerase (Cat. no.: M5005) có kèm theo 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer và 25mM MgCl₂.

- Mẫu ADN chuẩn 2800M (10ng/μl) của hãng Promega (Cat. no.: DD7251)

1.4. Hóa chất và vật tư tiêu hao dùng cho máy điện di mao quản 3130 Genetic Analyzer

- Sử dụng hóa chất của hãng Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): 10X Running Buffer with EDTA (Cat. no.: 4486293, AB), POP-4™ Polymer (Cat. no.: 4352755, AB), Hi-Di Formamide (Cat. no.: 4311320, AB), mao quản 3130/3100-Avant Genetic Analyzer 4-Capillary Array, 36 cm (Cat. no.: 4333464, AB), Internal Lane Standard 600 (Promega, DG1071) và các vật tư tiêu hao cần thiết.

- Nước deion được lấy từ hệ thống lọc nước Milli-Q-Integral 3 (Millipore -Mỹ) của phòng thí nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp thu mẫu:* 2ml máu toàn phần được lấy từ tĩnh mạch của mỗi cá thể nghiên cứu (104 cá thể) cho vào ống đựng máu chuyên dụng có sẵn EDTA để chống đông, lắc nhẹ nhàng và bảo quản ở -20°C.

- *Phương pháp tách chiết ADN:* ADN tổng số được tách chiết từ 104 mẫu máu theo phương pháp “salting out” của tác giả S.A.Miller [6].

- *Phương pháp định lượng ADN:* Lấy 1μl ADN tổng số thu được sau tách chiết đem định lượng trên máy NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, Mỹ).

- *Phương pháp PCR* [1, 5, 7, 8, 9]: 15 locus STR và 1 locus Amelogenin xác định giới tính của mỗi cá thể nghiên cứu, được nhân bội đồng thời trong 20μl phản ứng PCR có thành phần đã được tối ưu trong nghiên cứu là: 250μM dNTP; 1,2X Colorless GoTaq® Flexi Buffer; 1,75mM MgCl₂; 3units GoTaq® Hot Start polymerase; 2μl HQ 16 Primer Mix và 1-2ng ADN khuôn [1]. Phản ứng được thực hiện trên máy GeneAmp®PCR System 9700 với chu trình nhiệt là: 96 °C - 2 phút; (94 °C - 1 phút; 60 °C - 1 phút; 72 °C - 1 phút) x 30 chu kỳ; 60 °C - 30 phút và giữ ở 15 °C. Trong quá trình PCR đều có mẫu chứng dương (2800M) và mẫu chứng âm chạy kèm [1].

- *Kỹ thuật điện di phân tách sản phẩm PCR trên máy 3130 Genetic Analyzer* [8]: Mẫu điện di được chuẩn bị trên khay trộn mẫu 96 giếng (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Cat.no.: N8010560, AB) như sau: Lấy 1,0μl sản phẩm PCR (hoặc thang alen) và 0,5 μl ILS 600 trộn với 10μl

Hi-Di Formamide. Biến tính bằng máy GeneAmp®PCR System 9700 ở 95°C trong 3 phút và giữ ở 4°C trong 5 phút. Cho mẫu đã biến tính vào khay đựng mẫu chạy của máy 3130 Genetic Analyzer, khai báo thông tin mẫu, chọn điều kiện chạy trong phần mềm Run 3130 Data Collection software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), các bước được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Kết quả điện di được phân tích bằng phần mềm GeneMapper® software v.3.2.1, cho phép xác định được kiểu gen 16 locus hay còn được gọi là hồ sơ ADN (DNA profile) của mỗi cá thể nghiên cứu.

- Phân tích thống kê [4, 12]: Dữ liệu kiểu gen 16 locus của 104 mẫu khảo sát được nhập vào phần mềm Excel để quản lý và xử lý dữ liệu. Sau đó, sử dụng phần mềm EasyDNA_PopuData của tác giả Wing Kam Fung và Yue-Qing Hu (Đại học Hồng Kông) để tính tần suất alen và các chỉ số thống kê cho 15 locus STR nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sử dụng nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu ở trên, chúng tôi đã xây dựng được bảng tần suất alen và các chỉ số thống kê cho 15 locus STR trên NST thường trong quần thể người Mường (N=104 cá thể, trong đó có 61 nam và 43 nữ) sống tại tỉnh Hòa Bình của Việt Nam được thể hiện ở trong Bảng 1.

Tác giả Chakraborty, R. (1992) cho rằng thông thường việc khảo sát với số lượng mẫu trên 100 cá thể của mỗi quần thể nghiên cứu cho phép chúng ta thu được các chỉ số thống kê đáng tin cậy cho các tính toán về quan hệ nhân thân tại quần thể đó [3]. Do đó, kết quả trong nghiên cứu này của chúng tôi thực hiện khảo sát trên số lượng mẫu là 104 cá thể

người Mường khỏe mạnh, không cùng quan hệ huyết thống, được lựa chọn một cách ngẫu nhiên từ quần thể người Mường sống tại tỉnh Hòa Bình của Việt Nam là đảm bảo độ tin cậy và có ý nghĩa cho các tính toán phân tích thống kê quần thể phục vụ tốt cho công tác pháp y nhận dạng cá thể người. Hơn nữa, trong nghiên cứu này chúng tôi còn sử dụng phần mềm EasyDNA_PopuData để tính toán tần suất alen, các chỉ số thống kê và kiểm tra χ^2 cho 15 locus STR nghiên cứu để kiểm tra mức độ phù hợp giữa tần suất kiểu gen dị hợp tử thu được từ thực nghiệm so với tần suất kiểu gen dị hợp tử theo lý thuyết định luật Hardy-Weinberg ở trạng thái cân bằng. Kết quả phân tích bằng phần mềm cho thấy, tần suất phân bố kiểu gen dị hợp tử của 15 locus STR thu được từ thực nghiệm hoàn toàn phù hợp với tần suất kiểu gen dị hợp tử theo lý thuyết định luật Hardy-Weinberg ở trạng thái cân bằng theo tiêu chuẩn χ^2 với độ tin cậy 95%. Điều này được thể hiện ở các giá trị CHI của 15 locus STR này đều nhỏ hơn các giá trị CHI(c) tương ứng (Bảng1). Ngoài ra, các giá trị xác suất của việc kiểm tra sự phù hợp theo định luật Hardy - Weinberg cân bằng của các locus (P1) cũng đã được xác định với tần suất dao động từ 0,047 (D5S818) đến 0,966 (Penta D) (Bảng 1).

Kết nghiên cứu thu được ở Bảng 1, cho thấy 15 locus STR được sử dụng trong nghiên cứu này có tính đa hình cao thể hiện ở các chỉ số khả năng phân biệt cá thể (PD) và tần suất kiểu gen dị hợp tử theo thực nghiệm (OH) của mỗi locus là tương đối cao. Khả năng phân biệt cá thể (PD) của 15 locus STR nghiên cứu dao động từ 0,768 (TPOX) đến 0,968 (FGA). Tương tự, tần suất kiểu gen dị hợp tử theo thực nghiệm (OH) cũng dao động từ 0,596 (TPOX) đến 0,875 (Penta E). Theo kết quả

thu được, nếu sử dụng 15 locus STR này trong pháp y nhận dạng cá thể người và xác định huyết thống cha con thì khả năng phân biệt kết hợp (CPD) và khả năng loại trừ kết hợp (CPE) có thể đạt được giá trị tương ứng là 0,999999999999999998 và 0,999998. Điều này có nghĩa là, nếu sử dụng 15 locus STR này trong pháp y nhận dạng cá thể người và xác định huyết thống cha con thì khả năng nhận dạng chính xác có thể đạt tới hơn 99,999999999999998% và khả năng loại trừ quan hệ huyết thống cha con có thể đạt tới độ

chính xác hơn 99,9998%. Đây là hai chỉ số quan trọng thường được dùng trong nhận dạng cá thể và xác định huyết thống cha con. Hai chỉ số này còn được gọi là độ tin cậy của phương pháp nhận dạng cá thể người và xác định huyết thống. Chính vì vậy, phương pháp phân tích ADN sử dụng các locus STR trong pháp y nhận dạng cá thể người và trong xét nghiệm huyết thống được coi là phương pháp cho kết quả chính xác nhất hiện nay về nhận dạng cá thể người và xác định huyết thống.

Bảng 1. Tần suất alen và các chỉ số thống kê của 15 locus STR trên NST thường trong quần thể người Mường sống ở tỉnh Hòa Bình, Việt Nam (N=104)

Allele	D3S1 258	TH0 1	D21S 11	D18S51	Penta_ E	D5S81 8	D13S3 17	D7S82 0	D16S 539	CSF1 P0	Penta_ _D	vWA	D8S1 179	TPO X	FGA
5	---	---	---	---	0,029	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	---	0,106	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7	---	0,365	---	---	---	0,014	---	0,019	---	0,029	0,024	---	---	0,005	---
8	---	0,029	---	---	---	---	0,404	0,154	---	---	0,072	---	---	0,601	---
9	---	0,385	---	---	---	0,043	0,082	0,043	0,188	0,010	0,288	---	---	0,072	---
9.1	---	---	---	---	---	---	---	0,019	---	---	---	---	---	---	---
9.3	---	0,048	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10	---	0,067	---	---	0,053	0,255	0,087	0,197	0,101	0,274	0,144	---	0,188	0,043	---
11	---	---	---	---	0,327	0,269	0,212	0,327	0,341	0,226	0,163	---	0,173	0,240	---
12	---	---	---	0,058	0,125	0,260	0,130	0,173	0,279	0,389	0,173	---	0,130	0,038	---
13	---	---	---	0,115	0,053	0,159	0,082	0,058	0,082	0,053	0,077	---	0,183	---	---
14	0,043	---	---	0,212	0,082	---	0,005	0,010	0,010	0,019	0,053	0,240	0,120	---	---
15	0,250	---	---	0,264	0,067	---	---	---	---	---	---	0,014	0,135	---	0,005
16	0,351	---	---	0,183	0,038	---	---	---	---	---	---	0,111	0,067	---	---
17	0,308	---	---	0,062	0,038	---	---	---	---	---	---	0,231	0,005	---	---
18	0,034	---	---	0,029	0,058	---	---	---	---	---	---	0,231	---	---	0,010
19	0,010	---	---	0,034	0,058	---	---	---	---	---	---	0,154	---	---	0,067
20	0,005	---	---	0,019	0,034	---	---	---	---	---	---	0,019	---	---	0,053
20.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,005
21	---	---	---	0,014	0,024	---	---	---	---	---	0,005	---	---	---	0,125
21.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,010
22	---	---	---	0,005	0,014	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,236
22.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,053
23	---	---	---	0,005	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,163
23.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,014

Allele	D3S1 258	TH0 1	D21S 11	D18S51	Penta_ E	D5S81 8	D13S3 17	D7S82 0	D16S 539	CSF1 P0	Penta _D	vWA	D8S1 179	TPO X	FGA
24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,154
24.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,043
25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,034
25.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,005
26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,024
28	---	---	0,019	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
29	---	---	0,250	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
30	---	---	0,269	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
30.2	---	---	0,043	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
31	---	---	0,082	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
31.2	---	---	0,077	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
32	---	---	0,014	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
32.2	---	---	0,168	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
33	---	---	0,005	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
33.2	---	---	0,058	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
34.2	---	---	0,010	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
35.2	---	---	0,005	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
OH	0,760	0,702	0,808	0,827	0,875	0,663	0,702	0,779	0,760	0,731	0,827	0,846	0,865	0,596	0,856
EH	0,717	0,700	0,818	0,829	0,848	0,768	0,754	0,795	0,754	0,718	0,825	0,799	0,848	0,572	0,864
EH_SE	0,044	0,045	0,038	0,037	0,035	0,041	0,042	0,040	0,042	0,044	0,037	0,039	0,035	0,049	0,034
PD	0,867	0,860	0,944	0,950	0,966	0,907	0,908	0,930	0,900	0,872	0,948	0,929	0,958	0,768	0,968
PE	0,461	0,439	0,646	0,666	0,708	0,551	0,538	0,604	0,528	0,467	0,659	0,608	0,699	0,279	0,733
CHI	4,400	3,540	2,460	2,180	0,490	12,230	1,420	4,310	1,240	0,520	4,620	12,420	3,470	0,190	2,300
CHI(c)	7,810	3,840	7,810	7,810	3,840	12,590	3,840	12,590	7,810	7,810	12,590	12,590	7,810	3,840	7,810
P1	0,644	0,085	0,296	0,592	0,568	0,047	0,744	0,111	0,147	0,944	0,966	0,278	0,836	0,492	0,579

OH: Tần suất kiểu gen dị hợp tử theo thực nghiệm

EH: Tần suất kiểu gen dị hợp tử theo lý thuyết

EH_SE: Sai số chuẩn của tần số dị hợp tử theo lý thuyết

PD: Khả năng phân biệt cá thể

PE: Khả năng loại trừ một người đàn ông ngẫu nhiên từ quan hệ huyết thống cha con

CHI: Giá trị kiểm định χ^2 ở các trạng thái cân bằng theo định luật Hardy - Weinberg của locus

CHI (c): Giá trị tới hạn 5 % của việc kiểm định χ^2

P1 : Giá trị xác suất của việc kiểm tra sự phù hợp với định luật Hardy-Weinberg ở trạng thái cân bằng của locus

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được bảng tần suất alen bao gồm các giá trị tần suất alen và các chỉ số thống kê tương ứng cho 15 locus STR trên NST thường (D3S1358, TH01, D21S11, D18S11, PentaE, D5S818, D13S313, D7S820, D16S359, CSF1PO, PentaD, vWA, D8S1179, TPOX và FGA) của 104 cá thể người Mường khỏe mạnh, không cùng quan hệ huyết thống và sống tại tỉnh Hòa Bình của Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đáp ứng được các mục đích mong muốn. Các giá trị tần suất alen và các chỉ số thống kê tương ứng thu được của 15 locus STR nghiên cứu có độ tin cậy cao, sử dụng tốt cho các tính toán có liên quan tới các chỉ số nhận dạng cá thể và chỉ số quan hệ huyết thống đối với quần thể người Mường sống tại tỉnh Hòa Bình, Việt Nam. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng cung cấp thêm cơ sở dữ liệu về đặc tính di truyền quần thể người Mường với những đặc trưng riêng, điều này cũng có thể gợi mở hướng nghiên cứu mới về sự đa dạng di truyền trong các nhóm quần thể người dân tộc khác nhau của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Trọng Hội, Lê Thị Bích Trâm, Nguyễn Văn Hà, Trịnh Đình Đạt (2013). Nghiên cứu tối ưu thành phần multiplex PCR cho 16 cặp mồi gắn huỳnh quang trên hệ thống điện di mao quản. Tạp chí *Phân tích Hóa-Lý và Sinh học*. T-18 - Số 3/2013. Trang 29-34.
2. Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA Typing*. Elsevier Academic Press, Second Edition.
3. Chakraborty, R. (1992) *Human Biology* 64:141-159
4. Fung, W.K., Hu, Y.Q. (2008). *Statistical DNA Forensics: Theory, Methods and Computation*. John Wiley & Sons Ltd.
5. Krenke, B. E., Tereba, A., Anderson, S. J., Buel, E., Culhane, S., Finis, C. J., Tomsey, C. S., Zachetti, J. M., Masibay, A., Rabbach, D. R., Amriott, E. A., and Sprecher, C. J. (2002). Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J. Forensic Sci.* 47(4): 773-785.
6. Miller, S. A., et al. (1988). A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
7. Park et al, (2007). *Method for performing multiplex PCR with cyclic changes of PCR parameters*, United States patent. No: US 7.183.056 B2.
8. Peter M. Vallone, Carolyn R. Hill, John M. Butler (2008). Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. *Forensic Science International: Genetics* 3: 42-45.
9. Promega Corp. (Revised 5/2014), *Technical Manual PowerPlex® 16 HS Systems*. Part # TMD022 (5/14). Madison, WI 53711-5399 USA.
10. <http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm>
11. <http://www.promega.com/products/genetic-identity/str-analysis-for-forensic-and-paternity-testing/>
12. <http://www.saasweb.hku.hk/EasyDNA/>