

Marta Gorzkiewicz

*Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
gorzkiewiczmartha@cm.umk.pl*

Małgorzata Grabowska

*Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Tomasz Grzybowski

*kierownik Katedry Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Wstępne badania w kierunku potwierdzenia obecności krwi ludzkiej w śladach biologicznych na podstawie analizy mRNA

Streszczenie

Celem projektu było stworzenie specyficznej i zarazem taniej metody służącej do wykrywania ludzkiej krwi w śladach biologicznych opartej na analizie mRNA hemoglobiny z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym, z zastosowaniem niespecyficznego detektora typu SYBR Green. Ostatecznie opracowany test umożliwia jednoczesną analizę krzywych topnienia trzech fragmentów o różnej długości – HBB61, HBA197 i HBB503, oraz dodatkowo genu referencyjnego – mRNA β -aktyny. Jednoznaczna identyfikacja możliwa była już dla 0,1 μ l krwi. Metoda jest specyficzna tkankowo i gatunkowo. Analizowane markery mRNA cechują się większą stabilnością w porównaniu do białka hemoglobiny wykrywanego standardowymi metodami. Wynik profilowania mRNA wykazuje wartość predykcyjną odnośnie jakości materiału genetycznego i obecności mieszaniny płynów. Wyniki badań wykonanych w ramach projektu wskazują na potencjalną przydatność markerów HBB i HBA1 w rutynowych badaniach genetyczno-sądowych. Jednak niezbędne jest przeprowadzenie szerszego spektrum eksperymentów walidacyjnych, a szczególnie przeanalizowanie większej liczby rzeczywistych śladów biologicznych, dokładne określenie optymalnej ilości użytego RNA oraz sprawdzenie różnic osobniczych w poziomach ekspresji.

Słowa kluczowe: identyfikacja ludzkiej krwi, profilowanie mRNA, hemoglobina

Wstęp

W laboratoriach genetyczno-sądowych rutynowo identyfikowane jest pochodzenie osobnicze różnych śladów biologicznych zabezpieczanych w sprawach kryminalnych na podstawie profilu genetycznego DNA. Jednak w większości przypadków równie istotne jest określenie źródła pochodzenia plam biologicznych, a więc rodzaj tkanki czy rodzaj płynu biologicznego.

Do najczęstszych śladów biologicznych zabezpieczanych na miejscu przestępstwa należą plamy krwi. Ich badanie dostarcza śledczym niezwykle cennych informacji, np. analiza wzoru zaplamień może pomóc w rekonstrukcji zdarzenia, na podstawie analizy DNA wyizolowanego z jądrzastych komórek krwi możliwa jest jednoznaczna indywidualizacja pochodzenia śladu.

Przeważnie ślady krwi, zwłaszcza świeże, można łatwo rozpoznać. Jednak na różnych podłożach i z upływem czasu zaschnięte plamy krwi mogą blaknąć lub znacząco zmieniać swój kolor, wykruszać się, przez co podczas oględzin można je wziąć za inną substancję lub zwyczajnie przeoczyć. Ponadto nie zawsze zabezpieczone ślady okazują się krwią ludzką. Należy również podkreślić, że subiektywna ocena oparta jedynie na obserwacji nie stanowi rzetelnego dowodu. Dlatego potrzebne są dodatkowe testy, by w sposób obiektywny i wiarygodny potwierdzić występowanie krwi. Wykrywanie i/lub potwierdzenie obecności krwi następuje z użyciem metod opartych na reakcji redox, enzymatycznych, immunologicznych i molekularnych lub z wykorzystaniem tzw. alternatywnego źródła światła.

Przeglądu zawierającego szczegółową charakterystykę tych metod dokonali Virkler i Lednev (2009).

Generalnie testy do wykrywania różnego rodzaju plam biologicznych, w tym krwi, dzieli się na przesiewowe i potwierdzające, w zależności od ich specyficzności. Testy przesiewowe, których działanie jest oparte na zdolności cząsteczek hemu do utleniania, z reguły nie są inwazyjne, a do tego są wygodne w użyciu i bardzo czułe, pozwalają wykryć zarówno krew ludzką, jak i zwierzęcą. Niestety często dają one wynik fałszywie pozytywny z różnymi substancjami wykazującymi właściwości utleniające, np. sokami z owoców, detergentami, herbatą. Z kolei testy specyficzne dla ludzkiej krwi są oparte na immunologicznym wykrywaniu obecności białka hemoglobiny. Metody te są czułe, jednak wymagają stosunkowo dużej ilości materiału do badań, w związku z czym nie zawsze można je przeprowadzić. Ponadto są nieprzydatne w przypadku zdegradowanych śladów.

W ostatnich latach wraz z rozwojem nowych technologii coraz szersze zastosowanie w identyfikacji rodzaju tkanki czy płynu biologicznego znajdują metody molekularne. Przyczyną wzrostu ich popularności są głównie coraz niższe koszty analiz. Dotychczas opracowano m.in. metody oparte na analizie specyficznych dla danego płynu wzorów metylacji, oznaczaniu poziomu ekspresji markerów mRNA i miRNA, a także na charakterystyce mikrobiomu. Więcej informacji na temat wad i zalet poszczególnych metod można znaleźć w pracy przeglądowej Sijen (2015). Przykładowo, gdy laboratorium dysponuje tylko ekstraktem DNA, źródło pochodzenia śladu można ustalić jedynie badając markery metylacji DNA. Trudności w interpretacji wyników tej metody mogą się pojawić w przypadku śladów stanowiących mieszaninę komórek charakteryzujących się różnym wzorem metylacji. Z kolei na podstawie mikrobiomu można określać pochodzenie śladu nie z konkretnej tkanki czy płynu, ale z obszaru ciała, np. z jamy ustnej czy z pochwy. Wątpliwości związane z zastosowaniem tych metod budzi fakt, że zarówno na poziom metylacji, jak i na skład mikrobiomu znacząco wpływają: dieta, stan fizjologiczny, klimat, pochodzenie etniczne czy płeć (Sijen, 2015). Najwięcej opracowań na temat ustalania rodzaju płynów ustrojowych dotyczy analiz mRNA i miRNA, które wykazują specyficzny wzór ekspresji w zależności od pochodzenia tkankowego. Podobnie jak w przypadku DNA można analizować ilości RNA rzędu nanogramów, a nawet pikogramów. Dzięki możliwości jednoczesnej ekstrakcji ze śladu tak DNA, jak i RNA nawet z małego śladu można uzyskać wszystkie potrzebne informacje, czyli unikalny profil genetyczny i pochodzenie tkankowe (Park, Park, Lee, 2013; Lindenbergh, de Pagter, Ramdayal, Visser, Zubakov, Kayser, Sijen, 2012; Wang, Zhang, Luo, Ye, Yan, Hou, 2013). Do tej pory uważano, że niska w porównaniu do DNA stabilność cząsteczek RNA uniemożliwia wykorzystanie ich do badania

zdegradowanych śladów biologicznych. Okres półtrwania kwasów nukleinowych jest ograniczony przez różne czynniki endogenne, np. strukturę cząsteczki, i czynniki egzogenne, takie jak obecność: enzymów, światła, wody, pH. W związku z tym ustalił się pogląd, że dwuniciowa cząsteczka DNA, związana dodatkowo z białkami, jest znacznie bardziej stabilna niż jednoniciowy RNA. Jednak bardziej szczegółowe badania nad RNA pokazały, że cząsteczki te również tworzą różnego rodzaju dwuniciowe struktury i mogą być połączone z białkami. Mniejsza stabilność RNA wynika przede wszystkim z faktu, że jego degradacja postępuje głównie przez działanie rybonukleaz, które bardzo licznie występują w komórkach organizmów wyższych, w bakteriach i w środowisku zewnętrznym. Dowodzą tego badania nad degradacją RNA *post mortem*, których wyniki pokazują, że w tkankach zawierających różny poziom rybonukleaz rozkład RNA zachodzi w zróżnicowanym okresie: od kilku minut do kilku tygodni (Fordyce, Kampmann, van Doorn, Gilbert, 2013). Ślady biologiczne najczęściej występują w postaci suchych plam, gdzie aktywność enzymów drastycznie spada. Degradacja następuje głównie przez działanie czynników fizycznych i chemicznych, jak w przypadku DNA. Szczegółowy opis mechanizmów degradacji RNA przedstawiono w publikacji Fordyce i in. (2013).

Dostępnych jest wiele opracowań naukowych na temat identyfikacji rodzajów płynów biologicznych i tkanek na podstawie markerów mRNA i miRNA, które wykrywano w materiale biologicznym przechowywanym przez dłuższy okres (Setzer, Juusola, Ballantyne, 2008; Hanson, Lubenow, Ballantyne, 2009; Hanson, Haas, Jucker, Ballantyne, 2012; Sakurada, Ikegaya, Fukushima, Akutsu, Watanabe, Yoshino, 2009; Zubakov, Kokshoorn, Kloosterman, Kayser, 2009; Zubakov, Boersma, Choi, van Kuijk, Wiemer, Kayser, 2010; Courts, Madea, 2011; Haas, Hanson, Bär, Johansen, Lindenbergh, 2011a; Kohlmeier, Schneider, 2012; Patnaik, Mallick, Yendamuri, 2010; Visser, Zubakov, Ballantyne, Kayser, 2011; Wang, Luo, Pan, Liao, Hou, 2012; Wang i in., 2013; Lindenbergh i in., 2012; Richard, Harper, Craig, Onorato, Robertson, Donfack, 2012; Jakubowska, Maciejewska, Bielawski, Pawłowski, 2014). Lindenbergh i in. (2012) oznaczyli markery mRNA w plamach krwi liczących nawet 28 lat. W opracowanych metodach analizy RNA wykorzystywane są techniki CE i/lub RT-QPCR. W przypadku markerów miRNA porównuje się poziomy ekspresji pomiędzy tkankami, natomiast markerów mRNA – obecność lub brak produktu ekspresji. Na podstawie przeglądu powyższej literatury można stwierdzić, że najczulszym i najczęściej używanym markerem krwi jest mRNA hemoglobiny. Ponadto wśród innych markerów mRNA specyficznych dla krwi należy wymienić: GlycoA, PBGD, CD93, AMICA1, PPBP, NKG7, CCL5, NRG1, GZMH, PRF1. Jakubowska

i in. (2014) wykazali z kolei, że ekspresja mRNA MMP7 i MMP11 jest specyficzna dla krwi miesiączkowej.

Celem projektu było opracowanie specyficznej i jednocześnie taniej metody służącej do wykrywania ludzkiej krwi w śladach biologicznych opartej na analizie mRNA hemoglobiny z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Materiał

Do badań optymalizacyjnych i walidacyjnych użyto krwi ludzkiej zabezpieczonej w trakcie sekcji zwłok przeprowadzanych w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum w Bydgoszczy. Do laboratoryjnej oceny specyficzności tkankowej wykorzystano cDNA pochodzący z 10 μ l krwi, z 10 μ l nasienia i 10 μ l śliny, zabezpieczonych na tkaninie bawełnianej, oraz RNA otrzymany z mieszaniny tkanek niezawierającej krwi (Control RNA Human, o stężeniu 50 ng/ μ L [Applied Biosystems]). Oceny czułości reakcji dokonano, analizując jednodniowe suche plamy wykonane z 10 μ l, 5 μ l, 1 μ l, 0,1 μ l oraz 0,01 μ l krwi naniesionej na tkaninę bawełnianą. Oceny specyficzności gatunkowej wybranych markerów dokonano, analizując krew pochodzącą od czterech gatunków zwierząt: bydła domowego (*Bos taurus*), świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*), psa (*Canis lupus familiaris*) i kury domowej (*Gallus gallus domesticus*). Plamy wykonano, wylewając po 10 μ l każdej pobranej próby krwi na bawełnianą tkaninę, które następnie wysuszone i przechowywano w ciemności. Wpływ czasu na stabilność RNA oceniano, analizując materiał przechowywany w okresie od 0 do 28 dni w temperaturze pokojowej, eksponowany na światło słoneczne w cyklu dobowym, z którego izolowano RNA całkowity w tygodniowych odstępach. Oceny wpływu różnego rodzaju podłoża, na którym znajduje się płyn biologiczny, dokonano, badając cDNA otrzymany z całkowitego RNA wyizolowanego z jednodniowych plam krwi naniesionych na materiał dzinsowy oraz bibułę Whatman, przechowywanych w laboratorium w temperaturze pokojowej, w ciemności.

Przebadano również rzeczywiste ślady biologiczne w postaci wycinków z odzieży oraz fragmentów

wymazów z plamami substancji, co do których istniało podejrzenie, że mogą zawierać krew, oraz z plamami substancji, w których potwierdzono obecność ludzkiej krwi za pomocą specyficznego testu immunochromatograficznego HemCheck (Hydrex).

Jako kontrole stosowano roztwór Control RNA Human, o stężeniu 50 ng/ μ L (Applied Biosystems) oraz RNA wyizolowany ze świeżej krwi ludzkiej.

Metody

Na podstawie dostępnej literatury oraz baz danych wybrano do identyfikacji krwi ludzkiej mRNA hemoglobiny beta (nr ref. GenBank: NM_000518.4) – markery HBB61 i HBB503, oraz mRNA hemoglobiny alfa (nr ref. GenBank: NM_000558.3) – marker HBA197. Jako gen referencyjny wykorzystano mRNA β – aktywny. Dane na temat sekwencji starterów, ich długości, temperatury topnienia (T_m), zawartości procentowej par GC oraz informacje na temat długości powstałych w reakcji z tymi starterami produktów amplifikacji wszystkich markerów przedstawiono w tabeli nr 1. Sekwencje starterów dla fragmentu HBB61 zaczerpnięto z literatury (Lindenghberg i in., 2012). Pozostałe zaprojektowano przy użyciu programu Primer3, dostępnego online.

Całkowity RNA izolowano z suchych plam krwi z wykorzystaniem TRI Reagent Solution (Ambion), zgodnie z instrukcją producenta.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) oraz losowych heksamerów, w końcowej objętości 10 μ l, podając do reakcji 0,5 μ g RNA.

Oznaczanie markerów mRNA prowadzono z wykorzystaniem reakcji real time PCR z zastosowaniem niespecyficznego detektora typu SYBR Green. Mieszanina reakcyjna o objętości 12,5 μ l zawierała ostatecznie: 0,5 μ l matrycy cDNA, startery o stężeniach odpowiednio: HBB503 – 30 pM; HBB61 – 30 pM; HBA197 – 10 pM; β -aktywna – 15 pM, 300 nM roztwór ROX (EURx), 0,25 U roztworu UNG (glikozylazy N-uracylu) (EURx), 1x stężony SG qPCR Master Mix (EURx). Profil temperaturowy reakcji: wstępna

Tabela 1. Charakterystyka starterów wykorzystywanych do profilowania mRNA.

| Marker (nazwa genu) | Sekwencja startera | Długość startera (pz) | Długość produktu (pz) | T_m [°C] | GC [%] | Źródło |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------|--------|--------------------|
| HBB | F: 5` GCACGTGGATCCTGAGAAC | 19 | 61 | 53,2 | 57,9 | [39] |
| | R: 5` ATGGGCCAGCACACAGAC | 18 | | 52,6 | 61,1 | |
| HBB | F: 5` CATGGTGCATCTGACTCCTG | 20 | 503 | 53,8 | 55,0 | opracowanie własne |
| | R: 5` AGTTGGACTTAGGGAACAAAGG | 22 | | 53,0 | 45,5 | |
| HBA | F: 5` TTCCCCACCACCAAGACCTA | 20 | 197 | 53,8 | 55,0 | opracowanie własne |
| | R: 5` AGGAGCTTGAAGTTGACCGG | 20 | | 53,8 | 55,0 | |
| β -aktywna | F: 5` CTTCAACACCCAGCCATGT | 20 | 301 | 53,8 | 55,0 | opracowanie własne |
| | R: 5` CTCTTGCTCGAAGTCCAGGG | 20 | | 55,9 | 60,0 | |

denaturacja w 94°C przez 5 minut, 32 cykle: denaturacja w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 67°C przez 30 sekund, wydłużanie nici w 72°C przez 1 minutę oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 minut. Wszystkie reakcje amplifikacji prowadzono w co najmniej dwóch powtórzeniach. Do analizy krzywych topnienia zastosowano następujące warunki reakcji: 95°C przez 15 sekund, 60°C przez jedną minutę i 95°C przez 15 sekund. Reakcje prowadzono w aparacie ViiA 7 Real-Time PCR System. Analizę wyników prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ViiA 7 Ruo Software, dołączonego do urządzenia.

Wyniki

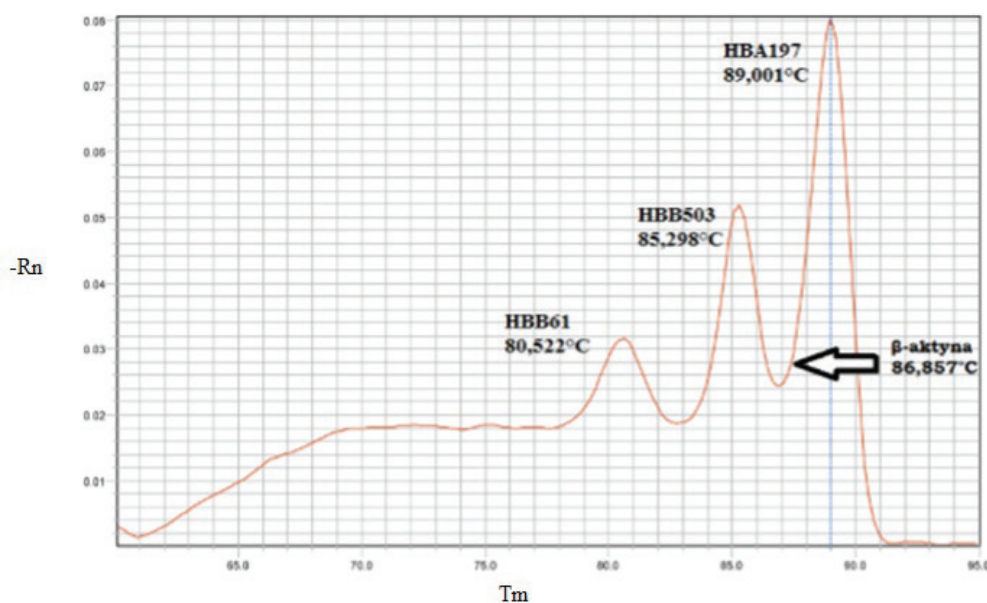
Opracowany test do identyfikacji ludzkiej krwi umożliwia jednoczesną analizę krzywych topnienia trzech markerów: HBB61, HBA197 i HBB503, oraz dodatkowo genu referencyjnego – mRNA β -aktyny. W tak zaprojektowanej reakcji, w przypadku ludzkiej krwi, zamiast spodziewanych czterech, otrzymywano trzy produkty o wartości T_m odpowiednio ok. 80,5°C, 85,3°C i 89°C, natomiast w przypadku ludzkiego materiału biologicznego niezawierającego krwi otrzymywano tylko jeden produkt o wartości T_m ok. 86,8°C. Wynika to ze zbyt małej różnicy pomiędzy wartościami T_m dla HBB503 i dla genu referencyjnego, przez co w reakcji multiplexowej krzywe topnienia obu markerów się nakładają. Przykładowy wykres krzywych topnienia produktów reakcji multiplexowej dla próbki krwi przedstawia rycina numer 1.

Na podstawie analizy sekwencji homologicznych genu hemoglobiny przy użyciu narzędzia BLAST stwierdzono, że startery dla HBB61, HBB503, HBA197 są specyficzne dla gatunków naczelnych. Stosunkowo niski procent homologii dla innych ssaków (ok. 83%)

wskazuje, że wyselekcjonowane markery nie powinny w ogóle ulegać amplifikacji lub ewentualnie mogą się tworzyć produkty niespecyficzne. Eksperymentalnie sprawdzono specyficzność starterów względem krwi pochodzącej od czterech gatunków zwierząt: bydła domowego (*Bos taurus*), świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*), psa (*Canis lupus familiaris*) i kury domowej (*Gallus gallus domesticus*). Spośród wybranych do reakcji multiplexowej czterech markerów – HBB61, HBA197, HBB503, oraz β -aktyny, tylko produkt HBB197 powstawał w próbkach krwi badanych zwierząt. Amplikon ten miał taką samą długość jak w przypadku krwi ludzkiej i podobną wartość T_m . W przypadku krwi psiej i świńskiej różnica temperatur topnienia wynosiła ok. 1°C, natomiast – biorąc pod uwagę wartość odchylenia standardowego – praktycznie nie ma różnicy pomiędzy krwią ludzką a kurzą i bydlęcą. Dla krwi ludzkiej użytej jako kontrola pozytywna wykryto wszystkie fragmenty mRNA (tabela nr 2).

W celu określenia czułości metody przebadano szereg plam wykonanych z 10 μ l, 5 μ l, 1 μ l, 0,1 μ l oraz 0,01 μ l krwi. Przyjęto, że wynik reakcji jest dodatni, gdy otrzymano wszystkie produkty reakcji multiplexowej przynajmniej w dwóch powtórzeniach. Przy takim kryterium granicę czułości metody stanowiło 0,1 μ l krwi.

Do oceny stabilności badanych markerów mRNA w czasie wykorzystano plamy krwi, z których RNA całkowity izolowano w dniu otrzymania materiału (punkt 0) oraz po 7, 14, 21 i 28 dniach przechowywania. Analizy dokonano na próbkach pochodzących od 8 osób. Identyfikacja krwi możliwa była z każdej próbki, bez względu na wiek badanej plamy. Analiza średnich wartości C_t dla próbek izolowanych w kolejnych tygodniach wykazała niewielki spadek ilości produktu amplifikacji w stosunku do próbki izolowanej w czasie



Ryc. 1. Wykres krzywych topnienia dla produktów reakcji multiplexowej.

Tabela 2. Średnie temperatury topnienia dla próbek krwi zwierzęcej oraz kontroli zawierającej materiał ludzki.

| Gatunek | Średnia Tm [°C] | | | |
|---------------------------------|-----------------|--------|--------|----------|
| | HBB197 | HBA503 | HBB61 | β-aktyna |
| <i>Bos taurus</i> | 88,778 | - | - | - |
| <i>Sus scrofa f. domestica</i> | 87,995 | - | - | - |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | 87,995 | - | - | - |
| <i>Gallus gallus domesticus</i> | 88,338 | - | - | - |
| Kontrola – krew ludzka | 88,898 | 85,195 | 80,615 | 86,857 |
| Kontrola – inne tkanki* | - | - | - | 86,857 |

* Zastosowano RNA pochodzący z mieszaniny tkanek stałych, nie zawiera krwi – *Control RNA Human*, o stężeniu 50 ng/μL (Applied Biosystems).

zerowym. Średnio wartość Ct otrzymana po amplifikacji RNA wyizolowanego z krwi przechowywanej 28 dni była niższa o ok. 2 cykle (tabela nr 3).

Aby ocenić wpływ różnego rodzaju podłoża, na którym znajduje się płyn biologiczny, na skuteczność stosowanej metody do identyfikacji krwi ludzkiej, użyto cDNA pochodzący z całkowitego RNA izolowanego z plam naniesionych na materiał dżinsowy oraz bibułę Whatman. Analizowano materiał pochodzący od dwóch osób. W przypadku obydwu podłoży powstały wszystkie specyficzne produkty, umożliwiając jednoznacznie identyfikację krwi.

Test oparty na analizie obecności markerów mRNA hemoglobiny wykorzystano do identyfikacji ludzkiej krwi w 22 rzeczywistych śladach biologicznych, co do których istniało podejrzenie, że mogą zawierać krew. Wyselekcjonowane ślady były wcześniej poddane badaniom wstępnym w kierunku ustalenia obecności krwi z wykorzystaniem niespecyficznego testu HemoPhan (Pliva-Lachema) oraz testu specyficznego dla ludzkiej hemoglobiny HemCheck (Hydrex). Dla wszystkich tych śladów przeprowadzono reakcje genotypowania z wykorzystaniem komercyjnych zestawów HID: NGMSelect (Applied Biosystems) i/lub PowerPlex ESI 17 (Promega). W zależności od wyników

poszczególnych badań próbki podzielono na siedem grup (tabela nr 4). Do grupy 1 zaliczono 13 próbek, dla których test HemoPhan dał wynik dodatni i dla których otrzymano pełny profil RNA i DNA, natomiast test HemCheck dał wynik ujemny. W ramach tej kategorii trzy ślady wykazywały cechy degradacji na poziomie kwasów nukleinowych. Objawiało się to charakterystycznym obniżeniem wysokości pików najdłuższych układów STR (profil DNA) oraz znacznie wyższym przyrostem najkrótszego produktu amplifikacji HBB61 (profil RNA). Natomiast jedna z próbek charakteryzowała się znacznie wyższym przyrostem fragmentu HBB503 w stosunku do pozostałych markerów mRNA, a profil DNA wskazywał na obecność mieszaniny materiału genetycznego. Grupę 2 reprezentowały próbki, dla których obydwa konwencjonalne testy na obecność krwi dały wynik dodatni oraz ustalono profile DNA i RNA w pełnym zakresie. Trzecią kategorię stanowiła jedna próbka, którą w stosunku do grupy 2 wyróżniał niejednoznaczny wynik testu HemCheck. Kolejne dwa ślady zaliczono do grupy 4, charakteryzującej się dodatnim wynikiem testu HemoPhan, ujemnym wynikiem testu na obecność ludzkiej hemoglobiny, ujemnym wynikiem genotypowania w zakresie układów DNA-STR oraz niepełnym profilem RNA (oznaczono

Tabela 3. Analiza wpływu czasu na stabilność RNA. Ct – średnie wartości Ct uzyskane w multipleksowej reakcji profilowania mRNA dla poszczególnych próbek pochodzących od 8 osób, SD – odchylenie standardowe.

| Lp. | Dzień izolacji | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | 0 | | 7 | | 14 | | 21 | | 28 | |
| | Ct | SD | Ct | SD | Ct | SD | Ct | SD | Ct | SD |
| 1 | 21,792 | 0,821 | 23,421 | 0,745 | 24,393 | 0,618 | 22,064 | 0,821 | 23,611 | 0,760 |
| 2 | 21,324 | 0,655 | 22,643 | 0,227 | 21,466 | 0,476 | 23,786 | 0,402 | 23,808 | 0,431 |
| 3 | 22,734 | 0,098 | 22,457 | 0,879 | 23,568 | 0,581 | 23,419 | 0,981 | 23,776 | 0,881 |
| 4 | 20,345 | 0,124 | 21,615 | 0,145 | 23,590 | 0,090 | 23,987 | 0,034 | 24,987 | 0,095 |
| 5 | 22,000 | 0,568 | 21,484 | 0,098 | 24,003 | 0,478 | 22,998 | 0,412 | 24,158 | 0,514 |
| 6 | 21,768 | 0,987 | 21,324 | 0,675 | 23,948 | 0,589 | 22,531 | 0,634 | 23,911 | 0,617 |
| 7 | 21,989 | 0,099 | 23,142 | 0,763 | 23,098 | 0,613 | 24,561 | 0,752 | 24,122 | 0,732 |
| 8 | 20,732 | 0,878 | 22,444 | 0,221 | 24,108 | 0,717 | 24,178 | 0,248 | 22,785 | 0,342 |
| średnia | 21,586 | 0,529 | 22,316 | 0,469 | 23,522 | 0,520 | 23,440 | 0,535 | 23,895 | 0,547 |

Tabela 4. Zestawienie wyników testów na obecność krwi i ludzkiego DNA przeprowadzonych na rzeczywistych śladach biologicznych.

| Lp. | Liczba próbek | HemoPhan | HemCheck | Profil RNA | Profil DNA | Uwagi |
|-----|---------------|----------|----------|------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 13 | + | - | + (3) | + | W przypadku 3 próbek zaobserwowano znacznie większy przyrost produktu HBB 61 w stosunku do pozostałych markerów. Dla tych próbek profil DNA wykazywał cechy degradacji. |
| 2 | 3 | + | + | + (3) | + | Brak |
| 3 | 1 | + | +/- | + (3) | + | Brak |
| 4 | 1 | + | - | + (2) | - | Oprócz właściwych produktów powstały również produkty niespecyficzne. |
| 5 | 1 | + | - | + (1) | - | Uzyskano tylko produkt HBB 61. |
| 6 | 2 | + | - | + (1) | + | Uzyskano tylko produkt HBB 61. Profil DNA – mieszanina od 3 osób, mieszanina od 2 osób o charakterze szczątkowym. |
| 7 | 1 | + | N.B.* | - | - | Przyczyną może być zbyt mała ilość krwi lub brak krwi. |

Legenda: „+” – wynik dodatni testu; „-” – wynik ujemny testu; „N.B.*” – nie badano ze względu na zbyt małą ilość materiału. W kolumnie „RNA” w nawiasie podano liczbę oznaczonych markerów w reakcji multipleksowej.

dwa z trzech markerów mRNA). Dodatkowo w reakcji profilowania mRNA uzyskano niespecyficzne produkty amplifikacji. Do grupy 5 zaliczono jedną próbkę, dla której niespecyficzny test HemoPhan dał wynik dodatni, test HemCheck i genotypowanie DNA dały wynik ujemny, natomiast analiza mRNA wykazała obecność tylko najkrótszego fragmentu HBB61. Dwie kolejne próbki zakwalifikowano do grupy 6, w której kryteria stanowiły: dodatni wynik testu HemoPhan, ujemny wynik testu HemCheck oraz zdegradowany profil DNA i mRNA. Grupę 7 tworzy ślad, dla którego test HemoPhan dał wynik dodatni, testu HemCheck nie prowadzono ze względu na niewystarczającą ilość materiału do badań, a profilowanie w zakresie DNA i RNA dało wynik ujemny.

Dyskusja

Krew jest jednym z najczęściej badanych śladów biologicznych zabezpieczanych na miejscu przestępstwa. Nierzadko zdarza się, że ślady są niewielkie i trzeba wybrać, czy przeprowadzać wstępne testy identyfikujące źródło śladu, ryzykując zbyt duże straty materiału, czy tylko ustalić profil DNA. Opracowanie metody, która umożliwiłaby szybkie określenie rodzaju płynu biologicznego, przy jednoczesnym minimalnym zużyciu materiału, jest niezwykle ważne we współczesnej kryminalistyce. Większość najnowszych, zaproponowanych w tym celu technik obejmuje analizy RNA, w szczególności analizy wzorów ekspresji mRNA, które wykazują specyficzność tkankową.

Głównym celem badań było opracowanie specyficznej i jednocześnie taniej metody do wykrywania ludzkiej krwi w śladach biologicznych opartej na analizie mRNA hemoglobiny z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Na podstawie literatury wybrano dwie cząsteczki mRNA: HBB – hemoglobinę beta, oraz HBA1 – hemoglobinę alfa 1 (Haas i in., 2011a; Haas, Hanson, Kratzer, Bär, Ballantyne, 2011b; Kohlmeier, Schneider, 2012; Nussbaumer, Gharehbaghi-Scnell, Korschineck, 2006; Park i in., 2013), które charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji we krwi. Otrzymane wyniki potwierdzają przydatność markerów HBB i HBA1 do określania obecności ludzkiej krwi. Należy jednak jeszcze ocenić występowanie potencjalnych różnic osobniczych poziomu ekspresji transkryptów HBB i HBA1, które mogą wpływać na wyniki testów opartych na profilowaniu mRNA. Zgodnie z założeniami analiza krzywych topnienia produktów amplifikacji wyselekcjonowanych fragmentów mRNA hemoglobiny umożliwiła jednoznaczne potwierdzenie obecności krwi w badanym śladzie. Zarówno dla hemoglobiny beta, jak i hemoglobiny alfa startery zaprojektowano tak, aby namnażane fragmenty znajdowały się w miejscach łączenia eksonów. Miało to na celu wykluczenie ryzyka amplifikacji DNA, co mogłoby skutkować otrzymaniem fałszywie dodatnich wyników. Przy projektowaniu starterów wzięto także pod uwagę występujące w obszarze ich przyłączenia się do odpowiedniego miejsca matrycy polimorfizmy SNP. Ostatecznie opracowany test do identyfikacji ludzkiej krwi umożliwia jednoczesną analizę krzywych topnienia trzech fragmentów o różnej długości – HBB61, HBA197 i HBB503, oraz dodatkowo genu referencyjnego – mRNA β-aktyny. Ze względu na fakt, iż HBB61 był najkrótszym z uzyskiwanych amplikonów, oczekiwano, że będzie namnażany z największą wydajnością, a okazało się, że był najslabiej powielanym fragmentem w reakcji multipleksowej. Prawdopodobną przyczyną słabszej amplifikacji

tego fragmentu jest sama sekwencja startera. Jego oba końce są częściowo komplementarne, przez co wykazują tendencję do tworzenia struktury spinki. Tłumaczy to konieczność stosowania wyższych stężeń tych starterów w reakcji multipleksowej.

Odpowiednie dobranie warunków podczas przeprowadzania reakcji miało kluczowe znaczenie dla całego badania. Użyta w nim metoda detekcji sygnału fluorescencji z zastosowaniem niespecyficznego barwnika co prawda nie wymaga zaprojektowania skomplikowanej sondy, co z kolei wpływa na obniżenie kosztów analizy, wymusza jednak potrzebę dokładnej optymalizacji metody. SYBR Green, jako detektor niespecyficzny, może łączyć się nie tylko z oczekiwanym produktem, ale także z dimerami starterów bądź innymi, niespecyficznymi produktami reakcji, co utrudnia interpretację wyników i wpływa na ich zafałszowanie. Dlatego przeprowadzono analizę krzywych topnienia, która umożliwiła potwierdzenie obecności specyficznego amplikonu. Projektując reakcję multipleksową, wybrano trzy fragmenty mRNA różniące się długością oraz wartością Tm o co najmniej 4°C (odpowiednio dwa fragmenty dla markera HBB o długościach 61 pz i 503 pz o Tm równych ok. 80,5°C i 85,3°C oraz jeden fragment dla markera HBA1 o długości 197 pz o Tm równej ok. 89°C) oraz dodatkowo produkt amplifikacji genu referencyjnego β -aktyny o długości 301 pz i o wartości Tm ok. 86,8°C. Temperatury topnienia trzech pierwszych amplikonów różniły się na tyle, by możliwa była ich identyfikacja na podstawie otrzymanych z reakcji multipleks krzywych topnienia. Charakterystyczna wartość Tm dla genu referencyjnego różniła się od wartości charakterystycznej dla produktu o długości 503 pz o ok. 1,5°C. Różnica ta okazała się zbyt mała, by w sposób jednoznaczny potwierdzić obecność produktu β -aktyny w multipleksie w przypadku, gdy materiałem badanym była krew. Jednocześnie należy zauważyć, że powstaje on w monopleksowej reakcji, w której matryca pochodzi z krwi ludzkiej, oraz w multipleksowej reakcji w przypadku analizy RNA nie pochodzącego z krwi. Dlatego przyjęto, że niemożność uwidocznienia markera β -aktyny nie jest ważna, gdy w teście multipleksowym zostaną wykryte wszystkie markery hemoglobiny, natomiast stanowi on swego rodzaju kontrolę dodatnią reakcji. Obecność wyłącznie tego amplikonu świadczy o tym, że badany ślad jest pochodzenia ludzkiego, natomiast brak jakiegokolwiek produktu wskazywać może na duży stopień degradacji matrycy, obecność inhibitorów blokujących reakcję lub inne niż ludzkie pochodzenie badanego materiału. W celu potwierdzenia przydatności stosowania markerów HBB61, HBA197 i HBB503 do identyfikacji ludzkiej krwi w badaniach genetyczno-sądowych należy przeprowadzić szereg eksperymentów walidacyjnych na różnym materiale biologicznym pochodzenia ludzkiego, w tym dla naskórka, wydalin i wydzielin.

Spśród czterech zaproponowanych do reakcji multipleks markerów HBA197 ulegał amplifikacji nie tylko w przypadku krwi ludzkiej, ale także krwi zwierząt wybranych do analizy: *Bos taurus*, *Sus scrofa f. domestica*, *Canis lupus familiaris* i *Gallus gallus domesticus*. Wynika to z wysokiego poziomu homologii pomiędzy genem ludzkim hemoglobiny alfa a genami zwierzęcymi. Ze względu na taką samą długość w pz oraz zbyt małe różnice w wartości Tm produktów uzyskanych dla krwi pochodzącej od człowieka i badanych w tym doświadczeniu zwierząt, fragmentu HBA197 nie można uznać za marker specyficzny względem krwi ludzkiej. Pozostałe trzy markery (HBB61, HBB503 i β -aktyna) były namnażane jedynie z ludzkiego materiału biologicznego. Otrzymane wyniki wskazują na możliwość zastosowania stworzonej reakcji multipleks nie tylko do potwierdzenia obecności ludzkiej krwi, ale również do różnicowania krwi ludzkiej od zwierzęcej. Powstanie wyłącznie jednego produktu, HBA197, wskazuje na obecność w danym materiale krwi zwierzęcej. Natomiast wykrycie obecności wszystkich trzech markerów hemoglobiny daje pewność, że badany materiał zawiera krew ludzką. W celu dokładniejszej oceny specyficzności gatunkowej konieczne jest przeprowadzenie analiz laboratoryjnych krwi pochodzącej od innych gatunków zwierząt.

W niniejszej pracy do ustalenia czułości metody wykorzystano różne ilości krwi nanoszone bezpośrednio na bawełnianą tkaninę (odpowiednio 10 μ l, 5 μ l, 1 μ l, 0,1 μ l oraz 0,01 μ l). Widoczne są różnice w wartościach Ct pomiędzy próbkami pochodzącymi od różnych osób, które mogą być konsekwencją wpływu m.in. czynników będących przyczyną śmierci bądź degradacji RNA, która nastąpiła od czasu zgonu do czasu pobrania materiału, a nawet wynikać z różnicy wydajności izolacji RNA dla poszczególnych próbek. Ewentualnie mogą one wynikać z różnych poziomów mRNA hemoglobiny we krwi. W celu określenia granicy czułości przyjęto, że wynik testu jest dodatni, gdy w badanej próbce zostaną wykryte wszystkie markery krwi w przynajmniej dwóch powtórzeniach. Przy takim założeniu identyfikacja była możliwa już dla 0,1 μ l krwi. Zbyt duża ilość użytego materiału również negatywnie wpływa na otrzymywane wyniki. Może być to skutkiem hamowania reakcji amplifikacji z powodu zbyt dużego stężenia matrycy lub obecności hemu, który nie został wyeliminowany podczas izolacji RNA. Zakres czułości reakcji profilowania mRNA z wykorzystaniem markera HBB podawany w literaturze pasuje się pomiędzy 0,1–0,001 μ l krwi (Haas i in., 2011a, 2011b; Kohlmeier, Schneider, 2012; Lindenbergh i in., 2012). Różnice w czułości wynikać mogą przede wszystkim z odmiennych wydajności stosowanych metod izolacji i amplifikacji. Nie bez znaczenia może być fakt, że inni badacze użyli do badania świeżej krwi pobranej od zdrowych ochotników (Haas i in., 2011b). Ponadto przyjęte przez nich kryterium do ustalenia granicy czułości reakcji to możliwość detekcji produktu przynajmniej w jednym powtórzeniu, natomiast

w niniejszej pracy – co najmniej w dwóch powtórzeniach. Wysoka czułość profilowania mRNA w połączeniu z możliwością jednoczesnej ekstrakcji RNA/DNA stwarza ogromne możliwości zastosowania tej metody w rutynowej pracy laboratoriów genetyczno-sądowych.

W celu sprawdzenia możliwości zastosowania opracowanego testu do badań nie tylko świeżych plam krwi analizowano wyniki otrzymane przy zastosowaniu materiału przechowywanego przez 0, 7, 14, 21 oraz 28 dni. Dla każdego z badanych punktów czasowych udało się zamplifikować wszystkie markery, co wskazuje na względną stabilność RNA, przynajmniej w okresie miesiąca. Istnieją opracowania, w których naukowcy donoszą, że RNA jest stabilny w plamach krwi przechowywanych przez okres 16, 23, a nawet 28 lat (Zubakov i in., 2009; Kohlmeier, Schneider, 2012; Lindenbergh i in., 2012). Do oceny stabilności RNA konieczne są także dodatkowe badania, gdyż wpływ na nią, a co z tym związane – na możliwość otrzymywania powtarzalnych wyników, ma nie tylko czas, ale także inne czynniki zewnętrzne, m.in. wilgoć, promienie UV czy zmienna temperatura. Badane w niniejszym projekcie plamy przechowywane były w miejscu suchym, bez narażenia na promienie słoneczne, dzięki czemu nie doszło do znaczącej degradacji materiału genetycznego. Haas i in. (2011a) analizowali próbki krwi, które poddane zostały wpływowi czynników środowiskowych, takich jak deszcz, wysoka temperatura czy promienie słoneczne, z jednoczesną oceną zależności otrzymywanych wyników od płci dawcy. Najbardziej destruktywny wpływ na RNA wykazywały deszcz i wysoka temperatura, z tym że możliwość identyfikacji krwi zależała od rodzaju wykorzystanych markerów mRNA. Podobnie jak w przypadku badania wpływu czasu najbardziej stabilnymi markerami krwi okazały się HBB oraz HBA1, które zostały wykryte w każdej badanej próbce (Haas i in., 2011a).

Zabezpieczone w miejscu przestępstwa ślady biologiczne mogą znajdować się na różnych powierzchniach, takich jak drewno, papier, obuwiu czy odzież. Ze względu na różną chłonność podłoża oraz możliwe występowanie inhibitorów, które mogą się przedostać do ekstraktu podczas izolacji RNA, należy podejrzewać, że jego rodzaj może mieć wpływ na wyniki testu identyfikacyjnego. W ramach niniejszej pracy, w celu sprawdzenia wpływu rodzaju podłoża na prowadzoną analizę, wykorzystano matrycę RNA pochodzącą z plam naniesionych na materiał dzinsowy oraz bibułę Whatman. W obu przypadkach we wszystkich próbkach z powodzeniem potwierdzono obecność badanych markerów hemoglobiny, co wskazuje, że akurat te badane podłoża nie wpływają na przebieg reakcji profilowania mRNA opracowanej w tym projekcie. Dla dokonania pełnej oceny przydatności stworzonego testu do identyfikacji krwi na dowodach rzeczowych istnieje jednak konieczność przebadania większej liczby różnorodnych powierzchni. Ważna jest też ocena, czy rodzaj podłoża może wpływać nie tylko na

przebieg samej reakcji, ale również na tempo degradacji znajdującego się na nim materiału biologicznego.

Przydatność opracowanego testu do profilowania mRNA sprawdzono na rzeczywistych śladach biologicznych. Do analizy wyselekcjonowano 22 próbki, dla których niespecyficzny test przesiewowy wykrywający właściwości utleniające hemu dał wynik dodatni, jednak tylko w 3 potwierdzono obecność ludzkiej krwi testem specyficznym (grupa 2 w tabeli nr 4). Dla 21 analizowanych śladów uzyskano profil DNA, w kilku przypadkach o złej jakości. W 17 próbkach wykryto wszystkie markery mRNA specyficzne dla krwi, a w 4 próbkach otrzymano częściowy profil mRNA, tym samym jednoznacznie potwierdzając obecność ludzkiej krwi w badanych śladach. Na podstawie eksperymentów walidacyjnych ustalono, że granicę czułości testu HemCheck stanowi 10000-krotne rozcieńczenie krwi, co odpowiada ok. 0,01 µl krwi. Powyższe wyniki sugerują zatem, że w badanych w ramach niniejszego projektu rzeczywistych śladach biologicznych markery mRNA były bardziej stabilne od białka hemoglobiny wykrywanego testem płytkowym. Chociaż biorąc pod uwagę nieprzewidywalny charakter rzeczywistych śladów w porównaniu do sztucznie przygotowanych próbek użytych do walidacji, całkowicie nie można wykluczyć, że przyczyną ujemnego wyniku testu płytkowego przy jednoczesnym dodatnim wyniku profilowania mRNA są różnice w czułości lub odporności obu metod. Analiza wykresów krzywych topnienia reakcji multipleksowej, odzwierciedlających obecność poszczególnych specyficznych markerów mRNA i ich wzajemny stosunek ilościowy oraz obecność potencjalnych niespecyficznych produktów PCR, w połączeniu z wynikami innych testów wykrywających krew i wynikami profilowania DNA umożliwia bardziej szczegółowe wnioskowanie na temat pochodzenia i stanu zachowania badanej próbki. Przykładowo, analiza jednego ze śladów (grupa 4 w tabeli nr 4) wykazała obecność dwóch specyficznych produktów mRNA oraz dodatkowych niespecyficznych fragmentów, co może wskazywać na znaczny stopień degradacji śladu, ewentualnie obecność RNA innych organizmów, np. bakterii. Podobnie o degradacji materiału biologicznego w śladach może świadczyć amplifikacja tylko najkrótszego fragmentu HBB61 lub jego większy przyrost w stosunku do pozostałych dłuższych fragmentów, jak np. w trzech próbkach z kategorii 1 oraz w próbkach z kategorii 5 i 6, tym bardziej, że w przypadku tych śladów zaobserwowano również szczytkowy profil DNA lub jego brak. Ponadto, analizując wykres krzywych topnienia dla jednej z próbek zakwalifikowanej do grupy 1, zaobserwowano znacznie wyższy przyrost produktu o długości 503 pz w stosunku do pozostałych krótszych fragmentów. Pik obrazujący marker HBB503 był również szerszy od pozostałych. Prawdopodobnym wyjaśnieniem opisanego powyżej wykresu krzywych topnienia

multipleksu jest znacznie wydajniejsza amplifikacja markera β -aktyny w stosunku do markerów krwi i nałożenie się krzywych topnienia produktu genu referencyjnego oraz HBB503, co może świadczyć o obecności w badanym śladzie mieszaniny krwi z ludzkim materiałem biologicznym o innym pochodzeniu. Hipotezę tę wzmacnia fakt uzyskania dla tego śladu mieszanego profilu DNA.

Wnioski

Identyfikacja krwi ludzkiej na podstawie analizy poziomu ekspresji genów hemoglobiny jest bez wątpienia obiecującą metodą, która już znajduje zastosowanie w praktyce kryminalistycznej. Wśród zalet tej metody należy podkreślić przede wszystkim wysoką czułość, specyficzność oraz możliwość jednoczesnej ekstrakcji RNA/DNA, co jest szczególnie istotne, kiedy analiza DNA jest priorytetem, a ilość materiału ograniczona. Przeprowadzone badania własne i dane z literatury cytowanej w niniejszej pracy udowodniły, że zarówno transkrypty hemoglobiny alfa, jak i hemoglobiny beta są niekwestionowanymi markerami krwi. Test oparty na profilowaniu markerów HBB61, HBB503 i HBA197 wymaga jeszcze wielu badań. Po przeprowadzeniu szerszego spektrum eksperymentów walidacyjnych, a szczególnie określeniu specyficzności markerów dla różnych płynów ustrojowych, przeanalizowaniu większej liczby rzeczywistych śladów biologicznych i dokładnym wskazaniu optymalnej ilości użytego RNA oraz po zbadaniu różnic osobniczych w poziomach ekspresji genów możliwe będzie jego rutynowe wykorzystanie do badania większości plam, co do których istnieje podejrzenie, że mogą zawierać krew. Ponadto wynik testu może mieć wartość predykcyjną odnośnie jakości materiału genetycznego, a także obecności mieszaniny płynów. Na obecną chwilę test oparty na analizie wybranych markerów mRNA może stanowić metodę uzupełniającą do komercyjnie dostępnych specyficznych testów immunologicznych i immunochromatograficznych.

Źródła rycin i tabel: autor

Bibliografia

1. Courts, C., Madea, B. (2011). Specific microRNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *Journal of Forensic Sciences*, 56(6), 1464-70. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01894.x.
2. Fordyce, S.L., Kampmann, M.L., van Doorn, N.L., Gilbert, M.T. (2013). Long-term RNA persistence in postmortem contexts. *Investigative Genetics*, 23, 4(1), 7. doi: 10.1186/2041-2223-4-7.
3. Haas, C., Hanson, E., Bär, W., Johansen, P., Lindenbergh, P.A. (2011a). mRNA profiling for the identification of blood—Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Science International: Genetics*, 5(1), 21-6. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.01.003.
4. Haas, C., Hanson, E., Kratzer, A., Bär, W., Ballantyne, J. (2011b). Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 449-58. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.09.006.
5. Hanson, E., Haas, C., Jucker, R., Ballantyne, J. (2012). Specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of skin in 'touch DNA' evidence. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 548-58. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.01.004.
6. Hanson, E.K., Lubenow, H., Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Analytical Biochemistry*, 15,387(2), 303-14. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.037.
7. Jakubowska, J., Maciejewska, A., Bielawski, K.P., Pawłowski, R. (2014). mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 53-60. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.07.006.
8. Kohlmeier, F., Schneider, P.M. (2012). Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 274-6. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.04.007.
9. Lindenbergh, A., de Pagter, M., Ramdayal, G., Visser, M., Zubakov, D., Kayser, M., Sijen, T. (2012). A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 565-77. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.01.009.
10. Nussbaumer, Ch., Gharehbaghi-Scnell, E., Korschineck, I. (2006). Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by Real-Time PCR. *Forensic Science International*, 10, 157(2-3), 181-6.
11. Park, S.M., Park, S.Y., Lee, S.H. (2013). Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1):143-50. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.09.001.
12. Patnaik, S.K., Mallick, R., Yendamuri, S. (2010). Detection of microRNAs in dried serum blots. *Analytical Biochemistry*, 1, 407(1), 147-9. doi: 10.1016/j.ab.2010.08.004.
13. Richard, M.L., Harper, K.A., Craig, R.L., Onorato, A.J., Robertson, J.M., Donfack, J. (2012). Evaluation of mRNA marker specificity for the identification of five human body fluids by capillary electrophoresis. *Forensic Science International: Genetics*, 6(4), 452-60. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.09.007.

14. Sakurada, K., Ikegaya, H., Fukushima, H., Akutsu, T., Watanabe, K., Yoshino, M. (2009). Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Legal Medicine (Tokyo)*, 11(3), 125-8. doi: 10.1016/j.legalmed.2008.10.002.
15. Setzer, M., Juusola, J., Ballantyne, J. (2008). Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), 296-305. doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00652.x.
16. Sijen, T. (2015). Molecular approaches for forensic cell type identification: on mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 21-32. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.11.015.
17. Virkler, K., Lednev, I.K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International: Genetics*, 1, 188(1-3), 1-17. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.02.013.
18. Visser, M., Zubakov, D., Ballantyne, K.N., Kayser, M. (2011). mRNA-based skin identification for forensic applications. *International Journal of Legal Medicine*, 125(2), 253-63. doi: 10.1007/s00414-010-0545-2.
19. Wang, Z., Luo, H., Pan, X., Liao, M., Hou, Y. (2012). A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 419-23. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.08.008.
20. Wang, Z., Zhang, J., Luo, H., Ye, Y., Yan, J., Hou, Y. (2013). Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 116-23. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.07.006.
21. Zubakov, D., Boersma, A.W., Choi, Y., van Kuijk, P.F., Wiemer, E.A., Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*, 124(3), 217-26. doi: 10.1007/s00414-009-0402-3.
22. Zubakov, D., Kokshoorn, M., Kloosterman, A., Kayser, M. (2009). New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *International Journal of Legal Medicine*, 123(1), 71-4. doi: 10.1007/s00414-008-0249-z.

Badania finansowane z grantu młodych naukowców Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy nr MN-9/WL pt. „Identyfikacja płynów biologicznych z wykorzystaniem specyficznych markerów mRNA”.