



mRNA PROFILING IN IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL FLUIDS IN FORENSIC GENETICS

Joanna JAKUBOWSKA¹, Agnieszka MACIEJEWSKA², Ryszard PAWŁOWSKI²

¹ *Intercollegiate Faculty of Biotechnology of University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Poland*

² *Institute of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland*

Abstract

Detection and identification of human body fluids represent very important aspects of forensic biology, since in the case of numerous offences, a firm determination of the DNA source (e.g. semen, saliva, epithelium) rather than establishing the DNA profile alone is of great significance. The presently employed routine methods are insufficient: there are no specific tests confirming the presence of saliva, vaginal secretions, menstrual blood or azoospermic semen. mRNA profiling, or identification and detection of body fluids based on the presence of tissue-specific transcripts is a new, promising technique of biological fluid identification. The method is universal, may be specific, and detection of several biological fluids can be simultaneous thanks to the use of multiplex PCR. To date, several dozen mRNA markers characteristic for numerous body fluids have been identified. The present review paper provides a summary of current knowledge on mRNA profiling for the purpose of biological fluid identification.

Key words

Body fluid identification; mRNA; Forensic genetics; Multiplex PCR.

Received 27 June 2011; accepted 25 August 2011

1. Introduction

Detection and identification of human biological fluids, such as blood, semen, saliva, vaginal secretions, menstrual blood, urine and sweat, represent highly important forensic biology analyses. In numerous offences, determination of a DNA source rather than establishing a DNA profile alone is of great significance. The profile of a victim's DNA from the clothing of a perpetrator has an entirely different probative value when DNA originates from the epithelium (sudoral and fatty substance) as compared to the situation where it is possible to demonstrate that the source of DNA is vaginal secretions of the victim. The presence of the victim's epithelium may bear no relation whatsoever to the crime, while the presence of vaginal secretions

definitely does. Similarly, the presence of peripheral blood may have a completely different significance as compared to the presence of menstrual blood, in the same way as the presence of saliva versus the presence of semen. In such situations, it becomes necessary to find a sound and unambiguous solution to such a problem through identification of the type of biological substance and by the same token determination of the more probable version of events. In legal proceedings, a proper and reliable determination of the source of isolated DNA is essential and an error in identification may result in grave legal consequences.

2. Methods of biological fluid identification

Numerous tests, both preliminary and specific, are employed in identification of particular biological fluids. Unfortunately, specific detection is possible solely for blood and semen. Identification of blood is based on immunochromatographic assays with anti-hemoglobin A or anti-glycophorin A monoclonal antibodies (e.g. HemCheck, Hexagon Obti Test, RSID-Blood), microscopy, spectrometric tests, and previously microcrystalline tests. The most reliable method of semen identification is sperm cell visualization; immunochromatic tests detecting the presence of semenogelin (RSID-Semen) and prostate-specific antigen (PSA) (e.g. Hexagon PSA, OneStep ABACard) are also popular. PSA tests, however, are not fully specific in view of the presence of small amounts of the protein in biological fluids other than semen [26, 30]. On the other hand, we lack specific tests confirming the presence of saliva, vaginal secretions, menstrual blood and azoospermic semen, the latter being increasingly common in males. Only preliminary (non-specific) tests are employed, such as tests detecting salivary amylase activity or presence (e.g. Phadebas, RSID-Saliva) and periodic acid Schiff (PAS) staining for detection of vaginal secretion and the presence of glycogen-rich cells [26, 30].

The presently employed methods of identification of human biological fluids are insufficient not only in view of their frequent lack of specificity, but also in the aspect of the high sensitivity of methods of DNA amplification. No universal method is available that would identify various biological fluids. Another problem is the destructive character of numerous preliminary tests, especially when the amount of evidentiary material is scant [9, 10].

Investigations carried out over the past few years have resulted in considerable progress in identification of biological fluids. Of particular interest is a detection technique based on the presence in biological evidence of mRNA molecules specific for given tissues. The paper is focused on this issue, aiming at systematizing and summing up the present body of knowledge.

3. Messenger RNA and procedures employed in mRNA analysis

mRNA (messenger ribonucleic acid) is a single strand nucleic acid involved in transcription and translation processes. It provides a matrix for protein synthesis. A typical mammalian cell contains 10–30 pg of total RNA, of which only 1–5% is mRNA. A single cell

contains approximately 360,000 mRNA molecules, which constitute 12,000 different transcripts that differ in their percentage representation in the general mRNA pool. While DNA is identical in each cell of an organism, the mRNA profile demonstrates what genes are expressed and what proteins are synthesized [1].

The method of biological fluid identification through mRNA profiling takes advantage of the fact that cells present in various biological fluids show specific patterns of gene expression and they synthesize proteins in characteristic amounts. The method is very sensitive owing to the use of amplification (PCR) and is also specific thanks to the unique pattern of gene expression for cells and organs with various functions [22, 24]. RNA analysis has the following steps: RNA isolation, reversed transcription, quantification, replication of particular transcripts and detection of amplicons.

Numerous methods of RNA isolation, as well as simultaneous RNA and DNA isolation have been described. Thanks to such coisolation, loss of material may be avoided, which is of importance in the case of small traces, where DNA profiling is a priority. These include organic methods [2, 3], commercially available kits (e.g. AllPrep DNA/RNA kit, Qiagen), as well as modifications of commercial kits [8]. Obviously, isolation of RNA alone is much simpler. Publications from the field of forensic genetics most commonly refer to RNeasy-type kits (Qiagen) [17, 18, 19, 32] or organic methods [22, 29] based on the Chomczynski protocol [11]. Commercial kits based on RNA affinity to silica (Qiagen) or coated magnetic beads (Ambion) are a faster, more sensitive and safer alternative to organic methods, yet – contrary to the latter – they do not allow for unlimited RNA recovery.

The average yield of total RNA from blood and saliva stains with a volume of 50 μ l is several hundred nanograms, whereas 1 μ g RNA is obtained from a semen stain with a volume of 50 μ l and almost 70 μ g RNA from a vaginal smear [29].

A significant problem in the course of RNA isolation is its low stability resulting from the presence of ribonucleases (RNases) that are difficult to inactivate. For this reason all buffers and vessels that come into contact with isolation are subjected to diethylpyrocarbonate (DEPC) activity, which inactivates the enzymes. Commercially available kits include RNase-free buffers and probes, which greatly facilitates work.

Following isolation, RNA is subjected to reversed transcription and the thus produced cDNA is amplified in the presence of primers specific for selected genetic markers. For this purpose, both end-point PCR [13, 18, 22, 29], and real-time PCR [5, 18, 23, 24, 27]

TABLE I. mRNA MARKERS EMPLOYED IN IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL FLUIDS IN FORENSIC GENETICS

Blood			Menstrual blood	Blood originating from pregnant woman	Saliva	
SPTB (β-spectrin) [22]	ALOX5AP (Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein) [33]	C5R1 (C5a receptor) [33]	MMP11 (Matrix metalloproteinase 11) [4, 29]	hPL (Placental lactogen) [15]	STATH (Stath-erin) [6]	SPRR1A (Small proline-rich protein A) [33]
PBGD (Porphobilinogen deaminase) [22]	AMICA1 (Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1) [33]	MNDA (Myeloid cell nuclear differentiation antigen) [33]	MMP7 (Matrix metalloproteinase 7) [4, 5, 23]	βhCG (Chorionic gonadotrophin) [15]	HTN3 (Histatin 3) [21]	SPRR3 (Small proline-rich protein 3) [33]
HBA (Hemoglobin alpha locus 1) [24]	AQP9 (Aquaporin 9) [33]	NCF2 (Neutrophil cytosol factor 2) [33]	MMP10 (Matrix metalloproteinase 10) [5, 23]		HTN1 (Histatin 1) [19]	KRT4 (Keratin 4) [33]
HBB (Hemoglobin beta) [18]	ARHGAP26 (GRAF) [33]	CD3G (Gammmapolypeptide) [17]			PRB1-3 (Basic salivary proline-rich proteins 1-3) [21]	KRT6A (Keratin 6A) [33]
ALAS2 (Erythroid δ-aminolevulinic synthase) [23]	C1QR1 (C1q receptor 1) [33]	GlycoA (Glycophorin A) [13]			PRB4 (Basic salivary proline-rich protein 4) [12]	KRT13 (Keratin 13) [33]
Semen	Seminal fluid	Vaginal secretions	Sweat	Skin	Reference genes	
PSA (KLK) (Prostate specific antigen) [12, 24]	TGM4 (Transglutaminase 4) [13]	HBD1 (Human beta-defensin 1) [22]	DCD (Dermicidin) [28]	CDSN (Corneodesmosin) [31]	Ribosomal protein S15 [22]	TEF (Transcription elongation factor 1α) [13]
PRM1 (Protamine 1) [6]		MUC4 (Mucin 4) [22]		LOR (Loricrin) [31]	ACTB (β-actin) [21]	UCE (Ubiquitin conjugating enzyme) [13]
PRM2 (Protamine 2) [6]		ESR1 (Estrogen receptor 1) [12]		KRT9 (Keratin 9) [31]	GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) [18, 22]	G6PDH (glucose 6-phosphate dehydrogenase) [13]
SEMG1 and SEM2 (Semenogelin 1 and 2) [12, 27]		<i>Lactobacillus crispatus</i> [14]			18S rRNA [18, 24]	
		<i>Lactobacillus gasseri</i> [14]				

reactions have been postulated. Real-time PCR allows for more quantitative determination of the transcript, which may be of significance when certain markers appear in fluids other than theoretically specific for a given marker due to contaminations, e.g. haemoglobin A (HBA) in saliva in bleeding gums or mucin 4 (MUC4) in sperm if the donor has recently had sexual intercourse [24]. Moreover, some investigators believe

real-time PCR to be a method that is 40 times more sensitive as compared to end-point PCR [24], while others claim that the sensitivity of both techniques is comparable [17]. For detection of amplification products of end-point PCR, both gel electrophoresis [21, 29] and capillary electrophoresis [13, 18, 22, 25] have been advocated; at present, the latter is increasingly common, especially in view of its advantages, such as

ease of performing the analysis and interpreting the results, automation and no requirement of using dangerous reagents.

4. Currently employed and proposed mRNA markers and methods of their detection

To date, several dozen mRNA markers characteristic for particular biological fluids and for skin have been identified. Table I lists mRNA markers proposed to be employed in identification of given biological fluids. Nevertheless, not all the listed markers are fully specific. Their routine employment in medico-legal practice still requires detailed investigations with emphasis put on specificity and sensitivity of detection.

One of the earliest papers presenting opportunities afforded by mRNA profiling in forensic genetics was published by Bauer and Patzelt. The authors described mRNA markers characteristic of menstrual blood: metalloproteinases (MMP) [4], and of semen: protamines (PRM1 and PRM2) [6]. In turn, Juusola and Ballantyne confirmed that biological stains contain mRNA in a sufficient amount and of sufficient quality to allow for amplification and analysis on agarose gels, and described markers that might be used in identification of saliva: statherin (STATH), histatin 3 (HTN3), as well as proline-rich proteins (PRB1, PRB2, PRB3). The authors also demonstrated that the house-keeping-type gene transcripts: ribosomal protein S15, GAPDH and β -actin are present in saliva, semen and in blood, and thus may serve as reference genes [21]. Soon afterwards the same group of investigators developed an octaplex end-point PCR reaction for detection of blood, saliva, semen and vaginal secretion. In order to minimize the risk of false results, two genes with independently regulated expression were replicated for each biological fluid: SPTB and PBGD for blood, HTN3 and STATH for saliva, PRM1 and PRM2 for semen and HBD1 and MUC4 for vaginal secretions. The sensitivity of the method ranged from <200 pg RNA for semen to 12 ng for vaginal secretions. When MMP7-specific primers were included in the octaplex, a nanoplex was developed to identify five biological fluids, with expression of MMP-7, MUC-4 and HBD-1 observed in menstrual blood, while SPTB and PBGD in menstrual blood were detected solely by the gene monoplexes [22].

Another method of transcript amplification is real-time PCR, proposed by such researchers as Nussbaumer et al. [24]. The presence or absence of a marker in the investigated sample is determined based on the value of dCt , which is the difference between the

threshold cycles of the investigated gene and reference gene. The threshold cycle (Ct) of each gene is the number of the cycle in which the fluorescence signal generated through amplification of the gene exceeds the determined threshold value. Reactions were developed for detection of HBA (blood), PSA (semen) and MUC4 (vaginal secretions), and the reference gene for these reactions was 18S rRNA. Inasmuch as HBA and PSA were specifically detected both in fresh and in 10-day old stains, MUC4 was characterized by higher stability and was also seen in fresh saliva samples [24].

In 2007, Juusola and Ballantyne also described real-time PCR reactions employed respectively in detection of blood (ALAS2, SPTB, GAPDH), saliva (HTN3, STATH, GAPDH), semen (PRM1, PRM2, GAPDH) and menstrual blood (MMP7, MMP10, GAPDH). Following normalization of reactions for house-keeping genes and markers, the authors made an assumption that $dCt > 0$ denoted positivity, while $dCt < 0$ – negativity. The value of dCt was achieved by subtracting the mean value of Ct for the biological fluid gene from the mean value of Ct of the reference gene. Thanks to incorporation of two genes characteristic for given biological fluids to each triplex, the specificity of real-time PCR was increased. The authors also noted the importance of controlling the amount of isolate subjected to reversed transcription, since false positive results might be generated [23].

Other markers were proposed by Fang et al. The authors selected 110 potential tissue-specific markers, including SEMG1/2 (semenogelin), TGM4 (transglutaminase 4) and PSA for semen, ESR1 (estrogen receptor 1) for vaginal secretions and PRB4 for saliva [12]. One of these markers was employed by Sakurada et al., who used real-time PCR to replicate STATH, HTN3 for saliva and PRM2, SEMG1 for semen, demonstrating the above markers to be highly specific [27].

Screening studies of human nuclear genome carried out by Zubakov et al., employing micromatrices and aimed at selection of the most specific and stable transcripts allowed for identification of further new markers characteristic for saliva (SPRR1A, SPRR2A, KRT4, KRT6A, KRT13) and blood (ALOX5AP, AMICA1, AQP9, ARHGAP26, C1QR1, C5R1, CASP1, MNDA, NCF2) [32]. As the authors report, the markers may be successfully determined in stains as old as 16 years (blood) and 6 years (saliva) [33]. An mRNA marker characteristic for sweat – dermicidin (DCD) – was also identified; it is characterized by high specificity and is stable in stains that are 7 days old at the minimum [28]. In turn, markers identified for skin include corneodesmosin (CDSN), loricrin (LOR) and keratin

9 (KRT9), which are stable in 6-month old fingerprints [31]. As markers of blood originating from pregnant women, one may use human placental lactogen (hPL) and human chorionic gonadotropin (β hCG), although the latter is detected only by the mid-third trimester of pregnancy. It is possible that a simultaneous analysis of both these fragments may in future be helpful in assessing the advancement of pregnancy [15].

A particularly significant problem is posed by identification of vaginal secretions (including menstrual blood) and azoospermic semen, since there are no specific, classic methods of identification for these biological fluids. The end-point PCR multiplex developed by Juusola and Ballantyne extended to include the marker of menstrual blood [22] and replicating HTN3, STATH (saliva), PBGD, SPTB (blood), PRM1, PRM2 (semen), HBD1, MUC4 (vaginal secretion) and MMP7 (menstrual blood) was described by Patel and Peel in 2008, who confirmed the high specificity of the markers. To a large extent, the authors concentrated on possibilities afforded by the method in identification of vaginal secretions and menstrual blood, observing significant inter-sample differences in the level of marker expression and lack of correlation between marker expression and menstrual cycle. While MUC4 is a good marker in detection of vaginal secretions, HBD1 may produce false negative results and MMP7 may escape detection in females on hormonal contraceptives [25]. Haas et al. also focused on this problem; the investigators extended the above multiplex to include the menstrual blood marker MMP11 and described another reaction employed in detection of blood, menstrual blood and vaginal secretions, amplifying the following markers: SPTB, PBGD, MMP7, MMP11, HBD1 and MUC4. In menstrual blood, the presence of markers characteristic for all the three biological fluids may be expected, while metalloproteinases 7 and 11 may be present in vaginal secretions throughout the entire cycle, but its highest concentration is noted between day 1 and day 4 [18].

Another PCR end-point multiplex described by Fleming et al. is a reaction that detects GlycoA (blood), MMP11 (menstrual blood), HTN3 (saliva), STATH (saliva), PRM2 (spermatozoa), TGM4 (seminal fluid) and TEF, G6PDH, UCE (house-keeping genes). Owing to employment of a prostate-specific marker, which is present in seminal fluid and absent in spermatozoa, the authors were able to identify seminal fluid in stains with a volume as small as 1 μ l [13]. In detection of vaginal secretions, the same authors employed profiling of RNA originating from bacteria colonizing the female genital tract [14], rejecting HBD1 and MUC4 in view of their possible presence in saliva [24, 27].

Intergenic spacer regions 16S–23S rRNA of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri* were found to be present in vaginal secretions of adolescent girls, women at child-bearing and menopausal age, as well as in post-hysterectomy women and female tobacco smokers. The authors suggested that antibiotic therapy should not affect test results either, but this thesis requires further studies. Bacterial primers were successfully incorporated into the previously described multiplex, thus creating an undecimplex [14].

5. Types of employed reference genes

Apart from analysis of markers themselves, reaction normalization and control is of significance; this objective is achieved by genes that are always expressed in all tissues (house-keeping genes). To this end, when studying mRNA of particular proteins, the following transcripts are employed: ribosomal protein S15, β -actin, GAPDH, TEF, UCE and 18SrRNA [6, 13, 21, 24]; however, they differ with respect to specificity and variability of expression level in various biological fluids. Thus, when comparing expression of β -actin, GAPDH and S15 in various biological fluids, it appears that GAPDH amplification is characterized by the highest variability and the lowest sensitivity [29]. GAPDH may also escape detection in saliva, unlike 18S rRNA [18]. β -actin is indicated by Visser et al. [31] as the best reference gene among several genes that are commonly employed (β -actin, GAPDH, B2M, PPIB, UBC). Summing up information on various mRNAs of reference genes described to date in the above-mentioned publications, it seems that S15 and β -actin are the most promising, and in order to increase the reliability of results, two or even three different control genes should be amplified [29, 31].

6. Stability and sensitivity of known markers

Despite the commonly believed theory about the low stability of mRNA, mRNA markers have been detected in biological stains as old as 15 or 16 years [7, 33], but most likely such situations are exceptional. Depending on the mRNA sequence, stability may differ and it is unclear why certain mRNAs are degraded at a slower rate, while degradation of others is much faster. To give an example, in 6-year-old saliva and semen stains stored in a dry and dark place, STATH, PRM2, and SEMG1 were detectable, while HTN3 was not [27]. Other authors reported that stains stored in a dry, dark place for several years did not show any

decrease in transcript level [18, 27]. In turn, exposure of samples to various environmental conditions (rain, humidity, light, ultraviolet rays) results in a prompt degradation of RNA [27, 29]. Samples exposed to environmental effects but protected from rain yielded a sufficient amount of RNA for analysis after maximally 7 days for saliva and semen, 30 days for blood, and 180 days for vaginal secretions. Exposure to rain resulted in shortening the time to 1 day for saliva, 7 days for semen, 3 days for blood and vaginal secretions. PRM 2 was not detected as early as after 1 day [29].

The sensitivity of mRNA profiling by end-point PCR and real-time PCR is comparable to the sensitivity of classic methods [18, 19]. Transcripts for STATH, HTN3, PRM2 and SEMG1 were detected even in 0.1 µl of saliva and semen, which is comparable to the sensitivity of such tests as RSID SALIVA and SER-ATEC PSA; however, RSID SALIVA is less sensitive in the case of older stains (6 years) as compared to mRNA profiling [27]. Multiplex sensitivity (minimal amount of total RNA added to reversed transcription reaction) is similar to the sensitivity of monoplexes for given genes and may range from 160 pg to 12 ng, depending on the marker [21, 22].

7. Specificity of known markers

Despite promising preliminary results for marker specificity, the issue requires in-depth analysis. After further analyses, some markers described as specific proved to produce false positive results. However, one should not confuse lack of specificity with contaminations, e.g. urine contaminated with semen or saliva and vaginal secretions contaminated with blood, which obviously may occur [17, 18]. For a test to be regarded as fully specific, it must produce a positive result solely in the presence of a human biological fluid. Investigations of human specificity of markers present in the multiplex described by Fleming et al. demonstrated that all the markers were specific, excluding histatin and statherin, which were also found in orangutan saliva [13]. Another important issue is the specificity of a marker among human biological fluids. The described markers as a rule fulfil the requirement, yet the issue should undoubtedly be treated with caution, since for example MUC4 and HBD1 (vaginal secretion markers) may also be present in saliva [24, 27].

8. Summary and future prospects

mRNA profiling is a promising, modern technique of human biological fluid identification. Apart from specificity and sensitivity, another advantage of the method is ease of analysis. The latter is supported by the fact that 15 out of 16 laboratories participating in the EDNAP (European DNA Profiling Group) organized project were capable of isolating RNA from dry blood stains in spite of the fact that the majority of labs lacked experience in RNA analysis [16].

In the nearest future, RNA profiling may become a popular method employed in identification of biological fluids, especially in the case of mixtures and fluids that to date lack effective identification methods. New markers are constantly being described, thanks to which this branch of knowledge continues to develop. An interesting alternative to mRNA is the use of microRNA (miRNA) markers in identification of biological fluids. miRNA, whose function in the cell is controlling gene expression, may – similarly to mRNA – be tissue-specific and their length within the range of 20–30 nucleotides makes them function better when analyzing degraded material [20, 34]. Although at present mRNA profiling is the focus of interest of forensic geneticists who are searching for new methods of biological fluid identification, the future of this specialty may belong to miRNA.

References

1. Alberts B., Bray D., Lewis J. [et al.], *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, New York 1994.
2. Alvarez M., Juusola J., Ballantyne J., An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples, *Analytical Biochemistry* 2004, 335, 289–298.
3. Bauer M., Patzelt D., A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains, *Forensic Science International* 2003, 136, 76–78.
4. Bauer M., Patzelt D., Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood, *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47, 1278–1282.
5. Bauer M., Patzelt D., Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: Technical improvements and the practical value of negative test results, *Forensic Science International* 2008, 174, 54–58.
6. Bauer M., Patzelt D., Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains, *International Journal of Legal Medicine* 2003, 117, 175–179.
7. Bauer M., Polzin S., Patzelt D., Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of blood stains?, *Forensic Science International* 2003, 138, 94–103.

8. Bowden A, Fleming R., Harbison S. A. [et al.], A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ TM system, *Forensic Science International: Genetics* 2011, 5, 64–68
9. Branicki W., Kupiec T., Wolańska-Nowak P., *Badania DNA dla celów sądowiczych*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2008.
10. Butler J. M., *Forensic DNA typing, second edition: biology, technology, and genetics of STR markers*, Elsevier Academic Press, New York 2005.
11. Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry* 1987, 162, 156–159.
12. Fang R., Manohar C. F., Shulse C. [et al.], Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs, *International Congress Series* 2006, 1288, 685–687.
13. Fleming R. I., Harbison S.A., The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids, *Forensic Science International: Genetics* 2010, 4, 244–256.
14. Fleming R. I., Harbison S. A., The use of bacteria for the identification of vaginal secretions, *Forensic Science International: Genetics* 2010, 4, 311–315.
15. Gauvin J., Forensic pregnancy diagnostics with placental mRNA markers, *International Journal of Legal Medicine* 2010, 124, 13–17.
16. Haas C., Hanson E., Bar W., mRNA profiling for the identification of blood – Results of a collaborative ED-NAP exercise, *Forensic Science International: Genetics* 2011, 5, 21–26.
17. Haas C., Hanson E., Kratzer A. [et al.], Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood, *Forensic Science International: Genetics* 2011, 5, 449–458.
18. Haas C., Klessler B., Kratzer A. [et al.], mRNA profiling for body fluid identification, *Forensic Science International: Genetics, Supplement Series* 2008, 1, 37–38.
19. Haas C., Klessler B., Maake C. [et al.], mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Science International: Genetics* 2009, 3, 80–88.
20. Hanson E. K., Lubenow H., Ballantyne J., Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Analytical Biochemistry* 2009, 387, 303–314.
21. Juusola J., Ballantyne J., Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification, *Forensic Science International* 2003, 135, 85–96.
22. Juusola J., Ballantyne J., Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, *Forensic Science International* 2005, 152, 1–12.
23. Juusola J., Ballantyne J., mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52, 1252–1262.
24. Nussbaumer C., Gharehbaghi-Schnell E., Korschineck I., Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by Real-Time PCR, *Forensic Science International* 2006, 157, 181–186.
25. Patel G., Peel C., Identifying the origin of cells, *Forensic Science International: Genetics, Supplement Series* 2008, 1, 574–576.
26. Pawłowski R., *Medyczo-sądowe badanie śladów biologicznych*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 1997.
27. Sakurada K., Ikegaya H., Fukushima H. [et al.], Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen, *Legal Medicine* 2009, 11, 125–128.
28. Sakurada K., Akutsu T., Fukushima H. [et al.], Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA, *Forensic Science International* 2010, 194, 80–84.
29. Setzer M., Juusola J, Ballantyne J., Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains, *Journal of Forensic Sciences* 2008, 53, 296–305.
30. Virkler K., Lednev I. K., Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Science International* 2009, 188, 1–17.
31. Visser M., Zubakov D., Ballantyne K. N. [et al.], mRNA-based skin identification for forensic applications, *International Journal of Legal Medicine* 2011, 125, 253–263.
32. Zubakov D., Hanekamp E., Kokshoorn M. [et al.], Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples, *International Journal of Legal Medicine* 2008, 122, 135–142.
33. Zubakov D., Kokshoorn M., Kloosterman A. [et al.], 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* 2009, 123, 71–74.
34. Zubakov D., Boersma A. W. M., Choi Y., [et al.], MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation, *International Journal of Legal Medicine* 2010, 124, 217–226.

Corresponding author

Joanna Jakubowska
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego
ul. Kładki 24
PL 80-833 Gdańsk
e-mail: jjakubowska@gumed.edu.pl

PROFILOWANIE mRNA DO IDENTYFIKACJI PŁYNÓW BIOLOGICZNYCH W GENETYCE SĄDOWEJ

1. Wprowadzenie

Wykrywanie i identyfikacja ludzkich płynów biologicznych takich jak np. krew, nasienie, ślina, wydzielina z dróg rodnych, krew miesiączkowa, mocz i pot są bardzo ważnymi analizami z zakresu biologii sądowej. W przypadku wielu przestępstw bardzo istotne jest ustalenie źródła DNA, a nie tylko sam jego profil. Zupełnie inną wartość dowodową będzie miał profil DNA ofiary na odzieży sprawcy, gdy pochodzi on z naskórka (substancja potowo-tłuszczowa), a inny, gdy uda się wykazać, że źródłem DNA jest wydzielina z dróg rodnych ofiary. Obecność naskórka ofiary może nie mieć żadnego związku z przestępstwem, a obecność wydzieliny z dróg rodnych bezwzględnie tak. Podobnie obecność krwi obwodowej może mieć zupełnie inne znaczenie niż krwi menstruacyjnej, a obecność śliny inne niż nasienia. W takich sytuacjach konieczne staje się pewne i jednoznaczne rozstrzygnięcie tego problemu poprzez zidentyfikowanie rodzaju substancji biologicznej i tym samym ustalenie, która wersja jest bardziej prawdopodobna. Właściwe i pewne rozpoznanie źródła izolowanego DNA w postępowaniu sądowym jest konieczne, a błąd identyfikacji może nieść za sobą poważne konsekwencje prawne.

2. Metody identyfikacji płynów biologicznych

Istnieje wiele testów, zarówno wstępnych jak i swoistych, które wykorzystywane są do identyfikacji poszczególnych płynów biologicznych. Niestety, specyficznie można wykrywać jedynie krew oraz nasienie. Do identyfikacji krwi stosuje się testy immunochromatograficzne z monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko hemoglobinie A lub glikoforynie A (np. HemCheck, Hexagon Obti Test, RSID-Blood), mikroskopię, testy spektrometryczne, a niegdyś mikrokryształiczne. Najpewniejszą metodą identyfikacji nasienia jest wizualizacja plemników, popularne są także testy immunochromatograficzne na obecność semenogeliny (RSID-Semen) i antygeny specyficznego dla prostaty (PSA) (np. Hexagon PSA, OneStep ABACard). Testy na obecność PSA nie są jednak w pełni specyficzne ze względu na obecność niewielkich ilości tego białka w innych niż nasienie płynach ustrojowych [26, 30]. Brak jest natomiast specyficznych testów potwierdzających obecność śliny, wydzieliny z dróg rodnych, krwi menstruacyjnej i nasienia azoospermicznego, coraz częściej występującego u mężczyzn. Stosuje się jedynie testy wstępne (nieswoiste), takie jak testy do wykrywania śliny na aktywność lub obecność amylazy (np.

Phadebas, RSID-Saliva) i test do wykrywania wydzieliny z dróg rodnych kobiety z PAS (ang. periodic acid Schiff reagent) na obecność komórek bogatych w glikogen [26, 30].

Obecnie stosowane metody identyfikacji ludzkich płynów biologicznych są niewystarczające, nie tylko ze względu na częsty brak specyficzności, ale także w aspekcie wysokiej czułości metod powielania DNA. Nie ma uniwersalnej metody identyfikacji różnych płynów biologicznych. Problemem jest też destrukcyjny charakter wielu testów wstępnych, szczególnie, gdy ilość materiału dowodowego jest niewielka [9, 10].

Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat przyniosły znaczny postęp dziedzinie identyfikacji płynów biologicznych. Na szczególną uwagę zasługuje technika detekcji w oparciu o obecność w śladzie biologicznym specyficznych dla danych tkanek cząsteczek mRNA. Temu zagadnieniu poświęcona jest niniejsza praca mająca na celu usystematyzowanie i podsumowanie dotychczasowej wiedzy, a także przybliżenie polskiemu czytelnikowi powyższej tematyki.

3. Matrycowy RNA i procedury jego analizy

mRNA (matrycowy kwas rybonukleinowy) to jednoniciowy kwas nukleinowy zaangażowany w procesy transkrypcji i translacji. Jest matrycą dla syntezy białek. Typowa komórka ssaka zawiera 10–30 pg całkowitego RNA, z czego zaledwie 1–5% to mRNA. W pojedynczej komórce znajduje się około 360 000 cząsteczek mRNA stanowiących 12 000 różnych transkryptów różniących się udziałem procentowym w ogólnej puli mRNA. Podczas gdy DNA w każdej komórce organizmu jest takie samo, profil mRNA pokazuje, jakie geny ulegają ekspresji i jakie białka są syntezowane [1].

Metoda identyfikacji płynów biologicznych poprzez profilowanie mRNA wykorzystuje fakt, że komórki obecne w różnych płynach biologicznych wykazują specyficzny wzór ekspresji genów i syntezują białka w charakterystycznych dla nich ilościach. Metoda ta jest bardzo czuła dzięki zastosowaniu amplifikacji (PCR) i specyficzna dzięki unikalnemu wzorowi ekspresji genów dla komórek i organów o różnych funkcjach [22, 24]. Na analizę RNA składają się następujące etapy: izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, pomiar ilości, powielanie określonych transkryptów i detekcja amplikonów.

Istnieje wiele opisanych metod izolacji RNA, a także jednoczesnej izolacji RNA i DNA. Dzięki takiej koizolacji można uniknąć strat materiału, co jest istotne w przy-

padku niewielkich śladów, kiedy profilowanie DNA jest priorytetem. Są to metody organiczne [2, 3], zestawy komercyjnie (np. AllPrep DNA/RNA kit, Qiagen), a także modyfikacje komercyjnych zestawów [8]. Oczywiście łatwiejsza jest izolacja samego RNA. W publikacjach z dziedziny genetyki sądowej najczęściej wymieniane są zestawy typu Rneasy (Qiagen) [17, 18, 19, 32] lub metody organiczne [22, 29] oparte na protokole Chomczyńskiego [11]. Komercyjne zestawy oparte na powinowactwie RNA do złóż krzemionkowych (Qiagen) lub opłaszczonych kuleczek magnetycznych (Ambion) są szybszą, czulszą i bardziej bezpieczną alternatywą dla metod organicznych, jednak w przeciwieństwie do nich nie pozwalają na nieograniczony odzysk RNA.

Średnio uzyskuje się kilkaset nanogramów całkowitego RNA z plam krwi i śliny o objętości 50 μ l, 1 μ g RNA z plamy nasienia o objętości 50 μ l i niemal 70 μ g RNA z wymazu z dróg rodnych [29].

Istotnym problemem podczas izolacji RNA jest jego niska stabilność wynikająca z obecności trudnych do inaktywowania RNaz (rybonukleaz). Z tego względu wszystkie bufony i naczynia mające styczność z izolacją są poddawane działaniu DEPC (ang. diethylpyrocarbonate, eter dietylowy kwasu pirowęglowego), który inaktywuje te enzymy. Komercyjne zestawy zawierają bufony i próbówki wolne od RNaz, co znacznie ułatwia pracę.

Po izolacji RNA jest poddawany odwrotnej transkrypcji, a powstałe w ten sposób cDNA podlega amplifikacji w obecności starterów specyficznych dla wybranych markerów genetycznych. W tym celu proponowano zarówno reakcję *end-point* PCR [13, 18, 22, 29], jak i PCR w czasie rzeczywistym [5, 18, 23, 24, 27]. PCR w czasie rzeczywistym daje możliwość bardziej ilościowego oznaczania transkryptu, co może być istotne, gdy niektóre markery pojawiają się w innych niż teoretycznie specyficzne dla nich płyny ze względu na zanieczyszczenie, np. hemoglobina A (HBA) w ślinie w przypadku krwawienia dziąseł lub mucyna 4 (MUC4) w nasieniu, jeśli dawca niedawno odbył stosunek seksualny [24]. Ponadto niektórzy badacze uważają PCR w czasie rzeczywistym za nawet czterdzieści razy czulszą metodę niż *end-point* PCR [24], a inni dowodzą, że czułość obu technik jest porównywalna [17]. Do wykrywania produktów amplifikacji *end-point* PCR proponowano zarówno elektroforezę żelową [21, 29], jak i kapilarną [13, 18, 22, 25]; obecnie ta druga metoda jest coraz bardziej rozpowszechniona szczególnie ze względu na jej zalety, takie jak łatwość przeprowadzenia i interpretacji wyników, automatyzacja, a także brak konieczności użycia niebezpiecznych odczynników.

4. Używane i proponowane markery mRNA oraz metody ich wykrywania

Jak dotąd zidentyfikowano kilkadziesiąt markerów mRNA charakterystycznych dla poszczególnych płynów biologicznych, a także dla skóry. Tabela I przedstawia zestawienie markerów mRNA proponowanych do identyfikacji określonych płynów biologicznych. Nie wszystkie jednak wymienione markery są w pełni specyficzne. Rutynowe stosowanie ich w praktyce medyczno-sądowej wymaga jeszcze szczegółowych badań z wyraźnym naciskiem położonym na specyficzność i czułość detekcji.

Jedną z najwcześniejszych prac o możliwościach, jakie niesie profilowanie mRNA w genetyce sądowej, opublikowali Bauer i Patzelt. Opisali oni markery mRNA charakterystyczne dla krwi menstruacyjnej: metaloproteinazy (MMP) [4] i dla nasienia: protaminy (PRM1 i PRM2) [6]. Z kolei Juusola i Ballantyne potwierdzili, że w plamach biologicznych znajduje się mRNA w wystarczającej jakości i ilości do amplifikacji i analizy na żelach agarozowych oraz opisali markery mogące służyć do identyfikacji śliny: staterynę (STATH), histatynę 3 (HTN3), a także białka bogate w proliny (PRB1, PRB2, PRB3). Wykazali również, że transkrypty genów typu *house-keeping*: białka rybosomalnego S15, GAPDH i β -aktyny są obecne zarówno w ślinie, nasieniu jak i krwi, a więc mogą służyć za geny referencyjne [21]. Wkrótce ta sama grupa naukowców stworzyła oktapleksową reakcję *end-point* PCR do wykrywania obecności krwi, śliny, nasienia i wydzieliny z dróg rodnych. W celu zminimalizowania ryzyka powstania wyników fałszywych powielano po dwa geny o niezależnie regulowanej ekspresji dla każdego płynu biologicznego: dla krwi SPTB i PBGD, dla śliny HTN3 i STATH, dla nasienia PRM1 i PRM2 oraz dla wydzieliny z dróg rodnych HBD1 i MUC4. Czułość metody wahała się od <200 pg RNA dla nasienia do 12 ng dla wydzieliny z dróg rodnych. Po dołączeniu do oktapleksu primerów specyficznych dla MMP7 stworzono nanopleks do identyfikacji pięciu płynów biologicznych, przy czym we krwi menstruacyjnej obserwowano ekspresję MMP7, MUC4 i HBD1, natomiast SPTB i PBGD w krwi menstruacyjnej wykrywano tylko za pomocą monopleksów dla tych genów [22].

Drugim sposobem amplifikacji transkryptu jest PCR w czasie rzeczywistym, proponowany m.in. przez Nussbaumer i in. [24]. Obecność lub brak markera w badanej próbce stwierdza się na podstawie wartości *dCt*, która jest różnicą wartości cyklu progowego dla badanego genu i genu referencyjnego. Cykl progowy (*Ct*) dla każdego genu to numer cyklu, w którym sygnał fluorescencji wygenerowany poprzez amplifikację tego genu przekracza ustaloną wartość progową. Opracowano reakcje do wykrywania HBA (krew), PSA (nasienie) i MUC4 (wydzielina z dróg rodnych kobiety), a genem referencyjnym dla tych reakcji był 18S rRNA. Podczas gdy HBA i PSA

były specyficznie wykrywane zarówno w świeżych, jak i 10-dniowych plamach, MUC4 miał mniejszą stabilność i pojawiał się także w świeżych próbkach śliny [24].

Juusola i Ballantyne w 2007 r. również opisali reakcje PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania odpowiednio: krwi (ALAS2, SPTB, GAPDH), śliny (HTN3, STATH, GAPDH), nasienia (PRM1, PRM2, GAPDH) i krwi menstruacyjnej (MMP7, MMP10, GAPDH). Po normalizacji reakcji dla genów house-keeping i markerów autorzy założyli, że $dCt > 0$ oznacza wynik pozytywny, a $dCt < 0$ wynik negatywny. Wartość dCt otrzymywano, odejmując średnią wartość Ct dla genu płynu biologicznego od średniej wartości Ct genu referencyjnego. Dzięki włączeniu dwóch genów charakterystycznych dla danych płynów biologicznych do każdego tripleksu, zwiększono specyficzność metody PCR w czasie rzeczywistym. Stwierdzono także, że bardzo ważne jest kontrolowanie ilości izolatu poddawanego odwrotnej transkrypcji, gdyż może to prowadzić do powstawania wyników fałszywie pozytywnych [23].

Inne markery zostały zaproponowane przez Fang i in. Wyselekcjonowali oni 110 potencjalnych markerów tkankowo-specyficznych, wśród nich SEMG1/2 (semenogelina), TGM4 (transglutaminaza 4) i PSA dla nasienia, ESR1 (receptor estrogenu 1) dla wydzieliny z dróg rodnych i PRB4 dla śliny [12]. Jeden z nich został wykorzystany przez Sakurada i in., którzy za pomocą PCR w czasie rzeczywistym powielali STATH, HTN3 dla śliny i PRM2, SEMG1 dla nasienia, wykazując wysoką specyficzność wymienionych markerów [27].

Badania screeningowe ludzkiego genomu jądrowego, przeprowadzone z użyciem mikromacierzy przez Zubakov i in., a mające na celu wyodrębnienie najbardziej specyficznych i stabilnych transkryptów, pozwoliły wyłonić kolejne nowe markery charakterystyczne dla śliny (SPRR1A, SPRR2A, KRT4, KRT6A, KRT13) i krwi (ALOX5AP, AMICA1, AQP9, ARHGAP26, C1QR1, C5R1, CASP1, MNDA, NCF2) [32]. Markery te, jak podają autorzy, mogą być z powodzeniem oznaczane nawet w 16-letnich (krew) i 6-letnich plamach (ślina) [33]. Wytypowany został także marker mRNA charakterystyczny dla potu – dermicydyna (DCD), który wykazuje wysoką specyficzność i jest stabilny w minimum 7-dniowych plamach [28]. Z kolei dla skóry wytypowano korneodesmozynę (CDSN), lorykrynę (LOR), keratynę 9 (KRT9), które są stabilne w 6-miesięcznych odciskach palców [31]. Jako markery krwi kobiety ciężarnej może służyć laktogen łożyskowy (hPL) i gonadotropina kosmówkowa (β hCG), chociaż β hCG jest wykrywana tylko do połowy trzeciego trymestru ciąży. Istnieje możliwość, że analiza obu tych fragmentów jednocześnie może w przyszłości być przydatna do oceny stopnia zaawansowania ciąży [15].

Szczególnie istotnym problemem jest identyfikacja wydzieliny z dróg rodnych kobiety (w tym krwi miesięcz-

kowej) oraz nasienia pozbawionego plemników, gdyż dla tych płynów w ogóle nie ma swoistych, klasycznych metod identyfikacji. Rozbudowany o marker krwi menstruacyjnej multipleks *end-point* PCR Juusola i Ballantyne'a [22] powielający: HTN3, STATH (ślina), PBGD, SPTB (krew), PRM1, PRM2 (nasienie), HBD1, MUC4 (wydzielina dróg rodnych), MMP7 (krew miesięczkowa), został opisany przez Patel i Peel w 2008 r., które potwierdziły wysoką specyficzność tych markerów. W dużej mierze skupiły się one na możliwościach metody do identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych kobiety i krwi menstruacyjnej, stwierdzając duże różnice w poziomie ekspresji markerów dla tych płynów pomiędzy próbkami oraz brak korelacji pomiędzy ekspresją markerów a cyklem menstruacyjnym. Podczas gdy MUC4 jest dobrym markerem do detekcji wydzieliny z dróg rodnych, HBD1 może dawać wyniki fałszywie negatywne, a MMP7 może nie być wykrywany u osób stosujących antykoncepcję hormonalną [25]. Na tym problemie skupili się także Haas i in., którzy rozszerzyli powyższy multipleks o marker krwi miesięczkowej MMP11 oraz opisali drugą reakcję do wykrywania krwi, krwi miesięczkowej i wydzieliny z dróg rodnych, amplifikując markery: SPTB, PBGD, MMP7, MMP11, HBD1 i MUC4. W krwi miesięczkowej należy się spodziewać obecności markerów charakterystycznych dla wszystkich tych trzech płynów biologicznych, a metaloproteinazy 7 i 11 mogą być obecne w wydzielinie z dróg rodnych przez cały okres cyklu, lecz w największym stężeniu w dniach od 1 do 4 cyklu [18].

Kolejny opisany przez Fleming i in. multipleks *end-point* PCR to reakcja wykrywająca GlycoA (krew), MMP11 (krew miesięczkowa), HTN3 (ślina), STATH (ślina), PRM2 (plemniki), TGM4 (płyn nasienny) oraz TEF, G6PDH, UCE (geny *house-keeping*). Dzięki zastosowaniu markera specyficznego dla prostaty, a więc obecnego w płynie nasiennym, a nie w plemnikach, autorzy mogli identyfikować płyn nasienny już w śladach o objętości 1 μ l [13]. Ci sami autorzy do wykrywania wydzieliny z dróg rodnych zastosowali profilowanie RNA bakterii bytujących w drogach rodnych kobiet [14], odrzucając HBD1 i MUC4 ze względu na ich możliwe występowanie w ślinie [24, 27]. Stwierdzono, że regiony ISR (ang. intergenic spacer region) 16S–23S rRNA laseczek *Lactobacillus crispatus* i *Lactobacillus gasseri* są obecne w wydzielinie z dróg rodnych dziewcząt, kobiet w wieku rozrodczym i postmenopausalnym, a także kobiet po histerektonii i palaczek. Autorzy sugerują, że przyjmowanie antybiotyków także nie powinno wpływać na wynik testu, lecz ta teza wymaga dalszych badań. Primery bakteryjne zostały z powodzeniem włączone do wcześniej opisanego multipleksu, co stworzyło jedena-stopleks [14].

5. Rodzaje używanych genów referencyjnych

Oprócz analizy samych markerów istotna jest normalizacja i kontrola reakcji, do czego służą geny ulegające ekspresji we wszystkich tkankach (ang. house-keeping genes). W tym celu przy badaniu mRNA poszczególnych białek wykorzystywane są transkrypty: białka rybosomalnego S15, β -aktyny, GAPDH, TEF, UCE i 18SrRNA [6, 13, 21, 24], różnią się jednak one specyficznością oraz zmiennością poziomu ekspresji pomiędzy różnymi płynami biologicznymi. I tak, przy porównaniu ekspresji β -aktyny, GAPDH i S15 w różnych płynach biologicznych, okazuje się, że amplifikacja GAPDH wykazuje największą zmienność i najmniejszą czułość [29]. GAPDH może także nie być wykrywana w ślinie, w przeciwieństwie do 18S rRNA [18]. β -aktyna jest wskazywana jako najlepszy gen referencyjny spośród kilku często stosowanych (β -aktyna, GAPDH, B2M, PPIB, UBC) przez Visser i in. [31]. Podsumowując informacje o różnych mRNA genów referencyjnych dotychczas opisywanych w powyższych publikacjach, wydaje się, że S15 i β -aktyna są najbardziej obiecujące, a dla zwiększenia wiarygodności wyników powinno się amplifikować dwa, a nawet trzy różne geny kontrolne [29, 31].

6. Stabilność i czułość znanych markerów

Pomimo obiegowej teorii mówiącej o małej stabilności mRNA, markery mRNA wykrywano nawet w 15- i 16-letnich plamach biologicznych [7, 33], ale prawdopodobnie są to wyjątkowe sytuacje. W zależności od sekwencji mRNA, stabilność może różnić się i nie jest zupełnie jasne, czemu niektóre mRNA degradują się wolniej, a inne szybciej. Np. w 6-letnich plamach śliny i nasienia przechowywanych w suchym i ciemnym miejscu, STATH, PRM2, SEMG1 były wykrywane, ale HTN3 już nie [27]. Inni autorzy donoszą, że plamy przechowywane przez kilka lat w suchym, ciemnym miejscu nie wykazują spadku poziomu transkryptu [18, 27]. Z kolei ekspozycja próbek na różne warunki środowiska (deszcz, wilgotność, światło, promienie UV) powoduje szybką degradację RNA [27, 29]. Próbkę narażone na wpływ środowiska, ale chronione przed deszczem, dały wystarczającą ilość RNA do analizy maksymalnie po 7 dniach dla śliny i nasienia, 30 dniach dla krwi i 180 dniach dla wydzieliny z dróg rodnych. Ekspozycja na deszcz skróciła ten czas do 1 dnia dla śliny, 7 dni dla nasienia, 3 dni dla krwi i wydzieliny z dróg rodnych. PRM 2 nie była wykrywana już po 1 dniu [29].

Czułość profilowania mRNA za pomocą *end-point* PCR i PCR w czasie rzeczywistym jest porównywalna do czułości metod klasycznych [18, 19]. Transkrypty STATH, HTN3, PRM2 i SEMG1 wykrywano nawet w 0,1 μ l śliny i nasienia, co jest porównywalne z czułością

cią takich testów, jak RSID SALIVA i SERATEC PSA, jednak RSID SALIVA jest mniej czuły w przypadku starszych plam (6 lat) niż profilowanie mRNA [27]. Czułość multipleksów (minimalna ilość całkowitego RNA dodawana do reakcji odwrotnej transkrypcji) jest podobna do czułości multipleksów dla danych genów i może wahać się od 160 pg do 12 ng w zależności od markera [21, 22].

7. Specyficzność znanych markerów

Pomimo obiecujących wstępnych wyników dotyczących specyficzności markerów wymaga ona jeszcze pogłębionej analizy. Niektóre z markerów opisywanych jako specyficzne, po dalszej analizie okazały się dawać wyniki fałszywie pozytywne. Nie należy jednak mylić braku specyficzności z zanieczyszczeniem np. moczu nasieniem albo śliny i wydzieliny z dróg rodnych krwią, które może oczywiście wystąpić [17, 18]. Aby test mógł być uznany za w pełni specyficzny, musi dawać wynik pozytywny tylko w obecności ludzkiego płynu biologicznego. Badania specyficzności dla człowieka markerów obecnych w multiplesie opisywanym przez Fleming i in. wykazały, że wszystkie markery są specyficzne za wyjątkiem histatyny i stateryny, które były obecne również w ślinie orangutana [13]. Drugą zasadniczą kwestią jest specyficzność markera wśród ludzkich płynów biologicznych. Opisywane markery z reguły spełniają ten warunek, jednak z pewnością kwestię tę należy traktować ostrożnie, gdyż np. MUC4 i HBD1 (markery wydzieliny z dróg rodnych kobiety) mogą występować również w ślinie [24, 27].

8. Podsumowanie i perspektywy na przyszłość

Profilowanie mRNA jest obiecującą, nowoczesną techniką identyfikacji ludzkich płynów biologicznych. Wśród zalet tej metody, obok specyficzności i czułości, należy wymienić również łatwość analizy. Świadczy o niej fakt, że 15 z 16 laboratoriów biorących udział w projekcie organizowanym przez EDNAP (European DNA Profiling Group) było w stanie wyizolować i wykryć RNA z suchych plam krwi, pomimo że większość laboratoriów nie miała doświadczenia w analizie RNA [16].

W niedalekiej przyszłości profilowanie RNA może stać się popularną metodą stosowaną do identyfikacji płynów biologicznych, szczególnie w przypadkach mieszanin oraz płynów, dla których obecnie nie ma skutecznych metod identyfikacji. Wciąż opisuje się nowe markery, dzięki czemu ta dziedzina wiedzy nieustannie się rozwija. Ciekawą alternatywą dla mRNA jest zastosowanie markerów mikroRNA (miRNA) do identyfika-

cji płynów biologicznych. miRNA, służące w komórce do kontroli ekspresji genów, podobnie jak mRNA, mogą być tkankowo specyficzne, a ich długość rzędu 20–30 nukleotydów sprawia, że lepiej sprawdza się przy analizie zdegradowanego materiału [20, 34]. Choć obecnie profilowanie mRNA znajduje się w centrum zainteresowania genetyków sądowych, szukających nowych metod identyfikacji płynów biologicznych, przyszłość tej dziedziny może należeć właśnie do miRNA.