

MATERIA
Xenética Forense

unidade
didáctica
6

TITULACIÓN
Máster Universitario en Investigación Biomédica

Aplicación das novas tecnoloxías á xenética forense: a secuenciación masiva en paralelo

Jorge Ruiz Ramírez

Departamento de Ciencias Forenses, Anatomía Patolóxica,
Xinecoloxía e Obstetricia, e Pediatría
Facultade de Medicina

unidadesdidácticas
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





Esta obra atópase baixo unha licenza internacional Creative Commons BY-NC-ND 4.0. Calquera forma de reprodución, distribución, comunicación pública ou transformación desta obra non incluída na licenza Creative Commons BY-NC-ND 4.0 só pode ser realizada coa autorización expresa dos titulares, salvo excepción prevista pola lei. Pode acceder Vde. ao texto completo da licenza nesta ligazón: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.gl>

© Universidade de Santiago de Compostela, 2021

Deseño e maquetación

J. M. Gairí

Edita

Edicións USC

usc.gal/publicacions

DOI

<https://dx.doi.org/10.15304/9788419155252>

MATERIA: Xenética Forense

TITULACIÓN: Máster Universitario en Investigación Biomédica

PROGRAMA XERAL DO CURSO

Localización da presente unidade didáctica

Unidade I. A Xenética Forense: a pericia forense

Concepto de Xenética Forense

Tipos de pericias

Estrutura da pericia en España e noutros países do mundo

Estandarización e control de calidade. Acreditación de laboratorios

Unidade II. A Xenética Forense: os polimorfismos e a súa utilidade

Os polimorfismos humanos

Conceptos básicos de xenética

Os polimorfismos de ADN: Utilidade forense

Unidade III. Aplicación dos novos marcadores xenéticos á xenética forense: a predición de ancestralidade bio-xeográfica

Unidade IV. Aplicación dos novos marcadores xenéticos á xenética forense: a predición de características externas visibles

Unidade V. Aplicación dos novos marcadores xenéticos á xenética forense: a predición de idade biolóxica

Unidade VI. Aplicación das novas tecnoloxías á xenética forense: a secuenciación masiva en paralelo

Unidade VII. Análises de parentesco e criminalística

Investigación da paternidade e análise de vestixios biolóxicos de interese criminal

Conceptos básicos de estatística bayesiana

Valoración da proba de ADN

Comunicación e interpretación

ÍNDICE

CONTEXTUALIZACIÓN

- Presentación
- Xustificación

OBXECTIVOS

CONTIDOS

1. Introducción
2. Fluxo de traballo nun secuenciador de NGS
 - 2.1 Preparación das librarías de ADN
 - 2.2 Preparación do molde de secuenciación
 - 2.2.1 PCR en emulsión (*emulsion PCR*)
 - 2.2.2 PCR ponte (*bridge PCR*).
 - 2.3 Secuenciación
 - 2.3.1 Detección variacións de pH
 - 2.3.2 Detección mediante dNTPs marcados fluorescentemente
 - 2.3.3 Detección mediante o uso de nanoporos
 - 2.4 Análises dos datos do secuenciador
3. Aplicacións
4. Vantaxes e inconvenientes sobre as técnicas de electroforese capilar

METODOLOXÍA

- Sesión expositiva
- Sesións prácticas

AVALIACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

CONTEXTUALIZACIÓN

Presentación

A unidade didáctica “Aplicación das novas tecnoloxías á xenética forense: a secuenciación masiva en paralelo” pertence á materia optativa Xenética Forense (optativa, 3 ECTS), que se imparte no primeiro cuatrimestre do Máster Universitario en Investigación Biomédica da Universidade de Santiago de Compostela.

Nesta unidade didáctica, explicaranse os fundamentos dos secuenciadores de nova xeración e darase unha visión xeral aos alumnos do proceso de traballo e das súas aplicacións no ámbito da xenética forense. Estes contidos impartiranse nunha clase teórica e unha clase práctica.

Xustificación

O emprego das novas tecnoloxías de secuenciación no campo da xenética forense é unha tendencia que aumenta a cada ano, e cada vez hai máis laboratorios forenses que dispoñen dunha plataforma de secuenciación de nova xeración de xeito que o coñecemento, tanto do seu funcionamento e do fluxo de traballo, é imprescindible para poder traballar con este tipo de instrumentos.

O descubrimento de novos marcadores, non só para identificación, senón tamén para outras aplicacións, como a predición de ancestralidade e características físicas, fai que sexa necesario o traslado ás técnicas de secuenciación de nova xeración, xa que cada vez temos máis marcadores dispoñibles e a capacidade das técnicas de tipaxe mediante secuenciación capilar non é suficiente para acomodar paneis tan grandes. O funcionamento destas tecnoloxías difire en gran medida das técnicas tradicionais e require dunha formación específica para a comprensión das súas particularidades e para coñecer como se fai o procesamento dos datos.

OBXECTIVOS

Os obxectivos xerais (OX) que nos atopamos na materia de xenética forense que imos tratar nesta unidade didáctica son:

- **OX2:** Proporcionar as bases teórico conceptuais da xenética forense.
- **OX3:** Ensinar os métodos de tratamento de datos para a investigación en xenética-forense.
- **OX6:** Coñecer as aplicacións concretas da xenética forense.
- **OX7:** Manexar os programas de análises de datos xenético-forenses.
- **OX8:** Manexar a bibliografía apropiada.

Estes obxectivos están relacionados coas seguintes competencias xerais (CX) e as específicas (CE) do programa do Máster Universitario en Investigación Biomédica:

- **CX2:** Poder emitir xuízos sobre hipóteses, propostas experimentais ou experimentos xa realizados do campo da investigación biomédica, tanto sobre a validez científica como sobre aspectos éticos e sociais do axuizado.
- **CX4:** Ser capaz de comunicar as súas propostas, experimentos, resultados, conclusións e críticas tanto ante públicos especializados como non especializados.
- **CX5:** Posuír as habilidades de aprendizaxe necesarias para manterse ao día no campo da investigación biomédica e as súas técnicas de forma autónoma.
- **CE10:** Ser capaz de deseñar experimentos no campo da Biomedicina, aplicando as técnicas adecuadas para responder á pregunta pertinente.
- **CE11:** Desenvolver habilidade práctica no laboratorio de Biomedicina. Ser capaz de seguir un protocolo.

Nesta unidade defínense os seguintes obxectivos específicos (OE) que se abordarán ao longo do seu desenvolvemento:

- **OE1:** Comprender o funcionamento teórico dos distintos tipos de secuenciadores de secuenciación masiva en paralelo empregados noso campo (relacionado cós OX2 e OX8 e a CE7).
- **OE2:** Ser capaces de seguir o fluxo de traballo de un secuenciador MPS nos distintos tipos de tecnoloxías que existen (relacionado co OX2 e a CE11).
- **OE3:** Entender como se fai a análise dos datos e saber manexar os programas que se empregan para este fin (relacionado cós OX3 e OX7 e a CX5).
- **OE4:** Coñecer as limitacións deste tipo de técnicas en comparación coas tradicionais e saber en que casos deben ser aplicadas (relacionado co OX6 e as CX2 e CX4).

CONTIDOS

1. Introducción

As tecnoloxías de secuenciación masiva en paralelo (ou MPS, polas súas siglas en inglés), tamén coñecidas como tecnoloxías de nova xeración ou NGS (*next-generation sequencing*), recollen un conxunto de técnicas que, como o seu nome indica, permiten a secuenciación de millóns de moléculas de ADN de forma simultánea. A química empregada para a detección da secuencia é moi variada en función da casa comercial que fabrique o aparato: atopámonos desde secuenciadores que empregan desoxinucleótidos marcados fluorescentemente, como na secuenciación de Sanger, ata secuenciadores baseados na detección de interrupcións na corrente eléctrica que provoca o paso dunha cadea de ADN a través dun nanoporo.

Dentro das técnicas de secuenciación existen distintos métodos de secuenciación, que dependen basicamente de que partes do ADN se queren secuenciar. Noutros campos, emprégase máis a secuenciación de xenoma completo

(*whole genome sequencing*), por exemplo, para a ensamblaxe *de novo* do xenoma dunha nova especie; ou a secuenciación de exomas, moi empregada na clínica para a busca de variantes patóxicas. No caso da xenética forense, o principal tipo de secuenciación que se realiza é a secuenciación dirixida, onde unicamente se realiza a secuenciación de rexións específicas de ADN na que nos atopamos cos polimorfismos que queremos xenotipar (STRs, InDels, SNPs...).

Figura 1. Aparencia das principais plataformas de NGS en xenética forense



Fonte: Thermo Fisher Scientific, Illumina e Oxford Nanopore Technologies

2. Fluxo de traballo nun secuenciador de NGS

Aínda que o funcionamento das distintas plataformas sexa diferente, o proceso de secuenciación segue unha orde moi similar entre elas. A continuación, veremos cada un dos pasos deste fluxo de traballo común e a explicación sobre como se realiza nos principais tipos de secuenciadores.

2.1 Preparación das librarías de ADN

Na secuenciación dirixida, o primeiro paso consiste na preparación das librarías de ADN. A partir dun extracto de ADN faise unha PCR multiplex (unha reacción PCR onde se engaden varias parellas de cebadores para amplificar, ao mesmo tempo, multitude de rexións) para a amplificación dos loci onde se atopan as variantes que queremos xenotipar.

Estes produtos de PCR teñen que ser purificados e realízanselles normalmente modificacións, como a adición de secuencias adaptadoras, necesarias para o proceso de secuenciación, e de secuencias identificadoras. Estas últimas permiten secuenciar conxuntamente as librarías de distintas mostras.

2.2 Preparación do molde de secuenciación

O sinal que produce unha única molécula de ADN non sempre é suficiente para ser detectada nos secuenciadores. Por iso, é preciso obter múltiples copias dos fragmentos de librería a secuenciar nun molde que separe espacialmente os grupos de copias, para que o sinal sexa detectable inequivocamente.

Dúas das principais estratexias que empregan as plataformas son a PCR en emulsión, empregada nos secuenciadores da gama Ion Torrent de Thermo Fisher Scientific, e a PCR ponte dos secuenciadores de Illumina.

2.2.1 PCR en emulsión (*emulsion PCR*)

A PCR en emulsión consiste na amplificación das librerías na fase acuosa dunha mestura de dous líquidos inmiscibles. Esta mestura dá lugar á formación de gotas acuosas, onde están presentes todos os reactivos requiridos para facer a PCR (polimerase, dNTPs, *primers*...) e, ademais, nas que se introducen unha microesfera metálica e unha molécula de ADN da librería. As esferas conteñen na súa superficie unha serie de cebadores complementarios ás secuencias dos adaptadores das librerías, facendo de *primer* ou cebador para a súa copia. Desta forma, conseguimos que a molécula da librería se amplifique ó redor de toda a superficie da esfera.

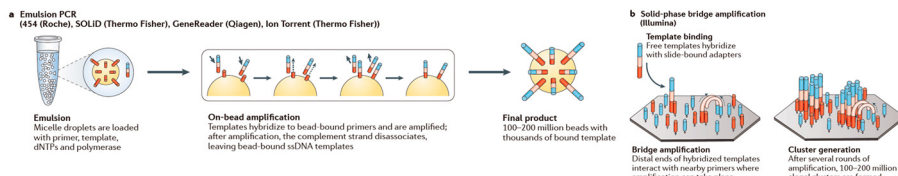
2.2.2 PCR ponte (*bridge PCR*).

A PCR ponte ten un funcionamento similar á PCR en emulsión, só que en lugar de facer a copia nas esferas, a amplificación faise ó longo da superficie da célula de fluxo ou *flow cell*, onde están os cebadores ancorados. Actualmente empréganse principalmente as células de fluxo con micropozos (*patterned flow cells*), onde en cada un deses pozos van formarse *clusters* de copias dunha única molécula.

A diferenza do caso anterior, os *primers* que hai na superficie son tanto *forward* como *reverse* (é dicir, son complementarios a ambos os extremos da molécula da librería). Isto permite que as moléculas, aínda que estean fixadas á superficie, poidan hibridar cos cebadores complementarios na superficie, formando unha “ponte”. Ademais serven á polimerase para comezar a síntese.

Cando termina a amplificación, escíndese a parte copiada no sentido *reverse*, deixando os cebadores libres e preparados para a secuenciación.

Figura 2. Ilustracións da PCR en emulsión e da PCR ponte



Fonte: adaptada de Goodwin et al. 2016

2.3 Secuenciación

A forma de secuenciar é a característica que máis varía entre as distintas plataformas. Nos instrumentos que se mencionan previamente, os de Thermo Fisher Scientific e Illumina, emprégase a estratexia de secuenciación por síntese, é dicir, que a secuencia se vai obtendo conforme se van sintetizando as cadeas. Ademais, veremos a metodoloxía de secuenciación dos instrumentos de Oxford Nanopore Technologies, que teñen unha aproximación moito máis distinta ás outras dúas plataformas.

2.3.1 Detección variacións de pH

Esta é a estratexia que empregan os instrumentos Ion Torrent. Tras a PCR de enriquecemento, as librarías son cargadas no chip, onde se vai levar a cabo a secuenciación. Cada microesfera (denominadas ISP ou *Ion Sphere™ Particle*) introdúcese en un micropozo do chip, que pode conter máis de 80 millóns deles. En cada un destes hai un sensor de tipo CMOS–ISFET capaz da detección dos cambios de pH no interior do pozo.

Durante a secuenciación, van engadíndose os nucleótidos secuencialmente ao medio e, en cada etapa, engádese unicamente un tipo de dNTP (A, C, T o G). A polimerase incorpóroa á nova cadea e, como consecuencia, libérase un protón, que dá lugar a unha variación do pH que é captada polo sensor. Desta forma, a máquina é capaz de detectar en que pozos se incorporou a base e pode traducilo na súa secuencia.

Pode ocorrer que na secuencia do molde haxa máis dun mesmo nucleótido seguido. Nese caso, incorporaranse varias bases á secuencia, o que dá lugar unha variación de pH máis intensa que será proporcional ó número de bases que se engadiron. Desta forma, o secuenciador pode saber cantos nucleótidos seguidos do mesmo tipo hai na secuencia.

2.3.2 Detección mediante dNTPs marcados fluorescentemente

Nos instrumentos de Illumina a química que se emprega aseméllase á do método de Sanger, xa que se usan dNTPs con fluoróforos que bloquean o extremo 3'OH. A diferenza do caso anterior, en cada etapa da secuenciación engádense os catro tipos de nucleótidos conxuntamente, pero soamente se unirá un único nucleótido a cada cadea a causa do bloqueo da molécula fluorescente. Tras iso, un sensor CCD captura o sinal emitido polos fluoróforos tras ser excitados, identificando que base se incorporou a cada secuencia e, a continuación, féndese o elemento que bloquea o extremo 3' do nucleótido. Este proceso repítese durante varios ciclos ata que se completa a síntese da cadea. Tras isto, cópanse a cadeas que se empregaron como molde no sentido *reverse*, e elimínanse as *forward* para facer a secuenciación da cadea no outro sentido.

2.3.3 Detección mediante o uso de nanoporos

Os secuenciadores desenvolvidos por *Oxford Nanopore Technologies* presentan unha química moi distinta ás vistas anteriormente. En lugar de empregar

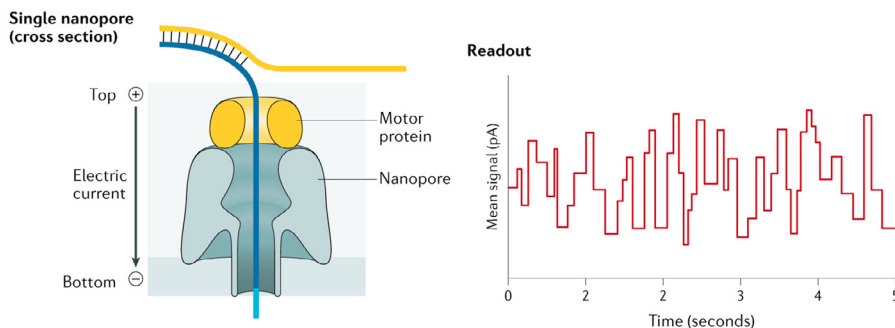
a estratexia de secuenciación por síntese, estes instrumentos baséanse no uso de nanoporos formados por a α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* nunha membrana sintética.

As moléculas das librarías únense dúas secuencias adaptadoras en cada extremo, ás cales hai ancorada unha proteína motora. A molécula é dirixida ao poro, onde a proteína motora separa as dúas cadeas de ADN e empurra (xunto coa corrente eléctrica) unha das cadeas a través do poro.

O paso da cadea de ADN xera unha interrupción da corrente que atravesa a membrana, e estas variacións son detectadas por un sensor de ciclodextrina unido ao nanoporo. As variacións de voltaxe que se producen non son as mesmas en todos os casos: a súa intensidade e duración dependen do tipo de nucleótido que atravesou a membrana e da cantidade do mesmo tipo que a atravesaron, respectivamente. É por iso que estas variacións poden traducirse na secuencia de nucleótidos da molécula.

Este tipo de secuenciación aínda non está nada implantada no campo pese a ter unhas características moi atractivas: as lecturas son máis longas, ten modelos portátiles (cun tamaño similar ao dunha memoria USB), os protocolos son máis sinxelos e é máis económico que o resto de plataformas. Pese a isto, ten un inconveniente moi importante: as lecturas de entre 10-100 kb teñen unha precisión de só o 87-89 %. Porén, espérase que co tempo tanto a mellora da tecnoloxía como das ferramentas bioinformáticas continúe diminuíndo a taxa de erro. De feito, na actualidade xa hai diversos estudos que reportan unha precisión do 99 %, polo que a súa implantación na xenética forense está cada vez máis cerca.

Figura 3. Ilustración do funcionamento da secuenciación a través de nanoporos



Fonte: adaptada de Logsdon et al. 2020

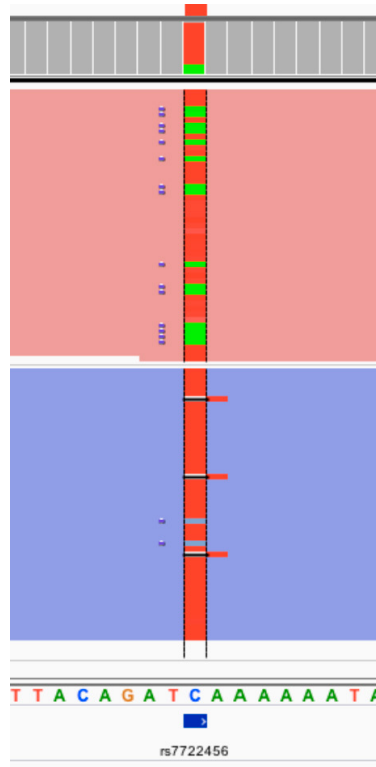
2.4 Análises dos datos do secuenciador

Aínda que os secuenciadores poden proporcionar os datos brutos do sinal que captan, practicamente sempre se traballa con arquivos FASTQ. Este tipo de ficheiros conteñen a secuencia de nucleótidos que resulta da interpretación que fai o aparato dos datos brutos, así como a calidade da lectura de cada unha das bases; é dicir, como de fiable é cada unha.

No obstante, estes arquivos aínda non son suficientes e precisan dunha análise bioinformática para obter os xenotipos. En primeiro lugar, ten que buscarse a que parte do xenoma corresponde cada lectura e, para isto, faise un aliñamento co xenoma. Con isto obtemos os denominados arquivos SAM/BAM (o BAM é a versión binaria/comprimida do SAM). No noso caso, non necesitamos toda a secuencia que aliñou, senón que queremos saber unicamente o xenotipo de determinadas posicións. Entón, proporcionamos ao programa unha lista de posicións (arquivos BED) e devólvemos unha lista xenotipos para as variantes que determinamos. Ademais, tamén nos pode achegar información adicional, como a cobertura (número de veces que leu esa posición), o número de veces que se atopou cada unha das bases, o número de veces que leu na dirección *forward* e na *reverse*...

Nalgúns casos o *software* do secuenciador pode proporcionar directamente o xenotipo das variantes e evítanos ter que facelo nós manualmente. Porén, hai ocasións onde a interpretación da máquina non é correcta e é precisa a inspección manual do aliñamento. Por exemplo, na figura 4 vemos un erro causado por un aliñamento incorrecto: o secuenciador identifica un nucleótido de máis nas lecturas *reverse* que no aliñamento se coloca na posición do SNP, identificándoo como un heterocigoto.

Figura 4. Captura en IGV dun error de aliñamento do secuenciador



3. Aplicacións

Como se menciona previamente, con este tipo de tecnoloxías pódese xenotipar todo tipo de variantes, como STRs, SNPs o InDels, tanto autosómicos como dos cromosomas sexuais, e pódese tamén secuenciar a rexión control do xenoma mitocondrial (ou incluso o seu xenoma completo).

A maior parte dos paneis dispoñibles actualmente son de SNPs, aínda que tamén temos kits comerciais só de STRs o que combinan STRs con SNPs, como os kits *Precision ID GlobalFiler™* de Thermo Fisher e *ForenSeq DNA Signature Prep Kit* de Verogen.

Aínda que os SNPs *per se* non son tan informativos como os STRs, a gran capacidade destas plataformas permite multiplexar unha cantidade tan grande de marcadores que poden alcanzar un poder de discriminación moito máis alto que os kits tradicionais de STRs e chegar a distinguir relacións de parentesco máis distantes. Ademais, como se explica nas unidades previas, os SNPs permiten inferir outro tipo de información, como a orixe bioxeográfica ou características físicas (cor de pel, ollos e pel, morfoloxía do rostro, patróns de calvicie...).

O emprego destas tecnoloxías permite tamén adoptar outros tipos marcadores, como os microhaplotipos: un conxunto de dous o máis SNPs que están tan cerca que se herdán de forma conxunta. Coas tecnoloxías de electroforese capilar non se pode facer a tipaxe correctamente dos microhaplotipos; pódense saber os xenotipos de cada SNP por separado pero non é posible saber que variante vai con cal (por exemplo, se temos un SNP 1 que é A/T e un SNP 2 que é C/G, non sabemos se o A vai na mesma cadea que o C o que o G). Estes marcadores presentan varias vantaxes sobre os SNPs e STRs, xa que poden presentar un maior número de alelos que os SNPs, o que lles confire un maior poder de discriminación; conservan o seu tamaño reducido de amplicón e non teñen *stutters*, o que os fai moi adecuados para a análise de mesturas de ADN.

4. Vantaxes e inconvenientes sobre as técnicas de electroforese capilar

As novas tecnoloxías de secuenciación presentan unha serie de vantaxes cando as comparamos coas técnicas de electroforese capilar (EC):

- **Obtemos a secuencia do ADN**, non só o seu tamaño. Isto permítenos observar variacións crípticas na secuencia de ADN no caso dos STRs. Aínda que dous alelos presenten o mesmo tamaño, a súa secuencia pode ser distinta e non poderíamos velo mediante técnicas de separación baseadas no tamaño da molécula de ADN.
- **Alta sensibilidade**. Pódense detectar cantidades moi baixiñas de ADN, chegando ata picogramos de ADN.
- **Gran capacidade de multiplex**. Mediante unha única reacción multiplex podemos amplificar unha enorme cantidade de marcadores distintos e incluso pódense combinar de distinto tipo (STRs e SNPs, por exemplo).

Aínda que tamén presentan unha serie de inconvenientes:

- **Protocolos máis longos e complexos.** A tipaxe de STRs pode levar unhas poucas horas, unicamente require a realización dunha PCR e da electroforese capilar. Porén, para a secuenciación mediante técnicas de NGS, o proceso de preparación das librarías pode levar máis dun día de traballo.
- **Custo.** O custo por mostra nos secuenciadores de MPS é moito máis elevado ca o dun secuenciador de EC. Ademais, para que o prezo non sexa excesivamente alto, é necesario xuntar unha cantidade importante de mostras que serán secuenciadas conxuntamente e, no noso ámbito, non sempre se pode agardar.
- **Estandarización.** As tecnoloxías de MPS aínda son relativamente novas non están ben asentadas, mentres que a tipaxe mediante EC xa está moi estandarizada e existen protocolos ben definidos para estas técnicas.

Como conclusión, aínda que as técnicas sexan moi prometedoras, hoxe en día non son a primeira opción e en moitas ocasións resérvanse a casos puntais onde os marcadores de tipaxe con EC non son o suficientemente informativos.

METODOLOXÍA

O contido desta unidade impartirase a través dunha sesión expositiva e unha sesión interactiva.

Sesión expositiva

O groso da teoría será explicado nunha lección maxistral, onde se utilizará unha presentación para expoñer os contidos, que ademais estará dispoñible para os alumnos a través da Aula Virtual. Tamén se empregarán recursos en liña, principalmente vídeos explicativos desenvolvidos polas propias casas comerciais, que ilustran dunha forma visual o funcionamento dos instrumentos dos que trata a unidade. O URL destes materiais facilitarase na presentación e na bibliografía.

Sesións prácticas

As clases prácticas realizaranse na aula cos ordenadores propios dos alumnos. Nestas clases aprenderán o manexo básico dos arquivos e a súa estrutura, como se interpretan e como se traballa normalmente con eles. Para isto, os alumnos partirán dos arquivos FASTQs (os arquivos de saída do secuenciador) e empregarán distintas ferramentas a través da consola de comandos para o procesamento dos datos (aliñamento, *variant calling*, revisión dos BAMs nun navegador xenómicos...) para finalmente chegar a unha lista coas variantes das mostras.

AVALIACIÓN

A avaliación dos contidos tratados nesta unidade didáctica realizarase en conxunto co resto de materia do curso:

- O 90 % da nota final será determinado a través do examen final, que consistirá na resposta de preguntas curtas. Nesta proba avaliaranse tanto os contidos impartidos nas clases, nas teóricas e nas prácticas, e a capacidade dos alumnos de aplicar e razoar empregando os coñecementos adquiridos.
- O restante 10 % será avaliado a través da participación activa dos alumnos e da realización das actividades propostas. Deste xeito, valorarase de forma positiva a formulación de preguntas e as intervencións pertinentes ao temario nas clases teóricas, así como a súa participación nas sesións prácticas e a resolución das cuestións que se formularán nelas.

BIBLIOGRAFÍA

- BØRSTING, C. & MORLING, N. 2015. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet*, 18, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.002>
- GOODWIN, S., MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17, 333-51. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- ILLUMINA. 2016. *Illumina Sequencing by Synthesis* [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8> [Accessed 2021].
- KASIANOWICZ, J. J., BRANDIN, E., BRANTON, D. & DEAMER, D. W. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13770-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770>
- KIDD, K. K., PAKSTIS, A. J., SPEED, W. C., LAGACE, R., CHANG, J., WOOTTON, S., HAIGH, E. & KIDD, J. R. 2014. Current sequencing technology makes microhaplotypes a powerful new type of genetic marker for forensics. *Forensic Sci Int Genet*, 12, 215-24. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.014>
- LOGSDON, G. A., VOLLGER, M. R. & EICHLER, E. E. 2020. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*, 21, 597-614. 10.1038/s41576-020-0236-x
- OLDONI, F., KIDD, K. K. & PODINI, D. 2019. Microhaplotypes in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet*, 38, 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.009>
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. 2020. *Ion Torrent Next-generation Sequencing* [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=zBPKj0mMcDg> [Accessed 2021].

VASILJEVIC, N., LIM, M., HUMBLE, E., SEAH, A., KRATZER, A., MORF, N. V., PROST, S. & OGDEN, R. 2021. Developmental validation of Oxford Nanopore Technology MinION sequence data and the NGSspeciesID bioinformatic pipeline for forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int Genet*, 53, 102493. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102493>



Unha colección orientada a editar materiais docentes de calidade e pensada para apoiar o traballo do profesorado e do alumnado de todas as materias e titulacións da universidade

unidadesdidácticas
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA