

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ADLI TIP ANABİLİM DALI

**10 STR LOKUSUNUN MULTİPLEKS ANALİZİ VE  
ÇUKUROVA POPÜLASYONUNDA ALLEL  
FREKANSLARININ SAPTANMASI**

Ayça ULUBAY

ADLI TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayşe SERİN

ADANA-2016

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ADLI TIP ANABİLİM DALI

**10 STR LOKUSUNUN MULTİPLEKS ANALİZİ VE  
ÇUKUROVA POPÜLASYONUNDA ALLEL  
FREKANSLARININ SAPTANMASI**

Ayça ULUBAY

ADLI TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayşe SERİN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2015-3655 Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2016

## **KABUL VE ONAY**

Adli Tıp Anabilim Dalı

Adli Tıp Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

### **“10 STR Lokusunun Multipleks Analizi ve Çukurova Popülasyonunda Allel Frekanslarının Saptanması”**

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tarihi:** / / 2016

#### **TEZ SINAV JÜRİSİ**

Prof. Dr. Mete K. GÜLMEN

Çukurova Üniversitesi

#### **Başkan**

Doç. Dr. Ayşe SERİN

Çukurova Üniversitesi

**Üye**

Doç. Dr. Dilek BATTAL

Mersin Üniversitesi

**Üye**

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun ..... tarih ve.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Tezimin oluşum ve çalışma aşamalarında bilgi ve deneyimleri ile desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe Serin'e,

Eğitim ve tez dönemim içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mete Korkut Gülmen ile ğretim yeleri Prof. Dr. Necmi ekin, Prof. Dr. Ahmet Hilal, Prof. Dr. Behnan Alper ve Doç. Dr. Nebile Dağlıoğlu'na,

Tezimin laboratuvar çalışması ve yazım aşamalarında bana her türlü anlayış ve sabrı gösteren, yardım ve teşviklerini esirgemeyen Dr. Biyolog Hüsniye Canan'a,

Bana daima destek olan sevgili aileme,

TYL-2015-3655 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ayça Ulubay

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Tarihçe .....	3
2.2. DNA'nın Genel Özellikleri ve Yapısı.....	4
2.3. Genom ve İnsan Genomunun Yapısı .....	4
2.4. Adli Analizlerde Kullanılan Polimorfizmler.....	5
2.5. STR Lokuslarının Genel Özellikleri .....	6
2.5.1. STR Lokuslarının Kromozomal Lokalizasyonuna Göre Adlandırılması.....	6
2.5.2. STR Lokuslarının Tekrar Yapılarına Göre Sınıflandırılması.....	7
2.5.3. STR Lokusu Allellerinin Adlandırılması .....	7
2.6. Adli Amaçlı Kullanılan STR Lokusları .....	8
2.7. Çalışmada Kullanılan STR Lokusları .....	10
2.8. STR Lokuslarının Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	12
2.8.1. DNA İzolasyonu .....	12
2.8.2. DNA Kantitasyonu.....	12
2.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	13
2.8.4. Elektroforez.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. Gereçler .....	17
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Örnekler .....	17
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	17
3.1.3. Deneylerde Kullanılan Plastik ve Diğer Malzemeler.....	17
3.1.4. Deneylerde Kullanılan Cihaz veya Gereçler.....	17
3.2. Yöntem.....	18

3.2.1. PCR .....	18
3.2.2. Kapiller Elektroforez.....	19
3.2.3. İstatistiksel Hesaplamalar.....	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA .....	23
6. SONUÇLAR .....	27
7. KAYNAKLAR .....	29
ÖZGEÇMİŞ .....	36



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 - Thermal Cycler.....	18
Şekil 2 - Kapiller Elektroforez Cihazı.....	19



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1- STR lokus setleri içeren ticari kitlerden bazıları.....	10
Tablo 2- Çalışmada kullanılan STR Lokusları.....	11
Tablo 3- Çukurova popülasyonunda 9 STR lokusunun 100 kişide saptanan allel frekans dağılım oranları .....	21
Tablo 4- 9 STR lokusunun Çukurova popülasyonu için adli etkinlik değerleri (n=100).....	22





## SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP-FLP: Amplification Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

CODIS: Combined DNA Index System (Birleşik DNA İndeks Sistemi)

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Dinükleotid trifosfat

EDNAP: European DNA Profiling Group (Avrupa DNA Profillendirme Grubu)

ENFSI: European Network of Forensic Science Institutes (Avrupa Adli Bilimler Enstitüsü Ağı)

ESS: European Standard Set (Avrupa Standart Seti)

FBI: Federal Bureau of Investigation (Federal Soruşturma Bürosu)

Mg<sup>+2</sup>: Magnezyum iyonu

ml: Mililitre

PCR: Polymerase Chain Reaction (Çoklu Zincir Reaksiyonu)

pH: Power of Hydrogen (Hidrojen gücü)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlandırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

STR: Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar)

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats (Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar)

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

## ÖZET

### 10 STR Lokusunun Multipleks Analizi ve Çukurova Popülasyonunda Allel Frekanslarının Saptanması

Kısa ardışık tekrarlar (Short Tandem Repeats = STRs) insan genomunda 2-6 baz çifti uzunluğunda baz bloklarının, birbirlerine baş-kuyruk olacak şekilde ardışık tekrarından oluşan DNA dizileridir. Ardışık tekrar sayılarının kişiden kişiye değişiklik göstermesi, PCR ile çoğaltılabilmeleri ve degrade DNA örneklerinde analiz edilebilmeleri, onları adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağımlı tespitlerde ideal belirteçler yapmaktadır.

STR lokuslarının kimliklendirme ve akrabalık ilişkileri tayininde kullanılabilmesi için öncelikle popülasyon çalışması yapılarak, ilgili popülasyonda allel frekans dağılım oranlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı 10 STR lokusunun (D10S1248, D1S1656, D2S1338, D22S1045, D19S433, TH01, D2S441, D6S1043, D12S391 ve AMEL) multipleks analizi ve bu lokusların Çukurova popülasyonunda allel frekanslarının araştırılması ve popülasyon verisinin ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Genetik Laboratuvarı'nda bir başka popülasyon çalışması kapsamında alınan örneklerden hazırlanan genomik DNA'lar kullanıldı. Bu kişiler, aralarında akrabalık bağı bulunmayan ve rastgele seçilen 100 gönüllü vericiden oluşmaktaydı. İzole örneklerin analizinde 10 STR lokusunu multipleks çoğaltmaya olanak tanıyan Verifiler Kit kullanıldı. PCR reaksiyonu sonrasında PCR ürünleri kapiller elektroforezde yürütüldü.

Çalışmada, 8 D10S1248 alleli (11-18), 16 D1S1656 alleli (8-21), 11 D2S1338 alleli (14-25), 9 D22S1045 alleli (10-18) , 11 D19S433 alleli (12-17.2), 6 TH01 alleli (6-10), 8 D2S441 alleli (10-16), 12 D6S1043 alleli (9-21) ve 14 D12S391 alleli (15-25) tanımlandı.

Çalışılan 9 sistemin allel frekans dağılımları Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu bulundu. Lokusların heterozigotluk oranı 0.50 ve 0.90 arasında olup, kombine eşleşme olasılığı  $1.7 \times 10^{-11}$ , kombine ayırım gücü 0.999999 ve kombine dışlama gücü 0.9998 olarak hesaplandı.

Çukurova yöresi için hesaplanan yüksek ayırım gücü nedeniyle, 9 STR sisteminin birlikte bu yörenin adli amaçlı analizlerinde kullanılacak geçerli genetik işaretler olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Adli DNA analizi, Çukurova popülasyonu, kimliklendirme, STR, paternite testi.

## ABSTRACT

### **Multiplex Analysis of 10 STR loci and Investigation of Allele Frequencies in Çukurova Population**

Short Tandem Repeats (STRs) are DNA sequences consist of 2-6 base pair length blocks that repeat like head and tail in human genome. Showing difference in tandem repeat number among individuals, being amplified by PCR and being analyzed in degraded DNA samples make them ideal markers in forensic individualization and kinship analysis.

In order to use STR loci in individualization and kinship analysis, first a population study must be done, and allele frequency distribution related to the population must be determined.

Purpose of this study is to carry out the multiplex analysis of 10 STR loci (D10S1248, D1S1656, D2S1338, D22S1045, D19S433, TH01, D2S441, D6S1043, D12S391 and AMEL) and to study allele frequencies of these loci in Çukurova population and detection of population data.

In this study, genomic DNAs prepared from samples which had been collected within the scope of another population study in Çukurova University Faculty of Medicine Forensic Medicine Department Forensic Genetics Laboratory were used. These people consisted of randomly chosen 100 volunteer individuals whom don't have a kinship. In analysis of isolated samples, Verifiler Kit which enables multiplex amplification of 10 STR loci was used. PCR products obtained after PCR reaction were conducted on capillary electrophoresis.

In the study, 8 D10S1248 allele (11-18), 16 D1S1656 allele (8-21), 11 D2S1338 allele (14-25), 9 D22S1045 allele (10-18), 11 D19S433 allele (12-17.2), 6 TH01 6 allele (6-10), 8 D2S441 allele (10-16), 12 D6S1043 allele (9-21) and 14 D12S391 allele (15-25) were determined.

Allele frequency distribution of 9 studied systems was found consonant with Hardy-Weinberg equilibrium. Heterozygosity ratio of loci was calculated as between 0.50 and 0.90, combined matching probability as  $1.7 \times 10^{-11}$ , combined discrimination power as 0.999999 and combined power of exclusion as 0.9998.

Due to high discrimination power that has been calculated for Çukurova region, it is believed that 9 STR systems together would be the valid genetic markers used in forensic analysis of this region.

**Key words:** Forensic DNA analysis, Çukurova population, identification, STR, paternity testing.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kimliklendirme, yaşayan veya ölü bir kişinin tanımlanmasına ve diğer kişilerden ayırt edilebilmesine yarayan özelliklerin tespiti için yapılan işlemdir. Adli bilimlerin temel uygulama alanlarından biri olan kimliklendirme, şüpheli ölüm, kitlesel felaket, kayıp kişi tespiti, soy bağı tayini, suçlu/suçsuz araştırması gibi çalışmalarda kullanılmaktadır<sup>1, 2</sup>.

Kan, semen ve diğer biyolojik vücut sıvıları ile bunlara ait lekelerden adli amaçlı kimlik tespiti çok uzun bir süredir yapılabilmektedir. Geçmişte bu amaçla ana kan grubu ve alt grupları, insan lökosit antijenleri, polimorfik proteinler ve enzimlerin immünolojik ve elektroforetik yöntemlerle analizi yapılmıştır<sup>3</sup>.

Günümüzde ise, doğrudan DNA teknolojisinden yararlanılmaktadır. DNA profillemesi veya tiplendirmesinin 1985'te Alec Jeffreys et al.<sup>1, 4</sup> tarafından ilk kez tanımlanmasının ardından, adli genetik alanında, insan orjinli biyolojik materyallerin kimliklendirmesinde oldukça etkili olduğu kanıtlanan, bilgilendirici ve güçlü DNA tiplendirme sistemleri geliştirilmiştir.

DNA analizi, doku tipi ayrımı yapmadan, herhangi bir dokudan (örneğin kan, kemik, saç, tükürük, semen, deri) yapılabilmektedir. Ayrıca, diğer belirteçlere (antijenler, polimorfik proteinler ve enzimler) göre degradasyona daha dirençli olmasının yanında, çok az miktardaki örneklerde analizinin yapılabilmesi ve kimliklendirme potansiyelinin çok yüksek olması sebepleri ile oldukça avantajlıdır. Günümüzde DNA analizi, kriminal çalışmalar ile kimliklendirmede adli genetik laboratuvarları tarafından kullanılan standart bir metot haline gelmiş olup, geleneksel testlerin tamamen gündemden kalkmasını sağlamıştır<sup>3</sup>.

Günümüz adli genetik laboratuvarlarında, kimliklendirme ve soy bağı tespiti çalışmalarında, DNA üzerinde bulunan ve yüksek polimorfizme sahip olan STR lokuslarının analizi yapılmaktadır<sup>5</sup>. STR lokuslarının kimliklendirme ve akrabalık ilişkileri tayininde kullanılabilmesi için öncelikle popülasyon çalışması yapılarak, ilgili popülasyonda allel frekans dağılım oranlarının belirlenmesi gerekmektedir. Böylece, istenilen kimliklendirme potansiyeline ulaşılabilmesi için ortalama kaç STR lokusunun

alışılması gerektiği ve istatistiksel hesaplamalarda yeterli ayırım gücüne ulaşılıp ulaşılamadığı belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada, kan ve yanak içi epitel hücrelerinden daha önce izole edilmiş olan genomik DNA'lardan 10 STR lokusunun multipleks amplifikasyonu yapılarak, ilgili lokusların kimliklendirme ve akrabalık ilişkileri tayininde kullanılabilmesi için allel frekanslarının saptanması ve Çukurova popülasyonu için bir veri tabanı oluşturulması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

20. yüzyılın başından itibaren DNA'nın ve adli bilimlerde DNA'nın kullanımının gelişimi hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. 1900 yılında Karl Landsteiner ABO kan grubu sistemini tanımlamış ve bireylerin kan gruplarına göre farklı gruplara yerleştirileceğini gözlemlemiştir<sup>6</sup>. 1915'te Leone Lattes, Karl Landsteiner'in tanımladığı ABO kan grubu sistemi ile bir babalık vakasını çözerek, genetik farklılıklar sonucu antijenlerin oluşturduğu ayırım gücünü hukukun kullanımına sunmuş ve böylece adli genetiğin temelleri atılmıştır. Bunu takiben, birçok kan grubu sistemi ile polimorfik serum proteini tanımlanmış ve bu belirteçler birlikte analiz edildiğinde yüksek ayırım gücü elde edilebilmiştir. Bu serolojik belirteçler hep birlikte kullanıldığında güçlü bir araç olmakla birlikte, çoğu adli olguda tüm belirteçlerin analizi için yeterli miktarda biyolojik materyal bulunmadığından ve/veya materyallerin olay yerinde yapıları bozulduğundan, etkinliği sınırlı kalmıştır<sup>1, 6</sup>.

Kişiler arasındaki farkların, adli amaçlı kimliklendirmede ulaşılmak istenen temel verilerden olması nedeniyle 1978 yılında DNA polimorfizminin tanımlanması, adli genetikte genetik materyalin bizzat kullanıldığı, DNA'ya dayalı kimliklendirme yaklaşımlarının da başlangıcını oluşturmuştur<sup>6</sup>. DNA polimorfizmi ilk yıllarda Southern tarafından tasarlanan Southern Blotlama tekniği ile saptanmış ve 1980 yılında ilk yüksek polimorfizme sahip lokus tespit edilmiştir. 1984 yılında Jeffreys, restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının spesifik DNA problemleri ile hibridizasyonu sonucu birey spesifik bant paternlerinin oluştuğunun keşfetmişlerdir. Oluşan birey spesifik bant paterni DNA parmak izi olarak adlandırılmıştır<sup>6-9</sup>.

Nakamura et al.<sup>10</sup> tarafından, 1987 yılında DNA parmak izinden farklı olarak, belirli bir lokusta bulunan ve ardışık tekrar eden DNA dizileri saptanmıştır. Birbirine baş-kuyruk oluşturacak şekilde ardışık tekrar eden bu dizilerin sayıları bireyler arasında değişiklik gösterdiği için, bu tekrarlar Değişen Sayıda Ardışık Tekrarlar (VNTRs-Variable Number of Tandem Repeats) olarak adlandırılmaktadır<sup>11</sup>. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile bu lokusların kan, semen, tükürük gibi biyolojik sıvılar ve bunlara ait lekeler ile dokuların kimliklendirmesinde kullanılabileceği görülmüştür<sup>12</sup>.

İlerleyen yıllarda, Karry Mullis tarafından geliştirilen PCR teknolojisi sayesinde, PCR ile çoğaltılabilen VNTR lokusları tanımlanmış ve bu lokuslara PCR ile çoğaltılabilmeleri nedeni ile AMP-FLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) denmiştir<sup>1</sup>. 1990'lı yılların başında, Edwards et al.<sup>13</sup> tarafından, AMP-FLP'lerden daha kısa parça uzunluk polimorfizmi oluşturan ve STR olarak isimlendirilen lokuslar tanımlanmıştır. Daha önce tanımlanan diğer lokuslara oranla, degrade örnekte PCR ile analizinin mümkün olması, az miktarda örnekte analiz edilebilmesi, yorumlama kolaylığı gibi üstünlükleri nedeniyle, biyolojik materyallerin kimliklendirilmesinde STR lokusları tercih edilmiştir<sup>14,15</sup>.

## **2.2. DNA'nın Genel Özellikleri ve Yapısı**

DNA, insanlar ve neredeyse diğer tüm organizmalarda bulunan kalıtım materyalidir. Bir insanın vücudundaki hemen hemen tüm hücreler aynı DNA'ya sahiptir.

İnsan DNA'sı 3 milyar bazdan meydana gelmektedir ve bu bazların %99'undan fazlası bütün insanlarda aynıdır. Bazların dizisi, organizmanın oluşturulması ve korunması için uygun bilgiyi kodlar. Hücrenin nükleusunda bulunan DNA, 23 çift kromozom içinde paketlenmiş halde bulunmaktadır<sup>1</sup>.

DNA'nın önemli bir özelliği, kendini kopyalayabilmesidir. İkili sarmaldaki her bir iplik, baz dizilerinin kopyalanması için model görevi görür. DNA, her bir iplik boyunca bulunan nükleotitlerin sırası veya dizisi boyunca bilgiyi kodlar. Organizmalar, farklı nükleotid dizilerine sahip DNA molekülleri taşımaları sebebi ile birbirlerinden ayrılır.

## **2.3. Genom ve İnsan Genomunun Yapısı**

Bir organizma DNA'sındaki bilginin tamamı genom olarak adlandırılır ve organizmanın sentezleyeceği bütün proteinlerin bilgisini taşır. DNA'nın %25'i genlerle ilgili bölge, %75'i ise genlerle ilgili olmayan bölge şeklinde sınıflandırılmaktadır. Genlerle ilgili olan %25'lik kısmın %1.5'i kodlayan bölge (ekzon) ve %23.5'i

kodlamayan bölge (intron) olarak ayrılmaktadır. Kodlayan bölgede insersiyon, delesyon ve eşit olmayan crossing over gibi çeşitli nedenlerle fenotipe de yansiyabilen bireysel farklılıklar oluşurken, kodlamayan bölgelerde de aynı nedenlerle polimorfizmler oluşmaktadır<sup>16</sup>.

#### **2.4. Adli Analizlerde Kullanılan Polimorfizmler**

Adli analizlerde, genom üzerinde bulunan yaygın 2 tip DNA polimorfizmi kullanılmaktadır:

**Tek nükleotit polimorfizmleri (SNP):** SNP'ler, genomik DNA'da tek baz çiftlik sekans farklılığı oluşturan ve popülasyondaki normal bireylerde frekansı %1 veya daha fazla olan nükleotit varyasyonlarıdır. SNP oluşum mekanizması oldukça basittir. SNP'ler, hücrede DNA replikasyonu esnasında polimeraz enzimlerinin yanlış nükleotit ilave etmesi, nükleotitlerin yer değiştirmesi veya delesyonları sonucu oluşabilmektedir. SNP'ler insan genomunda ortalama her 1000 baz çiftinde bir görülmektedir<sup>17-19</sup>. İnsan genomu 3.2 milyar baz çifti uzunluğunda olduğundan, her iki genom arasında bir milyondan fazla farklılık olacağı hesaplanmıştır. Bu oran insan genom varyasyonunun %85'ini oluşturmaktadır.

SNP'ler insan genomu üzerinde bialelik, trialelik ve tetraalelik formda bulunabilirler. Genom üzerinde en fazla bulunanlar bialelik SNP'lerdir. Onu sıra ile trialelik SNP'ler ve tetraalelik SNP'ler izlemektedir. Bialelik SNP'ler ile teorik olarak üç farklı genotip oluşmaktadır. SNP'lerin büyük çoğunluğunun bialelik olması, onlardan elde edilen bilginin sınırlı olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, SNP'lerin kimliklendirme esasına dayalı adli analizlerde uygulamaları sınırlıdır<sup>19, 20</sup>.

**Değişen Sayıda Ardışık Tekrarlar (VNTR):** Genomda belirli baz dizilerinden oluşan çekirdek ünitenin birbirlerine baş kuyruk olacak şekilde ardışık tekrarını içeren diziler bulunmaktadır. Ardışık olarak tekrar eden bu dizilerin sayıları kişiden kişiye değişiklik gösterdiği için, bireyler arasında uzunluk varyasyonu meydana gelmekte olup, bu tekrar dizileri adli amaçlı kimliklendirmede kullanılabilir. Uzunluk farkı



gösteren bu DNA bölgeleri VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) olarak adlandırılmaktadır<sup>6</sup>.

Mendel yasalarına göre kalıtılan VNTR lokusları, nükleotitlerde delesyon, insersiyon ve/veya eşit olmayan krosing-over sonucu oluşabilmektedir. VNTR'lerin tekrar dizilerinde bulunan çekirdek ünitenin baz sayısına göre alt sınıflandırması yapılmıştır. Çekirdek ünite 6 baz çiftinden fazla ise uzun ardışık tekrar ya da minisatellit, 2-6 baz çifti arasında ise Kısa Ardışık Tekrar (Short Tandem Repeat-STRs) ya da mikrosatellit olarak adlandırılmaktadır<sup>5</sup>.

## **2.5. STR Lokuslarının Genel Özellikleri**

STR lokusları, 2-6 baz çifti uzunluğundaki çekirdek ünitenin ardışık tekrarı ile, 100-400 baz çifti uzunluğunda baz dizilimi içeren bölgelerdir<sup>21-23</sup>. İnsan genomu boyunca her 6-10 kilo bazda bir bulunmaktadır<sup>13</sup>. Mutasyon oranları  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  civarındadır.

### **2.5.1. STR Lokuslarının Kromozomal Lokalizasyonuna Göre Adlandırılması**

STR lokuslarının isimlendirilmesi, lokusun genler arasında veya genlerden uzakta olan bir bölgede olmasına bağlı olarak değişiklik gösterir.

Gen bölgesi içinde bulunan STR lokusu, genin adını takiben kaçınıcı intronda ise o intron sayısının yazılması ile isimlendirilir. Örn: HumTHO1 lokusu. THO, Tirozin hidroksilaz genini ifade ederken, 1 rakamı bu lokusun Tirozin hidroksilaz geninin birinci intronunda bulunduğunu göstermektedir. Gen bölgesi dışında olan bir STR lokusunun isimlendirilmesi ise, dört aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk harf olan D; DNA'yı sembolize etmektedir. D harfinden sonra gelen rakam; lokusun hangi kromozomda yer aldığını göstermektedir. Üçüncü sıradaki harf S (Single); lokusun DNA dizisinde tek olduğunu ifade etmektedir. En sondaki sayı ise; lokusu o kromozomda bulunan diğer STR lokuslarından ayıran sayıdır. Örneğin; D10S1248 bu kurallara göre isimlendirilmiş bir lokustur<sup>24</sup>.

### 2.5.2. STR Lokuslarının Tekrar Yapılarına Göre Sınıflandırılması

STR lokusu allelleri, tekrar yapısına göre; basit, bileşik ve kompleks tekrarlar olmak üzere üç şekilde sınıflandırılmıştır. Basit tekrarlar; aynı uzunluk ve dizi birimleri, bileşik tekrarlar; iki veya daha fazla bitişik basit tekrarları, kompleks tekrarlar ise; az veya çok sayıda çeşitli, araya karışmış dizilerle birlikte, farklı birim uzunluğunda birçok tekrar blokları içerebilirler<sup>25-28</sup>.

Örnek:

Basit STR; **TH01**→ [AATG]<sub>7</sub>

Bileşik STR; **D12S391**→ [AGAT]<sub>11</sub> [AGAC]<sub>7</sub> [AGAT]

Kompleks STR; **D21S11**→ [TCTA]<sub>4</sub> [TCTG]<sub>6</sub> [TCTA]<sub>3</sub> TA [TCTA]<sub>3</sub> TCA  
[TCTA]<sub>2</sub> TCCATA [TCTA]<sub>9</sub>

Basit STR'ler, kolay standardizasyon ve düşük mutasyon oranları avantajına sahiptir. Kompleks STR'ler ise, çok değişken olma avantajına sahiptir. STR dizileri, tekrar birimi uzunluğunda, tekrar sayısında ve tekrar motifinde çeşitlilik göstermektedir<sup>26, 27</sup>.

### 2.5.3. STR Lokusu Allellerinin Adlandırılması

Allellerin adlandırılması ise, allelin içerdiği tekrar sayısına göre yapılmaktadır. Her allele tekrar adedini gösteren bir sayı verilmektedir. Tamamlanmamış tekrar içeren allellerde ise; baz sayısı, allel isminden sonra ondalık olarak eklenir<sup>26, 28</sup>.

Örnek: HumTHO1 lokusu

HumTHO1: [AATG]<sub>9</sub> = allel 9

HumTHO1: [AATG]<sub>6</sub>-ATG-[AATG]<sub>3</sub>= allel 9.3

## 2.6. Adli Amaçlı Kullanılan STR Lokusları

Genom üzerinde çok sayıda STR lokusunun varlığı bilinmektedir. Ancak, STR lokusunun adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağına tespit çalışmalarında kullanılabilmesi için bazı kriterler taşıması gerekmektedir. Belirlenen kriterler;

- Kullanılan lokusun ayırım gücünün %90'ın üzerinde ve gözlenen heterozigotluğun %70'in üzerinde olması,
- Alellerin tahmin edilen uzunluklarının 90-400 baz çifti arasında olması,
- Tanımlanma hassasiyeti yüksek olan lokusların seçilmesi,
- Mutasyon oranının düşük olması,
- Uygun olmayan çevre koşullarından toplanan biyolojik örneklerde sağlıklı sonuçlar alınabilmesi,
- Multipleks amplifikasyona olanak tanınmasıdır<sup>5</sup>.

Son 20 yılda, insan kimliklendirmesine uygulanmak üzere birtakım tetranükleotid STR'ler keşfedilmiştir<sup>27</sup>. Tetramerik STR lokusları, dimerik ve trimerik lokuslara oranla tanımlama sırasında daha az hata oranına sahip olması, jel üzerinde kolayca ayırt edilebilmesi ve amplifikasyon sonrası elektroforez aşamasında daha az artık ürün oluşumu sebebiyle tercih edilmektedir. Adli DNA tiplendirmesinde kullanılan otozomal STR lokusları, bağlantı dengesizliği ile ilgili oluşabilecek bir sorunu ortadan kaldırmak için ayrı kromozomlardan veya aynı kromozomda uzak bölgelerden seçilmektedir.

Multipleks STR analizi, modern DNA profillemesinin temelidir. Çeşitli suçların failinin tanımlanmasına yardımcı olmak için, ulusal ve uluslararası veri tabanı oluşturulmasında kullanılmak üzere standart STR lokus setleri tanımlanmıştır<sup>29-31</sup>. Zaman içinde bölgesel, ulusal ve uluslararası veri tabanlarının boyutları genişletilmiştir. DNA profillemesinin rolü ayrıca, veri tabanlarının ailesel araştırmalara dahil edilmesi için geliştirilmiş olup, akrabalık analizleri, mülteci, sığınmacı ve göçmen uygulamalarında da kullanılmak üzere, analiz edilen lokus sayısı arttırılmıştır. Bu artış, tesadüfi eşleşmelerin etkisini azaltmaktadır.

Genel olarak, STR'lerin ayırma gücü son derece yüksektir ve 13 STR lokusu çalışıldığında akraba olmayan iki bireyin aynı DNA profiline sahip olma olasılığı ortalama  $10^{-15}$  hesaplanmıştır<sup>32,33</sup>.

DNA tiplendirmesinde kullanılan lokusların, ulusal ve uluslararası alanda etkili olması için, standart bir set oluşturulması gerektiği düşünülmüştür. Bunun üzerine, Kasım 1997'de, FBI tarafından ABD'nin ulusal DNA veri tabanına yüklemek üzere, 13 STR lokusu içeren bir sete ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. ABD dahilindeki DNA eşleşmelerini sağlamak için CODIS veri tabanı tarafından seçilen 13 standart STR lokusu; CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 ve D21S11'dir<sup>34</sup>.

Nisan 2011'de, FBI Laboratuvarı ABD için standart 13 STR lokus setinin genişletilmesini önermiş ve eklenen lokuslarla birlikte toplam lokus sayısı 21 olmuştur. Bu 21 lokustan 19'u otozomal lokustur. Bunlar; CSF1PO, FGA, TH01, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D12S391, D1S1656, D2S441, D10S1248, D2S1338, D19S433 ve Penta E'dir. Kalan 2 tanesi ise gonozomal lokus olup, bunlar Amelogenin ve DYS391'dir<sup>27</sup>.

Avrupa'da ise, Avrupa Adli Bilimler Enstitüsü tarafından oluşturulan DNA çalışma grubu, 1999 yılında benzer şekilde bir toplantı gerçekleştirmiştir. Bu toplantıda 7 STR lokusundan (TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11 ve D3S1358) oluşan Avrupa Standart Seti (ESS)'ni, Avrupa'nın ulusal DNA veri tabanı olarak kullanmak üzere seçmiştir<sup>4,32</sup>. Seçilen lokuslar, Avrupa konseyi tarafından 2001 yılında onaylanmıştır. Avrupa Adli Bilimler Enstitüsü Ağı (ENFSI), Nisan 2009'da 7 STR lokusu içeren Avrupa Standart Set'e, 5 STR lokusu (D12S391, D1S1656, D2S441, D10S1248 ve D22S1045) eklemiştir<sup>35-37</sup>.

Firmalar, seçilen standart STR setleri ile uyumlu olacak şekilde, floresan işaretli primerler içeren multipleks STR setleri geliştirmiştir. Bunlardan bazıları Tablo 1'de gösterilmiştir<sup>29, 31, 32</sup>.

**Tablo 1-** STR lokus setleri içeren ticari kitlerden bazıları

Powerplex 16	Identifiler	Minifiler	ESX/ES117	NGM(Select)	SEfiler Plus	SGM Plus
TPOX	TPOX	-	-	-	-	-
CSF1PO	CSF1PO	CSF1PO	-	-	-	-
D5S818	D5S818	-	-	-	-	-
D7S820	D7S820	D7S820	-	-	-	-
D13S317	D13S317	D13S317	-	-	-	-
FGA	FGA	FGA	FGA	FGA	FGA	FGA
vWa	vWa	-	vWa	vWa	vWa	vWa
D3S1358	D3S1358	-	D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358
D8S1179	D8S1179	-	D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179
D18S51	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51
D21S11	D21S11	D21S11	D21S11	D21S11	D18S51	D18S51
THO1	THO1	-	THO1	THO1	THO1	THO1
D16S539	D16S539	D16S539	D16S539	D16S539	D16S539	D16S539
-	D2S1338	D2S1338	D2S1338	D2S1338	D2S1338	D2S1338
-	D19S433	-	D19S433	D19S433	D19S433	D19S433
-	-	-	D12S391	D12S391	-	-
-	-	-	D1S1656	D1S1656	-	-
-	-	-	D2S441	D2S441	-	-
-	-	-	D10S1248	D10S1248	-	-
-	-	-	D22S1045	D22S1045	-	-
-	-	-	SE33	SE33	SE33	-
Penta D	-	-	-	-	-	-
Penta E	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin

Adli DNA incelemelerinde kullanılmak üzere STR lokuslarının bulunduğu ticari kitlerde; allelik ladder, pozitif kontrol olarak genotipi bilinen kontrol genomik DNA, primer seti ile Master Mix (enzim, tuz, dNTP, taşıyıcı proteinler ve 0.05% sodyum azid) bulunmaktadır.

## 2.7. Çalışmada Kullanılan STR Lokusları

Soy bağı tayininde ayırım gücünün yeterli olmadığı ve mutasyonun olduğu durumlarda, sonuçların doğruluğunu ve kalitesini arttırmak üzere, zamanla ek bölgelere ihtiyaç duyulmuştur<sup>38, 39</sup>. Bu ihtiyaç neticesinde, ek bölgelerin bulunduğu ticari kitler oluşturulmuştur. İçerisinde 9 otozomal STR lokusu bulunan Verifiler Direct PCR Amplification Kit, bu ticari kitlerden biridir. Verifiler Direct Amplification Kit, ilk kez Kasım 2012’de sunulmuştur<sup>40</sup>. Yapılan değişiklikler sonucunda, Mart 2013’te son halini almıştır. Bu kit içerisindeki lokuslar; D10S1248, D1S1656, D2S1338, D22S1045,

D19S433, TH01, D2S441, D6S1043, D12S391 ve cinsiyet belirleyici belirteç Amelogenin'dir<sup>40, 41</sup>. Identifiler STR Kit'i içerisinde bulunan 3 otozomal STR lokusu (D2S1338, D19S433, TH01) ve cinsiyet belirleyici Amelogenin, örneklerin karışma olasılığını azaltmak üzere, kontrol amaçlı olarak Verifiler Kit içinde de bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan STR lokusları ve bazı özellikleri Tablo 2'de aktarılmıştır.

Multipleks lokusların analizinde, çok renkli boya teknolojisi kullanılmaktadır. Örtüşen lokuslar için alleller, farklı renkte boyaları olan lokus spesifik primerlerin etiketlenmesi ile ayırt edilebilmektedir<sup>42</sup>.

10 lokusun analiz edildiği Veriler KİT'te analiz için 5 farklı floresan boya bulunmaktadır. Bunların 4'ü, örnekleri işaretlemek için kullanılan 6-FAM™, VIC®, NED™ ve PET® boyalarıdır. 5. boya ise, internal uzunluk standardının işaretlenmesinde kullanılan LIZ'dir. Her bir floresan boya, farklı dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. En düşük dalga boyunda ışık yayan mavi renkteki 6-FAM™ boyasıdır. Bunu VIC® (yeşil), NED™ (sarı), PET® (kırmızı) ve LIZ® (turuncu) takip etmektedir<sup>40, 43</sup>.

F: Forward

R: Reverse

**Tablo 2-** Çalışmada kullanılan STR Lokusları<sup>25</sup>

STR Lokusu	Bulunduğu Kromozom	GenBankası Adlandırması	Tekrar Sıra
D10S1248	10q26.3	AL391869	[GGAA] <sub>13</sub> (F)
D1S1656	1q42	G07820	[TAGA] <sub>16</sub> [TAGG] [TG] <sub>5</sub> (R)
D2S1338	2q35	G08202	[TGCC] <sub>7</sub> [TTCC] <sub>13</sub> [GTCC] [TTCC] <sub>2</sub> (R)
D22S1045	22q12.3	AL022314	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub> (F)
D19S433	19q12	G08036	[AAGG] AAAG [AAGG] TAGG [AAGG] <sub>12</sub> (R)
TH01	11p15.5	D00269	[AATG] <sub>7</sub> (F)
D2S441	2p14	AC079112	[TCTA] <sub>12</sub> (F)
D6S1043	6q15	AL132766	[AGAT] <sub>12</sub> (R)
D12S391	12p13.2	AF076965.1	[AGAT] <sub>11</sub> [AGAC] <sub>7</sub> [AGAT] (F)

## **2.8. STR Lokuslarının Analizinde Kullanılan Yöntemler**

Günümüzde yaygın olarak kullanılan STR lokusu analiz yöntemleri 4 aşamada gerçekleştirilmektedir.

### **2.8.1. DNA İzolasyonu**

Bu aşamada amaç, hücre zarlarını yıkmak, proteinleri denatüre etmek ve sonrasında, denatüre proteinlerle diğer hücre içeriklerinin ortamdan uzaklaştırılarak DNA'nın açığa çıkarılmasını sağlamaktır. İzolasyon için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. En çok bilinen yöntemler; Fenol-kloroform izolasyonu, Silika bazlı izolasyon, Chelex izolasyonu ve FTA izolasyonudur<sup>44,45</sup>.

Bu çalışmada, Chelex izolasyonu yöntemi ile izole edilen DNA'lar kullanıldı. Bu yöntemde, Chelex reçinesi, metalik olmayan iyonların konsantrasyonunu değiştirmeden, DNazların koaktivatörü olan  $Mg^{+2}$  gibi metal iyonlarına bağlanarak, DNA'nın parçalanmasına engel olur<sup>44</sup>. İki aşamada gerçekleşen işlemin ilkinde; protein partiküllerinin reçineye bağlanması için, Chelex eklenen örnek karışımı, 56°C'de 20 dakika ısıtılır. İkinci aşamada ise, protein denatürasyonunun ve reçine ile daha sıkı bağlanarak çökmenin sağlanması için 99°C'de 8 dakika kaynatılır. Daha sonra, PCR amplifikasyonu aşamasına kadar +4°C'de saklanır.

### **2.8.2. DNA Kantitasyonu**

İzole edilen DNA'nın miktar ve kalitesini belirlemek için yapılan işlemdir. Az veya fazla miktarda DNA ile PCR aşamasının gerçekleştirilmesi, hiç DNA profili elde edilmemesine veya hakkında yorum yapılamayacak kadar bozuk bir DNA profili elde edilmesine yol açabilmektedir. Özellikle olay yerinden elde edilen örnekler çevresel koşullara bağlı olarak degrade olabileceği için, bu örneklerde kantitasyon büyük önem taşımaktadır. Çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; ultraviyole spektroskopi, floresan spektroskopi, jel bazlı analiz, slot blot analizi, real-time PCR bunlardan bazılarıdır<sup>46</sup>. Adli örneklerin miktar tayininde hassas kantitasyon yöntemlerine ihtiyaç

duyulur. Bu nedenle, floresan spektroskopisi ve jel bazlı analiz kullanımı sınırlıdır. Adli örneklerin miktar tayini için geçmişte slot blot analizi yaygın olarak kullanılsa da, günümüzde real-time PCR'a dayalı miktar tayini yapılmaktadır.

### 2.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilmiş olup, DNA içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir<sup>47</sup>. Mullis bu çalışmasıyla, 1993 yılında kimya alanında Nobel Ödülü'nü kazanmıştır<sup>3,5</sup>.

PCR için; kalıp DNA, çoğaltılacak bölgenin 5' veya 3' ucuna komplementer iki adet primer, dinükleotid trifosfatlar (dNTP), DNA polimerazın optimum aktivite ve stabilitesi için uygun pH ve iyon ( $Mg^{+2}$ ) konsantrasyonunu sağlayan tampon çözelti ile yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi gereklidir.

PCR üç aşamada gerçekleşir.

**Denatürasyon:** Çoğaltılacak olan DNA'nın, yüksek sıcaklıkta ikili zincirinin bozularak tek zincir haline getirilme aşamasıdır. İkili zincirin çözülüp tek zincir haline gelmesi 94-98°C'de yaklaşık olarak 5 dakikada gerçekleşir. Ayrılma sonrası tek zincir halindeki DNA, kalıp olarak kullanılır.

**Bağlanma (Annealing):** Tepkime sıcaklığı 50-65°C'ye düşürülerek tek zincirli kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması gerçekleşir. Primerin bağlanma sıcaklığı; baz dizisine, primer konsantrasyonuna ve iyonik tepkime ortamına bağlıdır.

**Uzama (Extension/Elongation):** 68-72°C'de gerçekleşen bu aşamada, DNA polimeraz enzimi tarafından, kalıp DNA zincirinin 5' ucundan 3' ucuna doğru dNTP'lerin eklenmesi ile yeni DNA ipliği meydana gelir. Bu üç aşama bir döngü kabul edilir ve döngü sayısı 20-35 defa tekrarlanabilmektedir<sup>6</sup>.

Döngü tamamlandıktan sonra uygulanan son uzama aşaması, zaman zaman uygulanan bir aşamadır. Kalan tek iplikli DNA var ise, onların uzaması için ürünler 70-74°C arasında bir süre bekletilir.



PCR teknolojisi, genetik hastalıkların tanısı, doku tiplendirme, bulaşıcı hastalıkların tanısı, kimliklendirme ve soy bağı tespiti gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>48</sup>.

#### **2.8.4. Elektroforez**

PCR ile çoğaltılan DNA parçalarının, uzunluklarına göre ayrımının yapıldığı aşamadır. Bu aşama için mevcut olan yöntemlerden bazıları; agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi ve kapiller jel elektroforezidir. Bu çalışmada, kapiller jel elektroforezinden yararlanıldı.

##### **2.8.4.1.Kapiller Jel Elektroforezi**

Adli DNA laboratuvarlarında STR alellerinin ayrımı ve tespiti için başlıca kullanılan metot, kapiller elektroforezdir. 1995 yılında tanıtılmasından itibaren, adli DNA laboratuvarlarında STR tiplendirme amacıyla kullanılan popüler bir metot olmuştur<sup>46, 49</sup>. Kapiller elektroforezde; dar bir cam kapiller, iki küçük tampon şişesi ve yüksek voltajda güç sağlayıcıya bağlı iki elektrot bulunmaktadır. Ayrıca, lazer ışık kaynağı, floresan detektörü, örnek tüpleri veya tablasını tutan bir otomatik numune alma cihazı ile örnek enjeksiyonu ve tespitini kontrol eden bir bilgisayar da bulunmaktadır.

Her bir örnek enjekte edilmeden önce, polimer solüsyonu ile kapiller doldurulur. Çoğu kapiller elektroforez sistemi, yüklenmiş moleküllerin örnekten kapillere hareketini sağlamak üzere yüksek voltajın uygulandığı elektrokinetik enjeksiyondan faydalanmaktadır. DNA negatif yüklü olduğu için pozitif voltaj DNA moleküllerini kapillere çekmektedir.

Örneğin tespiti, kapillerin sonuna yakın yerleştirilen lazer ile örnek enjeksiyonundan örnek tespitine olan süreç ölçülerek otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Lazer ışığı, kapillerdeki pencerenin içinde sabitlenmiş bir pozisyonda kapillerin üzerine gelmektedir. DNA parçaları, bu pencereden geçtikçe ışıklandırılmaktadır. Tespit noktasında daha küçük DNA parçaları ilk önce tespit

edilmektedir. Onları uzunluk ve baz çifti sayısı ile ilişkili olarak daha büyük olan DNA parçaları takip etmektedir. DNA'nın çoğaltılmış hedef bölgeleriyle birleştirilmiş olan PCR primerleri floresan boyaya bağlanmıştır. Çoğaltılan alleller, işaretlenmiş DNA molekülleri detektörü geçtikçe elektroferogram üzerinde pikler halinde ekranda görüntülenir. Görüntülenen bu pikler, daha önce cihaza kaydedilen standartlarla karşılaştırılır<sup>6</sup>.

Kapiller elektroforez, güvenilir veri sağlayan, çok az miktarda örnek gerektiren, küçük inorganik iyonlardan DNA makromoleküllerine kadar, analizi yapılacak olan maddeler için etkili bir ayırma tekniğidir. Yüksek etkinlik, kısa analiz süresi, çok yönlü çalışma gibi özelliklerinin yanı sıra, manuel veya yarı manuel tekniklerin otomasyonunu çalıştırma, değerli örnekleri saklama ile tehlikeli organik kimyasalların kullanımını en aza indirme ve klinik laboratuvarlar için güçlü bir yeni metodoloji oluşturma avantajları bulunmaktadır<sup>46</sup>.

Klinik amaçlar için de kullanılmakta olan kapiller elektroforezden, metabolik hastalıkların tespiti vasıtasıyla insan hastalıklarının teşhisinde ve vücut sıvılarında ilaçların görüntülenmesinde de yararlanılmaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte, geleneksel jel elektroforezi yöntemiyle analiz edilemeyen düşük moleküler ağırlıktaki maddelerin saptanması için uygun olmaktadır.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Aralarında akrabalık bağı bulunmayan ve rastgele seçilen 100 kişiye ait örneklerin kullanıldığı çalışmanın projesi için, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik Kurul No: 2014-35/ Karar No:10). Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Genetik Laboratuvarı'nda bir başka popülasyon çalışması kapsamında alınan örneklerden hazırlanan genomik DNA'lar kullanıldı. İzole DNA'larda, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D22S1045, D19S433, TH01 D2S441, D6S1043, D12S391 ve cinsiyet belirleyici AMEL STR lokuslarının Applied Biosystems GeneAmp PCR Systems 9700 PCR cihazı ile amplifikasyonu ve amplifikasyon sonrası 3130 Genetic Analyzer otomatik kapiller elektroforez cihazı ile elektroforezi yapıldı. İşlem sonrası oluşan pikler değerlendirildi.

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonunda TYL-2015-3655 nolu proje ile parasal destek alınmıştır.

### **3.1. Gereçler**

#### **3.1.1. Deneyleerde Kullanılan Örnekleer**

Çukurova Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı'na soy bağı tespiti için başvuran olgulardan, aralarında akrabalık bağı olmayan ve rastgele seçilen sağlıklı kişilerin parmaklarından alınan 3µl tam kan (33 kişi) veya yanak içinden alınan ağız içi sürüntü örnekleri (67 kişi) kullanıldı.

#### **3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- VeriFiler™ Direct PCR Amplification Kit
- Formamid: Applied Biosystems HiDi™ Formamide 25 ml
- GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard
- Su: Deiyonize, DNAaz, RNAaz free

#### **3.1.3. Deneyleerde Kullanılan Plastik ve Diğer Malzemeler**

- Tüpler: 0.2 ml'lik steril ependorf tüpler
- Pipet uçları: 10 ve 100 µl'lik. steril, otomatik pipet uçları
- Rack
- Buz kalıbı
- Filtre kağıdı: Whatman

#### **3.1.4. Deneyleerde Kullanılan Cihaz veya Gereçler**

- Mikropipet: 10 µl ve 100 µl hacminde mikropipetler
- Mikro Santrifüj: Hettich Universal 12F santrifüj
- Vorteks: Elektro-Mag M16
- Thermal Cycler cihazı: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- Kapiller Elektroforez cihazı: Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer
- Buzdolabı: Philco
- Derin dondurucu: Bosch

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. PCR

İzole DNA örneklerine Verifiler Direct PCR Amplification Kit protokolü uygulandı. PCR reaksiyonunda her bir örnek için;

<u>Kullanılan malzemeler</u>	<u>Miktar</u>
VeriFiler™ Direct Master Mix	2 µl
VeriFiler™ Direct Primer Set	1 µl
Distile su	3 µl
DNA	1 µl

0.2 ml'lik ependorflara hazırlandı ve tüpler Thermal Cyclers cihazına yerleştirildi (Şekil 1). Amplifikasyon için kullanılan PCR parametreleri:

Başlangıç inkübasyon aşaması: 95°C'de 11 dakika

Denatürasyon aşaması: 94°C'de 20 saniye

Bağlanma aşaması: 59°C'de 3 dakika

Son uzama aşaması: 60°C'de 15 dakika

En son bekleme aşaması: 4°C'de ∞

} 27 Döngü



Şekil 1 - Thermal Cyclers

### 3.2.2. Kapiller Elektforez

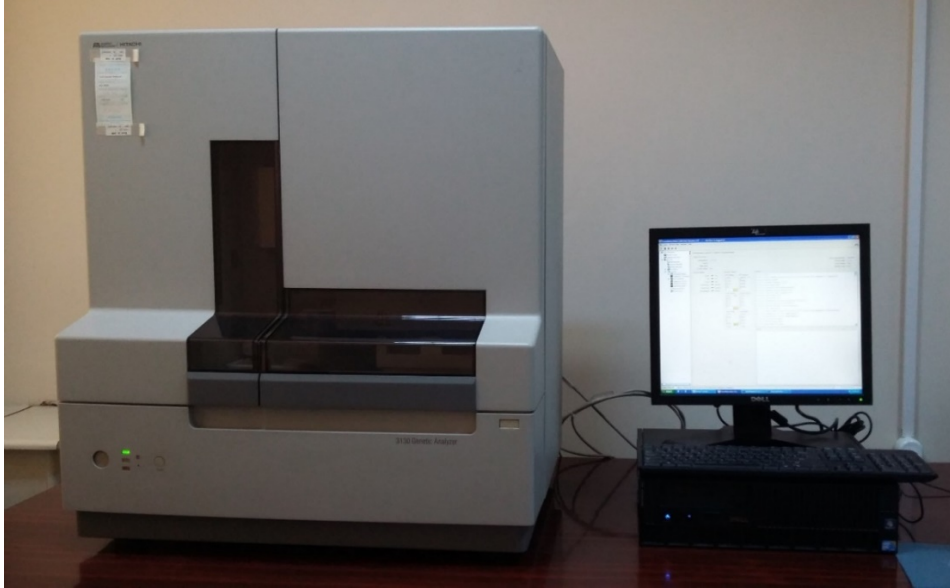
Thermal Cycler cihazında amplifiye edilen örnekler otomatik kapiller elektforez cihazında yürütüldü. Cihazda yürütülen her bir örnek için;

Hi-Di™ Formamide: 4.5 µl

GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard: 0.1 µl

DNA: 0.4 µl koyuldu.

Hazırlanan bu karışımlar plate'in uygun kuyucuklarına yerleştirildi. Ayrıca, analiz edilen örnekleri genotiplendirmek üzere 4.5 µl formamide ve 0.1 µl LIZ 500 ile 0.4 µl Allelik Ladder içeren bir başka karışım plate'in uygun kuyucuğuna koyuldu. Tüm örnekler kuyucuklara yerleştirildikten sonra, kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığına bakıldı. Eğer kabarcık varsa, kısa bir santrifüj yapılarak kabarcıklar giderildi. Plate elektforez cihazına yerleştirildikten sonra polimer seviyesi, tamponların ve suyun seviyesi, hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Elektforez sonrası sonuçlar GeneMapper ID v3.2 programı ile değerlendirildi (Şekil 2).



Şekil 2 - Kapiller Elektforez Cihazı

### 3.2.3. İstatistiksel Hesaplamalar

Genetik profilendirme sonuçlarının adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağı tespiti değerlendirmelerinde kullanılabilmesi için, allel frekanslarının ve lokusların adli etkinlik değerlerinin belirlenmesini sağlayan aşağıdaki istatistiksel hesaplamalar kullanılmıştır <sup>1, 50, 51, 52</sup>.

1. Allel frekansı

$$p = \frac{2X+Y}{2n}$$

X: Homozigot allel sayısı

Y: Heterozigot allel sayısı

n: Çalışmada kullanılan örnek sayısı

2. Heterozigotluk yüzdesi

$$H = \frac{\sum h}{n}$$

$\sum h$ : Örnek popülasyonunda tanımlanan toplam heterozigot kişi sayısı

n: Örnek popülasyondaki toplam kişi sayısı

3. Kimliklendirme potansiyeli (Eşleşme Olasılığı)

$$P_i = \sum x_i^2$$

$x_i$ : Polimorfik sistemde tanımlanan i kadar genotipin frekansı

4. Ayrım gücü

$$PD = 1 - \sum x_i^2$$

5. Bu istatistiksel hesaplamaların yapılmasında, PowerStats Program Version 1.2 kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

Tablo 3'te, 100 kişiye ait kan veya ağız içi epitel hücrelerinden izole edilen DNA'lardan 10 STR lokusunun multipleks PCR'ı sonrası, AMEL dışındaki 9 STR lokusunun allel frekans dağılım oranları gösterilmektedir.

**Tablo 3-** Çukurova popülasyonunda 9 STR lokusunun 100 kişide saptanan allel frekans dağılım oranları

Lokus	D10S1248	D1S1656	D2S1338	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D6S1043	D12S391
Allel									
6						28,5%			
7						20,0%			
8		0,5%				11,0%			
9						27,5%		0,5%	
9,3						12,0%			
10				0,5%		1,0%	14,5%	4,5%	
11	2,5%	12,0%		14,0%			28,0%	28,0%	
11,3							7,5%		
12	3,5%	10,5%		0,5%	10,5%		6,0%	29,0%	
13	20,0%	7,0%		0,5%	25,5%		3,0%	5,0%	
13,2					0,5%				
14	27,5%	4,0%	0,5%	5,5%	28,0%		35,0%	4,5%	
14,2					3,0%				
15	22,5%	15,0%		46,0%	12,5%		5,5%	1,0%	1,5%
15,2					11,0%				
15,3		5,0%							
16	15,0%	19,5%	1,5%	26,0%	5,5%		0,5%		1,5%
16,2					1,0%				
16,3		5,5%							
17	8,0%	5,0%	15,5%	6,0%	0,5%			1,0%	10,5%
17,2					2,0%				
17,3		9,0%							0,5%
18	1,0%	0,5%	13,0%	1,0%				9,5%	18,0%
18,3		5,0%							1,0%
19		0,5%	13,5%					10,0%	18,5%
19,3		0,5%							0,5%
20			15,0%					6,0%	12,5%
21		0,5%	0,5%					1,0%	12,0%
22			8,0%						8,0%
23			15,5%						8,5%
24			7,0%						6,0%
25			10,0%						1,0%



Tablo 4’de ise, ilgili lokusların Çukurova popülasyonu için adli etkinlik değerleri gösterilmektedir.

**Tablo 4-** 9 STR lokusunun Çukurova popülasyonu için adli etkinlik değerleri (n=100)

Lokus	D10S1248	D1S1656	D2S1338	D22S1045	D19S4333	TH01	D2S441	D6S1043	D12S391
Eşleşme Olasılığı	0,073	0,029	0,037	0,139	0,062	0,098	0,098	0,071	0,038
Ayrım Gücü	0,927	0,971	0,963	0,861	0,938	0,902	0,902	0,929	0,962
<b>Paternite</b>									
Dışlama Gücü	0,618	0,755	0,755	0,342	0,562	0,656	0,527	0,599	0,857
<b>Allel Frekansları</b>									
Homozigot	19,0%	12,0%	12,0%	36,0%	22,0%	17,0%	24,0%	20,0%	7,0%
Heterozigot	81,0%	88,0%	88,0%	64,0%	78,0%	83%	76%	80%	93%
Toplam Allel	200	200	200	200	200	200	200	200	200

## 5. TARTIŞMA

DNA teknolojilerinde meydana gelen gelişmelerin adli bilimlerde uygulanabilir olması; kimliklendirme ve soy bağı tespiti, miras davası, kitlesel felaket, kayıp kişilerin araştırılması, popülasyon genetiği, tıbbi teşhis gibi çalışmalara önemli katkılar sağlamıştır. Bunun yanında, bu gelişmelerden, cinayet, cinsel saldırı gibi suç teşkil eden durumların aydınlatılmasında da yararlanılmaktadır. Olay yerinden elde edilen biyolojik örnekler ve bunların bulunduğu yerler, suç ve suçla ilişkili kişiler hakkında bilgi sağlamaktadır<sup>12</sup>.

DNA analizinin dünyada adli amaçlı olarak ilk uygulaması, İngiltere’de 1983 ve 1986 yıllarında işlenen bir tecavüz ve cinayet davasının çözümüdür. Bu iki olayda, Alec Jeffreys tarafından şüpheli ve olay yeri örneklerinde DNA parmak izi yöntemi kullanılarak DNA profili ortaya çıkarılmıştır<sup>53, 54</sup>. Şüpheli ve olay yeri örneklerinden elde edilen DNA profilinin birebir eşleşmesi ile şüphelinin her iki olayın suçlusu olduğu bulunmuştur. Zaman içinde DNA teknolojisinin gelişmesi ile birlikte, RFLP tekniği ile VNTR lokuslarının ve PCR tekniği ile de STR lokuslarının kimliklendirme ve soy bağı tespiti amaçlı daha etkin olarak kullanılacak belirteçler olabileceği gösterilmiştir<sup>55, 56</sup>. Böylece, gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada daha objektif ve güvenilir sonuçlar elde edebilmenin yolu olan DNA’ya dayalı kimliklendirme ve soy bağı tespiti çalışmalarına geçiş süreci başlamıştır.

Ülkemizde, Yargıtay 2. Hukuk Dairesinin 27.05.1993 tarih ve 8685 esas, 9405 sayılı kararında, paternite araştırmalarında eritrosit antijenleri, polimorfik eritrosit enzimleri ve serum proteinlerinin çalışılması gerektiği; babalığın/anneliğin reddedilemediği durumlarda ve bu testlerle baba/anne olabirliğinin %99.73 oranına ulaşmadığı durumlarda, DNA analizleri dahil tüm çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Ülkemizde adli DNA analizinin ilk uygulaması ise 1993 yılında, İstanbul Üniversitesi’ne bağlı Deneysel Tıp Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Burada, HLA DQ alfa, LDLR, GC, GYPA, HBGG ve D7S8 lokuslarından oluşan 6 lokusun birlikte analizine izin veren ticari bir kit ile DNA analizi çalışmalarına başlanmıştır<sup>57</sup>.

STR lokuslarının keşfedildiği daha sonraki yıllarda ise, yapılan deneysel çalışmalar sonrası ticari olarak geliştirilen multipleks kitlerin kullanımı ile kimliklendirme ve soy bağı analizlerinde, geçmişte kullanılan tüm serolojik tanımlama metodolojilerinin yerini STR lokuslarının kullanıldığı DNA analizleri almıştır<sup>58, 59</sup>.

Günümüz adli DNA laboratuvarları, artık kimliklendirme ve soy bağı analizlerinin rutin uygulamalarında otozomal STR lokusları kullanmaktadır. Avrupa'da, Avrupa DNA Profilendirme Grubu (EDNAP), DNA analizleri ile babalığın veya anneliğin reddedilebilmesi için en az üç lokusta uyumsuzluk bulunması gerektiğini belirtmiştir<sup>60</sup>. Anne veya babalığın dışlanamadığı durumlarda ise, indeksin 10000 ve üzerinde olması gerektiği ifade edilmiştir<sup>61, 62</sup>. Ancak, yenilerde bu oranın da yeterli olamayacağını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

2015 yılında yapılan bir çalışmada<sup>63</sup>, kardeş iki baba adayı-anne ve çocuğun 15 STR lokusu ile yapılan karşılaştırmasında; her iki baba adayı ve çocuk arasında uyumsuzluk saptanmamış olup, babalık indeksi 10000'in üzerinde hesaplanmıştır. Ancak, ek sistemler çalışılarak iki kardeş baba adayından birinin babalığı dışlanabilmiştir. Yakın akrabalar arasında yapılan karşılaştırmalarda sıklıkla rastlanılan bu sorunlara, akraba olmayan kişiler arasında yapılan karşılaştırmalarda da rastlanılabilmektedir. Poetsch et al.<sup>64</sup> yaptığı bir çalışmada; 336 çocuk ve çocuklarla akrabalık ilişkisi olmayan 348 kişiyi bilgisayar programı ile karşılaştırarak (13-15 STR sistemi) 116004 çaprazlama yapmışlardır. Toplam çaprazlamada 322 çocukta baba adaylarından en az biriyle iki veya daha az sistemde uyumsuzluk saptandığı, 26 karşılaştırmada ise tam eşleşme saptandığı belirtilmiştir. Tam uyum gösteren 26 karşılaştırmaya anne dahil edildiğinde ise, 116004 çaprazlamanın 4'ünde babalığın dışlanamadığı belirtilmiştir.

Anabilim dalımızda 15 STR lokusu ile yaptığımız bir çalışmada da benzer bir durumla karşılaşmıştır<sup>65</sup>. Şüpheli baba ve çocuğun DNA profilleri karşılaştırıldığında bir lokusta mutasyon olabileceği düşünülen uyumsuzluk görülmüş, yapılan istatistiksel hesaplamada paternite indeksi 61623, paternite olasılığı %99.99 olarak bulunmuştur. İlave olarak çalışılan 6 lokusla beraber toplamda 21 STR lokusu ile oluşturulan DNA profilleri karşılaştırıldığında ise uyumsuz sistem sayısı üçe çıkmış ve babalık reddedilebilmiştir.

Bununla birlikte, 15 STR lokusuna ek olarak çalışılan ilave 6 lokusun, 10000'in üzerinde paternite indeksine ulaşmada yetersiz kaldığı durumların da görüldüğünü belirten çalışmalar da bulunmaktadır. 21 kişiden oluşan 10 ailede yapılan bir çalışmada, 15 STR lokusuna ilave olarak çalışılan 6 lokusla dahi 3 ailede paternite indeksinin 10000'in altında kaldığı bildirilmiştir<sup>66</sup>.

Almanya'da da paternite analizleri için 2012'de güncellenen Gen Tanı Yasası (Gendiagnostikgesetz) ile 2013 yılından itibaren olasılığın minimum %99.999 (indeks 100000 ve üzeri) oranına ulaşacak sayıda STR lokusu çalışılması gerektiği belirtilmiştir<sup>67</sup>.

Kimliklendirme ve soy bağının belirlenmesinde kullanılacak ilave STR lokuslarını belirlemek için popülasyon çalışması yapılması ve lokusların ilgili popülasyondaki allel frekans dağılım oranlarının hesaplanması gerekmektedir<sup>62</sup>. Olay yeri örneği ile şüpheli örneğin DNA profilleri eşleştğinde olay yeri örneğinin ne kadar olasılıkla şüpheliye ait olabileceğini veya şüpheli baba/anne ile çocuğun DNA profilleri eşleştğinde şüpheli baba veya annenin, baba/anne olma olasılığının toplumda bulunan herhangi bir erkek ya da kadından kaç kat daha olası olduğunu hesaplayabilmek için analizde kullanılan lokusların allel frekanslarının bilinmesi gerekmektedir. Daha az lokusla daha yüksek ayırım gücüne ulaşılabilmesi için seçilen lokusların ayırım gücünün %90'ın üzerinde olması istenmektedir<sup>68</sup>.

Çeşitli popülasyonlar arasında yapılan çalışmalarda, bu 9 STR lokusu için gözlenen ayırım gücü 0.78-0.96 arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir<sup>69-71</sup>. Bu çalışmada, 9 STR lokusunun ayırım gücü D22S1045 için 0.861'den, D1S1656 için 0.971'e kadar değişmektedir. Bu sonuca göre, kimliklendirme ve soy bağı tespiti için bildirilen en az %90 ayırt etme gücü oranının üzerine çıkıldığı görülmüştür.

D10S1248, D1S1656, D2S1338, D22S1045, D19S433, THO1, D2S441, D6S1043 ve D12S391'den oluşan 9 STR lokusunun kombine ayırım gücü ise %99.99'a ulaşmıştır.

Elde edilen sonuçlar, ayırım gücünün yeterli olmadığı durumlarda seçilen ek STR lokuslarının, kimliklendirme ve soy bağı analizleri için nitelikli sonuçlar sağlayabileceğini göstermiştir.

Bu nedenle soy bağını tespitine y6nelik olarak yapılan çalışmalarda ve 6zellikle de gerçek anne/baba olmayıp anne veya baba ile yakın akrabalığa sahip kişiler olduğu durumlarda, anne veya baba olabileceği y6n6nde hatalı sonuç verme olasılığına karşı, annelik/babalık indeksinin 100000 ve 6zerinde tutulması gerekmektedir. Bu bakımdan Anabilim Dalımız rutin uygulamalarda kullanılan 15 STR sistemine ek olarak kullanılabilir, 66 ortak bu dokuz (9) STR lokusu yanlış sonuç verme riskini 6nleyecektir.



## 6. SONUÇLAR

1. Çukurova yöresinde yaşayan 100 kişilik popülasyonda 9 STR lokusundan;

D10S1248 lokusunda 8 allel,  
D1S1656 lokusunda 16 allel,  
D2S1338 lokusunda 11 allel,  
D22S1045 lokusunda 9 allel  
D19S433 lokusunda 11 allel,  
THO1 lokusunda 6 allel,  
D2S441 lokusunda 8 allel,  
D6S1043 lokusunda 12 allel,  
D12S391 lokusunda 14 allel saptanmıştır.

2. Ladder içinde bulunmayan ancak bu popülasyonda görülen alleller D1S1656'da 21, D2S1338'de 14 ve D12S391'de 17,3 ile 18,3 alelleridir.

3. Çalışılan STR lokuslarının PD değerleri;

D10S1248	0.927
D1S1656	0.971
D2S1338	0.963
D22S1045	0.861
D19S433	0.938
THO1	0.902
D2S441	0.902
D6S1043	0.929
D12S391	0.962 olarak hesaplanmıştır.

4. 9 lokus için hesaplanan kombine eşleşme olasılığı  $1.7 \times 10^{-11}$ , kombine ayırım gücü 0.999999 ve kombine dışlama gücü 0.9998 hesaplanmıştır.

5. 9 lokusun da adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağını tespit çalışmalarında anlamlı olabileceği görölmüştür.
6. Bu çalışma ile oluşturulan popölasyon verileri Anabilim Dalımız Adli Genetik Laboratuvarı ve diğer Adli Genetik Laboratuvarlarında yapılacak istatistiksel hesaplamada kullanılabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. **Butler JM.** Fundamentals of forensic DNA typing. Amsterdam, Boston: Academic Press/Elsevier, **2010**.
2. **Jiang X, Guo F, Jia F, Jin P, Sun Z.** Development of a 20-locus fluorescent multiplex system as a valuable tool for national DNA database. *Forensic Science International Genetics*, **2013**; 7: 279-289.
3. **Carracedo A, Sanchez-Diz P.** Forensic DNA-typing technologies: a review. *Methods in Molecular Biology*, **2005**; 297: 1-12.
4. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **1985**; 314: 67-73.
5. **Butler JM.** Advanced topics in forensic DNA typing methodology. Waltham, MA, Elsevier/Academic Press, **2012**.
6. **Goodwin W, Linacre A, Hadi S.** An introduction to forensic genetics. Chichester, England, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, **2007**.
7. **Tamaki K, Jeffreys AJ.** Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, **2005**; 7: 244-250.
8. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, **1985**; 316: 76-79.
9. **Litt M, Luty JA.** A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet*, **1989**; 44: 397-401.
10. **Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kuhlman E et al.** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, **1987**; 235: 1616-1622.
11. **Kashyap VK, Sitalaximi T, Chattopadhyay P, Trivedi R.** DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *Int J Hum Genet*, **2004**; 4(1): 11-30.



12. **Kloosterman AD, Budowle B, Daselaar P.** PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, **1993**; 105: 257-264.
13. **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, **1991**; 49: 746-756.
14. **Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M.** Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applications*, **1993**; 3: 13-22.
15. **Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P.** Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *International Journal of Legal Medicine*, **1994**; 106: 302-311.
16. **Melez İE.** *Kan Lekesi Üzerinden Adli Genetiğe Giriş Olay Yerinden Laboratuvara.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2013**: 79-82.
17. **Hughes-Stamm S.** DNA Typing Methods for Highly Degraded Samples. PhD, Bond University, Australia, **2012**.
18. **Glover KA, Hansen MM, Lien S, Als TD, Hoyheim B, Skaala O.** A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BMC Genetics*, **2010**; 11(2): 1-12.
19. **Aitken N, Smith S, Schwarz C, Morin PA.** Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular Ecology*, **2004**; 13: 1423-1431.
20. **Rapley R, Whitehouse D.** *Molecular Forensics.* Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, **2007**.
21. **Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM.** STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*, **2001**; 29: 320-322.
22. **Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, Gill P.** The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *International Journal of Legal Medicine*, **1994**; 107: 77-89.

23. **Semizoğlu İ.** Adli DNA Analizleri. 1. Baskı., Ankara: Adalet Basım Yayım Dağıtım San ve Tic. Ltd. Őti, **2013**: 182.
24. **AŐıciođlu F.** X-Kromozomal STR Polimorfizmi (DXS8377, DXS101, DXS6789, STRX-1, HUMHPRTB) ve Trk Toplumundaki Alel Frekansları. Doktora, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, **2006**.
25. **Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, Butler JM.** STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Science International Genetics*, **2015**;18: 118-130.
26. **Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P.** Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*, **1994**; 107: 13-20.
27. **Butler JM, Hill CR.** Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Science Review*, **2012**; 24: 15-26.
28. **Altun A.** Çukurova Yöresinde HUMVWA Lokusu Allel Frekans Dağılımı. Doktora, Çukurova Üniversitesi, Adana, **1999**.
29. **Westen AA, Kraaijenbrink T, Robles de Medina EA, Hartevelde J, Willemse P, Zuniga SB, van der Gaag KJ, Weiler NE, Warnaar J, Kayser M et al.** Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Science International Genetics*, **2014**; 10: 55-63.
30. **Schumm JW, Gutierrez-Mateo C, Tan E, Selden R.** A 27-locus STR assay to meet all United States and European law enforcement agency standards. *Journal of Forensic Sciences*, **2013**; 58: 1584-1592.
31. **Hill CR, Kline MC, Duewer DL, Butler JM.** Concordance testing comparing STR multiplex kits with a standard data set. *Forensic Science International: Genetics*, **2011**; 3: 188-189.
32. **Westen AA, Haned H, Grol LJ, Hartevelde J, van der Gaag KJ, de Knijff P, Sijen T.** Combining results of forensic STR kits: HDplex validation including allelic association and linkage testing with NGM and Identifiler loci. *International Journal of Legal Medicine*, **2012**; 126: 781-789.
33. **Bogusz MJ.** Forensic science. Handbook of Analytical Separations. Amsterdam ; Boston: Elsevier, **2008**; 6: 1-100

34. **Guo F, Shen H, Tian H, Jin P, Jiang X.** Development of a 24-locus multiplex system to incorporate the core loci in the Combined DNA Index System (CODIS) and the European Standard Set (ESS). *Forensic Science International Genetics*, **2014**; 8: 44-54.
35. **Welch LA, Gill P, Phillips C, Ansell R, Morling N, Parson W, Palo JU, Bastisch I.** European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Science International Genetics*, **2012**; 6: 819-826.
36. **Melo F, Amorim A, Alves C.** Comparative performance between "next generation" multiplex systems and the new European Standard Set of STR markers in the Portuguese Population. *Forensic Science International Genetics*, **2014**; 8: 137-142.
37. **Jedrzejczyk M, Jacewicz R, Berent J.** Forensic evaluation of the AmpFI STR® NGM™ loci in Lodz region of Poland population sample. *Int J Legal Med*, **2013**; 127: 911–912.
38. **Francischini CW, Sumita DR, Whittle MR.** Development and use of a single-tube four dye, 21plex direct PCR autosomal STR loci amplification assay for human identification and relationship testing. *Forensic Science International: Genetics*, **2013**; 4: 264–265.
39. **Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM.** The evolution of DNA databases--recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International*, **2006**; 156: 242-244.
40. VeriFiler™ Direct PCR Amplification Kit. Life Technologies Corporation. Publication Number 4479552, **2013**.  
Erişim: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4479567?ICID=search-product>.  
Erişim tarihi: 25.07.2016.
41. Verifiler™ Direct PCR Amplification Kit for Paternity Testing. Life Technologies Corporation, Applied Markets – Human Identification, 850 Lincoln Centre Dr., Foster City, CA 94404, USA.  
Erişim:  
<https://www.promega.com/~media/files/resources/conference%20proceedings/ishi%2023/poster%20abstracts/78%20poster.pdf>. Erişim tarihi: 25.07.2016.
42. **Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR.** Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, **2004**; 25: 1397-1412.
43. **Butler JM.** Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, **2006**; 51: 253-265.

44. **Mi Y.** Comparison of Different DNA Extraction Methods for Forensic Samples. *Journal of Natural Sciences Research*, **2013**; 3, No.11.
45. **Sweet D, Lorente M, Valenzuela A, Lorente JA, Alvarez JC.** Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Science International*, **1996**; 83: 167-177.
46. **Thormann W, Molteni S, Caslavská J, Schmutz A.** Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **1994**; 15: 3-12.
47. **Boehnke M, Arnheim N, Li H, Collins FS.** Fine-structure genetic mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations. *American Journal of Human Genetics*, **1989**; 45: 21-32.
48. **Boehm CD.** Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clin Chem*, **1989**; 35 (9): 1843-1848.
49. **El-Alfy SH, Abd El-Hafez AF.** Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **2012**; 10: 101–112.
50. **Zhang S, Bian Y, Tian H, Wang Z, Hu Z, Li C.** Development and validation of a new STR 25-plex typing system. *Forensic Science International Genetics*, **2015**; 17: 61-69.
51. **Jones DA.** Blood samples: probability of discrimination. *Journal of Forensic Science Society*, **1972**; 12: 355-359.
52. **Brenner C, Morris J.** Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies, **1990**: 21-53. <http://dna-view.com/promeg89.htm>. Erişim: 12.07.2016.
53. **Aronson JD.** DNA fingerprinting on trial: the dramatic early history of a new forensic technique. *Endeavour*, **2005**; 29: 126-131.
54. **Jobling MA.** Curiosity in the genes: the DNA fingerprinting story. *Investigative Genetics*, **2013**; 4: 20.

55. **Budowle B, Baechtel FS, Giusti AM, Monson KL.** Applying highly polymorphic variable number of tandem repeats loci genetic markers to identity testing. *Clinical Biochemistry*, **1990**; 23: 287-293.
56. **Lareu V, Pestoni C, Phillips C, Barros F, Syndercombe Court D, Lincoln P, Carracedo A.** Normal and anomalous electrophoretic behavior of polymerase chain reaction-based DNA polymorphisms in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **1998**; 19: 1566-1572.
57. **Vural B, Atlioglu E, Kulusayin O, Togan I, Buyukdevrim S, Ozcelik T.** Turkish population data on the HLA-DO alpha, LDLR, GYPA, HBGG, D7s8, and GC loci. *International Journal of Legal Medicine*, **1998**; 111: 43-45.
58. **Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM.** Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *Journal of Forensic Sciences*, **1999**; 44: 1277-1286.
59. **Birus I, Marcikic M, Lauc D, Dzijan S, Lauc G.** How high should paternity index be for reliable identification of war victims by DNA typing? *Croatian Medical Journal*, **2006**; 44: 322-326.
60. **Cifuentes LO, Martinez EH, Acuna MP, Stat M, Jonquera HG.** Probability of Exclusion in Paternity Testing: Time to Reassess. *J Forensic Sci*, **2006**; 51/2: 349-350.
61. **Neuvonen AM, Palo JU, Hedman M, Sajantila A.** Discrimination power of Investigator DIPlex loci in Finnish and Somali populations. *Forensic Sci Int-Gen*, **2012**; 6: 99-102.
62. **Hallenberg C, Morling N.** A report of the 2000 and 2001 Paternity Testing Workshops of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics. *Forensic Science International*, **2002**; 129: 43-50.
63. **Dogan M, Kara U, Emre R, Fung WK, Canturk KM.** Two brothers' alleged paternity for a child: who is the father? *Mol Biol Rep*, **2015**; 42: 1025-1027.
64. **Poetsch M, Ludcke C, Repenning A, Fischer L, Malyusz V, Simeoni E, Lignitz E, Oehmichen M, von Wurmb-Schwark N.** The problem of single parent/child paternity analysis - Practical results involving 336 children and 348 unrelated men. *Forensic Science International*, **2006**; 159: 98-103.
65. **Canan H, Serin A, Ulubay A.** Bir Olgu Sunumu: Mutasyon mu Red mi?. 13. Adli Bilimler Kongresi. Bodrum. 27-30.04.2016.

66. **Somboonngern O, Rerkamnuaychoke B.** 21 STR loci for increasing paternity index and paternity probability. 3rd Forensic DNA Network of Thailand Conference; 28-29 November 2013; Faculty of Medicine Siriraj Hospital.  
Erişim: <http://forensic.sc.mahidol.ac.th/researchareas2013.php>. Erişim tarihi: 25.07.2016.
67. **Poetsch M, Preusse-Prange A, Schwark T, von Wurmb-Schwark N.** The new guidelines for paternity analysis in Germany-how many STR loci are necessary when investigating duo cases? *International Journal of Legal Medicine*, 2013; 127: 731-734.
68. **Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, Kimpton CP.** A new method of STR interpretation using inferential logic - Development of a criminal intelligence database. *International Journal of Legal Medicine*, 1996; 109: 14-22.
69. **Guo F, Shen HY, Tian HZ, Jin P, Jiang XH.** Development of a 24-locus multiplex system to incorporate the core loci in the Combined DNA Index System (CODIS) and the European Standard Set (ESS). *Forensic Sci Int-Gen*, 2014; 8: 44-54.
70. **Ramirez-Flores E, Saiz M, Villegas-Carmona D, Alvarez-Cubero MJ, Alvarez JC, Vega-Navarrete L.** Genetic variation of 24 STR loci in a Mexican Mestizo population from Mexico D.F. *Forensic Sci Int-Gen*, 2014; 10: 4-6.
71. **Rodriguez JJRB, Salvador JM, Calacal GC, Laude RP, De Ungria MCA.** Allele frequencies of 23 autosomal short tandem repeat loci in the Philippine population. *Legal Medicine*, 2015; 17: 295-297.

## ÖZGEÇMİŞ

Ayça Ulubay 1989 yılında İstanbul’da doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladıktan sonra, 2007-2011 yılları arasında Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünde okuyarak mezun oldu.

2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen TÜBİTAK destekli ‘Püberte Fizyolojisinde Görevli Yeni Genlerin Karakterizasyonu’ adlı projede çalışmaktadır.

