

GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLI TIP ANABİLİM DALI

DNA PARMAK İZİ YÖNTEMİ İLE KİŞİ FARKLILIKLARININ
GÖSTERİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aysun BARANSEL

Tez Danışmanı: Doç.Dr.H.Ergin DÜLGER

Gaziantep-2000

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

DNA PARMAK İZİ YÖNTEMİ İLE KİŞİ FARKLILIKLARININ
GÖSTERİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aysun BARANSEL

Tez Danışmanı: Doç.Dr.H.Ergin DÜLGER

Gaziantep-2000

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nükleik Asitler	3
2.1.1. Pirimidin Bazları	5
2.1.2. Pürin Bazları	5
2.1.3. Pentoz Şekerleri	6
2.1.4. Fosfat Molekülü	6
2.2. DNA Molekülünün Yapısı ve Tipleri	6
2.3. İnsan Genomu	8
2.3.1. İnsan Genomundaki DNA Sınıfları	8
2.3.2. Satelit (uydu) DNA	9
2.3.3. Gen Yapısı ve Organizasyonu	9
2.3.4. Genlerin Haritalanma Yöntemleri	10
2.3.4.1. Hüresel Metot	10
2.3.4.2. Moleküler Metot	11
2.4. Genetik Çeşitlilik ve Polimorfizm	11
2.4.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	11
2.4.2. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmi (VNTR)	13
2.4.3. Mikrosatellitler	13
2.4.4. Kısa Ardışık Tekrarlar (STR)	14

2.4.5. PCR'in Keşfi ve Kullanımı ile DNA Polimorfizminin Kısa Rastgele Tek Primerler Kullanılarak Gösterilmesi	14
2.4.5.1. PCR Elemanları	16
2.4.5.2. PCR'in Kullanım Alanları	16
2.4.5.3. PCR'in Kimlik Tanımlanmasında Kullanılması	17
2.5. Agaroz Ve Poliakrilamid Jel Elektroforezi	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kimyasal Maddeler	21
3.1.2. Çözeltiler	22
3.1.3. Araçlar	23
3.2. Metot	23
3.2.1. DNA İzolasyonu	23
3.2.2. PCR Protokolleri	24
3.2.2.1. PCR Protokolü 1	24
3.2.2.2. PCR Protokolü 2	24
3.2.2.3. PCR Protokolü 3	25
3.2.2.4. PCR Protokolü 4	26
3.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	38
7. ÖZET	39
8. İNGİLİZCE ÖZET	40
9. KAYNAKLAR	41

ÖNSÖZ

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda tez çalışmam esnasında başta Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Doç. Dr. H.Ergin DÜLGER'e tezimin hazırlanmasında gösterdiği, destek, titizlik ve özverinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam esnasında bilimsel katkı ve deneyimlerinden yararlandığım Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Şükrü AYNACIOĞLU'na, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Ahmet ARSLAN ve Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Osman ÇATALOLUK'a, bana tüm laboratuvar imkanını açan Farmakoloji Anabilim Dalı ekibine, Adli Tıp Anabilim Dalı sekreteri Nuray AĞAR'a, katkı ve desteklerinden dolayı sevgili aileme en içten saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez uzmanlık TF.99.03 kod no'lu proje olarak Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığı'nca desteklenmiştir.

KISALTMALAR

A	: Adenin
bp	: Basepair
C	: Sitozin
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DNTPs:	Deoksinükleotittirifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
G	: Guanin
kbp	: kilo basepair
M	: Molar
m	: Mili
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
RFLP	: Restricted Fragment Long Polimorfism
rpm	: Revolution per minute
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STR	: Short Tandem Repeat
T	: Timin
TAE	: Trisasetik asit
TBE	: Trisborik asit
TPE	: Trisfosforikasit
UV	: Ultraviole
VNTR	: Variable Number Tandem Repeat

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1.	İnsan Genomundaki DNA sınıfları	9
Şekil 1.	DNA'nın Watson Crick Modeli	5
Şekil 2.	Pürin ve Pirimidin Bazları Pentoz Şekeri Fosfat Molekölü	6
Şekil 3.	DNA'nın yapısı	7
Şekil 4.	PCR reaksiyon Şartları	
	4A) Örnekleler; 1a-4a, 1b-4b	28
	4B) Örnekleler; 5a-10a,5b-9b	28
	4C) Örnekleler; 10a-15a,10b-15b	29
Şekil 5.	PCR reaksiyon Şartları	
	5A) Örnekleler; 1-4	30
	5B) Örnekleler; 5a-8a; 5b-8b	30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Moleküler genetik, geçmişte başa çıkılamayan bazı problemlerin üstesinden gelmekte ve adli tıp da bu bilimsel gelişmelerden olumlu bir şekilde yararlanmaktadır. Bireylerin kimliklendirilmesi, şüpheli cinayetlerin aydınlatılması, ebeveyn/akrabalık tespiti, toplu kazalar veya postmortem vakalarda çözüme ulaşmada, yeni bir çığır açan kişiye özel DNA yapısını inceleme tekniği (DNA fingerprinting) bugün pratikte daha güçlü ve güvenilir bir teknik olarak kullanılmaktadır [1].

PCR'in (Polimerase Chain Reaction) klinik laboratuvarlara girmesi ile devamlı gelişme gösteren moleküler biyoloji teknikleri, bilimin sınırlarını zorlamıştır. Adli tıp son on yıl içinde DNA tiplendirme metodu ile tanıştırılmış, bu konuda kaydadeğer başarı ve tartışmalara yol açılmıştır [2]. Bu yöntemle, var olan çok küçük delillerden yararlanılabilecek çok önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bunların DNA parmak izi tekniğine yeni boyutlar kazandıracağı muhakkaktır. Diğer bir yandan, hayatın alfabetini oluşturan "A,G,T,C" nükleotidleri üzerine yapılan insan genom projesinin sonlanmış olması, belki de yakın bir gelecekte yanıtız soru bırakmayacaktır. Çünkü canlıyı oluşturan ana prensipler tek tiptir ve özgünlük bireyin genetik haritasını da özelleştirmektedir [2,3].

Bu çalışmada, birbiri ile akraba olmayan 135 kişinin alınan kan dokusundan elde edilen DNA'lar kullanıldı. Daha sonra bu kalıp DNA'lar rastgele seçilmiş nükleotid dizileri esas alınarak PCR tekniği ile hazırlanan primer ile çoğaltıldı.

Böylece her DNA, elde edilen PCR ürününe göre kimliklendirildi. Ayrıca aynı DNA farklı primerler ile de çoğaltılarak kişisel farklılıklar ortaya çıkarılmaya çalışıldı.

Bu temel üzerine yapılandırılan çalışmada amaç 2 ayrı primerin birey ayırımında kullanılabilirliğini test etmek ve PCR tamponlarındaki kimyasal madde ilavelerinin ve PCR'da ısı ayarlayıcının döngülerinin sonuçları olumlu yönde değiştirip değiştirmediğini araştırmaktır.

Ayrıca bu çalışma, rastgele seçilmiş primerler ve PCR tekniği ile bireysel kimliklendirme çalışmalarına sağladığı kolaylık ve kesinliği göstermesi bakımından da Üniversitemiz bünyesinde, adli tıp alanında DNA parmak izi tekniğinde yapılan ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

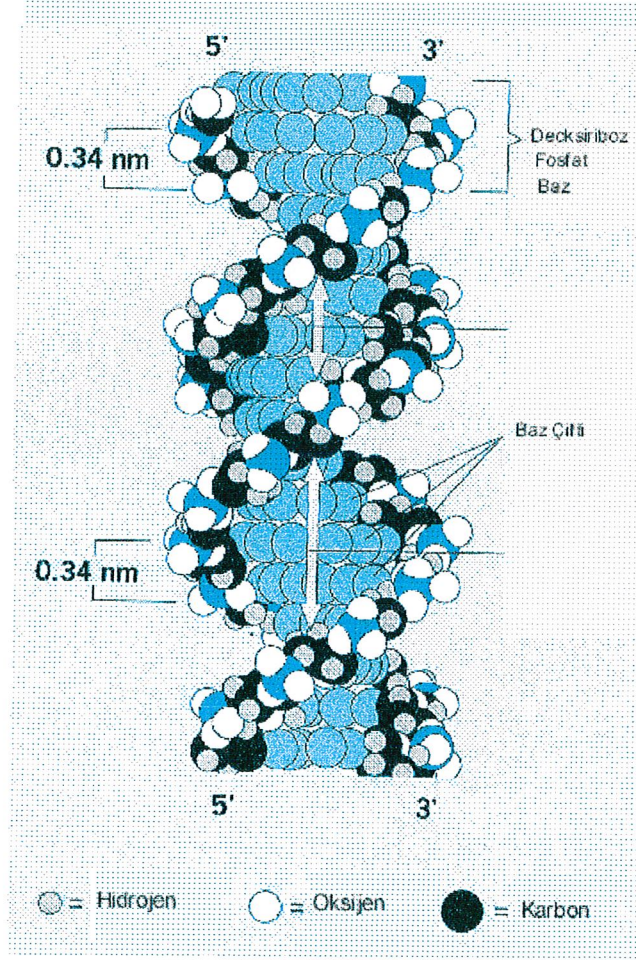
1977 yılında DNA teknolojisi kullanılarak, ilk insan proteininin sentezi gerçekleştirildikten hemen sonra 1985 yılında PCR "polimeraz zincir reaksiyonu" tekniği geliştirilmiştir. Takiben, 1993 yılında gen yapısının kesintisiz bir bütün değil, bölünmüş olduğu ve gen çalışma prensibi R.Roberts ve P.Sharp tarafından ortaya konmuştur [4].

2.1. Nükleik Asitler

1860 yılında F.Niescher hücre çekirdeğinden izole ettiği asit karakterli maddeye "nükleik asit" adını vermiştir [4]. DNA'nın görevini yapabilmesi yani protein sentez ve yapısını denetleyebilmesi için gerekli olan nükleik asitler deoksiribonükleik asitler (DNA) ve ribonükleik asitler (RNA) olarak ikiye ayrılır. Nükleik asitler, nükleozid monofosfatların (Nükleotidlerin) polimerleşmesinden oluşurlar. Her bir monomerik birim pürin veya pirimidin gibi azotlu bir baz, riboz veya deoksiriboz gibi bir pentoz şeker, ve şekere ester bağı ile bağlı bir fosfat grubundan meydana gelir. Bazın pentoz şekeri ile birleşmesi sonucu nükleozid, nükleozidin fosforlanması ile oldukça kompleks molekül olan nükleotid oluşur [5]. DNA'nın uzun bir polimerik olduğu gerçeği 1930'ların sonunda ilk defa açıkça anlaşılmıştır ve bu da DNA'nın gerekli genetik materyalin potansiyel değişebilirliğine sahip olduğunun farkedilebilmesine kılavuzluk etmiştir [1]. İnsan DNA'sı 3 milyar baz çiftinden oluşmaktadır ve her organizmanın her bir hücrelerindeki DNA miktarı sabittir [1,6]. 1947-1953 yıllarında Chargaff ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri sonuçlara göre DNA baz dizilimi türden türe değişiklik göstermektedir, bir türün muhtelif organlarından izole edilen DNA'lardaki baz dizilimi aynıdır, bir türün DNA'sındaki baz kapsamı o türün

yaşı, beslenmesi ve çevre değiştirmesi ile değişmez, devamlı sabittir. İncelenen hemen hemen bütün DNA'larda Adenin'in Timin'e (A=T), Sitozin'in ise Guanin'e eşit olduğu bulunmuştur. Birbirine yakın türlerden elde edilen DNA'ların baz diziliminin birbirine yakın, ve tür gelişim ve değişimi bakımından uzak olan türlerin DNA'larının baz kapsamının birbirine hiç benzemediği görülmüştür [5].

1953 yılında Watson ve Crick, Franklin ve Wilkins'in X ışını kırılma bulgularını kullanarak DNA'nın çift sarmal yapılı olduğunu öne sürmüşlerdir. Çift sarmalın çapının 20 nm olup, her 3.4 nm'de tam bir dönüş yapar. Her dönüş te 10 nükleotid çifte isabet ettiğine göre, her baz çiftin büyüklüğü 0.34 nm dir. Bazlar arasında orta eksene göre 36°C'lik bir açı vardır. DNA çift sarmalı sabit omurgada (dışa bakan tarafta) herbiri suyu seven (hidrofilik) deoksiriboz şekeri ve fosfatlar, suyu sevmeyen (hidrofobik) pirimidin ve pürin baz çiftleri ise sarmalın iç yüzünde ana eksene dik olarak yerleşir. Zincirin nükleotid bağları bir sırada 5'-3' yönlü iken diğer sırada tam tersi 3'-5' yönündedir. Bu iki sırada pürin bazları yalnızca pirimidin bazları ile eşleşerek simetrik bir sarmal ortaya çıkar. Sarmalı oluşturan baz çiftleri kendi aralarındaki hidrojen bağla en üst enerji düzeyine çıkarak bağlanırlar. Böylece adenin yalnızca timin'le guanin yalnızca sitozinle çift yapar. Bir başka deyişle, A=T, C=G'ne ve yine A+G=T+G'ne eşittir. Ancak (A+T)/(C+G) oranı farklı olup, bu oran türlere göre değişiklik göstermektedir [4,5,7]. Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerden daha büyük ve daha çok DNA molekülü içermektedir. Virüs, bakteri ve insanların dahil olduğu çok hücreli canlılardaki DNA molekülünün ihtiva ettiği baz çifti sayısı ve uzunluğu çok değişkenlik göstermektedir. İnsan genomunda GC oranı AT oranına göre daha düşüktür [5]. DNA çift sarmalının en önemli özelliği bazlar arasındaki eşleşmenin sadece kendine özgü oluşudur [4].



Şekil 1: DNA'nın Watson Crick Modeli

2.1.1 Primidin Bazları

Yapılarında 2 azot (N) ve 4 karbon bulunan altıgen (siklik) halkaya sahip bileşiklerdir. Bunlardan timin ve sitozin DNA yapısında, urasil ve sitozin ise RNA yapısında yer almaktadır [1,5].

2.1.2 Pürin Bazları

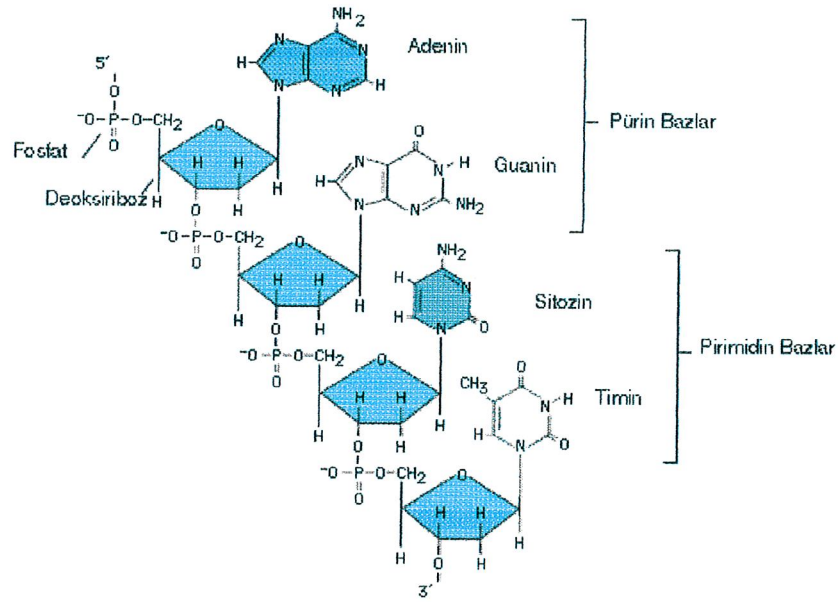
Altıgen pirimidin halkasına beşli bir imidazol halkasının bağlanması ile pürin bazlarının ana halka yapısı oluşur. Bunlar adenin ve guanin'dir. Ksantin, hipoksantin ve ürik asit ise daha az sıklıkla rastlanan diğer purin bazlarıdır [1,5].

2.1.3. Pentoz Şekerleri

Nükleik asitlerin omurgası boyunca DNA'da deoksiriboz, RNA'da ise riboz şekeri bulunur. Her iki şeker arasındaki fark 2 nolu karbona bağlı hidroksil (-OH) grubundaki oksijenin deoksiriboz şekerinde bulunmamasıdır. Her iki şekerde 5'li bir furan halkasına sahiptir. Riboz veya deoksiriboz şekerlerinin pirimidin veya pürin bazlarına bağlanması ile nükleozidler meydana gelir [1,5].

2.1.4 Fosfat Molekülü

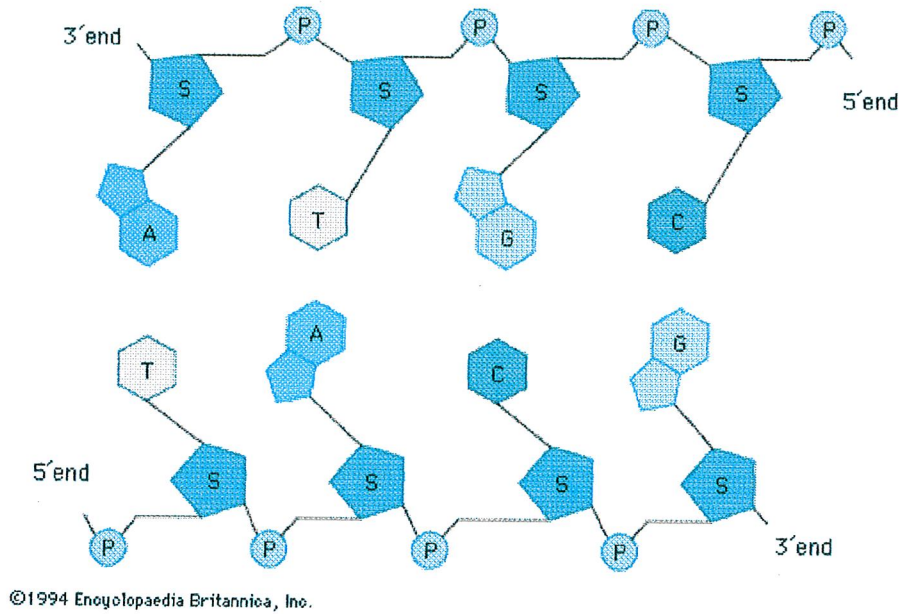
Nükleotidler, nükleozidlerin birer fosfat esterleridir ve deoksiribonükleotidlerin polimerize olması ile DNA, ribonükleotidlerin polimerize olması ile de RNA meydana gelir [1,5].



Şekil 2: Pürin ve Pirimidin Bazları Pentoz Şekeri Fosfat Molekülü

2.2. DNA Molekülünün Yapısı ve Tipleri

DNA bir polimerik nükleik asit makromolekülü olup nitrojen kapsayan bazlar, beş karbonlu şekerler ve fosfat grupları olarak 3 bölümden oluşmaktadır [4,8].



Şekil 3:DNA'nın Yapısı

Genel olarak, A-DNA, B-DNA ve Z-DNA olmak üzere üç tip DNA molekülü vardır. Bunlardan A-DNA ve B-DNA modellerinde sarmal sağa dönüşlü, fakat Z-DNA modelinde sola dönüşlüdür [9].

A-DNA: DNA süspansiyon halinde iken ortamdan suyun uzaklaştırılması ile (dehidrasyon) veya %70-75 etanol içinde oluşmaktadır. Böyle ortamlarda DNA'da büzölmeler meydana geldiğinden, herbir dönüşe 10.7 baz çifti isabet eder. Sağa dönüşlü bir omurgaya sahip olan bu tip DNA'da bazların birbirine uzaklığı 0.26 nm ve orta eksenine göre bazlar arasında 32.7° 'lik açı bulunmakta ve tam dönüş 2.8 nm kadardır. Bu sarmalın çapı 2.3 nm'dir. Biyolojik önemi bilinmemektedir [4].

B-DNA: Hücrede en yaygın bulunan DNA tipidir ve Watson-Crick tarafından önerilen DNA modeli de B-DNA tipindedir. Çift zincirin bir tam dönüşünde yapıda 10 baz bulunmaktadır [5,9].

Kimyasal olarak sentez edilen yapay DNA molekülleri ancak 1970'lerden sonra elde edilebilmiştir. DNA moleküllerinin solüsyon içindeki yapılarının kati olarak çözümü ise ancak bu tarihten sonra (1979) mümkün olmuştur ve bu DNA'ların büyük çoğunluğunun B-DNA formunda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır [5].

Z-DNA: Bazı organizmaların kromozomlarında bulunan Z-DNA'nın omurgasının yönü sola dönüşlü ve zigzag'dır [9]. Herbir dönüşte 12 baz çifti bulunur. Bazlar arası uzaklık 0.37 nm heliks çapı 1.8 nm'dir. Sentetik DNA fragmanı d(CGCGCG) sol dönüşlü bir heliks olarak kristalize olmaktadır. Biyolojik işlevi bilinmemektedir. Bazı spesifik proteinlerin DNA'daki G-C'den zengin bölgelere bağlanması ile B'den Z'ye dönüşebileceği düşünülmektedir [4].

2.3. İnsan Genomu

2.3.1. İnsan Genomundaki DNA Sınıfları

DNA'nın insan genomundaki organizasyonu çok karmaşıktır. Genomdaki DNA'nın % 10'dan az bir kısmı genleri oluşturmaktadır. Toplam lineer genom uzunluğunun yaklaşık dörtte üçlük bir bölümü tek kopya veya özgün olup genomda bir kez temsil edilmektedir. Geri kalan genomun hemen tamamı tekrarlayan DNA bölgelerinden oluşmaktadır. Genomda 50-100.000 genin tek kopya DNA olarak bulunduğu düşünülmektedir. Tekrarlayan DNA kısmının ise kromozom yapısının korunmasında rolü aldığı sanılmaktadır [4,5].

Tablo 1: İnsan genomundaki DNA sınıfları

DNA Tipi	Genomdaki Oranı	Özellikleri
Özgün DNA veya Tek kopya DNA	%75	a) Birçok geni kapsamaktadır. b) Tüm genoma dağılmıştır.
Tekrarlayan DNA		
I Dağınık	% 15	a) Genler ve diğer tek kopya DNA arasında dağılmıştır. b) İki ana aileden oluşur.(Alu ve L1) c) Tüm genoma dağılmıştır.
II Satellite	% 10	a) Yüksek tekrarlı diziler. b) Birçok aileden oluşurlar. c) Lokalizasyonları sentromer ve telomer gibi özel yerlerde dir.

2.3.2. Satellit (uydu) DNA'sı :

DNA'nın sezyum klorid, yoğunluk gradient santrifugasyonunda ana bazlar dışında üç ek bant meydana gelir. Bu bantlarda "CG" içeriği daha az olduğundan yoğunluğu da daha azdır. Bu diziler satellit DNA'sı adını alır. İnsan genom DNA'sının yaklaşık %10 kadarı satellit DNA'sıdır. Satellit DNA'sı belirli kromozomların sentromer ve telomerleri gibi özel yerlerde ileri derecede ve çok sayıda yer almaktadır. Ribozomal RNA ve tRNA'yı kodlayan bölgeler satellit DNA'sı içinde yer alır. Minisatellit, mikrosatellit ve makrosatellit olmak üzere 3 türü vardır [4].

2.3.3. Gen Yapısı ve Organizasyonu

Belirli bir baz dizi uzunluğundan meydana gelmiş, bir polipeptid zincirinin veya bir RNA zincirinin sentezinden sorumlu ve bu sentezleri düzenleyen

regülatör ve operatör bölge ihtiva eden kromozom üzerindeki DNA dizilerine gen denilmektedir [5].

İnsan hücresinde, ortalama büyüklüğü 5000 baz çiftinden daha az olan 30.000 ile 40.000 arasında farklı gen olduğu hesaplanmıştır [1]. Genlerin büyük bir bölümü, bir ya da birkaç kodlamayan bölgelerle bölünürler. Aminoasitleri kodlamak üzere şifrelenmiş nükleotid segmentine ekson, kodlama yapmayan kısımlara ise intron denir. İnsan genomunda DNA sekanslarının ancak %10'u protein kodladığı sanılmaktadır [4].

Genlerin birbirleri ile ve çevre ile etkileşimi çok önemlidir. İnsanda ilk gen nakil girişimi 1990'da ABD'de gerçekleştirilmiştir [6]. Bugün ise çalışmaları en az 2010 yılına kadar süreceği planlanan ancak 26.06.2000 tarihinde yapılan basın açıklaması ile umulandan erken bir zamanda insan genom şifresi açıklanarak, insandaki 23 çift kromozomun sahip olduğu baz dizisi açıklanmıştır.

2.3.4. Genlerin Haritalanma Yöntemleri

2.3.4.1. Hücresel Metod

İnsan gibi çok hücreli organizmaların uzun DNA'ları, az sayıda soyları vardır. Bu nedenle somatik hücrelerin bir kısmı hızlıca ve çok miktarda yeniden elde edilip incelenebilir. Belirli bir protein sentezleyen genin özel enzimiyle kesilip, taşıyıcı vektör ile alıcı hücreye transfer edilmesiyle, bu alıcı hücrenin gen açıklaması sağlanmış olur. Bu yöntemle genetik değişiklik ve defektin gösterilmesi mümkün olmuştur. Ancak bu yöntemle yalnızca gösterilebilen otozomal dominant genler, soy hakkında bilgi için yeterli değildir [10].

2.3.4.2. Moleküler Metod

Genlerin haritalanmasının temelinde, DNA'nın belli ve özel bölgelerinin kesilebilmesi yatar. Bu kesimi yapan enzimler genellikle bakteri kökenli olup "restriksiyon endonükleazlar" olarak isimlendirilir. Bakteriler bu enzimlerle yabancı

DNA'yı ya rastgele ya da özel bazı bölgelerinden keserek kendilerini viral veya başka infeksiyöz DNA'lardan korurlar. Restriksiyon endonükleazlarla 1970'li yıllardan beri genlerin fonksiyona bağlı olmadan detaylı haritalandırılmaları mümkün kılınmış ve gen eldesi, çoğaltılmaları ve değiştirmeleri yapılabilmektedir [4,11].

2.4. Genetik Çeşitlilik ve Polimorfizm

Her yeni zigotun anne ve babasında bulunmayan 100 yeni baz çiftine (bp) sahip olduğu düşünülmektedir. Bu değişimin çoğu kodlanmayan baz dizilerinde bulunur. Bu bazlardaki değişim yüksek derecede genetik çeşitliliğe ve bireysel özgüllüğe yol açmaktadır [1]. Kişi genotipini atasına borçlu olduğuna göre, toplumu meydana getiren genotiplerin, daha doğrusu genlerin çeşit ve frekansları önceki kuşaklar kadar olacağını kabul eden ve bunların sıklığını ortaya koyan yasaya Hardy-Weinberg yasası denir [12]. Bu yasaya göre belli toplumlar için bazı allellerinin frekanslarının istatistiksel olarak hesaplanmaları ile o alelin toplum için kimlik tesbitinde yüksek oranda güvenilirlik sağladığı gösterilmiştir [13]. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada birbiri ile ilişkisiz rastgele seçilmiş 157 Türk bireyinde "LDLR, GYPA, HBCG, D7S8 ve Gc lokuslarında allel ve genotip sıklığı araştırılmış ve sonuçlar Afrika, Amerika ve Kafkas popülasyonu ile karşılaştırılmıştır. Türk, Afrika ve Amerika popülasyonları arasında LDLR, HBCG ve Gc lokuslarında çok anlamlı farklılıklar görülmüştür [14].

2.4.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

İlk RFLP tanımı Kan ve Dozy tarafından 1978 yılında yayınlanmıştır. Beta globin geni çevresinde yer alan *Hpa* I enzimi kesim bölgesinden aynı enzimle kesilerek gösterilmek sureti ile RFLP klinik uygulamaya girmiştir [4].

Bir restriksiyon enzimi tanıma bölgesindeki kayıp ya da kazançtan dolayı RFLP'ler yer polimorfizmi (site polimorfizm) adını da almaktadır. Genellikle iki alternatif parça uzunluğuna sahip olan RFLP'lerin bu ikinci polimorfizmi farklı

kromozomlar üzerindeki iki tanıma bölgesi arasında tandem tekrarların sayısındaki değişkenlikle kendilerini gösterirler [15]. Genel olarak kullanılan DNA markerleri RFLP'dir [15,16].

DNA üzerinde hastalığa neden olmayan suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanan DNA polimorfizmi, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olursa, kolaylıkla saptanabilirler. DNA bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara "restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmi" denir [11]. Bugün için 400'den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır [17] ve bunların 100 kadar değişik tanıma bölgeleri bulunmaktadır. Bu enzimlerin herbiri DNA üzerindeki 4-8 baz çiftlik uzunluktaki özel bölgeleri (tanıma bölgesi) tanır ve bu bölgeden keserler. Kesilen parçaların uçları endonükleazın tipine göre künt ya da yapışkan olur [9].

RFLP analizinin temeli iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomun birbirinden ayırt edilmesine ve aile içinde daha önceden hangi kromozomunun mutasyona uğramış aleli taşıdığıнын bulunmasına ve risk guruplarının tesbitine dayanır. Eğer kişi RFLP için heterozigot ise, o takdirde birey bilgilendirici olarak tanımlanır. Böylece kromozomlarda, işaretlerin nesilden nesile geçmelerini incelemek mümkün hale gelir [4].

RFLP analizinde çok farklı teknikler kullanılmakla beraber başlıca iki temel teknik uygulanmaktadır. Bunlardan birisi Southern tekniği diğeri ise PCR tekniğidir [5]. Southern blot tekniği zahmetli ve yoğun uygulama ve analiz gerektirmektedir. Buna karşılık PCR ile yapılan polimorfizm analizi Southern blot ile yapılan polimorfizm analizinden daha duyarlı ve daha hızlı sonuç vermesi bakımından üstündür [9].

Genetik bağlantı haritalarının yapılması genetik varyantların kalıtsallığının örneklenmesini göstermektedir. Genetik haritalar için RFLP kullanılabilir. çünkü farklı büyüklüklerde fragman, kişilerde kalıtsaldır [11].

2.4.2. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmi (VNTR-Variable Number Tandem Repeats polymorphisms)

İki restriksiyon enzimi kesim noktası arasında bulunan ve ard arda (tandem) tekrarlayan (repeat) farklı sayıda (variable) DNA dizileridir. Bu diziler 2-60 nükleotid uzunluğunda olup, bir lokustaki alel sayısının 2-20 arasında değiştiği gözlenmiştir [4,17].

Ard arda tekrarlayan diziler (VNTR) ilk defa RFLP analizleri ile ortaya konmuştur. DNA profil çıkarılmasında kullanılan bu değişken bölgeler insan DNA'sının heterozigotluk seviyesinin fazlalığı ve alellerin sayısı hakkında oldukça fazla bilgi vermektedir [18]. Heterozigotluğun fazla oluşu bu dizilerin bir işaretleyici olarak kullanılmasını da sağlar [19]. Polimorfizmin kısa bir DNA dizisinin ardarda tekrarlama sayısına bağlı olduğundan pek çok kişi bir lokusta heterozigot olabilir [17]. Bazı VNTR lokuslarında 14 ile 500 tekrar sayısına ve 80'den fazla alele rastlanmıştır. Southern Blot tekniği ile radyoaktif materyale gerek duymadan D1S80 ve D17S30 VNTR lokusları ile yapılan ve oligonükleotid primerleri kullanılan DNA parmak izi PCR çalışmalarında, bireysel ayırt edicilik tespit edilmiştir [20]. Bu yöntem özellikle adli tıp uygulamalarında çok kullanılmaktadır [21].

2.4.3. Mikrosatellitler

Birçok ökaryotik genomda bulunan basit dizilerdir. Bunlar genellikle 100 bp'den daha kısa ve benzersiz dizi olduklarından kolaylıkla çoğaltılırlar ve klonlanması da kolaydır. 4-20 bp motifleri gösteren 400'ün üzerinde mikrosatellit tanımlanmıştır. Yapılan hesaplamalara göre; tüm insan genomunun hemen her 6 kbp'lik bir ortalama ile görülmesi halinde, toplam olarak 745 kbp'ini kapsamaktadır. İnsan tekrarlama motifleri A, AC, AAAN, AAN veya AG şeklindedir. AC tekrarları, hemen her 30 kbp'da bir oluşur ki; en sık kullanılan mikrosatellit tipidir [22]. Bu yöntemde öncelikle, seçilen genom bölgesi dizi vektörlerine sık kesen enzimlerle bağlanırlar (*Alu* I, *Rsa* I, *Hae* III) ve basit tekrar

oligonükleotidleri ile hibridize edilerek pozitif klonlar dizi analizine tabi tutulurlar [4,23].

Mikrosatelitler, kalıtım haritalarının çıkarılmasında, adli tıpta, babalık tesbitinde, kemik iliği transplant takibinde kullanılmaktadır [24,25].

2.4.4. Kısa Ardışık Tekrarlar (STR)

Kısa ardışık tekrar dizileri [Short Tandem Repeats (STR)] genetik kimliklendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [26–30]. İnsan genomunda bu tipte 2-7 bp'lik tekrarlar çok yaygındır [18,31]. STR lokusunda tekrar sayısındaki değişikliğe bağlı polimorfizm seviyesi yükselir [22]. Kısa ardışık 12 farklı tekrar lokusu ile 151 Kafkaslı'nın genotip ve allel sıklığının gösterildiği bir çalışmada bu yöntem, çok duyarlı ve ayırt edici bulunmuştur [31]. Polimorfik 4 STR lokusunun (HUMOSFIPO, HUMTPOX, HUMTHOI, HUMVWFA31, HUMF13AO1, HUMFESFPS, HUMBFXIII ve HUMLXPOL) PCR çoğaltım ürünleri, flüoresan verme niteliğine sahip çok yönlü STR sistemleri ile tekrar üretilebilen, adli kimlik ve diğer genetik analizler için çok uygun DNA profil metodunu oluşturmuştur [30].

2.4.5. PCR'in keşfi ve kullanımı ile DNA Polimorfizminin Kısa-Rastgele Tek Primerler Kullanılarak Gösterilmesi

Kary MULLIS'in buluşu olan ve kendisine 1993 yılında NOBEL ödülü kazandıran PCR, nükleik asitlerin in vitro çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. İlk kez 1985 yılında bilim dünyasına sunulan PCR hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığır açmıştır [4,32]. Hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu PCR ile tüp içinde taklit edilmektedir. 1990'lı yıllardan itibaren kısa, tamamen rastgele primerler kullanılarak, geniş bir tür çeşitliliğinden alınan genomik DNA'larda polimorfizm çalışmaları yapılmış ve soya özel genomik DNA yapısının polimorfik kıyaslamalarla tanımlanabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemle, DNA çoğaltım parmak izi (DNA Amplification Fingerprinting) veya diğer adı ile

rastgele primerlerle çoğaltılmış DNA (Random Amplification Polimorfic DNA) metodu denilmektedir [16,33,34].

Bu teknikle bir DNA hedefini 10^6 - 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır [4]. PCR tekniği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamakta, laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmaktadır, ayrıca radyoaktivite kullanımını da gereksiz hale gelmiştir [34].

PCR yöntemi ile DNA'nın çoğaltılması için karışımda, çoğaltılacak olan kalıp DNA, kalıp DNA'dan çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerleri, primerlere bağlanıp 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan ısıya dayanıklı DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle tris ve KCl), enzimin çalışması için gerekli kofaktör olan Mg^{++} iyonları yer almalıdır:

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde (devri-daim) tekrarlanması ile gerçekleştirilir. Denatürasyon $94^{\circ}C$ 'ye dek ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması. Annealing (yapışma), sıcaklığın düşürülmesi ile primerlerle çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan ve primerlerle özgül eşleşme sağlayan bölgelerin primerlerle hidrojen bağları kurmasıdır. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genelde $40-70^{\circ}C$ arasında değişebilmektedir. Primerlere nükleotid eklenmesi, karışım DNA Polimeraz'ın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde, primerlere bağlanmış olan enzim 3' ucundan kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirir.

Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur [35,36].

2.4.5.1. PCR elemanları

DNA, PCR reaksiyonuna tek veya çift zincirli olarak eklenebilir. DNA'nın uzunluğu önemli bir faktör olmamasına karşın eğer DNA'yı seyrek olarak kesen (sa I veya Not I) bir restrikted enzim ile kesilirse, o takdirde sonuç daha başarılı olur.

Oligonükleotidler genellikle PCR'da 1µM konsantrasyonda bulunur ve bu miktar 30 sikluluk bir PCR için yeterlidir. Yüksek konsantrasyonda olmaları halinde ektopik noktalara yapışma olabilir ve böylece istenen hedef DNA dışında bölgelerde çoğalmaya başlar. Eğer yeterli konsantrasyonda değilse bu takdirde PCR ürünü çok azdır. PCR'da uzun oligonükleotidler kullanılırsa poliakrilamid jel elektroforezi gerekebilir.

Bazı DNA polimerazlarda 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi vardır. Bu özellik "proofreading" olarak tanımlanır. Proofreading, selektif olarak uygunsuz yapışan nükleotidleri doğru olanla yer değiştirme özellikleri taşır. Taq DNA polimerazın optimal termal aktivitesi 55-75 ° C'dir. Sıcaklık arttıkça ortaya çıkacak hata oranı da artacaktır.

PCR siklus sayısının artırılması ile de hata oranı artar. Bir PCR reaksiyonunda 35-45 siklus yeterli görülmektedir [4,35,36].

2.4.5.2. PCR Kullanım Alanları

PCR'ın kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir.

- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- Prenatal tanıda,
- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması,
- Adli tıpta,
- Onkogenesisin araştırılmasında,

- Prob'ların oluşturulmasında, klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında,
- DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında,
- Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizinde,
- İnvitro fertilizasyon yapılan tek hücrede implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanmasında,
- DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir [4,8,11,34,37-39].

2.4.5.3. PCR'in Kimlik Tanımlanmasında Kullanılması

PCR öncesinde moleküler sistematige yaklaşım oldukça farklıydı [4]. DNA parmak izi yönteminden önce kişilerin kimlik tesbiti ile ebeveyn/akraba tayininde Landsteiner'in ilk kez tanımladığı ABO kan grupları ile daha sonra keşfedilen Rh, M,N, Kelly, Duffy, Lewis gibi kan grupları, HLA doku antijenleri, antikolar, protein kompleksleri, haptoglobulinler ve PGM (fosfo-glukomutaz) gibi kan ve enzim sistemleri kullanılmıştır. Kana kimlik kazandıran bu yöntemlerin bireyselliği belirleme oranı kişiye özel DNA yapısının ortaya çıkarılması tekniğinin yanında çok az güvenilirirdi. DNA profilinin özgüllüğü istatistiki terimlemede o kadar büyüktür ki dünyadaki insan sayısı bu rakam yanında küçük kalır. Mesela birbiri ile ilişkisiz iki bireyin aynı DNA dizisini paylaşma şansı trilyonlarda birdir, hatta bu kardeşler arasında bile onmilyonda birdir [1,4,12]. Paabö ve arkadaşları yaklaşık 2500 yıllık bir mummyadan, bazı bilim adamları 7000 yıllık bir beyinden, dünyada örneği kalmamış Mamut ile Guagga'dan elde edilmiş DNA'ları inceleyerek geçmiş günümüzde değerlendirmişlerdir. Evrimin aydınlatılmasında değerlendirilen bu çalışmalarda evrimin yavaş olduğu ve insan genetik yapısındaki % 0.4'lik

değişiklik için yaklaşık bir milyon yıllık bir sürecin geçmesi gerektiği gerçeği görülmüştür [4].

Son yıllarda adli tıp ve kriminal araştırmalarda PCR tekniği ile DNA tiplendirmesi standart bir laboratuvar tekniği olarak güçlü bir yöntem olmuştur [3,20,32,38-41]. Kompleks genomların basit ve üretilebilir parmak izleri, önceki dizi bilgisine gerek duyulmadan, rastgele seçilmiş primerler ile PCR yöntemi kullanılarak karakterize edilebilmektedir [8,16,33,42-44]. Bu konuda ilk çalışmalar Caetano ve arkadaşları [7] tarafından yapılmıştır. Herhangi bir ön bilgiye sahip olmadan, kısa rastgele primerler ile DNA polimorfizmi gösterilmiştir. Organizmalar arasındaki genetik farklılıkları bulmak için, insan, virüs, bakteri, mantar, bitki ve hayvan orjinli DNA'lar en az 5 en fazla 21 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler primer olarak kullanılarak, bir genomun ayrı ve sınırlı parçaları çoğaltılmıştır. Bu yaklaşımla her primer, amplifikasyon ürünlerinin karakteristik bir bölümünü üretmiş, böylece organizmanın genomik DNA'sında yüksek oranda tekrar üretilebilen parmak izleri elde edilmiştir [6]. Bu metot ile ökaryot ve prokaryotlar arasındaki polimorfizmin, DNA parmak izlerindeki polimorfizmin kıyaslanması ile tanımlanabileceği gösterilmiştir [15,42]. PCR teknolojisi, adli tıbbı tamamen değiştirmiştir. Bir vücut hücresinin DNA içeriği kadar, küçük bir parçası özel, bireysel işaret vermek için yeterlidir. İnsana ait biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın belirli bazı bölgelerinin incelenmesi ile "barkod" niteliğinde bir sonuca ulaşılarak elde edilen DNA profili, tek yumurta ikizleri dışında kişiye özgüdür. Aynı insana ait her hücrenin DNA'sı aynı olduğundan, hangi doku yada biyolojik sıvıyla çalışılırsa, çalışılırsın elde edilen DNA profili de aynıdır [45,46].

2.5. Agaroz Ve Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Elektrofrez, agaroz veya poliakrilamid jele elektrik akımı uygulandığı zaman negatif elektrik yüklü DNA veya DNA parçalarının nötral pH'da anoda doğru göçmesi esasına dayanır. Bu göçme hareketinin miktarı bazı değişkenlere bağlıdır.

1. *Molekülün Büyüklüğü:* Büyük moleküller yavaş hareket ederler çünkü küçük agaroz deliklere girme kabiliyetleri az ve sürtünmeleri fazladır.
2. *Jel Konsantrasyonu:* Jel konsantrasyonunun artması ile çözme gücü (Resolving Power) artar. Örneğin % 0.3'lük jel 5-60 kb'lık DNA'yı çözerken, %2'lik jel 0.1-2 kb'lık DNA'yı çözer.
3. *DNA'nın Şekli:* DNA süperheliks, sirküler ve lineer olmasına göre farklı hareket eder. Örneğin süperheliks DNA, lineer DNA'dan hızlı hareket eder.
4. *Voltaj:* Yüksek voltaj ağır fragmanların hareketini artırır, ama bu etki jelin molekülleri ayırma gücünü düşürür. 2 kb'dan daha büyük parçaların ayrılmasında jelin cm'si başına en fazla 5V kullanılmalıdır.
5. *Elektrik Alanı:* DNA molekülü 50-100 kb'dan büyükse agaroz jel içerisinde yürümesi için aynı seviyede direk elektrik akımına ihtiyaç vardır.
6. *Baz sırası ve Sıcaklık:* Akrilamid jellerin aksine agaroz jel elektroforezi bu değişkenlerden pek etkilenmez. Normalde 4-30 °C'de, genellikle de oda sıcaklığında elektroforez yapılabilir. %0.5'ten daha az agaroz içeren veya düşük ısıda eriyen agarozla hazırlanmış jel elektroforezinde 4°C kullanılmalıdır.
7. *DNA Bazları Arasına Girmiş Boya Varlığı:* Etdyum bromür flüoresanlı bir boyadır. Bir kısım negatif yükü nötralize eder. Agaroz ve poliakrilamid jelde DNA'nın hareketini % 15 azaltır. Bunun için etidyum bromürün kritik konsantrasyonu 0.1-0.5 mg/ml arasında olmalıdır. Yine etidyum bromür kanser etkeni olduğu için bu madde ile bulaşık tüm kaplar kullanılıp atılabilen cinsten olmalıdır.
8. *Elektroforez Tamponunun İçeriği:* DNA'nın elektroforetik hareketini tamponun içeriği ve iyonik gücü belirler. İyonun yokluğu elektrik iletkenliğinin en az olması ve DNA'nın çok yavaş hareket etmesine neden olur. Eğer iyon yoğunluğu çok fazla ise iletkenlik çok artar ve

belirgin miktarda ısı enerjisi ortaya çıkar Böylece jel erir ve DNA denatüre olur.

Çift sarmal DNA için birkaç çeşit tampon vardır. Bu tamponlar etilendiamin tetraasitik asit (EDTA) (pH 8.0) ile, tris-asetat (TAE), tris-borat (TBE) veya tris-fosfatın (TPE) ortalama 50mM (pH 7.5-7.8) yoğunluğundaki karışımları ile oluşturulur. Tamponlar genellikle oda sıcaklığında saklanır. En çok kullanılan TAE tamponu, TPE ve TBE'den daha ucuzdur, ancak TBE ve TPE'den tampon kapasitesi daha azdır.

PCR ile elde edilen ürünler oranj-G ile karıştırılarak agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak U.V. ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir [35].

3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma deneysel ve tanımlayıcı tip bir araştırmadır. Deneyler akraba olmayan sağlıklı toplam 135 gönüllüden elde edilen kanlardan ayrıştırılan DNA ile yapılmıştır. Kan vermek gönüllülük esasına dayandığı için çalışmada herhangi bir örneklem hacmi ve yöntemi kullanılmamıştır. Deneylerin tümü Farmakoloji ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dallarında mevcut imkan ve aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sarf edilen kimyasal maddeler Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığı tarafından sağlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce belirtilen Anabilim Dallarının kendi araştırmaları incelenerek bir ön eğitim alınmış, daha sonra bu araştırmaya geçilmiştir. Ayrıca pilot veya diğer ön çalışma yapılmamıştır. Elde edilen PCR ürünleri UV. altında görünür hale getirilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Kimyasal maddeler kısıtlı miktarlarda alındığından ancak belirtilen sayıdaki kişinin DNA'sı incelemeye alınmış. böylece deneyler bunlarla sınırlı tutulmuştur. Çalışma laboratuvar olanaklarının sunulduğu Anabilim Dallarıyla koordineli bir şekilde organize edilmiş ve yürütölmüştür. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, çözelti ve araçlar aşağıda sunulmuştur:

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Agaroz (lot no: 031216PR, Prona, İspanya), Amonyum asetat (Sigma, Steinheim), DMSO((Dimethyl sulfoxide) Sigma, Steinheim), DNA Taq polimeraz (Fermentas, Lithuania), DNTPs (2mM) (Fermentas, Lithuania), Etanol 96 vol (%100) (Carlo

Erba, Radona), Etidyum bromür (Sigma, Steinheim), Marker 100 bp (DNA Ladder Plus) (Fermentas, Lithuania), $MgCl_2$ (25mM) (Fermentas, Lithuania). Orange-G Tozu (Merck, Damstadt), Proteinaz K (Boehringer, Mannheim). Sodyumdodesilsülfat (SDS) (Sigma, Louis), TBE tamponu (Sigma, Steinheim), Tris-EDTA tamponu (Sigma, Steinheim), Oligonükleotid Primer 1 (8 bp'lik) (Fermentas, Lithuania), Oligonükleotid Primer 2 (10 bp'lik), (Fermentas, Lithuania).

3.1.2. Çözeltiler

Buffer 10XPCR	Nonidet P40 (% 0.8) Tris HCl (100 mM, pH 8.8)	KCl (500 mM)
Buffer((NH₄)₂SO₄) 10XPCR	(NH ₄) ₂ SO ₄ (200 Mm) Tris HCl (750 mM, pH 8.8)	Tween 20 (%0.1)
DNTPs Çözeltisi	DATP (0,002 mol/L) DGTP (0,002 mol/L)	DCTP (0.002 mol/L) DTTP (0,002 mol/L)
Etidyum bromür çözeltisi	10 mg/ml	
NLB(Nücleus parçalama tampon çözeltisi)		Tris HCl (10 Mm) NaCl (400 mM) Na ₂ EDTA (2mM)
Oranj-G çözeltisi	Fikol (%20) pH=7,5 Orange-G (1mg/ml)	Tris (0.01 mol/L)

SDS çözeltisi

Sodyumdodesilsülfat (200 g/L) pH=7.2

TBE çözeltisiTris (0.9 mol/L) Borik asit (0.9 mol/L)
EDTA (0,025 mol/L) pH = 8,0-8,3**3.1.3. Araçlar**

Isı Ayarlayıcı	Genius	Cambridge
Elektroforez Tankı	E-C App.Corp	Newyork
Elektroforez Güç Kaynağı	Bio Rad Power Pac1000	California
Video-Grafik Printer	Sony	Koeln
Görüntüleme Sistemi	VilberLourmat	Torcy
Mikropipet Takımı	Eppendorf	Hamburg
0.2ml'lik Santrifüj Tüpleri	Eppendorf	Hamburg
Soğ.Santrifüj	Selecta	Barcelona
İnkübatör	Biometra	Göttingen
Hassas Terazi	Shimadzu	Kyota
Mikrodalga Fırın	Arçelik	İstanbul
Buzdolabı	Arçelik	İstanbul
Manyetik Karıştırıcı	Labinco	Hollanda
Vorteks	Labinco	Hollanda

3.2. Metot**3.2.1. DNA İzolasyonu**

Toplanan kanların -20°C'de kan hücreleri parçalandı. 2,5 ml kan üzerine 10 ml soğuk steril distile su ilave edildi. 2-3 dakika boyunca ters düz çalkalandı ve

2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yavaşça dökülerek kalan çökelti üzerine 6,5 ml soğuk saf su eklendi ve örnekler hızlı çalkalanma ile 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Yeniden üstte kalan sıvı dökülerek pelet üzerine 0,75 ml NLB (nükleus parçalama tampon çözeltisi), 37,5 µl Proteinaz K (10 mg/ml) ve 50 µl SDS (% 10 sodyumdodesil sülfat) ilave edildi. Tüpler hızlı çalkalama ile 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra üzerlerine 0,5 ml amonyum asetat ilave edilerek 30 saniye hızla çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilen örnekler 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı bir başka tüpe alındı ve çökelti atıldı. Üstte kalan sıvı üzerine iki katı hacimde saf etanol (% 100) konularak DNA çöktürüldü. Otomatik pipet ucuyla alınarak, içerisinde 250 µl TE tamponu bulunan eppendorf tüplerine konuldu. DNA örnekleri 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlandı ve +4°C'de saklandı [36].

3.2.2.PCR Protokolleri

3.2.3.1. PCR 1

1 örnek için:

2,5	µl (2 mM) dNTPs,
2,5	µl 10×PCR Buffer,
1,5	µl (25mM) MgCl ₂ ,
1	µl primer,(8 bp'lik 1. Primer (CGCGCCGG))
0,15	µl Taq DNA polimeraz
1,25	µl DMSO
16,1	µl H ₂ O

Toplam 25,0 µl karışım hazırlandı.

3.2.3.2. PCR 2

1 örnek için:

2,5	µl (2 mM) dNTPs,
2,5	µl 10×PCR Buffer, ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lı)

	1,5	μl (25mM) MgCl_2 ,
	1	μl primer, ,(8 bp'lik 1. Primer (CGCGCCGG))
	0,15	μl Taq DNA polimeraz
	1,25	μl DMSO
	16,1	μl H_2O
Toplam	25,0	μl karışım hazırlandı.

Birinci ve ikinci PCR karışımları ince çeperli 0.2 ml'lik eppendorf tüplere 25 μl oranında konuldu ve karışım üzerine 1 μl DNA eklendi. Isı ayarlayıcı 1 döngü 94 °C'de 2 dk denatürasyon, 35 döngü 94°C'de 1dk denatürasyon, 40 °C'de 1 dk annealing, 72 °C'de 2 dk uzama ve son olarak 1 döngü 72 °C'de 7 dk uzama olarak programlandı. Döngülerin tamamlanmasıyla oluşan PCR ürününden 15 μl alınarak Oranj-G solüsyonu ile karıştırıldı ve örnekler %2'lik normal agaroz jelde oluşturulan kuyucuklara pipetle yerleştirildi. Bantları belirlemek için Marker 5 kullanıldı. Örnekler içerisinde %1 etidyum bromürlü TBE (tris borik asit EDTA) tamponu bulunan elektroforez tankında 100 volt akımda 80 dk yürütüldü. UV görüntüleme sistemi yardımıyla PCR ürünlerinin bantlaşan fragmanlarının fotoğrafları çekildi (Şekil 4).

3.2.3.3. PCR 3

1 örnek için:

	2,5	μl (2 mM) dNTPs,
	2,5	μl 10 \times PCR Buffer,
	1,5	μl (25mM) MgCl_2 ,
	1	μl primer (10 bp'lik 2. Primer (TGCCGAGCTG))
	0,15	μl Taq DNA polimeraz
	1,25	μl DMSO
	16,1	μl H_2O
Toplam	25,0	μl karışım hazırlandı.

3.2.3.4. PCR 4

1 örnek için:

2,5	µl (2 mM) dNTPs,
2,5	µl 10×PCR Buffer, ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lı)
1,5	µl (25mM) MgCl ₂ ,
1	µl primer (10 bp'lik 2. Primer (TGCCGAGCTG))
0,15	µl Taq DNA polimeraz
1,25	µl DMSO
16,1	µl H ₂ O

Toplam 25,0 µl karışım hazırlandı.

Üçüncü ve dördüncü PCR karışımları ince çeperli 0.2 ml'lik eppendorf tüplere 25 µl oranında konuldu ve üzerine 1µl DNA eklendi. Isı ayarlayıcı 1 döngü 94 °C'de 2 dk denatürasyon, 35 döngü 94 °C'de 1dk denatürasyon, 40 °C'de 1 dk annealing, 72 °C'de 1 dk uzama ve son olarak 1 döngü 72 °C'de 7 dk uzama olarak programlandı ve PCR ürünlerine uygulanan elektroforez işlemi 1. ve 2. PCR protokolündeki gibi yapıldı ve UV görüntüleme sistemiyle DNA'ların fotoğrafları çekildi (Şekil 5).

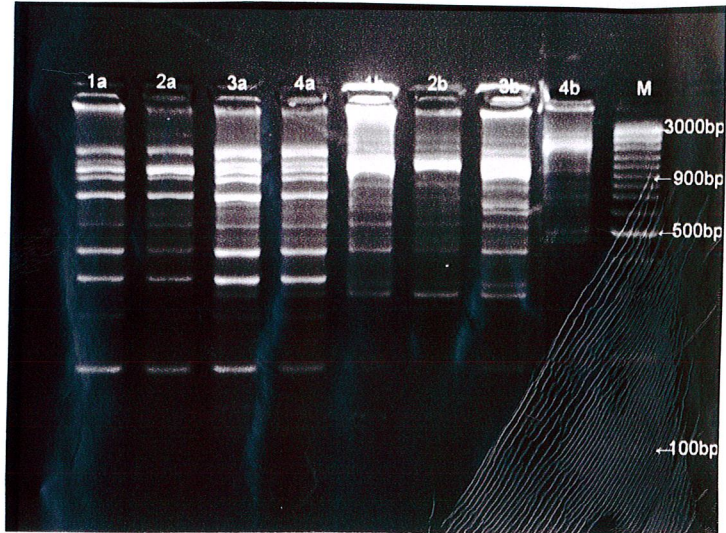
3.2.3. % 2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Bir behere aktarılan 150 ml 1×TBE tamponuna 3 g normal agaroz ilave edildi. Mikrodalga fırında 1-2 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Manyetik karıştırıcı da tutulup ılıyınca içerisine 15 µl etidyum bromür eklendi. Büyük tankta kuyucuklar için tarağın küçük dişleri kalıp kullanılarak donduruldu. Buzdolabında 1-2 saat tutularak PCR ürünü elektroforezi için kullanıldı.

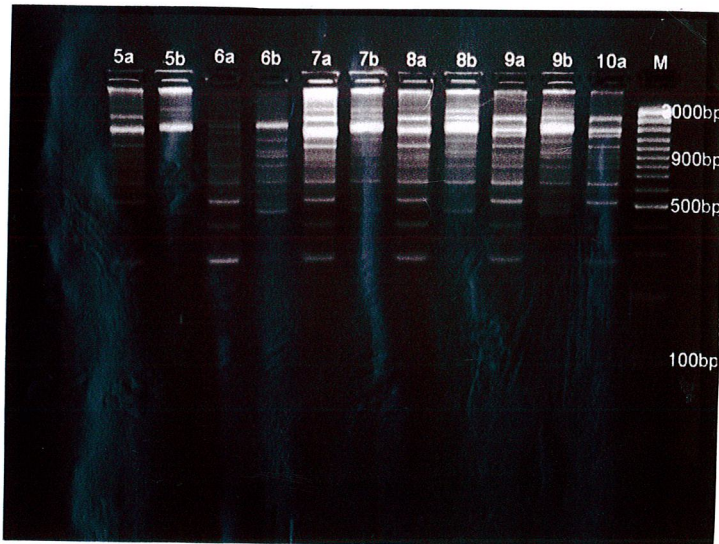
4. BULGULAR

Çalışmamızda 135 örnekten alınan kanlardan DNA izole edilmiştir. Elde edilen DNA'ların hepsi 8 bazlık (CGCGCCGG) kısa rastgele primeri ve iki farklı PCR reaksiyon protokolü ile çoğaltılmıştır. 8 bazlık primer ile yapılan birinci PCR uygulamasında 135 DNA'nın hepsinden bant elde edilerek %2'lik agaroz jelde 10×TBE tamponlu elektroforezde 3 kbp'lik işaretleyici kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen bantlar görüntüleme ekranında tek tek sayılarak işaretleyiciye göre seviye farkları değerlendirilmiştir. Bu sınıflanmış verilerin aritmetik ortalamaları hesaplanmıştır. En fazla 15, en az 4 olmak üzere ortalama 9 belirgin bantın 500 bp ile 1500 bp arasında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Kişiler arasında %61.5 oranında ayırt edicilik tesbit edilmiştir. Aynı primer ile yapılan tek değişkenli ikinci PCR uygulamasında en fazla 16, en az 5 olmak üzere ortalama 10 belirgin bant gözlenmiştir. Kişisel ayırt edicilik %86.7 oranında tesbit edilmiştir. Deneme yanılma yöntemi ile amonyum sülfatlı tampon çözeltisi kullanılarak yapılan çalışmalarda daha net ve verimli sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir. PCR karışımındaki tek tampon çözeltisi farklılığının yani 10×PCR tampon çözeltisi ile 10×PCR ((NH₄)₂SO₄) amonyum sülfatlı tampon çözeltisinin aynı DNA, aynı kısa rastgele primer ve aynı PCR protokolü kullanılarak ortaya koyduğu kişisel ayırt edicilik ve her iki yöntemin tek yöntem olarak değerlendirilebilmesi avantajı bize kişisel ayırt edicilik oranında %92 başarı sağlamıştır (Şekil 4).

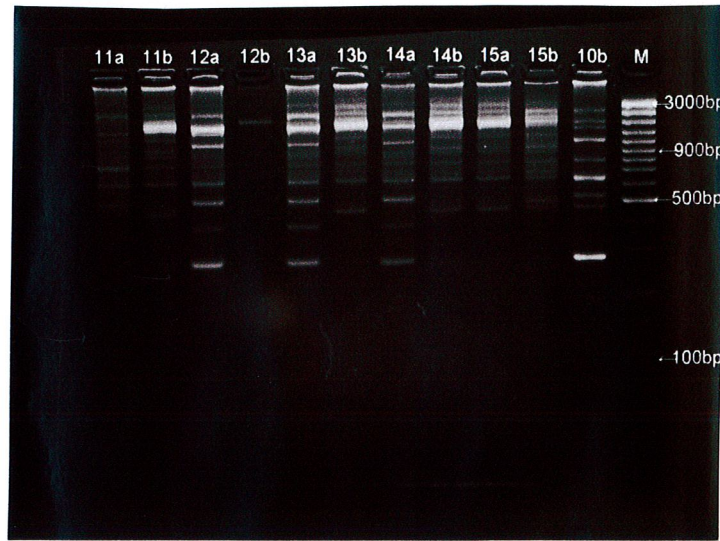
. Bu yöntemle akraba olmayan 135 kişinin DNA parmak izi çıkarılmış, yalnızca 11 kişide bireyler arası kesin ayırım yapılamamıştır. Bunun sebebi izah edilememekle birlikte muhtemelen bu bireyler akraba olmadıklarını söylemelerine rağmen akrabadırlar veya DNA tüplerinde bulaşma vardır.



Şekil 4A



Şekil 4B



Şekil 4C

Şekil 4: PCR reaksiyon şartları amonyum sülfat ihtiva eden (PCR 1a) grupları ile amonyum sülfat ihtiva etmeyen (PCR 2b) grupları A) Örnekler; 1a-4a ile 1b-4b, B) Örnekler; 5a-10a ile 5b-9b, C) Örnekler; 10a-15a ile 10b-15b.

Aynı DNA'lar ikinci 10 bazlık (TGCCGAGCTG) kısa rastgele primeri kullanılarak aynı ve farklı PCR reaksiyon protokolleri ile çoğaltılmıştır. PCR koşullarının izin verdiği uygun amonyum sülfat'lı ((NH₄)₂SO₄) tampon çözeltisi, taq polimeraz aktivitesini arttırarak sonuçta anlamlı bir gelişme gösterir düşüncesi ile 2. Grup PCR reaksiyonunda da kullanıldı. Elde edilen çoğaltım ürünlerinde kullanılan 10×PCR tampon çözeltisi ile 10×PCR ((NH₄)₂SO₄) amonyum sülfatlı tampon çözeltisi farklılığına rağmen, birinci PCR protokolünde kişisel ayırt edicilik tesbit edilemeyen 11 kişi de dahil olmak üzere bantlar benzer olarak değerlendirildi, kişisel ayırt edicilik tesbit edilemedi. (Şekil 5).

Çalışmamızın başında aynı kişi DNA'sı için her iki farklı primer dizisi ile kişi farklılığını göstermeyi amaçlarken yaptığımız deneyler bizi tek primer kullanarak yalnızca tampon çözeltisi farklılığı ile spesifik verimli ve farklı sonuçlara götürmüştür (Şekil 4)

5. TARTIŞMA

Günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerle en küçük delillerden dahi yararlanarak bireysel farklılık öne çıkarılmakta ve toplumdan farklı olan belirlenebilmektedir [4]. Tıbbın moleküler düzeyde ilerlediği günümüzde DNA parmak izi tekniği ile DNA baz dizilimindeki değişimler ve bireyler arasındaki genetik farklılık tayin edilebilmektedir [17]. Genetik şifremiz DNA, kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, organlar, dokular, kemik, diş, saç, tırnak, tükürük, idrar ve diğer biyolojik sıvılar gibi çekirdek içeren tüm biyolojik materyalden, hatta postmortem değişime uğramış analiz için uygun olmayan dokularda dahi, günümüzde başarılı bir şekilde izole edilip tiplendirilmektedir [2,25,47-50]. DNA eldesi için en uygun kaynak sıvı kan, sperm, tükürüktür.Yapılan çalışmalarda DNA en çok semenden, en az tükürükten elde edilmiştir [2,45]. DNA parmak izi, geleneksel parmak izinden daha güçlü bir ayırım ve uygulama tekniğidir. Çünkü bir olay yerinde failin parmak izi her zaman bulunmaz. Halbuki biyolojik bir kalıntıya (saç, kıl, tükürük, sperm, idrar, kan yada bunların lekelerine) rastlanması daha büyük bir olasılıktır. Dolayısıyla bütün bu biyolojik delillerden de günümüzde DNA izole edilerek profillemek mümkündür [2,4].

DNA parmak izi tekniği bireysel kimliklendirme, babalık tespiti, bağlantı haritası, antenatal tanı, cinayet olgularının aydınlatılması, toplu kazalarda kimliklendirme, hastalık lokusu lokalizasyonu, genetik farklılık, moleküler arkeoloji ve epidemiyoloji olgularında yaygın olarak kullanılmaktadır [2,7,15,41,42,46,51-53]. DNA parmak izi tekniğine birçok farklı yaklaşım metotları arasında en ucuz ve kolay, uygulanım yolu olan ayrıca normal laboratuvar şartlarında çalışılabilen, keyfi seçilmiş oligonükleotid primerleri ile PCR tekniği bu avantajları ile çalışmada öncelik almıştır. PCR tekniğinin hassaslığı ve elde edilen DNA'yı amplifiye etmeye

muktedirliği ve az miktarda küçük numune miktarları ile adli laboratuvarlarda profile edilen DNA için analitik bir metot olmuştur [18]. Bu çalışmada basit ve hızlı olan DNA'nın elde edilebileceği her örneğe uygulanabilecek bir metot uygulandı. Primer seçiminde çalışmaya referans olarak, Caetano ve arkadaşlarının [6] uygulanabilirliğini test ettiği primerleri alındı. 8 bp'lik primer ile daha başarılı sonuçlar elde edilirken, 10 bp'lik primer ile elde edilen bantlarda bireysel ayırt edicilik tespit edilemedi. PCR ile DNA çoğaltılmasının başarılı olmasında en önemli etkenlerden biri primerlerin doğru seçimidir [16,43]. Primerlerin uzunluğu, nükleotid içeriği gibi etkenler sonucu değiştirmektedir. Primer seçimindeki amaç çoğaltılan PCR parçasının uzunluğunun değişiminin polimorfik özellikten kaynaklanabileceğidir ki bu durumda elde edilen veriler mukayese edilebilir. Bu çalışmada 8 bazlık "CGCGCCGG" primeri ile yine bu primerle netlik kazanmayan durumlarda başka bir primerle yapacağımız çalışmada bireysel ayırt edicilik adına başarımız ne olabilir düşüncesi ile aynı DNA örneğinde 10 bazlık "TGCCGAGCTG" primeri kullanıldı. Ancak yaptığımız çalışmalar sonucunda en optimal koşullara rağmen bu primer ile ayırt edici bantlar elde edilemedi. Bu bizi kullandığımız taq DNA polimerazın ya da primer dizisinin çalışmamız için özgül olmadığı kanısına vardırdı. Sonuç olarak 8 bazlık primer ile elde edilen DNA parmak izinde yüksek oranda ayırt edicilik elde edilirken, 10 bazlık primer ile insan genomu üzerinde ayırt edicilik elde edilemedi. 8 bazlık primer dizisi ile sınırlı, net ve özgün bantlar elde edildi (Şekil 4, Şekil 5).

Yine benzer şekilde rastgele seçilmiş primer dizisi baz uzunluğu ile amplifikasyon yeteneği arasında korelasyon ya da tezat ilişkiye dair birçok çalışma yapılmıştır. Williams ve arkadaşlarının [16] yaptığı çalışma da, her primer nükleotid dizisi sınırlamalar içinde seçilmiş ve her primer tek baz değişikliklerine göre ayrılmıştır. Yapılan çalışma ile tek baz değişikliklerinin, bantların diziliminde tam bir değişikliğe sebep olacağı sonucu desteklemiştir. Bu çalışmada baz ve sayı içeriği değişik 8 baz uzunluğundaki primer ile daha fazla ve daha özgün bantlar elde edilirken, 10 bazlık primer ile nisbeten daha az bantlar elde edildi.

1994 yılında Zhang ve arkadaşları yeni bir PCR tampon çözeltisini kullanmışlar. Standard bufferdan KCl içermeyişi ile ayrılan bu tampon çözeltisi ile yüksek verimi, üreyebilirliği ve spesifikliğı ile tatmin edici amplifikasyon ürünleri elde etmişlerdir [54]. Moretti ve arkadaşları ise 1998 yılında yaptıkları çalışmada başlangıçta inaktive olması nedeni ile reaksiyon hazırlama, PCR ısı dengesi ve otomosyonuna kolaylık sağlayan, Ampli Taq Gold DNA polimerazı kullanarak elde edilen amplifikasyon ürün verimi ve spesifitesinde anlamlı gelişmeler göstermişlerdir [55]. Bizde buna benzer bir görüşle, PCR koşullarının izin verdiği yeni uygun amonyum sülfat'lı ((NH₄)₂SO₄) tampon çözeltisini, taq polimeraz aktivitesini arttırarak sonuçta anlamlı bir gelişme gösterir düşüncesi ile PCR reaksiyonunda kullandık. Deneylerimizde diğer bütün protokoller sabit tutuldu, amonyum sülfat'lı buffer (10xPCR buffer (NH₄)₂SO₄) ile standart 10xPCR tampon çözeltisinden elde edilen PCR ürünleri karşılaştırıldı. Ayrıca her iki farklı primer ile her iki tampon çözeltisi ayrı ayrı çalışıldı. Amonyum sülfat'lı tampon çözeltisinin taq polimeraz aktivitesini daha çok kuvvetlendirdiğı düşüncesinden yola çıkarak yaptığımız çalışmada 200 mM (NH₄)₂SO₄) ilaveli amonyum sülfatlı tampon çözeltisi çalışması ile PCR ürünlerinden, en fazla 16 bant elde edildi. Yalnızca sayı karşılaştırması ile çok anlamlı fark ve ayırım gözlemlenmezken, aynı DNA örneğinde bantların dizilim ve seviye farkı yani standart tampon çözeltisinin tanıdığı dizilim ile amonyum sülfat'lı tampon çözeltisinin tanıdığı dizilimin farklı olduğu tesbit edildi. Bu bulgu bize taq DNA polimerazın, amonyum sülfat'lı tampon çözeltisinin aktivitesini arttırması yanında işlevliğini de değiştirerek, üretilen bantların üretilirliğini sağladığını da gösterdi. Ayrıca her iki tampon çözeltisi ile yapılan çalışmada elde edilen bantlar arasında yüksek yoğunluk farkı görüldü. Amonyum sülfat'lı tampon çözeltisinin taq DNA polimeraz aktivitesine yardımcı etkisi sonucunda yüksek yoğunluklu bantlar elde edildi. Bu önemli fark yaptığımız çalışmada kişiler arası ayırt ediciliğın çok net olmadığı örneklerde, aynı DNA örneğinde tek primerle ve her iki tampon çözeltisi ile çalışarak elde edilen bantları karşılaştırma yolu ile kesin sonucu elde etmemizi sağladı. Sonuçta amonyum sülfat'lı tampon çözeltisi ile elde ettiğimiz bantların daha fazla sayıda, daha verimli ve daha spesifik olduğunu, standard tampon çözeltisi ile üretilen bantların

üretildiğini, elde edilen bantlardaki seviye ve sayı farkı ile PCR protokolünde tek değişken ile farklı ve anlamlı sonuçlar elde edildiği ve amonyum sülfat'lı tampon çözeltisinin taq polimeraz aktivitesini etkilediği tesbit edildi. Bu şekilde elde ettiğimiz DNA parmak izi tekniği oldukça verimli, spesifik ve tatmin edici oldu (Şekil 4).

Her primerle sınırlandırılmış DNA bölgesi çoğaltılarak genom bölgesine özgün primer ise genomun ayrı ve sınırlı parçaları çoğaltılır [6]. Hedef DNA için en iyi DNA dizilimini seçmek ve PCR amplifikasyonu metodunu oluşturmak oldukça zaman alıcı bir yöntemdir [56]. Bassam ve arkadaşları [57] yaptıkları bir çalışmada amplifikasyon parametrelerini optimal üretim için sıralamışlar. PCR siklusu kadar karışımdaki magnezyum, primer ve enzim konsantrasyonları iyi olan güvenli bir pencere kurarak artırılmış yöntemle daha fazla toleranslı, verimli ve bilgi verici sonuç elde etmişlerdir. Yaptığımız deneyler sonucunda en optimal düzeyde PCR reaksiyon karışımı ile her iki primer için farklı iki PCR metodu oluşturuldu. Çünkü PCR protokolünün bir sistem için çalışırken, diğeri için sonuç vermediği, bilindiği gibi her primer için farklı bir PCR amplifikasyon metodu gerektiği için bu çalışmada da buna yönelik uygulamalar yapıldı. Her primere göre PCR metodu uyarlandı.

Yapılan birçok çalışmada PCR'ı kolaylaştırmak için PCR ortamına bazı maddelerin eklenmesi (cosolvent) ile PCR'dan elde edilen ürün miktarı arttırılmaktadır [4]. Bu maddelerin konsantrasyonları primer bölgelerine göre değişiklik göstermekte ve deneme yanılma yoluyla saptanmaktadır. PCR reaksiyonuna % 5-10 oranında DMSO eklenmesi PCR'ı iyileştirmektedir. Ancak bu yöntem her PCR sistemi için uygun değildir [4,58,59]. DMSO bir taraftan amplifikasyon etkinliğini ve hızını düzenleyip, kalıp DNA'nın iki boyutlu yapısını sabitlerken diğer taraftan taq polimerazın aktivitesini kararlı kılmaktadır [60,61]. Bu nedenle PCR reaksiyon karışımına %5 oranında DMSO ekleyerek, DMSO'lu ve DMSO'suz yapılan çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, %5 oranında DMSO kullanılan reaksiyon karışımlarından daha iyi sonuçlar elde edildi. Böylece DMSO

içeren PCR reaksiyonu kullandığımız her iki primer ile uygunluk gösterdi. DMSO kullanımına bağlı elde edilen net bant görüntüleri çalışmamızda değerlendirildi. (Şekil 4, Şekil 5).

DNA parmak izi çalışmalarında en ufak bir kontaminasyon dahi DNA tiplendirme sürecini ve PCR'in seyrini etkileyebilmektedir [61]. DNA analiz metodları teknik çalışma grubu ve Amerikan sosyal suç laboratuvarı yönetimi gibi adli organizasyonlar, PCR analizi esnasında kontaminasyon olasılığını minimize etmek için dizayn edilmiş kuralları onaylamışlardır [62]. PCR tek bir molekül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden reaksiyon karışımlarının farklı DNA molekülleri ile bulaşma olmasının engellenmesi gerekmektedir [61,62]. Doğaldır ki, duyarlılığı bu kadar yüksek olan bir yöntemin yalancı pozitif sonuç verme olasılığı da yüksektir. En fazla yalancı pozitiflik kalıp DNA veya daha önceki çoğaltma ürünlerinin kontaminasyonundan kaynaklanmaktadır [4]. Bu nedenle gerek örneklerin toplanmasında gerekse bunları laboratuvarlara gönderme ve çalışma aşamalarında, bulaşma ve kirliliğin önlenmesi için ciddi önlemlerin alınması şart olmaktadır [62]. Bu çalışmada güvenli steril ortamı sağlamak için PCR'in bütün aşamalarında bir kez kullanılıp atılabilir malzemeler kullanıldı. Kalıp DNA ile PCR karışımının hazırlandığı, elektroforez yapıldığı yerler ayrı tutuldu. Kontaminasyonu elimine etmek için her zaman pozitif kontrol kullanmak yapılan işlemin güvenilirliği açısından önemli olmuştur. Çalışmamızda bu konuya gösterdiğimiz titizlik ve uyguladığımız yöntem bize problemsiz ve güvenilir sonuçlar kazandırmıştır.

Çalışmanın sonucunda elde edilen PCR ürünleri %2'lik normal agaroz jele yüklenip etidyum bromürlü, TBE tamponu bulunan elektroforez tankında yürütülerek, UV. görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı ve kişisel farklılığın ortaya konmasında normal agaroz jel elektroforezinin yeterli olacağını tesbit edildi. Ancak bu çalışmada kişisel fark agaroz jelde ortaya konulmasına rağmen agaroz jele göre 50-100 kat daha fazla hassas ve analitik gücü olan poliakrilamid jelin ebeveyn/akrabalık tesbiti ve bazı genetik hastalıkların tesbitinde kullanılmasının daha avantajlı olduğu Bassam ve arkadaşları [63] ile Blum ve arkadaşlarının [64]

yaptıkları çalışmada gösterilmiş, poliakrilamid jelde, gelişmiş gümüş boyama tekniği daha hassas ve hızlı olarak tanımlanmıştır.

DNA polimorfizmi üzerine ilk çalışmalar, RFLP analizi ile yapılmıştır [18]. Bununla restriksiyon enzim kesim düzeni mukayese edilmektedir. VNTR [19] ise insan DNA'sındaki yüksek heterozigotluğa ve alellerin sayısına bağlı olarak bilgi verici olmuştur. VNTR'dan daha kısa ve benzersiz dizi olduğundan dizi analizinin yapılması daha kolay olan mikrosatellitler insan genomunun aydınlatılmasını hızlandırmıştır [17,19,65]. VNTR ve mikrosatellit markerleri sonraki tip polimorfizmin temel örnekleri olmuştur [15,66]. Son yıllarda STR olarak isimlendirilen kısa ardışık tekrar DNA dizileri bireysel kimliklendirme için yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır [18,22,28,67]. Bu yöntem ile PCR amplifikasyonunda gereken DNA miktarı $\frac{1}{2}$ oranında daha azdır. Bu yöntem kimlik tesbiti, popülasyon çalışmaları, bağ analizi ve genom haritası çalışmaları için kullanışlı bir yaklaşımdır [29,30,66].

Bu çalışmada, akraba olmayan 135 bireyin kan dokusundan elde edilen DNA'lar, 8 bazlık ve 10 bazlık kısa rastgele primer dizileri ile PCR tekniği kullanılarak çoğaltıldı. Rastgele seçilmiş primer dizileri ile tanınan DNA molekülünün, rastgele bir bölgesi çoğaltılarak elde edilen DNA parmak izi ile kişilerin gen kimliği çıkarılmaya çalışıldı. Belki de insan genom projesinin tamamlanma sürecine paralel olarak gelişen teknoloji ile önümüzdeki yıllarda insan genomunun tamamının incelenmesi rutin bir işlem haline gelecektir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Üniversitemizde ilk olarak DNA parmak izi tekniği uygulandı.
2. DNA parmak izi tekniğinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılan Amonyum sülfatlı buffer ile daha verimli, spesifik ve anlamlı bantlar elde edildi.
3. 8 bazlık "CGCGCCGG" primeri ile %92 oranında kişisel ayırt edicilik elde edildi.
4. 10 bazlık "TGCCGAGCTG" primeri, ile kişisel ayırt edicilik elde edilemedi.
5. Tek primer ve iki farklı buffer kullanılarak yapılan PCR çalışmasında daha güvenilir sonuçlar elde edildi.
6. DNA parmak izi tekniği ile ilgili yapılan diğer çalışmalar da değerlendirildiğinde, standart veri oluşturabilmek için tüm laboratuvarlarda aynı yöntemin kullanılması gerektiği tesbit edildi.
7. Böylesine modern tekniklerin adli tıp, klinik, temel bilimler için getireceği avantajlar değerlendirildiğinde çok amaçlı DNA-PCR laboratuvarlarının gerekliliği ve önemi ortaya çıkarıldı.
8. Fakültemiz mevcut olanaklarının en üst seviyede kullanılması ve benzeri çalışmalarımızın mahkemelere ve pratik hayata kazandırılabilmesi için bundan sonraki projemize daha fazla kaynak aktarılması önerildi.

7. ÖZET

DNA parmak izi ile kişi farklılıklarının gösterilmesi, parmak izi teriminden esinlenerek adlandırılan gen iziyle kimlik saptama tekniği olarak, adli tıp ve kriminal araştırmalarda güçlü bir yöntem olarak yerini almıştır. Moleküler biyolojik yöntemlerle, kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, organlar, dokular, kemik, diş, saç, tırnak, tükürük, postmortem değişime uğramış dokular ve en küçük delillerden dahi DNA izole edilebilmektedir. Elde edilen genomların basit ve üretilebilir parmak izleri ile bireysel farklılık öne çıkarılmaktadır. DNA parmak izi yöntemi adli tıp alanında babalık tesbiti, bağlantı haritası, cinayet olgularının aydınlatılması ve toplu kazalarda kimliklendirme amacı ile kullanılabilir. Günümüzde, DNA parmak izi tekniğine yönelik çeşitli çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Çalışmamızda, DNA'nın elde edilebileceği her örneğe uygulanabilecek, ucuz, hızlı ve güvenli bir metodu kullandık. Herhangi bir ön bilgiye sahip olmadan seçilmiş kısa rastgele primerler ve PCR yöntemi kullanılarak, DNA profili karakterize edildi.

Çalışmada, birbiri ile ilişkisiz toplam 135 kişiden alınan kanlardan izole edilen DNA'lar kullanıldı. DNA'ların hepsi, 10×PCR buffer ile 10×PCR ((NH₄)₂SO₄) amonyum sülfatlı buffer gibi iki farklı buffer ile, 8 bazlık "CGCGCCGG" ve 10 bazlık "TGCCGAGCTG" kısa rastgele primerleri ve PCR tekniği ile çoğaltıldı. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılıp U.V.ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirildi.

Sonuç olarak, PCR karışımında kullanılan tek buffer değişkenliği, kişisel ayırd edicilik de başarı oranını arttırırken, 8 bazlık tek primer kullanılarak, her iki yöntemin tek yöntem olarak değerlendirilebilmeside ayrı bir avantaj sağlamıştır. Aynı DNA'ların farklı 10 bazlık kısa rastgele primer ile aynı ve farklı protokollerde hazırlanan PCR yönteminde dahi aynı bantları verdiği, kişisel ayırd edicilik sağlayamadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelime: DNA Parmak İzi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Adli Tıp.

8. İNGİLİZCE ÖZET

Detection of identity based on genetic sequencing called DNA finger printing has been one of the major options in the criminal and forensic medicine investigations. By means of molecular biology techniques it has become possible to isolate DNA from the blood, blood clot, semen, semen clot, organs, tissues, bones, teeth, hair, nail, saliva, decayed tissues of a flesh as well as even minor samples. Individual differences can be identified by means of the genomes obtained. DNA fingerprinting may be used in the field of forensic medicine for paternal identification, linkage mapping, identification in crowded accidents also as an ancillary technique in murders. Recently, numerous studies have been conducted regarding this technique.

In this study, we used a rapid, cheap and safe method which can be applied for any sample where DNA can be isolated. In the absence of any presumption and using selected short random primers and PCR technique, we aimed to find out individual differences according to DNA fingerprints being obtained. In the study, DNA's isolated from the blood of 135 unrelated subjects were used. On PCR study, using 8 base CGCGCCGG and 10 base TGCCGAGCTG short-random primers, DNA's were replicated and two different buffers which were 10×PCR buffer and 10×PCR ((NH₄)₂SO₄) (ammonium-sulphate) buffer were used. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized under UV fluorescent light.

In conclusion, single buffer alteration on PCR mixture increased the success rate in individual differentiation while the use of 8 base single primer gives the advantage of evaluation of both methods as a single method. It was found that with 10 base short random primer of the same DNA even if the same or different PCR protocol is used, identical bands can be obtained, but this can not provide individual differentiation.

Key Words: DNA Fingerprinting, polymerase chain reaction, Forensic science.

9. KAYNAKLAR

1. Brown TA. Genetics a moleküler approach (2nd ed). Routledge, Chapman and Hall, 1990:24-86.
2. Lee HC, Ladd C, Scherezinger CA, Bourke MT. Forensic applications of DNA evidence. Am J Forensic Med Pathol 1998;19:10-18.
3. Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirdany F. DNA typing in forensic science. I. Theory and background. Am J Forensic Med Pathol 1994;15:269-282.
4. Akar N. Klinik moleküler patolojiye giriş 1. Baskı. Ankara Antıp A. Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, 1995;5:95-163.
5. Gözükara EM. Biyokimya 1. Baskı Ankara, Ofset Repromat Ltd Şti. 1990;279-431.
6. Arda M. Biyoteknoloji. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. 1995: 350-355.
7. Caetano-Anolles B, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 1991;9:553-557.
8. Halkerston DK. NMS Biyokimya (Çev. T Onat) 2. Baskı İzmir Saray Medikal Yayıncılık San ve Tic Ltd Şti, No.1 1994:1-12.
9. Başaran N. Tıbbi Genetik. 2. baskı İstanbul, Bilim Teknik Yayınevi. 1996;275-297.

10. GD, Elset Baumgardner KD. Principles of modern genetics. 1. Baskı New York West Publishing Company.1985:39-49.
11. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 1980;32:314-331.
12. Şaylı BS. Medikal Genetik İlkeleri. 3. Baskı. Ankara. Türkiye Klinikleri Yayını. 1995:40-45.
13. Ritter H. On the istatistic of the Genetic Fingerprinting. Int J Leg Med 1991;104:307-308.
14. Ülküer MK, Ülküer Ü, Kesici T, Menevşe A. Data on the PCR Turkish population based loci: LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and Gc. J Forensic Science 1999;44:1258-1260.
15. Wayne JS, Fourney RM. Identification of complex DNA polymorphisms based on variable number of tandem repeats (VNTR) and restriction site polymorphism. Hum Genet 1990;84:223-227.
16. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 1990;18:6531-6535.
17. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 1987;235:1616-1622.
18. Richie KL, Goldsborough MD, Darfler MM, Benzinger EA, Lovekamp ML, Reeder DJ, et al. Long PCR for VNTR analysis. J Forensic Sci 1999;44:1176-1185.

19. Nakamura Y, Carlson M, Krapcho K, Kanamori M, White R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet* 1988;43:854-859.
20. Boonsaeng V. DNA fingerprinting and forensic medicine. *J Trop Med Public Health* 1995;26:296-300.
21. Lewontin RC, Hartl DL. Population genetics in forensic DNA typing. *Science* 1991;20:1745-1750.
22. Vergnaud G, Mariat D, Zoroastro M, Lauthier V. Detection of single and multiple polymorphic loci by synthetic tandem repeats of short oligonucleotides. *Electrophoresis* 1991;12:134-140.
23. Jefferys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 1985;316:76-79.
24. Caetano GA, Gresshoff PM. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini hairpin and microsatellite primers. *Biotechniques* 1996;20:1044-1056.
25. Mangin PD, Ludes BP. A forensic application of DNA typing. Paternity determination in a putrified fetus. *Am J Forensic Med Pathol* 1991;12:161-163.
26. Fregeau CJ, Germain O, Fourney RM. Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent profiler plus fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody fingerprints. *J Forensic Sci* 2000;45:354-380.
27. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 1994;55:175-189.

28. Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrom E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci Int* 1999;105:171-183.
29. Entrala C, Lorente JA, Lorente M, Alvarez JC, Budowle B, Villanueva E, et al. Spanish population data on the loci D13S317, D7S820 and D16S539 generated using silver staining. *J Forensic Sci* 1999;44:1032-1034.
30. Ricciardone MD, Lins AM, Schumm JW, Holland MM. Multiplex systems for the amplification of short tandem repeat loci evaluation of laser fluorescence detection. *Biotechniques* 1997;23:742-747.
31. Kupferschmid TD, Caliccho T, Budowle B. Maine caucasian population DNA database using twelve short tandem repeat loci. *J Forensic Sci* 1999;44:392-395.
32. Benecke M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a curr. *Naturwissenschaften* 1997;84:181-188.
33. Welsh J, McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990;18:7213-7218.
34. Gillings M, Holley M. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation. *Electrophoresis* 1997;18:1512-1518.
35. Innis MA, Gelfand DH. A guide to methods and applications (chapter 1-2) In: *PCR protocols*. San Diego Academic Press 1990:3-20.
36. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A Simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215.

37. Ota M, Katsuyama Y, Liu CY, Arakura A, Fukushima H. Validation of HLA-DR locus typing in forensic specimens by combining PCR –SSP with PCR-RFLP. *J Forensic Sci* 1997;42:929-934.
38. Bjerre A, Court DS, Lincoln P, Morling N. A report of the 1995 and 1996 paternity testing works shops of the English speaking working group of the international society for forensic haemogenetics. *Forensic Sci Int* 1997;90:41-55.
39. Reeder DJ. Impact of DNA typing on standards and practice in the forensic community. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1063-1065.
40. Tsongalis GJ, Wu AH, Silver H, Ricci A Jr. Amplications of forensic identity testing in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 1999;112:93-103.
41. Chow ST, Ng TL, Chao TC. Forensic applications of DNA profiling. *Ann Acad Med Singapore* 1996;25:103-106.
42. Caetano AG, Bassam BJ. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 1993;42:189-200.
43. Vincent J, Gurling H, Melmer G. Oligonucleotides as shorts as 7 mers can be used for PCR amplification. *DNA Cell Biol* 1994;13:75-82.
44. Hogdall E, Boye K, Vuust J. Simple preparation method of PCR fragments for automated DNA sequencing. *J Cell Biochem* 1999;4:433-436.
45. Dülger HE, Tokdemir M, Erbağ B, Atalay EÖ, Doymaz MZ. Farklı örneklerden elde edilen DNA parmak izi çalışması. *Adli Tıp Bülteni* 1997;2:15-20.
46. Pandian SK, Sekar MC, Annaapoorani KS, Nazuriddin B, Sekharan PC, Damodaran C. DNA polimorphism fingerprinting the first forensic attempt in India. *Adli Tıp Derg* 1989;5:67-72.

47. Oz C, Zamir A. An evaluation of the relevance of routine DNA typing of fingernail clippings for forensic casework. *J Forensic Sci* 2000;45:158-160.
48. Schneider PM. Basic issues in forensic DNA typing. *Forensic Sci Int* 1997;88:17-22.
49. Leonart R, Riego E, Sainz de la Pena MV, Bacallao K, Amaro F, Santiesteban M, Blanco M et al. Forensic identification of iskeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's guerrillas in Bolivia based on DNA typing. *Int J Legal Med* 2000;113:98-101.
50. Anderson TD, Ross JP, Roby RK, Lee DA, Holland MM. A validation study for the extraction and analysis of DNA from human nail material and its application to forensic casework. *J Forensic Sci* 1999;44:1053-1056.
51. Hsu CM, Huang NE, Tsai LC, Kao LG, Chao CH, Linacre A. Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int J Legal Med* 1999;113:43-46.
52. Gallo JC, Thomas E, Nowick GE, Herrera RJ. Effects of subpopulation structure on probability calculations of DNA profiles from forensic PCR analysis. *Genetica* 1997;101:1-12.
53. Reynolds R, Sensebaugh G, Blake E. Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polimerase chain reaction. *Analytical Chem* 1991;63:2-15.
54. Zhang M, Zuo J, Xu X. An approach for PCR amplification of long DNA fragments. *Science* 1994;16:348-351.
55. Moretti T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using Ampli Taq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 1998;25:716-722.

56. Du Z, Hood L, Wilson RK. Automated fluorescent DNA sequencing of polymerase chain reaction products. *Methods Enzymol* 1993;218:104-121.
57. Bassam BJ, Caetano GA, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;38:70-76.
58. Bonner G, Klibanov AM. Structural stability of DNA in nonaqueous solvents. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:339-344.
59. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-1651.
60. Ruano G, Brash DE, Kidd KK. PCR. The first few cycles. *Amplifications* 1991;7:1-4.
61. Scherezinger CA, Ladd C, Bourke MT, Adamowicz MS, Johannes PM, Scherezinger R. A systematic analysis of PCR contamination. *J Forensic Sci* 1999;44:1042-1055.
62. Ladd C, Adamowicz MS, Bourke MT, Scherezinger CA, Lee HC. A systematic analysis of secondary DNA transfer. *J Forensic Sci* 1999;44:1270-1272.
63. Bassam BJ, Caetano GA, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1991;196:80-83.
64. Blum B, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987;8:93-99.
65. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.

66. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 1989;17:6463-6471.
67. Frank WE, Llewellyn BE. A time course study on STR profiles derived from human bone muscle and bone marrow. *J Forensic Sci* 1999;44:778-782.