

**ADLİ DNA ANALİZLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE
MULTİPLEKS STR KİTİ OLUŞTURULMASI**

**DESIGN OF MULTIPLEX STR KIT FOR USING IN
FORENSIC DNA ANALYSIS**

İBRAHİM SEMİZOĞLU

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

**DESIGN OF MULTIPLEX KIT FOR USING IN FORENSIC
DNA ANALYSIS**

**ADLİ DNA ANALİZLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE
MULTİPLEKS STR KİTİ OLUŞTURULMASI**

İBRAHİM SEMİZOĞLU

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Supervisor

Submitted to Institute of Sciences of Hacettepe University
as a Partial Fulfillment to the Requirements
for the Award of the Degree of Doctor
in Biology

2016

İBRAHİM SEMİZOĞLU'nun hazırladığı “**Adli Dna Analizlerinde Kullanılmak Üzere Multipleks Str Kiti Oluşturulması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**’ nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Başkan

Prof. Dr. Hatice Mergen

Danışman

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Üye

Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN

Üye

Yrd. Doç. Dr. M. Mert SÖZEN

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.../.../2016

İBRAHİM SEMİZOĞLU

ÖZET

ADLİ DNA ANALİZLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE MULTİPLEKS STR KİTİ OLUŞTURULMASI

İbrahim SEMİZOĞLU

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Mayıs 2016, 122 sayfa

Adli DNA analizleri, gerek dayandığı bilimsel temeller ile ölçülebilir nicel sonuçlara ulaşılabilir olması gerekse doğrudan kişiler ile ilişkilendirilebilmesi sebepleri ile adli bilimlerin alanında altın standart olarak sınıflandırılan bilim dallarındandır. Bu sebeple adli kolluk güçlerinin ve adli yargı makamlarının suç olaylarının çözümünde deliller uygunsa mutlaka kullandıkları bir araçtır.

Günümüzde adli DNA analizleri olay yerinde bulunan delillerin üzerinde biyolojik artık tespitiyle başlar. Bulunan biyolojik artıklardan yeterli miktar DNA saflaştırıldıktan sonra elde edilen DNA profili, referans örnekler ve olay yerinden elde edilen diğer DNA profilleri ile karşılaştırılarak elde edilen uyum veya uyumsuzluklar rapor edilir. Son olarak elde edilen DNA profili –varsa- DNA Veri Bankasında taranır ve daha sonra elde edilecek profiller ile karşılaştırmak üzere DNA Veri Bankasına kaydedilirler.

DNA profili; insan hücrelerinden elde edilen ve yukarıda belirtildiği gibi insanlar arasındaki genetik çeşitliliği sağlayan gen bölgelerinin incelenmesi neticesinde ortaya çıkan “barkod” benzeri adlandırmalardır. Adli DNA analizlerinde yüksek polimorfizm göstermeleri sebebiyle STR bölgeleri kullanılır. Aynı anda onlarca Short Tandem Repeat (Ardışık Kısa Tekrarlı) bölgesinin analizi multipleks PZR kitleri ile standartlaştırılmıştır.

Ancak zaman içinde cihaz, yazılım ve PZR teknolojisi tekelleştirilmiş ve birbirine bağlı analizler zinciri oluşturularak DNA parçacık analizi ile bu analiz temelli yöntemle belirli bir çerçeveye sığdırılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında; mevcut STR kitlerinden daha yüksek ayırım gücüne sahip ve uluslararası standartlara uygun bir STR analiz yönteminin geliştirilmesi, geliştirilen bu analiz yöntemi ile elde edilen verilerin saklanması, analizi, arşivlenmesi, karşılaştırılması ve raporlanması ile ilgili sorunların çözümüne yönelik bir yazılım geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 17 STR bölgesine yönelik primerler dizayn edilmiş, fragment analizleri ve optimizasyon çalışmaları yapılmış, ayrıca analiz, değerlendirme ve formül algoritmaları yazılım dili ile kodlanmıştır.

Sonuç olarak PZR, Touchdown PZR, Kapiller Elektroferez teknikleri yanında analiz, formülasyon ve formül algoritmalarının yazılım dili ile kodlanarak yazılıma çevrilmesi ile aslında sadece adli DNA analizlerinde kullanılmak üzere STR tanı kiti oluşturulmamış, aynı zamanda farklı ve alternatif analiz kurgusu oluşturulmuştur. Ortaya çıkan analiz metodolojisi sadece adli DNA analizlerinde değil Fragment, Real-Time PZR ile sekans analizleri dâhil bir grup yöntemde de kullanılacak şekilde tamamlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: STR, DNA Parçacık Analizi, Adli DNA

ABSTRACT

DESIGN OF MULTIPLEX STR KIT FOR USING IN FORENSIC DNA ANALYSIS

İbrahim SEMİZOĞLU

Doctor of Biology, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

May 2016, 122 pages

Forensic DNA analysis is among the disciplines that are called as golden standards in forensic sciences due to both its ability to reach measurable quantitative results as a result of its scientific fundamentals and direct relations to the criminals. That's why it is certainly used if there is appropriate evidence by law enforcement and judicial authorities.

Forensic DNA analysis start with the determination of biological traces on crime scene evidence. The DNA profiles which are isolated after purifying necessary amount of DNA from these traces, are compared with the reference samples and other DNA profiles achieved from crime scene samples, then consistencies and non-consistencies reported. Finally DNA profile is compared with DNA Database if available and saved to the DNA Database to compare future profiles.

DNA profile is a naming similar to barcode which is achieved as a result of examining the gene regions which are isolated from humans' cells and as explained above provide the diversity among humans. In forensic DNA analysis STR loci are used as they show high polymorphism. Simultaneous analysis of several STR loci is standardized with multiplex PCR kits.

However equipment, software and PCR technology is monopolized in time and DNA fragment analysis and methods depend on this analysis are constricted in a narrow frame. Within the scope of this thesis it is aimed to develop a STR analysis method which is consistent with international standards and has a better discrimination power and also to develop a software to store, analyze, archive, compare and report the data gathered with this

newly developed analysis method. For this purpose primers for 17 STR loci were designed, fragment analysis and optimization studies done and also analysis, evaluation and formula algorithms were coded in software language.

As a result by converting analysis, formulation and formula algorithms to software by coding with software language among PCR, Touchdown PCR and Capillary Electrophoresis techniques there is not only the development of the kits also different and alternative analysis fiction is produced. This analysis methodology is developed not only for forensic DNA analysis but also to use in a group of methods which include Fragment, Real Time PCR and Sequence analysis.

Key words: STR, DNA Fragment Anlaysia, Forensic DNA



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca yol gösterici olan, çalışmanın ortaya konmasında özveriyle destek veren ve yol göstericiliğiyle hiç bımadan ve yılmadan bilgisini bana aktaran, tezimin her aşamasında yanımda olan sayın Prof. Dr.Hatice MERGEN'e,

Tezinin oluşmasında ve laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her sıkıntıda sabırla desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Çağatay KARAASLAN, Dr. Emel SAĞLAR, Dr. Beril ERDEM'e

Laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Tuğçe KARADUMAN, Merve ÖZCAN, Hayriye AKEL, Ofcan OFLAZ, Kerem SELÇUK ile lisans öğrencisi olarak öğrenimime başladığım 1995 yılından bugüne kadar ferdi olmaktan gurur duyduğum Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü ailesine,

Tezimin yazım aşamasında sabırla düzeltme ve kontrolleri yapan Aydın GÖK, Berrin DEĞİRMENCİ, H. Ceyda MISIRLIOĞLU ve Erdoğan DEĞER'e

Doktora eğitimimin başladığı günden bugüne kadar görev aldığım Emniyet Genel Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarları Dairesi, Türkiye Tıbbi Cihaz ve İlaç Kurumu Bilgi İşlem Dairesi, Analiz ve Kontrol Laboratuvarları Dairesi ile Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu Bilgi Teknolojileri Dairesi çalışanlarına,

Doktora eğitimimin boyunca vermiş oldukları destek için Nurullah ZENGİN, Yücel DENER, Yıldırım CESARETLİ ve Burak SEMİZOĞLU'na,

Literatür ve alan çalışmalarında destek ve özverileri için Ali BAYKAL, Z.İrem ERİŞ, Fatma KARADENİZ DURSUN ve Hayrettin DURSUN'a,

Proje desteği ve yardımları için Hüseyin BOZOĞLU, Muharrem YAKIN, Emre YOLAY, Rijad KONJHODZIC ve Tanju BASMACI'ya,

Yazılım çalışmalarında destekleri için Okan KÖYLÜ ve Musa ÖĞÜTLÜ'ye,

Tanıdığım ilk günden beri sabrı, desteği, sevgisi ile yılmadan hoşgörü ile yanımda olup; bıkip usanmadan çalışmamın her bir satır satırına katkı sağlayan, hedeflerime ulaşmamda en büyük desteğim eşim Özgül SEMİZOĞLU'na ve değerleri ailemizin her bir ferdine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Tarihçe.....	3
1.2.1. Kan Grubu Çalışmaları.....	3
1.2.2. Minisatellitler ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi	4
1.2.3. PZR Temelli Uygulamalar	4
1.2.3.1. Dot-Blot Analizi.....	5
1.2.3.2. Değişken Sayılı Ardışık Tekrar Dizileri (Variable Number of Tandem Repeat-VNTR)..	6
1.3. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (Short Tandem Repeat - STR).....	6
1.3.1. Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölge Çeşitleri.....	7
1.3.2. DNA Tiplendirmesinde Kullanılan Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölge Özellikleri.....	9
1.3.3. DNA Tiplendirmesinde Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölgelerinin Üstünlüğü.....	9
1.3.4. Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölgelerinin İsimlendirilmesi	10
1.4. Bu Tez Çalışmasında Oluşturulan Kıtte Bulunan STR Bölgelerinin Özellikleri	11
1.4.1. TH01	11
1.4.2. D14S1434.....	13
1.4.3. F13A1.....	13
1.4.4. CSF1PO.....	14
1.4.5. D16S539.....	15
1.4.6. D5S818.....	15
1.4.7. D18S51.....	16
1.4.8. D3S1358.....	18
1.4.9. D10S1248.....	19
1.4.10. vWA.....	20

1.4.11. D7S820.....	21
1.4.12. FGA.....	22
1.4.13. DYS460.....	24
1.4.14. D13S317.....	24
1.4.15. TPOX	25
1.4.16. D8S1179.....	26
1.4.17. D21S11.....	27
1.5. Kısa Ardışık Tekrar Dizilerinin Seçimi.....	31
1.5.1. Popülasyon Çalışmaları.....	31
1.5.2. Uluslararası Standartlar	34
1.5.3. Mevcut Ticari Kitler.....	34
1.6. Adli DNA Analizi Aşamaları.....	35
1.6.1. Biyolojik Örneklerin Tespiti ve Tanımlanması.....	36
1.6.2. DNA İzolasyonu.....	37
1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	38
1.6.3.1. Floresan Boyalar ve Floresan İşaretleme	39
1.6.4. DNA Miktar Tayini.....	40
1.6.5. Kapiler Elektropherez.....	41
1.7. Tiplendirme	45
1.7.1. Alel Nedir?.....	45
1.7.2. Alellerin Elektroferogramda Gösterilmesi - Pik	45
1.7.3. Size Marker (Büyüklik Markırı).....	46
1.7.4. Piklerin Temsil Ettiği DNA Parçacıklarının Uzunluğunun Tespiti.....	46
1.7.4.1. En Küçük Kare Yöntemi	47
1.7.4.2. Kübik Spline İnterpolasyon Metodu	48
1.7.4.3. Local Southern Method.....	49
1.7.4.4. Global Southern Method	51
1.7.5. Alelik Ladder	51
1.7.6. Kit-Panel-Marker-Bin	52
1.7.7. Alellerin Tespiti	52
1.8. STR Tiplendirmesini Karmaşıklaştıran Etkenler	53
1.8.1. Tekrar Kayması.....	53

1.8.2. Non-Template Ekleme	53
1.8.3. Mikrovaryant Aleller.....	54
1.8.4. Üç Alelli Örnekler.....	54
1.8.5. Alel Düşmesi (Drop-out) ve Null Aleller.....	54
1.8.6. Yansıma Pikler	54
1.8.7. Alelik Ladder Dışı Aleller.....	55
1.8.8. Bütünlüğü Bozulmuş DNA	55
1.8.9. Boya Artıkları.....	55
1.9. DNA Parçacık Analiz Yazılımları.....	55
1.9.1. GeneMapper DNA Analiz Yazılımı.....	56
2. MATERYAL-YÖNTEM	57
2.1. STR Bölgeleri için Floresan İşaretli Primerlerin Sentezlenmesi.....	57
2.2. Floresan İşaretli Primerler Kullanılarak Touchdown PZR Yapılması	58
2.3. Kapiler Elektroforez.....	59
2.4. Elektroforez Sonuçlarının Analiz Edilmesi.....	62
2.5. Kite Bulunacak STR Marker' ların Tespit Edilmesi ve Panellerin Oluşturulması	62
2.6. Panel Primer Karışımlarının PZR ve Kapiller Elektroforezinin Yapılması	62
2.7. Optimizasyonun Yapılması	62
2.8. Analiz Yazılımının Kodlanması.....	62
3. SONUÇ ve TARTIŞMA	66
3.1. Primerlerin Sentezlenmesi.....	66
3.2. Primer Çiftlerinin Çalışmalarının Tespiti.....	66
3.3. Primerlerin Bağlanma Derecelerinin Bulunması	70
3.4. Markır' ların Seçilmesi ve Panelin Oluşturulması	73
3.5. Kit Optimizasyonu	75
3.6 Kalıp DNA Aralığının Belirlenmesi.....	77
3.7 Alelik Ladder	82
3.8. DNA Fragment İnceleme Değerlendirme (DNA FinD) Yazılımı	83
3.9. Tartışma.....	89
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	106

TABLULAR

Tablo 1.1. D3S1358 STR bölgesinin isimlendirilmesi.....	11
Tablo 1.2. TH01 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	12
Tablo 1.3. F13A1 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	13
Tablo 1.4. CSF1PO STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	14
Tablo 1.5. D16S539 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	15
Tablo 1.6. D5S818 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	16
Tablo 1.7. D18S51 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	17
Tablo 1.8. D3S1358 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	18
Tablo 1.9. D10S1248 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makale.....	19
Tablo 1.10. vWA STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler.....	20
Tablo 1.11. D7S820 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	21
Tablo 1.12. FGA STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler.....	22
Tablo 1.13. DYS460 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler.....	24
Tablo 1.14. D13S317 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makale.....	25
Tablo 1.15. TPOX STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	26
Tablo 1.16. D8S1179 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	27
Tablo 1.17. D21S11 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler	28
Tablo 1.18. STR Bölgelerinin ayırım güçleri (PD).....	35
Tablo 1.19. Genel biyolojik deliller ve tespit edilme yöntemleri.....	37
Tablo 2.1. Sentezlenen primerler ile elde edilen en büyük ve en küçük amplikonların büyüklükleri	58
Tablo 2.2. Analiz çeşidine göre kullanılacak polimer ve kapiler ile uygulanacak süre tablosu.....	60
Tablo 2.3. Genetik Analiz Cihazı dosyası .fsa dökümünün bir bölümü.....	63
Tablo 3.1. 2 nolu STR Bölgesi primer karışımları kombinasyonlarına göre beklenen uzunlukları gösterir tablo.....	67
Tablo 3.2. 2 nolu STR Bölgesi 1 nolu primer karışımı ile farklı ısı derecelerinde yapılan PZR ile elde edilen verileri gösterir tablo.....	72
Tablo 3.3. 2 nolu STR bölgesi primer karışımları kombinasyonlarına göre beklenen ve elde edilen uzunlukları gösterir tablo	73
Tablo 3.4. Geliştirilen Kit içeriğindeki STR bölgelerinin popülasyonlara göre ayırım gücü ve toplam ayırım gücü (PI).....	91
Tablo 3.5. Türkiye genelinde yapılan bölgesel popülasyon çalışmalarında elde edilen ayırım gücü verileri.	92

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik görüntüsü.....	5
Şekil 1.2. Bir referans örneğe ait HLA-DQA1 ampikon görüntüsü.....	5
Şekil 1.3. Bir referans örneğe ait Amplitype® PM polimarkır sistem görüntüsü	5
Şekil 1.4. D1S80 sistemi jel görüntüsü	6
Şekil 1.5. 2. derece en küçük kareler boyut isimlendirme eğrisi.....	47
Şekil 1.6. 3. derece en küçük kareler boyut isimlendirme eğrisi.....	48
Şekil 1.7. Kübik Spline İnterpolasyon Metodu.....	49
Şekil 1.8. Local Southern Method.....	50
Şekil 1.9. Global Southern Metodu.....	51
Şekil 1.10. Genemapper yazılımında veri işleme yolu.....	53
Şekil 2.1. Çoklu kitte kullanılan floresan boyalar için cihazda oluşturulan matriks	60
Şekil 2.2. Genetik Analiz cihazları veri giriş başlıkları	61
Şekil 2.3. Yürütme parametrelerinin belirlendiği ekran görüntüsü.....	61
Şekil 2.4 Yazılımın hazırlanmasında kullanılan belgelerden alınan örnek sayfa.....	64
Şekil 3.1. 2 nolu STR bölgesinin 1 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	67
Şekil 3.2. 2 nolu STR bölgesinin 2 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	68
Şekil 3.3. 2 nolu STR bölgesinin 3 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	68
Şekil 3.4. 2 nolu STR bölgesinin 4 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	68
Şekil 3.5. 2 nolu STR bölgesinin 5 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	69
Şekil 3.6. 2 nolu STR bölgesinin 6 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	69
Şekil 3.7. 2 nolu STR bölgesinin 7 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	69
Şekil 3.8. 2 nolu STR bölgesinin 8 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	70
Şekil 3.9. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü	70
Şekil 3.10. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının aynı primer karışımı ile tekrar PZR 'sinden elde edilen elektroferogram görüntüsü.....	71

Şekil 3.11. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının tekrar hazırlanması ile yapılan PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü.	71
Şekil 3.12. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının tekrar hazırlanan karışımın ikinci PZR ile yapılan toplamda dördüncü çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü.....	71
Şekil 3.13. 58 °C' elektroferogram görüntüsü	72
Şekil 3.14. 60 °C' de elektroferogram görüntüsü	72
Şekil 3.15. 62 °C' de elektroferogram görüntüsü	72
Şekil 3.16. 64 °C' de elektroferogram görüntüsü	72
Şekil 3.17. 66 °C' elektroferogram görüntüsü.....	72
Şekil 3.18. 68 °C' de elektroferogram görüntüsü	72
Şekil 3.19. Floresan ile işaretli paneldeki STR bölgelerinin primer konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü.	74
Şekil 3.20. Primer konsantrasyonlarının düşürülmesi ile PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü.	75
Şekil 3.21. FAM / JOE floresan boya ile işaretli primerlerin aynı primer konsantrasyonları ile elektroferogram görüntüsü	75
Şekil 3.22. FAM / JOE floresan boya ile işaretli primerlerin primer konsantrasyonları değiştikten sonra elektroferogram görüntüsü	75
Şekil 3.23. ATTO550 ile işaretli primerlerin katılması ile elde edilen elektroferogram görüntüsü.	76
Şekil 3.24. Primer konsantrasyonlarının dengelenmesi ile elde edilen elektroferogram görüntüsü	76
Şekil 3.25. 1 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü.	76
Şekil 3.26. 1,5 µl ile elektroferogram görüntüsü.....	76
Şekil 3.27. 2 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü	76
Şekil 3.28. 2,5 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü	76
Şekil 3.29. 3 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü	76
Şekil 3.30. 0,5 ng kalıp DNA ile yapılan çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü.	77
Şekil 3.31. 1 ng kalıp DNA ile yapılan çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü.	78
Şekil 3.32. 3 ng kalıp DNA ile yapılan çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü.	79
Şekil 3.33. 4 ng kalıp DNA ile yapılan çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü	80
Şekil 3.34. 5 ng kalıp DNA ile yapılan çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü.	81
Şekil 3.35. Alellik Ladder' a ait elektroferogram görüntüsü.....	82
Şekil 3.36. DNA FinD ana menü	84
Şekil 3.37. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme bilgi ekranı.	85
Şekil 3.38. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme koşulları bilgi ekranı.	85

Şekil 3.39. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme bilgi ekranı ham veri grafik ekranı.....	86
Şekil 3.40. DNA FinD analiz modülü.....	86
Şekil 3.41. DNA FinD analiz modülü panel detay bilgi ekranı.....	87
Şekil 3.42. DNA FinD analiz modülü pik detay bilgi ekranı.....	87
Şekil 3.43. DNA FinD import ekranı.....	88
Şekil 3.44. DNA FinD export ekranı.....	88
Şekil 3.45. DNA FinD veri bankası ekranı.....	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
Da	Dalton
kV	Kilo Volt
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram

Kısaltmalar

STR	Short Tandem Repeat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
ABI	Applied Biosystems Instrument
INTERPOL	International Police
EUROPOL	European Police
CODIS	Combined DNA Index System
MLP	Multi-Locus Probing
SLP	Single-Locus Probing
RFLP	Restriction-Fragment Length Polymorphism
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
SSRs	Simple Sequence Repeats
FSS	Forensic Science Service
PD	Power of Discrimination
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes
UV	Ultraviolet
pH	Power of Hydrogene
CCD	Charged Coupled Device
RFU	Relative Flouresence Unit
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
LOH	Loss of Heterozygosity
SNP	Single Nucleotid Length Polymorphism
TBE	Tris-Borat EDTA

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Adli DNA analizleri, gerek dayandığı bilimsel temeller ile ölçülebilir nicel sonuçlara ulaşılabilir olması gerekse doğrudan kişiler ile ilişkilendirilebilmesi nedeni ile adli bilimlerin alanında altın standart olarak sınıflandırılan bilim dallarındandır. Bu sebeple adli kolluk güçlerinin ve adli yargı makamlarının suç olaylarının çözümünde deliller uygunsa mutlaka kullandıkları bir araçtır.

Adli DNA analizleri, 1980'li yıllardan bu yana özellikle çalışmalarda kullanılan cihazların, kitlerin ve analiz yazılımlarının birbirine entegre olması sebebi ile tekelleşme sıkıntısı yaşamaktadır. Aşağıda belirtilen analiz basamaklarında alternatif yöntemler geliştirilmesi mümkün olur ise bu tekelleşme engellenebilir.

Günümüzde adli DNA analizlerinde yaygın olarak kullanılan cihazlar ve bu cihazlar üzerinde çalışan DNA analiz yazılım programı dışında bir iki deneme yazılımı haricinde yaygın başkaca yöntem kullanılmamaktadır.

Ancak zaman içinde başkaca büyük kurumlar kit üreterek, kullanılan kitler için ticari bir rekabet getirmiş olsalar da, bu kitlerin verilerini analiz edecek bir yazılım programı geliştirilmemiş olup kitler mevcut yönteme adapte edilmiştir.

Mevcut analiz yazılımı, kısa tekrar dizileri (Short Tandem Repeat - STR) analizleri dışında kullanılan fonksiyonları sebebi ile kullanıcı dostu değildir. Ayrıca özellikle DNA analizleri için alelik ladder ihtiyacı vardır.

Alelik ladder, her STR bölgesi için bilinen tüm alellere ait fragmentleri içermektedir. Ticari kit üreticisi tüm firmaların bu alelleri toplayarak bir araya getirmesi veya sentetik olarak üretmesi gibi bir zorunluluk ve zorluk getirmektedir.

Dolayısı ile alelik ladderı bir kere üretmek yeterli olmayıp her yürütme grubu için kullanılacak şekilde üreterek kite eklemek gerekmektedir. Çünkü mevcut yaygın olarak kullanılan analiz yazılımı ile her yürütme grubunda mutlaka bir adet alelik ladder yürütme gerekliliği vardır.

Ticari kiti üretmek isteyenler 16 STR bölgesi standart bir DNA kiti için yaklaşık 160 ile 250 arasında değişik sayıda ve dizide alelleri de üretmek ve cihazlara tanıtmak zorundadır. Bu zorunluluk, hem oluşturulacak olan kitin maliyetini arttırmakta hem de standart ve optimize olarak alel karışımını canlı ve üretilebilir tutmak için gerekli yatırım ve çalışmaların

yapılması zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu zorunluluklar sebebi ile üretici firma sayısı artmadığı gibi pazar tekelleşmekte ve ürün fiyatı yüksek maliyetlerde kalmakta özellikle bu konuda dışa bağımlı olan ülkemiz için yıllık beş milyon TL üzerinde bir dış harcama kalemi oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasının temel hipotezlerinden biri alternatif bir algoritma geliştirilerek Alelik Ladder yerine bilinen DNA profiline sahip bir örnek kullanılarak alellerin tespitinin mümkün olabileceğidir. Alelik Ladder yazılım ile belirlenen parçacık uzunluğunda oluşabilecek kaymaların tespit edilerek ortadan kaldırılmasında kullanılır. İleriki bölümlerde detaylı olarak anlatılacak olan bu analiz yönteminde Alelik Ladder yerine profili dolayısı ile temsil edildiği alel uzunlukları bilinen bir örneğin verilerinin kullanılması aynı şekilde ortaya çıkabilecek kaymaların tespitinde ve giderilmesinde kullanılabilir.

Kit üretmek için bir başka engel de kullanılan floresan boyalardır. Mevcut cihazların okuyabildiği dalga boyunda ışımaya yapabilecek boyalar yine aynı cihazı üreten firmalarca patentlenmiş olduğundan kit üretirken primerlerin işaretlenmesi için bu boyaların satın alınması gereklidir. Boya ücretleri de eklendiğinde geliştirilecek kitin maliyeti artacak ve yine mevcut ürünlere rekabetçi olamayacaktır.

Yine bu tez çalışması ile patentli boyalar yerine alternatif patentsiz boyların kullanımının mümkün olduğu gösterilecektir. Bu boyalar ileride geliştirilecek benzer kitler ve deney yöntemlerinde de kullanılabilir.

Sonuçların analiz edilmesi için kullanılan yazılım üretici firma kitleri ve firma tarafından üretilen diğer yazılım programları ile bütünleşmiş olduğundan sonuçların değerlendirilmesi, arşivlenmesi diğer sonuçlarla karşılaştırılması veya raporlanması aşamaları için ya yine aynı firmaca üretilen yazılımlar kullanılacak ya da sonuçlar manuel olarak elle veya dijital formatlarda diğer yazılımlara taşınacaktır. Baştan sona bütünleşmiş otomatize bir sistem kurulmak istenirse bu ancak mevcut cihaz kit üretici yazılımları ile mümkün olacaktır.

Sadece STR analizleri için değil, diğer elektroforetik analizler veya real-time temeline dayanan genetik kitlerin analizi için de yaygın kullanılan bu yazılımı sadece cihaz üzerinde satın alıp cihaz başında kullanmak zorunda kalınmaktadır. Cihazlar bilgi güvenliği ve virüs ataklarına karşı herhangi bir ağa dâhil edilemediklerinden uzaktan bağlanarak yazılımı kullanmak mümkün değildir. Kullanıcıların kendi bilgisayarlarında yazılımı kullanabilmesi için paylaşım satın alınması gerekmektedir. Laboratuvarlar ek bir ücret ödemek istemedikleri için tüm çalışanlar aynı kullanıcı adı ile cihaz yazılımını kullanmaktadırlar.

Aynı kullanıcı adı kullanılınca da laboratuvar çalışanlarının yaptığı işlemler kişiye özel olarak izlenememektedir.

Yazılım sonucunda elde edilen bulguların raporlanması için otomatik bir yöntem geliştirmek mümkün değildir. Üretici kendi yazılımına bütünleşmiş analiz programları üretmiş olsa da bu programlar hem maliyetli olup hem de ticari kitlelere özgüdür. AR-GE çalışması yapan standart bir laboratuvar için otomatize bir zincir oluşturmak ve sonuçları arşivlemek, karşılaştırmak veya raporlamak bu yazılımlar ile mümkün değildir. Böyle bir sistem kurmak için manuel veya dijital veri taşınmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak tez çalışmasının önerisi öncelikle uluslararası kullanılabilir, ayırım gücü yüksek, muadillerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılabilir sonuçlar veren ve tüm otorite kurum veya kuruluşların /(INTERPOL, EUROPOL, CODIS v.b.) standartlarına uyan bir kit geliştirirken bu kitin analizinde kullanılacak yazılımının yapılabilirliği ve bu yazılımın alternatif bir analiz yöntemi ile çalışabileceğidir. Bahse konu alternatif yazılım, yeni kitlerin üretilmesinde karşılaşılan ve yukarıda anlatılan sorunlara çözüm olmasının yanında üretilen tüm genetik kitlerin verisinin analiz edilmesi, saklanması, arşivlenmesi, karşılaştırılması ile raporlanmasını da sağlayabilmeli ve her kullanıcı bu yazılımı kendi bilgisayarında kullanabilecek niteliğe sahip olabilir.

1.2. Tarihçe

1.2.1. Kan Grubu Çalışmaları

Biyolojik delillerin ve özellikle adli DNA analizleri için toplanan delillerin amacı, suçlu ya da kurbanı işlemek ya da aklamak için bilinen bir kişinin mukayeselenmesi yoluyla menşei bilinmeyen biyolojik örneğin doğru bir şekilde tanımlanmasını yapmaktır. Karl Landsteiner insanlarda şu an A, B ve 0 olarak sınıflandırılan üç kan tipini gözlemlemiştir. Landsteiner'in çalışması kan transferini güvenli hale getirmiş ve aynı zamanda bu çalışma kendisine 1930 yılında Nobel Tıp ödülünü kazandırmıştır [1]. Bu keşiften 15 yıl sonra İtalyan bilim adamı Leone Lattes forensik alanda AB0 testini ilk uygulayan kişi olmuştur [2].

AB0 gruplama sistemi, bireyin biyolojik örneğin kaynağı olarak dışlanmasında kullanışlı olmasına rağmen örneğin kaynağının belirlenebilmesi için çok ta kullanışlı değildir. Bir bireyin yanlışlıkla bir olaya dâhil edilme şansı, kan grubu sistemi içinde sınırlı çeşitlilik olmasından ve A ve 0 alellerinin sıklığının fazla olmasından dolayı yüksektir [3,4]. Kan grubu tayini bireyleri birbirinden ayırmak için kullanılan, birkaç dakika içinde sonuç verebilen fakat çok fazla bilgi vermeyen ilk genetik araç olmuştur. Daha sonraki 70 yıl içinde

Rh, MN, Kell, Duffy ve Kidd gibi diğer kan faktörleri ile ilintili AB0 test sistemi birey tanımlamasında birincil metod olarak kullanılmıştır. Kan grup sistemi ile polimorfik protein ve enzim sistemleri, frekansı düşürmek ve böylece sonuçların daha güvenli bir hale gelmesi için birlikte kullanılmıştır [5].

1.2.2. Minisatellitler ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

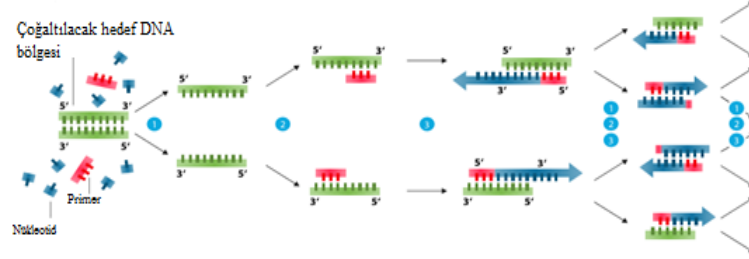
Kan grubu belirleme yöntemi ile yapılan inceleme 1985 yılında yapılan büyük keşife kadar sürmüştür. Çoklu bölge problama (multi locus probing - MLP) tekniği ilk kez 1986 yılında İngiltere’ de kullanılmıştır [6]. DNA profillemesi için geliştirilen bu ilk yöntem multilokus testleri olarak isimlendirilmiştir. Farklı bireyler arasında çeşitlilik gösteren ardışık tekrar DNA sekanslarını veya “minisatellit” dizilerini keşfeden Alec Jeffreys ve çalışma arkadaşları bu yaklaşımın öncülüğünü yapmışlardır. Minisatellitler 300-10.000 bp boyutu arasında sıralanan [7] ve 10-100 bp uzunluğunda tekrar eden çekirdek birimleri içermektedir [8]. Jeffreys minisatellitlerdeki çekirdek birimlerinin tekrar sayılarının kişiden kişiye göre değiştiğini ve ‘multi-lokus prob’ tekniğinin biyolojik materyalden şahıs tespitinin yapılabileceğini bulmuştur [9]. Bu fragmentler uzun minisatellitleri ve onların flanking bölgelerini içerir. Fragmentler boyutlarına göre ayrıldıkları jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulurlar ve daha sonra birçok minisatellit bölgeye hibridize olan multilokus problemler kullanılarak görünür hale getirilir. Bu barkoda benzeyen bir örnek oluşturur. Minisatellitleri betimleyen restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmini (Restriction Fragment of Length Polymorphism - RFLP) de içeren çok çeşitli akronimler vardır. Bu genel terim restriksiyon bölgeleri arasındaki uzunluk farklılıklarının ortaya çıkardığı tüm polimorfizmleri işaret etmektedir.

1.2.3. PZR Temelli Uygulamalar

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodunun bulunması ve gelişmesinden sonra [10], [11], [12] DNA analizlerinin hassaslığı, az miktarda DNA içeren örnekler artık amplifikasyondan sonra analizlenebildiğinden dolayı kayda değer şekilde artmıştır. Hatta degrade olmuş DNA örnekleri bir dereceye kadar çoğaltılabilmektedir. Otomatik sekanslama ve fragment uzunluk analiz tekniklerinin geliştirilmesi çoğaltılmış DNA analizlerini kolaylaştırmıştır (Şekil 1.1).

PZR tekniği DNA’nın küçük bir bölgesinin çok sayıda üretilmesinde kullanılır. Bu işlem sıklıkla “moleküler kopyalama” olarak tabir edilmektedir. PZR işlemi temel olarak üç basamaktan meydana gelir. İlki 95°C’de gerçekleştirilen çift zincirli kalıp DNA’nın denatürasyonu, bu basamağı takiben PZR primerlerinin daha düşük sıcaklıkta kalıp DNA’ya

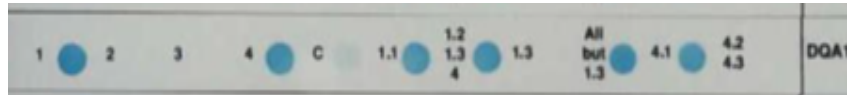
bağlanması ve son olarak 72°C’de gerçekleşen uzama basamağıdır. Uzama basamağı polimeraz enziminin en uygun düzeyde çalışmasına izin veren sıcaklıkta gerçekleşir. İleri ve geri primerler çoğaltılacak bölgenin sınırlarını belirler ve çoğaltılmış ürünün gerçek boyutunu tanımlar.



Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik görüntüsü

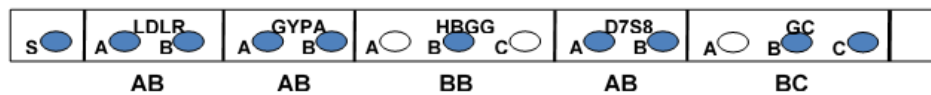
1.2.3.1. Dot-Blot Analizi

Forensik alanda PZR’ye dayalı ilk DNA analiz metotlarından biri, kromozom 6 üzerinde yer alan 242 baz çiftilik HLA-DQA1 (insan lökosit antijen hücre yüzey proteini) genindeki polimorfizmleri analiz etmek için kullanılan bir “dot blot” tekniğidir [13], [14] (Şekil 1.2). Bu polimorfizm moleküler probolar kullanılarak belirlenir ve bu probolar bu lokusun farklı alellere tamamlayıcı olarak dizayn edilmiş sentetik DNA fragmentleridir. Sadece tek lokus sınırlı çeşitlilik ile analizlenebildiğinden ayırım gücü RFLP metodu kadar iyi değildir. Söz konusu metodun en büyük avantajı az miktardaki örneği analizleme yeteneği ve analizlerin hızıdır [15], [16].



Şekil 1.2. Bir referans örneğe ait HLA-DQA1 amplikon görüntüsü

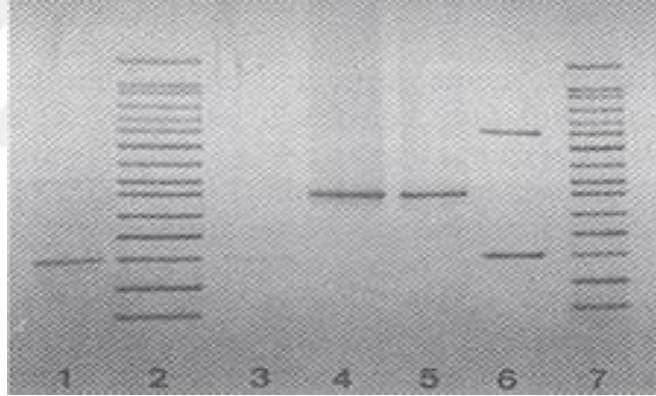
Amplitype® PM polimarkır sistemi HLA DQα/HLA DQA1 metodunun genişletilmiş bir versiyonudur. Bu sistem, ayırım gücünü arttırmak için farklı lokuslardaki beş markırı bir araya getirmiştir [17]. Bu sistemin dezavantajı birden fazla katılımcının olduğu durumlarda DNA analizlerinin karmaşıklaşmasıdır. Birden fazla prob bulunduğundan, tiplendirme koşullarındaki küçük değişimler dot blot sonuçlarının yoğunluğunda çeşitliliğe yol açabilir ve bu durum da karışık örneklerin yorumlanmasını zorlaştırır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Bir referans örneğe ait Amplitype® PM polimarkır sistem görüntüsü

1.2.3.2. Değişken Sayılı Ardışık Tekrar Dizileri (Variable Number of Tandem Repeat-VNTR)

DNA profillemeye gelişmesindeki bir diğer aşama aynı RFLP tekniğini kolay hale getirmiştir bununla birlikte ürünü görünür hale getirmek için kullanılan proplar, bir seferde sadece tek bir lokusu hedefleyecek şekilde değiştirilmiştir. Bu sistemler 1988 yılından sonra forensik dünyaya tanıtılmış olup, İngiltere ve Yeni Zelanda'da tek bölge probları (single-lokus proplar – SLP) Amerika da ise VNTR olarak anılmıştır. Söz konusu analizde MLP'lerin aksine tek bir bölgeye özgü proplar kullanılmaktadır ve bu analiz sonucunda bir ya da iki bant ortaya çıkmaktadır. Bunun gibi bölgeler için PZR tekniğinin uygulanması rapor edilmiştir [18]. D1S80 sistemi 16bç'lik VNTR dizi analizlerini kapsayan bir uzunluk polimorfizmidir. Tekrar sayısı 16-41 arasındadır [19] ve yüzlerce baz çiftlik bir yelpazede DNA fragmentleri ortaya çıkmaktadır [20]. Bu sistemin avantajı karışık örneklerin ele alınmasındaki üstünlüğü ve ayırımının kolaylığıdır. Bununla birlikte, sadece tek bir lokus uzunluk çeşitliliği için incelendiğinden ayırım gücü o kadar da güçlü değildir. SLP'ler 1993 sonuna kadar kullanılmıştır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. D1S80 sistemi jel görüntüsü

1.3. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (Short Tandem Repeat - STR)

Minisatellit VNTR alelleri (~400-1000bç) ile kıyaslandığında STR alellerinin küçük boyutu (~100-400 bç) STR markırlarını degrade DNA'nın yaygın olduğu adli uygulamalar için daha uygun aday haline getirmiştir. Degrade DNA örneklerinin PZR ile çoğaltılması, RFLP gibi daha eski teknolojilerde çok zor hatta imkânsız olduğundan küçük ürün boyutlu STR bölgeleri ile daha iyi başarılabilir. Geniş VNTR alellerini (20.000 bç) belirlemek için biyolojik örnek içerisinde yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA molekülüne ihtiyaç duyulmaktadır. Minisatellit markırlarındaki daha küçük alellerin tercihli amplifikasyonun sebep olduğu geniş alellerde meydana gelen alel düşmesi (allelic drop-out) minisatellit bölgeleri ile çalışmak için önemli bir problemdir [21]. Dahası, DNA fragmentlerinin tek baz

ayırma duyarlılığı denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak 500bp'nin altındaki boyutlar ile daha kolay elde edilebilir. Böylece, hem biyolojik hem de teknolojik nedenlerden ötürü minisatellit VNTR'leri ile kıyaslandığında daha küçük olan STR'ler avantajlıdır.

Ökaryotik genomlar tekrarlayan DNA dizileri ile doludur [22]. Bu tekrarlayan DNA dizileri farklı boyutlarda biraraya gelir. Tipik olarak bir çekirdek tekrar birimi ve birbiri ile bitişik tekrar biriminin sayısı veya tekrar bölgesinin toplam uzunluğu ile belirlenir. 2 ila 7 bp uzunluğunda tekrar birimlerine sahip DNA bölgeleri mikrosatellit, basit dizi tekrarları (Simple sequence repeat - SSRs) veya en yaygın olarak kısa ardışık tekrarlar (STRs) olarak adlandırılırlar.

Mikrosatellit bölgeler popülasyonlar içinde çok değişkendirler ve diğer nükleer bölgelere oranla çok daha yüksek mutasyon oranı sergilemektedirler [23]. Mikrosatellit bölgede görülen çeşitlilik, aleller arasındaki temel motifin tekrar sayısında farklılıklardan ortaya çıkar ve yeni aleller muhtemelen DNA replikasyonu süresince polimerazın tekrar motifi atlaması ve atlanan bu motifin bulunduğu zincirin yanlış eşleşmesi ki bu da bir tekrar ünitesi ya da bir tekrar ünitesinin küçük bir kısmının kaybı ile ortaya çıkar [24], [25], [26].

STR bölgeleri, diferansiyel amplifikasyon problemleri olmaksızın polimeraz zincir reaksiyonu ile kolayca çoğaltılabildikleri için popüler DNA tekrar markırları haline gelmişlerdir. Bunun nedeni, tekrar büyüklüğü küçük olduğundan, heterozigot bireyden gelen her iki alelin birbirine benzer boyutta olmasıdır. STR markırların tekrar sayıları, bireyler arasında çok çeşitlilik gösterebildiğinden bu durum STR'leri birey kimliklendirme amacı için etkili bir hale getirmiştir. STR analizlerinde mikrosatellit bölgeler her iki uca özellikli primerler ile çoğaltılır, elektroforez yöntemi ile ayrıştırılır ve fragmentlerin uzunlukları belirlenir [27].

1.3.1. Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölge Çeşitleri

STR'ler tekrar eden baz sayısı ve tekrar eden motiflerin özelliğine göre farklılık göstermektedirler. Tekrar eden baz sayılarına göre;

- i. Dinükleotid Tekrarlar: İki bazlık bloğun tekrar etmesi ile meydana gelir (Örn. CACACACACA). Genomda çok fazla sayıda bulunmaktadır. PZR sırasında çok fazla çatallı pik oluştururlar.
- ii. Trinükleotid Tekrarlar: Üç bazlık bloğun tekrar etmesi ile meydana gelirler (Örn. AATAATAATAAAT).

- iii. Tetranükleotid Tekrarlar: Dört bazlık bloğun tekrar etmesi ile meydana gelir (Örn. AGATAGATAGATAGATAGAT). Diğer STR'lere göre çok daha az stutter ürünü oluşturmaktadır.
- iv. Pentanükleotid Tekrarlar: Beş bazlık bloğun tekrar etmesi ile meydana gelirler (Örn. AATGTAATGTAATGTAATGTAATGT).
- v. Hegzanükleotid Tekrarlar: Altı bazlık bloğun tekrar etmesi ile meydana gelir (Örn. CCATGTCCATGTCCATGTCCATGT)

Çok çeşitli STR sistemleri arasında, tetranükleotid tekrarlar di- ya da trinükleotid tekrarlarına göre daha popüler hale gelmiştir. Penta- ve hegzanükleotid tekrarlar insan genomunda daha az yaygın olarak bulunmaktadır [28].

Stutter olarak bilinen biyolojik fenomen, STR alelleri PZR ile çoğaltığında ortaya çıkmaktadır. Stutter ürünleri gerçek alelden bir ya da daha fazla tekrar biriminin eksik olduğu ve PZR işlemi sırasında zincir kaymasından dolayı ortaya çıkan ampliconlardır [29]. STR lokusuna bağlı olarak stutter ürünleri tetranükleotit tekrarların gerçek alel ürünlerinin %15'i kadar ya da daha fazla olabilmektedir. Di- ve trinükleotitler ile çalışıldığında stutter yüzdesi %30'ların bile üzerine çıkabilmektedir ve bu durum da karışık örneklerin yorumlanmasını güçleştirmektedir. Ek olarak; tetranükleotit tekrara sahip aleller arasındaki dört bazlık boşluk, birbirine yakın heterozigot alellerin boyuta dayalı elektroforetik ayırımları iki baz ya da üç bazlık farkın bulunduğu di- ve trinükleotitlere göre daha kolay olmaktadır. Forensik araştırmalarda analizlenen STR'ler genellikle 150-400 bp uzunluğunda tetranükleotid bölgeleridir [30].

DNA tiplendirmesinde tetranükleotit STR bölgelerinin VNTR minisatellitler ya da di- ve trinükleotit tekrarlı STR'lere göre avantajları;

- Multipleks oluşturmaya izin veren dar alel boyut aralığı,
- Daha küçük alellerin tercihli amplifikasyonundan kaynaklanan alel düşmesinin oluşmasını azaltan dar alel boyut aralığı,
- Küçük boyutlu PZR ürünleri ortaya çıkardığından degrade olmuş DNA örneklerinden profil elde etme yeteneği,
- Karışık örneklerin yorumlanmasını kolaylaştıran dinükleotit tekrarlara kıyasla daha az çatallı pik oluşumu.

Tekrar motiflerine göre;

- i. Basit (Simple): Aynı tekrar bloğunun ardarda sıralanması ile meydana gelir. TH01 STR bölgesi bu grup için bir örnek teşkil etmektedir. AATG tekrar motifi 5 ila 11 kez tekrar etmektedir.
- ii. Bileşik (Compound): İki veya daha fazla komşu basit tekrardan meydana gelir. vWA STR bölgesi bu grupta yer almaktadır. TCTA ve TCTG tekrar bloklarının $TCTA(TCTG)_{3-4}(TCTA)_n$ şeklinde biraraya gelmesi ile oluşur.
- iii. Kompleks (Complex): Kompleks tekrarlar da araya giren değişken dizilerin yanısıra farklı uzunluktaki birimlerin birkaç tekrar bloğundan oluşur. D21S11 bu grupta yer almaktadır ve $(TCTA)_{4-6}(TCTG)_{5-6}(TCTA)_3TA(TCTA)_3TCA(TCTA)_2TCCATA(TCTA)_{8-16}TC$ yapısındadır.

STR bölgelerinin bütün alelleri tamamlanmış tekrar birimleri içermez. Basit tekrarlar bile tam tekrar birimlerine sahip aleller arasına denk gelen nonkonsensüs aleller içerir. Mikrovaryantlar tamamlanmamış tekrar birimlerini içeren alellerdir [31], [32].

1.3.2. DNA Tiplendirmesinde Kullanılan Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölge Özellikleri

Birey tanımlama uygulamalarındaki aday STR bölgeleri için seçici kıstas aşağıdaki nitelikleri içermektedir [33, 34]:

- Yüksek ayırım gücü, genellikle >0.9 ve gözlenen heterozigotluk $>70\%$
- Birbiri ile yakın bağlantılı bölgeler olmadığından emin olmak için farklı kromozom lokasyonları,
- Diğer markırlar ile biraraya getirildiklerinde sonuçların sağlamlığı ve tekrar üretilebilirliği,
- Düşük stutter oluşturma,
- Düşük mutasyon oranı ve
- Degrade olmuş DNA örnekleri ile çalışmaya uygun 90-500bp uzunluk aralığında aleller.

1.3.3. DNA Tiplendirmesinde Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölgelerinin Üstünlüğü

PZR temelli STR'lerin, büyük VNTR'lerin konvansiyonel Southern Blotlama tekniğine göre avantajları vardır. STR markırları ile elde edilen genotiplerin mukayesesi laboratuvarlar arasında kolaylıkla yapılabilir. Ek olarak; degrade DNA' yı da içeren küçük miktarlarda DNA (0.1-1 ng) STR' ler ile tiplendirilebilir. Tekrar dizileri küçük olduğundan

dolayı degrade DNA, geniş VNTR dizilerine göre STR-markırları ile daha az problem yaşamaktadır. Böylece, DNA örneğinin miktar ve bütünlüğü, geleneksel RFLP metotlarına göre PZR temelli STR analizlerinde daha az sorun çıkarmaktadır.

- Diğer avantaj, radyoaktif probalar kullanıldığında 6-8 hafta, floresan probalar kullanıldığında 1 hafta süren RFLP analizlerinden daha hızlı olmasıdır.
- Bu metot MLP ve SLP teknikleri ile karşılaştırıldığında daha az maliyetli olduğu kadar örneklerin verimliliği de artmıştır [35].
- STR-PZR tekniğinin SLP tekniğine göre avantajı STR pik boyunun doğru ve açık bir şekilde ölçülebilmesidir [36].
- DNA'nın daha küçük parçaları analiz edilebildiğinden degrade olmuş DNA örneklerinden profil elde etmeyi mümkün hale getirmiştir [37], [38], [39].
- STR metodu ile ortaya çıkarılan DNA profilleri otomatik olarak veritabanına atılabilir ve DNA analiz işlemlerinin başlangıcından itibaren otomatize edilebilir [40]
- STR profilleri bir seri alelden meydana gelir, her lokusta her ebeveynden kalıtılan iki alel vardır. Bu durum, faili meçhul olaylardan ve bilinen suçlulardan elde edilen profilleri içeren bir veritabanı kurulumunu kolaylaştırmaktadır.
- Ek olarak, çoklu bölge tiplendirmesi tek bir multipleks reaksiyon ile gerçekleştirilebilir [41], [42], [43].
- İnsan genomunda çok sayıda STR bölgesi bulunduğu için, tekniğin ayırıcı gücü için bir sınır bulunmamaktadır [44].

1.3.4. Kısa Ardışık Tekrar Dizi Bölgelerinin İsimlendirilmesi

STR markırları buldukları kromozom üzerindeki lokasyonları ya da ilişkili oldukları genin isminden köken alırlar. Örneğin, TPOX insan tiroid peroksidaz geni içinde yer aldığı için bulunduğu genin ismini alır. Aynı durum TH01 için de geçerlidir. Bu gen insan 11. Kromozomunda yer alan tirozin hidroksilaz genidir. TH01'in "01" kısmı söz konusu tekrar bölgesinin tirozin hidroksilaz geninin 1. intronunda yer aldığını göstermektedir. Bazen HUM ön eki, söz konusu bölgenin insan genomunda yer aldığını göstermek için lokus adının önünde kullanılır. Böylece TPOX ve TH01 HUMTPOX ve HUMTH01 olarak listelenebilir [45].

Genlerle ilişkili olmayan markırlar kromozomal pozisyonları ile tanımlanırlar. Tablo 1.1' e aktarıldığı üzere D3S1358 isimlendirmesinde D; markırın DNA üzerinde olduğunu, 3; kromozom 3 üzerinde yer aldığını, S; tek kopya olduğunu “single copy DNA” terimi ile karıştırılmamalıdır, buradaki ifade başka bir kromozom lokasyonunda bulunmadığı anlamındadır), 1358 ise bu STR markırınının 3. kromozom üzerinde tanımlanan 1358. lokus olduğunu ifade eder.

Tablo 1.1. D3S1358 STR bölgesinin isimlendirilmesi

D3S1358	
D	DNA
3	3.Kromozom
S	Tek kopya dizisi
1358	3.kromozom üzerinde tanımlanmış 1358.lokus

1.4. Bu Tez Çalışmasında Oluşturulan Kite Bulunan STR Bölgelerinin Özellikleri

Tez çalışması kapsamında oluşturulan çoklu PZR kiti TH01, D14S1434, F13A1, D16S539, D5S818, D18S51, D3S1358, D10S1248, vWA, D7S820, FGA, CSF1PO, DYS460, D13S317, TPOX, D8S1179, D21S11 ve Amelogenin bölgelerinden oluşmaktadır. Amelogenin gen bölgesi STR bölgesi olmamasına rağmen kit içeriğinde yer almaktadır. Bu gen bölgesi X ve Y kromozomları üzerinde kodlanmakta ve X kromozomu üzerinde bulunan amelogenin bölgesinde 6 bç'lik delesyon bulunmaktadır. Bu özelliğinden dolayı erkek ve dişi bireylerin ayırımında kullanılmaktadır. STR bölgelerinin yanısıra söz konusu gen bölgesi kite eklenerek cinsiyet belirleme için ayrıca bir çalışma yapmaya gerek kalmamıştır. Aynı şekilde özellikle cinsel suçlarla ilgili örneklerin analizleri yapılırken elde edilen genotipin dişi bireyden mi erkek bireyden mi geldiğinin ayırımının tam olarak yapılması ve Y kromozomu üzerinde yer alan Amelogenin gen bölgesinde meydana gelen mutasyon nedeni ile erkek bireylerin yanlışlıkla dişi birey olarak tanımlanmasının [135] önüne geçmek için Y kromozomu üzerinde yer alan DYS460 bölgesi de eklenmiştir. Bu tezde kullanılan STR bölgelerinin belirlenme kriterleri ise bir sonraki başlıkta (1.5) irdelenmiştir.

1.4.1. TH01

Diğer İsim: HUMTH01, TC11 (İnsan tirozin hidroksilaz geninin 1. intronu)

Sitogentikal lokalizasyon: 11p15.5-p15

Tekrar dizisi: AATG (Genellikle Kullanılan)

TCAT (GenBank)

Büyüklik Aralığı: 3-14

Özellikleri: 11. Kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan tirozin hidroksilaz geninin birinci intronunda bulunan basit tetranükleotid tekrardır. Lokusun adı tirozin hidroksilaz ve intron 1 (örn:01) kelimelerinin ilk harflerinden ortaya çıkmıştır. Söz konusu lokus bazen yanlış olarak “0” yerine “O” harfi kullanılarak TH01 olarak da belirtilmektedir. TH01, literatürde TC11 ve HUMTH01 olarak da yer almaktadır. Tekrar motifi genellikle, GenBank referans dizisinde tamamlayıcı zincir için doğru olan AATG olarak referans verilmektedir. Beyaz ırkta ortaya çıkan genel mikrovaryant alel, alel 10’daki tek bir baz delesyonu nedeniyle [46] ve 9.3 aleli olarak adlandırılmıştır [47]. TH01 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.2’ de verilmiştir.

Tablo 1.2. TH01 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
3	[AATG] ₃	[103]
4	[AATG] ₄	[104]
5	[AATG] ₅	[105]
6	[AATG] ₆	[105]
6.3	[AATG] ₃ ATG[AATG] ₃	[108]
7	[AATG] ₇	[105]
8	[AATG] ₈	[105]
8.3	[AATG] ₅ ATG[AATG] ₃	[105]
9	[AATG] ₉	[105]
9.3	[AATG] ₆ ATG[AATG] ₃	[105]
10	[AATG] ₁₀	[105]
10.3	[AATG] ₆ ATG[AATG] ₄	[105]
11	[AATG] ₁₁	[105]
12	[AATG] ₁₂	[106]
13.3	[AATG][AACT] [AATG] ₈ ATG[AATG] ₃	[107]

Varyant Aleller: 5.3, 6.1, 7.1, 7.3, 9.1, 14

Bulunduğu Multiplex Kitler: CTT, CTTV, AmpFISTR Identifiler, AmpFISTR Identifiler Direct, AmpFISTR Identifiler Plus, AmpFISTR NGM, AmpFISTR NGM Select, AmpFISTR GlobalFiler, AmpFISTR VeriFiler, AmpFISTR SGM Plus, AmpFISTR COfiler, AmpFISTR Profiler, AmpFISTR SEfiler, AmpFISTR SEfiler Plus, AmpFISTR Green I, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex

Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Hexaplex ESS Kit, Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}, Genome LabTM Human STR Primer Set.

İlk Yayını: [48,49]

1.4.2. D14S1434

Sitogentikal lokalizasyon: 14q32.13

Tekrar dizisi: [AATG]_n[CTAT]_n

Büyüklik Aralığı: 13-21

Aleller: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Bulunduğu Multipleks Kitler: Yok.

1.4.3. F13A1

Diğer İsim: FXIII A01

Sitogentikal lokalizasyon: 6p24-p25

Tekrar dizisi: [AAAG]

Büyüklik Aralığı: 3-17 (Tablo 1.3)

Tablo 1.3. F13A1 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellere ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
3	[AAAG] ₃	[109]
3.2	[AAAG] ₄ A—AAAA	[110]
4	[AAAG] ₄ AGTAAAA	[110]
5	[AAAG] ₅	[110]
6	[AAAG] ₆	[110]
7	[AAAG] ₇	[110]
8	[AAAG] ₈	[110]
9	[AAAG] ₉	
10	[AAAG] ₁₀	
11	[AAAG] ₁₁	[110]
12	[AAAG] ₁₂	[110]
13	[AAAG] ₁₃	[110]
14	[AAAG] ₁₄	[110]
15	[AAAG] ₁₅	[110]
16	[AAAG] ₁₆	[110]
17	[AAAG] ₁₇	

Bulunduğu Multipleks Kitler: FFV, FFFL, British Quadruplex

İlk Yayını: [50]

1.4.4. CSF1PO

Diğer İsim: CSF

Sitogentikal lokalizasyon: 5q33.1, CSF-1 reseptör geni için insan c-fms proto-onkogeni 6. intron.

Tekrar dizisi: [AGAT] GenBank üst zincir (genellikle kullanılan)

Size range: 5-16

Özellikler: 5. Kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan reseptör CSF-1 için c-fms proto-onkogenin altıncı intronunda bulunan basit tetranükleotid tekrarlı bir STR lokusudur. AGAT çekirdek tekrarından oluşur ve boyutu 5 ile 17 tekrar arasında değişir [51]. CSF1PO STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.4' te verilmiştir.

Tablo 1.4. CSF1PO STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
6	[AGAT] ₆	[111]
7	[AGAT] ₇	[112]
8	[AGAT] ₈	[113]
9	[AGAT] ₉	[113]
10	[AGAT] ₁₀	[113]
10.3		[111]
11	[AGAT] ₁₁	[113]
12	[AGAT] ₁₂	[113]
13	[AGAT] ₁₃	[113]
14	[AGAT] ₁₄	[111]
15	[AGAT] ₁₅	[111]

Varyant Aleller: 5, 6.3, 7.3, 8.3, 9.1, 9.3, 10.1, 10.2, 11.1, 11.3, 12.1, 16.

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR NGM, AmpFlSTR NGM SElect, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR MiniFiler, AmpFlSTR SGM Plus, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR Profiler, AmpFlSTR SEfiler, AmpFlSTR SEfiler Plus, AmpFlSTR Blue, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Triplex AFS QS Kit, Investigator Triplex DSF Kit Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}.

1.4.5. D16S539

Diğer İsim: D16

Sitogentikal lokalizasyon: 16q24.1

Tekrar dizisi: [GATA]

Büyüklik Aralığı: 4-16

Özellikler: 16. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan basit tetranükleotid tekrarıdır. Bu lokus 4 ile 16 tekrar boyutunda sıralanan alellere sahip GATA tekrarına sahiptir [52]. D16S539 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.5' de verilmiştir.

Tablo 1.5. D16S539 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
5	[GATA] ₅	[114]
8	[GATA] ₈	[114]
9	[GATA] ₉	[114]
10	[GATA] ₁₀	[114]
11	[GATA] ₁₁	[114]
12	[GATA] ₁₂	[114]
13	[GATA] ₁₃	[114]
14	[GATA] ₁₄	[114]
15	[GATA] ₁₅	[114]

Varyant Aleller: 4, 6, 7, 8.3, 9.3, 11.3, 12.1, 12.2, 13.1, 13.3, 14.3, 16

Bulunduğu Multipleks Kitler: FFV, FFFL, British Quadruplex

1.4.6. D5S818

Diğer İsim: D5

Sitogentikal lokalizasyon: 5q23.2

Tekrar dizisi: [AGAT]

Büyüklik Aralığı: 6-18

Özellikler: 5. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan basit tetranükleotid tekrarıdır. Bu lokus 4 ile 29 tekrar boyutunda sıralanan alellere sahip AGAT tekrar birimine sahiptir. Üretilen ticari kitlerde D5S818 küçük boyutlu lokuslardan birisidir ve degrade DNA örneklerinde diğer bazı lokuslara göre daha sıklıkla belirlenebilecektir. Bu STR bölgesinde sadece birkaç nadir mikrovaryant ile tekrarın 55bç downstream kısmında bir G→T mutasyonu rapor edilmiştir [53]. D5S818 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.6' da verilmiştir.

Tablo 1.6. D5S818 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Alleller	Tekrar dizisi	Referans
7	[AGAT] ₅	[114]
8	[GATA] ₈	[114]
9	[GATA] ₉	[114]
10	[GATA] ₁₀	[114]
11	[GATA] ₁₁	[114]
12	[GATA] ₁₂	[114]
13	[GATA] ₁₃	[114]
14	[GATA] ₁₄	[114]
15	[GATA] ₁₅	[114]
16		Profil Plus

Varyant Alleller: 6, 10.1, 11.1, 12.3, 17, 18

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR Profiler, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit.

1.4.7. D18S51

Diğer İsim: D18S379, UT574

Sitogentikal lokalizasyon: 18q21.33

Tekrar dizisi: [GAAA]

Büyüklik Aralığı: 6-18

Özellikler: 18. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan basit AGAA tetranükleotid tekrarıdır. Alleller, 5.3-40 tekrar boyutunda sıralanmaktadır. X.2 alel varyantlarının sayısı, 3' flanking bölgede bulunan AG baz çiftinin kaybının sebep olduğu 2bç'lik delesyon nedeni ile ortaya çıkmaktadır. D18S51 için 70'den fazla alel rapor edilmiştir ki bu durum D18S51 lokusunu genel olarak kullanılan lokusların en polimorfiklerinden biri haline getirmektedir [54]. D18S51 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.7' de verilmiştir.

Tablo 1.7. D18S51 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
8	[AGAA] ₈	[104]
9	[AGAA] ₉	[104]
9.2		SGM Plus
10	[AGAA] ₁₀	[104]
10.2		SGM Plus
11	[AGAA] ₁₁	[104]
12	[AGAA] ₁₂	[104]
13	[AGAA] ₁₃	[104]
13.2	[AGAA] ₁₃	[115]
14	[AGAA] ₁₄	[104]
14.2	[AGAA] ₁₄	[115]
15	[AGAA] ₁₅	[104]
15.2	[AGAA] ₁₅	[115]
16	[AGAA] ₁₆	[104]
17	[AGAA] ₁₇	[104]
17.1		SGM Plus
17.2	[AGAA] ₁₇	[116]
18	[AGAA] ₁₈	[104]
19	[AGAA] ₁₉	[104]
19.2	[AGAA] ₁₉	[116]
20	[AGAA] ₂₀	[104]
21	[AGAA] ₂₁	[104]
22	[AGAA] ₂₂	[104]
23	[AGAA] ₂₃	[104]
23.1		SGM Plus
24	[AGAA] ₂₄	[104]
25	[AGAA] ₂₅	[104]
26	[AGAA] ₂₆	[104]
27	[AGAA] ₂₇	[104]

Varyant Aleller: 6, 10.1, 11.1, 12.3, 17, 18

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFI STR Identifiler, AmpFI STR Identifiler Direct, AmpFI STR Identifiler Plus, AmpFI STR NGM, AmpFI STR NGM SElect, AmpFI STR GlobalFiler, AmpFI STR MiniFiler, AmpFI STR SGM Plus, AmpFI STR Profiler Plus, AmpFI STR Profiler Plus ID, AmpFI STR Sinofiler, AmpFI STR SEfiler, AmpFI STR SEfiler Plus, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator HDplex Kit, Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}, Mentype® Chimera®, Genome Lab™ Human STR Primer Set.

İlk Yayını: [55]

1.4.8. D3S1358

Diğer İsim: -

Sitogentikal lokalizasyon: 3p21.31

Tekrar dizisi: [AGAT], [TCTA]

Büyüklik Aralığı: 8-20

Özellikler: 3. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan bileşik tetranükleotid tekrarıdır. Bu lokus hem TCTA hem de TCTG tekrar birimine sahiptir ve aleller 6 ile 26 tekrar boyutunda sıralanır [50]. D3S1358 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.8' de verilmiştir.

Tablo 1.8. D3S1358 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Alleler	Tekrar dizisi	Referans
12		SGM Plus
13	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₀	[117]
14	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₁	[118]
15	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₁	[118]
15'	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₂	[118]
16	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₂	[118]
16'	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₃	[117]
16.2		[119]
17	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₃	[118]
17'	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₄	[117]
18	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₄	[118]
19	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₅	[117]
20		[117]

Varyant Alleler: 8, 8.3, 9, 10, 11, 14.3, 15.1, 15.2, 15.3, 17.1, 17.2, 18.1, 18.2, 18.3

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFI STR Identifiler, AmpFI STR Identifiler Direct, AmpFI STR Identifiler Plus, AmpFI STR NGM, AmpFI STR NGM SElect, AmpFI STR GlobalFiler, AmpFI STR SGM Plus, AmpFI STR Profiler Plus, AmpFI STR Profiler Plus ID, AmpFI STR COfiler, AmpFI STR Sinofiler, AmpFI STR Profiler, AmpFI STR SEfiler, AmpFI STR SEfiler Plus, AmpFI STR Blue, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit,

Investigator Triplex DSF Kit, Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}, Genome Lab™ Human STR Primer Set.

İlk Yayını: [56]

1.4.9. D10S1248

Diğer İsim: CHLC.GGAA23C05

Sitogentikal lokalizasyon: 10q26.3

Tekrar dizisi: [GGAA]_n

Büyüklik Aralığı: 8-20

Özellikler: 10. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan ve 7 ile 19 GGAA tekrarına sahip basit tetranükleotid tekrar dizisidir. Bu lokus miniSTR olarak çoğaltılabilir ve degrade örneklerde iyi çalışan bir lokustur [57]. D10S1248 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.9' da verilmiştir.

Tablo 1.9. D10S1248 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makale

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
8	[GGAA] ₈	[120]
9	[GGAA] ₉	[120]
10	[GGAA] ₁₀	[120]
11	[GGAA] ₁₁	[120]
12	[GGAA] ₁₂	[120]
13	[GGAA] ₁₃	[120]
14	[GGAA] ₁₄	[120]
15	[GGAA] ₁₅	[120]
16	[GGAA] ₁₆	[120]
17	[GGAA] ₁₇	[120]
18	[GGAA] ₁₈	[120]
19	[GGAA] ₁₉	[120]

Varyant Aleller: 8, 8.3, 9, 10, 11, 14.3, 15.1, 15.2, 15.3, 17.1, 17.2, 18.1, 18.2, 18.3

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFISTR NGM, AmpFISTR NGM SElect, AmpFISTR GlobalFiler, AmpFISTR VeriFiler, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Hexaplex ESS Kit, Mentype® Pentaplex ESS.

1.4.10. vWA

Diğer İsim: vWF, VWA31A

Sitogentikal lokalizasyon: 12p13.31

Tekrar dizisi: [GGAA]_n

Büyüklik Aralığı: 8-20

Özellikler: 12. Kromozomun kısa kolu üzerindeki von Willebrand Factor geninin 40. İntronunda bulunan bileşik tetranükleotid tekrarıdır. VWA literatürde aynı zamanda vWF ve vWA olarak da yer almaktadır. vWA lokusu alel boyutu 10 ile 25 tekrar boyutunda sıralanan, TCTG tekrar dizisinin aralarında yer aldığı TCTA tekrar motifine sahiptir [51]. vWA STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.10' da verilmiştir.

Tablo 1.10. vWA STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Alleller	Tekrar dizisi	Referans
10	TCTA TCTG TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₃	[104]
11 (13')	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₇	[105]
12	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₇	[121]
13	[TCTA] ₂ [TCTG] ₄ [TCTA] ₃ TCCA[TCTA] ₃	[104]
13 (15)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₈ TCCA TCTA	[105]
13 (15'')	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₀	[105]
14 (16'')	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₁	[105]
14' (16''')	TCTA TCTG[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₄ [TCTA] ₃ TCCA [TCTA] ₃	[105]
15 (17)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₀ TCCA TCTA	[105]
15 (17')	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₁ TCCA TCTA	[105]
15.2		[121]
16 (18)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₁ TCCA TCTA	[105]
16 (18')	TCTA[TCTG] ₃ [TCTA] ₁₂ TCCA TCTA	[105]
17 (19)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₂ TCCA TCTA	[105]
18 (20)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃ TCCA TCTA	[105]
18' (20')	TCTA[TCTG] ₅ [TCTA] ₁₂ TCCA TCTA	[105]
18.1	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₂ A TCTA TCCA TCTA	[122]
19 (21)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₄ TCCA TCTA	[105]
20 (22)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₅ TCCA TCTA	[105]
21 (23)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₆ TCCA TCTA	[105]
22 (24)	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₇ TCCA TCTA	[105]

Varyant Alleller: 16.1, 18.2, 18.3, 19.2, 23, 24, 25

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR NGM, AmpFlSTR NGM SElect, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR VeriFiler, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Hexaplex ESS Kit, Mentype® Pentaplex ESS.

İlk Yayını: [58].

1.4.11. D7S820

Diğer İsim: D7

Sitogentikal lokalizasyon: 7q21.11

Tekrar dizisi: [GATA]

Büyüklik Aralığı: 5-16

Özellikler: 7. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan basit tetranükleotid tekrarıdır. Bu lokus başlıca 5 ile 16 tekrar boyutunda sıralanan alellere sahip GATA tekrarına sahiptir. Bununla birlikte birçok mikrovaryant alel rapor edilmiştir. Bazı durumlarda x.1 ve x.3 alelleri büyük ihtimal ile çekirdek GATA tekrarının 13 baz downstream kısmında ortaya çıkan poly(T) kuyruğunda bulunan T nükleotid sayısındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Sekans çalışmaları x.3 alelinin 8, x.1 alelinin ise 10 ardışık T bazı içerirken Alelik Ladder 'da yer alan alellerin 9 ardışık T bazı içerdiğini ortaya çıkarmıştır [59]. D7S820 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.11' de verilmiştir.

Tablo 1.11. D7S820 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellere ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
6	[GATA] ₆	[114]
7	[GATA] ₇	[114]
8	[GATA] ₈	[114]
9	[GATA] ₉	[114]
10	[GATA] ₁₀	[114]
11	[GATA] ₁₁	[114]
12	[GATA] ₁₂	[114]
13	[GATA] ₁₃	[114]
14	[GATA] ₁₄	[114]
15		Profil Plus

Varyant Aleller: 5, 5.2, 6.2, 6.3, 7.1, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.3, 11.1, 11.3, 12.1, 12.2, 12.3, 13.1, 14.1, 16.

Bulunduğu Multipleks Kitler: GammaSTR™, AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR MiniFiler, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR COfiler, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR Profiler, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit.

1.4.12. FGA

Diğer İsim: FIBRA

Sitogentikal lokalizasyon: 4q28, insan alfa fibrinojen geninin üçüncü intronunda yer alır.

Tekrar dizisi: [TTTC]₃TTTTTCT[CTTT]_nCTCC[TTCC]₂ GenBank üst zincir

Büyüklik Aralığı: 12.2-51.2

Özellikler: 4. Kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan human alfa fibrinojen lokusunun üçüncü intronunda yer alan bileşik tetranükleotid tekrarlı bir STR lokusudur. FGA aynı zamanda literatürde FIBRA veya HUMFIBRA olarak da yer almaktadır. Lokus, dejenere tekrarların her iki yanında yer alan bir CTTT tekrarı içermektedir. Rapor edilmiş aleller 12.2 tekrar ile 51.2 tekrar arasında sıralanmaktadır. Çekirdek tekrar motifin hemen önündeki bölgede bulunan CT baz çiftinin çıkması ile meydana gelen 2bç'lik delesyon, x.2 mikrovaryant alellerin ortaya çıkmasına neden olur [51]. FGA STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.12' de verilmiştir.

Tablo 1.12. FGA STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
15	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₇ CTCC[TTCC] ₂	[123]
16	[TTTC] ₃ TTTTTCT[CTTT] ₈ CTCC[TTCC] ₂	[124]
16.1	[TTTC] ₃ TTTTTCT[CTTT] ₅ T[CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₂	[104]
16.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₉ CTCC[TTCC] ₂	[124]
17	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₉ CTCC[TTCC] ₂	[123]
18	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₀ CTCC[TTCC] ₂	[123]
18.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₁ CTCC[TTCC] ₂	[123]
19	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₁ CTCC[TTCC] ₂	[123]
19.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₂ CTCC[TTCC] ₂	[124]
20	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₂ CTCC[TTCC] ₂	[123]
20.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₃ CTCC[TTCC] ₂	[123]
21	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₃ CTCC[TTCC] ₂	[123]
21.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₄ CTCC[TTCC] ₂	[124]
22	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₄ CTCC[TTCC] ₂	[123]
22.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₅ CTCC[TTCC] ₂	[123]
23	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₅ CTCC[TTCC] ₂	[123]

23.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₆ CTCC[TTCC] ₂	[123]
24	TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₆ CTCC[TTCC] ₂	[123]
24.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₇ CTCC[TTCC] ₂	[123]
25	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₇ CTCC[TTCC] ₂	[123]
25.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₈ CTCC[TTCC] ₂	[124]
26	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₈ CTCC[TTCC] ₂	[123]
26.2	TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₁₉ CTCC[TTCC] ₂	[124]
27	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₉ CTCC[TTCC] ₂	[123]
27'	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₃ CCTT[CTTT] ₅ CTCC[TTCC] ₂	[104]
27.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₂₀ CTCC[TTCC] ₂	[124]
28	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₂₀ CTCC[TTCC] ₂	[123]
28.2	[TTTC] ₃ TTTT TT [CTTT] ₂₁ CTCC[TTCC] ₂	[124]
29	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₅ CCTT[CTTT] ₅ CTCC[TTCC] ₂	[123]
30	[TTTC] ₃ TTTT TTCT[CTTT] ₁₆ CCTT[CTTT] ₅ CTCC[TTCC] ₂	[124]
30.2	TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₄ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC [TTCC] ₄	[123]
31.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₅ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC [TTCC] ₄	[104]
32.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₆ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC [TTCC] ₄	[104]
33.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₇ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC [TTCC] ₄	[104]
34.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₈ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[123]
42.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₈ [CTGT] ₄ [CTTT] ₁₃ [CTTC] ₄ [CTTT] ₃ CTCC [TTCC] ₄	[104]
43.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₈ [CTGT] ₅ [CTTT] ₁₃ [CTTC] ₄ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]
44.2	[TTTC] ₄ TTTTTT [CTTT] ₁₁ [CTGT] ₃ [CTTT] ₁₄ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]
45.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₀ [CTGT] ₅ [CTTT] ₁₃ [CTTC] ₄ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]
46.2	[TTTC] ₄ TTTTTT [CTTT] ₁₂ [CTGT] ₅ [CTTT] ₁₃ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[123]
47.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₂ [CTGT] ₅ [CTTT] ₁₄ [CTTC] ₃ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]
48.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₄ [CTGT] ₃ [CTTT] ₁₄ [CTTC] ₄ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]
50.2	[TTTC] ₄ TTTT TT [CTTT] ₁₄ [CTGT] ₄ [CTTT] ₁₅ [CTTC] ₄ [CTTT] ₃ CTCC[TTCC] ₄	[104]

Varyant Aleller: 12.2, 13, 13.2, 14, 14.3, 15.3, 17.1, 17.2, 18.1, 19.1, 19.3, 20.1, 20.3, 21.1, 21.3, 22.1, 22.3, 23.1, 23.3, 24.1, 24.3, 25.1, 25.3, 26.1, 26.3, 27.1, 27.3, 28.1, 29.1, 29.2, 31, 32, 32.1, 33.1, 34.1, 35.2, 41.1, 41.2, 42, 42.1, 43.1, 44, 44.3, 45, 45.1, 46, 46.1, 47, 48, 49, 49.1, 49.2, 50.3, 51, 51.2.

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR NGM, AmpFlSTR NGM SElect, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR MiniFiler, AmpFlSTR SGM Plus, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR Profiler, AmpFlSTR SEfiler, AmpFlSTR SEfiler Plus, AmpFlSTR Blue, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Triplex AFS QS Kit, Investigator Triplex DSF Kit Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}.

İlk Yayını: [60]

1.4.13. DYS460

Diğer İsim: Y-GATA-A7.1

Sitogentikal lokalizasyon: Y

Tekrar dizisi: [ATAG]_n GenBank üst zincir.

*Orijinal makale bu bölgeyi GATA tekrarı olarak bildirmektedir [61]

Büyükklük Aralığı: 7-13 (Tablo 1.13).

Tablo 1.13. DYS460 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
7	[ATAG] ₇	[125]
9	[ATAG] ₈	[125]
10	[ATAG] ₉	[125]
11	[ATAG] ₁₀	[125]
12	[ATAG] ₁₁	[125]
13	[ATAG] ₁₂	[126]

Varyant Aleller: Yok.

Bulunduğu Multipleks Kitler: Yok.

1.4.14. D13S317

Diğer İsim: D13

Sitogentikal lokalizasyon: 13q31.1

Tekrar dizisi: [GATA]_n= Alt zincir (genellikle kullanılan); [TATC]_n= GenBank üst zincir

Büyüklik Aralığı: 7-15

Özellikler: 13. Koromozomun uzun kolu üzerinde yer alan basit TATC tetranükleotid tekrarından meydana gelir. Genel aleller 5 ile 17 tekrar birimi içermektedir. Farklı primer setleri ile alel sıralamasının etkilenebileceği çekirdek TATC tekrarının 24 baz downstream kısmında rapor edilmiş bir 4bç'lik delesyon bulunmaktadır [62], [63]. D13S317 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.14' te verilmiştir.

Tablo 1.14. D13S317 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makale

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
7	[TATC] ₇	[114]
8	[TATC] ₈	[114]
9	[TATC] ₉	[114]
10	[TATC] ₁₀	[114]
10'	[TATC] ₁₀ AATC	[114]
11	[TATC] ₁₁	[114]
12	[TATC] ₁₂	[114]
13	[TATC] ₁₃	[114]
14	[TATC] ₁₄	[114]
15	[TATC] ₁₅	[114]

Varyant Aleller: 7.1, 8.1, 11.1, 11.3, 13.3, 14.3, 16, 17.

Bulunduğu Multipleks Kitler: GammaSTR™, AmpFI STR Identifiler, AmpFI STR Identifiler Direct, AmpFI STR Identifiler Plus, AmpFI STR GlobalFiler, AmpFI STR MiniFiler, AmpFI STR Profiler Plus, AmpFI STR Profiler Plus ID, AmpFI STR Sinofiler, AmpFI STR Profiler, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit.

1.4.15. TPOX

Diğer İsim: hTPO, TPO

Sitogentikal lokalizasyon: 2p25.3, İnsan tiroid peroksiz geninin 10. intronunda yer alır.

Tekrar dizisi: [AATG] GenBank üst zincir (genellikle kullanılan)

Büyüklik Aralığı: 4-16

Özellikler: 2. kromozomun kısa kolunun en ucuna yakın Tiroid peroksizaz geninin 10. intronunda bulunan basit tetranükleotid tekrar dizisidir. Bu STR lokusu, basit AATG alellerinden oluşur. Bu STR lokusu, 4 ile 16 tekrar arasında sıralanan alellere sahip basit

AATG tekrar motifine sahiptir [51]. TPOX STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.15' de verilmiştir.

Tablo 1.15. TPOX STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
6	[AATG] ₆	[127]
7	[AATG] ₇	[128]
8	[AATG] ₈	[113]
9	[AATG] ₉	[113]
10	[AATG] ₁₀	[113]
11	[AATG] ₁₁	[113]
12	[AATG] ₁₂	[113]
13	[AATG] ₁₃	[128]
14	[AATG] ₁₄	[112]

Varyant Aleller: 4, 5, 7.3, 10.1, 10.3, 13.1, 15, 16.

Bulunduğu Multipleks Kitler: CTT, CTTV, AmpFI STR Identifiler, AmpFI STR Identifiler Direct, AmpFI STR Identifiler Plus, AmpFI STR GlobalFiler, AmpFI STR COfiler, AmpFI STR Profiler, AmpFI STR Green I, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Genome Lab™ Human STR Primer Set.

İlk Yayını: [64]

1.4.16. D8S1179

Diğer İsim: D6S502

Sitogenetik lokalizasyon: 8q24.13.

Tekrar dizisi: [TATC] GenBank üst zincir (FSS-Forensic Science Service- tarafından [TCTA] olarak isimlendirilmiştir)

Büyüklik Aralığı: 7-20

Özellikler: 8. kromozom üzerinde bulunan bileşik tetranükeotid tekrar dizisidir. Cooperative Human Linkage Center veritabanındaki etiketleme hatasından dolayı D8S1179, FSS 'in önceki yayınlarında D6S502 olarak listelenmiştir [65, 66]. Bu lokus öncelikle TCTA alellerinden oluşur. Buna karşılık 13 tekrardan büyük tüm aleller için motife TCTG tekrar birimi girer ve bu bölge de genellikle tekrar bölgesinin 5' ucunun ikinci veya üçüncü pozisyonudur [67]. Alellerin boyutu 7 ile 20 tekrar aralığındadır. D8S1179 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.16' da verilmiştir.

Tablo 1.16. D8S1179 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Alleller	Tekrar dizisi	Referans
7	[TCTA] ₇	[104]
8	[TCTA] ₈	[115]
9	[TCTA] ₉	[115]
10	[TCTA] ₁₀	[115]
11	[TCTA] ₁₁	[115]
12	[TCTA] ₁₂	[115]
13	[TCTA] ₁ [TCTG] ₁ [TCTA] ₁₁	[115]
14	[TCTA] ₁ [TCTG] ₁ [TCTA] ₁₂	[115]
15	[TCTA] ₁ [TCTG] ₁ [TCTA] ₁₃	[115]
16	[TCTA] ₂ [TCTG] ₁ [TCTA] ₁₃	[115]
17	[TCTA] ₂ [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₃	[115]
18	[TCTA] ₂ [TCTG] ₁ [TCTA] ₁₅	[115]
19	[TCTA] ₂ [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	[104]

Varyant Alleller: 10.2, 12.3, 15.1, 15.3, 17.1, 20.

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR NGM, AmpFlSTR NGM SElect, AmpFlSTR GlobalFiler, AmpFlSTR SGM Plus, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR SEfiler, AmpFlSTR SEfiler Plus, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}, Genome LabTM Human STR Primer Set.

1.4.17. D21S11

Diğer İsim: -

Sitogentikal lokalizasyon: 21q21.1

Tekrar dizisi: [TCTA], [TCTG]= GenBank üst zincir

Büyüklik Aralığı: 12-43.2

Özellikler: 21. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan kompleks tetranükleotid tekrarıdır. Çeşitli sayıdaki TCTA ve TCTG tekrar blokları, sabit 43 bazlık [TCTA]₃ TA [TCTA]₃ TCA [TCTA]₂ TCCA TA dizisini çevreler. X.2 mikrovaryant aleli başlıca tekrar bölgesinin 3' ucuna 2bç'lik TA insersiyonu ile ortaya çıkmaktadır [68]. D21S11, fragment uzunluğuna dayalı uzunluk ayırım metodları ile kolaylıkla belirlenebilecek bölgelere göre daha fazla

polimorfik yapı barındırmaktadır. D21S11'in alel yapısındaki ince farklılıklar sadece DNA dizileme tekniği ile ortaya çıkarılabilir. Çünkü, alellerin birçoğu aynı boyutta fakat farklı internal dizi yapısına sahiptir. Örneğin, fragment uzunluğuna dayalı metodlarla ayırımı yapılamayan 30 tekrarlı 4 farklı alel bulunmaktadır [69]. D21S11 STR bölgesinin tekrar dizisi ve referans makaleleri Tablo 1.17' de verilmiştir.

Tablo 1.17. D21S11 STR bölgesinin tekrar dizisi ve alellerine ait referans makaleler

Aleller	Tekrar dizisi	Referans
12		
24	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₆	[104]
24.2	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₆	[129]
25	[TCTA] ₄ [TCTG] ₃ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[129]
25.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[104]
26	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₈	[130]
26.1		SGM Plus
27	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₉	[130]
27'	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₈	[130]
27''	[TCTA] ₅ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₉	[104]
28	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[130]
28'	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₉	[131]
28.2	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[104]
28.2'	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₈ TA TCTA	[131]
29	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[130]
29'	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[131]
29.1	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₆ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	GenBank AP000433
29.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀ TA TCTA	[131]
30	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[130]
30'	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[131]

30''	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[129]
30'''	[TCTA] ₆ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀	[132]
30.1		SGM Plus
31	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[104]
31'	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[130]
31''	[TCTA] ₆ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[131]
31'''	[TCTA] ₇ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[129]
31.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁ TA TCTA	[130]
32	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[130]
32'	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[131]
32.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂ TA TCTA	[130]
32.2'	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃ TA TCTA	[132]
32.2''	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₂ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃ TA TCTA	[132]
33	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₄	[131]
33.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃ TA TCTA	[130]
33.2'	[TCTA] ₆ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃ TA TCTA	[132]
33.2''	[TCTA] ₆ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂ TA TCTA	[132]
33.3	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₈ TCA [TCTA] ₂ TA TCTA	[132]
34	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[132]
34'	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₅	[131]
34.2	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₄ TA TCTA	[130]
34.3	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₀ TCA [TCTA] ₄ TA TCTA	[132]
35	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[132]
35'	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	
35.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₅ TA TCTA	[131]

36	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[132]
36'	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[104]
36''	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[132]
36.2	[TCTA] ₅ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₆ TA TCTA	[131]
37	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[132]
37'	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[133]
37.2	[TCTA] ₇ [TCTG] ₁₄ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
37.2'	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₂ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
37.2''	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₃ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[134]
37.2'''	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
37.2''''	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[134]
38	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[132]
38'	[TCTA] ₁₃ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[104]
38''	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[132]
38'''	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₁	[132]
38.2	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₂ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[134]
38.2'	[TCTA] ₉ [TCTG] ₁₃ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
38.2''	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₁₁ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₃	[134]
39.2	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₁₃ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
39.2'	[TCTA] ₁₁ [TCTG] ₁₂ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]
40.2		[135]
41.2	[TCTA] ₁₀ [TCTG] ₁₅ [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCA TA [TCTA] ₁₂	[134]

Varyant Aleller: 24.3, 25.1, 25.3, 26.2, 27.1, 27.2, 27.3, 28.1, 28.3, 29.1, 29.3, 30.3, 31.1, 31.3, 32.1, 32.3, 33.1, 34.1, 35.1, 35.3, 36.1, 36.3, 39.

Bulunduğu Multipleks Kitler: AmpFlSTR Identifiler, AmpFlSTR Identifiler Direct, AmpFlSTR Identifiler Plus, AmpFlSTR NGM, AmpFlSTR NGM SElect, AmpFlSTR

GlobalFiler, AmpFlSTR MiniFiler, AmpFlSTR SGM Plus, AmpFlSTR Profiler Plus, AmpFlSTR Profiler Plus ID, AmpFlSTR Sinofiler, AmpFlSTR SEfiler, AmpFlSTR SEfiler Plus, PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator HDplex Kit, Mentype® Nonaplex I, Mentype® Nonaplex^{QS}, Mentype® Chimera®

İlk Yayını: [70].

1.5. Kısa Ardışık Tekrar Dizilerinin Seçimi

Kitte kullanılacak STR bölgeleri, popülasyon çalışmaları, uluslararası kuruluşların kabul ettiği standartlar ve mevcut ticari kitlerin içerikleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Söz konusu kriterler aşağıda üç başlık halinde detaylı olarak ele alınmıştır.

1.5.1. Popülasyon Çalışmaları

Bir gen bölgesini temsil eden alel sayısı ve heterozigotluk oranı ne kadar fazla ise o bölgenin ayırım gücü de o kadar fazla olacaktır.

Forensik analizlerde ayırım gücü (Power of Discrimination-PD) olarak adlandırılan değer; bir STR bölgesinin potansiyel olarak, bir popülasyonda rastgele olarak seçilen iki kişinin birbirinden farklı olduğunu gösterme gücünü tanımlar. PD bulunması için homozigot genotip frekanslarının karesi toplanarak birden çıkarılır. Dolayısı ile alel sayısı ve heterozigotluk arttıkça STR bölgesinin ayırım gücüde artar. Ayırım gücü yükseldikçe aynı genotipi sahip birey olasılığında düşer. Bu olasılık değeride tanımlama gücü olarak adlandırılabilir. Ayırım gücünün 1 tam sayısından çıkarılması ile tanımlama gücü (Probability of Identifiy-PI) bulunur. Bu değer STR bölgesi için aynı genotipin bulunma olasılığıdır. PI ve PD değerleri STR bölgesinin adli DNA analizleri için etkinliğinin göstergesidir. STR kiti içinde PD ve PI değeri kitin etkinliği için önemlidir.

STR kitlerinin PI ve PD değeri içerdikleri STR bölgelerinin PI ve PD değerlerinin çarpımı ile bulunur. Erken dönem STR kitlerinden olan Co Filer (D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO ve D7S820) altı STR bölgesini içerir ve PI değeri $5,45 \times 10^{-7}$ dir. PD değeri ise PI değerinin 1 den çıkarılması ile bulunur. CoFiler 3 renk teknolojisi ile üretilmiştir. 4 renk teknolojisinin kullanılması ile üretilen ilk kitlerden biri Profiler Plus 'dır. Profiler Plus 9 STR bölgesi içerir. (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 ve

D7S820) Tanımlama gücü $6,11 \times 10^{-12}$ olup CoFiler' e göre yaklaşık 100 Bin kat daha güçlüdür.

Dört renk teknolojisinin kullanıldığı ve en yaygın kullanıma sahip kiti olan SGM Plus halen İngiltere DNA Veri Bankası için standart kabul edilmekte ve kullanılmaktadır. SGM Plus 10 STR bölgesi içerir. (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D13S317, D16S539, D2S1338 ve D19S433) SGM Plus tanımlama gücü $7,04 \times 10^{-14}$ 'dır. Bu değer Cofiler 'in 10 milyon, Profiler Plus'ın 100 katı daha güçlüdür.

Dolayısı ile ilk dönem STR kitlerinde o dönem mevcut STR bölgeleri tercih edilirken zaman içerisinde yeni tanımlanan STR bölgeleri ilave edilmiştir. Ancak eski dönem kitleri ile çalışmalar ile karşılaştırma imkânı bulunsun diye Cofiler 'in içerdiği STR bölgeleri ayırım gücü yüksek olmasa da multiplex kitler içerisinde hep yer almıştır.

Özellikle dört renk boya teknolojisi ve günümüzde kullanılmaya başlanan beş renk teknolojisi ile beraber multiplex kitlerin içerdiği STR bölgesi sayısı da artmış ve kite dâhil olacak bölgeler seçilirken ayırım gücünden çok uluslararası standartlar ön plana çıkmıştır. Çünkü kitlerin içerdiği STR bölgesi sayısının fazla olması sebebi ile zaten yüksek ayırım gücüne sahip olmaktadır.

Dört renk teknolojisi ile üretilen kitlerle elde edilen sonuçlar yeterli ise neden beş renk teknolojisi kullanılmaya başlanmasının çeşitli gerekçeleri var. Temel olarak teknolojinin yenilenmesi ticari bir döngü başlatmaktadır. Genetik Analiz cihazları on yıllarca hizmet edecek şekilde yapılandırılmıştır. Çoğu parça değiştirilerek cihaz kullanım süresi uzatılabilir. Bununla beraber eğer teknolojik olarak yeni bir ürün üretirseniz satış imkânı için alan yaratılmış olunur. Bunun en kuvvetli kanıtı üretici firmaların yeni teknoloji ile ürettikleri cihazları piyasaya sürer sürmez kademeli olarak eski cihazlara verilen bakım desteğinin çekilmesi ile anlaşılabilir. Benzer şekilde teknoloji kopyalanıp başka firmalarca üretilmesi ile pazar payı daralması yaşanmadan yeni teknolojinin kullanıma sunulması ticari avantaj sağlamaktadır. Diğer tüm firmalar mevcut teknolojiye uyum sağlamak durumundadır. Bu da üretici firmaya liderlik avantajı verir.

Bu ticari stratejilerin yanında yeni teknolojinin sadece 5 renk tespiti yapması dışında bir önemli özelliğide hassasiyetidir. Özellikle piklerin tespitinde ve kirliliklerin azaltılmasında daha etkili mercekle sistemine sahiptir.

Renk teknolojinin artırılması ile kitlerin içindeki STR bölge sayısı artışı yerine yeni ve X Kromozom STR 'larının kitlere dâhil edildiğini görmekteyiz. Daha öncede belirtildiği üzere

15 STR bölgesi ile çalışılıp (SGM PLUS / Power Plex ve diğerleri.) tek yumurta ikizleri hariç aynı gerekmektedir. Geçen yıllarda otozomal STR çalışması sonrası mutlaka Y ve X STR analizleri yapılarak doğrulam yapıldı. Ancak yeni renk teknolojisi ile ve dört renk teknolojisinin kullanıldığı yeni nesil multiplex kitlere eklenen Y ve X STR bölgeleri ile ekstra bir çalışma yapılmaksızın örneğin durumu ile ilgili bilgi elde edilmiş olunurken ihtiyaç duyulur ise multiplex Y ve X STR çalışmaları ile veriler güçlendirilebilir olmuştur.

Ülkemizde yapılan popülasyon çalışmaları genelde multiplex kitlerle yapılan çalışmaları kapsamaktadır. Belirli bölgelerden seçilen bireylerden mevcut multiplex kitler ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen veriler yayın haline getirilmiştir. Ülkemizde ağırlıklı olarak SGM Plus kullanılması sebebi ile yayınlarda SGM Plus kitinde bulunan STR bölgelerinden ibarettir. Tablo 2.3 'de ülkemizde yapılan bölgesel çalışmaların karşılaştırmalı verisi verilmiştir.

Örneğin; Doğu bölgelerimiz için yapılan çalışma neticesinde D18S51, D2S1338 ve D21S11 Str bölgelerinin ayırım gücünün yüksek olduğu tespit edilirken ($>0,96$) CS1PO ve TPOX STR bölgelerinin ise düşük ayırım gücüne sahip olduğu görülmektedir. [76] Aynı şekilde yapılan benzer bir çalışma için batı bölgelerinde D8S1179, D18S51, FGA, D21S11 STR bölgelerinin yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ($>0,94$) ancak D5S818, CS1PO ve TPOX ($<0,879$) bölgelerinin nispeten düşük ayırım gücünde olduğu görülmektedir.[75] Sadece Bolu bölgesinde yapılan bir çalışmada D8S1179, D18S51, ve D21S11 STR bölgelerinin yüksek ayırım gücü gösterdiği ($>0,94$) FGA bölgesinin ise ($0,937$) yine en yüksek bölgelerden olduğu diğer bölge çalışmalarına uygun olarak D5S818, CS1PO ve TPOX STR bölgelerinin en düşük ayırım gücüne sahip olduğu ($<0,865$) gözlemlenmiştir. [74] 2005 yılında sayın İknur YAVUZ ve arkadaşları tarafından yapılan ve Türk popülasyonunu temsil eden çalışmada ise D8S1179, D18S51, FGA ve D21S11 STR bölgelerinin yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ($>0,956$) ancak D5S818, CS1PO ve TPOX ($<0,888$) bölgelerinin nispeten düşük ayırım gücünde olduğu görülmektedir. (Tablo 3.5)

Geliştirilecek olan kitin uluslararası nitelikte geçerli olması için seçilecek STR bölgelerinde belirli bir ırk veya ulus için değil genel geçer tüm popülasyonlar için yüksek ayırım gücü olanlar içinden seçilmesi uygun değerlendirilmiştir. Hem Türkiye [71], [72], [73], [74], [75], [76] hem de dünyada [77], [78], [79], [80], [81], [82], [83], [84], [85] yapılan popülasyon genetiği çalışmaları dikkate alındığında özellikle dört STR bölgesinin

(D8S1179, D18S51, FGA, D21S11) yüksek ayırım gücüne sahip olduğu göze çarpmaktadır. (Tablo 3.4.-Tablo 3.5)

Bu çalışmalar ile uluslararası çalışmaların birarada değerlendirilmesi neticesinde dört STR bölgesinin kit içine dâhil edilmesine özen gösterilmiştir. Kalan 12 STR bölgesinde eklendiğinde kitin tanımlama gücünün SGM Plus'tan yüksek olacağı öngörülmüş ve çalışmalar bu doğrultuda yapılmıştır.

Söz konusu dört bölge uluslararası European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), International Police (INTERPOL), European Police (EUROPOL) kuruluşlarında çekirdek setlerinde bulunmaktadır.

1.5.2. Uluslararası Standartlar

ENFSI, INTERPOL, EUROPOL gibi uluslararası organizasyonlar küresel ölçekte yapılan analizlerin birbirleri ile karşılaştırılabilir olması için belirli standartlar getirmişlerdir. Üye ülkelerden Adli DNA analizleri ile yapılacak incelemelerde kullanılacak STR bölgelerini bildirerek özellikle küresel ölçekte yapılacak karşılaştırma ve raporlamalarda sonuçların mukayeselenilerek kabulü için bu çekirdek STR bölgelerini kullanmalarını istemişlerdir. Bu şekilde özellikle ülkeler arasında DNA profili değişimi ve karşılaştırılmasının yapılması mümkün olmuştur. ENFSI (TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11, D3S1358, D12S391, D1S1656, D2S441, D10S1248, D22S1045, Amelogenin), CODIS (TPOX, D3S1358, FGA, D5S818, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, Amelogenin), Interpol (vWA, TH01, D21S11, FGA, D21S11, D3S1358, D18S51, TPOX, CSF1PO, D13S317, D7S820, D5S818, D16S539, D2S1338, D19S433, PentaD, PentaE, FES, F13A1, F13B, S33, CD4, GABA) STR bölgelerini yapılacak çalışmalarda çekirdek STR bölgeleri olarak belirlemiş ve talep edilecek bir karşılaştırmada bu çekirdek STR bölgelerinin bulunmasını zaruret olarak belirlemişlerdir.

1.5.3. Mevcut Ticari Kitler

STR çalışmaları 1990'lı yıllardan beri yapılmakla birlikte ilk DNA Veri Bankası 1995 yılında İngiltere' de resmi olarak oluşturulmuştur. Henüz tüm ülkelerde DNA Veri Bankası olmamakla beraber hemen hemen her ülke kendi laboratuvarlarında elde edilen sonuçları daha sonra gelecek suç konusu delillerden elde edilecek DNA profilleri ile karşılaştırmak üzere saklamaktadırlar. Bu sonuçlar mevcut kitlerde bulunan STR bölgelerine ait DNA profillerinden oluşmaktadır. Analistler yeni kit sipariş edecekleri zaman mutlaka daha önce o laboratuvarında çalışılan STR bölgelerini de kapsayan kitleri tercih etmektedirler. Bu

sebeple üretilecek yeni kitler mutlaka mevcutta yaygın olarak kullanılan kitler ile karşılaştırma yapılabilecek ve elde edilecek yeterlilikte ortak STR bölgesi içermesi gerekmektedir.

Tablo 1.18. STR Bölgelerinin ayırım güçleri (PD)(www.promega.com 'dan alınmıştır.)

STR BÖLGESİ	ALEL SAYISI	GENOTİP SAYISI	PD
SE33	52	304	0,9934
D2S1338	13	68	0,9780
D1S1656	15	93	0,9776
D18S51	22	93	0,9742
D12S391	24	113	0,9729
FGA	27	96	0,9692
D6S1043	27	109	0,9679
Penta D	16	74	0,9618
D21S11	27	86	0,9597
D8S1179	11	46	0,9442
D19S433	16	78	0,9441
vWA	11	39	0,9389
F13A01	16	56	0,9322
D7S820	11	32	0,9274
D16S539	9	28	0,9251
D13S317	8	29	0,9235
TH01	8	24	0,9234
Penta C	12	49	0,9231
D2S441	15	43	0,9159
D10S1248	12	39	0,9155
D3S1358	11	30	0,9085
D22S1045	11	44	0,9079
F13B	7	20	0,9027
CSF1PO	9	31	0,8946
D5S818	9	34	0,8896
FESFPS	12	36	0,8872
LPL	9	27	0,8664
TPOX	9	28	0,8642
Penta E	23	138	0,8530
DYS391	7	7	0,5242

1.6. Adli DNA Analizi Aşamaları

Adli DNA analiz çalışmaları biyolojik örneğin tespitinden genetik analizör cihazlarından elde edilen verilerin değerlendirilerek raporlandırmasına kadar geçen bir süreci

kapsamaktadır. Bu süreçte biyolojik örneğin tespiti yapıldıktan sonra insana ait olup olmadığı tespit edilir. İnsana ait biyolojik örnekler DNA izolasyonuna alınır. Adli DNA örnekleri doğaları gereği çok iyi korunan örnekler olmadığı için DNA elde edildikten sonra miktar tayini yapılarak PZR analizlerine alınır. Daha sonra genetik analizörlerde yürütme yapılır ve yazılımlar aracılığı ile elde edilen piklerin değerlendirilmeleri yapılarak rapor hazırlanır.

1.6.1. Biyolojik Örneklerin Tespiti ve Tanımlanması

Deliller üzerinde biyolojik örnek olabilecek leke araştırması ve tespiti için sırasıyla üç yöntem kullanılır; ilk olarak delil üzerinde makroskobik inceleme yapılır. Makroskobik inceleme büyüteçle veya çıplak gözle yapılabilir. Delil üzerinde gözle görülebilecek lekeler ile kıl, kepek, doku vb. gibi örnekler makroskobik inceleme ile tespit edilebilir (Tablo 1.18).

Delil üzerinde makroskobik inceleme neticesinde biyolojik örnek olabilecek leke bulunamaz ise ikinci olarak yapılacak inceleme UV Işık incelemesidir. Biyolojik lekeler buldukları yüzeyden farklı olarak tipik UV ışık yansıması yaparlar. UV Işık kaynağı kullanılarak üretilen farklı dalga boylarında ışık tutulduğunda farklı renklerde gözlükler kullanılarak makroskobik olarak tespit edilemeyen biyolojik lekeler tespit edilebilir.

Makroskobik ve UV ışık inceleme neticesinde herhangi bir biyolojik örnek tespit edilemez ise son olarak eser miktar muhtemel kan örneğinin araştırılması için Luminol veya Hemacein kimyasalları kullanılır [86]. Her iki kimyasalda gözle görülmeyen ancak inceleme yapılacak delil üzerindeki gözeneklere nüfus etmiş kan örneklerinin tespitinde hassastırlar.

Her üç inceleme sonunda biyolojik örnek olabilecek leke tespit edilirse lekelerden alınan örnekler üzerinde önce ihtimali test reaktifleri kullanılarak lekenin biyolojik örnek olup olmadığı test edilir. Bu reaktifler genelde oksitlenme reaksiyonlarına dayalı tepkimeler ile renk değiştiren kimyasal reaksiyonlara dayalıdır. Ortamda biyolojik örnek varsa biyolojik örneğin türüne bağlı olarak ortama eklenen kimyasal madde oksitlenerek renk değiştirir ve ortamda biyolojik örnek olabileceği kanaatine varılır.

Bununla beraber biyolojik örneklerin kesin tanımlanması doğrulama testleri ile yapılır. İhtimali test reaktifleri ile türü konusunda belirli bir kanaat oluşursa örnek bu sefer antikor – antijen ilişkisine dayalı doğrulama testlerine tabi tutulur. Bu testlerle elde edilen sonuçlar kuvvetli antikor–antijen ilişkisine dayalı oldukları için biyolojik örneğin tam olarak doğrulanmasını sağlarlar.

Tablo 1.19. Genel biyolojik deliller ve tespit edilme yöntemleri

Delil	Biyolojik Delillin Tespit Yöntemi
Sigara İzmariti	Makroskobik
Tırnak	Makroskobik
Tırnak Makası	Makroskobik
Diş Fırçası	Makroskobik
Şapka – Bere	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Kar Maskesi	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Eldiven	Makroskobik -UV Işık -Luminol
Gözlük	Makroskobik
Şişe – Bardak	Makroskobik
Çatal-Bıçak-Kaşık	Makroskobik
Külot	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Atlet – Fanila	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Gömlek	Makroskobik -UV Işık - Luminol
T-Shirt	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Pantolon	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Ceket – Hırka	Makroskobik -UV Işık - Luminol
Bıçak vb	Makroskobik - Luminol
Tabanca vb.	Makroskobik – Luminol

1.6.2. DNA İzolasyonu

Adli DNA analizlerine alınacak biyolojik örnekler hücre içi ve dışı moleküllerle birlikte buldukları yerlerden de kaynaklanabilecek birçok inhibitör ve kirlilikleri de içerirler. Bu sebeple DNA'nın, hücre içi ve dışında bulunan ve daha sonra yapılacak analizleri etkileyecek inhibitörlerden arındırılması gerekir. DNA'nın hücre özütünden saflaştırılması veya daha sonra yapılacak analizler için uygun hale getirilebilmesi için yapılacak işlemlere DNA İzolasyonu denir.

Günümüzde DNA izolasyonu için bir birçok ticari kit ve geleneksel yöntem kullanılmakla beraber temelde birbirini izleyen üç aşamadan oluşur; Patlat, Ayır, Geri Al.

Patlatma aşamasında; hücre çeperi ile çekirdek zarının patlatılarak DNA'nın serbest kalması sağlanır. Bu aşamada ortaya çıkacak ve DNA'ya zarar verecek enzimler ile diğer unsurların etkisizleştirilmesi ve DNA'nın korunması gereklidir. Her bir metot için farklı yöntem veya kimyasalların kullanıldığı bu basamakta temel geçerli mantık bir tamponla pH'ın

dengelenmesi, proteinaz' lar ile proteinlerin, deterjanlar ile de yağ ve yağ bileşenlerinin parçalanması şeklindedir.

Ayırma basamağında; patlatılarak açığa çıkarılan hücre içeriğinden DNA ayrılır. Bu aşama için gerek ticari gerekse geleneksel birçok yöntem geliştirilmiştir. Ayırma işlemi DNA'nın molekül büyüklüğüne, yüküne veya çözünme özelliklerine göre yapılabilir. Manyetik parçacıkların kullanıldığı yöntemde DNA elektriksel yüküne bağlı olarak manyetik parçacıklar üzerinde sabitlenirken diğer moleküller ortamdan uzaklaştırılır [87]. Elek kolon yönteminde DNA ile birlikte belirli büyüklükteki moleküller elek kolonun gözeneklerinde tutulurken diğer moleküller elekten geçirilerek ayrılır. Afinite kolon teknolojisinde ise yine DNA elektriksel yüküne göre veya bağlandığı çekici moleküle kolonda tutulurken diğer moleküller kolondan süzülerek ayrılır. Bir başka geleneksel yöntemde ortama eklenen proteinaz K ile DNAaz, enzimleri geri dönüşümsüz olarak degrades ederken kaynatma yöntemiyle DNA dışındaki inhibitörler etkisizleştirilir. Yani DNA tamamıyla saflaştırılabileceği gibi sadece daha sonraki analiz basamakları için zararlı olabilecek etkenler de uzaklaştırılabilir ya da etkisizleştirilebilir.

Son basamak olan Geri Al basamağında; zararlı etkenlerden ayrılan DNA'nın sonraki analiz basamakları için uygun bir çözücüde çözülerek hazır hale getirilmesi sağlanır. En uygun çözücü DNAaz' lardan arındırılmış distile sudur. Ancak uzun süreli saklanacak DNA'nın yapısının korunması için pH' ı dengelenmiş tamponların kullanılması daha uygundur.

1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Herhangi bir DNA parçasının hücre dışında kısa bir sürede çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknik çoğaltılacak DNA'nın, bir DNA Polimeraz, nükleotidler ve DNA sentezinde öncülük edecek tek zincirli sentetik kısa DNA parçaları ile aynı tüpte farklı sıcaklıklarda inkübe edilmesi temelinde çalışır. 1983'te Kary MULLIS tarafından geliştirilen teknik, kaşifine 1993 yılında kimya dalında Nobel Ödülü kazandırmıştır [10], [11], [12] .

Adli DNA Analizlerinde kullanılacak olan biyolojik örnekler buldukları yerler ve miktarları sebebiyle az veya nitelik olarak iyi durumda olmayacaklardır. Bu örneklerin birbirleri ile karşılaştırılabilmesi için öncelikle yeterli miktar ve kaliteye getirilmesi gerekir. Moleküler genetik alanında yeni bir çağ açan PZR tekniğinin bulunuşu adli DNA analizleri içinde önemli bir dönüm noktasıdır. Bu teknik sayesinde olay yerinde bulunabilecek eser miktar örnekten bile istenilen kalitede sonuca ulaşmak mümkün hale gelmiştir. Temeli PZR

olan yöntemler zamanla hem daha hassas hem de aynı anda birden çok bölgenin analiz edilmesi mümkün hale gelmiştir.

PZR diğer metotlara göre daha hassas, hızlı ve güvenilirdir. Diğer metotlara kıyasla çok daha az başlangıç DNA' sı gerektirir.

Günümüzde Adli DNA analizleri multipleks (çoklu) PZR yöntemi temellidir. Multipleks PZR terimi birden fazla primer çifti ile yapılabilen PZR' ler için kullanılmaktadır. Teknik, eş zamanlı olarak hedef DNA'nın birçok bölgesini çoğaltmaktır. Böylece maliyet düşürülmüş ve zamandan kazanç sağlanmaktadır. Multipleks PZR' nin oluşturulması oldukça zordur. Primerlerin birbiri ile etkileşime girmesine izin vermemek için reaksiyondaki tüm primerlerin yaklaşık aynı Tm derecesine sahip olmalarını sağlamak gereklidir. Çoğaltılmış ürünler yaklaşık aynı büyüklükte fakat birbirinden elektroforez tekniği ile ayrılması belirsiz olmamalıdır. Primerlerin bağlanma bölgeleri farklı olmalı ve birbirlerinin tamamlayıcısı olmamaları gerekir. Bu şekilde primerlerin birbirleri ile reaksiyona girmeleri engellenmiş olur. Multipleks PZR'de önemli olan çoğaltılmak istenen tüm dizilerden dengeli olarak ürün alabilmektir.

1.6.3.1. Floresan Boyalar ve Floresan İşaretleme

Floresans, soğuk cisimlerde moleküler fotonun yutulmasının daha uzun bir dalga boyunda diğer bir fotonun yayılmasını tetiklemesiyle gerçekleşen ışık verme (ışık) olayıdır. Yutulan ve yayılan fotonlar arasındaki enerji farkı moleküler titreşimler ya da ısı olarak ortaya çıkar.

Bir molekülün ışık soğurma yeteneği onun yapısındaki atomik çekirdek etrafında bulunan elektronların yerleşimine bağlıdır. Böylece molekül tarafından bir foton soğurulduğunda bir elektron daha yüksek enerji seviyeli bir orbitale aktarılır. Bir foton soğurmuş molekül uyarılmış durumdadır ve genellikle artık kararlı değildir. Uyarılmış molekülde daha yüksek enerjili orbitallere taşınan elektronlar genellikle kendi düşük enerjili orbitallerine geri dönerler. Uyarılmış molekülün eski durumuna dönmesiyle salınan ışık floresans olarak adlandırılır. Bu işlemi yapabilen moleküllerde florofor ismini alır.

Her bir floroforun kendine has ışık yayma özelliği vardır. Bu özellik molekülün kimyasal yapısına ve çevresel koşullara bağlıdır. Özel olarak kullanılacak olan optik filtreler ile birbirlerinden ayrılabilirler. Floroforun ışık etkinliği, molekülün ışığı emme ve yayma kapasitesi ile beraber stabilitesine ve molekülün yapısını etkileyebilecek pH, ısı, çözücü ve benzeri dış etkenlere bağlıdır. Ancak ışık yapacak boyama seçilirken en önemli husus ışığın ortam şartları aynı olduğu sürece stabil olmasıdır. Bunun yanında boyanın

okunmasında kullanılacak cihaz özellikleri ve kabiliyeti de boya için özgül olmalıdır. STR kitlerinde kullanılan floroforlar sahip oldukları iki ünite stabil ve özgül bir ışığa üretebilecek niteliktedir. Ünitelerden biri uyarıcı ışığı emerek belirli bir miktarda ikinci üniteye enerji aktarırlar. Gelen ışık miktarı ne olursa olsun aktarılan enerji miktarı değişmez. İkinci ünite sabit gelen enerji miktarı kadar ışığa yapar. Dolayısı ile ışığın miktarı ile dalga boyu hep sabit olur. Kısaca lazer ışık kaynağından yayılan yüksek enerji boya tarafından emilerek daha düşük enerjili ancak daha büyük dalga boyunda yansıtılır.

Genetik analiz cihazı boyayı uyaracak uygun dalga boyunda ışık üretmeli ve boyanın yayacağı ışığı tespit edecek özgül optik sisteme sahip olmalıdır. Genetik Analiz cihazları sahip oldukları lazer ile boyayı uyarırken, Charge Coupled Device (CCD) kamera ile boyanın yapmış olduğu ışığı tespit edebilecek kabiliyette kurgulanmışlardır. Lazer ışık kaynaklarından üretilen ışık ile uyarılan boyalarca yayılan ışığa optik filtreler tarafından süzülür. Filtreler boyaların yaydığı ışığa dalga boylarına özgüdürler ve sadece bu dalga boylarında ışığın süzülerek fotomultiplere ya da CCD kamera üzerine odaklanmasını sağlarlar. Bu cihazlar gelen floresan ışığı elektrik sinyallerine çevirirler. Bu elektrik sinyalleri de cihaz tarafından yürütme dosyası adı altında belirli bir formatta kaydedilir.

Her bir boyaya özgü olan dalga boyunda ışığın belirli bir anda belirli bir birimin baz alınarak karşılıklı olarak kıyaslanması ile elde edilen ışığa birimine göre floresan birim (Relative Fluorescence Units - RFU) denir. Aslında genetik analiz cihazları yürütme zaman düzleminde CCD kameralarca okunan RFU birimini kaydetmiş olurlar. Bu veriler daha sonra analiz yazılımlarınca zaman/rfu grafiği olarak belirlenerek piksel veriler halinde yürütme ekranına aktarılır.

Cihaz tarafından tespiti yapılacak olan PZR ürünlerinin boya ile işaretlenmesi primerin aracılığı ile yapılır. Bu yöntemde boya primerin 5' ucuna eklenir. Her bir basamakta enzim aktivitesi ile primerden yeni bir ürün oluşur ve oluşan ürün primere bağlanan boyayı da içermiş olur. Bu işaretleme yöntemi ile farklı boyalar kullanılarak multipleks PZR ürünlerinin tanınması ve işaretlenmesi de sağlanmış olur.

1.6.4. DNA Miktar Tayini

Daha önceki bölümde de anlatıldığı gibi PZR reaksiyonuna alınacak DNA miktarı PZR verimliliğini doğrudan etkiler. Adli DNA Analizleri için üretilen çoklu ticari kitler belirli miktardaki DNA aralığı için optimize edilmişlerdir. DNA miktar tayininde kullanılan yöntemler PZR temelli olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki kısma ayrılabilir. UV Işık

spektrofotometresi, Agaroz jel elektroforezi, membran üzerine sabitlenen DNA' nın kemiluminesans ve kolorimetrik yöntemlerle ölçülmesi gibi yöntemler PZR temelli olamayan yöntemlere örnek olarak sıralanabilir. PZR temelli yöntemler ise Real Time PZR prensibine göre düzenlenmiştir. Bu yöntemlerle tek seferde DNA' nın miktarı, insan kaynaklı olup olmadığı, DNA 'nın parçalanmış olup olmadığı ve hatta PZR inhibitörü bulunup bulunmadığına kadar birçok etkenin değerlendirmesi yapılabilir. Real-time PZR 1990' lı yılların başında Higuchi ve arkadaşlarınca geliştirilmiştir [101]. Temel olarak her bir döngüde ortamda bulunan ve PZR boyunca hedeflenen bölgenin çoğaltılmasından kaynaklanan floresan ışımadaki değişimin hesaplanmasına dayanır. PZR döngü sayısına bağlı olarak oluşan ürünün üç farklı fazı vardır. Birinci faz ürünün geometrik olarak arttığı fazdır. Bu fazda ürün kendini katlayarak artar. İkinci faz lineer fazdır. Bu fazda ürün doygunluğa yaklaştığından artış miktarı düşecektir. Son faz ise platodur. Artık enzimin aktivitesi düşmüş ortamda kullanılacak girdilerin miktarı azalmış ya da tükenmiş olduğundan ürün miktarındaki artış çok azalmış hatta durmuştur. Bu üç fazdan DNA miktarının tespitinde kullanılacak olan faz geometrik fazdır. Günümüzde Real Time PZR ölçümlerinde genel olarak iki tip işaretleme yöntemi kullanılmaktadır. Birinci yöntem boyanın DNA'ya bağlanmasıyla ışımının alınabildiği yöntemdir. Bu yöntemde hedef DNA' nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artmakta ve bağlanan boyanın ışınması arttığı için doğal olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenmektedir. İkinci yöntem ise DNA' nın çoğaltılması sırasında kullanılan proplarda bulunan inaktive boya ile serbest kalarak ışımaya yapması şeklindedir. Real-time PZR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Teknik oldukça hassastır ve birçok örneği eş zamanlı olarak çalışma kapasitesindedir. PZR ürünlerinin bilinen son ölçümlerinin aksine, Real Time PZR, PZR kinetiği hakkında hemen bilgi verir. Başkaca ek bir tekniğe gerek kalmadan döngüler sırasında sonuç alınabilmektedir.

1.6.5. Kapiler Elektroforez

Kapiler elektroforez ilk olarak 60'lı yıllarda Hjerten tarafından tanımlanmıştır. Hjertenin tasarladığı sistem yüksek voltajlı güç kaynağı, detektör ve 1-3 mm ID kuvars kapiler tüpün içine batırıldığı soğutma haznesinden oluşmaktaydı. Ancak bu alanla ilgili asıl atılım Jorgenson ve Lukacs'ın 1980'li yıllarda yayınladığı çalışmalarıdır [88]. Kapiler elektroforezde temel fark kullanılan borucuk sistemidir. Genellikle silikadan üretilen kapilerin çapı 20-100 µm arasındadır. Tüplerin yapısı gereği örneklerin tek bir düzlemde hareket etmesi ve yayılması engellenmiş olur. Özellikle üretilen yüksek performanslı cam

kapillerler hassasiyet açısından büyük avantaj sağlamışlardır. Kapilerin içinin kaplanmasında daha önceleri borosilikat cam veya teflon gibi kaplama maddeleri kullanılmıştır. Günümüzde ise yaygın olarak silika kullanılmaktadır. Eritilmiş silika UV ve ışığın geçişini engelliyor olsa da kaplamadan bırakılan ve pencere olarak adlandırılan bir bölüm ışımanın tespiti için kullanılabilir. Silika kaplama kapilerin esnek olmasını sağlar. Bu özellik hem paketlemede hem de cihaz üzerine yerleştirilmesine avantaj sağlamaktadır. Kapilerin dış yüzey kaplaması elektroizosmatik akımın ve ısının ayarlanmasında önemlidir.

Kapilerin iç duvarı elektroizosmatik akımı dengelemesi ve DNA ile ilişkide olması nedeniyle önemlidir. Bu sebeple iç çeper genelde negatif yüklü olarak hazırlanır. Bu da DNA'ların polimer içinde doğrusal olarak yayılmadan akışına olanak sağlar.

Kapiler elektroforezde sabit faz polimerdir. Diğer elektroforez tiplerinde kullanılan jellerin yerini kapiler elektroforezde sentetik olarak üretilen polimer almıştır. Polimerler sentetik olarak hazırlanmaları sayesinde standardizasyon ve otomasyon için daha uygundur. Poliakrilamid veya agoroz jellerin kapiler elektroforezde uygulanan yüksek ısı ve voltajda stabil kalması mümkün değildir. Günümüzde PAM (poliakrilamid), PDMA (N,N-polydimetilakrilamid) ve poloxyeentylene temelli birçok polimer geliştirilmişse de en yaygın kullanılanı PDMA temelli POP (4, 5, 6, 7) serisidir. PDMA teknolojisi kapiler iç çeperine kat oluşturması ve düşük viskozitesi ile daha kullanışlıdır. Polimer tipi geliştirilmeye çalışılırken hedef daha az DNA ve iç çeper ilişkisi ile daha az elektroizosmatik akımdır. Düşük viskozite özellikle kapiler içine polimer asılmasında kolaylık sağlar. Düşük viskozitede polimer, daha az basınçla daha kolay kapiler içine eklenir. Polimerin yoğunluğu arttıkça ayırma gücü de artar. Aynı yükte olan DNA parçacıklarını bir bazdan 400 baza kadar ayırımı pop 4 ile yaklaşık 30 dakikalık sürede mümkündür. Tek zincir DNA yürütmeleri için polimere yüksek konsantrasyonda üre eklenir.

Kapiler elektroforezin hareketli fazını oluşturan tampon genelde Tris Borat tamponudur. Bunun dışında Tris Asetat kullanılır. Tamponların pH değeri 7.0-9.0 arasındadır. Bu tamponların ortak özelliği düşük geçirgenliği, ısınmayı en aza indirme ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilme imkanlarına sahip olmalarıdır. Yüksek konsantrasyon tampon DNA ile çeper ilişkilerini en aza indirerek DNA'nın konfirmasyonunun korumasını sağlar.

Kapiler elektrofezin en önemli avantajı otomatik örnek yüklemeye uygun olmasıdır. Genelde iki tip örnek yükleme metodu vardır. Hidrodinamik ve Elektrokinetik. Hidrodinamik yükleme metodu örnek solüsyonunun kullanılan basınç ile kapilere sokulması yöntemidir. Bu yöntem genellikle çözülebilir polimer ile kullanılır. Çünkü basınçla yükleme sırasında kapiler iç çeperi zarar görebilir. Elektrokinetik yükleme ise oluşturulan elektriksel alanda örneklerin kapiler içine hareket etmesi temeline dayanır. Günümüzde DNA örnekleri için kullanılan yöntemdir.

Elektrokinetik yükleme yapılırken en büyük problem PZR ürünlerinin yoğun tuz konsantrasyonu içermeleridir. Tuz iyonları DNA'nın kapiler içine hareketlerini inhibe edecek ya da yavaşlatacaktır. Bu sebeple tuz ve PZR artıklarından kolon, alkol presipitasyonu ile uzaklaştırılarak ürün saflaştırılır ya da su ve deiyonize formamid ile tuz konsantrasyonu seyreltilir. Zaman ve işgücü tasarrufu sebebi ile ve örneklerin denature olarak tutulması gerekliliği için günümüzde PZR ürünlerinin kapilere yüklenmesi formamid ile yapılmaktadır. Tek zincir DNA yürütmelerinde örnek formamid içinde ısı ile denature edilir ve kapilere bu şekilde yüklenir.

Genetik analiz cihazları, otomatik kapiler elektroforez DNA analiz sistemleridir. Genetik analiz cihazlarında DNA örneklerinin amplifikasyon sonrasında DNA fragmentlerinin büyüklüklerine göre elektrik akımı yardımı ile birbirinden ayrılarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Kapiler elektroforez cihazları veri işlemci ve elektroforez ünitesinden oluşur. Veri işlemci, elektroforez ünitesinin yönetiminden ve elde edilen verilerin işlenmesinden sorumludur. Elektroforez ünitesi ise üç bölümden oluşur. Örnek yükleme tepsisi, kapiler ve detektör ile piston bölümü.

Yükleme tepsisi yürütülecek örneklerin bulunduğu bölümdür. Bu bölüm yatay ve dikey düzlemde hareket eden bir blok üzerinde bulunur. Bu bölüm örneklerin yanı sıra kapilerin temizlenmesi ve atıkların atılması için su ve yürütmeye anot kısmında kullanılacak olan yürütme tamponunu da içerir. Örnekler plate ya da tüp taşıyıcı ile yüklenebilir. Ancak her ne şekilde olursa olsun taşıyıcı üzerindeki koordinatları mutlaka veri ünitesine kaydedilir.

Detektör ve kapiler bölümünde, kapiler ve kapilerin okuma penceresinin yerleştirileceği detektör ünitesi bulunur. Detektör ünitesi lazer, optik filtreler ile CCD kameradan oluşur. Kapilerin bulunduğu alan fırın ile elektroforez için gerekli ısıda sabit tutulur.

Cihazlarda son bölüm piston bölümüdür. Bu bölüm kapiler içinde basılacak olan polimeri ve bu polimerin hareketinde kullanılacak şırınga sistemleri ile yürütmenin katot ucunda bulunacak tamponu içerir. Şırıngalara polimer el ile yüklenebileceği gibi sistem polimer kabı içinden polimeri kendi de çekebilir.

Cihazlarda analiz yapılmaya başlanmadan önce yapılması gereken iki önemli kalibrasyon vardır. Birincisi kapiler penceresinin detektör ünitesine tam olarak oturduğunun tespiti için yapılır. Bu aynı zamanda çoklu kapiler sistemlerinde hangi kapilerin detektörün hangi noktasından sinyal vereceğinin de tespitinde önemlidir.

İkinci kalibrasyon ise analizlerde kullanılacak boyaların sisteme tanıtılmasıdır. Hangi dalga boyundaki ışığın hangi renge karşılık geleceği ve sistemin bunu nasıl algılayıp veriye dönüştüreceği bu kalibrasyon yöntemi ile sağlanır ve spektral kalibrasyon olarak bilinir. Spektral kalibrasyon ile sisteme girilen bilgiler toplamı matriks olarak adlandırılır. Matriks, floresan ışımaların tespiti ve birbirinden ayrılmasında kullanılan bir algoritmadır. Bu algoritma sayesinde farklı dalga boyunda ışımaya yapan boyalar birbirinden ayrılarak tanımlanabilir. Öncelikle tanımlanması gereken boyalar ile işaretlenmiş olan DNA parçacıkları cihazda analiz edilir. Bu DNA parçacıkları Matriks standartları olarak adlandırılır. Matriks standartları daha sonra analizlerde kullanılacak olan tüm boyaları içerir. Bilgisayar tespit ettiği her bir dalga boyundaki ışık arasında karşılaştırmalı bir matriks tablosu oluşturur. Bu tablo her bir boya arasındaki geçiş bölümlerini ve birbirlerine olan yakınlıklarını içerir. Örneğin üç renk boya kullanılacak ise dikey ve yatay olarak üç kolondan oluşan bir matriks tablosu oluşturulur. Yatay ve dikey sütunda kendi ile çakışan boyanın değeri "1" tamdır. Ancak diğer boyalar ile çakışan bölümler her iki ışımaya arasındaki yakınlığı ve birbirine olan geçişi ifade eder. Bu yakınlık daha sonra yapılacak olan analizler için kritiktir. Çünkü bu matriks tam olarak oluşturulamaz ise boyalar birbirinden tam olarak ayrılamaz ve herhangi bir boyada elde edilecek verinin diğer boyalarda da varmış gibi görünmesine sebep olur. Bu konu ilerde daha detaylı olarak incelenecektir. Matriks ile aslında cihaza her bir boya ve bu boyanın diğerlerinden ne ölçüde ayrılacağı tanımlanmış olur. Daha öncede belirtildiği gibi boyaların yaptığı ışımaya kendi yapısı kadar çevresel etmenlere de bağlıdır (pH, Isı, Elektroforez koşulları vb.). Bu sebeple matriks her bir cihaz ve laboratuvar koşulları için tekrar yapılmalıdır. Matriksin cihaza otomatik olarak yüklenmesi ve kullanılması mümkün değildir.

Günümüzde adli DNA analizlerinde en yaygın olarak kullanılan genetik analiz cihazları ABI marka genetik analiz cihazlarıdır. Bu marka cihazlar içerdikleri kapiler sayısına göre ve

polimer yükleme ünitelerine göre modellenirler. ABI 310 tek kapilerlidir. ABI 3100 serisinde Avant modeli 4 kapilerli, ABI 3100 onaltı kapilerlidir. ABI 3130 4 kapilerli , 3130 XL ise 16 kapilerlidir. ABI 3130 ile ABI 3100 serisinin farkı şırıngaya polimer yükleme ünitesinden kaynaklıdır. 3130 serisinden itibaren tüm ABI modellerinde polimer şırıngaya otomatik olarak yükleme ünitesince yüklenirken bu seriden önceki modellerde polimer şırıngaya analist tarafından yüklenir. ABI 3500 sekiz kapilerli, ABI 3500 XL 24 kapilerlidir. Son olarak ABI 3730 48 kapilerli, ABI 3730 XL ise 96 kapilerlidir [89], [90].

1.7. Tiplendirme

DNA analiz cihazlarında elde edilen verilerin yazılım kullanılarak değerlendirilmesi ile DNA profilinin ortaya çıkarılması yani tiplendirme adlı DNA analizlerinin son basamağıdır.

Kapiler elektroforez anlatılırken genetik analiz cihazlarının yürütme voltajına ulaşıldıktan sonra lazer ve detektör aktif hale getirilerek veri toplanmaya başlandığı ve bu verilerin yürütme süresi tamamlandığında bir dosya altında toplandığı belirtilmişti. Tiplendirme anlatılmadan önce verinin nasıl oluştuğu ve veri ile ilgili bazı terimlerin açıklanması uygun olacaktır.

1.7.1. Alel Nedir?

Bir STR bölgesinin dünya üzerinde bulunan farklı kompozisyonlarından her birine alel denir. İnsanda her STR bölgesi için anneden ve babadan birer adet olmak üzere bir çift alel bulunur. Daha öncede belirtildiği üzere STR bölgelerinde aleller birbirinden tekrar eden ünite baz sayısının farklılıklarına göre ayrılırlar.

1.7.2. Alellerin Elektroferogramda Gösterilmesi - Pik

Genetik analiz cihazlarının toplamış oldukları verileri zaman ve rfu miktarı olarak yürütme dosyasında tuttuğu daha önce belirtilmişti. Analiz yazılımları bu veriyi ekrana zaman/rfu grafiği olarak getirirler. Bu grafikte x düzlemi toplam rfu miktarına, y düzlemi ise zamana karşılık gelir. Dolayısı ile zaman düzleminde herhangi bir boyanın rfu miktarındaki artış, y düzlemindeki noktaya karşılık x düzleminde yükselen ve inen bir pik oluşturur.

Pik boy ve en olmak üzere iki düzlemde değerlendirilir. Pikin boyu toplam DNA parçacık miktarı ile orantılıdır. Parçacık sayısı arttıkça ışına yapan boya miktarı dolayısı ile toplam rfu miktarı artacaktır. Piklerin eni ise parçacıkların detektör önünden geçiş hızına bağlıdır. Detektörün okuması CCD kameranın açılıp kapanmasına bağlı olduğundan aynı boyda bile olsalar bazı parçacıklar daha önce veya daha sonraki data pointte yansıma verebilirler. Bu önce veya sonraya kalan parçalar oluşan pikin enlenmesine sebep olurlar. Bu enlenmeye sebep olan parçacıklar belirli bir aralık ve ölçekte pikin tepe noktasının temsil ettiği parçacık

ile aynı değerdendirilirler. Pikin enindeki simetri ve oranların ideale yakınlığı veya uzaklığından PZR ve elektroforezin kalitesinin değerdendirmesi yapılabilir. İdeal bir PZR 'de bir primer çifti için tüm ürünlerin tek bir boyda olması ve elektroforez koşullarında bunların aynı mesafeyi katetmeleri ve detektörden aynı anda geçmeleri beklenir. Ancak PZR' nin optimize olmaması veya elektroforez koşullarının standart olmaması sebebi ile analizler idealden uzaklaştıkça pik eni genişler. Belirlenen standart RFU miktarının üzerinde tepe noktası olan her bir pik aslında aynı büyüklükteki DNA parçacıklarını verir. Kısaca her bir pik aslında bir DNA parçacığının iz düşümüdür. Tepe noktanın yüksekliği aynı boyda kabul edilen parçacık sayısı ile doğru orantılıdır [91].

1.7.3. Size Marker (Büyükük Markırı)

Bilinen sayıda ve uzunlukta belirli bir boya ile işaretlenen DNA parçacıklarından hazırlanan DNA setidir. Bu DNA seti her elektroforez yürütme karışımına eklenir. Multiplex kitte bulunan primerlerin işaretlendiğı boyalardan farklı bir boya ile işaretli size marker kullanılması gerekir. Analiz yazılımları, bilinmeyen DNA parçacıklarının büyüklüğünü size marker içinde bulunan ve büyüklüğü bilinen DNA parçacıklarını kullanarak bulabilir. Size marker içinde bulunan parçacıkların miktarı ile büyüklükleri yazılıma tanımlanır. Yazılım data point/RFU grafiğinde size markerın işaretli olduğı renk için pikleri ve tepe noktaları belirler. Pik sayısı karışım içindeki farklı parçacık çeşidi kadardır. Yazılıma daha önce girişı yapılan büyüklüklere göre ilk okuduğı pike en küçük büyüklüğü vererek tek tek her bir pike karşılık gelen büyüklüğü belirler. Artık tüm yürütme boyunca data pointe karşılık DNA baz uzunluğunu gösteren doğru çizilebilir.

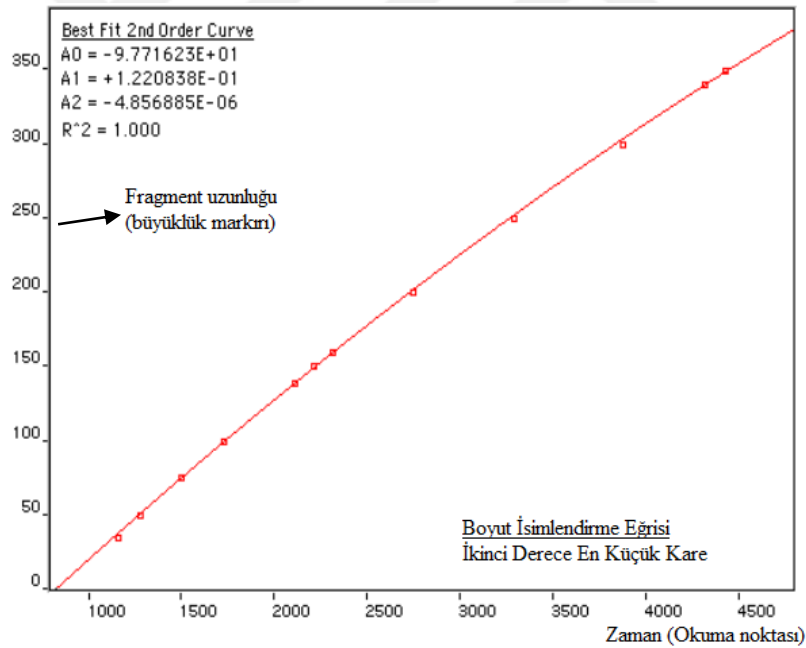
1.7.4. Piklerin Temsil Ettiğı DNA Parçacıklarının Uzunluğunun Tespiti

Uzunluğu bilinmeyen DNA parçacıklarının uzunluğunun, büyükük markırı kullanılarak tespitinde dört farklı yöntem kullanılabilir. Bunlar;

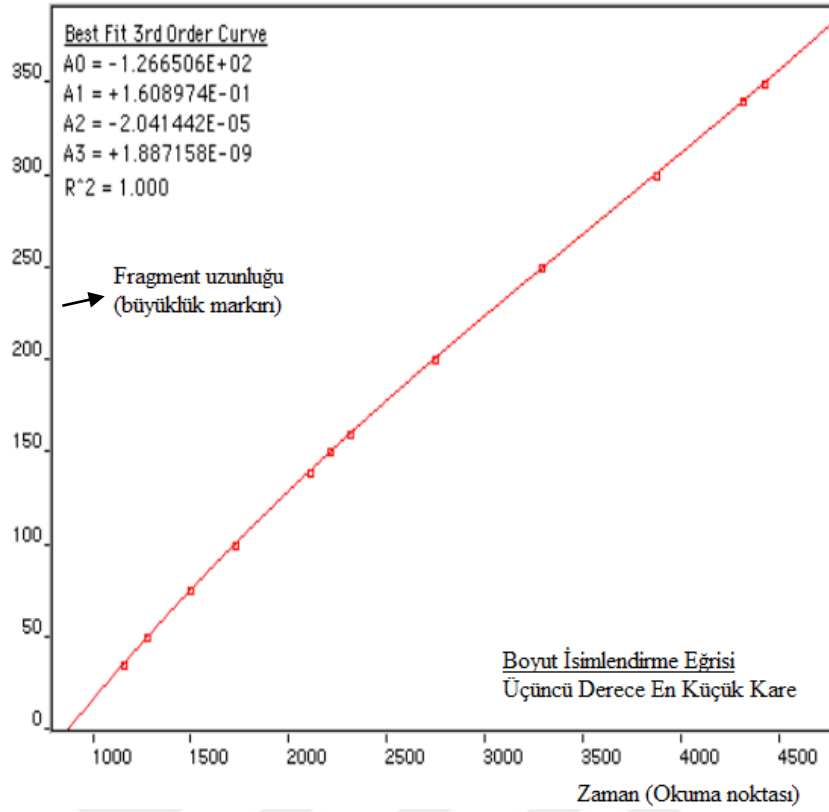
- i. En Küçük Kare Yöntemi
- ii. Kübik Spline İnterpolasyon Metodu
- iii. Local Southern Method
- iv. Global Southern Methodudur.

1.7.4.1. En Küçük Kare Yöntemi

Her iki en küçük kare metodu (2. derece ve 3. derece) en uygun boyut isimlendirme (size calling) eğrisini çizmek için regresyon analizi kullanır. Bu eğri, anormal şekilde yürüyen fragmentleri dengeler. Sonuç olarak, bu metot normal olarak boyut (size) standardı ve örnekleri içeren tüm fragmentler için en düşük miktarda sapma ile sonuç verir. Analiz parametreleri diyalog kutusunda 2. derece ve 3. derece en küçük kare metotlarından herhangi birini seçmenize bağlı olarak, sonuç olarak verilen size eğrisi ya kuadratik ya da kübik fonksiyondur. Yazılım, Çoklu Doğrusal (Multiple Linear) Regresyonu baz alan bir ölçülendirme eğrisi oluşturmak için ortak veri noktalarını ve bilinen standart fragmentleri kullanır. Neredeyse tüm durumlarda bir bireysel DNA fragmentinin hareketi, tüm veri dizisinin en iyi eğri grafiği ile uyum içindedir. Farklı şekilde ifade edilecek olursa, çoğu DNA fragmentlerinin hareketi kesinlikle uzunluk bağımlıdır. Bu metot otomatik olarak anormal şekilde yürüyen fragmentleri dengeler (Şekil 1.5, Şekil 1.6).



Şekil 1.5. 2. derece en küçük kareler boyut isimlendirme eğrisi. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

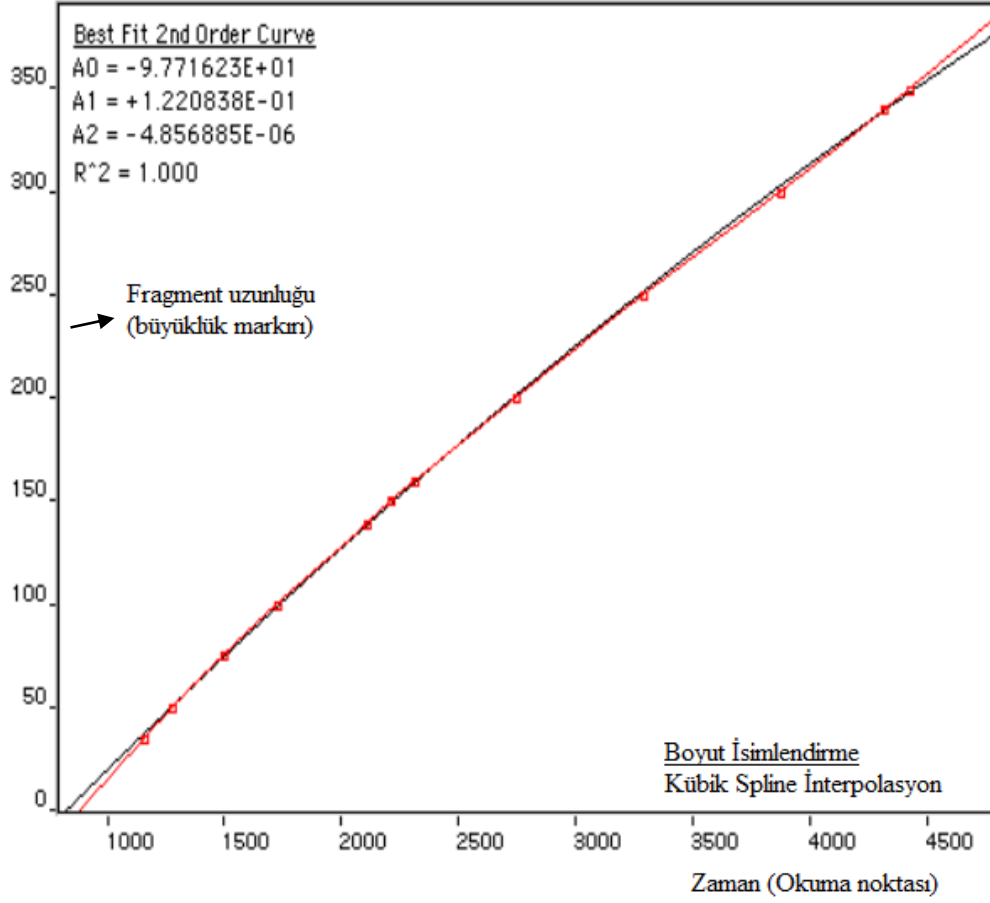


Şekil 1.6. 3. derece en küçük kareler boyut isimlendirme eğrisi. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

1.7.4.2. Kübik Spline İnterpolasyon Metodu

Kübik Spline metodu, seçili boyut standartlarının bilinen tüm noktaları vasıtasıyla boyutlandırma eğrisini oluşturur (Şekil 1.7). Bu uygulama, standartların kendi değerleri için kesin sonuçlar üretmesine rağmen, bu metot anormal şekilde yürüyebilen standart fragmentleri dengelemez.

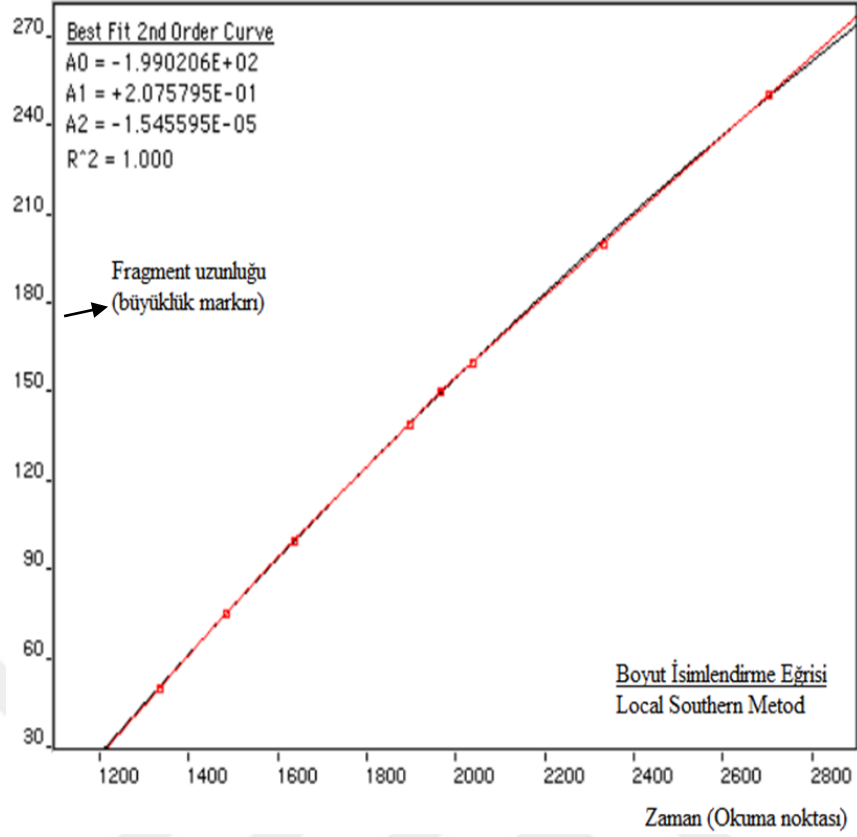
Herhangi bir DNA fragmentinin hareketi, kendi sekonder ve tersiyer yapı oluşumundan ve kendi dizisinden etkilenebilir. Eğer herhangi bir internal (iç) size standart fragmenti anormal hareketliliğe sahipse, Kübik Spline metodu yerel boyutlandırma hatası sergileyebilir. Örneğin; standart bir fragmentin, bilinmeyen bir örnek fragmentine moleküler uzunluğunun yakın olduğu, bir de ilaveten standart fragmentin anormal ilerlediği farzedilirse, Kübik Spline metodu az da olsa doğru olmamasına rağmen, standart fragmente bir değer verir. Bilinmeyen fragmentin boyutu, benzer şekilde tam doğru olmayacak şekilde hesaplanır.



Şekil 1.7. Kübik Spline İnterpolasyon Metodu. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

1.7.4.3. Local Southern Method

Local Southern Metodu, E. M. Southern [102] tarafından tanımlandığı şekliyle, fragment uzunluğu ve hareketliliği arasındaki ters-çift taraflı ilişkiyi kullanmak suretiyle fragmentlerin boyutlarını belirler (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Local Southern Method. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

$$L = [c/(m-m_0)] + L_0$$

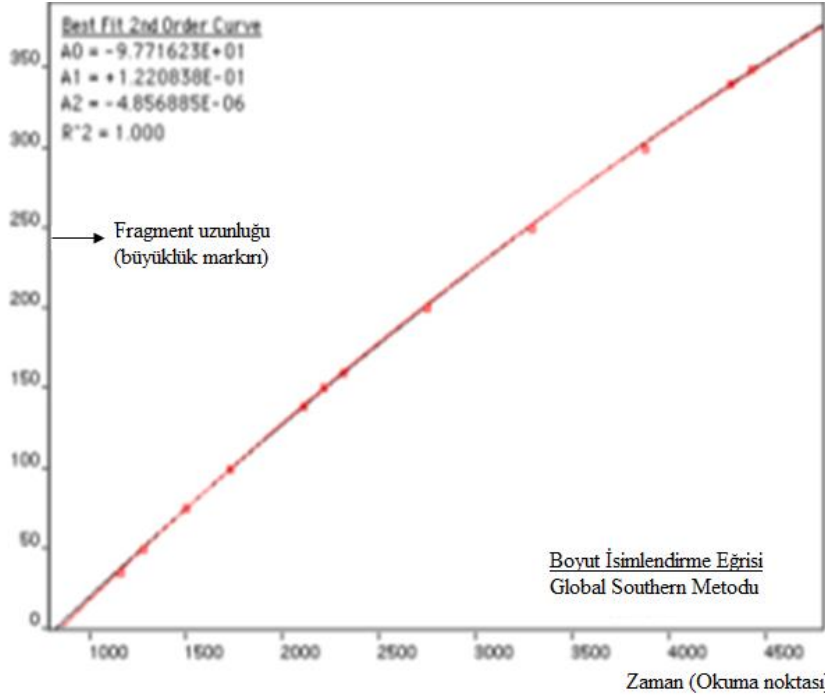
Eşitlik, standart fragmentlerin uzunluğu, L_0 ve hareketi, m , arasındaki ters ilişkiyi tanımlamayı amaçlar. Kübik Spline metoda benzeyen bu metod, en uygun line (hiza, sıra) değerini belirlemek için, boyut olarak bilinmeyen fragmente en yakın dört fragmenti kullanır. Sadece bilinmeyen uzunluktaki fragmente yakın size ladder bölgesi analizlenir.

Local Southern Metodunda;

- a. Eğrinin eşleşen sabitleri, standart üzerindeki 3 komşu noktanın her bir grubu için hesaplanır. Üç noktalı her veri dizisi için, ayrı bir eğri oluşturulur.
- b. Üç standart noktanın kullanımı ile bir eğri oluşturulur ve (fragmentin üzerinde bir nokta, altında iki nokta),daha sonra bir fragment boyutu belirlenir.
- c. Diğer eğri, ilave bir üç noktalı veri dizisine bakarak oluşturulur (fragmentin üzerinde iki nokta, altında bir nokta), daha sonra diğer değer atanır .
- d. İki büyüklük değerinin, bilinmeyen fragment uzunluğunu belirlemek için ortalaması alınır.

1.7.4.4. Global Southern Method

Bu metot, en küçük kareler metodundaki gibi anormal şekilde yürüyen standart fragmentleri dengeleyen en küçük kareler metoduna benzer. Metot, tüm mevcut noktalar vasıtasıyla en uygun hat meydana getirir ve daha sonra fragment değerlerini hesaplamak için bu hat üzerindeki değerleri kullanır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Global Southern Metodu. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

$L = [c/(m - m_0)] + L_0$ ----- Eşitlik, standart fragmentlerin uzunluğu, L_0 ve hareketi, m , arasındaki ters ilişkiyi tanımlamaya çalışır.

$\sum(L_i - (c/(m_i - m_0) + L_0))^2$ ----- Uygun sabitler L_0 , m_0 ve c , sol taraftaki değeri azaltmak için en küçük kareler metoduyla hesaplanır. Standarttaki tüm noktalar eşit ağırlıktadır ve eğri herhangi özel bir noktaya doğru ilerlemek zorunda değildir. Yazılım, bu metot ile geniş bir aralıktaki fragment boyutlarını analiz edebilir. En iyi sonuçlar için, ilgilenilen tüm fragmentleri kapsayan bir standart kullanılır [91].

1.7.5. Alelik Ladder

Alelik Ladder özgül bir STR bölgesi için popülasyonda var olan tüm yaygın alellerin sentetik olarak hazırlanması ile olan karışımdır [92]. Yapılan analizler neticesinde ürünler alelik ladder ile karşılaştırılarak adlandırılırlar. Standart olarak kullanılacak olması sebebi ile özgül olarak hazırlandıkları dizilere uygun olmalı ve primer bölgeleri de dahil olmak üzere boy ve içerik olarak aynı olmalıdırlar.

Alelik ladder test edilen örnek ile aynı primerler ile oluşturulur böylece ladder içinde yer alan tüm aleller için referans bir DNA boyutu sağlanmış olur. Alelik ladderların doğru genotip belirlemeleri için önemli olduğu gösterilmiştir [93]. Bu alelik ladderlar her STR bölgesi için metre gibi bir standart olarak hizmet eder. Alelik ladderlar, farklı cihazlardan ve çeşitli laboratuvarlar şartlarından alınan farklı boyut ölçümlmelerini aynı hizaya getirmek için gereklidir.

Alelik ladderlar genomik DNA'nın kombinlenmesi ya da özel STR markır çeşitliliğini temsil eden alellere sahip populasyondaki bireylerden elde edilen lokus-spesifik PZR ürünlerinden oluşturulur [92], [94]. Örnekler daha sonra STR markırın bütün alellerini içeren suni bir örnek üretmek için birlikte çoğaltılırlar. Alel miktarları aleller ladderda olabildiğince eşit olsun diye her bileşenin amplifikasyona giriş miktarı ayarlanarak dengelenir.

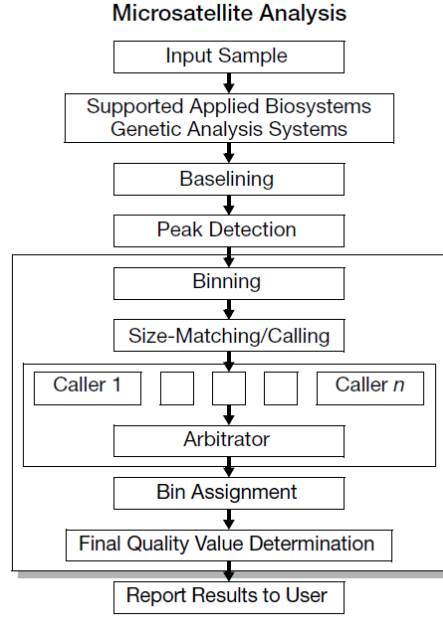
1.7.6. Kit-Panel-Marker-Bin

DNA Analiz yazılımları analiz yönteminin belirlenmesi için belirli bir hiyerarşide bilgi girişine ihtiyaç duyarlar. Bu bilgi seti multiplex kiti için bir kez hazırlanır ve tüm araştırmacılar aynı bilgi seti ile analiz yapabilirler. Kit; multiplex kitinin adıdır. Panel; multiplex kitinde bulunan her bir boyanın oluşturduğu yürütme kulvarının tamamının genel adıdır. Marker her bir STR bölgesini, bin ise STR bölgesinin tüm alel piklerinin RFU – Uzunluk grafiğindeki kapladığı alanı tanımlar. Dolayısı ile her bir STR Marker'ında alel sayısı kadar bin vardır.

Bin 'ler özellikle elektroforez koşullarından kaynaklanan küçük kaymaların önüne geçmek için oluşturulan aralıklardır. Bin orta noktası alelin beklenen büyüklüğüne denk gelir. Bu noktadan yaklaşık 1 bç önce ve sonrası alelin bin aralığı olarak kabul edilir. Dolayısı ile aleli temsil eden pik elektroforez kaynaklı olarak sapma gösterirse bu bin içinde bir noktada olduğu sürece doğru adlandırılır. Bin değerleri kit alelik ladder'ına bağlı olarak yazılıma girilir. Ancak yazılım her analizde yürütülen Alelik Ladder ile binleri karşılaştırarak bin değerlerini kontrol eder. Bu normalizasyon yapıldıktan sonra örnek analizi yapılarak parçacık büyüklüğü daha önce anlatılan yöntemleri kullanılarak gerçekleştirir.

1.7.7. Alellerin Tespiti

Uzunluğu bilinen DNA parçacığının boya renginden tespitle hangi panelde yer aldığı bulunur. Parçacığın uzunluğu hangi marker aralığında bulunan Bin içine rast geliyorsa DNA parçacığının alel ismi o binin ismidir. (Şekil 1.10) Her bir pik bu şekilde karşılık geldiği Alel numarasını almış olur [91].



Şekil 1.10. Genemapper yazılımında veri işleme yolu. (Genemapper el kitabından alınmıştır.)

1.8. STR Tiplendirmesini Karmaşıklaştıran Etkenler

1.8.1. Tekrar Kayması

Tekrar kayması [95] -stutter ürünler ya da gölge bantlar olarak adlandırılır- DNA çoğalması sırasında bir tekrar birimin kaybı ve/veya DNA'daki somatik varyasyondan kaynaklanmaktadır. Görülen bu artifaktın miktarı birincil olarak bölgeye ve amplifiye olacak DNA dizisine bağlıdır. Alelin pik boyunun %15'inden küçüktürler[96] .

Stutter ürün oluşumu Penta D ve Penta E gibi daha uzun tekrar birimlerine sahip STR markırları için işleme hızı daha yüksek olan DNA polimerazlar kullanıldığında azaltılabilir [97].

1.8.2. Non-Template Ekleme

Non-template ekleme [98], Taq DNA polimerazın kalıptan bağımsız bir tarzda çoğalmış DNA fragmentlerinin 3' ucuna bir nükleotit -genellikle adenin- eklediği zaman ortaya çıkar ki bu durum adenilasyon olarak adlandırılmaktadır. Böylece beklenenden -terminal eklemenin olmadığı- bir baz daha kısa artifakt bant bazen görülebilir. Non-template ekleme problemi, özünde terminal nükleotit eklemesinin tamamlanması şartlarını sağlamak için amplifikasyon koşullarına 60°C veya 72°C' de 30-45 dakikalık bir son uzatma basamağının eklenmesi ile azaltılabilir.

1.8.3. Mikrovaryant Aleller

Mikrovaryant alellerin varlığı alellerin yorumlanması ve belirlenmesini karmaşılaştırır. Mikrovaryant aleller de uzunluk olarak farklıdır ancak bu normal alellerde olduğu gibi tekrar uzunluk farkından değişiktir. Söz konusu aleller, temel tekrar motifinin tam katlarını içermezler ve temel motiftaki dizi farklılığından da kaynaklanmamaktadırlar. Kısmi tekrar birimlerine sahip aleller; tam tekrar sayısı ve ardından kısmi tekrardaki baz sayısı, ondalık sayı kısmında belirtilmek sureti ile isimlendirilir. Mikrovaryant eğilimi ve yüksek mutasyon oranı ile yüksek polimorfizm oranı arasında bir korelasyon olduğu gözükmemektedir. FGA ve D21S11 nispeten yaygın mikrovaryantları göstermektedir [96].

1.8.4. Üç Alelli Örnekler

Üç bantlı ya da üç alelli örnekler bazen çoklu bir STR profilini tek bölgede görülebilir. Bu ekstra pikler örneğin karışık olmasından kaynaklı değil aynı örnekten tekrar üretilebilir artefakt piklerdir. Ekstra kromozomal oluşumlar ya da primer nokta mutasyonlarının olduğu ve üç bantlı örneklere neden olduğu bilinmektedir. Belirli bir bölgede görülen üç pikin ya da bantın yoğunluğu eşit olabileceği gibi farklı da olabilmektedir [99].

1.8.5. Alel Düşmesi (Drop-out) ve Null Aleller

STR tekrar bölgesini içeren bir DNA fragmenti çoğaltılırken alel dropout olarak bilinen bir fenomen ile karşılaşmak olasıdır. Dizi polimorfizmlerinin STR tekrar bölgelerinin etrafında ya da içinde ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu varyasyonlar (primer bağlanma bölgesine göre) tekrar bölgesinin içinde, flanking bölgede ya da primer bağlanma bölgesinde ortaya çıkabilmektedir.

Eğer bir baz değişikliği kalıp DNA üzerinde PZR primer bağlanma bölgesinde ortaya çıkarsa amplifikasyon başarısızlığı uğrayacaktır ve bu yüzden kalıp DNA'da mevcut olan alel belirlenemez. Daha basitçe, DNA kalıbında söz konusu alel vardır ancak primer bağlanma sorunundan dolayı çoğalma işlemi gerçekleşmez. Null aleller, STR tekrarlarının etrafında yer alan flanking diziler çok istikrarlı ve örnekler arasında tutarlı olduğundan dolayı çok sık ortaya çıkmaz [96].

1.8.6. Yansıma Pikler

DNA'nın genetik analizör cihazlarında görünür hale gelebilmesi için floresan boyalar ile işaretlemeler yapılmaktadır. Floresan boya miktarının fazla olması durumunda ya da cihazın matriks ayarlarında bir aksaklık söz konusu ise cihaz tespit edilen dalga boyunu tam olarak sınıflandıramayacağından, tüm boyalardan sinyal alıyor gibi değerlendirerek hepsinde pik

oluşturacaktır. Mavi ve yeşil gibi birbirine yakın dalga boyunda ışımaya yapan floresan boyalar DNA miktarı fazla ise diğer renklerde de yapay pikler oluşturabilir. Ancak oluşan yapay pikler tüm renklerin aynı bölgesinde olacağından tüm pikler değerlendirilerek yansıma nedeni ile ortaya çıkan pikler elenebilir. Ortaya çıkan bu durum ürün miktarının azaltılması ya da matriksin yenilenmesi ile çözülebilir [96].

1.8.7. Alelik Ladder Dışı Aleller

Yapay pikler rastgele oluştukları için meydana çıkan bu piklerin gerçek alel olup olmadığını anlamak için alelik ladder ile karşılaştırılarak kontrol edilir. Ancak alelik ladderlar popülasyonda yaygın olarak bulunan alellerden oluştukları için popülasyonu temsil eden tüm alelleri içermeyebilir. Bu yüzden ortaya çıkan alelin yapay mı yoksa gerçek pik mi olduğunu anlamak çok önemlidir. Ladder dışı alelin dâhil olabileceği düşünülen gen bölgelerini de içeren farklı panel dizilimine sahip çoklu kit denenebileceği gibi dizi analizi yapmakta yapay alelin gerçek pik olup olmadığını ortaya çıkarmak için önemlidir [96].

1.8.8. Bütünlüğü Bozulmuş DNA

Her ne kadar STR bölgeleri küçük olduğundan bütünlüğü bozulmuş DNA örneklerinde iyi sonuç verse de bu bozulma primer bağlanma bölgesinde ya da hedef DNA bölgesinde meydana gelmiş ise çoğalma işlemi etkili bir şekilde gerçekleşmeyecektir. Bu durumda çoklu kit ile yapılan analizlerde bu bölgelerden sonuç alınamayacaktır. Olumlu sonuç alınamayan gen bölgeleri için düzenlenmiş farklı primer setleri ile çalışmak ya da diğer STR bölgelerini çoğaltmak sorunun çözümüne katkı sağlayacaktır [100].

1.8.9. Boya Artıkları

Primerler üzerinde bulunan boyalar ayrılarak bağımsız bir şekilde detektör önünden geçebilirler. Bu durumda cihaz tarafından ışımaya yapan bu boya artıkları değerlendirilir. Bu durumdan kaynaklanan pikler küçük ve geniş tepeye sahiptir. Stutter pik büyüklüğünde veya daha küçüktürler. Ancak düşük yoğunluktaki karışık örneklerde katılımcıların DNA pikleri ile karıştırılma ihtimali bulunmaktadır.

1.9. DNA Parçacık Analiz Yazılımları

Genel olarak değerlendirildiğinde genetik analiz cihazlarınca elde edilen verilerin yorumlanarak alellere dönüştürülmesi, her hangi bir jel elektroforezinin ladder kullanılarak analiz edilmesi ile aynı süreç ve yöntemleri içerir. Ancak tüm standart işlemler süreci yazılımlar ile otomatik olarak yapılabilmektedir.

1.9.1. GeneMapper DNA Analiz Yazılımı

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan DNA Analiz yazılımı Genemapper' dır. ABI tarafından üretilen Genemapper yazılımı Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Loss of Heterozygosity (LOH), mikrosatellit ve Single Nucleotid Length Polymorphism (SNP) genotipleme analizleri gibi birçok analizi yapabilecek kabiliyette yazılmış olduğundan karmaşık ve yüksek maliyette bir yazılımdır. Genelde bir lisans cihaz ile beraber alınır ve tüm analistler bu lisansı kullanırlar. Ek lisans maliyeti kullanıcı başına 30 000 TL'nin üzerindedir.



2. MATERYAL-YÖNTEM

Tez çalışmasının temel amacı adli olaylarda elde edilen biyolojik delillerin kimliklendirilmesinde kullanılmak üzere 17 STR bölgesinin analizini sağlayacak Multipleks PZR kiti üreterek bu kitle elde edilen deney sonuçlarının üretilen yazılım ile kontrol ve size marker kullanılarak yapılmasının sağlanmasıdır. Bu amaç ve kapsam ile uyumlu olarak yapılan deneysel çalışmalarda aşağıdaki yöntemler sırası ile kullanılmıştır.

1. STR Bölgeleri için Floresan İşaretli Primerlerin Sentezlenmesi
2. Floresan işaretli primerler kullanılarak Touchdown PZR yapılması
3. Kapiler Elektroforez
4. Elektroforez sonuçlarının analiz edilmesi
5. Kite bulunacak STR Marker' ların tespit edilmesi ve panellerin oluşturulması
6. Panel Primer Karışımlarının PZR ve kapiller elektroforezinin yapılması
7. Kite bulunacak STR Marker' ların tespit edilmesi ve panellerin oluşturulması

Tüm PZR çalışmalarında kalıp DNA olarak kontrol DNA kullanılmıştır. Kontrol DNA profili ve konsantrasyonu bilinen DNA örneğidir. Kontrol DNA ticari kitlerde özellikle yapılan çalışmanın kontrol edilmesi için eklenir. Her PZR çalışmasında çalışması yapılacak örneklere ek olarak bir pozitif bir de negatif örnek eklenir. Çalışma doğru yapıldı ise pozitif örnekten sonuç alınırken negatif örnekten sonuç alınmaz. Genelde pozitif örnek kitle beraber verilen ve içinde bulunduğu kitle yapılacak çalışmalara vereceği sonucu bilinen DNA 'dan ibaretken negatif örnek yerine steril su veya sadecePZR karışımının kendisi de kullanılabilir. Bu tez çalışması kapsamında herhangi bir biyolojik örnekten DNA elde edilmemiş mevcut ticari kitler içinde bulunan kontrol DNA 'lar kalıp olarak kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen sonuçlarda doğrulanabilmiştir.

2.1. STR Bölgeleri için Floresan İşaretli Primerlerin Sentezlenmesi

Kit içinde olması beklenen her STR bölgesi için üç ileri üç geri primer düzenlendi. Primerler düzenlenirken GC oranları, çoğaltılacak tekrar bölgesine yakınlıkları, birbirlerine eşleşmiyor olmaları ile tüm genomda sadece eşleniği olduğu bölüme özgül bağlanacak olmasına dikkat edildi. Bu amaçla tüm primerlerin Primer Blast programı bağlanma özgüllükleri kontrol edildi. Primer sentezlenirken sadece ileri primerler FAM ile işaretli olarak sentezlendi. Kit paneli belirlendikten sonra panel üzerindeki yerlerine göre STR bölgelerinin ileri primerleri JOE, ATTO565 ve ATTO550 ile işaretlendi.

Tablo 2.1. Sentezlenen primerler ile elde edilen en büyük ve en küçük ampliconların büyüklükleri

Primer Çifti No	STR bölgesi	Amplicon büyüklüğü (bp)		Floresan Boya
		Küçük	Büyük	
Primer 1	Amelogenin	108	114	FAM
Primer 2	TH01	125	166	FAM
Primer 3	D14S1434	205	253	FAM
Primer 4	F13A1	279	331	FAM
Primer 5	CSF1PO	346	382	FAM
Primer 6	D16S539	107	155	JOE
Primer 7	D5S818	152	200	JOE
Primer 8	D18S51	228	276	JOE
Primer 9	D3S1358	327	365	JOE
Primer 10	D10S1248	113	161	ATTO550
Primer 11	vWA	162	210	ATTO550
Primer 12	D7S820	224	268	ATTO550
Primer 13	FGA	300	456	ATTO550
Primer 14	DYS460	102	126	ATTO565
Primer 15	D13S317	170	202	ATTO565
Primer 16	TPOX	263	311	ATTO565
Primer 17	D8S1179	316	368	ATTO565
Primer 18	D21S11	381	445	ATTO565

2.2. Floresan İşaretli Primerler Kullanılarak Touchdown PZR Yapılması

Her bir STR Marker için tasarlanan 3 ileri ve 3 geri primer kombinasyonları yapılarak dokuz farklı primer karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan primer karışımları kullanılarak PZR işlemi aşağıdaki koşullara uygun olarak yapılmıştır. Birinci set PZR ve yürütmeleri tamamlandıktan sonra çoğalma olmayan primerler tekrar denendi. Bu çalışmada da sonuç alınamayan primerler son bir kez daha denenerek cevap alınamayan primerler elendi. Tüm

PZR çalışmalarında kalıp DNA olarak kontrol DNA kullanılmıştır. Kontrol DNA profili ve konsantrasyonu bilinen DNA örneğidir.

PZR karışımı da aşağıda belirtilen miktarlara göre hazırlandı.

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
10X PCR Gold Buffer	1,25 µl
MgCl ₂	1 µl
2.5mM dNTP karışımı	1 µl
10mM İleri primer	0,5 µl
10mM Geri primer	0,5 µl
<i>TaqGold</i> DNA polimeraz	0.25 µl
DNA kalıbı	1 µl
H ₂ O	7 µl
Son hacim	12,5 µl

PZR cihazına aşağıdaki program girildi. Sıcaklık 58 ile 68 arası olacak şekilde ayarlandı. Touchdown PZR cihazı tablası üzerinde 58-60-62-64-66-68 no 'lu ısı sağlayan sütunlar not edildi.

Reaksiyon koşulu	
95°C'de	11 dakika
94°C'de	20 saniye
58 → 68 °C'de	30 saniye
72°C'de	30 saniye
60°C'de	10 dakika
4°C	∞

} 28 döngü

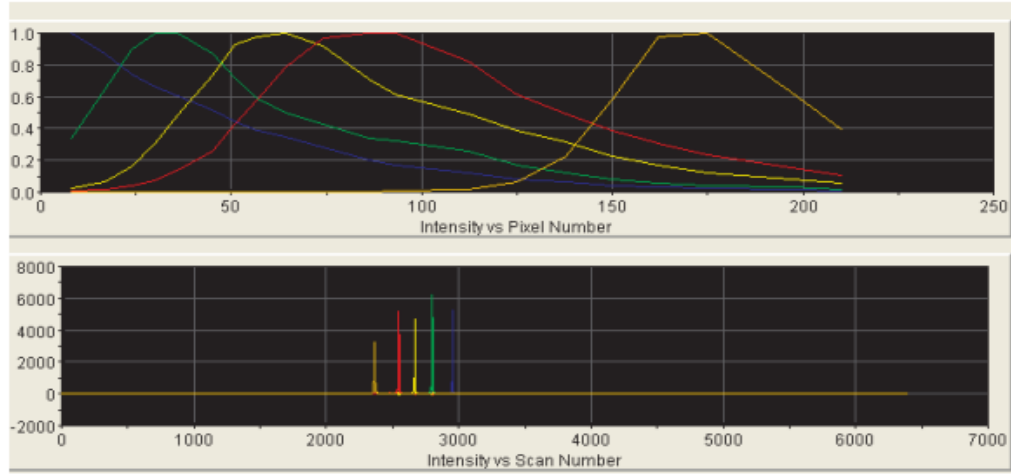
2.3. Kapiler Elektroforez

Touchdown PZR ile elde edilen ürünler, 4 kapilerli 3100 Avant cihazında elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez için kullanılan malzeme ve parametreler STR analizleri için kullanılan standart parametreler olarak seçildi. Yürütme için 36 cm kapiller, POP-7 veya POP-4 polimer ile 10X TBE tampon kullanıldı. Yürütme süresi özellikle size markırın tüm parçalarının görülebilmesi için 45 dakika olarak belirlendi (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Analiz çeşidine göre kullanılacak polimer ve kapiler ile uygulanacak süre tablosu

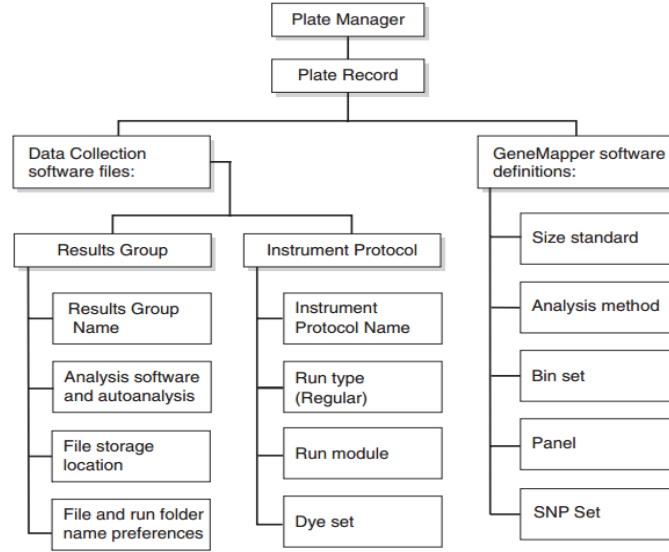
Run Modules	Capillary Length (cm)	Polymer Type	Run Time (min)	24 hr Throughput (GT ^a)		Resolution (bp)	Specification (SD) ^b
				3130 Analyzer	3130x/ Analyzer		
High Throughput, Small Size Fragment Analysis							
FragmentAnalysis22_POP4	22	POP-4	20	5,760	23,040	250	0.15
SNP22_POP4	22		20	5,760	23,040	120	0.50
Standard Fragment Analysis							
FragmentAnalysis36_POP4	36	POP-4	45	2,560	10,240	500	0.15
HIDFragmentAnalysis36_POP4			45	2,560	10,240	500	0.15
SNP36_POP4			30	3,840	15,360	120	0.50
FragmentAnalysis36_POP7		POP-7	35	3,290	13,170	500	0.15
FragmentAnalysis50_POP4	50	POP-4	65	1,760	7,040	500	0.15
FragmentAnalysis50_POP6		POP-6	90	1,200	4,800	500	0.15
FragmentAnalysis50_POP7		POP-7	50	2,300	9,220	500	0.15

Kitte kullanılan boya çeşitlerine göre matris hazırlanarak cihaza tanıtıldı (Şekil 2.1).



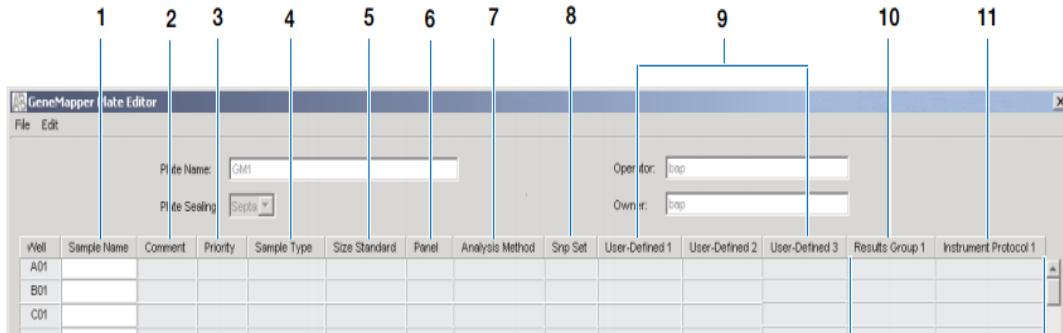
Şekil 2.1. Çoklu kitte kullanılan floresan boyalar için cihazda oluşturulan matris

Cihazda tüm yürütmelerde ortak kullanılacak parametreler girildi. Bu parametreler; verinin toplanacağı dosya ve bu dosya altında her bir yürütme verisinin nasıl adlandırılacağına dair parametrelerle beraber yürütmenin hangi boya grubu ve yürütme koşulları ile yapılacağını belirten parametrelerdir. Ayrıca daha sonra analiz programının kullanacağı size marker, analiz yöntemi ve paneller ile bin set bilgisi de bu aşamada cihaz yürütme parametresi olarak cihaza girildi (Şekil 2.2, Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Genetik Analiz cihazları veri giriş başlıkları

Şekil 2.3’ te “1” ile gösterilen yere ürün adı kodlanarak girildi. Bu kodlama için STR adı, Primer Karışım No ve sıcaklık değerleri kullanıldı. Örnek türü olarak “4” ile işaretli yere “sample” yani örnek bilgisi girildi. Size Marker olarak LIZ 500 kullanıldı. Panel ve analiz metod ile “Result Group” ve “Instrument Protokol” bu çalışma için elle oluşturuldu ve sisteme tanıtıldı.



Şekil 2.3. Yürütme parametrelerinin belirlendiği ekran görüntüsü

Örnekler yürütme karışımında belirtilen oranlarda pipetleyerek kısa vortex ve kısa santrifüj yapıldıktan sonra en az 3 dakika 94°C’de denature edildikten sonra yine en az 5 dk -20°C’de bekletildi.

Yürütme Karışımı Bileşenleri	Miktar
Formamid	11,0 µl
LIZ 500 Size Standart	0,5 µl
PZR Ürünü	1 µl
Son hacim	12,5 µl

2.4. Elektroforez Sonuçlarının Analiz Edilmesi

Kapiller elektroforez ile elde edilen veriler DNA FinD yazılımı kullanarak ürün miktarı, kalitesi ve parçacık büyüklüğü değerlerine göre değerlendirildi. Beklenen parçacık uzunlukları ile okunan uzunluklar karşılaştırıldı.

2.5. Kite Bulunacak STR Marker' ların Tespit Edilmesi ve Panellerin Oluşturulması

Tüm primer karışımları PZR ve elektroforez işlemleri tamamlandıktan sonra elde edilen sonuçlar tabloya aktarıldı. Tabloda tek tek STR bölgeleri ve sonuçları ile bunların verdikleri parçacık uzunlukları yazıldı. STR bölgelerinden en az primer karışımı iyi sonuç veren ilk yerleştirilmek suretiyle tek tek tüm STR bölgeleri panele yerleştirildi. Panel aynı uzunluktaki parçacıkların farklı renklerde panele yerleştirilmesi ile en uzun aleli ile en kısa aleli baz alınarak her iki STR bölgesi arasında en az 50 bç olmasına dikkat edildi.

2.6. Panel Primer Karışımlarının PZR ve Kapiller Elektroforezinin Yapılması

Primerler panellerine göre ayrılarak her panel için primer karışımı hazırlandı. Bu primer karışımları ile PZR ve kapiller elektroforez yapıldı. Pik dengesi ile ürün çoğalmaları değerlendirildi. Panellerde beklenen ve okunan uzunluklar karşılaştırıldı. Nihai olarak pik dengelerine bakıldı. Primer konsantrasyonları ile oynanarak pikler arasında denge kurulması sağlandı. Pik dengesi sağlandıktan sonra her panele uygun renk seçilerek floresan işaretli yeni primerler sentezletildi.

2.7. Optimizasyonun Yapılması

Panel renklerine göre floresan işaretlenen primerler kullanılarak nihai primer karışımı hazırlandıktan sonra PZR döngü süreleri, ısı dereceleri ile karışım oranlarında varyasyonlar denenerek nihai PZR koşulları tespit edildi. Son olarak DNA miktarları değiştirilerek kitin sonuç verdiği DNA miktar aralığı tespit edildi.

2.8. Analiz Yazılımının Kodlanması

Bu tez kapsamında bir yazılım firmasından (KROM A.Ş.) destek alınarak yeni ve özgün bir yazılım geliştirilmiştir. Yazılımın ekran düzenlemelerinden, işlem yapacağı formül ve algoritmalara kadar tüm içeriği tarafımca tasarlanmış ve yazıya dökülerek yazılım desteği alan firmaya teslim edilmiştir. Firma bünyesinde çalışan yazılım mühendisleri, tarafımca düzenlenen bilgi ve belgelere bağlı kalarak yazılımı kodlamışlardır. Ortaya çıkan yazılım yine tarafımca tek tek test edilmek sureti ile kesiklikleri giderilmiş ve nihai hali ortaya çıkmıştır. Yazılım sonuç bölümünde detaylı olarak anlatılacaktır.

Yazılım çalışmalarına başlanırken öncelikle analiz dosyalarının üretmiş olduğu dosya formatları incelenerek verilerin nerede ve nasıl kullanılacağı çıkarılarak belgelendirildi. Tablo 2.3. de görülen her bir veri karşılığı incelenerek bu verilerin kullanılacağı modül ve formüller beigelendirildi. İkinci aşamada ekranların planlaması ve düzenlemesi için belgelendirme yapıldı. Ekranlarda bulunan her bir link ve buton ile yapılacak ve geçilecek ekranlar dizayn edilerek Şekil 2.4. de gösterildiği gibi yazıya dökülerek tasarım için beleger hazırlanmış oldu. Son olarak yazılımın analizde kullacağı formüller ve sonuçların nasıl değerlendirileceği anlatılarak yazılım için destek veren firmanın sorumlu mühendilseirnce yazılımın kodlaması tamamlandı. İlgili personelce tarafımca hazırlanan belgelere göre kodlanan yazılım sürümleri test edilerek nihai eksiklikler belirlenerek yazılımın tamamlanmış oldu.

Tablo 2.3. Genetik Analiz Cihazı dosyası .fsa dökümünün bir bölümü. (Applied Biosystems Genetic Analysis Data File Format El Kitabı'ndan alınmıştır.)

APFN	2	pString	Sequencing Analysis parameters file name
APXV	1	cString	Analysis Protocol XML schema version
APrN	1	cString	Analysis Protocol settings name
APrV	1	cString	Analysis Protocol settings version
APrX	1	char	Analysis Protocol XML string
CMNT	1	pString	Comment about sample (optional)
CTID	1	cString	Container identifier, aka. plate barcode
CTNM	1	cString	Container name (usually identical to CTID)
CTTL	1	pString	Comment title
CpEP	1	char	Is Capillary Machine?
DATA	1	short	Channel 1 raw data
DATA	2	short	Channel 2 raw data
DATA	3	short	Channel 3 raw data
DATA	4	short	Channel 4 raw data
DATA	5	short	Voltage, measured (decavolts)
DATA	6	short	Current, measured (milliAmps)
DATA	7	short	Power, measured (milliWatts)
DATA	8	short	Temperature, measured (degrees C)
DATA	105	short	Raw data for dye 5 (optional)
DSam	1	short	Downsampling factor
DySN	1	pString	Dye set name
Dye#	1	short	Number of dyes
DyeN	1	pString	Dye 1 name
DyeN	2	pString	Dye 2 name
DyeN	3	pString	Dye 3 name
DyeN	4	pString	Dye 4 name

Daha önceki bölümlerde geliştirilecek olan kit ile elde edilecek verilerin analiz edilebilmesi için Alelik Ladder bağımsız bir yazılım kodlanması gerektiği daha önce anlatılmıştı. Hazırlanan yazılım aynı zamanda veri analizi yapmakla beraber verinin karşılaştırılması, paylaşılması ve saklanması fonksiyonlarını da içerirse analistin kullanacağı tüm

fonksiyonlar tek çatı altında toplanabilecekti. Bu nihai hedeften hareketle tez kapsamında geliştirmesi yapılan yazılım çoğu özelliği ve içerdiği fonksiyonlar ile özgün bir ürün niteliğindedir. Bu tezin ürünü olan ve sadece adli alanda değil diğer bir çok analiz alanında kullanılabilir olan yazılıma DNA FinD adı verilmiştir. “FİND” kelimesi Fragment İnceleme Değerlendirme isminin kısaltılması ile oluşturulmuştur. Fragment ve Değerlendirme kelimelerinin ilk harfleri ile inceleme kelimesinin ilk iki harfi alınarak “FİND” kelimesi oluşturuldu. (Fragment İnceleme Değerlendirme) “FİND” İngilizce bulmak anlamına gelmekte olup bu anlamı ile aslında yazılımın en temel fonksiyonu olan cihaz verilerinde DNA fragmentini tespit etmeye de gönderme yapılmıştır.

Başlık: Analiz Yöntemi

Alt Ekranları;

42A Başlık

42B Allel

42C Pik Tanıyıcı

42D Pik Kalitesi

42E İkaz Değerleri

Tablo 42A Başlık

Aşağıdaki bilgilerin girişi yapılır.

Analiz Yöntemi Adı: Yeni Analiz yönteminde bir kez girilir ve bir daha değiştirilemez.

Açıklama:

Cihaz:

Analiz Tipi:

Tablo 42B Allel

Aşağıdaki bilgilerin girişi yapılır.

Yuva Tipi: (Yuva tipi giriş ekranından seçilecek)

Bölge Tekrar Tipi

() Eğer varsa bölge özel stutter oranlarını kullan.

	TRİ	TETRA	PENTA
Kesme Değeri			
Plus A Oranı	0,95	0,95	0,95
Plus A Uzaklığı	1	1	1
Stutter Oranı	0,15	0,15	0,15
Stutter Uzaklığı	3	4	5

Default Değerler yukarıdaki değerler olup değiştirilebilmelidir.

Tablo 42C Pik Tanıyıcı

Aşağıdaki bilgilerin girişi yapılır.

Aralıklar	Analiz	Büyükük
	Tüm Alan	Tüm Büyükükler

Şekil 2.4 Yazılımın hazırlanmasında kullanılan belgelerden alınan örnek sayfa..

Bu yazılım kodlanırken “JAVA” yazılım dili kullanılmıştır. JAVA program dili tercih edilmesindeki temel sebep bu yazılım dili ile yazılan yazılımlar kullanılırken herhangi bir platform ihtiyacı olmamasıdır. Kısaca JAVA yazılım dili ile yazılan tüm yazılımlar herhangi bir işletim sistemi ve benzeri zorunluluk olmaksızın her türlü bilgisayarda çalıştırılabilirler.

Yazılım ile işlenecek verilerin saklanması, paylaşılması ve karşılaştırılması için bir veri tabanı üzerinde işlem yapılması gerekli olduğundan veri tabanı olarak “SQLite” kullanılmıştır. SQLite veri tabanı uygulaması ile taşınabilirlik ve kurulum gibi unsurlar kolaylaştırılmıştır.

Son olarak yazılımın kullanıcılar arasında veri paylaşımını sağlamak üzere kullanacağı export / import işlemlerinin sağlanabilmesi için masaüstü uygulama olması uygun değerlendirilerek yazılım masaüstü uygulama olarak geliştirilmiştir.

3. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bir önceki bölümde detaylı olarak anlatılan materyal ve metodların kullanılması ile elde edilen sonuçlar verilirken her bir STR bölgesine ait sonucun ayrı ayrı verilmesinin benzer bulgu ve sonuçların 18 kez tekrar edilmesi anlamına geleceği kanaatine varılmıştır. Bu tez başlığı STR kiti geliştirmek olsa da aslında hedeflenen kit geliştirmesi yapılırken mevcut sürecin ve teknolojinin alternatif bir modelinin geliştirilmesidir. Bu yeni model oluşturulurken her bir STR bölgesi için aynı işlemler uygulanarak sonuçlara ulaşılmıştır. Dolayısı ile yapılan işlemler anlatılırken her bir işlemi 18 STR bölgesi için tekrarlamak yerine örnek seçilen bir STR bölgesi üzerinden anlatmanın daha pratik ve özüne uygun olacağı kanaatine varılmıştır. Bu şekilde hem gereksiz bilgi kirliliğinin önüne geçilmiş olacak hem de daha kısa ve öz bir sunum imkânı elde edilmiş olunacaktır. Her bir başlık altında yapılan işlemlerde elde edilen sonuçlar ve bu sonuçların nasıl değerlendirildiği seçilen örnek STR bölgesi üzerinden detaylandırılmıştır.

3.1. Primerlerin Sentezlenmesi

Sentezlenen primerler ortalama baz uzunluğu arasında olup en uzun primer 26 bç, en kısa primer ise 21 bç baz uzunluğundadır. Primerlerin GC oranı ortalama %50 civarında olup en düşük oran % 35 en yüksek oran ise % 67' dir. Moleküler ağırlıkları 6285 Da ile 8580 Da arasında değişmektedirler.

Özellikle degrades olan DNA' lar için primerlerin daha kısa olması uygun olmakla birlikte bu kit kapsamında özgüllük ve hassasiyet önemli görüldüğünden primerler uzun olarak dizayn edilmiştir.

Primerlerin annealing dereceleri 53 °C - 60 °C ile arasında değişkenlik göstermekte ise de hem teorik hem de pratik sonuçlar göstermiştir ki kitte kullanılan primerler için bağlanma ısısı 60 °C - 62 °C 'dir.

3.2. Primer Çiftlerinin Çalışmalarının Tespiti

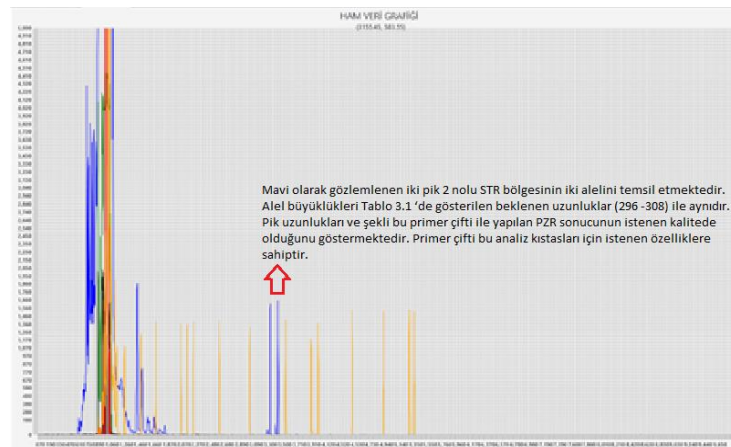
Touchdown PCR ile yapılan analizler neticesinde her bir STR bölgesinin tüm primerleri denenmiştir. Gerek primer hazırlarken gerekse PZR çalışması sırasında analist kaynaklı hataların olabileceği düşünülerek sonuç alınamayan primer çiftleri en az üç kez daha denenerek analizlere cevap vermediği kesinleştirilmiştir. Bu üç denemenin ilki ilk hazırlanan primer karışımı ile ikinci ve üçüncüsü ise tekrar hazırlanan primer karışımı kullanılarak yapılmıştır.

2 nolu STR bölgesi için sentezlenen üç ileri ve üç geri primerin kombinasyonundan oluşan parçacıkların büyüklükleri Tablo 3.1' de verilmiştir.

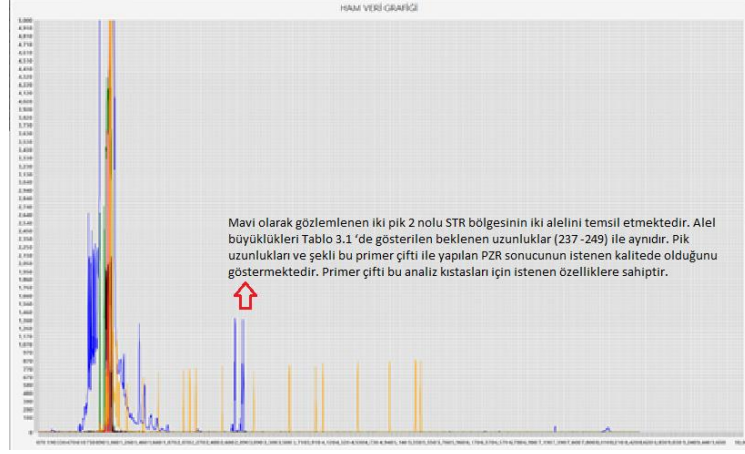
Tablo 3.1. 2 nolu STR Bölgesi primer karışımları kombinasyonlarına göre beklenen uzunlukları gösterir tablo

Primer Karışım No	İleri Primer No	Geri Primer No	1.Alel Beklenen Büyüklük (bç)	2.Alel Beklenen Büyüklük (bç)	Şekil No
1	1	1	296	308	3.1
2	1	2	237	249	3.2
3	1	3	217	229	3.3
4	2	1	276	288	3.4
5	2	2	217	229	3.5
6	2	3	197	209	3.6
7	3	1	262	274	3.7
8	3	2	203	215	3.8
9	3	3	185	197	3.9

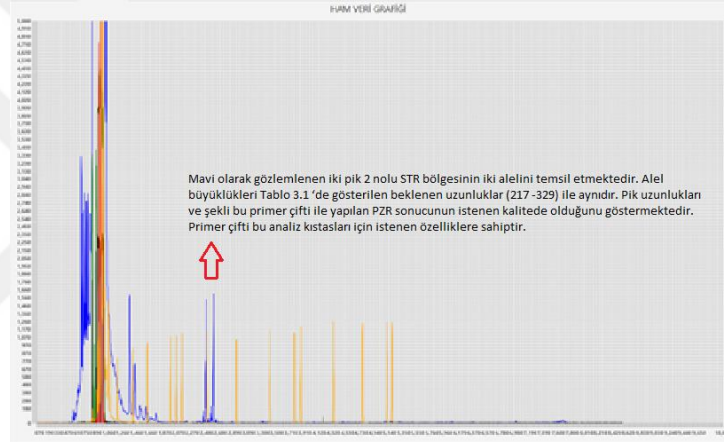
Bu tabloya aktarılan verilere göre 2 nolu STR bölgesinde beklenen en uzun parça 1 nolu primer karışımı ile elde edilebilirken, en kısa parça ise 9 nolu primer karışımı ile elde edilebilir. Bu primer karışımları kullanılarak yapılan PZR ile elde edilen ürünleri gösterir elektroferogramlar Şekil 3.1-3.12' de verilmiştir. Şekillerde turuncu pikler büyüklükleri bilinen DNA parçacıkları olup mavi pikler ise STR bölgesinin aleleridir. Bu aşamada beklenen, her bir primer kombinasyonu için bu iki alelin de şekilde bulunup bulunmadığıdır. Tek pik veya hiç pik olmayan yürütme sonuçları başarısızdır. Boyanın yükü ve büyüklüğünden kaynaklanan yaklaşık 3 ila 5 bazlık fazlalık dışında tamamı ile beklenen parçacık boyları okunmuştur.



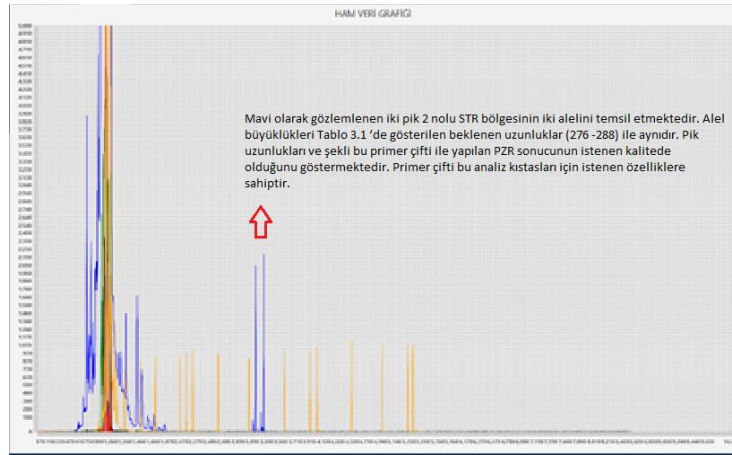
Şekil 3.1. 2 nolu STR bölgesinin 1 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



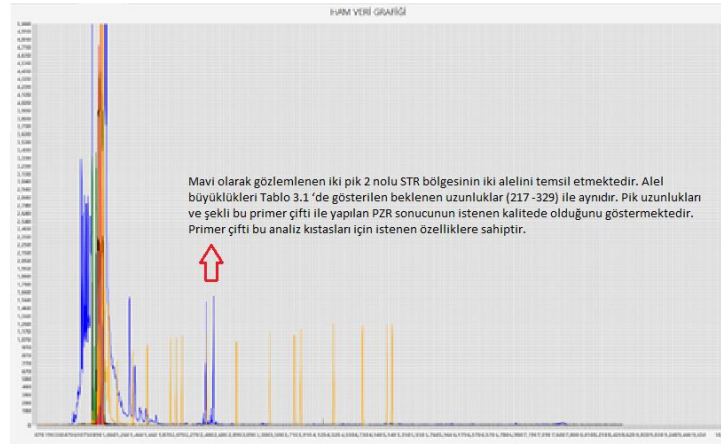
Şekil 3.2. 2 nolu STR bölgesinin 2 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



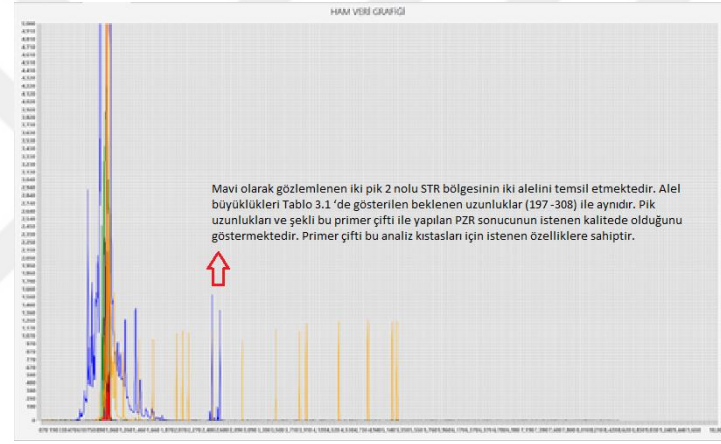
Şekil 3.3. 2 nolu STR bölgesinin 3 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



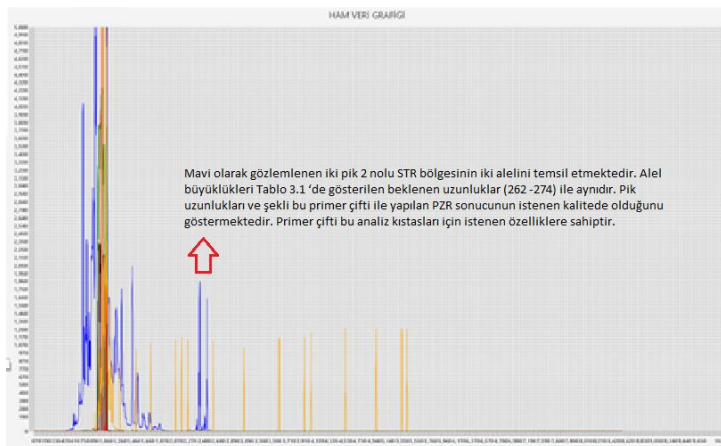
Şekil 3.4. 2 nolu STR bölgesinin 4 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



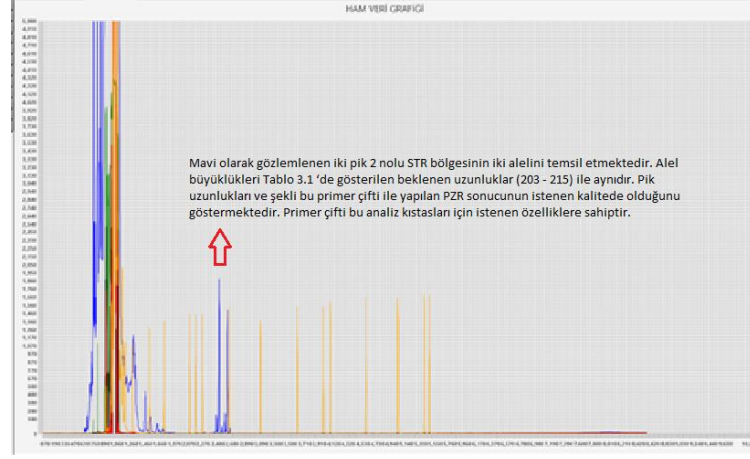
Şekil 3.5. 2 nolu STR bölgesinin 5 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



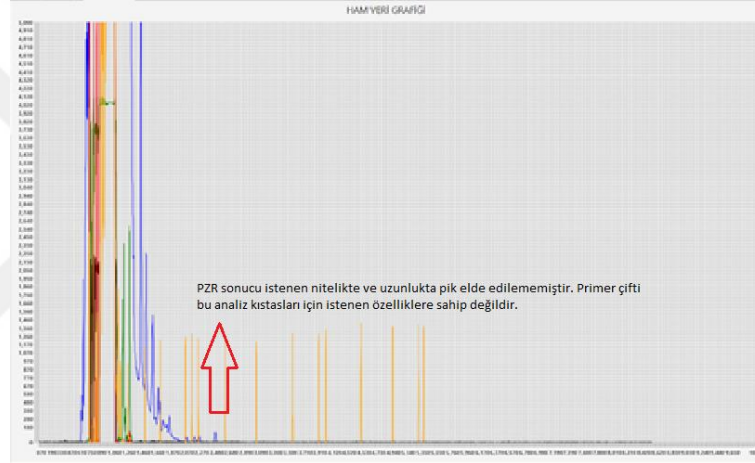
Şekil 3.6. 2 nolu STR bölgesinin 6 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.7. 2 nolu STR bölgesinin 7 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.8. 2 nolu STR bölgesinin 8 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü



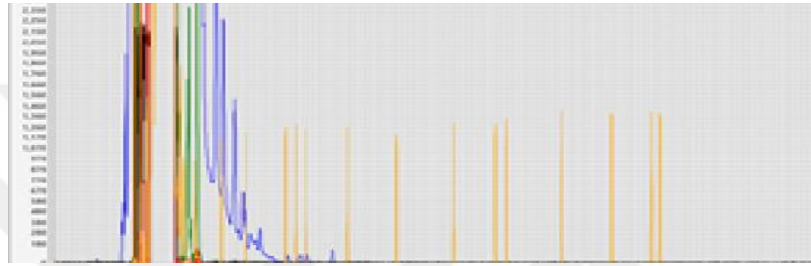
Şekil 3.9. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımı ile elde edilen parçacığının elektroferogram görüntüsü

Ancak 9 nolu primer karışımından ilk etap çalışmalarında sonuç elde edilememiştir. Bunun üzerine önce aynı karışımla daha sonra ise tekrar hazırlanan primer karışımı ile PZR işlemi tekrar edilmiştir. Sonuçta elde edilen ürün kit için yeterli büyüklük ve verimlikte değildir. (Şekil 3.10-3. 12)

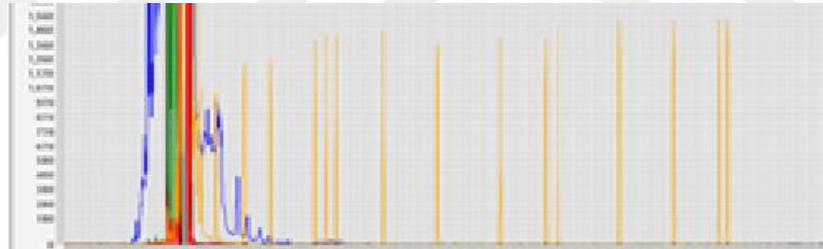
3.3. Primerlerin Bağlanma Derecelerinin Bulunması

Her bir primer çiftinin farklı derecelerde verdiği sonuçlar değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken STR bölgelerinin pik boyları ve ortaya çıkan arka plan kirlilikleri göz önünde bulunduruldu. Bu sonuçlara göre tüm primerlerin 60°C ile 62 °C arasında yüksek verimlilik verdikleri kanaatine varıldı. Farklı sıcaklık dereceleri ile yapılan çalışmalar Şekil 3.13-3.18 arasında gösterilmiştir. Şekillerde daha önce anlatıldığı üzere büyüklüğü bilinen DNA

parçacıklarının oluşturduğu turuncu pikler ile STR bölgesinin alellerini temsil eden mavi pikler vardır. İki mavi pik STR bölgesinin iki aleli olduğunu gösterir. Bu aşamada beklenen pikin yüksek olmasıdır. Pik yüksekliği amlikon sayısı ile doğru orantılıdır. Ayrıca piklerin çatallanma veya tepeleme yapmaması gereklidir. Çatallanma ve tepelem farklı boylarda ürünlerin bulunduğu anlamına gelir ki bu da özgül bir PZR sağlanamadığı şeklinde yorumlanabilir. 100 baz çifti üzerinde ikiden fazla mavi pik olması veya zeminde oluşan mavi renkli pikler büyüklüğüne bakılmaksızın başarısız olarak değerlendirilir. 2 nolu STR bölgesinin 1 nolu primer karışımının farklı ısı derecelerinde yapılan PZR işlemi ile elde edilen veriler Tablo 3.2' ye aktarılmıştır.



Şekil 3.10. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının aynı primer karışımı ile tekrar PZR 'sinden elde edilen elektroferogram görüntüsü. Primer çiftinden sonuç alınamamıştır.



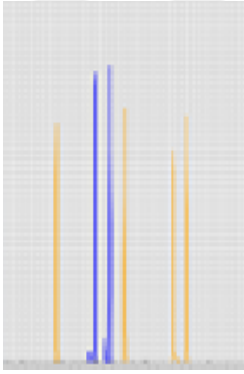
Şekil 3.11. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının tekrar hazırlanması ile yapılan PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü. Tekrar hazırlanan Primer çiftinden de sonuç alınamamıştır.



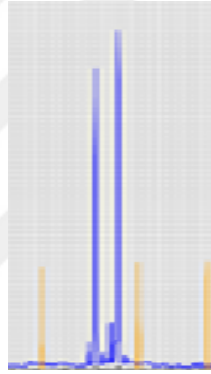
Şekil 3.12. 2 nolu STR bölgesinin 9 nolu primer karışımının tekrar hazırlanan karışımın ikinci PZR ile yapılan toplamda dördüncü çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü. İstenen sonuç alınamamıştır.

Tablo 3.2. 2 nolu STR Bölgesi 1 nolu primer karışımı ile farklı ısı derecelerinde yapılan PZR ile elde edilen verileri gösterir tablo

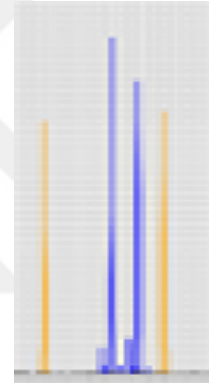
Sıcaklık	Parçacık Yüksekliği		Baseline Kirliliği	Ekstra Pik	Şekil No
	Alel 1	Alel 2			
58 °C	1600	1640	X	√	3.13
60 °C	2250	2540	X	√	3.14
62 °C	1660	1460	X	√	3.15
64 °C	1760	1460	X	√	3.16
66 °C	1450	1170	X	√	3.17
68 °C	1360	1260	X	√	3.18



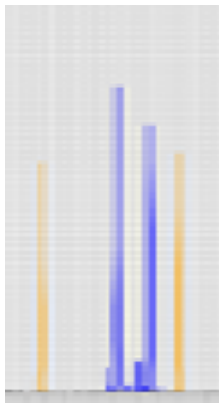
Şekil 3.13. 58 °C' de elektroferogram görüntüsü



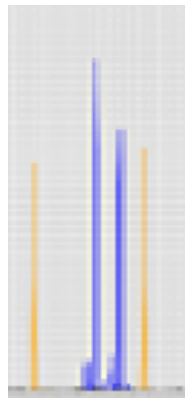
Şekil 3.14. 60 °C' de elektroferogram görüntüsü



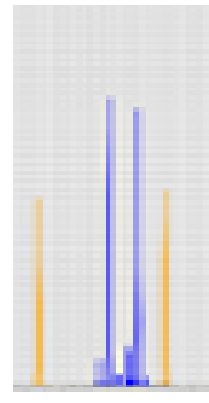
Şekil 3.15. 62 °C' de elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.16. 64 °C' de elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.17. 66 °C' de elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.18. 68 °C' de elektroferogram görüntüsü

İki alelli STR bölgelerinde birinci alelin büyüklüğü kısa olduğu için PZR neticesinde daha çok ürün oluşacaktır. Bu sebeple temsileden pik uzun aleli temsil eden pike göre daha uzun olmalıdır. Tüm yürütmelere eklenen size marker (Şekillerde turuncu ile gösterilmektedir.) aynı miktarda olduğu için alel piklerinin uzunluğu size marker uzunluklarına göre kıyaslandırılarak değerlendirilebilir. Bu açıklamalar ışığında 60 – 62 °C’ de en iyi sonucun elde edildiği kanaatine varılmıştır. Şekil 3.13-3.18.

3.4. Markır’ ların Seçilmesi ve Panelin Oluşturulması

Kullanılan DNA örneğinin DNA profili bilindiği için öncelikle bulunan parçacık büyüklükleri ile beklenen parçacık büyüklükleri karşılaştırıldı. Boyaların elektriksel yükü ve moleküler ağırlığına göre beklenen büyüklükten daha uzun parçacıkların oluştuğu gözlemlense de bu farkın 4 baz çiftinden fazla olmadığı görüldü.

Parçacık büyüklükleri ve tekrar sayısı bilindiği için her bir primer çiftinden elde edilecek en büyük ve en küçük alel büyüklükleri tespit edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. 2 nolu STR bölgesi primer karışımları kombinasyonlarına göre beklenen ve elde edilen uzunlukları gösterir tablo

Primer	Beklenen En Küçük	Beklenen En Büyük
1	260	308
2	201	249
3	181	229
4	240	288
5	181	249
6	161	229
7	226	274
8	167	235
9	149	217

Alel büyüklükleri çakışan primer çiftleri gruplandı. Grup içinde STR bölgelerinden diğer primer çiftlerin iyi sonuç alınamayan veya tercih şansı az olanlar ilk yerleştirilmek sureti ile teke tek tüm STR bölgeleri kombinasyonlar şeklinde yerleştirildi.

Alel sayısı çok olan bölgeler özellikle panelin sonuna planlanırken, Amelogenin ve Y kromozomu üzerindeki STR’ ler panelin başına yerleştirildi.

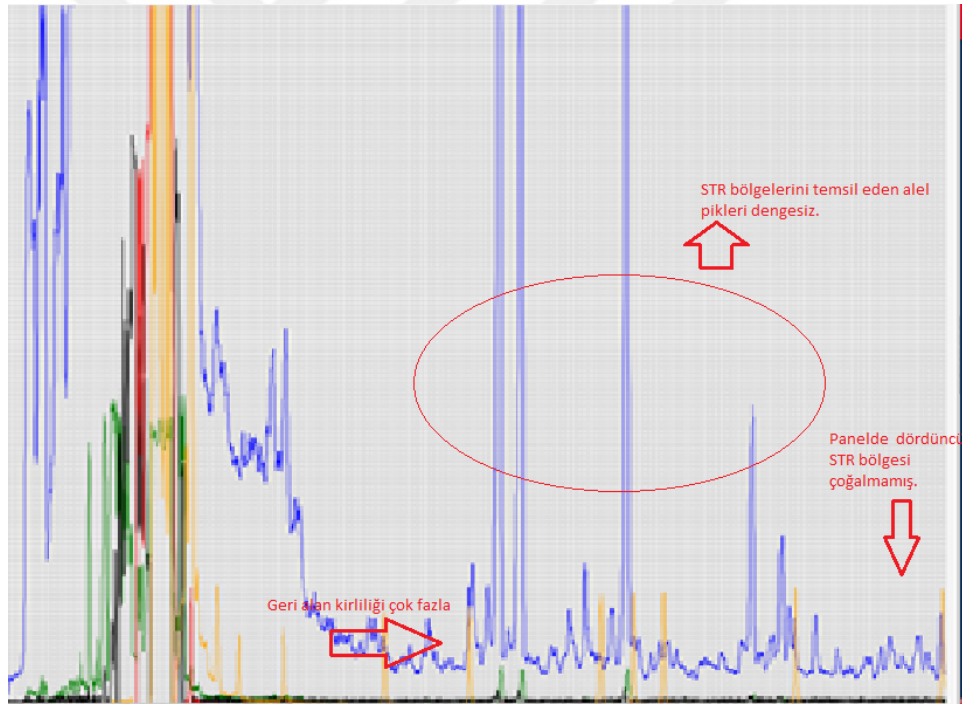
Paneller oluşturulduktan sonra her bir panel için o panelde bulunan primer çiftlerinden eşit hacim karıştırılarak primer karışımı hazırlandı. Bu karışımlar ile PZR işlemi tekrarlandı. Oluşan pik büyüklüklerine göre denge oluşturmak amacı ile primer konsantrasyonları değiştirilerek yeniden PZR tekrarlandı.

Bu çalışma tüm paneller için ayrı ayrı yapıldı.

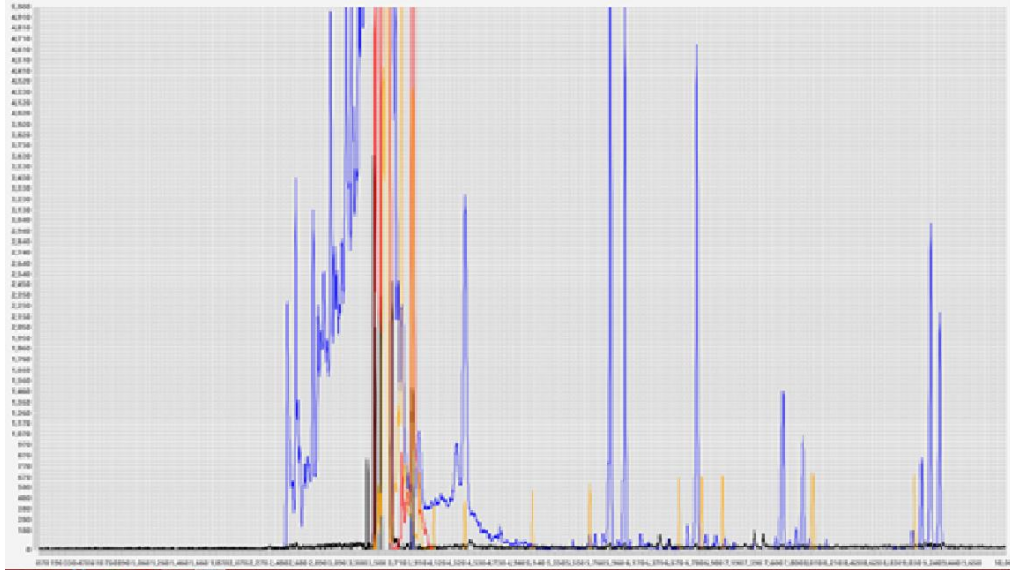
Amelogenin, TH01, D14S1434, F13A1 ve CSF1PO STR bölgelerinden oluşan ve FAM ile işaretlenen panel için hazırlanan primer karışımı ile yapılan ilk PZR ürünün yürütülmesi sonucunda primer artıklarının yoğun olduğu ve yaklaşık 100 baz çiftine kadar yayıldıkları, CSF1PO STR bölgesi alellerinin ise okunamayacak kadar küçülerek kaybolduğu tespit edilmiştir.

Son STR bölgesi olan CSF1PO en uzun alelleri içerdiği için, en yüksek konsantrasyonda bu bölgenin primerleri eklenerek diğer primerlerin bu miktardan hareketle dengelenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.19).

Son olarak primer miktarı genel olarak düşürülerek ürün miktarı düşürülerek kullanılabilir pik dengesi kurulmuştur (Şekil 3.20).



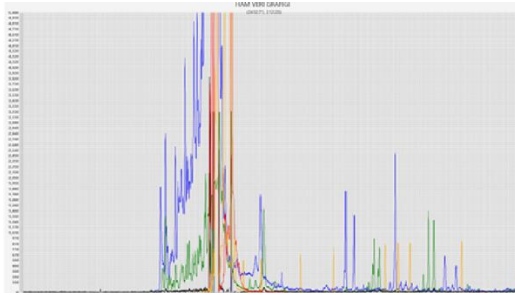
Şekil 3.19. Floresan ile işaretli paneldeki STR bölgelerinin primer konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü. Primer karışımları aynı konsantrasyonda olduğunda dördüncü STR bölgesi hiç çoğalmazken diğer STR bölgelerini temsil eden alel büyüklükleri de dengesiz.



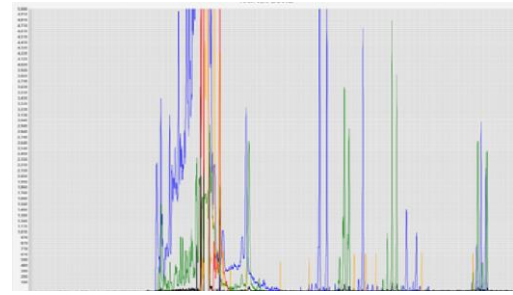
Şekil 3.20. Primer konsantrasyonlarının düşürülmesi ile PZR çalışmasından elde edilen elektroferogram görüntüsü. Pik boyları dengelenmiş. Dördüncü STR bölgesi alelleri çoğalmıştır.

3.5. Kit Optimizasyonu

Her bir panelin pik dengesi sağlandıktan sonra panellerin primer karışımları birleştirilmeye başlandı. Önce iki panel primerleri birleştirildi. Bu primer karışımı ile yapılan PZR ile elde edilen pik dengesi sağlandıktan sonra, üçüncü panelin primerleri ilk iki panel primer karışımlarına eklendi. Pik dengeleme çalışması tamamlandıktan sonra son olarak dördüncü paneli oluşturan STR bölgelerinin primerleri eklenerek çalışma tamamlandı (Şekil 3.21-3.25).

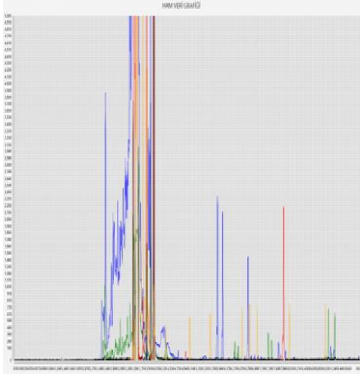


Şekil 3.21. FAM / JOE floresan boya ile işaretli primerlerin aynı primer konsantrasyonları ile elektroferogram görüntüsü

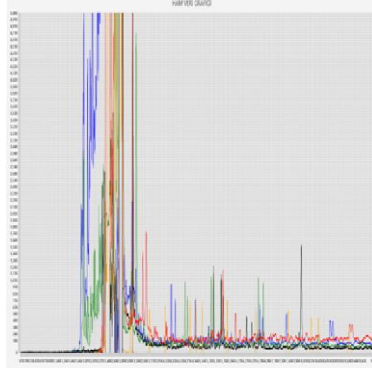


Şekil 3.22. FAM / JOE floresan boya ile işaretli primerlerin primer konsantrasyonları değiştiğinden sonra elektroferogram görüntüsü

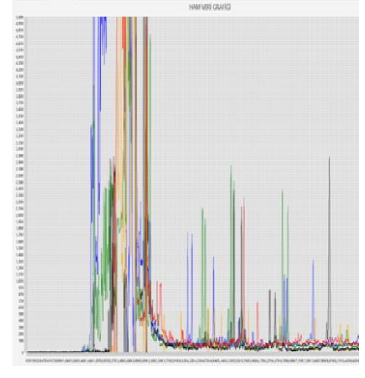
Şekil 3.21. de aynı primer konsantrasyonları ile yapılan PZR elektroferogram görüntüsü eğlendirilerek primer konsantrasyonları değiştirilerek yapılan PZR görüntüsü de Şekil 3.22. de verilmiştir. Primer konsantrasyonları ile denge kurulduğunda alelleri ifade eden pik dengesinin kurulduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.23. ATTO565 ile işaretli primerlerin katılması ile elde edilen elektroferogram görüntüsü

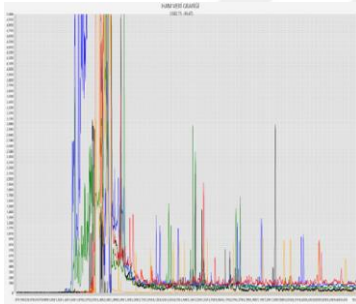


Şekil 3.23. ATTO550 ile işaretli primerlerin katılması ile elde edilen elektroferogram görüntüsü

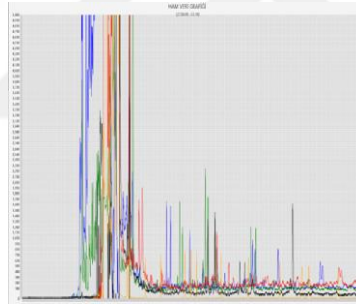


Şekil 3.24. Primer konsantrasyonlarının dengelenmesi ile elde edilen elektroferogram görüntüsü

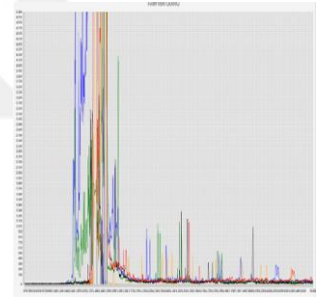
Çalışma neticesinde belirli olan primer konsantrasyonları sabit tutularak dNTP ve MgCl₂ gibi PZR girdilerinin konsantrasyonlarının primer konsantrasyonu ile varyasyonları denenerek kit optimizasyonu sağlandı. Şekil 3.26-3.30' da dNTP miktarında yapılan değişiklikler ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroferogram görüntüleri gösterilmiştir.



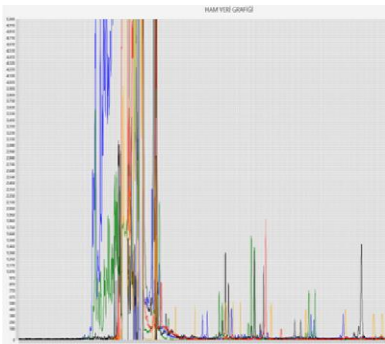
Şekil 3.25. 1 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü.



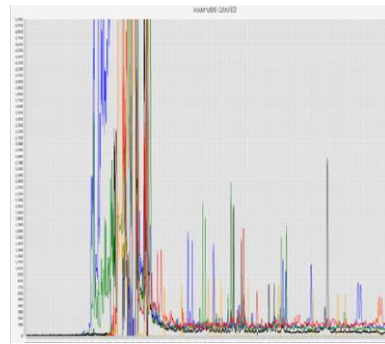
Şekil 3.26. 1,5 µl ile elektroferogram görüntüsü.



Şekil 3.27. 2 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü



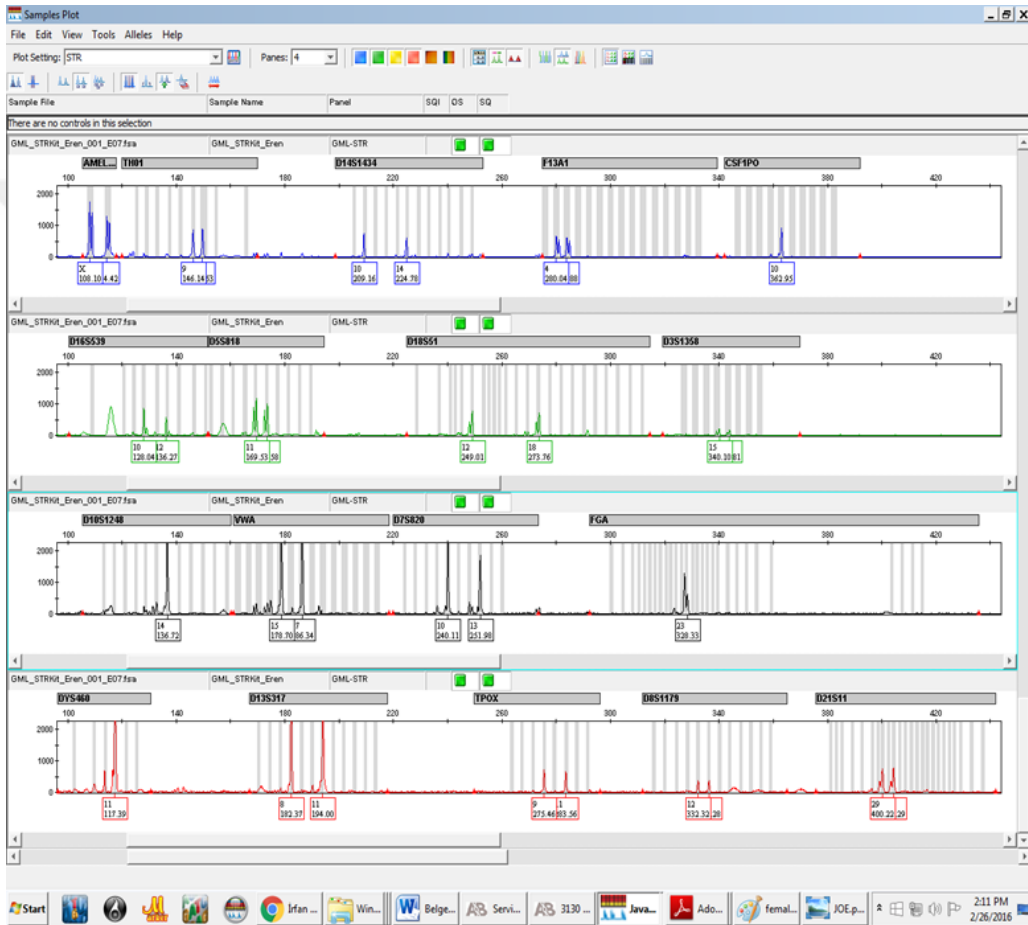
Şekil 3.28. 2,5 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü



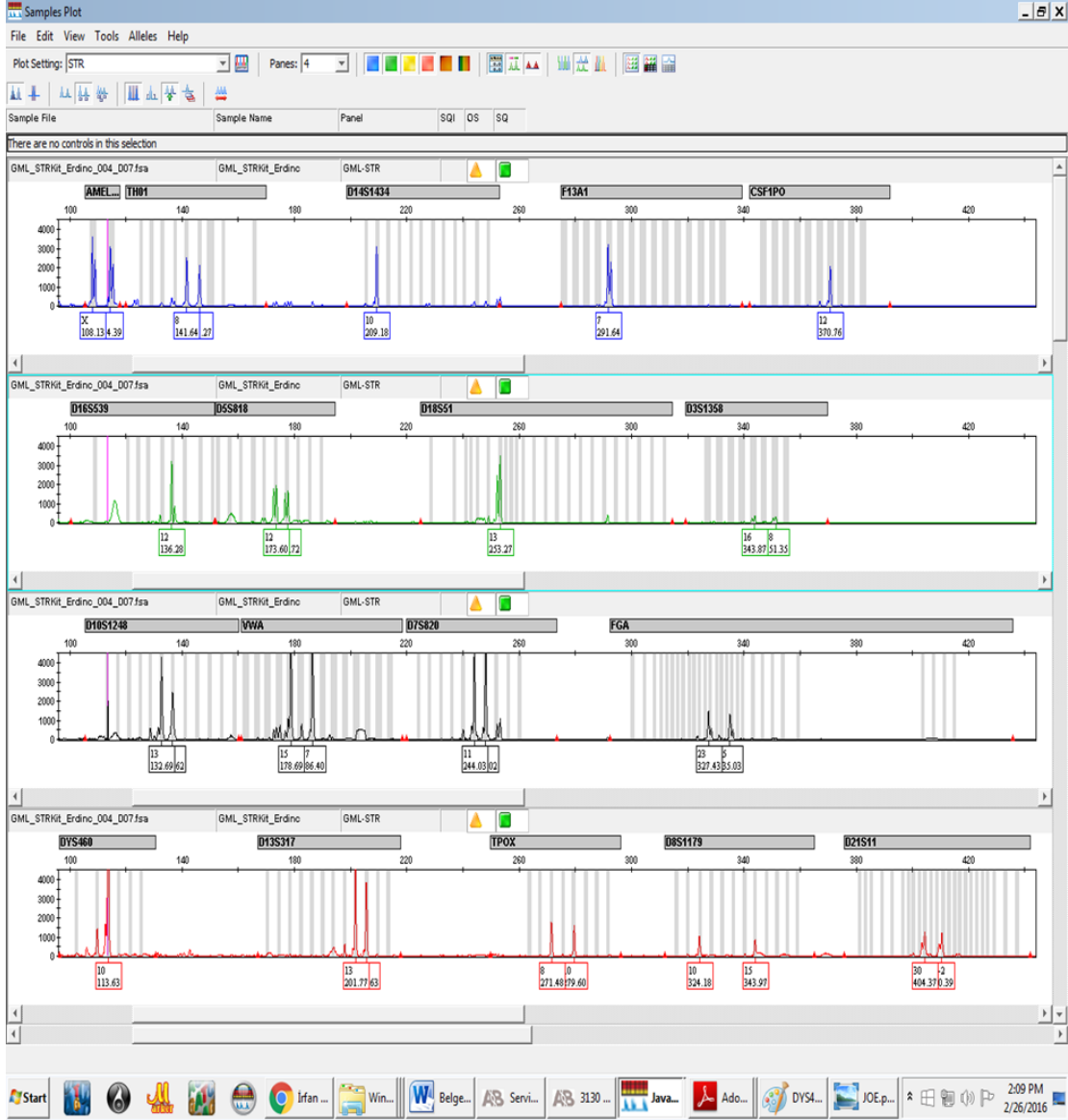
Şekil 3.29. 3 µl dNTP ile elektroferogram görüntüsü

3.6 Kalıp DNA Aralığının Belirlenmesi

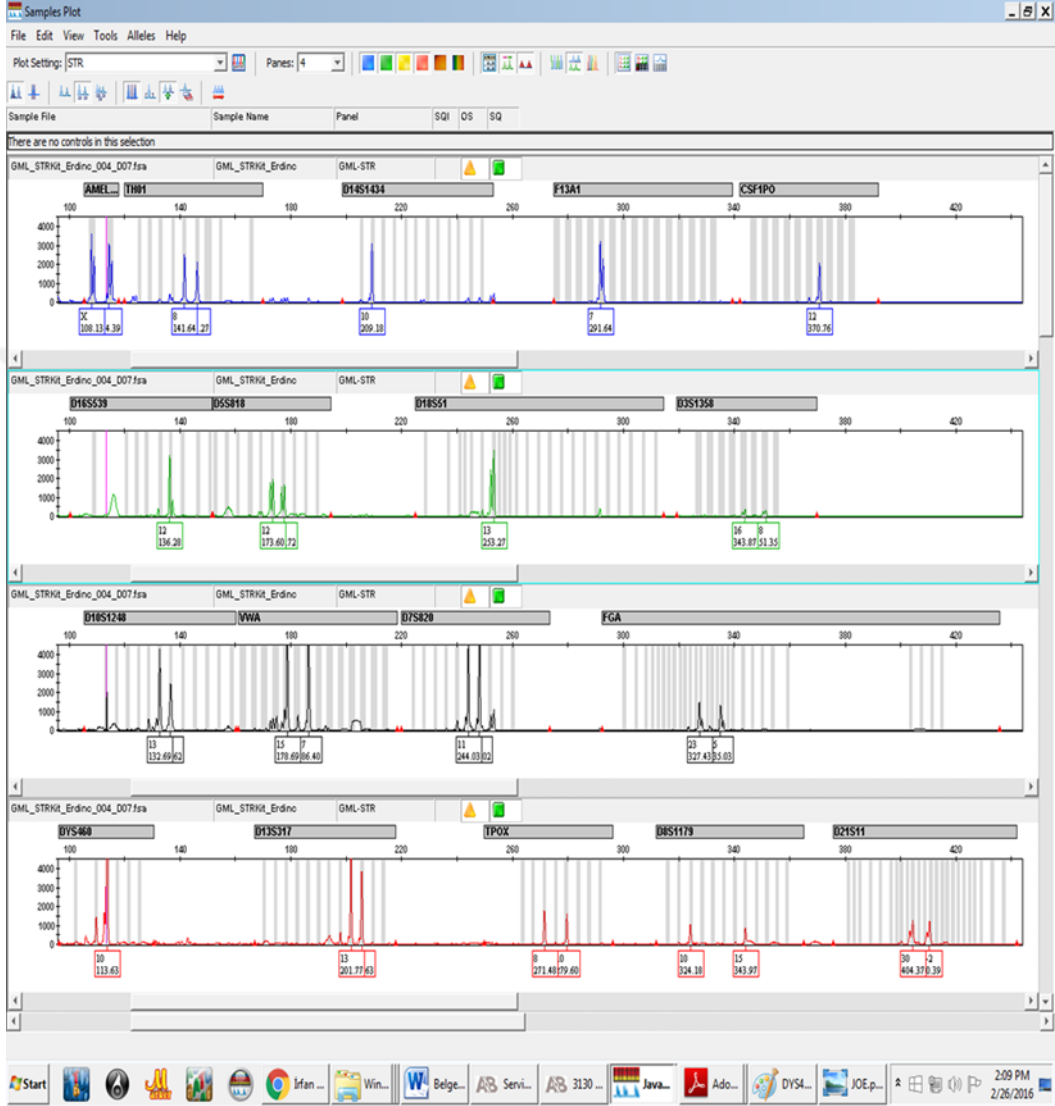
Primer, PZR ve diğer etmenler denenerek optimize edilen kitin hangi aralıkta kalıp DNA ile sonuç verdiğinin anlaşılması için farklı kalıp DNA konsantrasyonları ile yapılan analizler ile kitin 1 – 5 ng aralığında çalıştığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalara ait görüntüler Şekil 3.31-3.35 arasında verilmiştir.



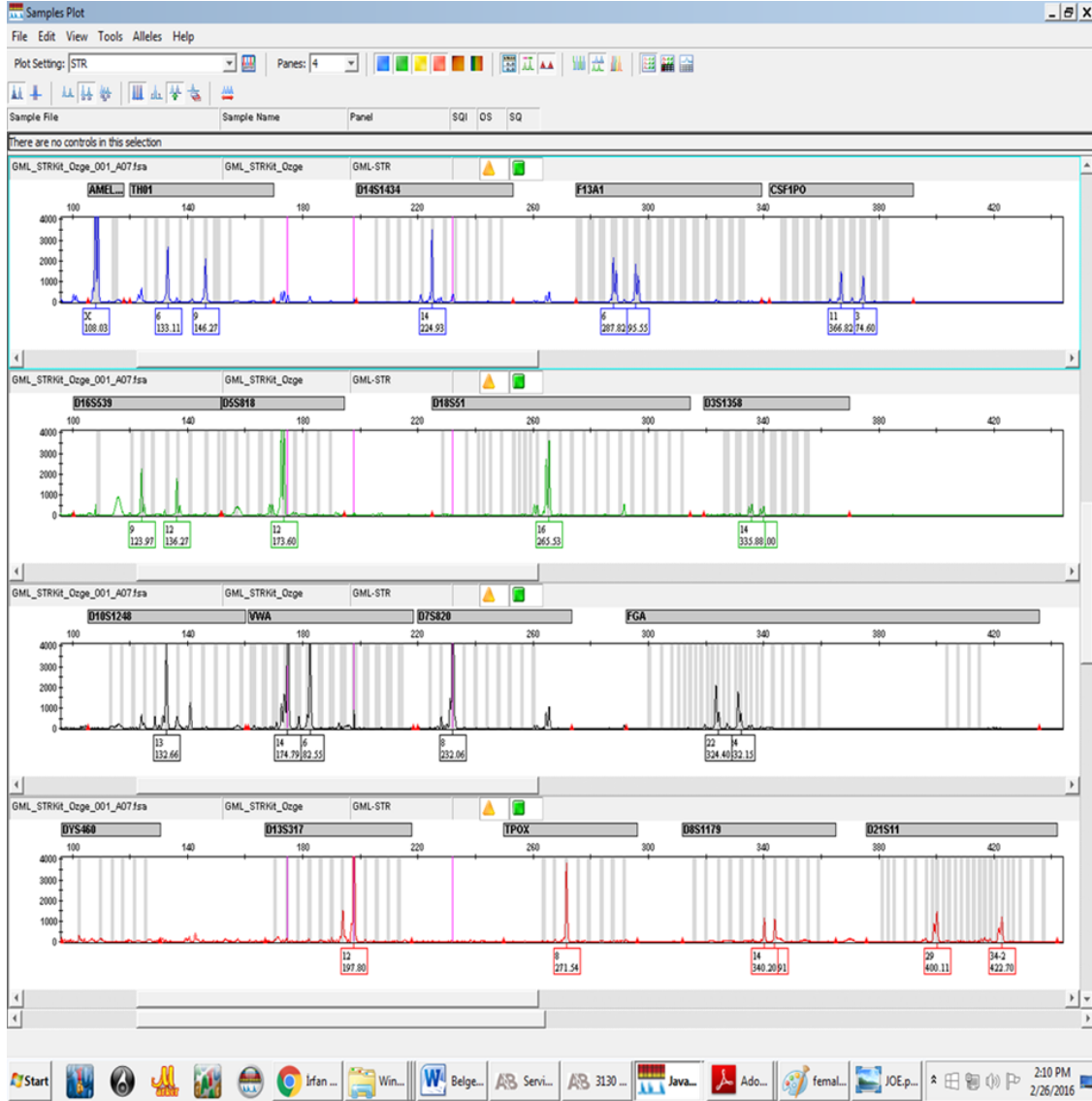
Şekil 3.30. 0,5 ng kalıp DNA ile yapılan PZR çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü. (Tüm aleller mevcut. Pik dengeleri korunuyor. Ekstra pik yok. Uzun STR bölgelerinde pik yüksekliği düşük.)



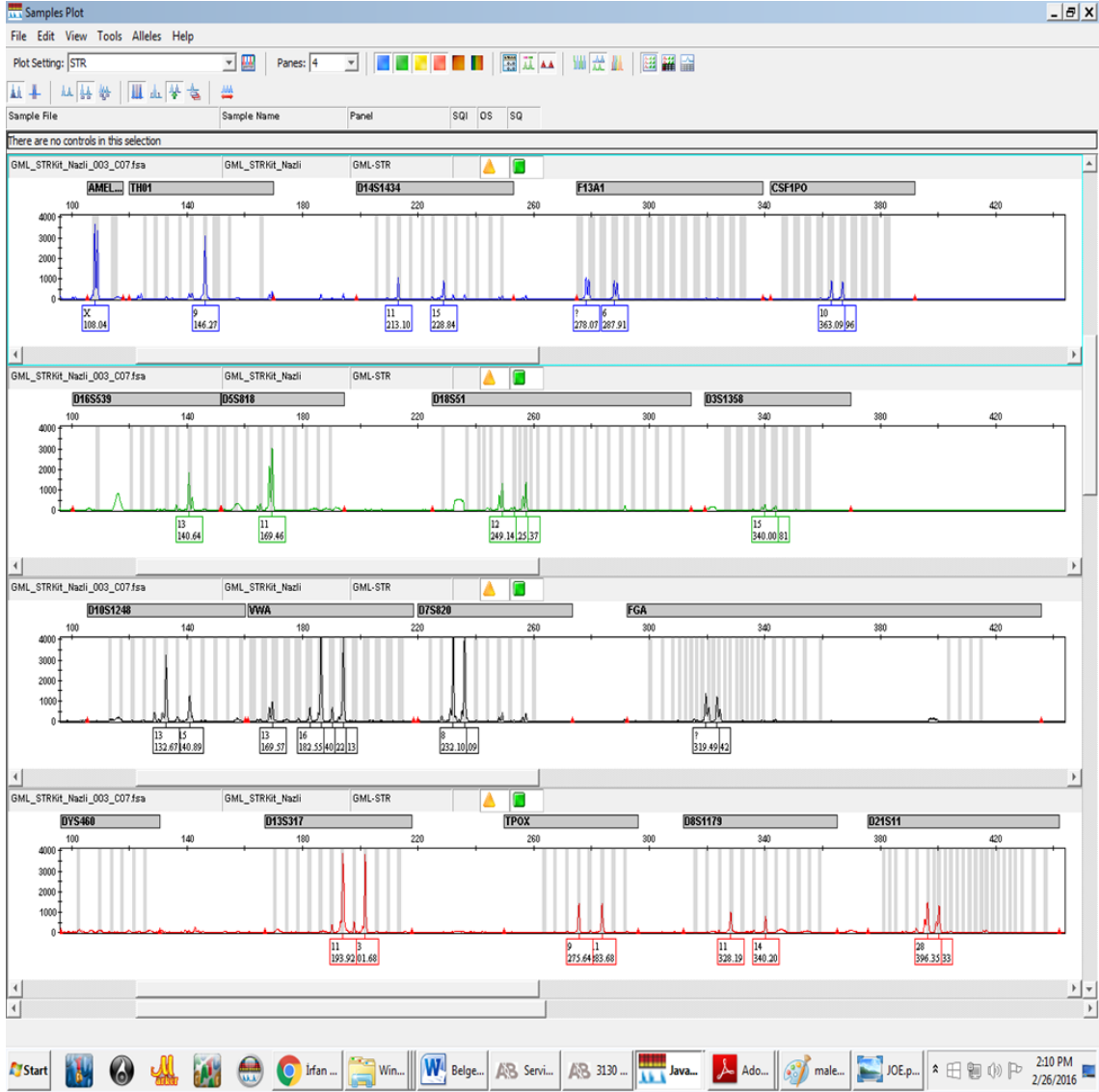
Şekil 3.31. 1 ng kalıp DNA ile yapılan PZR çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü. (Tüm aleller mevcut. Pik dengeleri korunuyor. Ekstra pik yok. Uzun STR bölgelerinde pik yüksekliği düşük.)



Şekil 3.32. 3 ng kalıp DNA ile yapılan PZR çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü. (Tüm aleller mevcut. Pik dengeleri korunuyor. Ekstra pik yok ancak zemin kirliliği var. Uzun STR bölgelerinde pik yüksekliği düşük.)



Şekil 3.33. 4 ng kalıp DNA ile yapılan PZR çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü (Tüm alleller mevcut. Pik dengeleri korunuyor. Ekstra pik yok ancak zemin kirliliği artıyor. Uzun STR bölgelerinde pik yüksekliği düşük.)



Şekil 3.34. 5 ng kalıp DNA ile yapılan PZR çalışılmadan elde edilen elektroferogram görüntüsü. (Tüm aleller mevcut. Pik dengeleri korunuyor. Ekstra pik yok ancak zemin kirliliği var. Uzun STR bölgelerinde pik yüksekliği düşük. Piklerde çatallanma var.)

3.8. DNA Fragment İnceleme Değerlendirme (DNA FinD) Yazılımı

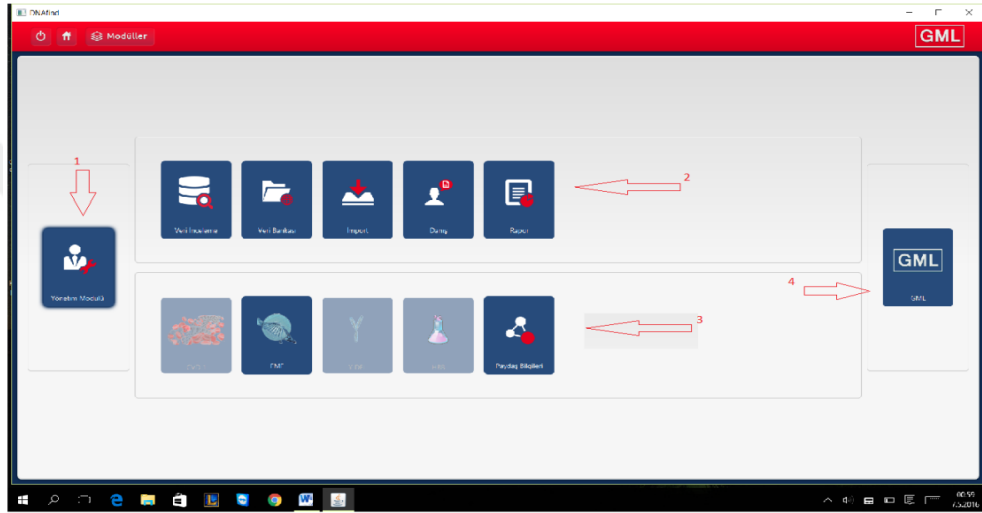
DNA FinD tamamı ile yerli kaynaklar kullanılarak özgün olarak bu tez kapsamında geliştirilen bir yazılımdır. Daha önce anlatıldığı gibi günümüzde kullanılan DNA parçacık analizi yazılımları sonucun hassasiyetini artırmak için mutlaka her yürütme grubunda bir adet alelik ladder yürütülmesini de zorunlu tutmaktadır. Yazılım panel, marker ve bin parametrelerini önce yürütme grubunda bulunan Alelik Ladder üzerine tatbik etmekte ve sonra diğer yürütme sonuçlarının değerlendirmesinde buradan elde ettiği verileri değerlendirmektedir. Burada amaç her yürütme anındaki elektroforez değişkenlerinin etkilerini de analiz sonuçlarını belirlerken kullanarak sonuç hassasiyetini artırmaktır. Bir PZR grubu ile analiz yapılırken mutlaka negatif ve pozitif örnekte eklenerek çalışmanın doğruluğu test edilir. Alelik ladder yerine her yürütme grubunda olan ve yürütme işlemine dahil edilen pozitif örnekten elde edilen verilerin Alelik ladder' dan elde edilen veriler gibi kullanılarak sonuç değerlendirilme yapılabilmesi öncelikle daha önceki bölümlerde sık sık vurgulandığı gibi yeni kit üretirken Alelik ladder kütüphanesi oluşturma zorunluluğunu ortadan kaldıracağı için maliyeti düşürecek ve tekeli ortadan kaldıracaktır. DNA FinD bu amaçtan hareketle kodlanırken yazılımın kullanıcı dostu olması, Adli DNA analizleri dışında fragment analizlerine dayalı tüm diğer metotlara kolayca adapte edilebilir olması yanında analize has farklı sonuçları da raporlayabilmesi hedeflendi. Son olarak elde edilen sonuçların başka bir yazılıma ihtiyaç duyulmadan arşivlenerek bilgi bankası oluşturabilecek şekilde saklanabilmesi imkanı da eklenince yazılım her türlü büyük veya küçük ölçekte çalışan birimlerde kullanılabilecek bir formata sahip oldu.

Ana menü dört ana ekrandan oluşur (Şekil 3.37): Aşağıda kısa başlıklarla verilen her bir fonksiyon madde numarası ile Şekil 3.37 de işaretlenmiştir.

1. Bölüm; Yönetim Modülü; bu bölümden yazılımın kullanacağı analizleri eklenmesi, parametrelerin değiştirilmesi vb. gibi yönetici işlemleri gerçekleştirilir.
2. Bölüm; Tüm parametrelerin değiştirilebileceği ve verinin niteliğinin incelenebileceği modüller ile verinin paylaşılabilmesi ve diğer kullanıcılara yönlendirilebileceği ya da diğer kullanıcılar tarafından gönderilen analizlerin sisteme çekilmesinde kullanılan modüller bulunur.
3. Bölüm Analizler; Belirli bir kite ya da analiz türüne özelleştirilmiş ve otomatize edilmiş modüllerin analizinin yapılabildiği alandır. Bu alana eklenen her bir analiz türü tüm analiz parametreleri ve arşivlenme yöntemleri ile standartlaşmış veya

otomatize edilmiş yöntemler eklenir. Bu modüllerde tüm süreç değiştirilemez ve sonuçlar bu parametreler üzerinden otomatik hazırlanır. Raporlama dahil karşılaştırma veri bankasına aktarım karşılaştırma tarama ve diğer tüm süreçler kendiliğinden ve otomatik olarak yapılır.

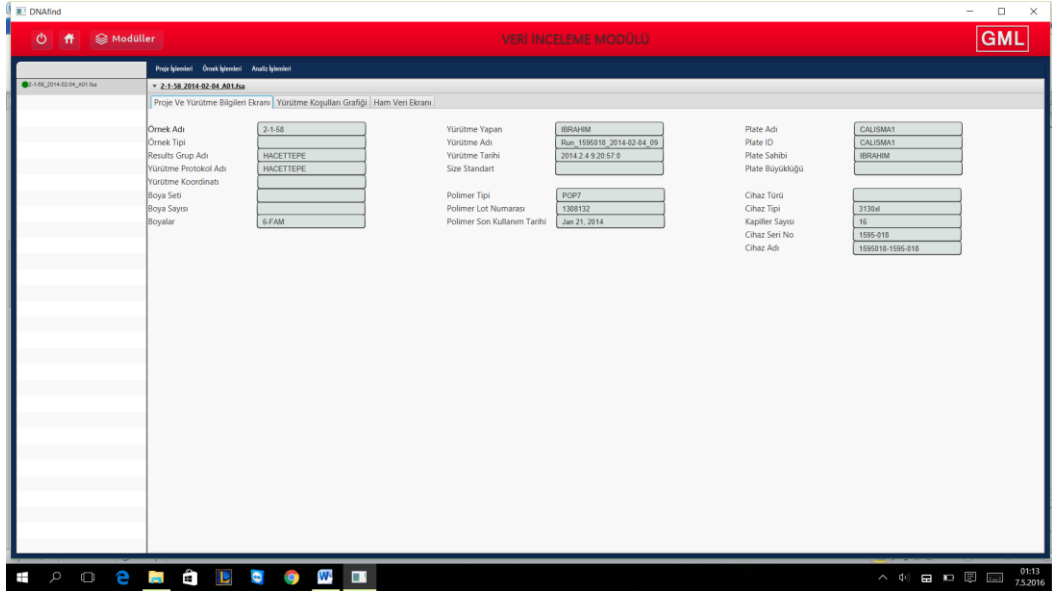
4. Kurumsal Bilgiler; bu bölümde yönetici kurumsal bilgileri, duyuruları, çalışma usul veya talimatları ya da kullanım kılavuzlarını yayımlayabileceği paylaşabileceği alandır.



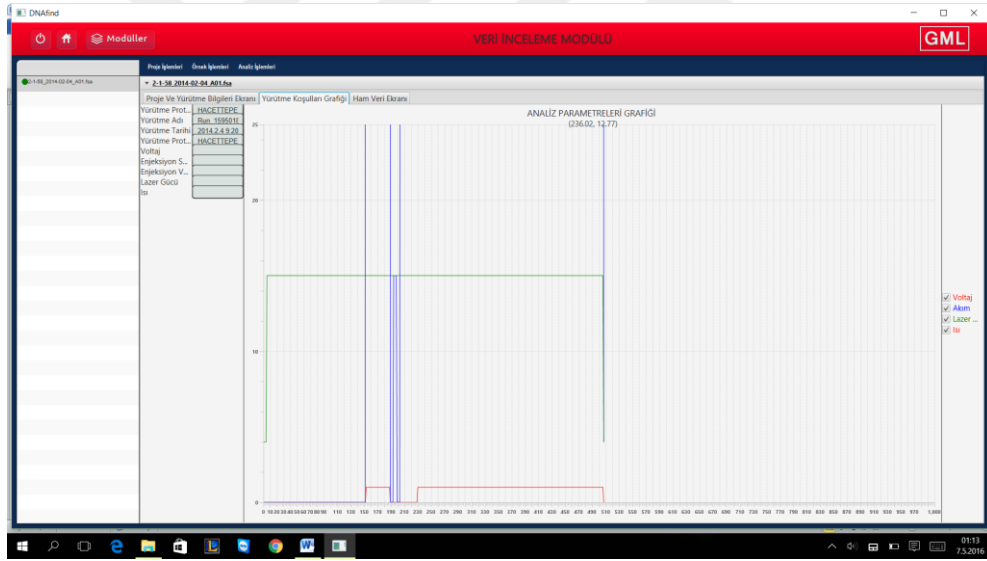
Şekil 3.36. DNA FinD ana menü

Bu bölümlerden anlaşılacağı gibi DNA FinD bir uzmanın standart metotlardan kullanıcı tercihlerinden oluşacak tüm varyasyonlarda analize açık, elde edilen verilerin paylaşılabilirdiği, geçmiş veriler ile karşılaştırılabilirdiği esnek bir yazılım programıdır. Laboratuvar sorumlusu aynı zamanda yazılımı iletişim ve standartlaştırmaya yönelik bildirimlerde de kullanabilir.

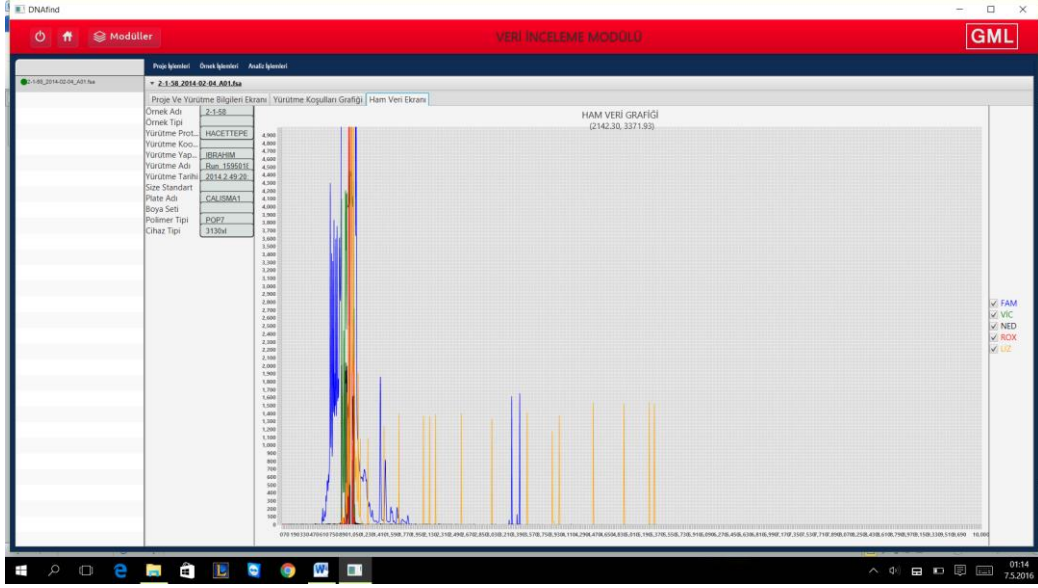
DNA FinD veri inceleme modülü ile analiz verileri herhangi bir kit parametresi girilmeden ön izleme yapılabilir. Bu ön izlemede yürütme parametreleri, yürütme koşulları ve yürütme görüntüsü incelenebilir (Şekil 3.38-3.40).



Şekil 3.37. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme bilgi ekranı.



Şekil 3.38. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme koşulları bilgi ekranı.



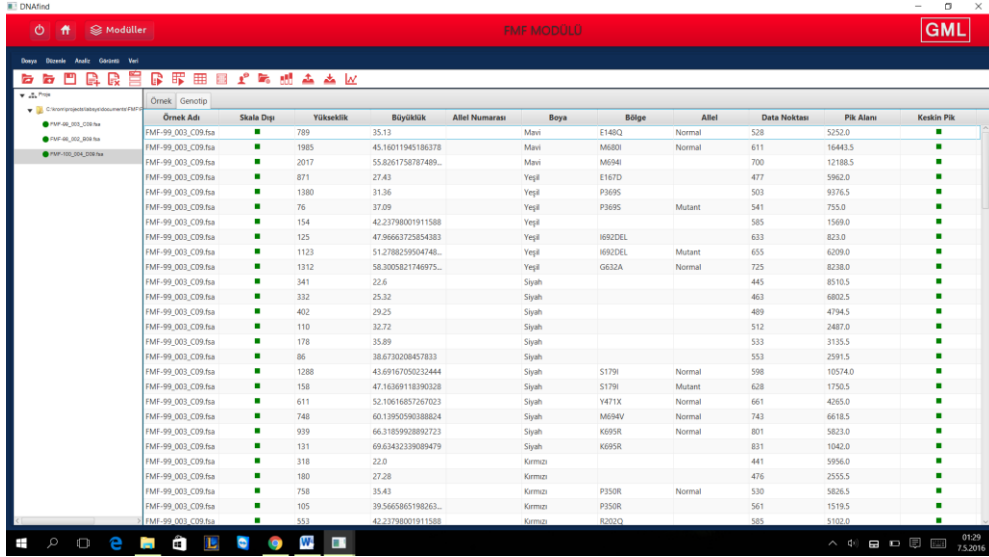
Şekil 3.39. DNA FinD veri inceleme modülü yürütme bilgi ekranı ham veri grafik ekranı.

Pik büyüklükleri, alel bilgileri ve benzeri detay bilgiye ulaşmak ve yürütme sonuçlarının oluşturulması için oluşturulacak proje altında girilecek parametreler ile istenildiği kadar standart model oluşturulabilir ve analizler bu modüller üzerinden gerçekleştirilir (Şekil 3.41-3.43).

Örnek	Durum	Örnek Adı	Analiz Yöntemi	Genotip Kalitesi	Yürütme Tarihi	Matriks	Size Kalitesi
FMF-99_003_C09.fsa		FMF-99_002_C09.fsa	20140318143434_FMF VERİYO...			AnySDye	
FMF-99_002_B09.fsa		FMF-99_002_B09.fsa	20140318143434_FMF VERİYO...			AnySDye	
FMF-100_004_D09.fsa		FMF-100_004_D09.fsa	20140318143434_FMF VERİYO...			AnySDye	
FMF-100_004_D09.fsa		FMF-100_004_D09.fsa				AnySDye	

Şekil 3.40. DNA FinD analiz modülü

Proje oluşturulup içine veri kaydedildikten sonra, önceden oluşturulan parametrelere göre yapılan analiz neticesinde verinin istenilen standarda uygun olup olmadığı ve elde edilen alel isimleri listelenir (Şekil 3.42).



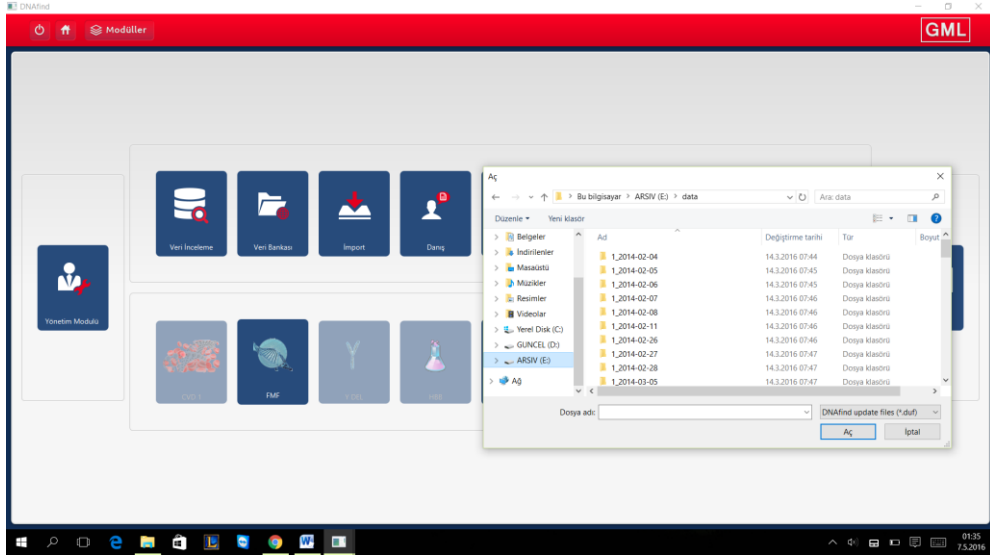
Şekil 3.41. DNA FinD analiz modülü panel detay bilgi ekranı

Her bir örnek için detay ekranlara ulaşıldığında tüm parametrelerin düzenlenebildiği ve sonuçların pik/allel karşılıklarının detaylı olarak sorgulanabildiği görüntüleme ekranlarında veri analiz edilebilir veya otomatik olarak analiz ettirilerek yine ekranın sağında kalan bölümden tüm hatalar tek tek incelenebilir(Şekil 3.43).



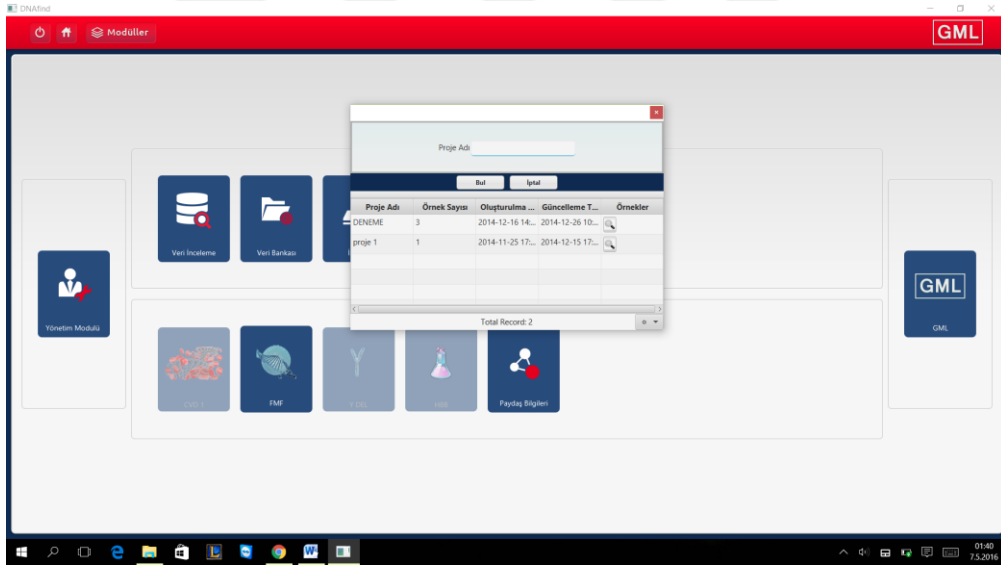
Şekil 3.42. DNA FinD analiz modülü pik detay bilgi ekranı

Ekran ve görüntü üzerinde istenilen her türlü parametre değişikliği anlık yapılabilir ve yapılan değişiklikler saklanabilir. Dışarı modülü ile projeler ve örnekler tek tek başka bir analist ile paylaşılmak üzere tüm parametre ve değişikli log' ları ile birlikte veri dosyasına dönüştürülerek dışarı aktarılabilir gibi import modülü ile de bu şekilde oluşturulmuş tüm projeler sistem yüklenerek değerlendirmeye alınabilir(Şekil 3.44, Şekil 3.45).

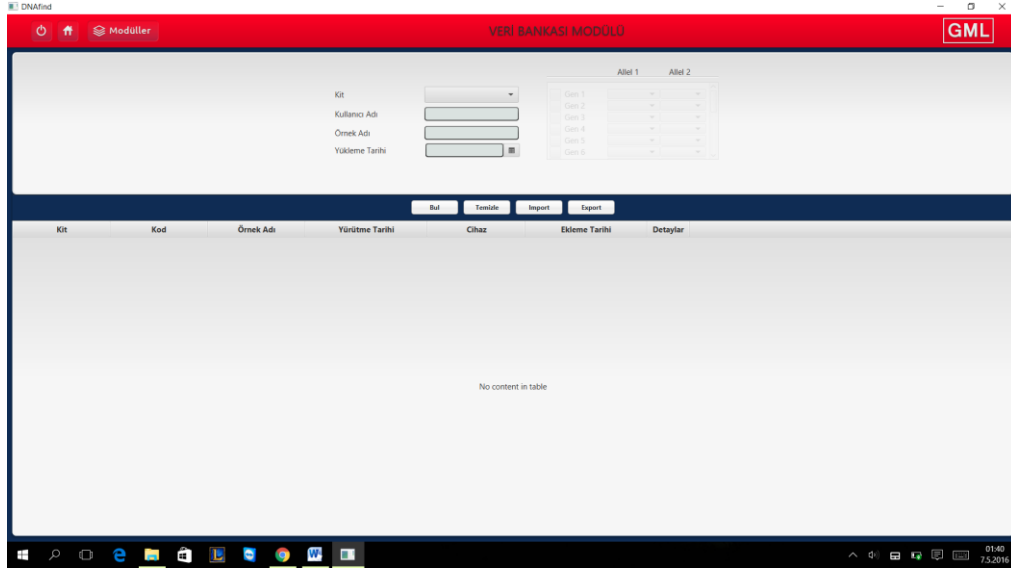


Şekil 3.43. DNA FinD import ekranı

Oluşturulan proje sonuçları sisteme girilecek format ve değerlendirme kriterlerine göre Word formatında rapora dönüştürülebileceği gibi her bir kullanıcı için analiz sonuçlarını saklayabileceği DNA Veri Bankaları oluşturulabilir.



Şekil 3.44. DNA FinD export ekranı



Şekil 3.45. DNA FinD veri bankası ekranı

Son olarak eğer bir grup analist çalışıyor ise analistlerin birbiri ile iletişimin ve veri paylaşımının sağlanabileceği paylaşım grupları oluşturulabilir. İsteğe göre analistler istedikleri veriyi otomatik olarak paketleyip e-posta ile ulaştırabilecekleri gibi ortak veri havuzları da oluşturabilirler.

3.9. Tartışma

Adli DNA analizleri, gerek dayandığı bilimsel temeller ile ölçülebilir nicel sonuçlara ulaştırabiliyor olması gerekse doğrudan kişiler ile ilişkilendirilebilmesi nedeni ile adli bilimlerin alanında altın standart olarak sınıflandırılan bilim dallarındandır. Bu sebeple adli kolluk güçlerinin ve adli yargı makamlarının suç olaylarının çözümünde -deliller uygunsa- mutlaka kullandıkları bir araçtır.

Bu tez çalışması kapsamında asıl hedef mevcut yöntem ve teknolojiye alternatif yeni ve özgün bir analiz metodu ve platformu geliştirmektir. Bu tez kapsamında geliştirilen teknoloji ve kit ile yapılacak deneylerden elde edilen verinin analizi yapılacaktır. Bu kapsamda geliştirilen kit hem yeni analiz platformunda hem de mevcut analiz yöntemlerinde kullanılabilir bir durumdadır. Aynı şekilde geliştirilen analiz platformu mevcut deneysel metodlarda kullanılan kitlerden elde edilen verileri de analiz etmektedir.

Dolayısı ile geliştirilen kit mevcut standartları karşılamalıdır. Bu standartlar öncelikle ayırım gücünün yüksek olması, tüm otorite kurum veya kuruluşların /(INTERPOL, EUROPOL, CODIS v.b.) standartlarına uyması ve mevcut kitlerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılabilir olması olarak çerçevelendirilebilir.

Bir gen bölgesini temsil eden alel sayısı ve heterozigotluk oranı ne kadar fazla ise o bölgenin ayırım gücü de o kadar fazla olacaktır. Forensik analizlerde ayırım gücü (Power of Discrimination-PD) olarak adlandırılan değer; bir STR bölgesinin potansiyel olarak, bir popülasyonda rastgele olarak seçilen iki kişinin birbirinden farklı olduğunu gösterme gücünü tanımlar. Ayırım gücünün 1 tam sayısından çıkarılması ile tanımlama gücü (Power of Identifiy-PI) bulunur. Bu değer STR bölgesi için aynı genotipin bulunma olasılığıdır. PI ve PD değerleri STR bölgesinin adli DNA analizleri için etkinliğinin göstergesidir. STR kiti içinde PD ve PI değeri kitin etkinliği için önemlidir. (Tablo 3.4 - Tablo 3.5)

Erken dönem STR kitlerinden olan Co Filer (D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO ve D7S820) altı STR bölgesini içerir ve PI değeri $5,45 \times 10^{-7}$ dir. 4 renk teknolojisinin kullanılması ile üretilen ilk kitlerden biri Profiler Plus'ın tanımlama gücü $6,11 \times 10^{-12}$ olup CoFiler' e göre yaklaşık 100 Bin kat daha güçlüdür. Dört renk teknolojisinin kullanıldığı ve en yaygın kullanıma sahip kiti olan SGM Plus tanımlama gücü $7,04 \times 10^{-14}$ 'dür. Bu değer Cofiler 'in 10 milyon, Profiler Plus'ın 100 katı daha güçlüdür.

Geliştirilen kitin PI değeri $4,58 \times 10^{-19}$ olup Cofiler 'dan 100 milyar kat, Profiler Plus'tan 10 milyon kat, SGM Plus'tan ise 100 bin kat daha güçlüdür. Dört farklı ırk grubuna göre yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere farklı popülasyonlar için elde edilen ayırım gücü SGM Plus' tan yüksektir.

Günümüzde kullanılan en güçlü STR kitleri 5 renk teknolojisi ile üretilen Globalfiler ile PowerPlex Fusion'dur. Bu kitler beş renk teknolojisi ile üretildiklerinden içerdikleri STR bölgesi sayısı dört renk teknolojisine göre daha fazladır. Globalfiler 21 ile PowerPlex Fusion 22 otozomal STR bölgesi içerir. Globalfiler tanımlama gücü $7,73 \times 10^{-28}$, PowerPlex Fusion 'ın ki ise $6,58 \times 10^{-29}$ olup geliştirilen kite göre en az 1 milyar kat daha güçlüdürler. Ancak beş renk teknolojisinin kullanımı yeni alınacak ekipmana bağlı olup son iki yıldan önce temin edilen tüm cihazların beş renk teknolojisi içeren kitleri analiz etmesi mümkün değildir. Bunun yanında geliştirilen kite eklenecek yeni bir boya ile panel sayısı artırılıp beş renk teknolojisi kullanılarak ayırım gücü artırılabilir.

Ancak asıl popülasyon genetiği çalışmaları ile mevcut kitler ile karşılaştırmalı analizlerinin prototip kitin geliştirilerek nihai ürünün ortaya çıkarılması çalışmaları kapsamında yapılmasının uygun olacağı değerlendirilmektedir.

Tablo 3.4. Geliştirilen Kit içeriğindeki STR bölgelerinin popülasyonlara göre ayırım gücü ve toplam ayırım gücü (PI)

STR Bölgesi	Beyaz Irk	Afrika-Amerika	Latin Amerika	Asya
TH01	0,0931	0,1050	0,0848	0,1361
D14S1434	0,1815	-	0,1624	-
F13A1	0,1164	0,0637	0,0783	0,1935
CSF1PO	0,1285	0,0827	0,1255	0,1040
D16S539	0,0983	0,0733	0,0762	0,0928
D5S818	0,1486	0,0983	0,1457	0,0788
D18S51	0,0305	0,0280	0,0303	0,0507
D3S1358	0,0758	0,1090	0,0904	0,1485
D10S1248	0,0989	0,0693	0,1050	0,0919
vWA	0,0660	0,0623	0,0730	0,0885
D7S820	0,0628	0,0889	0,0867	0,1006
FGA	0,0399	0,0318	0,0278	0,0528
D13S317	0,0777	0,1342	0,0526	0,0766
TPOX	0,1811	0,0879	0,1554	0,2188
D8S1179	0,0617	0,0660	0,0621	0,0492
D21S11	0,0512	0,0435	0,0468	0,0566
KİT PI	2,798X 10 ⁻¹⁷	5,03 X 10 ⁻¹⁸	9,32 X 10 ⁻¹⁷	3,04 X 10 ⁻¹⁶

Avrupa adli bilimler örgütü, ENFSI, üye ülkelerin kullandıkları kitlerde TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11, D3S1358, D12S391, D1S1656, D2S441, D10S1248, D22S1045, amelogenin bölgelerinin bulunmasını bildirmiştir. Bu şekilde üye ülkeler arasında profil karşılaştırması mümkün olacaktır. Geliştirilen kitte bildirilen bölgelerden sekizi ve amelogenin bulunmaktadır. (TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11, D3S1358, D10S1248, amelogenin) Bu da ENFSI standartlarının karşılanarak üye ülkelere bağlı laboratuvarlarda kitin kullanılabilmesini sağlamıştır.

Tablo 3.5. Türkiye genelinde yapılan bölgesel popülasyon çalışmalarında elde edilen ayırım gücü verileri.

STR Bölgesi	TÜRKİYE	BOLU	BATI BÖLGELERİ	DOĞU BÖLGELERİ
TH01	0,924	0,913	0,915	0,927
CSF1PO	0,869	0,865	0,879	0,874
D16S539	0,924	0,929	0,919	0,922
D5S818	0,888	0,862	0,879	0,886
D18S51	0,968	0,953	0,966	0,970
D3S1358		0,901	0,904	0,907
vWA	0,938	0,927		0,935
D7S820	0,933	0,931	0,924	0,933
FGA	0,962	0,937	0,944	0,961
D13S317	0,927	0,883	0,912	0,922
TPOX	0,823	0,772	0,851	0,840
D8S1179	0,939	0,911	0,946	0,949
D21S11	0,956	0,941	0,948	0,960

Amerika Birleşik Devletleri DNA Veri Bankası, CODIS, üye eyaletler arasında veri değişimi ve karşılaştırılması için TPOX, D3S1358, FGA, D5S818, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, amelogenin bölgelerini standart olarak bildirmiştir. Geliştirilen kit, standart olan tüm bölgeleri ve amelogenin bölgesini içermektedir. CODIS sadece ABD’ de değil aynı zamanda birçok devlette de (Slovakya, İsveç, Hollanda vd.) kullanılmakta olduğundan geliştirilen kit bu organizasyon için de kullanılabilir.

Global ölçekte en büyük organizasyonlardan olan Uluslararası Polis Teşkilatı, INTERPOL, üyesi olan 190 ülkeye analizlerinde kullanılması bildirdiği bölgelerden vWA, TH01, D21S11, FGA, D3S1358, D18S51, TPOX, CSF1PO, D13S317, D7S820, D5S818, D16S539, F13A1 ve Amelogenini içermekte ve yeterlilik sağlamaktadır.

Ayrıca otozomal STR bölgelerine ek olarak bir adet Y STR bölgesi de kite eklenmiştir. Eklenen bu bölge ile amelogenin yanında bir cinsiyet bölgesi daha eklenerek cinsiyetin

tespitinde ve dişi baskın durumlarda olası erkek kalıntılarının tespiti için imkân sağlandı. Eklenen Y STR bölgesinin cinsel içerikli suçların aydınlatılmasında ve amelogenin bölgesindeki olası mutasyonlar nedeni ile yanlış sonuç elde edilmesinin önüne geçilmiştir.

Bu tez çalışmasının bir diğer hedefi ise daha öncede belirtildiği üzere mevcut tekelleşmiş cihazların, kitlerin ve analiz yazılımlarının oluşturduğu analiz yöntemlerine alternatif yeni ve özgün bir analiz platformu geliştirmektir. Bu platformun temelini de yine bu tez kapsamında özgün olarak geliştirilen yazılım oluşturmaktadır. Bu yazılım yeni kitlerin geliştirilmesinde karşılaşılan ve daha önceki bölümlerde anlatılan sorunlara çözüm olmasının yanında geliştirilecek tüm genetik kitlerin verisinin analiz edilmesi, saklanması, arşivlenmesi, karşılaştırılması ile raporlanmasını da sağlayabilmeli ve her kullanıcı bu yazılımı kendi bilgisayarında kullanabilmelidir.

Mevcut analiz yöntemlerinde alelik ladder kullanım zorunluluğu vardır. Alelik ladder her STR bölgesi için bilinen tüm alellere ait fragmentleri içermektedir. Kit geliştiricilerinin bu alelleri toplayarak bir araya getirmesi veya sentetik olarak üretmesi gibi bir zorunluluk vardır. Geliştirilen yazılım ile alelik ladder ihtiyacı olmaksızın elde edilen verilerin analizi mümkün olduğundan geliştirilecek kitlerin maliyetinden ve iş gücünde tasarruf sağlanmıştır.

Mevcut kullanılan yazılımda -daha önce detaylı anlatıldığı üzere- verinin analiz edilerek alel adlarının belirlenmesinde mutlaka alelik ladder kullanılmaktaydı. Bu zorunluluk, özellikle fragmentlerin baz kompozisyonunun ve yürütme koşullarının anlık değişiminin sebep olduğu yavaşlama veya hızlanmaların parçacık büyüklüğünün tespitinde yanılmalara yol açabileceği temelinden köken alır. Bu anlık değişikliklerin o an için yürütme yolunun sonuna gelmiş ve dedektör önüne ulaşan parçacığın baz kompozisyonuna göre farklı şiddette etki ile hızlanmasına veya yavaşlamasına sebep olacağı değerlendirilerek, aynı yürütme koşulları ile yürütülen alelik ladderın da aynı etkilere maruz kalacağı belirtilerek her yürütmede alelik ladder bulunması zaruret haline getirilmiştir. Aslında bu zaruret konulurken hedeflenen yeni üreticilerin alelik ladder oluşturmada ve canlı tutmada yaşayacağı sıkıntıların rekabet ortamının oluşmasını engellemesi ile etkisini göstermiş ve piyasada kısıtlı sayıda alternatif markanın bulunması ile neticelenmiştir. Ancak bu temel tezin aksine iki husus dikkate alındığında aslında alelik ladder' ın bahsedilen istisnaların giderilmesinde çok da anlamlı olmadığı anlaşılabilir.

Örneğin, özellikle tek kapilerli sistemlerde her bir yürütme farklı bir zamanda ve farklı ortam koşullarında gerçekleştiği için alelik ladder' ın aynı koşullarda yürütülmesi gibi bir durum

söz konusu değildir. Dolayısı ile başta ifade edilen aynı koşullar tezi tek kapilerli sistemler için devre dışı kalmaktadır.

Aynı şekilde çoklu kapilerli sistemler için dış koşullar aynı tutulmuş olsa bile alelik ladder'ın yürütüldüğü kapiler ile örneklerin yürütüldüğü kapilerler farklı olacaktır. Dolayısı ile farklı bir kapilerle yapılan yürütmenin de örnek ile aynı koşullara sahip olduğunu kabul etmek uygun olmayacaktır.

Dolayısı ile bu tezin çıktılarında biri mutlaka alelik ladder zorunluluğunun ortadan kaldırılması olmuştur. Bu zorunluluğun kalkması ile bundan sonra geliştirilecek tüm yeni kitler içinde imkân verecektir.

Bu hedeften hareketle alelik ladder yerine pozitif kontrol örneğinin kullanılmasının daha pratik olacağı değerlendirilmiştir. Hem kalite uygulamalarının zorunluluğu hem de deneysel metodların geleneği gereği mutlaka her çalışmaya bir pozitif bir de negatif örnek eklenir. Pozitif örnek profili daha önceden bilineceği için yazılım alelik ladder yerine pozitif örneği standart kabul edip diğer bilinmeyen örneklerin analizinde referans olarak kullanabilmektedir.

Bu şekilde benzer çalışmalar ve kit geliştirecek bilim insanlarının da önü açılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan boyaların telif hakkı olmaması sadece adli değil diğer birçok çalışma alanı içinde uygulanabilir bir kapı açmıştır. Bu, her türlü çalışma için rekabeti güçlendirecek bir çalışma rahatlığı getirmiştir.

Yeni bir ürün geliştirirken karşılaşılan en ciddi risk üretilen ürünün kullanılabilir olması için maliyetinin mevcut ürünlere yakın olması gerekliliğidir. Kullanılan ham maddelerin maliyetleri doğrudan ürünün maliyetini belirlerler. Bu amaçla özellikle enzim, boya ve benzeri patentli ürünlerin kullanılması ile ürünün maliyeti yükselir. Dolayısı ile rekabet ortamı oluşmaz ve yeni ürün geliştirme imkanı oluşmaz. Bu çalışma kapsamında kullanılan boyalar patent ödemesi gerektirmeyen her geliştirici için uygun ve kullanılabilir niteliktedir. Böylece yapılan yeni ürün geliştirme çalışmalarında kullanılabilirler. Sadece mevcut teknoloji değil geliştirilecek yeni yöntemler için de imkan sağlarlar.

Sonuçların analiz edilmesi için kullanılan yazılımın açık kodlar ile tarafımızca yapılmış olması sadece analiz aşamasında değil sonuçların değerlendirilmesi, arşivlenmesi diğer sonuçlarla karşılaştırılması veya raporlanması aşamaları için de çıktı vereceğinden otomasyonda ve ek uygulamaların entegre edilmesinde analistlerin elini rahatlatmıştır.

Bu çalışma ile geliştirilen yazılım ile sadece STR değil diğer elektroforetik analizler veya real-time temeline dayanan genetik kitlerin analizi içinde kullanıcı sayısınca temin edilebilecek ve ortak çalışmalara izin verecek bir yazılım ortaya çıkmıştır. Kısaca onbinlerce dolar verip bir lisans almak yerine bir seferde her kullanıcının kullanacağı bir yazılımı temin etmek daha ucuz ve kolay olacaktır. Bu yazılım ile aslında birden fazla yazılım bir araya getirilerek otomatik ve tek bir ürün ortaya çıkarılmıştır. Bu yazılım öncelikli işlevi olan veri analizi yanında, veri depolama, karşılaştırma ve paylaşma gibi birden fazla yazılımında işlevini görecektir şekilde kodlanmıştır. Kullanıcı herhangi bir yazılıma ihtiyaç duymadan sayılan tüm ihtiyaçları tek bir yazılım ile karşılayabilmektedir.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında geliştirilen multipleks kit uluslararası standartları karşılar nitelikte olup küresel ölçekte elde edilen DNA profilleri ile mukayeselenilerek sonuç verilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede, oluşturulan kit sadece Türkiye’deki adli DNA analizlerini sonuca ulaştıracak bir kit olmayıp ENFSI, INTERPOL, CODIS gibi uluslararası standartların kullanıldığı ülkelerdeki adli vakaları sonuca ulaştırabilecek bir kit olma özelliği ile Türkiye’de daha önce bu alanda bulunmayan bir ürün olma özelliğini göstermektedir. Aynı şekilde elde edilen piksel verilerin anlamlı birer sonuca dönüşmesini sağlayan fragment analiz yazılımı da yine bu tez kapsamında geliştirilerek uluslararası alanda rekabetin oluşmasını sağlayacaktır. Adli DNA analizlerinde ve diğer fragment analizlerinde de kullanılabilir olan bu teknoloji de Türkiye’de ilk defa geliştirilmiş olup uluslararası ölçekte kullanıma hazırdır. Oluşturulan kit ve yazılım ile sadece yeni bir ürün geliştirilmemiş bunun yanında yapılacak yeni geliştirme çalışmaları için kullanılacak bir platform oluşturulmuştur. Bu platform fragment analizleri yanında diğer birçok genetik analiz yönteminde de kullanılabilir ve yeni geliştirilecek teknolojiler için temel oluşturabilir yapıdadır.

Bu tez çalışması limitleri içinde prototip bir kit ve yazılım geliştirilmiştir. Çalışmanın devamında hem geliştirilen kitin hem de yazılımın validasyonunun yapılması gereklidir. Kit ile en az bin farklı bireye ait DNA örneği test edilmelidir. Ayrıca tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve özgüllük testleri yapılmalıdır. Tüm bu test sonuçları muadil kitler ile karşılaştırmalı olarak yapılmalıdır. Son olarak degriden DNA ile çalışmalar yapılarak kitin verimliliği test edilmelidir. Bu çalışmalar ile beraber kit ile analizi yapılan STR bölgelerinin tüm alellerini toplamak mümkün olmadığı için sentetik olarak hazırlanacak Alelik Ladder klonlanarak kütüphane oluşturulmalıdır.

Kit ile beraber yazılım testleride yapılmalıdır. Yazılım ile en az bin örneğin analizi kontrol DNA referans alınarak yapılmalı ve bu örneklerin mevcut yazılım ile yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmalıdır. Karşılaştırma tespit edilen aleller adları yanında, uzunluk, pik yüksekliği ve genişliği hesaplamalarını kapsayacak şekilde tamamlanarak yazılım validasyonu da tamamlanmalıdır.

Son olarak beş renk teknolojisine uygun olarak eklenecek yeni boya ve panel ile STR sayısı artırılarak kitin yeni nesil kitlerle yarışabilir ayırım gücüne sahip olması sağlanabilir.



KAYNAKLAR

- [1] Landsteiner, K., Zurkenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierendenwirkungen des blutserumsun derlymphe. *Zentrabl, Bakteriol*, 27:357-362, **1900**.
- [2] Giusti, G.V., Leone, L., Italy's Pioneer in Forensic Serology, *American Journal of Medical Pathology*, 3(1), 79-81, **1982**.
- [3] Janeway, C.A., Travers, P., *The Immune System in Health and Disease*, *Immunology*, Churchill, Livingstone press, **1997**.
- [4] Olsson, M.L., Guerreiro, J.F. and Zago, M.A., Molecular analysis of O alleles at the blood group ABO locus in populations of different ethnic origin reveals novel crossing over events and point mutations. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 234 (3), 779-782, **1997**.
- [5] Sensabaugh, G.F., Isozymes in Forensic Science, *Isozymes*, 6, 247-82, **1982**.
- [6] Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L., Hypervariable 'Minisatellite' Regions in Human DNA, *Nature*, 314:67-73, **1985**.
- [7] Kasai, K., Nakamura, Y., White, R., Amplification of a Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Locus (pMCT118) by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Its Application to Forensic Science, *Journal of Forensic Science*, 35, 1196-200, **1990**.
- [8] Jobling, M.A., Gill, P., Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nature Reviews Genetics*, 5(10),739-51, **2004**.
- [9] Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L., Individual Specific 'Fingerprints' of Human DNA, *Nature*, 316:76-79, **1985**.
- [10] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim N., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230,1350-1354, **1985**.
- [11] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 51, Pt 1:263-73, **1986**.
- [12] Mullis, K.B. and Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, 155, 335-50, **1987**.
- [13] Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes, *Nature*, 324(6093),163-6, **1986**.
- [14] Helmuth, R., Fildes, N., Blake, E., Luce, M., Chimera, J., et al., HLA-DQ alpha allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes, *American Journal of Human Genetics*, 47(3), 515-23, **1990**.
- [15] Hochmeister, M.N., Budowle, B., Jung, J., Borer, U.V., Comey, C.T. and Dirnhofer, R., PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts, *International Journal of Legal Medicine*, 104(4), 229-33, **1991**.
- [16] Allen, M., Saldeen, T. and Gyllensten, U., Allele-specific HLA-DRB1 amplification of forensic evidence samples with mixed genotypes, *BioTechniques*, 19(3), 454-63, **1995**.

- [17] Herrin, G., Fildes, N. and Reynolds, R., Evaluation of the AmpliType PM DNA test system on forensic case samples, *Journal of Forensic Sciences*, **39**, 1247–1253, **1994**.
- [18] Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neumann, R. and Keyte, J., Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells, *Nucleic Acids Research*, **16**: 10953–10971, **1988**.
- [19] Kasai, K., Nakamura, Y. and White, R., Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science, *Journal of Forensic Sciences*, **35**(5) pg., 1196-1200, **1990**.
- [20] Inman, K., Rudin, N., *An Introduction to Forensic DNA Analysis*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, **1997**.
- [21] Tully, G., Sullivan, K.M. and Gill, P., Analysis of 6 VNTR loci by "multiplex" PCR and automated fluorescent detection, *Human Genetics*, **92**, 554–562, **1993**.
- [22] Ellegren, H., Microsatellites: simple sequences with complex evolution, *Nature Reviews Genetics*, **5**, 435-445; **2004**.
- [23] Weber, J.L. and Wong, C., Mutation of human short tandem repeats, *Human Molecular Genetic*, **2**, 1123-1128, **1993**.
- [24] Levinson, G. and Gutman, G.A., Slipped-strand impairing: A major mechanism for DNA sequence evolution, *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 203-21, **1987**.
- [25] Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M.D. and Aquadro, C.F., Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 10774-10778, **1998**.
- [26] Toth, G., Gaspari, Z. and Jurka, J., Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis, *Genome Research*, **10**, 967-981, **2000**.
- [27] Bacher, J.W., Hennes, L.F., Gu, T., Tereba, A., Micka, K.A., et al., Pentanucleotide Repeats: Highly Polymorphic Genetic Markers Displaying Minimal Stutter Artifact. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Identification*, pp. 24–37. Madison, Wisconsin, Promega Corporation, **1999**.
- [28] Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R., Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA, *Nucleic Acids Research*, **24**, 2807-2812, **1996**.
- [29] Gill, P., Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK-past, present, and future perspectives, *BioTechniques*, **32** (2), 366-385, **2002**.
- [30] Zhang, S., Tian, H., Wu, J., Zhao, S., Li, C., A New Multiplex Assay of 17 Autosomal STRs and Amelogenin for Forensic Application, *PLoS ONE*, **8**(2), **2013**.
- [31] Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B., Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11, *International Journal of Legal Medicine*, **106**, 319-23, **1994**.
- [32] Brinkmann, B., Moller, A. and Wiegand, P., Structure of new mutations in 2 STR systems, *International Journal of Legal Medicine*, **107**, 201.3, **1995**.
- [33] Gill, P., Urquhart, A., Millican, E.S., Oldroyd, N., Watson, T.J., et al., A new method of STR interpretation using inferential logic - development of a criminal intelligence database, *International Journal of Legal Medicine*, **109**, 14-22, **1996**.

- [34] Carracedo, A. and Lareu, M.V., *Proceedings from the Ninth International symposium on Human Identification*, pp. 89–107, Madison, Wisconsin, Promega Corporation, **1998**.
- [35] Gill, P., Kimpton, C.P., Urquhart, A., Oldroyd, N., Watson, T.J and Downes, T.J., Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework - strategy for the future. *Electrophoresis*, 16,1543-1552, **1995**.
- [36] Kimpton, C.P., Fisher, D., Watson, S., Adams, M., Urquhart, A., et al., Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci, *International Journal of Legal Medicine*, 106, 302-311, **1994**.
- [37] Hagelberg, E., Gray, I.C. and Jeffreys, A.J., Identification of the skeletal remains of a murder victim, *Nature*, 352, 427-429, **1991**.
- [38] Jeffreys, A.J., Allen, M.J., Hagelberg, E. and Sonnberg, A., Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis, *Forensic Science International*, 56, 65-76, **1992**.
- [39] Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., et al., Identification of remains of the Romanov family by DNA analysis, *National Genetics*, 6, 130-135, **1994**.
- [40] Butler, J.M., *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*, Academic Press, **2001**.
- [41] Hochmeister, M.N., Budowle, B., Jung, J., Borer, U.V., Comey C.T. and Dirnhofer R., PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts, *International Journal of Legal Medicine*, 104(4), 229-33, **1991**.
- [42] Lins, A.M., Sprecher, C.J., Puers, C. and Schumm, J.W., Multiplex sets for amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescent detection, *BioTechniques*, 20, 882–889, **1996**.
- [43] Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S. and Adams, M., Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci, *PCR Methods and Applications*, 3, 13-22, **1993**.
- [44] Gill, P., Brenner, C.H., Buckleton, J.S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W.R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P.M., Weir, B.S., DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures, *Forensic Science International*, 160, 90-101, **2006**.
- [45] Butler, J.M., *Forensic DNA Typing, Biology, Technology and Genetic of STR markers*, Second Edition, Elsevier Academic Press, **2005**.
- [46] Puers, C., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T., Schumm, J.W., Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 [AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder, *The American Society of Human Genetics*, 53, 953-958, **1993**.
- [47] Bar, W., Brinkmann, B., Lincoln, P., Mayr, W.R., Rossi, U., DNA recommendations-1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems, *International Journal of Legal Medicine*, 107, 159, **1994**.
- [48] Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, T., DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *American Journal of Human Genetics*, 49, 746-756, **1991**.

- [49] Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S., Merrill, C. R., tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH), *Nucleic Acids Research*, 19, 3753, **1991**.
- [50] Polymeropoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H. and Merrill, C.R., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucleic Acids Research*, 19, 4306, **1991**.
- [51] Butler, J.M., Hill, C.R., Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis, *Forensic Science Review*, 24,15, **2012**.
- [52] Butler, J.M., Devaney, J.M., Marino, M.A., Vallone, P.M., Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions, *Forensic Science International*, 119(1), 87-96, **2001**.
- [53] Gill, P., Fereday, L., Morling, N., Schneide,r P.M., The evolution of DNA databases Recommendations for new European STR loci, *Forensic Science International*, 156, 242-244, **2006**.
- [54] Barber, M.D., Parkin, B.H., Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179, *International Journal of Legal Medicine*, 109, 62-65, **1996**.
- [55] Staub, R.E., et al., A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18 *Genomics*, 15, 48-56, **1993**.
- [56] Li, H., Schmidt, L., Wei, M., Hustad, T., Lerman, M.I., Zbar, B., Tory, K., Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359, *Human Molecular Genetics*, 2(8), 1327, **1993**.
- [57] Coble, M.D., Butler, J.M., Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA, *J Forensic Sciences*, 50, 43-53, **2005**.
- [58] Kimpton, C., Walton, A. and Gill, P., A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene, *Human Molecular Genetics*, 1, 287, **1992**.
- [59] Egyed, B., Furedi, S., Angyal, M., Boutrand, L., Vandenberghe, A., Woller, J., Padar, Z., Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations, *Forensic Science International*, 113, 25; **2000**.
- [60] Mills K.A., Even D. and Murray,J.C., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Human Molecular Genetics*, 1: 779, **1992**.
- [61] White, P. S., Tatum, O. L., Deaven, L. L., and Longmire, J. L., New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome, *Genomics*, 57(3), 433-437, **1999**.
- [62] Butler, J.M., Schoske, R., Vallone, P.M., Redman, J.W., Kline, M.C., Allele frequencies for 15 autosomal STR loci on U.S. Caucasian, African American, and Hispanic populations, *Journal of Forensic Science*, 48, 908, **2003**.
- [63] Drabek, J., Chung, D.T., Butler, J.M., McCord, B.R., Concordance study between Miniplex assays and a commercial STR typing kit, *Journal of Forensic Science*, 49, 859, **2004**.
- [64] Ankar, R., Steinbrueck, T. and Donis-Keller, H., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus, *Human Molecular Genetics*, 1, 137, **1992**.

- [65] Barber, M.D., Parkin, B.H., Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179, *International Journal of Legal Medicine*, 109, 62-65 **1996**.
- [66] Oldroyd, N.J., Urquhart, A.J., Kimpton, C.P., Millican, E.S., Watson, S.K., Downes, T., Gill, P.D., A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification, *Electrophoresis* 16, 334-7, **1995**.
- [67] Leibel, C., Budowle, B., Collins, P., Daoudi, Y., Moretti, T., Nunn, G., Reeder, D., Roby, R., Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles, *Forensic Science International*, 133, 220-7, **2003**.
- [68] Lareu, M.V., Pestoni, M.C., Barros, F., Salas, A., Carracedo, A., Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D12S391 locus, *Gene*, 182, 151-153, **1996**.
- [69] Butler, J.M., *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier/Academic Press, San Diego, CA, **2012**.
- [70] Sharma, V. and Litt, M., Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus, *Human Molecular Genetics*, 1, 67, **1992**.
- [71] Cakir, A. H., Celebioglu, A., Altunbas S., STR data for the AmpFISTR SGM Plus from Marmara region of Turkey, *Forensic Science International*, 127, 240–242, **2002**.
- [72] Cakir, A. H., Celebioglu, A., Altunbas S., Yardımcı E., Allele frequencies for 15 STR loci in Van–Agri districts of the Eastern Anatolia region of Turkey, *Forensic Science International*, 135, 60-63, **2003**.
- [73] Yavuz I., Topal Sarikaya, A., Turkish Population Data for 15 STR Loci by Multiplex PCR, *Journal of Forensic Science*, Vol. 50, No. 3, **2005**.
- [74] Tuğ A., Erkol Z., Cetinyurek A., Doğan Alakoc Y., Elma C., Buken B., Erkol H., Allele distribution data for 16 short tandem repeat loci in Bolu, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40 (4), 659-664, **2010**.
- [75] Baransel Isir, A., Ozkorkmaz, A. and Pehlivan, S., Allele frequencies for 13 STRs loci in a Western Anatolia population and their forensic evaluation, *Annals of Human Biology*, 42(5), 494-497, **2015**.
- [76] Tokdemir, M., Tunçez, F.T., Vicdanlı, N.H., Population Genetic data for 15 Autosomal STR markers in Eastern Turkey, *Gene*, 586 36-40, **2016**.
- [77] Alshamali, F.H., Alkhatat, A.I., Budowle, B., Watson, N.D., Allele frequency distributions and other population genetic parameters for 13 STR loci in a UAE local population from Dubai, *International Congress Series*, 1239, 249-258, **2003**.
- [78] Carril, J.C., Ocaña, M.A., Sierra, O., Molino, A., Cospedal, R., Puente, J., Allele frequencies of 15 STR loci in a Spanish population, *International Congress Series*, 1261, 142-144, **2004**.
- [79] Pablo Abdon da Costa Francez, Elzemar Martins Ribeiro Rodrigues, Gleycianne Furtado Frazão, Nathalia Danielly dos Reis Borges and Sidney Emanuel Batista dos Santos, Allelic frequencies and statistical data obtained from 12 codis STR loci in an admixed population of the Brazilian Amazon, *Genetics and Molecular Biology*, 34(1), 35-39, **2011**.
- [80] Nabwowe1, J., Kirya1, M., Okello, E. and Nanteza, A., Allele Frequency of 15 Short Tandem Repeats (Strs) in a Buganda Population (Central Uganda), *Forensic Utility and Parentage Testing, Journal of Forensic Research*, 5, 2, **2014**.

- [81] Ozeki, M., Tamaki, K., Allele frequencies of 37 short tandem repeat loci in a Japanese population, *Legal Medicine*, 15 (342–6), **2013**.
- [82] Fujii, K., Watahiki, H., Mita, Y., Iwashima, Y., Kitayama, T., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi, K., Allele frequencies for 21 autosomal short tandem repeat loci obtained using GlobalFiler in a sample of 1501 individuals from the Japanese population, *Legal Medicine*, 17, 306-308, **2015**.
- [83] Flores, S., Sun, J., King, J., Eisenberg, A., Budowle, B., Allele Frequencies For 15 Autosomal Str Loci And Haplotype Data For 17 Y-Str Loci In A Population From Belize, *International Journal of Legal Medicine*, 129(6), 1217-8, **2015**.
- [84] Shrivastava, P., Jain, T., Trivedi, V.B., A Genetic Portrait Of Oraon Indian Tribe Drawn With 15 Autosomal And 17 Y Chromosomal Str Markers, *International Journal of Legal Medicine*, pp.1-2, **2016**.
- [85] Shan, M.A., Hussain, M., Shafique, M., Shahzad, M., Perveen, R., Idrees, M., Genetic Distribution Of 15 Autosomal Str Markers In The Punjabi Population Of Pakistan, *International Journal of Legal Medicine*, pp.1-2, **2016**.
- [86] Barni, F., Lewis, S., Berti, A., Miskelly, G., Lago, G., Forensic Application of the Luminol reaction as a Presumptive Test for Latent Blood Detection, Science Direct, *Talanta*, 72, 896-913, **2007**.
- [87] Saiyed, Z.M., Telang, S.D. and Ramchand, C.N., Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research Technology*, 1(1), 2, **2003**.
- [88] Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., Free – zone electrophoresis in glass capillaries, *Clinical Chemistry*, 27(9), 1551 – 3, **1981**.
- [89] *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User Guide*, Applied Biosystems, Copyright 2001, **2010**.
- [90] *3730/3730xl DNA Analyzers User Guide*, Applied Biosystems-HITACH, Copyright 2007, **2010**.
- [91] *GeneMapper® Software Version 3.7 User Guide*, Applied Biosystems, Copyright **2004**
- [92] Sajantila, A., Puomilahti, S., Johnson, V., Ehnholm, C., Amplification of reproducible allele markers for amplified fragment length polymorphism analysis, *Biotechniques*, 12(1), 16, 18, 20-2, **1992**.
- [93] Smith, R.N., Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR, *Biotechniques*, 18(1), 122–128, **1995**.
- [94] Baechtel, F.S., Smerick, J.B., Presley, K.W. and Budowle, B., Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80, *Journal of Forensic Sciences*, 38(5), 1176–1182, **1993**.
- [95] Schlotterer, C. and Tautz, D., Slippage synthesis of simple sequence DNA, *Nucleic Acids Research*, 20(2), 211-215, **1992**.
- [96] Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R., Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA, *Nucleic Acids Research*, 24, 2807-2812, **1996**.
- [97] Magnuson, V.L., Ally, D.S., Nylund, S.J., Karanjawala, Z.E., Rayman, J.B., et al., Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA

polymerase: Implications for PCR-based genotyping and cloning, *BioTechniques*, 21, 700-9, **1996**.

[98] Clayton, T.M., Guest, J.L., Urquhar, A.J., Gill, P.D., A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling, *Journal of Forensic Sciences*, 49, 1207-14, **2004**.

[99] Mulero, J.J., Chang, C.W., Lagacé, R.E., Wang, D.Y., Bas, J.L., McMahon, T.P. and Hennessy, L.K., Development and Validation of the AmpFISTR, MiniFiler PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA, *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 53, No. 4, 838-52, **2008**.

[100] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., Kinetic PCR Analysis: real-time Monitoring of DNA AMplification reactions, *Biotechnology*, 11(9), 1026-30, **1993**.

[101] Southern, E.M., Measurement of DNA length by gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 100(2), 319-23, **1979**.

[102] Espinheira, R., Geada, H., Ribeiro, T. and Reys, L., STR analysis-HUMTH01 and HUMFES/FPS for forensic application, *Advances in Forensic Haemogenetics*, Volume 6, p. 528, **1996**.

[103] Griffiths, R.A.L., Barber, M.D., Johnson, P.E., Gillbard, S.M., Haywood, M.D., Smith, C.D., Arnold, J., Burke, T., Urquhart, A., and Gill, P., New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system, *International Journal of Legal Medicine*, 111(5), 267-272, **1998**.

[104] Brinkmann, B., Sajantila, A., Goedde, H.W., Matsumoto, H., Nishi, K. and Wiegand, P., Population genetic comparisons among eight populations using allele frequency and sequence data from three microsatellite loci, *European Journal of Human Genetis*, 4(3), 175-182, **1996**.

[105] van Oorschot, R.A.H., Gutowski, S.J. and Robinson, S.L., HUMTH01: Amplification, species specificity, population genetics and forensic applications, *International Journal of Legal Medicine*, 107(3), 121-126, **1994**.

[106] Gené, M., Huguet, E., Moreno, P., Sanchez, C., Carracedo, A. and Corbella, J., Population study of the STRs HUMTH01 (including a new variant) and HUMVWA31A in Catalonia (northeast Spain), *International Journal of Legal Medicine*, 108(6), 318-320, **1996**.

[107] Klintschar, M., Kozma, Z., Al Hammadi, N., Fatah, M.A., and Nohammer, C., A study on the short tandem repeat systems HumCD4, HumTH01, and HumFIBRA in population samples from Yemen and Egypt, *International Journal of Legal Medicine*, 111(2), 107-109, **1998**.

[108] Glock, B., Schwartz, D.W.M., Schwartz-Jungl, E.M., Dauber, E.M. and Mayr, W.R., Laser fluorescent typing for the short tandem repeat polymorphism HUMFXIII A01 in an Austrian population sample, *Proceedings from the First European Symposium on Human Identification*, 154-155, **1997**.

[109] Puers, C., Hammond, H.A., Caskey, C.T., Lins, A.M., Sprecher, C.J., Brinkmann, B. and Schumm, J.W., Allelic ladder characterization of the short tandem repeat polymorphism located in the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit gene, *Genomics*, 23(1), 260-264, **1994**.

[110] Lazaruk, K., Walsh, P.S., Oaks, F., Gilbert, D., Rosenblum, B.B., Menchen, S., Scheibler, D., Wenz, H.M., Holt, C. and Wallin, J., Genotyping of forensic short tandem

repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis*, 19(1), 86-93, **1998**.

[111] Huang, N.E., Schumm, J.W. and Budowle, B., Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci-HUMTH01, TPOX and CSF1PO-derived using multiplex PCR and manual typing, *Forensic Science International*, 71, 131-136, **1995**.

[112] Puers, C., Lins, A.M., Sprecher, C.J., Brinkmann, B. and Schumm, J.W. Analysis of polymorphic short tandem repeat loci using well-characterized allelic ladders. *Proceedings from the 4th International Symposium on Human Identification*, Madison, Wisconsin, Promega Corporation, pp. 161-172, **1993**.

[113] Lins, A.M., Micka, K.A., Sprecher, C.J., Taylor, J.A., Bacher, J.W., Rabbach, D., Bever, R.A., Creacy, S. and Schumm, J.W., Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system, *Journal of Forensic Sciences*, 43(6), 1168-1180, **1998**.

[114] Barber, M.D. and Parkin, B.H., Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179, *International Journal of Legal Medicine*, 109, 62-65, **1996**.

[115] Gill, P., Urquhart, A., Millican, E.S., Oldroyd, N.J., Watson, S., Sparkes, R. and Kimpton, C.P., A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database, *International Journal of Legal Medicine*, 109(1), 14-22, **1996**.

[116] Mornhinweg, E., Luckenbach, C., Fimmers, R. and Ritter, H., D3S1358: Sequence analysis and gene frequency in a German population, *Forensic Science International*, 95(2), 173-178, **1998**.

[117] Szibor, R., Lautsch, S., Plate, I., Bender, K., and Krause, D., Population genetic data of the STR HUMD3S1358 in two regions of Germany, *International Journal of Legal Medicine*, 111(3), 160-161, **1998**.

[118] Budowle, B., Nhari, L.T., Moretti, T.R., Kanoyangwa, S.B., Masuka, E., Defenbaugh, D.A., and Smerick, J.B., Zimbabwe black population data on the six short tandem repeat loci - CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA, and FGA. *Forensic Science International*, 90(3), 215-221, **1997**.

[119] Coble, M.D. and Butler, J.M., Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA, *Journal of Forensic Sciences*, 50(1), 43-53, **2005**.

[120] Urquhart, A., Oldroyd, N.J., Kimpton, C.P. and Gill, P., Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification, *Biotechniques*, 18(1), 116-8, 120-1, **1995**.

[121] Kido, A., Hara, M., Yamamoto, Y., Kameyama, H., Susukida, R., Saito, K., Takada, A., and Oya, M., Nine short tandem repeat loci analysis in aged semen stains using the AmpFLSTR Profiler Kit and description of a new vWA variant allele, *Legal Medicine (Tokyo)*, 5(2), 93-96, **2003**.

[122] Barber, M.D., McKeown, B.J. and Parkin, B.H., Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus, *International Journal of Legal Medicine*, 108(4), 180-185, **1996**.

[123] *AmpFLSTR Blue™ PCR Amplification Kit: User's Manual*, The Perkin-Elmer Corporation, **1996**.

- [124] White, P. S., Tatum, O. L., Deaven, L.L. and Longmire, J.L., New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome, *Genomics*, 57(3), 433-437, **1999**.
- [125] Bosch, E., Lee, A. C., Calafell, F., Arroyo, E., Henneman, P., de Knijff, P. and Jobling, M. A., High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions, *Forensic Science International*, 125(1), 42-51, **2002**.
- [126] Luis, J., Liste, I. and Caeiro, B., Improved conditions for genotype diagnosis of a STR of the hTPO locus, *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5, 366-368, **1994**.
- [127] Amorim, A., Gusmão, L. and Prata, M.J., Population and formal genetics of the STRs TPO, TH01 and VWFA31/A in North Portugal, *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6, 486-488, **1996**.
- [128] Schwartz, D.W.M., Dauber, E.M., Glock, B. and Mayr, W.R., AMPFLP-typing of the D21S11 microsatellite polymorphism: allele frequencies and sequencing data in the Austrian population, *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6, 622-625, **1996**.
- [129] Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B., Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11, *International Journal of Legal Medicine*, 106(6), 319-323, **1994**.
- [130] Zhou, H.G., Sato, K., Nishimaki, Y., Fang, L. and Hasekura, H., The HumD21S11 system of short tandem repeat DNA polymorphisms in Japanese and Chinese, *Forensic Science International* 86(1-2), 109-188, **1997**.
- [131] Brinkmann, B., Meyer, E. and Junge, A., Complex mutational events at the HumD21S11 locus, *Human Genetics*, 98, 60-64, **1996**.
- [132] Asmundo, A. and Crino, C., Population study of the short tandem repeat polymorphisms HumTH01, HumvWA31, HumFESFPS and HumF13A01 in Sicily (Southern Italy), *International Journal of Legal Medicine*, 111(5), 281-283, **1998**.
- [133] Walsh, S. J., Robinson, S. L., Turbett, G. R., Davies, N. P. and Wilton, A.N., Characterisation of variant alleles at the HumD21S11 locus implies unique Australasian genotypes and re-classification of nomenclature guidelines, *Forensic Science International* 135(1), 35-41, **2003**.
- [134] Ayres, K. L., Chaseling, J. and Balding, D. J., Implications for DNA identification arising from an analysis of Australian forensic databases, *Forensic Science International*, 129(2), 90-98, **2002**.
- [135] Tozzo, P., Giuliadori, A., Corato, S., Panzano, E., Rodriguez, D., Caenazzo, L., Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: Literature revision and description of a novel method for sex confirmation, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(5), 387-391, **2013**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : İbrahim SEMİZOĞLU

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : ibrahimsemizoglu@yahoo.co.uk

Adresi : Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu Genel Müdürlüğü

Eğitim

Lise : Ankara Polis Koleji

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Ana

Bilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Ana

Bilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, ÜDS 88

İş Deneyimi

Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu Bilgi Teknolojileri Dairesi

Türkiye Tıbbi Cihaz ve İlaç Kurumu Analiz ve Kontrol Laboratuvarları Dairesi

Türkiye Tıbbi Cihaz ve İlaç Kurumu Bilgi İşlem Dairesi

Emniyet Genel Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarları Dairesi

Deneyim Alanları

Adli DNA Analizleri, Kalite Yönetimi Sistemleri, Bilgi Teknolojileri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar-