

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU

**GONozOMAL INDEL LOKUSLARINA AİT MULTİPLEKS KİT
GELİŞTİRİLMESİ**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TUĞBA ÜNSAL

İSTANBUL
2016

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje Numarası: 52985



ÖNSÖZ

*İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü'nde doktora öğrenimim sırasında tez izleme jürim olarak tanışma fırsatı bulduğum, tez çalışmamı gerçekleştirmeme imkân sunan, tezimin her aşamasını özenle izleyen ve bilgi birikimini paylaştan hocam; İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü **Prof. Dr. Faruk***

Aşıcıoğlu'na,

Tez çalışmamı gerçekleştirmeme imkân sunan, Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı hocamız

Prof. Dr. Münevver Açikkol'a,

*Tezimin her aşamasını özenle izleyen ve bilgi birikimini paylaştan hocam; **Prof. Dr. Salih***

Cengiz'e,

Lisansüstü eğitimim süresince ilgisini, bilgisini ve sevgisini benden esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında tüm özverisiyle değerli zamanını bana harcamaktan çekinmeyen, tez süresince ve her zaman tüm desteğiyle yanımda olan, kendime örnek aldığım sevgili

danışmanım, hocam,

Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na,

Bilgi ve birikimini benimle paylaşmaktan çekinmeyen hocam,

Yrd. Doç. Dr. Özlem Bülbül'e

*Laboratuarda birbirimize destek olarak, omuz omuza çalıştığım arkadaşım **Uzman Ömer***

Karataş ve Ph.D adayı Kadir Daştan'a,

Ve beni en iyi şekilde yetiştirerek bugünlere getiren, maddi ve manevi her zaman arkamda olan, sevgi ve desteğini benden hiç esirgemeyen sevgili

'ANNEM' e,

Sonsuz teşekkür ederim.

Tuğba ÜNSAL

İçindekiler

Tablolar Dizini	iii
Şekiller Dizini	iii
Grafikler Dizini	vi
Kısaltmalar	vii
1. Özetler	1
1.1. Özet	1
1.2. İngilizce Özet (Abstract).....	2
2. Giriş ve Amaç	4
3. Genel Bilgiler	6
3.1. Adli Moleküler Genetikte Geçmişten Günümüze Gelişmeler.....	6
3.2. Günümüzde Adli Kimliklendirmede Rutinde Kullanılan Önemli Kitler	7
3.2.1. Adli genetik laboratuvarlarında kullanılan STR analizine dayalı kitler	9
3.2.2. SNP analizine dayalı kitler.....	14
3.2.3. InDel analizine dayalı kitler	16
3.3. İnsersiyon/Delesyon Polimorfizminin Adli Genetikte Kullanımı	16
3.3.1. İnsersiyon	17
3.3.2. Delesyon	18
3.3.3. InDel (İnsersiyon/Delesyon)	19
3.4. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve PCR Optimizasyonu	21
3.4.1. Taq polimeraz seçimi ve konsantrasyonu	22
3.4.2. Magnezyum iyon konsantrasyonu	22
3.4.3. dNTP konsantrasyonu	23
3.4.4. PCR tampon çözeltisi.....	23
3.4.5. Multipleks PCR karışımı (PCR master miks, PCR miks).....	24
3.4.6. Primer dizaynı, konsantrasyonu ve Tm değerleri	24
3.4.7. PCR döngü koşulları	26
3.4.8. Multipleks Panel ve primer seçme kriterleri	28
3.5. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve Validasyonu	29
3.5.1. Tekrarlanabilirlik	30
3.5.2. Yeniden üretilebilirlik	30
3.5.3. Duyarlılık (LOQ)	30
3.5.4. Analiz eşiği belirlenmesi (LOD).....	30
3.5.5. Dinamik alanın belirlenmesi (lineer çalışma alanı belirlenmesi).....	31
3.5.6. Pik denge analizi (stokastik eşik).....	31

4. Gereç ve Yöntem.....	32
4.1. Kullanılan Kit, Kimyasal ve Cihazlar.....	33
4.2. Gonozomal InDel Lokuslarının Seçimi	34
4.2.1. Patent-kit taraması	35
4.3. Gonozomal InDel Lokuslarının Multipleks Dizaynı	36
4.4. Yöntemin Uygulanması.....	38
4.4.1. Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini.....	38
4.4.2. 28 InDel lokusunun ayrı ayrı ve 2 multipleks olarak PCR optimizasyonu.....	40
4.4.3. 21 InDel lokusunun 2 multipleks olarak validasyonu.....	45
4.4.4. 100 kişiye ait DNA örneğinde 21 InDel 1. ve 2. multipleksinin çoğaltılması (PCR), elektroforezi ve tiplendirilmesi	47
4.4.5. 21 InDel lokusuna ait Türkiye'deki alel sıklıkları	48
5. Bulgular	49
5.1. Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini	49
5.2. 21 InDel lokusunun ayrı ayrı PCR optimizasyonu ve analizi	51
5.3. 21 InDel lokusunun ayrı ayrı ve 2 multipleks olarak PCR optimizasyonu	58
5.3.1. PCR bileşenlerinin miktarları	58
5.4. 21 InDel Lokusunun 2 multipleks olarak Validasyonu	62
5.4.1. Analiz eşiği	62
5.4.2. Dinamik Alan.....	63
5.4.3. Duyarlılık (LOQ)	65
5.4.4. Stokastik Eşik.....	75
5.4.5. Tekrarlanabilirlik	77
5.4.6. Tekrar üretilebilirlik.....	80
5.5. 21 InDel lokusuna ait Türkiye'deki alel sıklıkları.....	81
5.5.1. Hardy-Weinberg dengesi	83
5.5.2. Populasyonlar arası alel frekanslarının karşılaştırılması.....	83
6. Tartışma	87
7. Kaynaklar.....	97
8. EKLER	104

Tablolar Dizini

Tablo 1. İlk seçilen Y-InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, PCR primer baz dizisi ve floresans boya seçimi.....	36
Tablo 2. İlk seçilen X-InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, PCR primer baz dizisi ve floresans boya seçimi.....	37
Tablo 3. Gonozomal InDel primerlerinin Tm sıcaklığı ve GC oranları.....	40
Tablo 4. InDel lokuslarının ayrı ayrı optimizasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.....	41
Tablo 5. InDel lokuslarının ayrı ayrı optimizasyonunda kullanılan PCR döngü koşulları.....	42
Tablo 6a. 1. Multipleks için dizayn edilen InDel Lokuslarının kromozomal yerleşimi, primer baz dizisi ve kullanılan floresans boya.....	43
Tablo 6b. 2. Multipleks için dizayn edilen InDel Lokuslarının kromozomal yerleşimi, primer baz dizisi ve kullanılan floresans boya.....	44
Tablo 7. InDel lokuslarının multipleks optimizasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.....	44
Tablo 8. InDel lokuslarının multipleks optimizasyonunda kullanılan PCR döngü koşulları.....	45
Tablo 9. Optimize edilen multipleks primer konsantrasyonları.....	45
Tablo 10. Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarı.....	50
Tablo 11. Tekli PCR ve multipleks PCR’de kullanılan PCR bileşenleri.....	58
Tablo 12. Analiz eşik değeri.....	63
Tablo 13. 9 DNA konsantrasyonuna ait pik yükseklikleri ortalaması.....	64
Tablo 14. Duyarlılık sonucu.....	66
Tablo 15. Stokastik eşik değeri.....	76
Tablo 16. Türkiye popülasyonunda 21 InDel lokusuna ait alel frekansları ve adli istatistik parametreler.....	82
Tablo 17. 21 InDel lokusunun hardy-weinberg denge tablosu.....	83
Tablo 18. 21 InDel lokusuna ait popülasyonlar arası alel farklılıkları.....	84
Tablo 19. Popülasyonlar arası F_{ST} -değerleri	86
Tablo 20. 21 InDel lokusuna ait genotipler.....	107

Şekiller Dizini

Şekil 1. Baz dizisi üzerinde İnsersiyon ve delesyonun şematize gösterimi.....	17
Şekil 2. Kromozom boyutunda insersiyon.....	18
Şekil 3. Kromozomal boyutta delesyon.....	18
Şekil 4. MID313 ve MID314 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü.....	51
Şekil 5. MID315 ve MID375 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü.....	51
Şekil 6 MID377 ve MID378 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü.....	52
Şekil 7. MID 504 Y-InDel lokusunun kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü.....	52
Şekil 8. MID 76 lokusuna ait elektroforegram.....	52
Şekil 9. MID 229 lokusuna ait elektroforegram.....	53
Şekil 10. MID 356 lokusuna ait elektroforegram.....	53
Şekil 11. MID 236 lokusuna ait elektroforegram.....	53
Şekil 12. MID 198 lokusuna ait elektroforegram.....	53
Şekil 13. MID 357 lokusuna ait elektroforegram.....	54
Şekil 14. MID 227 lokusuna ait elektroforegram.....	54
Şekil 15. MID 193 lokusuna ait elektroforegram.....	54
Şekil 16. MID 243 lokusuna ait elektroforegram.....	54
Şekil 17. MID 218 lokusuna ait elektroforegram.....	55
Şekil 18. MID 184 lokusuna ait elektroforegram.....	55
Şekil 19. MID 75 lokusuna ait elektroforegram.....	55
Şekil 20. MID 586 lokusuna ait elektroforegram.....	55
Şekil 21. MID 111 lokusuna ait elektroforegram.....	56
Şekil 22. MID 383 lokusuna ait elektroforegram.....	56
Şekil 23. MID 395 lokusuna ait elektroforegram.....	56
Şekil 24. MID 359 lokusuna ait elektroforegram.....	56
Şekil 25. MID 220 lokusuna ait elektroforegram.....	57
Şekil 26. MID 1566 lokusuna ait elektroforegram.....	57
Şekil 27. MID 219 lokusuna ait elektroforegram.....	57
Şekil 28. MID 358 lokusuna ait elektroforegram.....	57

Şekil 29. 7,5 µL PCR mix ve 0,2 µl Taq polimeraz kullanımı sonucu elde edilen elektroforegram.....	58
Şekil 30. Multiplekslerin 25 döngü sayısında PCR’inde görülen alel kayıp.....	59
Şekil 31. 3 pmol/ µl primer konsantrasyonlarında multipleks PCR’de gözlenen alelik dengesizlikler.....	60
Şekil 32. PCR koşulları optimize edilmiş multipleks 1’e ait erkek DNA’sı elektroforegramı.....	61
Şekil 33. PCR koşulları optimize edilmiş multipleks 1’e ait kadın DNA’sı elektroforegramı.....	61
Şekil 34. PCR koşulları optimize edilmiş multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	62
Şekil 35. 3 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	66
Şekil 36. 2 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	67
Şekil 37. 1 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	67
Şekil 38. 0,5 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	68
Şekil 39. 0,25 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	68
Şekil 40. 0,125 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	69
Şekil 41. 0,05 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	69
Şekil 42. 0,0125 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	70
Şekil 43. 0,0025 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 1’e ait elektroforegram.....	70
Şekil 44. 3 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	71
Şekil 45. 2 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	71
Şekil 46. 1 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	72
Şekil 47. 0,5 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	72
Şekil 48. 0,25 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	73
Şekil 49. 0,125 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	73
Şekil 50. 0,005 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	74
Şekil 51. 0,0125 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	74
Şekil 52. 0,0025 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2’ye ait elektroforegramı.....	75
Şekil 53a. 1. Analistin çalışması sonucu multipleks 1’e ait elektroforegram.....	78
Şekil 53b. 2. Analistin çalışması sonucu multipleks 1’e ait elektroforegram.....	78
Şekil 54a. 1. Analistin çalışması sonucu multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	79
Şekil 54b. 2. Analistin çalışması sonucu multipleks 2’ye ait elektroforegram.....	79
Şekil 55a. Farklı laboratuvarlarda farklı cihazda analiz edilen multipleks 1’e ait elektroforegram.....	80

Şekil 55b. Farklı laboratuvarlarda farklı cihazda analiz edilen multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	80
---	-----------

Grafikler Dizini

Grafik 1. Multipleks 1'e ait ortalama RFU değerlerine bağlı dinamik alan.....	64
Grafik 2. multipleks 2'ye ait ortalama RFU değerlerine bağlı dinamik alan.....	65
Grafik 3. Alellerin küçük pik yüksekliklerinin kardeş alel pik yükseklik oranına göre dağılımı.....	76
Grafik 4. Hedef DNA konsantrasyonlarına bağlı kardeş alel pik yükseklikleri oranı.....	77
Grafik 5. Türkiye populasyonunda 21 gonozomal InDel lokusları arası alel sıklık karşılaştırılması.....	81
Grafik 6. Popülasyonlar arası alel frekans karşılaştırması.....	85

Kısaltmalar

A: Adenin

Bç: Baz çifti

C: Sitozin

CODIS: Birleşmiş DNA Veri Bankaları Sistemleri (Combined DNA Index Systems)

dATP: Deoksi Adenozin Trifosfat (Deoxyadenosine triphosphate)

dCTP: Deoksi Sitozin Trifosfat (Deoxycytidine triphosphate)

dGTP: Deoksi Guanozin Trifosfat (Deoxyguanosine triphosphate)

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit (Deoxyribonucleic acid)

dNTP: Deoksiribo Nükleotit Trifosfat

DTT: Dikloro Difenil Trikloroethan

EBYO: En büyük pik yükseklikleri ortalaması

EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

EDTA: Ethilendiamintetra Asetik Asit

ENFSI: Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Örgütü (European Network of Forensic Science Enstitutes)

ESS: Avrupa Standart Seti (European Standard Set)

FBI: Federal Araştırma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)

G: Guanin

HLA-DQA: İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigens)

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High liquid pressure chromatography)

InDel: İnsersiyon/delesyon

Interpol: Uluslararası Polis Teşkilatı- International Criminal Police Organization

KCl: Potasyum Klorür

KCl(NH₄)₂SO₄: Potasyum Amonyum Sülfat

LOD: Dedeksiyon limiti (Limit of detection)

LOQ: Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation)

Mg: Magnezyum

MgCl₂: Magnezyum klorür

NaCl: Sodyum Klorür

NCBI: Biyoteknoloji Bilgileri Ulusal Merkezi (National Center for Biotechnology Information)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)

RFU: Rölatif Floresan Birimi (Relative Fluorescence Units)

SNP: Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

STR: Kısa tekrar dizinleri (Short Tandem Repeats)

SWGDM: DNA analiz Metotları Bilimsel Çalışma Grubu (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods)

T: Timin

Tm: Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)

Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride

1. Özetler

1.1. Özet

InDel'ler hem somatik hem de gonozomal kromozomlar üzerinde yaygın bir şekilde bulunan delesyon veya insersiyonun ya da her ikisinin bir arada görüldüğü polimorfizm çeşitidir. Bu lokuslar kısa ampikon uzunluklarına sahip olduğundan ve 20-30 lokuslu multipleks çalışıldıklarında ayırım güçleri yüksek olduğundan günümüzde STR lokuslarına alternatif olarak kimliklendirmede kullanılmaya başlanmıştır. Adli bilimlerde olgunun türüne ve çeşidine göre cinsiyet kromozomları kullanılabilir. Y kromozomu polimorfizmi kullanılarak baba tarafından akrabalığın ve baba-oğul ilişkileri belirlenebilirken; X kromozomu polimorfizmi kullanılarak baba-kız arasındaki ilişkiler belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada 20 X InDel lokusu (MID 76, MID 229, MID 356, MID 236, MID 198, MID 357, MID 193, MID 243, MID 218, MID 184, MID 75, MID 586, MID 111, MID 383, MID 395, MID 359, MID 220, MID 1566, MID 219, MID 358) ile 1 Y InDel (MID 227) lokuslarını içeren toplam 21 lokuslu, biri 10 diğeri 11 lokuslu olmak üzere 2 multipleks olarak panel geliştirildi. Bu multiplekslerin optimizasyonu ve validasyonu yapılarak optimum DNA miktarının 1 ng/µl olduğu belirlendi. Valide edilen 21 gonozomal InDel panelinin Türkiye popülasyonundaki gen sıklığı hakkında ön bilgi edinmek amacıyla 100 kişide tiplendirildi. Arlequin ver. 3.5.2.2 ile 21 lokusun gen sıklıkları ve popülasyonlar arası karşılaştırılması yapıldı. Her lokusun adli kimliklendirmedeki gücünü belirlemek için de Powerstat (Promega) kullanıldı. 21 lokusun ortalama heterozigotluk oranının 0,400 olduğu ve ayırım gücünün %99 olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sonucunda 21 lokustan oluşan gonozomal InDel multipleksinin Türkiye popülasyonu için polimorfik olduğunu ve kimliklendirme için gerekli ayırım gücüne ulaşılabildiği için, olgu aydınlatmada günümüzde kullanılan STR ve SNP lokuslarıyla birlikte veya tek başına kullanılabilir. Popülasyonlar arası karşılaştırmada

elde edilen F_{ST} (F-istatistik) değerlerine göre Türkiye ile Avrupa populasyonları arasında sadece 1 lokusta (MID 75) büyük bir farklılaşma gözlenirken, Türkiye ile Japonya arasında 7 lokusta (MID 75, MID 356, MID 357, MID 193, MID 76, MID 243, MID 358) büyük farklılaşmalar gözlendi. Buna göre 21 gonozomal InDel lokusu açısından Türkiye'ye en yakın populasyonun Avrupa, en uzak populasyonun ise Japonya olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Adli Tıp, Adli Bilimler, Adli Genetik, Genetik Kimliklendirme, İnsersiyon/Delesyon (InDel) Polimorfizmi, Kit Geliştirme

1.2. İngilizce zet (Abstract)

InDels are a variety of polymorphisms that are observed with deletion or insertion or both and common on both somatic and gonosomal chromosomes. Since these loci have short amplicon lengths and have a high discrimination power when they are studied with 20-30 loci multiplexes, they are now being used as an alternative to STR loci in forensic identification. In forensic sciences, sex chromosomes can be used according to the type and variety of the case. When the paternal kinship, and the relationship between father and son can be determined by using Y chromosome polymorphism, the relationship between father and daughter can be determined by the use of X chromosome polymorphism.

In this study, two multiplex panels were developed including 20 X InDel loci (MID 76, MID 229, MID 356, MID 236, MID 198, MID 357, MID 193, MID 243, MID 218, MID 184, MID 75, MID 586, MID 111, MID 383, MID 395, MID 359, MID 220, MID 1566, MID 219, MID 358) and 1 Y InDel (MID 227) with 21 loci in total as one consisting of 10 and the other 11 loci. Optimization and validation of these multiplexes revealed that the optimum amount of DNA was 1 ng/ μ l. In order to provide preliminary information about the gene frequency of

the validated 21 gonosomal InDel panel in Turkish population, samples of 100 people were identified. Comparisons of gene frequencies and populations of 21 loci were performed with Arlequin ver. 3.5.2.2. Powerstat (Promega) was used to determine the power of each locus in forensic identification. The mean heterozygosity ratio of 21 loci was determined to be 0.400 and the discrimination power was defined as 99%. As a result of this study, since the gonosomal InDel multiplex, which consists of 21 loci, is polymorphic for the Turkish population and the discrimination power required for identification can be reached, it can be used separately or together with currently available STR and SNP loci for solving cases. As per the F_{ST} (F-statistics) values obtained in the comparisons between the populations, when a major variation in only one locus (MID 75) was observed between Turkey and European populations, there were major variations in 7 different loci (MID 75, MID 356, MID 357, MID 193, MID 76, MID 243, MID 358) between Turkey and Japan. Accordingly, it was determined that Europe was the closest and the Japan was the furthest population to Turkey in terms of 21 gonosomal InDel loci.

Key Words: Legal Medicine, Forensic Sciences, Forensic Genetics, Genetic Identification, Insertion/Deletion (InDel) Polymorphism, Kit Development

2. Giriş ve Amaç

Adli bilimlerde cinayet, cinsel saldırı, hırsızlık gibi adli vakalarda olay yerinde bulunan biyolojik materyallerden elde edilen DNA profili kullanılarak, şüpheli kişiler ile olay arasında bağlantı olup olmadığı saptanmaya çalışılır. Adli vakaların çözümünde olgunun türüne göre otozomal ya da gonozomal (X ve Y kromozomundan) polimorfizmden yararlanılır (1,2,3,4).

STR lokusları rutin adli genetik analizlerde halen yaygın olarak kullanılmasına rağmen, birçok vakada olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş biyolojik örneklerde tiplleme sorunları yaşanabilmekte ve sonuç alınamamaktadır. Bu sorunları çözmek için adli bilimciler alternatif genetik işaretlere yönelmiştir (5).

Son yıllarda adli bilimlerde kullanılmaya başlanan InDel'ler, STR ve SNP lokuslarıyla birlikte kullanıldığında adli kimliklendirmede daha başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (6,7,8). InDel'ler genomda SNP'lerden sonra en fazla görülen polimorfizm çeşitidir. InDel; bir veya birden fazla nükleotidin insersiyonu-eklenmesi ve/veya delesyonu-çıkartılması sonucu oluşur. İnsersiyon/delesyon popülasyonda %1'in üzerinde bir sıklıkta görülmesiyle ilgili toplum için kullanılabilen bir polimorfizm şekli ortaya çıkmaktadır (6,7,8,9,10). Bu lokusların multipleks PCR çalışılmasına imkan vermesi, heterozigotluk oranının yüksek olması ve amplicon uzunluklarının küçük olmasından (60-200 bp) dolayı kimliklendirmede, biyocoğrafik soy, analizinde, evrimsel araştırmalarda ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabilirler (10,11,12).

InDel'lerin adli bilimlerde kullanımı ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu lokuslarla ilgili hazır ticari kit sayısı oldukça azdır. Bu nedenle araştırmacılar kullanacakları

InDel multipleks panellerini kendileri oluşturmaktadırlar. Türkiye’de ise konuyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada 21 gonozomal InDel lokusundan (X kromozomuna bağlı 20 InDel: MID 76, MID 229, MID 356, MID 236, MID 198, MID 357, MID 193, MID 243, MID 218, MID 184, MID 75, MID 586, MID 111, MID 383, MID 395, MID 359, MID 220, MID 1566, MID 219, MID 358 ve Y kromozomuna bağlı InDel: MID 227) oluşan bir multipleks panel oluşturmak, bu panelin uygulanabilirliği için optimizasyon ve validasyonu yapmak ve ön fikir vermek amacıyla Türkiye popülasyonunda çalışılarak; oluşturulan panelin gen sıklıkları, heterozigutluk oranı ve ayırtılma gücü belirlenerek Türkiye’deki adli laboratuvarlarda genetik kimliklendirmede ve nesep tayininde kullanılabilir bir multipleks (kit) haline getirilmesi amaçlanmıştır.

3. Genel Bilgiler

3.1. Adli Moleküler Genetikte Geçmişten Günümüze Gelişmeler

Moleküler genetik alanında 1980'li yıllarda gerçekleştirilen ilerlemeler ile polimorfik özelliklerin direkt olarak DNA düzeyinde incelenmesine olanak tanınmıştır. 1985 yılında Alec Jeffreys'in DNA molekülünde polimorfik tekrar dizilerini keşfinden sonra adli bilimlerde DNA kullanımı hızla gelişmiştir. O tarihten günümüze babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve diğer kriminal araştırmalarda gerek bireylerden gerekse olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin kimliklendirilmesi DNA analiz teknikleri ile yapılmaktadır. Terör, cinayet, cinsel saldırı, hırsızlık ve benzeri birçok adli olgunun olay yerinde tespit edilen biyolojik materyallerden izole edilen DNA profilleri sayesinde şüpheli şahıslar ile olay yeri ilişkilendirilebilmektedir (1,13,14).

DNA analizlerinin adli bilimlerde uygulanmaya başlandığı ilk dönemlerde kullanılan VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) lokuslarının ayırım gücü yüksek olmasına rağmen iyi kalitede (parçalanmamış), fazla miktarda (300-500 ng) DNA'ya ihtiyaç duyulması, analiz sürelerinin uzun ve zahmetli olması, radyoaktif madde maruziyeti gibi nedenlerle yerini yeni teknolojiler almıştır. Son 20 senedir adli kimliklendirmede yaygın olarak STR lokusları kullanılmaktadır (15,16).

STR lokuslarının amplicon büyüklüklerinin küçük olması, bozunmuş biyolojik örneklerde başarılı sonuçlar alınabilmesi, multipleks analize imkan vermesi ve pahalı donanım gerektirmemesinden dolayı son yıllarda adli bilimlerde genetik işaretler olarak kullanılmaktadır (2,17,18).

Federal Bureau of Investigation-Federal Araştırma Bürosu (FBI) tarafından kurulan bir DNA veri bankası olan Combined DNA Index Systems (CODIS) adli bilimlerde kullanılmak üzere 13 STR lokusu belirlemiştir. Bu lokusların multipleks PCR kitleri de ticari olarak üretilmiştir (5). 2015 yılında başlatılan ve validasyonu Ocak 2017’de tamamlanacak olan bir projeye, CODIS’e yeni lokuslar eklenerek lokus sayısı Amelegenin lokusu ile birlikte 20’ye çıkartılacaktır. Birçok ticari firma bu lokusları içeren yeni kitler üretmiştir ya da var olan kitlerine mini STR lokuslarını eklemişlerdir (19).

Bugün alışılan STR lokusları halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen aşırı derecede bozunmuş biyolojik örneklerde tipleme sorunları yaşanmakta, birçok kez karşılaştırmaya imkan verecek başarılı sonuçlar alınamamaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla degrede örneklerde dahi tipleme imknı veren kısa DNA dizinleri (miniSTR’ler) pazara sunulmuştur (5). Son yıllarda ise aynı amaçla DNA üzerinde çok az yer kaplayan tek nükleotid polimorfizmi (SNP-Single Nucleotide Polymorphism) ve InDel polimorfizmi gibi farklı DNA polimorfizm araştırmalarına yönelinmiştir (6,7,20).

3.2.Günümüzde Adli Kimliklendirmede Rutinde Kullanılan nemli Kitler

PCR, yaşam bilimi araştırmalarında, kalıtsal hastalıkların saptanması, bulaşıcı hastalıkların klinik tanısı, genlerin klonlanması, genetik kimliklendirme, babalık-nesep tayini gibi çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır (21). Normal bir PCR reaksiyonunda temel olarak aşağıdaki bileşenler bulunur:

- **Kalıp DNA:** Analiz edilecek DNA izolatı
- **Primer ifti-çiftleri:** oğaltılacak DNA bölgesine ait sentetik oligonükleotit baz dizisi
- **Taq Polimeraz:** Amplifikasyonda DNA sentezlenmesi için yüksek sıcaklığa dayanıklı polimeraz enzimi.

- **dNTP:** (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) DNA polimerazın yeni DNA moleküllerini oluşturduğu dört deoksिनुकлеотид-трифосfat
- **Buffer:** DNA amplifikasyonu için uygun bir kimyasal ortam sağlayan tampon çözelti

1985 yılında Alec Jeffreys'in DNA molekülünde polimorfik tekrar dizilerini keşfinden sonra adli bilimlerde DNA kullanımı hızla gelişmiştir. O tarihten beri babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi ve diğer kriminal araştırmalarda gerek bireylerden gerekse olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin kimliklendirilmesi DNA analiz teknikleri ile yapılmaktadır (13). Bu analizler, polimorfik DNA bölgelerinin çoğaltılması ve elektroforetik analizi ile ele edilen DNA profillerinin karşılaştırılması sonucunda kişilerin kimliklendirmesi aşamalarından oluşmaktadır. Adli bilimlerde, 1990 yılında ilk PCR'ye dayalı amplifikasyon kiti Human Leuokocyte Antigens -HLA-DQA polimorfik lokusları olmuştur (21).

Genel olarak PCR kitleri, tüm PCR bileşenlerini (kalıp DNA hariç) aynı tüpte içeren, optimizasyonu ve validasyonu tamamlanmış, kullanıma hazır ticari ürünlerdir. 1990 yılından beri çeşitli ticari firmalar gelişen teknolojiye paralel olarak birçok polimorfik lokusa ait hazır ticari kit üretmekte ve adli laboratuvarlar tarafından kullanılmaktadır. Ticari kitlelere olan ilginin nedeni; yöntemin optimize ve valide olması, her laboratuvarında aynı standartlarda analiz edilebilmesi, tek tüpte PCR bileşenlerin tümünü içermesi ve belli standartlarda üretilmiş olmasıdır (21).

Adli kimliklendirme amaçlı PCR kit üretimi 1990 yılından bu yana sırasıyla; doku uygunluk antijenleri (HLA lokusları), VNTR lokusları, STR lokusları, SNP lokusları ve InDel lokusları olmak üzere çeşitli sistemlerin polimorfizminden yararlanarak kit üretimi yapılmakta ve adli genetik laboratuvarlarında kullanılmaktadır (6,7,13,14,20,22).

3.2.1. Adli genetik laboratuvarlarında kullanılan STR analizine dayalı kitler

3.2.1.1. AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit

Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific firmasının ürettiği kullanıma hazır bir kittir. 20 yıla yakın bir süredir, STR teknolojisini kullanarak adli genetik laboratuvarlarında genetik kimliklendirme amacıyla kullanılmaktadır. CODIS'in önerdiği 13 STR lokusunu da içeren 15 STR lokusu ve cinsiyet ayrımı için kullanılan Amelogenin lokusu ile birlikte toplamda 16 STR lokusunun (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWa, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, Amelogenin) aynı anda multipleks olarak analizine imkan vermektedir. STR lokusları, kitin içeriğindeki 5 ayrı floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılarak kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir (23). Bugün adli genetik laboratuvarlarında kullanılabilen ticari hazır bir kittir.

3.2.1.2. PowerPlex® 16 System Kit

Promega firmasına ait 16 STR lokusunu (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D15S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, FGA, SE33) içeren kit, adli genetik laboratuvarlarında genetik kimliklendirme amacıyla kullanılmaktadır. STR lokusları, 4 ayrı floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılarak kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir. Halen adli genetik laboratuvarlarında kullanılan ticari bir kittir (24).

3.2.1.3. Investigator ESSplex Plus Kit

Qiagen firmasına ait, Avrupanın benimsediği (European Standard Set-ESS) yeni lokusları ve Amelogenin ile beraber 16 multipleks STR lokusunun (Amelogenin, TH01, D3S1358, vWA, D21S11, D16S539, D1S1656, D19S433, D8S1179, D2S1338, D10S1248, D22S1045

D12S391, D2S441, D18S51) analizine imkân veren ticari bir kittir. STR lokusları, kitin içeriğindeki 4 ayrı floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılarak kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir. Diğer ticari firmalara göre piyasaya son yıllarda girmiş olup, adli genetik laboratuvarlarında kullanılan hazır bir kittir (25).

3.2.1.4. GlobalFiler™ PCR Amplification Kit

Adli genetikteki son gelişmelere paralel olarak (CODIS lokus sayısının 20'ye çıkarılması vb.) son dönemde Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific firması tarafından 6 farklı floresans boya ile işaretli primerlerin kullanıldığı 24 lokuslu üretilen ticari kitidir. İçerdiği STR lokusları (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, DYS391, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Y indel, Amelogenin) FBI, Avrupa ve CODIS'in benimsediği tüm bölgeleri kapsamaktadır. Kitte cinsiyet ayırıcı kromozom olarak Amelogenin lokusuna ek olarak bir adet Y InDel lokusu kullanılmıştır. Bu lokuslardan 10'u mini STR lokusudur. 24 lokusun ayırım gücünün yüksek olması ve mini STR lokusu içermesi sayesinde zorlu adli vakalarda diğer kitlere göre %90 daha başarılı profil elde etmek mümkündür. Ayrıca bu kitte, tüm dünya popülasyonuna ait DNA veri tabanına uygun olarak alel aralıkları genişletilmiştir. Bu sayede global adli genetik kimliklendirmeye olanak tanımaktadır.

Kitte 6 floresans boya bulunduğundan Applied Biosystems 3500 ve 3500xl kapiller elektroforez cihazlarında analiz yapılabilmektedir (26).

3.2.1.5. PowerPlex® Fusion 6C System Kit

Promega firmasının adli genetikteki son gelişmelere paralel olarak en son çıkardığı 27 STR lokuslu (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045, FGA, DYS391, DYS576, DYS570, Penta E, Penta D , Amelogenin) ticari bir kittir. Kit CODIS ve Avrupa'nın benimsediği tüm lokusları içermekte olup cinsiyet ayırıcı Amelogenin lokusuna ek olarak 3 adet Y STR lokusu içermektedir.

6 floresans işaretli boya kullanılarak primerler tasarlanmıştır. 27 STR lokusu tek multiplekste analiz edilebilmektedir. Bu sayede kitin ayırım gücünü diğer firmaların ticari ürünlerine göre artırmıştır.

Kit 6 floresans boya teknolojisine uygun olup analiz Applied Biosystems 3500 ve 3500xl kapiller elektroforez cihazlarında yapılabilmektedir (27).

3.2.1.6. Investigator 24plex QS Kit

Qiagen firmasının adli genetikteki son gelişmelere paralel olarak en son çıkardığı 24 STR lokuslu (TH01, D3S1358, vWA, D21S11, TPOX, DYS391, D1S1656, D12S391, SE33, D10S1248, D22S1045, D19S433, D8S1179, D2S1338, D2S441, D18S51, FGA, QS1, D16S539, CSF1PO, D13S317, D5S818, D7S820, QS2) kitidir. Kit, CODIS, Avrupa ve International Criminal Police Organization - Uluslararası Polis Teşkilatı'nın (Interpol) benimsediği tüm lokusları içermektedir. 6 floresans boya teknolojisine uygun olup Applied Biosystems 3500 ve 3500xl kapiller elektroforez cihazlarında çalışlabilmektedir (28).

3.2.1.7. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit

Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific firmasının geliştirmiş olduğu 8 adet mini STR lokusu (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA) ve Amelogenin lokusunu içeren mltipleks bir kittir. STR lokuslarının amplikon boyutları 70-283 b olup özellikle olay yerinden gelen zorlu adli örneklerin analizinde kullanılmak üzere üretilmiştir. Lokusların küçük amplikon boyutlarından dolayı kite ‘MiniFiler’ adı verilmiştir. Kite 4 floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılmıştır. Örnekler kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir (29).

3.2.1.8. AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit

Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific firması tarafından üretilen Y kromozomu polimorfizim analizine dayalı 27 Y STR lokusunun (DYS19, DYS385 a/b, DYS387S1 a/b, DYS389 I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS449, DYS456, DYS458, DYS460, DYS481, DYS518, DYS533, DYS570, DYS576, DYS627, DYS635 (Y GATA C4) ve YGATA H4) multipleks analizine imkan veren PCR kitidir. Kitin nceki versiyonunda (AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit) 17 STR lokusu analiz edebilirken geliştirilen bu kit ile 10 STR lokusu daha eklenerek özellikle olay yerinden gelen zorlu örneklerin analizinde etkindir. Bu lokusların 7’si hızlı mutasyon oranına sahip olup akraba erkeklerin ayırımında etkin kullanılabileceği dşnlmektedir. Kit 6 floresans boya teknolojisine sahiptir ve Applied Biosystems 3500 ve 3500xl kapiller elektroforez cihazlarında çalışılabilmektedir (30).

3.2.1.9. PowerPlex® Y23 System

Promega firmasına ait Y kromozomu polimorfizmine dayalı 23 Y STR lokusunun (DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643, DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 ve Y-GATA-H4) multipleks analizini sağlayan PCR amplifikasyon kitidir. Olay yerinden gelen örneklerin kimliklendirilmesinde ve nesep tayininde Y kromozomu polimorfizminden yararlanmak üzere tasarlanmıştır. Kitte 4 floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılmıştır. Kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir (31).

3.2.1.10. Investigator Argus Y-12 QS Kit

Qiagen firmasına ait Y kromozomu polimorfizm analizine dayalı, Scientific Working Group on DNA Analysis Methods –DNA analiz Metotları Bilimsel Çalışma Grubu (SWGDM) tarafından benimsenmiş 12 Y STR lokusunun (DYS439, DYS437, DYS390, DYS385, DYS391, DYS389-I, DYS19, DYS389-II, DYS393, DYS438, DYS392) multipleks analizini sağlayan PCR amplifikasyon kitidir. Nesep tayininde Y kromozomu polimorfizminden yararlanmak üzere tasarlanmış olan kit içerisindeki 4 ayrı floresans boya ile işaretlenmiş primerler kullanılarak örnekler kapiller elektroforez - Applied Biosystems 310, 3130, 3130xl, 3500 ve 3500xl cihazlarında analiz edilmektedir (32).

3.2.1.11. Investigator Argus X-12 QS Kit

X kromozomu polimorfizmine dayalı nesep tayini analizleri için üretilmiş bir üründür. Qiagen firması tarafından 12 X STR lokusunu (DXS10103, DXS8378, DXS10101, DXS10134, DXS10074, DXS7132, DXS10135, DXS7423, DXS10146, DXS10079,

DXSHPRTB, DXS10148) ve otozomal D21S11 ile Amelogenin lokuslarıyla birlikte toplam 14 lokusun mltipleks analizi için geliştirilmiş PCR amplifikasyon kitidir (33).

3.2.2. SNP analizine dayalı kitler

DNA üzerinde çok az yer kaplayan SNP genetik işaretlerinin hazır ticari formları son yıllarda geliştirilmiştir. Bu ticari SNP kitleriyle kimliklendirmeye ek olarak özellikle şüpheli DNA'sına ait herhangi bir veri bulunamadığında, kişilerin sa rengi, göz rengi, ten rengi gibi fenotipik özelliklerini belirmeye yarayan ve biyocoğrafik soy tayini sağlayan SNP kitleri de geliştirilmiştir. SNP analizleri son dönemde hızlı ve veri kalitesinin arttırılmasını sağlayan daha ileri seviyede analize olanak veren yeni nesil dizileme sistemlerinde – NGS (Next Generation Sequencing System) yapılmaktadır. Aynı anda ortalama 120 SNP bölgesi çalışılarak %99,99'luk ayırım gücüne ulaşılabilmektedir. Ticari NGS kitleri ilk defa 2014 yılında Thermo Fisher Scientific tarafından "Ion PGMTM" sistemi için tasarlanıp iki tür olarak piyasaya sürülmüştür. Daha sonra Illumina, "MiSeq FGx Forensic Genomics System" için tasarladığı kiti piyasaya sürmüştür (34).

3.2.2.1. Precision ID Identity Panel

Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific firması tarafından degrade ve eser miktardaki örneklerde kimliklendirme ve nesep tayini amacıyla kullanılmak üzere tasarlanmış, Applied Biosystems marka Ion PGM, Ion S5-S5 XL NGS cihazlarında analiz edilebilen bir kittir. 124 SNP noktası içeren kit ile her türlü biyolojik örnekten (kan, tükürük, svab, vücut sıvısı vs.) alışılabilmektedir. Kit tasarlanırken rutinde kullanılan STR lokuslarının ayırım gücünü yakalayabilmek için 124 SNP seçilerek %99,99' luk ayırım gücüne ulaşılabilmiştir. Bu 124 SNP noktası; 90 otozomal SNP, 34 Y kromozomuna özgü SNP'den oluşan, düşük mutasyon oranına ve küçük amplikon boyutuna sahip (132-141 nükleotit) bölgelerdir. Bu sayede kit degrade ya da eser miktarda örneklerle çalışmaya imkan sunmaktadır (34).

3.2.2.2. Precision ID Ancestry Panel

Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific firması tarafından olay yerinden elde edilen şüpheli DNA'sına ait örneğin veri tabanında bir eşleşmeye rastlanmamışsa, soruşturmaya yön verebilecek ve kişiyi tanımlayabilecek hem fenotipik özelliklerini (saç rengi, göz rengi, ten rengi) hem de soy tayinini yapmak üzere geliştirilmiş bir kittir. Bu kit ile 165 SNP noktası multipleks olarak Applied Biosystems Ion PGM, Ion S5-S5 XL NGS cihazlarında analiz edilebilmektedir. Degrade ve her türlü biyolojik örnekte (kan, tükürük, svab, vücut sıvısı vs.) çalışılabilmektedir. Kit ile birlikte ALFRED (Allele Frequency Database) software kullanılmaktadır. Bu software tüm kıtasal düzeyde popülasyonlara özgü verilere sahiptir ve analiz edilen her örneğin hangi popülasyona yakın olduğunu tespit ederek harita üzerinde kişinin hangi ırk ve bölgeden olduğunu gösterir. Kitin içerdiği SNP noktaları ile % 99,77 oranında ayırım gücüne ulaşılmaktadır (34).

3.2.2.3. ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit

Illumina firması tarafından tamamen adli genetik uygulamaları için tasarlanan bu kit hem olay yeri örnekleri hem de referans örneklerde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Adli genetik uygulamalarında STR ve SNP teknolojilerini aynı anda kullanan ilk ve tek validasyonlu kittir. Aynı kit ile 29 otozomal STR, 24 Y-STR ve 9 X-STR lokusları, 86 kimliklendirme SNP noktası, 22 fenotip belirleyen SNP noktası ve 56 biyocoğrafik soya ait SNP noktasını bir arada çalışmak mümkündür. Üstelik bu 200'den fazla lokusun analizi için 1 ng DNA kullanılabilmektedir. Bu kitle olay yerinden gelen örneklerde sıkça rastlanan alel düşmesi ve kısmi profil sorunları yaşanmamaktadır. Kit yeni nesil dizileme sistemi olan Illumina MiSeq FGx sistemine valide olup bu sistemde çalışılabilmektedir (34).

3.2.3. InDel analizine dayalı kitler

Adli bilimlerde InDel lokusları son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu sebeple InDel kit üretimi de oldukça kısıtlıdır. Genellikle adli bilimciler kendi InDel panellerini oluşturmakta ve yaygınlaştırmaya çalışmaktadır (35). Hâlihazırda mevcut 2 adet ticari InDel kiti bulunmaktadır.

3.2.3.1. Investigator® DIPplex Kit

Qiagen firması tarafından Son 2-3 yılda piyasa sürülmüş somatik kromozomlarda bulunan 30 InDel lokusunu içeren bir kittir. Kit ayrıca Amelogenin lokusunu da içermektedir. Seçilen InDel lokusları 160 bp'den küçük olup özellikle felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi ve antropolojik araştırmalar için üretilmiştir. ABI 310, 3130, 3130XL, 3500, 3500XL cihazlarında analiz edilmektedir (36).

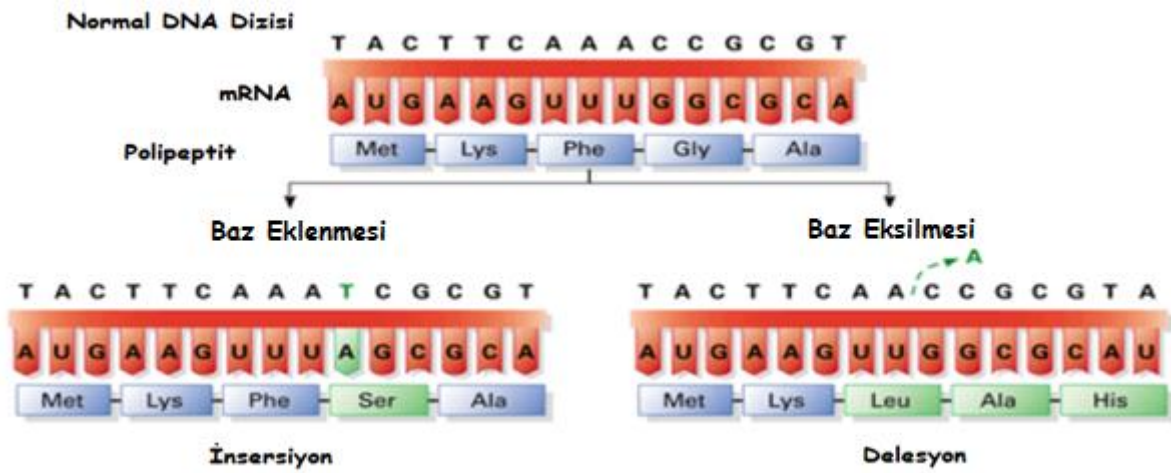
3.2.3.2. InDelPlex INDEL Polymorphism Detection Kit

Pereira R. vd. tarafından 2009 yılında Oporto Üniversitesi Molecular İmmünoloji ve Patoloji Enstitüsü ile Santiago de Compostela Üniversitesi ortaklığında geliştirilen, son 1-2 yıl içinde Genomica firması ile birlikte ticarileştirdikleri bir kittir. Kit 38 InDel bölgesinin multipleks PCR amplifikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu lokuslar somatik InDel'lerden oluşmaktadır. Adli genetik kimliklendirme ve klinik diagnostik amaçlı üretilmiştir ABI 310, 3130, 3130XL, 3500, 3500XL cihazlarında analiz yapılabilmektedir (6, 7, 8).

3.3. İnsersiyon/Delesyon Polimorfizminin Adli Genetikte Kullanımı

Nokta ya da gen mutasyonları, DNA dizisinde meydana gelen ve sonraki nesillere aktarılabilen değişiklikler olarak tanımlanırlar. Nokta mutasyonları genellikle bir veya birkaç nükleotidde meydana gelen mutasyonlar olup genomun yapısında değişikliğe neden olurlar. Baz dizisinin eksilmiş olmasına delesyon, baz eklenmesi olayına ise insersiyon adı

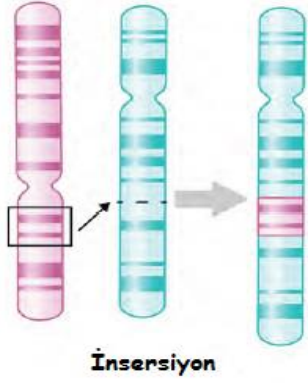
verilmektedir (22,37) (Şekil 1). İnsersiyon ya da delesyon mutasyonları, nokta mutasyonlarından çok daha önemli değişikliklerdir. Çünkü DNA zincirinde bir ya da birden fazla bazın eksilmesi ya da eklenmesi, genellikle eklenme ya da eksilmenin olduğu noktadan başlayarak okuma kodu çerçevesinin kaymasına yol açar. Bu da gen yapısında önemli değişiklikler meydana getirerek polimorfizme neden olur (6,7).



Şekil 1. Baz dizisi üzerinde İnsersiyon ve delesyonun şematize gösterimi (38).

3.3.1. İnsersiyon

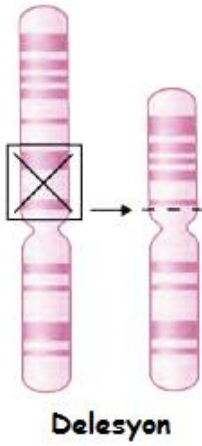
DNA baz dizisine bir veya daha fazla bazın eklenmesi sonucu doğal diziyi bozan mutasyon çeşididir. Bu ekleme bir baz olabileceği gibi bütün bir kromozom kadar da olabilir (Şekil 2). DNA polimerazın kayması sonucu genellikle mikrosatellit bölgelerine komşu olmayan baz dizilerinin ana diziye eklenmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir (39,40,41).



Şekil 2. Kromozom boyutunda insersiyon (38).

3.3.2. Delesyon

DNA baz dizisinde bir veya daha fazla bazın eksilmesi-çıkarılması sonucu oluşan mutasyon çeşididir. İnsersiyonda olduğu gibi delesyon baz bir veya birkaç bazda olabileceği gibi kromozom boyutunda da olabilmektedir (Şekil 3). Kromozomun bir parçasının kopup, kaybolması şeklinde oluşan delesyon ciddi genetik hastalıklara yol açabilmektedir (39,40,41).



Şekil 3. Kromozomal boyutta delesyon (38).

3.3.3. InDel (İnsersiyon/Delesyon)

InDel, özellikle somatik ve gonozomal kromozom mutasyonları; adli moleküler genetik, evrim ve popülasyon genetiği çalışmalarında delesyon veya insersiyonun ayrı ayrı ya da ikisinin bir arada görüldüğü mutasyon kombinasyonlarını ifade etmek için kullanılır (40,41,42).

Kromozomun bir bölümünün veya tamamının delesyona veya insersiyona uğraması çeşitli öldürücü genetik hastalıklara neden olur. Tek veya birkaç bazın insersiyon veya delesyona uğraması ise uzunluk polimorfizmine neden olur. DNA üzerinde 1-50 nükleotit arasında oluşan InDel mikroindel olarak tanımlanır (43). Polimorfik olmalarından dolayı InDel'ler popülasyon, filogenetik çalışmalarında ve kimliklendirmede kullanılabilir (6,7,8,44). Polimorfizm ardışık mutasyonlar sonucunda meydana gelir ve kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar. 2002 yılında James Weber ve arkadaşları insan genomu üzerinde 2000'in üzerinde bialelik insersiyon/delesyon bölgesi tanımlamışlardır (3).

InDel'ler genomdaki tüm genetik varyasyonların %16-25'ini oluşturmaktadırlar. İnsan popülasyon çalışmalarında 1,6-2,5 milyon InDel polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu da İnsersiyon veya delesyon (InDel) sonucu meydana gelen kalıtsal değişikliklerin, insan genomunda sıklıkla görüldüğünü ve genetik işaret olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu kadar sık görülmelerine rağmen yapılan çalışmalar kısıtlıdır (21). Oysa ayırım güçlerinin ve heterozigotluk oranlarının yüksek olması; kimliklendirmede, biyolojik köken araştırmalarında, evrimsel araştırmalarda ve moleküler antropolojide kullanılmaya elverişli kılmaktadır. Bu sebeple günümüzde adli kimliklendirmede DNA profillemesinde kullanılan SNP ve STR polimorfizmine alternatif oluşturmaktadır (6,7,8,9,10).

3.3.3.1. Gonozomal InDel lokuslarının adli genetikte kullanımı

InDel lokusları hem somatik hem de cinsiyet kromozomları üzerinde bulunmaktadır. Somatik kromozomlarla karşılaştırıldığında X ve Y kromozomlarında da benzer oranda InDel varyasyonları bulunmaktadır. X'e bağlı polimorfizm analizinde baba/kız ilişkisinde otozomal genetik işaretlere ek olarak kullanılabilir. Akraba iki erkeğin (baba/oğul gibi) babalık davasında, çocuğun kız olması durumunda X kromozomundaki polimorfizmin kullanılmasıyla babalık belirlenebilir. Çünkü şüpheli babalar farklı annelere sahip olduğundan farklı X kromozomlarına da sahip olacaktırlar (3,45).

Y kromozomu babadan oğula değişmeden aktarıldığından, aynı ailenin erkek bireylerinde mutasyon ve genetik anomaliler dışında aynı şekilde görülmektedir. Bu sebeple Y kromozomuna bağlı polimorfizm analizi ile, popülasyon genetiği, biyocoğrafik soy belirlenmesi, erkek tarafından akrabalıkların değerlendirilmesi-bağlantı analizi ve adli genetik kimliklendirme çalışmaları yapılabilmektedir. Özellikle baba adayının bulunamadığı, biyolojik materyalinden DNA elde edilemediği durumlarda ya da ölü olduğu durumlarda çocuk erkek ise; feth-i kabir yapmaya gerek kalmadan babanın soy ağacında yer alan dede, amca, kuzen vs. gibi herhangi bir erkeğin Y-kromozom lokuslarının tiplendirilmesi ile sorgulanan çocuğun aileye dahil edilip edilmediği söylenebilir (46,47,48). Benzer şekilde babanın öldüğü ya da bulunamadığı durumlarda çocuğun kız olması koşulu ile, babaanne-kız çocuk arasında X' e bağlı polimorfizmin analizi ile babalık davaları çözümlenebilir. Çocuğun X kromozomlarından biri babasından gelmektedir ve babasının X kromozomu da onun annesinden gelmektedir. Sonuç olarak kız çocuktaki baba kaynaklı X kromozomu mutlaka babaannenin X kromozomlarından biri olacaktır (3,45).

Cinsel tecavüz suçlarından sonra oluşan hamilelikler kürtaj ile sonuçlandırılabilir. 6-8 haftalık kürtajlarda düşük materyali, maternal kan ve dokularla birlikte bulunur ve bunlar mikroskopik

olarak ayrılması zordur. Bu durumda fetüs dişi ise, X' e bağlı polimorfizm analizi ile babadan kalıtılan X kromozomunun varlığı tespit edilebilir (3,45). Y kromozomundan da cinsel suçlarda yararlanılmaktadır. Mağdurun kadın olduğu durumlarda mağdura ait vajinal sürüntü örneğinde mağdur ve faile ait DNA karışım durumundadır. Kadında Y kromozomu bulunmadığından elde edilen karışım DNA'sında Y kromozomu lokusları kullanılarak kimliklendirme yapıldığında yalnızca faile ait profil elde edilmektedir (46,47,48).

Anneleri farklı veya aynı 2 kız çocuğunun, aynı babadan olup olmadığının araştırılması yine X' e bağlı polimorfizmin analizi ile belirlenebilir. Babada bir X kromozomu bulunduğundan tüm kız çocuklarına aynı X kromozomunu aktaracaktır. Ancak babaları aynı değilse babalarından aktarılan X kromozomu lokusları da farklı olacaktır (3,45).

Bu tür olgularda ve olay yerinden gelen örneklerin profilendirilmesinde gonozomal ve otozomal InDel'ler STR ve SNP lokuslarıyla birlikte kullanılarak daha başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (3,45).

3.4. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve PCR Optimizasyonu

PCR optimizasyonu, yöntemin gerekliliklerine ve çeşidine göre PCR bileşenlerinin dengelenip optimum koşullara getirilmesidir. Optimize edilmesi gereken PCR bileşenleri ise: Polimeraz enzimi, PCR tampon çözeltisi, primer konsantrasyonları ve Tm değerleri, Deoksinükleotid Trifosfatların (dNTP) konsantrasyonu, Magnezyum (Mg^{+2}) iyon konsantrasyonu ve döngü parametreleridir (49,50).

3.4.1. Taq polimeraz seçimi ve konsantrasyonu

Taq polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimidir. *Thermus aquaticus*, termofilik bir bakteri olup kaplıca ya da jeotermal bölgelerde yaşar. Taq polimeraz enzimi, PCR'de kullanılan, yüksek sıcaklıklara dayanabilen bir enzimdir. Bu sebeple PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkı bu enziminin bulunması olmuştur. Günümüzde PCR'de Hot Start özellikte AmpliTaq Gold gibi Taq polimerazlar kullanılmaktadır. Hot Start DNA Polimeraz, Taq DNA Polimeraz'ın geliştirilmiş bir formudur ve ısı muamelesi ile aktive edilmektedir. Enzimin aktif bölgesine eklenen kimyasal bir madde ile oda sıcaklığında inaktif hale getirilmiştir. PCR'nin hazırlık ve başlangıç aşamasında henüz aktifleşmeyen enzim, bu aşamalarda meydana gelen yanlış primer bağlanmalarını ve yanlış uzamaları engellemektedir. Bu şekilde standart DNA polimerazlara göre daha spesifik ve yüksek verimde PCR ürünü elde edilebilmektedir.

Enzimin miktarı da PCR'de önemli bir faktördür. PCR koşulları optimum hale getirildiğinde 100 µl reaksiyon için önerilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2,5 ünedir. Bu miktar kalıp DNA veya primere göre değişebilir. Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur. Enzim konsantrasyonu yüksek olursa istenmeyen bantlar ortaya çıkabilir (49,51,52).

3.4.2. Magnezyum iyon konsantrasyonu

Mg⁺² iyonlarının esas işlevi DNA polimerazın aktivitesini başlatmak ve primer-kalıp DNA hibridizasyonunu sağlamaktır. Ayrıca çift iplikli DNA'nın erime noktası (T_m) değerini arttırmaktır. PCR ortamına eklenen Mg⁺² iyonunun reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı PCR uygulamalarında değişiklik gösterebilir. Mg⁺² konsantrasyonu primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PCR sonucunda elde edilen

DNA kalitesini, primer-dimer oluşumlarını, enzim aktivitesini ve güvenilirliğini etkilemektedir. Bu nedenle PCR'de Mg^{+2} iyon konsantrasyonunu ayarlamak çok önemlidir. Bir PCR protokolünün optimum koşullara gelebilmesi için 0,5-2,5 milimolar (mM) arasında Mg^{+2} iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir (49,50).

3.4.3. dNTP konsantrasyonu

DNA polimeraz enzimi DNA sentezleyebilmek için; komplementerini sentezleyeceği bir kalıp DNA molekülüne, substrat olarak serbest nükleotidlere - dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ve kalıp zincire eşleşmiş primere ihtiyaç duyar. Ticari ürün olan dNTP'ler eşit konsantrasyondaki dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin karışımından oluşmaktadırlar. PCR reaksiyonu için dört bazın konsantrasyonu da eşit olmalı ve optimum koşullar için her bir deoksiniükleotid (adenin, timin, guanin, sitozin -A, G, C, T) konsantrasyonu 20- 200 μ M arasında olmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması, yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı dizilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu sebeple mümkün olduğu kadar düşük konsantrasyonda dNTP kullanmak PCR'nin özgünlüğünü ve güvenilirliğini artırmaktadır. dNTP'ler karışım halinde veya ayrı ayrı olarak satın alınabilir. Genellikle 100 mM konsantrasyonda satılan dNTP karışımlarının 10 mM'lık küçük hacimlere bölünerek -20 °C de saklanmalıdır (49,50).

3.4.4. PCR tampon çözeltisi

PCR tampon çözeltisinin karışımı beraber kullanıldığı enzime ve PCR şartlarına göre değişiklik gösterebilir. Tris-HCl, Tris-Asetat, Taps tampon çözeltisinde en sık kullanılan kimyasallardır. PCR tamponu olarak genellikle tercih edilen 10-50 mM arası Tris-HCl'dir. Bu tampon çözeltinin 20 °C de pH'si 8,3-8,8 arasında değişir. Tampon çözeltisinde primer bağlanmasını kolaylaştırmak için 50 mM KCl veya NaCl; enzimin daha iyi çalışmasına

yardımcı olmak için Jelatin (gelatin), bovine serum albumin veya Tween 20 deterjanı ilave edilir. Fakat 50 mM'ın üzerindeki KCl veya NaCl Taq DNA polimeraz aktivitesini engeller (49,53).

10X Buffer dengelenmiş Amonyum/Potasyum konsantrasyonu ile multipleks PCR için optimize edilmiş bir tampon sistemidir. Multipleks PCR için gerekli tüm tampon çözeltilerini karışım halinde içerir. Genellikle 10X Reaksiyon Buffer: Tris-HCl pH:8.7, dengelenmiş KCl/(NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, %1 Tween 20® içerir. 10X Buffer'ın son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanılır (54).

3.4.5. Multipleks PCR karışımı (PCR master miks, PCR miks)

PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler genellikle; MgCl₂, 10X PCR tamponu, dNTP'ler, Taq DNA Polymeraz'dır. PCR bileşenlerini tek tek kullanmak yerine tüm bileşenleri tek tüpte içeren hazır ticari PCR karışımları bulunmaktadır. Bu hazır karışımlar özellikle multipleks PCR gibi daha karmaşık ve gelişmiş PCR sistemleri için optimize edilmiş ürünlerdir ve birçok araştırmacı PCR çalışmalarında hazır ticari PCR karışımı kullanmaktadır. Tercih edilme nedeni ise; maliyetinin düşük olması, multipleks PCR çalışmaları için optimize edilmiş olması, kolay olması ve PCR reaksiyonu hazırlama süresini kısaltmasıdır. Ayrıca primer haricinde tüm PCR karışımı bir seferde alındığından kontaminasyon riski de en aza inmektedir (55).

3.4.6. Primer dizaynı, konsantrasyonu ve T_m değerleri

Primerler (oligonükleotidler): PCR ürününe özgü 18-30 baz çifti arasında değişen dizileridir. Primerler tasarlanırken çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin her iki ucuna tamamlayıcı olan diziler tasarlanır (56).

Primerlerin 3' uçlarındaki baz dizini primerin doğru yere bağlanmasını belirlemektedir. Eğer ileri ve geri yönlü (forward ve reverse) primerlerin karşılıklı olarak 3' uçlarında birbirlerine komplementer baz dizisi içeriyorsa bu durum istenmeyen primer-dimer oluşumlarına neden olur (49).

Primer tasarımı yapılırken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar:

- Genellikle en fazla 30 baz çifti uzunluğunda olmalıdır.
- Özellikle G-C oranının %50'nin altında kalmasına özen gösterilmelidir.
- Tm sıcaklığı birbirine yakın primer çiftlerinin seçilmesine dikkat edilmelidir.
- Dört bazın da eşit oranda kullanımına özen gösterilmeli, primerler tekrarlı bölgeler içermemeli ve seçilen primerin genomda başka bir bölgeye komplementer olup olmadığının NCBI, VEGA, ENSEMBL vb. genom veri bankalarından kontrolü yapılmalıdır.
- Seçilen primer çiftlerinin primer-dimer yapma olasılıklarının olmamasına dikkat edilmelidir (57).

Primerlerin baz dizisindeki guanin, sitozin (GC) miktarı ve primerlerin bağlanması için gerekli sıcaklık miktarı (Tm) arasında çok iyi bir denge kurmak gerekir. Bu denge sağlanamadığı takdirde PCR'de iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle primer dizilerinin ortalama %50-60'ının G ve C bazlarının olması gerekir. Örneğin bir primerin baz dizisinde GC oranı % 50 ve Tm değeri 56-62 °C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenir. Primerlerin denatürasyonda ikiye ayrılan DNA zincirlerinde hedef bölgeye hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için bağlanma sıcaklığının iyi hesaplanması gerekmektedir. Primerlerin bağlanma sıcaklığını hesaplamak için $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$ formülü kullanılmaktadır (49,58).

Günümüzde primer tasarlamak için bilgisayar programları yapılmıştır. Bu programlarda da genellikle dört bazın eşit oranda kullanımına dikkat edilir. Primerler, aralarında tek bir nükleotid farkı olan hedef dizileri birbirinden ayıracak şekilde tasarlanır ve böylece genetik testler için alele spesifik problemler hazırlanabilir. Tasarlanan primerleri sentezletmek için üreticiler genellikle 3 yöntemden birini kullanır.

- Tuzdan arındırma (desalting)- en ucuz yöntemdir, Ancak primerler dizi analizinde kullanılacaksa bu yöntem tercih edilmemelidir.
- Kolon bazlı saflaştırma çok temiz sonuç veren tuzdan arındırma yöntemine göre daha pahalı ancak HPLC'ye göre ekonomik olan bir yöntemdir.
- HPLC- en başarılı saflaştırma yöntemi olmakla beraber maliyeti en yüksek olan yöntemdir.

Primerler, firmalardan genellikle liyofilize halde ve steril olarak temin edilir. 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırılır daha sonra bu stoktan 10 pmol/μl'lik bir dilüsyon hazırlanarak kullanılabilir (57). Genellikle PCR'de primer konsantrasyonu 0,1-0,5 μM arasında olması gerekir. Primer konsantrasyonu yüksek olduğunda primerler yanlış bağlanabilmekte ve spesifik olmayan DNA bantları oluşabilmektedir. Ayrıca primer-dimer oluşarak elde edilecek PCR ürünün az olmasına da neden olur (49,57,58).

3.4.7. PCR döngü koşulları

PCR, ön denatürasyon, denatürasyon, annealing (bağlanma) ve ekstansiyondan (uzama) oluşan tekrar döngüleri ile final ekstansiyon aşamalarından oluşur.

3.4.7.1. Denatürasyon

PCR'de kullanılan kalıp DNA iplikçiklerinin çift sarmal yapısı 92-95 °C'de 1-2 dakikada birbirlerinden ayrılır. Ancak GC bazlarınca zengin kalıp DNA zincirlerinde, süre ve sıcaklığı

artırmak gerekir. PCR olmamasının en önemli nedenlerinden biri de kalıp DNA zincirinin yeterince açılmamasıdır (49,59,60).

3.4.7.2. Bağlanma

PCR'de denatürasyon sonrası sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlanmasıdır. Bu işlem 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (49). Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması için gerekli sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonu, elde edilecek DNA'nın uzunluğu ve baz içeriğine göre değişir (49,58).

3.4.7.3. Uzama

Primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılması için gerekli zaman, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA parçasının uzunluğu, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişir. Genel olarak primer uzatma işlemi 55-72 °C de yapılmaktadır. Çünkü bu sıcaklık Taq DNA polimeraz enziminin optimal çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Primerlerin uzatılması için gerekli süre amplifiye edilecek bölgeye bağlı olarak değişmektedir. En uygun uzama süresi ortalama 1 dakikadır (49,58).

3.4.7.4. Döngü sayısı

PCR'nin çalışma şartları iyi ayarlandığı takdirde 25-40 döngü sayısı yeterli olmaktadır. Bu sayı çoğaltılacak kalıp DNA konsantrasyonuna ve kullanılan enzimin kalitesine bağlıdır. Az miktarda DNA ile başlandığında en fazla 40 döngü, daha fazla DNA ile başladığında ise ideal döngü sayısı 30 olmalıdır. Döngü sayısının fazla olması, spesifik olmayan ikincil ürünlerin (primer dimer) oluşumuna neden olur (49,59).

3.4.8. Multipleks Panel ve primer seçme kriterleri

Multipleks PCR, aynı reaksiyonda birden fazla primer kullanılarak tüm bölgelerin aynı anda ve kısa sürede analiz edilmesini sağlamaktadır. Multipleks PCR sistemlerinin optimizasyonu, tek bir primer ile çalışılan PCR'ye göre kullanılacak primerler arasındaki uyumun sağlanması ve diğer parametrelerin düzenlenmesi gerektiğinden daha zor olsa da, elde edilen sonuçların kalitesi nedeniyle günümüzde yaygın biçimde kullanılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir (61).

Multipleks PCR için primer seçiminde aşağıdaki kriterlere uyarak tercih yapılmalıdır:

- Primerler en fazla 30 baz çifti uzunluğunda olmalıdır.
- Seçilen primerlerin baz dizilerinin doğruluğu NCBI, VEGA, ENSEMBL vb. gibi veri tabanlarından kontrol edilmelidir.
- Primer dizilerinin %50-60'nın G ve C bazlarının olmasına dikkat edilmelidir.
- Her bir primerin Tm sıcaklığı hesaplanarak bu sıcaklıkları birbirine yakın primer çiftlerinin seçilmesine dikkat edilmelidir.
- Seçilen primerin genomda başka bir bölgeye ya da diğer primere-bölgeye komplementer olup olmadığının NCBI, VEGA, ENSEMBL vb. genom veri bankalarından kontrolü yapılmalıdır.
- Seçilen primer çiftlerinin primer-dimer yapma olasılıklarının olmamasına dikkat edilmelidir.
- Benzer büyüklükteki bölgelerin primerleri kapiller elektroforez analizi için farklı floresans boya ile işaretlenmelidir (6,7,57,61).

3.5. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve Validasyonu

TS EN ISO/IEC 17025 Standardı; deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartların yanısıra bir laboratuvarın teknik açıdan doğru ve güvenilir sonuçlar üretme kabiliyetini ve teknik yeterliliğini ele almaktadır. Laboratuvar yeterliliğinin göstergesi olarak uluslararası düzeyde tek bir standardın kullanılmasıyla, dünyanın herhangi bir yerinde faaliyet gösteren deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının birbirleriyle aynı seviyede rekabet etmesi amaçlanmaktadır. Adli genetik laboratuvarları da EN ISO / IEC 17025 kurallarına tabidir ve gerekliliklerinden birisi, test laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin doğrulanması ve geçerli kılınmasıdır (valide edilmesidir) (62,63).

European Network of Forensic Science Enstitutes –Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Topluluğu (ENFSI) DNA Çalışma Grubu, bir yöntemin laboratuvarında uygulanabilmesi için aşağıda belirtilen asgari geçerlilik kriterlerini içermesi gerektiğini öngörmektedir. Bu validasyon parametre tavsiyeleri genel kriterler olup her laboratuvar kendi iç validasyonunu yöntemine göre genişletebilir ya da düzenleyebilir. Ancak bir sistemi doğrulamak için ne olursa olsun prosedürler ve enstrümanlar EN ISO / IEC17025'e uygun olmalıdır. Ayrıca sonuçların uluslararası uyumluluk içinde olması mutlak bir zorunluluktur. DNA profillerinin laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir olmasını sağlamak için belli standartlarda ve geçerlilikte yöntemin uygulanmasına bağlıdır (62,63,64).

Yeni multipleks bir kit geliştirildiğinde yöntemin geçerli kılınması için gerekli asgari parametreler; tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, duyarlılık - ölçüm limiti belirlenmesi (LOQ), analiz eşiğinin belirlenmesi (LOD), dinamik alan belirlenmesi (lineer çalışma alanı belirlenmesi) ve pik denge analizinden oluşmaktadır (stokastik eşik) (62,63,64).

3.5.1. Tekrarlanabilirlik

Yöntem optimizasyonunda kullanılan örneklerin aynı laboratuvar ve cihazlarda farklı analistler tarafından farklı bir zamanda çalışılarak benzer sonuçların alınıp alınmadığının belirlenmesidir (62,63,64).

3.5.2. Yeniden üretilebilirlik

Optimizasyonda kullanılan örneklerin farklı bir laboratuvar ve farklı genetik analizör cihazı kullanarak benzer sonuçların alınıp alınmadığının belirlenmesidir (62,63,64).

3.5.3. Duyarlılık (LOQ)

Yöntemin uygulanacağı cihazda tam profil elde edilebilen en düşük hedef DNA konsantrasyonunun tespit etmek üzere yapılır. Dinamik alanın belirlenmesinde kullanılan PCR ürününe ait yürütmeler en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona elde edilen her bir aletin pik yüksekliklerinin ortalaması ile standart sapması bulunarak analiz cihazında tam profil elde edilen en düşük DNA konsantrasyonu tespit edilmiş olur (62,63,64).

3.5.4. Analiz eşiği belirlenmesi (LOD)

Kullanılan cihazın analiz eşiğini belirlemek üzere, negatif kontrol örneklerinin analizi yapılır. Elde edilen en yüksek piklerin RFU (Rölatif Floresan Birimi) değerlerinin ortalaması ile standart sapması hesaplanır (62). Genellikle analiz eşiği aşağıdaki formüllerle hesaplanabilir (65):

$$1- \text{ Analiz eşiği (LOD)} = \text{EBYO} + (3 \times \text{EBPYS})$$

EBYO: En büyük pik yükseklikleri ortalaması (Negatif kontrol çalışmasındaki)

EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

2- Analiz eşiği (LOD): 3 X EBPYS

EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

3- Analiz eşiği (LOD): EBYO+ 4.65 X EBPYS

EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

3.5.5. Dinamik alanın belirlenmesi (lineer çalışma alanı belirlenmesi)

Dinamik alan, analiz cihazının tespit aralığını gösterir ve bu da cihazın tespit edebileceği en düşük ve en yüksek DNA miktarlarını gösterir. Bunun için; DNA miktarı bilinen örnekten çeşitli konsantrasyonlarda dilüsyon (0,0125 ng/ μ l, 0,025 ng/ μ l, 0,05 ng/ μ l, 0,125 ng/ μ l, 0,25 ng/ μ l, 0,5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, 3 ng/ μ l) hazırlanır. PCR rnleri analiz cihazında yürütülür. Elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması alınarak her bir konsantrasyona denk gelen pik yüksekliği ortalaması grafiği çizilerek dinamik alan belirlenir (62,63).

3.5.6. Pik denge analizi (stokastik eşik)

Pik denge analizi için; aynı lokusta bulunan kardeş aleller arasında dengesizliklerin görülmeye başlandığı pik yüksekliği ya da hedef DNA konsantrasyonudur. Bu amaçla amplifiye edilip çoğaltılarak tiplendirilen örneklerde heterozigot gen bölgeleri için alel pik yüksekliklerinin birbirine olan oranları bulunur. Kardeş alel pik yükseklikleri oranı için bir eşik değer elde edilir. Bu oranın hesabında pikler dengeli ve en az $> \% 60$ 'tır (62).

4. Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 28 gonozomal InDel lokusundan (MID 314, MID 378, MID 375, MID377, MID 504, MID 227, MID 313, MID 315, MID 75, MID 76, MID 586, MID 356, MID 383, MID 236, MID 198, MID 395, MID 357, MID 193, MID 243, MID 358, MID 184 MID 111, MID 1566, MID 218, MID 219, MID 220, MID 358, MID 359) oluşan bir multipleks panel geliştirmek için primer seçimi ve tasarımı yapıldı. Bu 28 InDel lokusunu içeren başka bir patenti alınmış bir multipleks panel ya da hazır ticari kit olup olmadığı araştırıldı. Her bir InDel lokusu için önce tek tek PCR optimizasyonu yapıldı 28 InDel lokusu içindeki 8 Y-InDel lokusundan 7'si hem kadın hem erkek DNA'sında amplifiye olduğu için bu lokuslar multipleksten çıkarıldı ve çalışmaya 21 InDel lokusu ile devam edildi. Daha sonra multipleks PCR'nin optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon sonrası oluşturulan multipleksin uygulanabilirliği için validasyon parametreleri çalışıldı. Valide edilmiş InDel panelinin Türkiye popülasyonu için bir ön fikir vermesi amacıyla, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve çalışmaya gönüllü katılmayı kabul eden 100 kişide 21 gonozomal InDel lokusunun genotipleri belirlenerek Arlequin ver 3.5.2.2 ile alel sıklıkları ve popülasyonlar arası uzaklık belirlendi. Ayrıca adli istatistiksel parametreler de powerstat (promega) ile hesaplandı. İş akışı aşağıdaki sırayla yapılmıştır.

1. Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini
2. 28 InDel lokusunun ayrı ayrı PCR optimizasyonu
3. 21 InDel Lokusunun 2 multipleks olarak optimizasyonu
4. 21 InDel Lokusunun 2 multipleks olarak validasyonu
5. 100 kişiye ait DNA örneğinde 21 InDel lokusunun 1. ve 2. multipleksinin çoğaltılması (PCR), elektroforezi ve tiplendirilmesi
6. 21 InDel lokusuna ait Türkiye'deki alel sıklıklarının belirlenmesi ve karşılaştırılması

4.1.Kullanılan Kit, Kimyasal ve Cihazlar

DNA İzolasyonunda Kullanılan Kitler:

- PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific)
- COPAN FG-4N6FLOQSWABS (Applied Biosystems -Thermo Fisher Scientific)

DNA Miktar Ölçümünde Kullanılan Kitler:

- Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™- Thermo Fisher Scientific)

PCR'de Kullanılan Kimyasallar ve Kitler:

- Floresan (6FAM, VIC ve NED) ile işaretli primerler (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific)
- GML PCR Master Mix (PCR Mix ve Taq Polimeraz) (GML AG)

Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar:

- Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific),
- GeneScan™ - 500 LIZ™ Size standard (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific)

Kullanılan Cihazlar

- Vorteks - Harmony Mixer Uzusio - VTX-3000L
- Termomikser - Wealtec Corp.
- Fluorometre cihazı - Qubit ® (Invitrogen™- Thermo Fisher Scientific)
- Automate Express DNA İzolasyon Robotu (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific)

- Isı döngü cihazı (PCR) - GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific)
- Genetik Analizatör - ABI 310 (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific)

4.2.Gonozomal InDel Lokuslarının Seçimi

Kimliklendirmeye yönelik multipleks bir InDel paneli (kiti) oluşturmak üzere konuyla ilgili literatürde çalışılmış tüm InDel lokusları, alınmış patentler ve hazır ticari kitler araştırıldı. Bu çalışmaların dışında kalan InDel lokusları Marshfield diallelic indels database - Mamalian Genotyping Service veri bankasından (<https://www3.marshfieldclinic.org/mgs/>) aşağıdaki kriterlere uygun şekilde seçildi (6,7) (Tablo 1).

- Her bir lokusun farklı populasyonlarda çalışılmış olduğuna,
- Gen sıklıklarının ve heterozigot oranlarının dengeli olmasına,
- Beklemiş ve eser örneklerde başarılı sonuç alınabilmesi için DNA üzerinde daha az yer kaplayan dolayısıyla amplicon uzunlukları küçük boyutta olan (60-160 bp) InDel'lerin olmasına,
- Multipleks PCR için primerlerin GC oranları, TM değerleri, primerler arası komplementerlik olup olmamasına,
- Adli kimliklendirme yapan ve her laboratuvarında mevcut olan genetik analizör cihazlarında (Applied Biosystems 310, 3130, 3130 xl, 3500, 3500xl, 3730,3730 xl), oluşturulan multipleks panelin analiz edilebilmesi için bu cihazların yazılımlarında tanımlı bulunan floresans boyalar ile işaretlenmesine ve benzer büyüklükteki InDel lokusları farklı floresans boya ile işaretlenmesine dikkat edildi.

Seçilen primerlerin NCBI (Biyoteknoloji Bilgileri Ulusal Merkezi (National Center for Biotechnology Information) genom veri bankalarından genomda başka bir bölgeye ya da diğer primerlere komplementer olup olmadığının kontrolü yapıldı.

4.2.1. Patent-kit taraması

Seçilen InDel lokuslarına ait daha önceden alınmış patent – hazır ticari kit olup olmadığı Google patents (<https://patents.google.com/>) ve TR-Espacenet (<https://tr.espacenet.com/>) internet adreslerinde tarandı. InDel’lerle ilgili patenti alınmış 3 çalışma bulunmuş olup bu çalışmalar aşağıda verilmiştir.

- CN 101956005 B patent numarası ile “Fluorescently-labeled insertion/deletion (InDel) genetic polymorphism locus composite amplification system and application thereof” isimli 35 InDel bölgelerini kapsayan bir multipleks panel patenti bulunmaktadır. Burada patenti alınan 35 InDel bölgesi otozomal kromozomlar üzerinde yer almaktadır.
- CN 103468800 B patent numarası ile “Forensic medicine composite detection kit based on 20 multiple insertion/deletion genetic markers” isimli 20 InDel bölgesini kapsayan bir multipleks panel patenti bulunmaktadır. Patenti alınan 20 InDel bölgesi, otozomal kromozomlar üzerinde yer almaktadır.
- CN 104131067 B patent numarası ile “X-InDel site of a fluorescent compound labeled amplified system and its application translated from” isimli 18 X kromozomu üzerinde yer alan InDel bölgelerini kapsayan bir multipleks panel patenti bulunmaktadır. Burada patenti alınan 18 InDel bölgesi, X kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Ancak Bu çalışmadaki bölgelerden tamamen farklı bölgelerdir.

Yukarıdaki patent taramalarına ek olarak;

- Qiagen firmasına ait olan “Investigator DIPplex Kit” isimli InDel kiti bulunmaktadır. Bu kit 30 otozomal InDel lokusunu kapsamaktadır.
- Genomica Markasına ait “InDelPlex INDEL Polymorphism Detection Kit” isimli 38 otozomal InDel bölgesi içeren multipleks kit bulunmaktadır.

Bu tezde yukarıda patenti alınmış ve ticari olarak üretilmiş InDel kitlerinin paneli dışındaki lokusların seçilmiş olduğu teyit edildi.

4.3.Gonozomal InDel Lokuslarının Multipleks Dizayını

X ve Y kromozomuna özgü seçilen InDel lokuslarının X ve Y olarak 2 ayrı multiplekste çalışılması planlandı (Tablo 1 ve 2). Benzer büyüklükte olan lokusların, elektroforezde çakışmaması için farklı floresans boya ile işaretlendi.

Tablo 1. İlk seçilen Y-InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, PCR primer baz dizisi ve floresans boya seçimi

No	MID Kodu	RefSNP Cluster ID (rs)	Kromozom	InDel Dizisi	Amplikon Büyüklüğü	Forward /Reverse PCR Primer	Floresans Boya
1	314	rs25538	Y	TTG	74-77	F: 5' TCTGCTTGATCAATTCTGCT 3' R: TTCTGGAGCTAAAAACATGC 3'	6-FAM
2	378	rs25602	Y	GATA	105-109	F: 5' GTCCCATAGGCATAAGAGT 3' R: ACCCACAGCATCATGTTATT 3'	6-FAM
3	375	rs25599	Y	AAG	143-146	F: 5' ATGCCAAAAGTGAAAATCTG 3' R: TTCTTTTCTCAGTGAAAACCTT 3'	6-FAM
4	377	rs25601	Y	AAATC A	100-106	F: 5' AAGGCATAGCATGATGACTC 3' R: 5' ACAAACACTAGCATCAGGC 3'	VIC
5	504	rs140793	Y	ACA	132-135	F: 5' TGTCACCAGGTACTAGTGCA 3' R: 5' AAAGCAACCACTTACCTAATG 3'	VIC
6	227	rs16664	Y	AA	148-150	F: 5' TATCAAACATTACTCCCCCA 3' R: 5' AATCTGGCACTCTGAAAATTT 3'	VIC
7	313	rs25537	Y	ATG	134-137	F: 5' GGCTGCACATTAACATTACC 3' R: 5' GGATGCATATTGGTATCACC 3'	NED
8	315	rs25539	Y	AA	144-146	F: 5' TGGTGCTATGAATATGCATG 3' R: 5' AGTTACTGTGGAAATCGGC 3'	NED

Tablo 2. İlk seçilen X-InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, PCR primer baz dizisi ve floresans boya seçimi

No	MID Kodu	Ref SNP Cluster ID (rs)	Kromozom	InDel Dizisi	Amplikon Büyüklüğü	Forward /Reverse PCR Primer	Floresans Boya
1	75	rs16367	X	AAGT	82-86	F: 5' CCCATTTGTGATAATCTGCT 3' R: 5' TGTTC AATATATCCTTTTTGGG 3'	6-FAM
2	76	rs16368	X	AGA	99-102	F: 5' TGAATGTTTCGTGTCTTTTCC 3' R: 5' GAGAACTCATGGCCTAATCA 3'	6-FAM
3	586	rs1160845	X	AGG	117-120	F: 5' GATTGGTGAAGCCAATTATG 3' R: 5' GTCACACATGGGACATTTTT 3'	6-FAM
4	356	rs25580	X	CTT	127-130	F: 5' TTGGGTACAGCTTCTGAGTC 3' R: 5' CCACGTGAGAAATGATCAAT 3'	6-FAM
5	383	rs25607	X	AG	147-149	F: 5' ATTAGCGTTTGTGTCCACAT 3' R: 5' TAGCATCAGTACTTCAGGGG 3'	6-FAM
6	236	rs16673	X	AATT	62-66	F: 5' GCCATTTTGCTAATTGTTTTCTA 3' R: 5' AACATGCTACGCTAGGACAA 3'	VIC
7	198	rs16637	X	CAACCA AT	96-104	F: 5' ATGAAGTCTGGTATTGGCTTT 3' R: 5' TCAGCTGCAACAGTTATCAA 3'	VIC
8	395	rs39781711 6	X	CTT	115-118	F: 5' CCAACAAGCTTTGTCAATTC 3' R: 5' TTGTCATAACACAGATGAGCA 3'	VIC
9	357	rs25581	X	TGAGA	128-133	F: 5' TCCTCAAAGTGGCAAGTTAC 3' R: 5' TTGCACATTCTAGCTGAACA 3'	VIC
10	193	rs16632	X	AATA	101-105	F: 5' TTTGAAAACACAGAAATGCA 3' R: 5' CTGAAGTGACCATTGACCTC 3'	NED
11	243	rs16680	X	TGT	119-122	F: 5' GATGTTTTGTGGATTAGCCA 3' R: 5' TTTTGGAGCACTTAACCAAG 3'	NED
12	358	rs25582	X	CCTAGC C	135-142	F: 5' TGAACATCACCCTGTCTGA 3' R: 5' TAGGCAAGTCCCTAGAGACA 3'	NED
13	184	rs16460	X	TTC	163-166	F: 5' GGAAAAGGTCCACTATAGCC 3' R: 5' TGTGAGACTCAAATGAGACTGTA 3'	NED
14	111	rs16397	X	NNN	132-135	F: 5' AGGCAGGGAATCAGTTAGT 3' R: 5' CCCTTCTCCCTAGTTACCA 3'	6-FAM
15	1566	rs2307762	X	GTATTG A	92-99	F: 5' TTGTTTTATAAAGACGAATGCT R: 5' GAGTGCCATTTTTTCAGAGAA 3'	NED
16	218	rs39782541 7	X	AA	149-151	F: 5' CACATCCAACCTCCTCAAATC 3' R: 5' TGAAGTGGTTTCTAACAGCTG 3'	NED
17	219	rs16656	X	TT	127-129	F: 5' CTAATGGAAGCCTGACTGA 3' R: 5' CAACCAGATGATGCTAACCT 3'	NED
18	220	rs16657	X	GTGA	143-147	F: 5' AACTGTTAATGCCAAAGACA 3' R: 5' TCCACTTCTTCATTCTCTCG 3'	VIC
19	358	rs25582	X	CCTAGC C	135-142	F: 5' TGAACATCACCCTGTCTGA 3' R: 5' TAGGCAAGTCCCTAGAGACA 3'	NED
20	359	rs25583	X	AA	134-136	F: 5' AATTTTGCTGTGAACCTGAA 3' R: 5' GGCACATGATGCCAATATAT 3'	VIC

4.4.Yöntemin Uygulanması

4.4.1. Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini

4.4.1.1.DNA Örneklerinin Hazırlanması

DNA örnekleri için; aralarında akrabalık bulunmayan, sağlıklı ve çalışmaya onay veren (Ek1: Aydınlatılmış Onam Formu) İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü çalışanları, öğrencileri ve gönüllülerden oluşan toplam 100 kişiden alınan ağız içi sürüntü örnekleri kullanıldı. Örneklerin DNA izolasyonu PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific) kullanılarak Automate Express DNA izolasyon robotu ile yapıldı (66).

4.4.1.2.AutoMate Express™ DNA izolasyon robotu ve PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit ile DNA izolasyonu

1. Eppendorf tüpe konan ağız içi sıvı üzerine 500 µl Lysis Buffer + 5 µl 1M DTT eklenerek 40 dakika, 70°C’de 800 rpm hızda çalkalandı.
2. Automate Express cihazının protokol kartı etiketi sola bakacak şekilde yerine yerleştirildi ve cihaz açıldı.
3. Menü ekranında 1’e basarak PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit protokolüne uygun menü seçildi.
4. Cihazın kapağını yukarı doğru iterek kartuş şasisi içinden çıkarıldı. PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit içinden çıkan 13 adet boş reaktif kartuşu (PrepFiler® Express Cartridges) kartuş şasisine yüklendi. Bunu yapmak için her bir reaktif kartuşunu ok yönünde reaktif kartuşu yerine tam oturana kadar kanal boyunca kaydırıldı.
5. Kartuş şasisi cihaz içindeki yerine yerleştirildi. Daha sonra tüp şasisi cihazdan çıkarıldı. AutoMate Express™ Tips and Tip Holders (pipet uçları) tüp şasisindeki T1 ve T2 yazılı kuyucuklara (26 kuyucuk) yerleştirildi.

6. PrepFiler® Elution Tubes (elüsyon tüpleri), tüp şasisindeki E yazılı kuyucuklara (13 kuyucuk) yerleştirildi.
7. Lysis Buffer ile inkübasyona bırakılan DNA örnekleri (tüm sıvı- 500 µl), PrepFiler® Sample Tubes (örnek tüpü)'e pipet yardımıyla aktarıldı. Tüpler örnek numarasına göre kodlandı ve tüp şasisinde S yazılı kuyucuklara (13 kuyucuk) yerleştirildi.
8. Tüp şasisi E yazılı kuyucuklar önde olacak şekilde cihazdaki yerine yerleştirildi.
9. Kartuş şasisi ve tüp şasisi yerleştirildiğinden emin olduktan sonra cihaz kapağı kapatıldı ve Start (başla) tuşuna basıldı.
10. 30 dakika sonunda cihazın kapağı yukarı doğru itelerek açıldı ve tüp şasisindeki elüsyon tüpleri (DNA izolatları) kapakları kapatılarak -20 ° C de muhafaza edildi.

4.4.1.3. İzolatların DNA miktar tayini

DNA'sı izole edilen örneklerin DNA miktar tayini Qubit® Fluorometer - Invitrogen™ cihazında, Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) kullanılarak yapıldı (67). İşlem basamakları aşağıda verildiği şekilde yapıldı:

4.4.1.4.The Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA İzolatlarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

1. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 0,5 ml'lik steril tüpler hazırlandı.
2. Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan Quant-iT™ dsDNA HS reaktifi, ölçümü yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT™ working çözeltisi ile seyreltildi. Tüplere bu çözeltiden 200 µl' lik karışımlar hazırlandı.
3. Hazırlanan karışımdan standartların ölçüleceği tüplere 190 µl, örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µl konuldu.

4. İki standarttan da 10 µl alınarak, 190 µl 'lik karışım içeren tüplere eklendi.
5. İncelenecek örneklere ait izolatlardan da 1 µl alınarak, 199 µl'lik karışım içeren tüplere eklendi.
6. Elde edilen karışımlar kısa süre vorteksenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi.
7. Öncelikli olarak standartların Qubit™ fluorometer cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek aletin kalibrasyonu sağlandı.
8. Kalibre edilen Qubit™ fluorometer cihazında sırasıyla örnekler ölçülerek miktarları not edildi.

4.4.2. 28 InDel lokusunun ayrı ayrı ve 2 multipleks olarak PCR optimizasyonu

4.4.2.1. Primerlerin Tm değerlerinin belirlenmesi

Öncelikle her bir InDel lokusunun Primer-Blast programında GC oranlarına göre TM değerleri hesaplandı ve PCR'deki annealing derecesi belirlendi. En yüksek 58 °C olduğu gözlemlendi. Buna bağlı olarak PCR döngü koşullarında annealing sıcaklığının en az 58 ° C olması gerektiği belirlendi. (Tablo 3).

Tablo 3. Gonozomal InDel primerlerinin Tm sıcaklığı ve GC oranları

Primer No	MID Kodu	TM Sıcaklığı (° C) - PCR Annealing Sıcaklığı	GC Oranları (%)
1	75	53,5	40
2	76	54,5	45
3	229	55,5	45
4	586	54,5	40
5	356	57	50
6	111	56,5	50
7	236	57	45
8	383	56,5	50
9	198	55,5	40
10	395	55,5	40
11	357	56	45
12	359	54	40
13	220	56	45
14	227	54	40
15	1566	54	40
16	193	56	50
17	243	54	40
18	219	55,5	45
19	218	56,5	45

Primer No	MID Kodu	TM Sıcaklığı (° C) - PCR Annealing Sıcaklığı	GC Oranları (%)
20	358	57	50
21	184	57	50
22	313	55,5	45
23	314	55,5	40
24	315	55,5	48
25	375	54,5	35
26	377	56,5	45
27	378	56,5	50
28	504	58	50

4.4.2.2. Primer konsantrasyonları

Genellikle PCR’de primer konsantrasyonunun 1-5 pmol/ µl arasında olması gerekir (49,57,58). Bu sebeple her bir lokus için primer konsantrasyonu ortalama 3 pmol/ µl olarak belirlendi. Bunun için 100 pmol/ µl olan stok primerler sulandırılarak 3 pmol/ µl olacak şekilde sulandırıldı.

4.4.2.3. PCR bileşenleri ve döngü programı

PCR için hazır multipleks PCR karışımı (GML PCR Master Mix) kullanıldı. PCR döngü koşulları ve bileşenleri (Tablo 4) Her bir lokus ayrı ayrı kendi Tm oranına bağlı bağlanma sıcaklığında (Tablo 3) ve genel PCR döngü koşullarına bağlı kalarak GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems) ısı döngü cihazında çoğaltıldı (Tablo 5) (6,7,8,68).

Tablo 4. InDel lokuslarının ayrı ayrı optimizasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µL) Her bir örnek için
GML PCR Mix	7,5
GML Taq Pol. (5U/µL)	0,2
Primer	2
Distile su	4,3
Genomik DNA (5-10 ng/µl)	1
Total	15

Tablo 5. InDel lokuslarının ayrı ayrı optimizasyonunda kullanılan PCR döngü koşulları

Aşama	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre
1	Denatürasyon	95	10 dak.
2	Amplifikasyon (25döngü)	95	40 sn
		54-60	45 sn
		72	40 sn
3	Uzama	60	30 dak.
4		4	süresiz

4.4.2.4. Elektroforez aşaması

PCR ürünleri Applied Biosystems marka 310 Genetik Analizör Cihazında yürütüldü. Örneklerin elektroforetik analizi; elektroforeze hazırlanması, yüklenmesi ve verilerin analizi olmak üzere üç temel adımdan oluşmaktadır.

- **Elektroforeze Hazırlık:**

10 µl Formamide, 0,5 µl LIZ Size standart ve 1 µl PCR ürünü elektroforeze yüklenmek için hazırlandı.

- **Örneklerin Elektroforez Cihazına Yüklenmesi ve verilerin analizi:**

Örnekler 36 cm kapillerle, POP-4 polimeri kullanarak GS STR POP4 (1ml) G-5 modülünde; enjeksiyon 3kV ve 5sn, yürütme voltajı 15 kV, 60°C’de 30 dakika yürütüldü. Elektroforezden sonra örnekler GeneMapper® programında analiz edilerek genotip tayini yapıldı. Her bir lokusun Del ve Ins (minör ve majör) alel boyutları (alel aralık skalası) Marshfield diallelic indels database - Mamalian Genotyping Service veri bankasındaki (<https://www3.marshfieldclinic.org/mgs/>) verilere göre genetik analizör cihazında her lokusun genotiplendirmesi yapıldı.

7 Y-InDel lokusunun (MID313, MID314, MID315, MID375, MID377, MID378, MID504) elektroforegramında hem kadın hem de erkek DNA örneklerinde pikler gözlemlendi (Şekil 20, 21, 22, 23). Bu lokuslar cinsiyet ayırımında kullanılamayacağı için 7 Y-InDel lokusu

çalışmadan çıkarıldı ve çalışmaya 1 Y-InDel ve 20 X-InDel olmak üzere toplam 21 InDel bölgesi ile devam edildi.

4.4.2.5. 21 InDel lokusunun multipleks PCR optimizasyonu

21 InDel lokusunun ayrı ayrı PCR'si yapıp başarılı sonuçlar elde ettikten sonra, 2 multipleks olacak şekilde PCR optimizasyonu yapıldı (Tablo 6a, 6b). Bunun için 3 pmol/µl olan primerlerden eşit hacimde alınarak multipleks primer karışımı oluşturuldu. PCR bileşenleri ve döngü programı ilk başta aynı şekilde uygulandı. Daha sonra çoklu lokus sebebiyle PCR mix ve Taq polimeraz miktarları, PCR döngü sayısı ve primer konsantrasyonları artırıldı (Tablo 7, 8, 9).

Tablo 6a. 1. Multipleks için dizayn edilen InDel Lokuslarının kromozomal yerleşimi, primer baz dizisi ve kullanılan floresans boya

Multipleks 1							
No	MID Kodu	RefSNP Cluster ID (rs)	Kromozom	Del/Ins Dizisi	Amplikon Büyüklüğü	Forward /Reverse PCR Primer	Floresans Boya
1	76	rs16368	X	AGA	99-102	F: 5' TGAATGTCGTGTCTTTTCC 3' R: 5' GAGAACTCATGGCCTAATCA 3'	6-FAM
2	229	rs16666	X	CTTTTA	104-110	F: 5' TGTGTAATTCATACCCCAGG 3' R: 5' TTCCAGTTAAAGAGGGACCT 3'	6-FAM
3	356	rs25580	X	CTT	127-130	F: 5' TTGGGTACAGCTTCTGAGTC 3' R: 5' CCACGTGAGAAATGATCAAT 3'	6-FAM
4	236	rs16673	X	AATT	62-66	F: 5' GCCATTTTGCTAATTGTTTTCTA 3' R: 5' AACATGCTACGCTAGGACAA 3'	VIC
5	198	rs16637	X	CAACCAA T	96-104	F: 5' ATGAAGTCTGGTATTGGCTTT 3' R: 5' TCAGCTGCAACAGTTATCAA 3'	VIC
6	357	rs25581	X	TGAGA	128-133	F: 5' TCCTCAAACCTGGCAAGTTAC 3' R: 5' TTGCACATTCTAGCTGAACA 3'	VIC
7	227	rs16664	Y	AA	148-150	F: 5' TATCAAACATTACTCCCCCA 3' R: 5' AATCTGGCACTCTGAAAATTT 3'	VIC
8	193	rs16632	X	AATA	101-105	F: 5' TTTGAAAACACAGAAATGCA 3' R: 5' CTGAAGTGACCATTGACCTC 3'	NED
9	243	rs16680	X	TGT	119-122	F: 5' GATGTTTTGTGGATTAGCCA 3' R: 5' TTTTGGAGCACTTAACCAAG 3'	NED
10	218	rs39782 5417	X	AA	149-151	F: 5' CACATCCAACCTCCTCAAATC 3' R: 5' TGAAGTGGTTTCTAACAGCTG 3'	NED
11	184	rs16460	X	TTC	163-166	F: 5' GGAAAAGGTCCACTATAGCC 3' R: 5' TGTGAGACTCAAATGAGACTGTA 3'	NED

Tablo 6b. 2. Multipleks için dizayn edilen InDel Lokuslarının kromozomal yerleşimi, primer baz dizisi ve kullanılan floresans boya

2. Multipleks							
No	MID Kodu	Ref SNP Cluster ID (rs)	Kromozom	Del/Ins Dizisi	Amplikon Büyüklüğü	Forward /Reverse PCR Primer	Floresans Boya
1	75	rs16367	X	AAGT	82-86	F: 5' CCCATTTGTGATAATCTGCT 3' R: 5' TGTTC AATATATCCTTTTTGGG 3'	6-FAM
2	586	rs1160845	X	AGG	117-120	F: 5' GATTGGTGAAGCCAATTATG 3' R: 5' GTCACACATGGGACATTTT 3'	6-FAM
3	111	rs16397	X	NNN	132-135	F: 5' AGGCAGGAAATCAGTTAGT 3' R: 5' CCCTTCTCCCTAGTTACCA 3'	6-FAM
4	383	rs25607	X	AG	147-149	F: 5' ATTAGCGTTTGTGTCCACAT 3' R: 5' TAGCATCAGTACTTCAGGGG 3'	VIC
5	395	rs3978171 16	X	CTT	115-118	F: 5' CCAACAAGCTTTGTCAATTC 3' R: 5' TTGTCATAACACAGATGAGCA 3'	VIC
6	359	rs25583	X	AA	134-136	F: 5' AATTTTGCTGTGAACCTGAA 3' R: 5' GGCACATGATGCCAATATAT 3'	VIC
7	220	rs16657	X	GTGA	143-147	F: 5' AACTGTTAATGCCAAAGACA 3' R: 5' TCCACTTCTTCTCTCTCG 3'	VIC
8	1566	rs2307762	X	GTATTG A	92-99	F:5' TTGTTTTTATAAAGACGAATGCT R: 5' GAGTGCCATTTTTCAGAGAA 3'	NED
9	219	rs16656	X	TT	127-129	F: 5'CTAAATGGAAGCCTGACTGA 3' R: CAACCAGATGATGCTAACCT 3'	NED
10	358	rs25582	X	CCTAGC C	135-142	F: 5' TGAACATCACCCTGTCTGA 3' R: 5' TAGGCAAGTCCCTAGAGACA 3'	NED

Tablo 7. InDel lokuslarının multipleks optimizasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µL) Her bir örnek için
GML PCR Mix	10
GML Taq Polimeraz (5U/µL)	0,5
Primer karışımı	5
Genomik DNA (1ng/µl)	1
Distile Su	3,5
Total Hacim	20

Tablo 8. InDel lokuslarının multipleks optimizasyonunda kullanılan PCR döngü koşulları

Aşama	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre
1	Denatürasyon	95	10 dak.
2	Amplifikasyon (29 döngü)	95	40 sn
		60	45 sn
		72	40 sn
3	Uzama	60	30 dak.
4		4	süresiz

Tablo 9. Optimize edilen multipleks primer konsantrasyonları

	Primer No	MID Kodu	Primer Konsantrasyonu (pmol/µl)
1. Multipleks	1	76	6
	2	229	4
	3	356	4
	4	236	4
	5	198	4
	6	357	4
	7	227	6
	8	193	8
	9	243	6
	10	218	6
	11	184	8
	Primer No	MID Kodu	Primer Konsantrasyonu (pmol/µl)
2. Multipleks	1	75	7
	2	586	12
	3	111	4
	4	383	5
	5	395	4
	6	359	8
	7	220	4
	8	1566	12
	9	219	4
	10	358	8

4.4.3. 21 InDel lokusunun 2 multipleks olarak validasyonu

InDel multipleks panelin validasyonu için; analiz eşiği, dinamik alan, duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik basamakları uygulandı.

4.4.3.1. Analiz eşiği

Genetik analizör cihazının analiz eşiğini belirlemek için, analiz edilen 10 negatif kontrol örneğinde gözlenen en yüksek piklerin RFU (*Rölatif Floresan Unit*) değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Analiz eşik değeri hesabı için aşağıdaki formül kullanıldı:

Analiz eşiği (LOD): 3 X EBPYS (EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması)

4.4.3.2. Dinamik Alan

Dinamik alan için; DNA miktarı bilinen örnekten 9 adet dilüsyon (0,0125 ng/μl, 0,025 ng/μl, 0,05 ng/μl, 0,125 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,5 ng/μl, 1 ng/μl, 2 ng/μl, 3 ng/μl) hazırlandı. Her bir konsantrasyon için 5 örnek olmak üzere 45 PCR yapıldı. PCR ürünleri 310 Genetik Analizör Cihazında yürütüldü. Her bir konsantrasyon için elde edilen 5 örneğin pik yükseklikleri ortalamaları da alındı. Her bir konsantrasyona karşı elde edilen pik yüksekliği ortalamasına ait grafik çizilerek multipleksin çalıştığı optimum dinamik alan belirlendi

4.4.3.3. Duyarlılık

Dinamik alan çalışmasında belirlenen en düşük iki konsantrasyona ait 5 örnekten elde edilmiş olan her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması ve standart sapması ile aşağıdaki formülden konsantrasyona bağlı duyarlılık değerleri hesaplandı.

Duyarlılık Değerleri LOQ = Pik yükseklikleri ortalaması – (3 x pik yükseklikleri standart sapması)

4.4.3.4. Stokastik Eşik

Duyarlılık sonucu belirlenmiş tam profil elde edilen en düşük 2 konsantrasyondaki DNA örneklerinde heterozigot InDel bölgeleri için kardeş alel pik yüksekliklerinin birbirine oranı

ve standart sapması hesaplandı. Sonra aşağıdaki formülle kardeş alel pik yükseklikleri oranı eşik değeri (Stokastik eşik) belirlendi.

Stokastik Eşik Değeri = Kardeş Alel Pik Yükseklikleri Oranlarının Ortalaması – (3 X Kardeş Alel Pik Yükseklikleri Oranlarının Standart Sapması)

Daha sonra kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşılık gelen küçük pik yüksekliklerini veren grafik ve kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşılık gelen DNA konsantrasyonu grafikleri çizildi.

4.4.3.5. Tekrarlanabilirlik

Bunun için sonuçları alınmış 5 örneğin aynı laboratuvar ve cihazlarda farklı analist tarafından farklı bir zamanda çalışması sağlandı.

4.4.3.6. Yeniden üretilebilirlik

Bunun için sonuçları alınmış 5 örneğin farklı bir laboratuvar ve cihazlarda (Applied Biosystems marka ABI3130 Genetik Analizör cihazı) farklı analist tarafından farklı bir zamanda çalışması sağlandı.

4.4.4. 100 kişiye ait DNA örneğinde 21 InDel 1. ve 2. multipleksinin çoğaltılması (PCR), elektroforezi ve tiplendirilmesi

Rızaları alınmış toplam 100 kişiden alınan ağız içi sürüntü örneklerinin 21 InDel lokusunun 2 multiplekste optimizasyon ve validasyona uygun olarak PCR'si yapıldı (Tablo 7,8,9). Daha sonra optimizasyonda kullanılan aynı yürütme koşullarında (bkz syf 42, 4.4.2.4. Elektroforez aşaması) Applied Biosystems 310 Kapiller Elektroforez cihazında yürütülerek analiz edildi ve genotipler belirlendi.

4.4.5. 21 InDel lokusuna ait Türkiye'deki alel sıklıkları

21 gonozomal InDel lokusunun optimizasyonu ve validasyonu tamamlandıktan sonra 100 kişiden toplanmış örneklerde bu lokusların genotipleri belirlenerek, Türkiye popülasyonuna ait ön fikir vermesi amacıyla Arlequin ver 3.5.2.2 programı kullanılarak alel frekansları belirlendi.

Populasyonlar arası alel frekanslarının karşılaştırılması için Mammalian Genotyping Service - Marshfield Clinic InDel veri bankasında yer alan lokuslara ait çalışılmış farklı popülasyonların alel frekansları kullanıldı. Yine bu frekanslar kullanılarak Arlequin ver 3.5.2.2'de popülasyonlar karşılaştırıldı. Ayrıca adli istatistiksel parametreler de powerstat (promega) programları kullanılarak; Ayrım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (TPI) hesaplandı.

5. Bulgular

Bu çalışmada, multipleks InDel kit oluşturmak üzere X kromozomu üzerinde bulunan 20 InDel lokusu (MID 76, MID 229, MID 356, MID 236, MID 198, MID 357, MID 193, MID 243, MID 218, MID 184, MID 75, MID 586, MID 111, MID 383, MID 395, MID 359, MID 220, MID 1566, MID 219, MID 358) ve Y kromozomu üzerinde bulunan 1 adet InDel (MID 227) lokusu ile birlikte toplam 21 InDel lokusunun 2 multiplekste optimizasyonu ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Valide edilen 21 InDel multipleks panelinin Türkiye popülasyonundaki gen sıklığını araştırmak ve bir ön fikir edinmek amacıyla, çalışmaya gönüllü katılmayı kabul eden, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve sağlıklı 100 kişiden alınan ağız içi sürüntü- sıvap örnekleri kullanılarak gen sıklıkları belirlenmiştir.

5.1. Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini

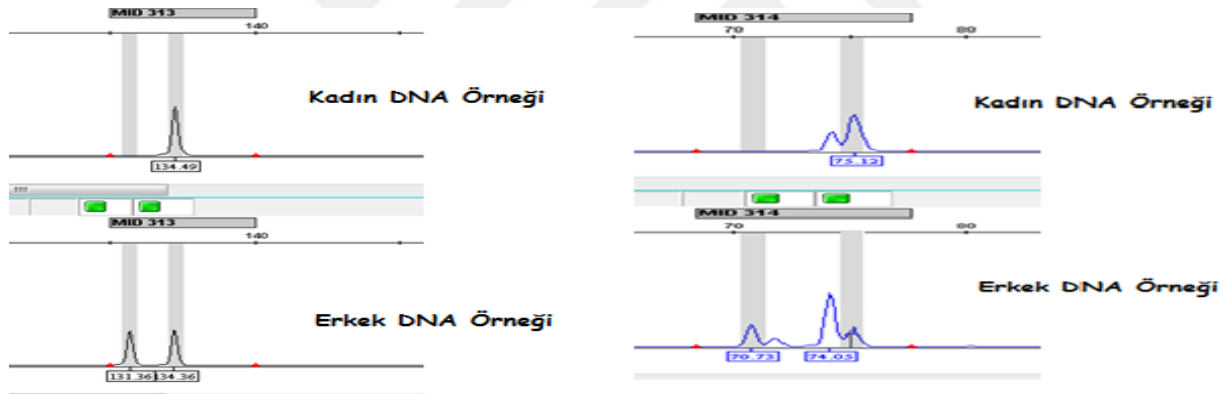
Çalışmada kullanılmak üzere 100 kişiden alınan ağız içi sürüntü örneklerinin tümünden DNA izolasyonu yapılarak DNA miktarları ölçüldü (Tablo 10). Bir örneğin DNA miktarı cihazın ölçüm değerlerinin altında kalmıştır.

Tablo 10. Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarı

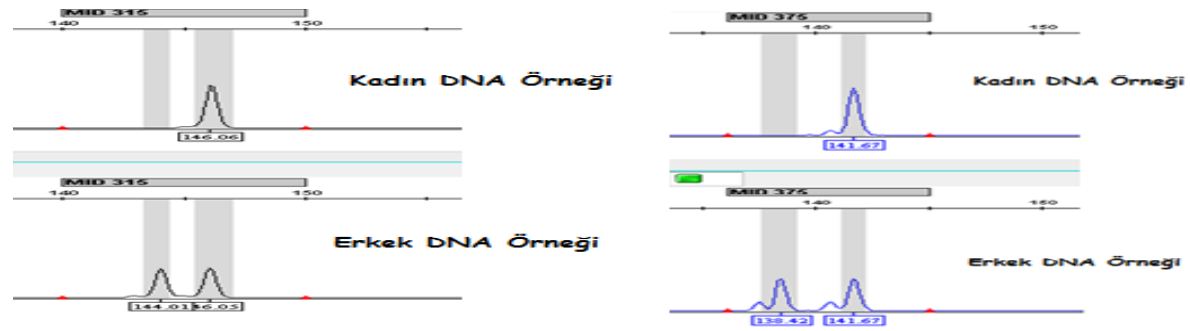
Sıra	DNA Örnek Kodu	DNA Miktarı (ng/μl)	Sıra	DNA Örnek Kodu	DNA Miktarı (ng/μl)
1	C1	5,8	51	T4	7,5
2	C3	14,5	52	T5	1,78
3	C4	9	53	T6	4,31
4	C5	1,6	54	T7	12,3
5	C6	14,4	55	T8	6,35
6	C7	6	56	T9	1,54
7	C8	7,5	57	T10	2,18
8	C10	15,5	58	T11	9,87
9	C11	12	59	T12	10,3
10	C12	8,2	60	T13	8,8
11	C13	31,8	61	T14	1,18
12	C14	8,7	62	T15	45
13	C15	14,6	63	T16	3,77
14	C16	45	64	T17	1,65
15	C17	47	65	T18	22,1
16	C18	16,6	66	T19	2,5
17	C20	9,8	67	T20	22
18	C22	6,6	68	T21	6,81
19	C32	10,5	69	T22	6,62
20	C33	8,3	70	T23	10,3
21	C35	11,5	71	T24	10,7
22	C37	14	72	T25	3,88
23	BX	1,07	73	T26	11,5
24	BB	1	74	T27	5,7
25	B9	8	75	T28	17,4
26	B19	42	76	T29	1,25
27	25K	8	77	T30	1,66
28	BA	31	78	T31	1,4
29	BÖ	1,17	79	T32	6,6
30	3K	31	80	T33	4
31	5K	44	81	T34	3,68
32	6K	41	82	T35	1,97
33	7K	24,5	83	T36	3,67
34	8K	61	84	T37	3,91
35	10K	64	85	T38	3,35
36	11K	62	86	T39	12,8
37	12K	88	87	T40	1,97
38	13K	71	88	T41	5,1
39	14K	57	89	T42	1,2
40	15K	69	90	T43	0,7
41	17K	33,8	91	T44	1,46
42	19K	84	92	T45	3,7
43	20K	81	93	T46	0,99
44	21K	21	94	T47	1,3
45	22K	66	95	T48	1,9
46	23K	50	96	T49	3,9
47	24K	12	97	T50	16,2
48	26K	36	98	T51	8,6
49	T1	2,61	99	T52	1,7
50	T3	2,85	100	T2	-

5.2. 21 InDel lokusunun ayrı ayrı PCR optimizasyonu ve analizi

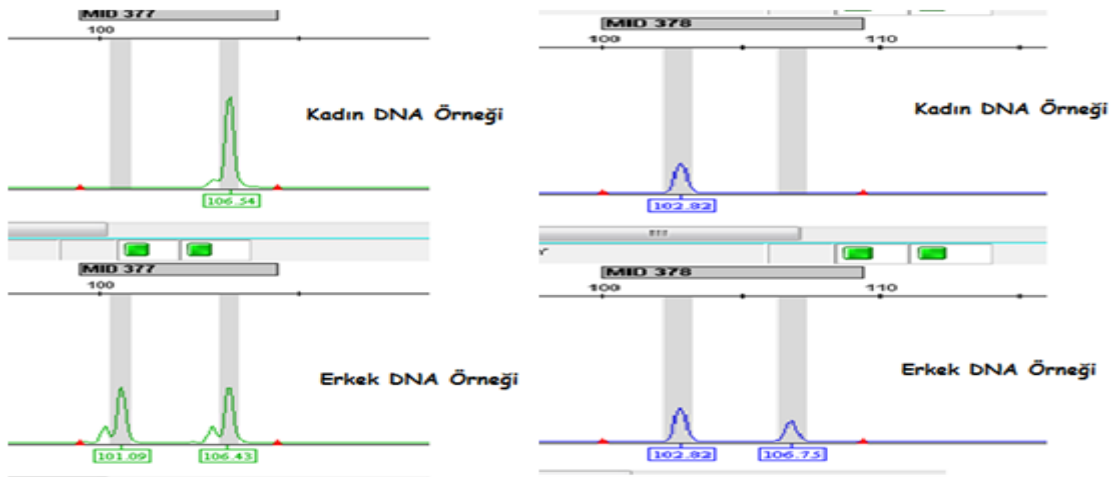
Her bir InDel lokusu PCR ile çoğaltılıp analiz edilerek optimize edildi. Her bir lokus için primer konsantrasyonu ortalama 3 pmol/ µl olarak belirlenmiş ve Tm sıcaklıklarına (Rui 2012) göre belirlenen PCR protokolü ile amplifikasyon yapıldı (Tablo 4,5). 7 Y-InDel lokusunda (MID313, MID314, MID315, MID375, MID377, MID378, MID504) hem kadın hem de erkek DNA örneklerinde PCR'de amplifikasyon görüldüğünden (Şekil 4, 5, 6, 7) ve cinsiyet ayırımında kullanılamayacağı için bu lokuslar çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya 1 Y-InDel ve 20 X-InDel olmak üzere toplam 21 InDel bölgesi ile devam edildi. Tek tek analiz edilen lokuslara ait elektroforegramlar Şekil 8-28'te verilmiştir.



Şekil 4. MID313 ve MID314 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü



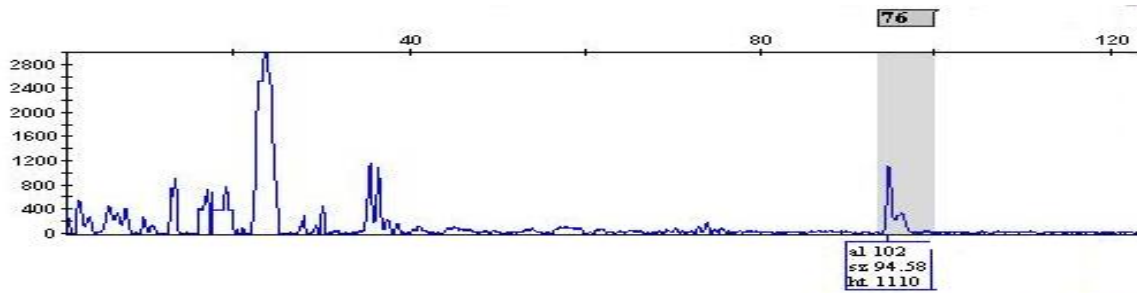
Şekil 5. MID315 ve MID375 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü



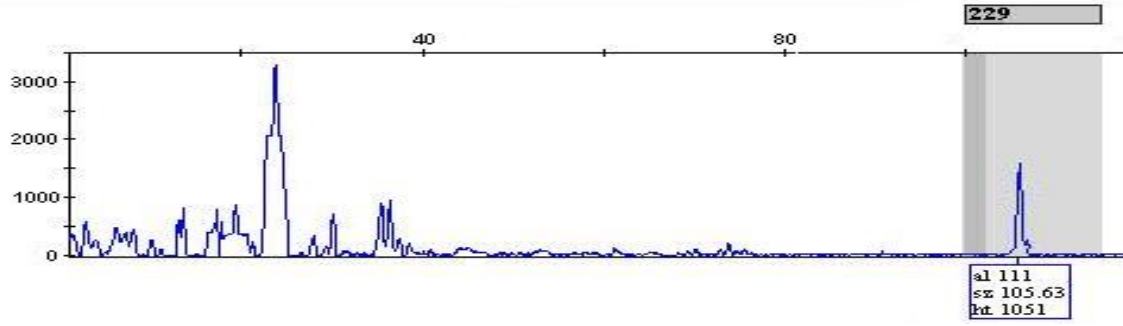
Şekil 6. MID377 ve MID378 Y-InDel lokuslarının kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü



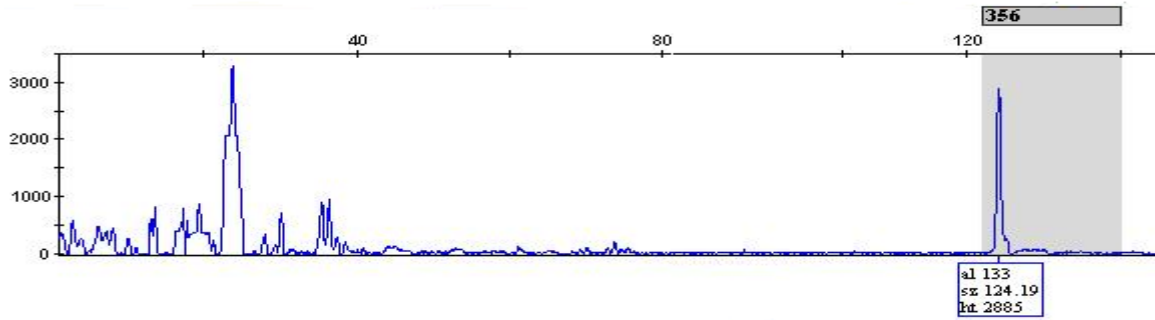
Şekil 7. MID 504 Y-InDel lokusunun kadın ve erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü



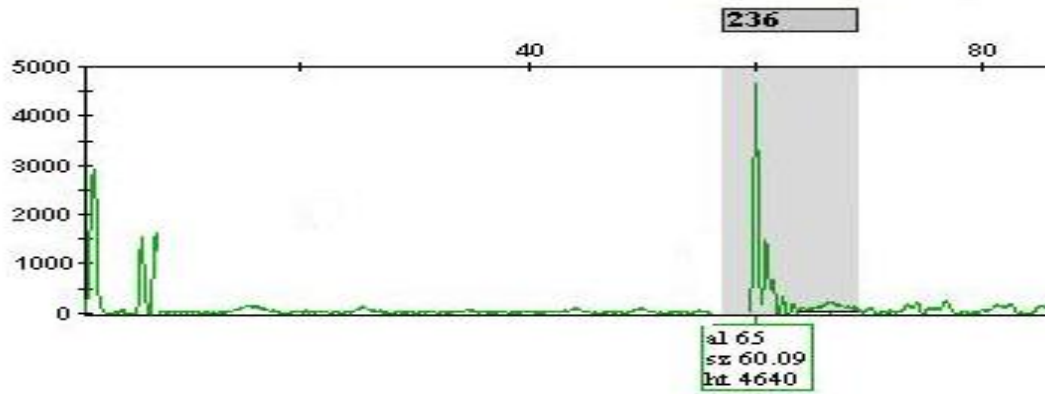
Şekil 8. MID 76 lokusuna ait elektroforegram



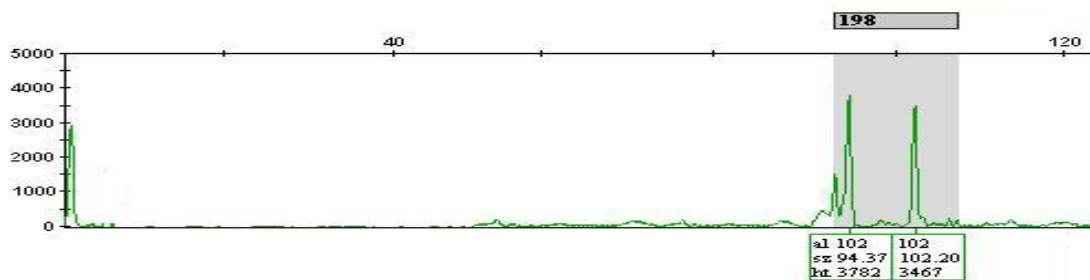
Şekil 9. MID 229 lokusuna ait elektroforegram



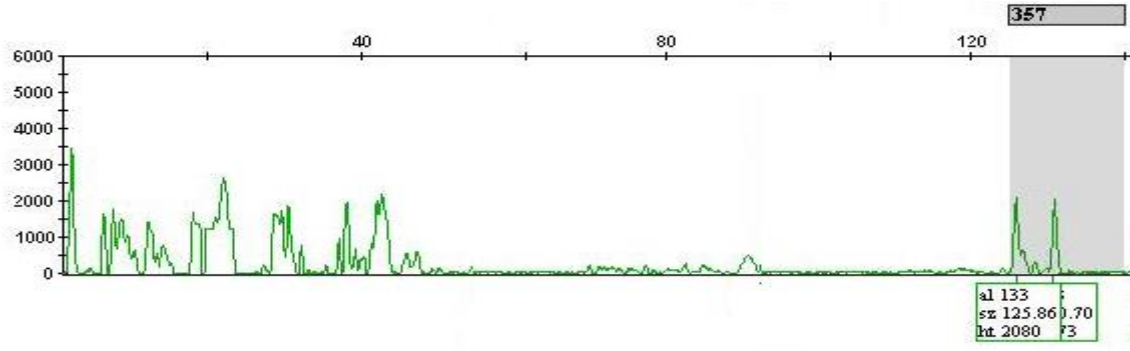
Şekil 10. MID 356 lokusuna ait elektroforegram



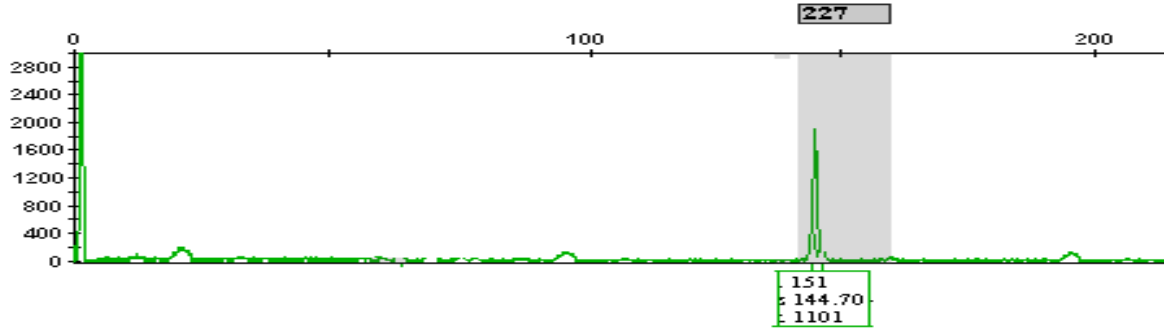
Şekil 11. MID 236 lokusuna ait elektroforegram



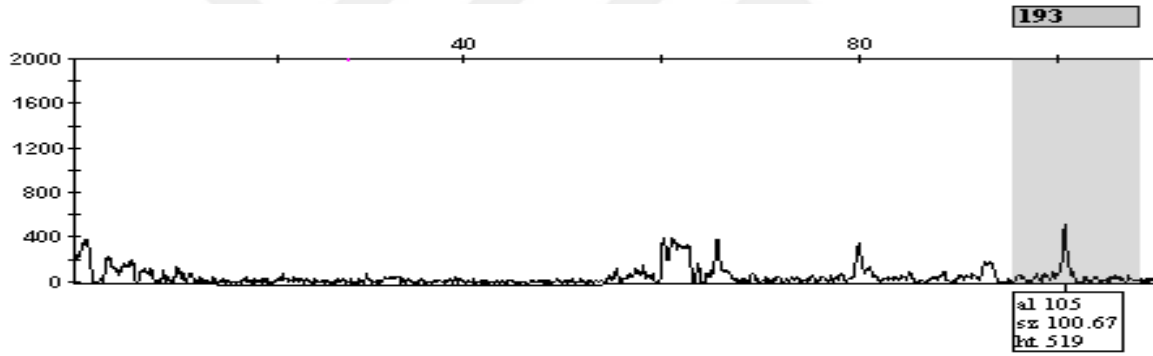
Şekil 12. MID 198 lokusuna ait elektroforegram



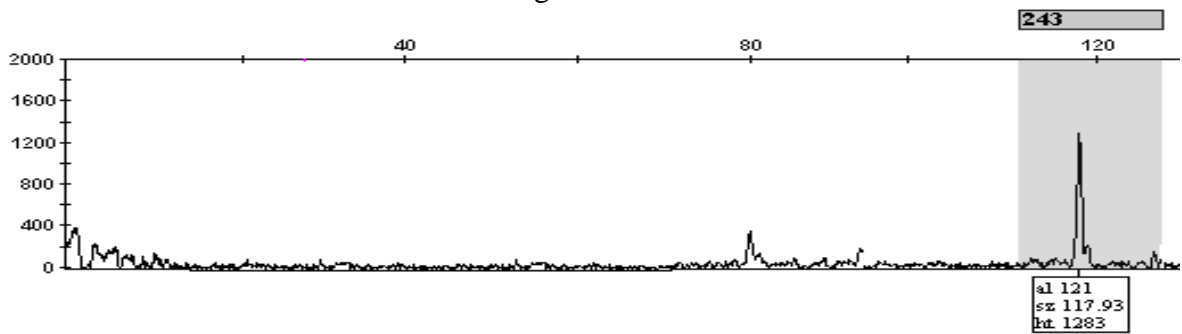
Şekil 13. MID 357 lokusuna ait elektroforegram



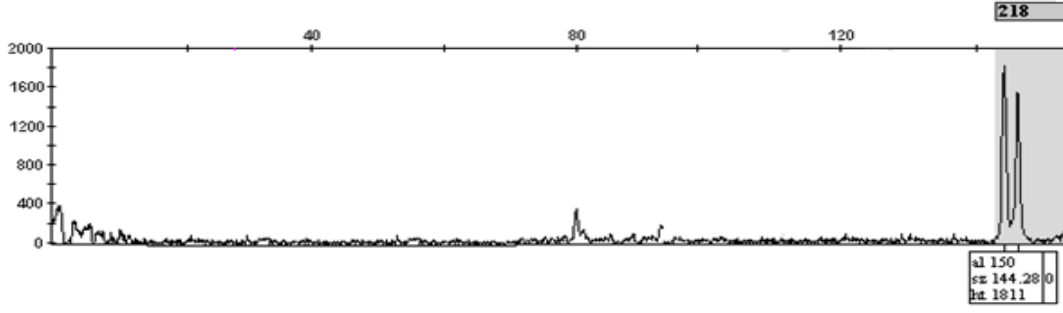
Şekil 14. MID 227 lokusuna ait elektroforegram



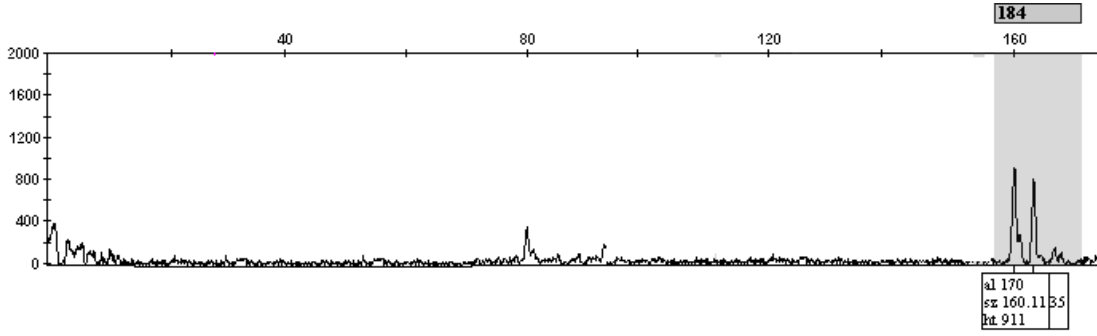
Şekil 15. MID 193 lokusuna ait elektroforegram



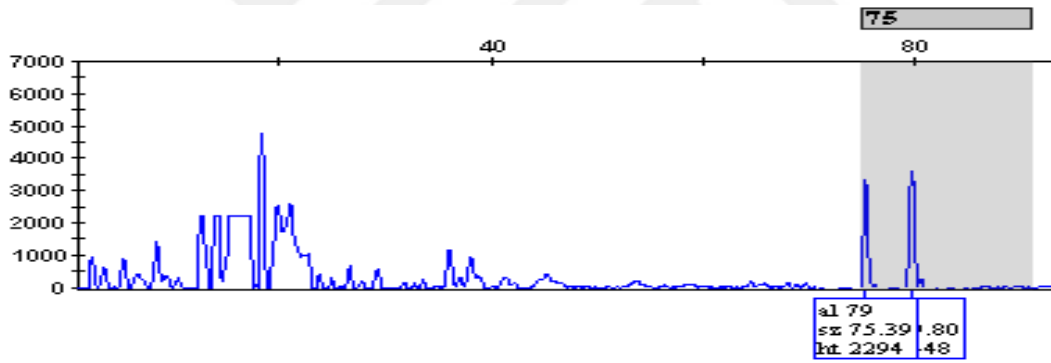
Şekil 16. MID 243 lokusuna ait elektroforegram



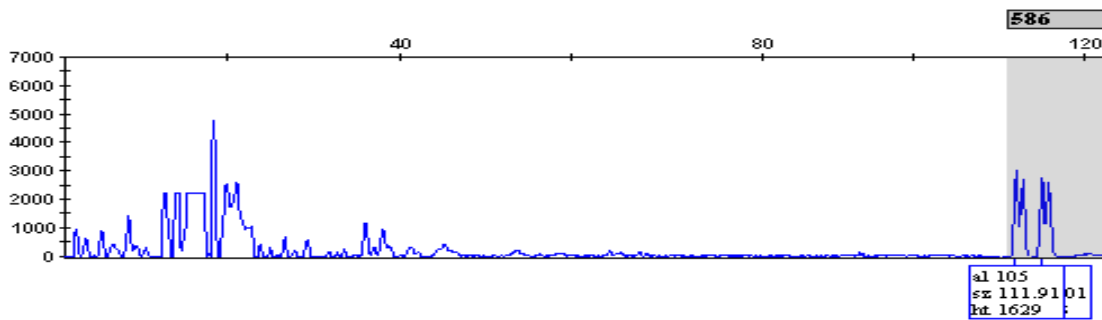
Şekil 17. MID 218 lokusuna ait elektroforegram



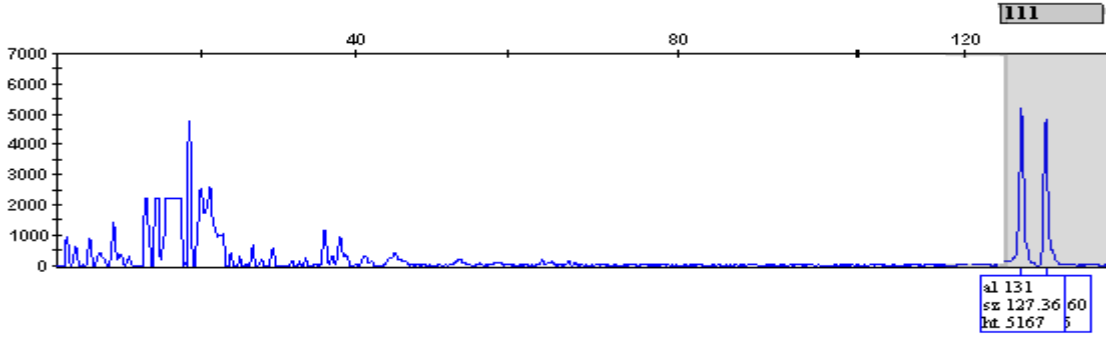
Şekil 18. MID 184 lokusuna ait elektroforegram



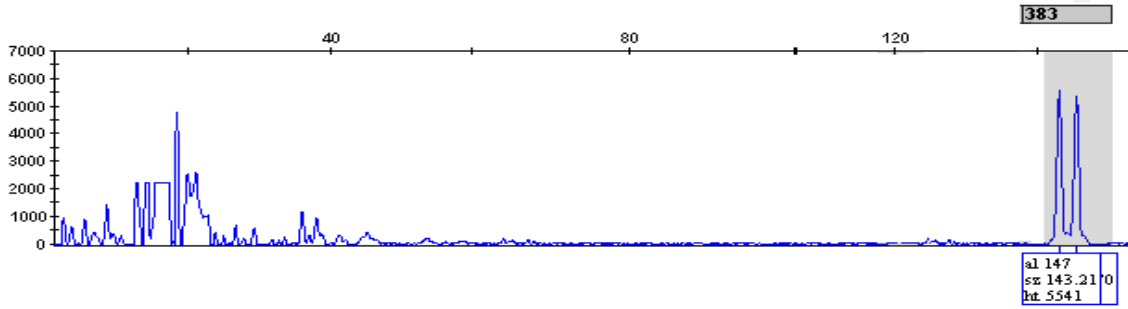
Şekil 19. MID 75 lokusuna ait elektroforegram



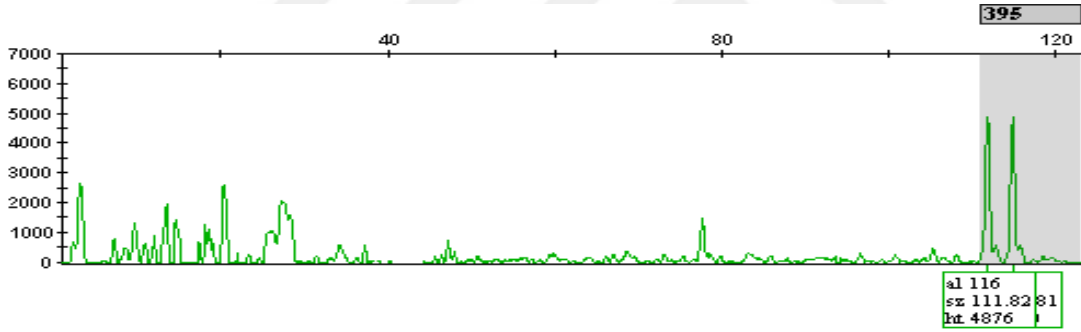
Şekil 20. MID 586 lokusuna ait elektroforegram



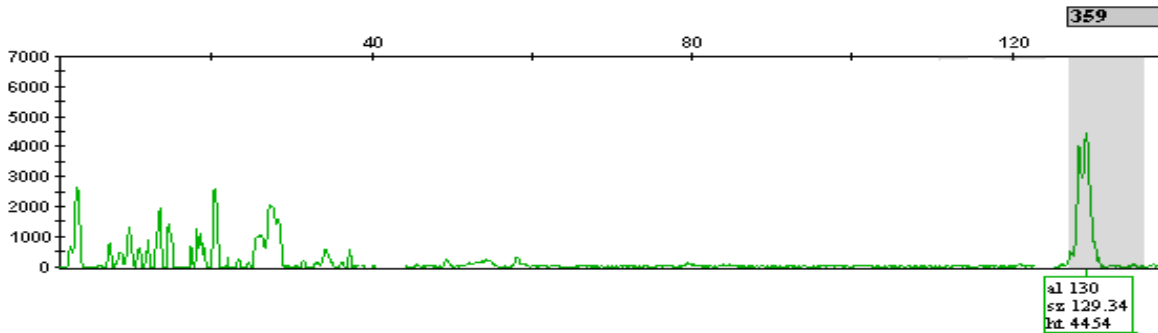
Şekil 21. MID 111 lokusuna ait elektroforegram



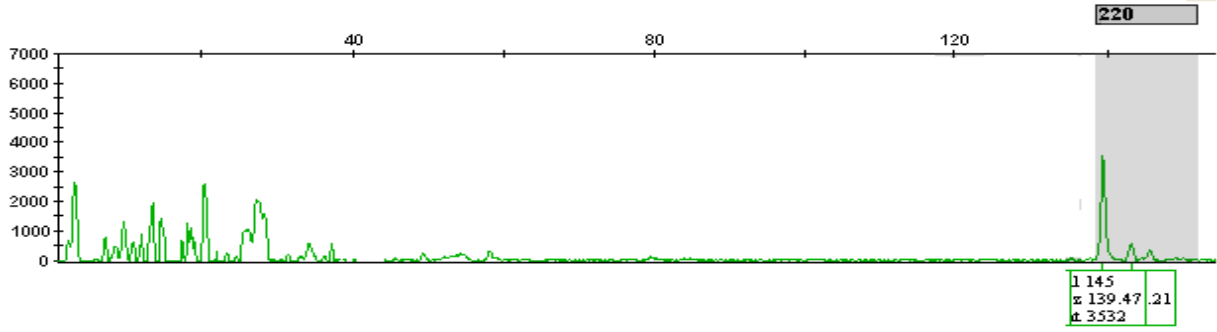
Şekil 22. MID 383 lokusuna ait elektroforegram



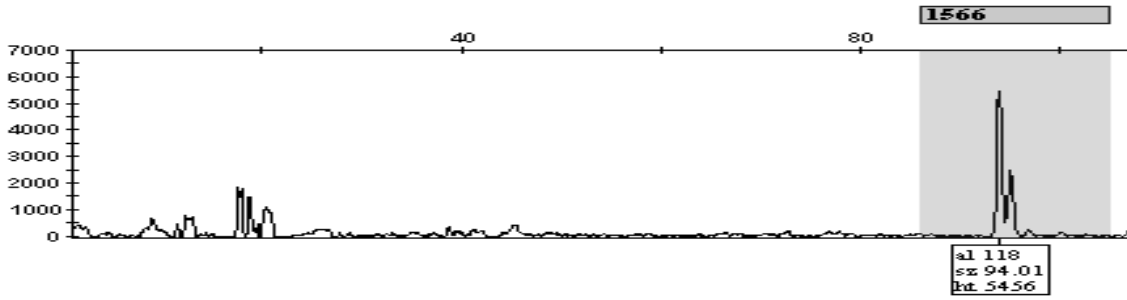
Şekil 23. MID 395 lokusuna ait elektroforegram



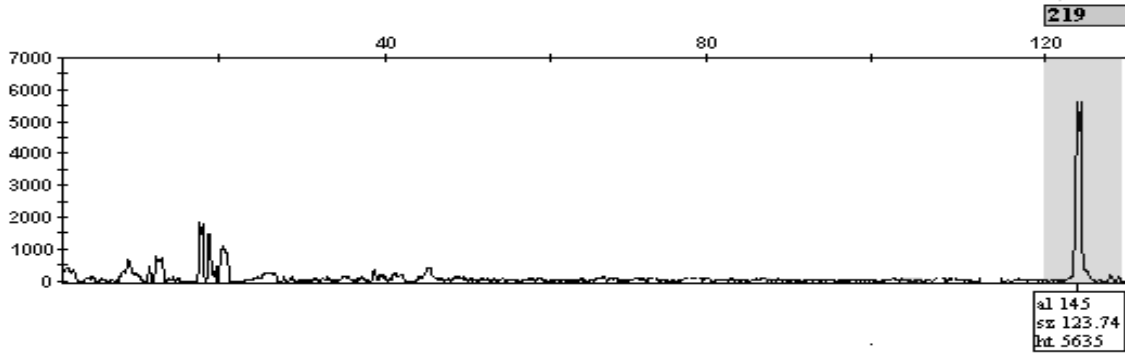
Şekil 24. MID 359 lokusuna ait elektroforegram



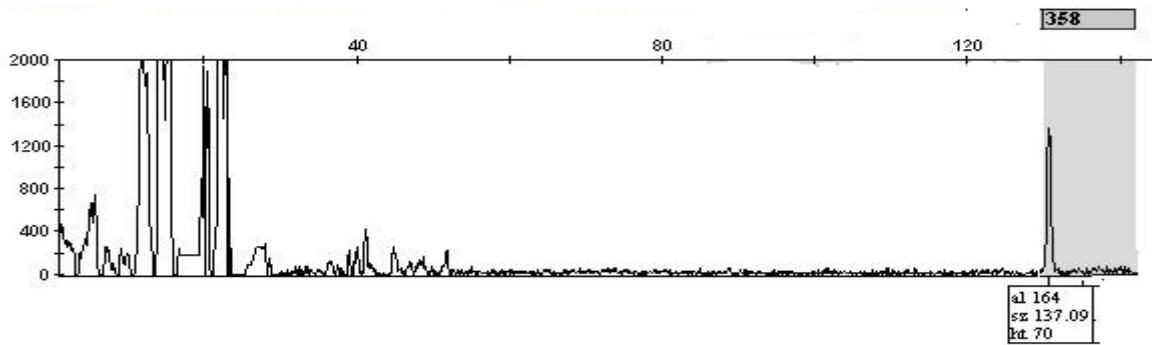
Şekil 25. MID 220 lokusuna ait elektroforegram



Şekil 26. MID 1566 lokusuna ait elektroforegram



Şekil 27. MID 219 lokusuna ait elektroforegram



Şekil 28. MID 358 lokusuna ait elektroforegram

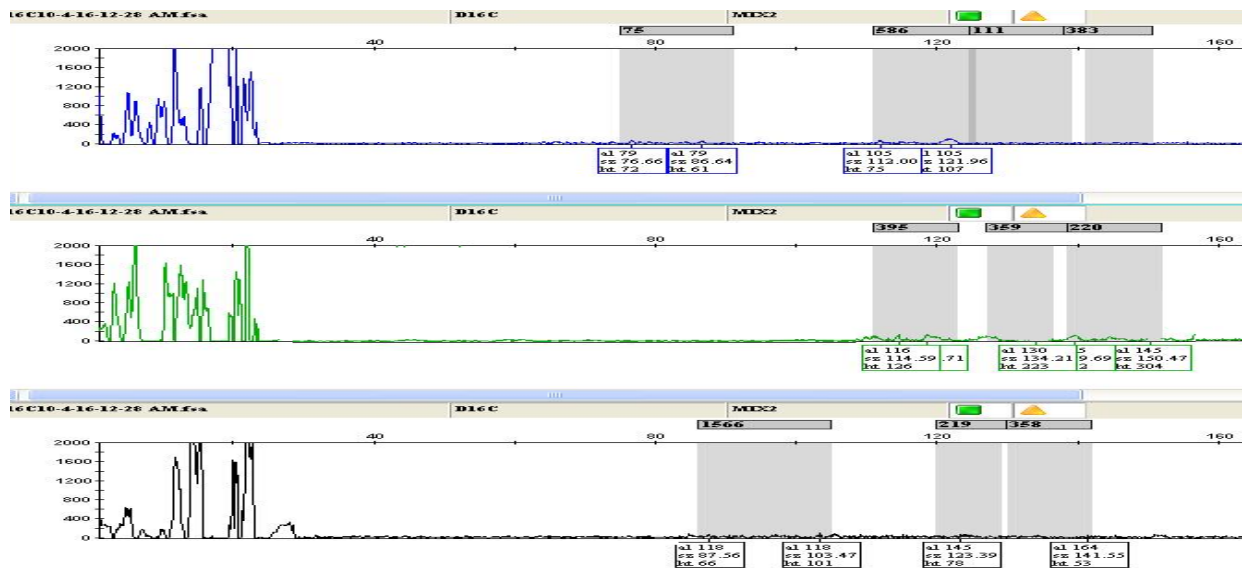
5.3. 21 InDel lokusunun ayrı ayrı ve 2 multipleks olarak PCR optimizasyonu

5.3.1. PCR bileşenlerinin miktarları

Bu çalışmada hazır ticari PCR karışımı olan GML PCR Master Mix kullanılmış olup tekli lokus PCR'sinde 7,5 µL PCR mix ve 0,2 µl Taq polimeraz kullanılmıştır. Ancak multipleks olarak PCR'de aynı miktarda bileşenler kullanıldığında hiç pik gözlemlenmediğinden (Şekil 29) bu miktarların multipleks PCR için yetersiz olduğu tespit edildi ve 10 µL PCR mix ve 0,5 µl Taq polimeraz olarak artırıldı (Tablo11).

Tablo 11. Tekli PCR ve multipleks PCR'de kullanılan PCR bileşenleri

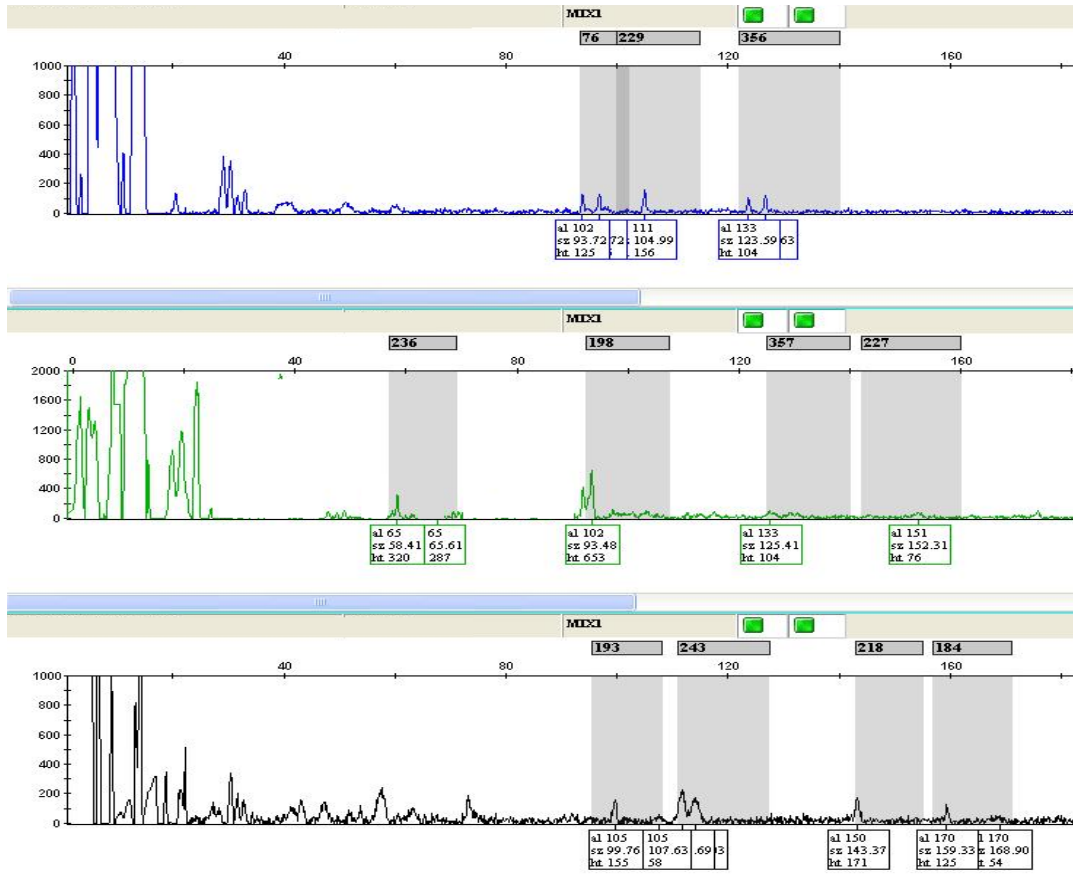
Bileşenler	Tekli PCR'de Kullanılan Hacim (µL) Her bir örnek için	Multipleks PCR'de Kullanılan Hacim (µL) Her bir örnek için
GML PCR Mix	7,5	10
GML Taq Pol. (5U/µL)	0,2	0,5
Primer	2	5
Distile su	4,3	3,5
Genomik DNA (5-10 ng/µl)	1	1
Total	15	20



Şekil 29. 7,5 µL PCR mix ve 0,2 µl Taq polimeraz kullanımı sonucu elde edilen elektroforegram

5.3.1.1. PCR döngü koşulları

Her bir InDel lokusunun tekli PCR’de kullanılan PCR bileşenlerinin miktarları artırılmasına rağmen PCR döngü sayısı 25 olarak yapıldı. Ancak multipleks PCR için 25 döngü sayısı yeterli olmadığı için alelik kayıplar gözlemlendi (Şekil 30). Bu sebeple döngü sayısı 29’a çıkarıldı.

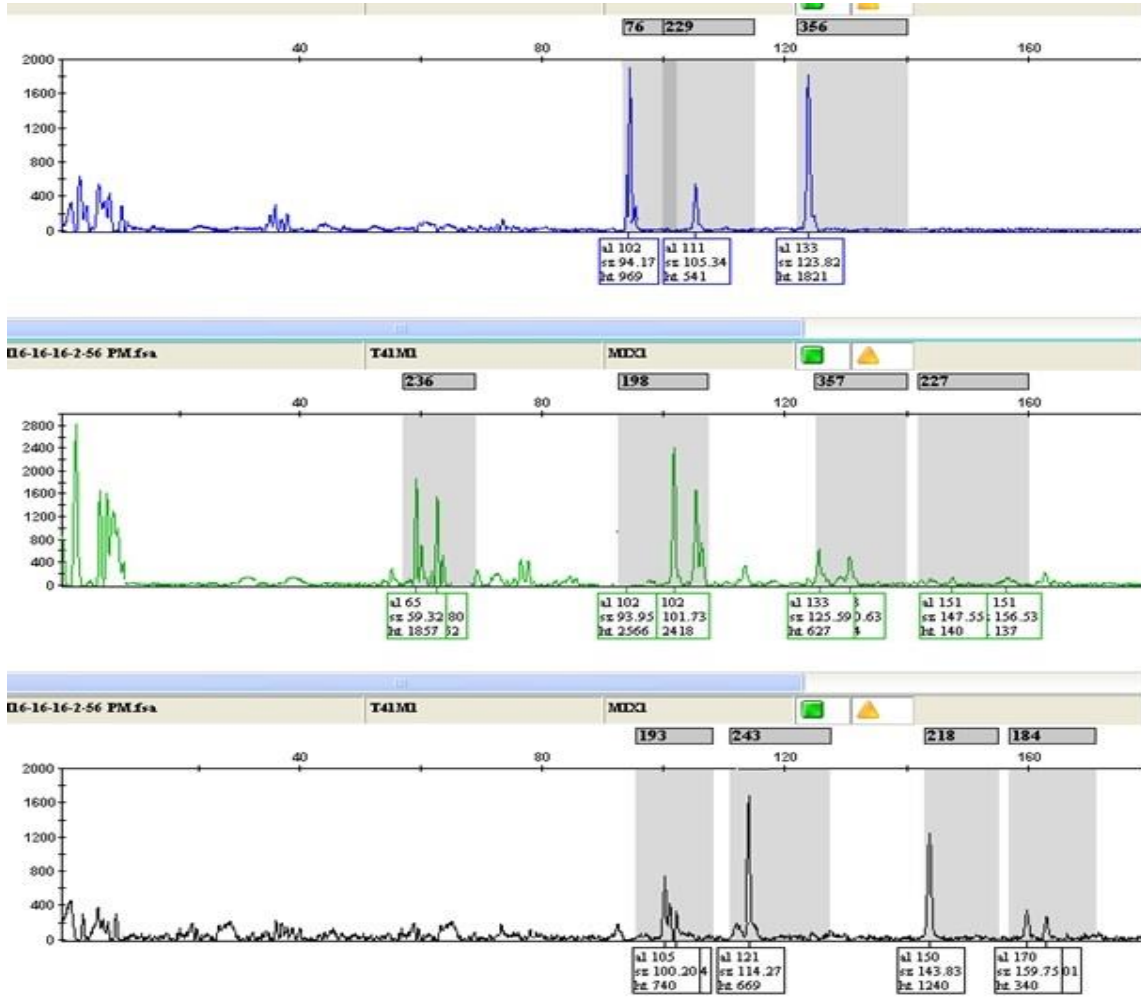


Şekil 30. Multiplekslerin 25 döngü sayısında PCR’inde görülen alelik kayıpları

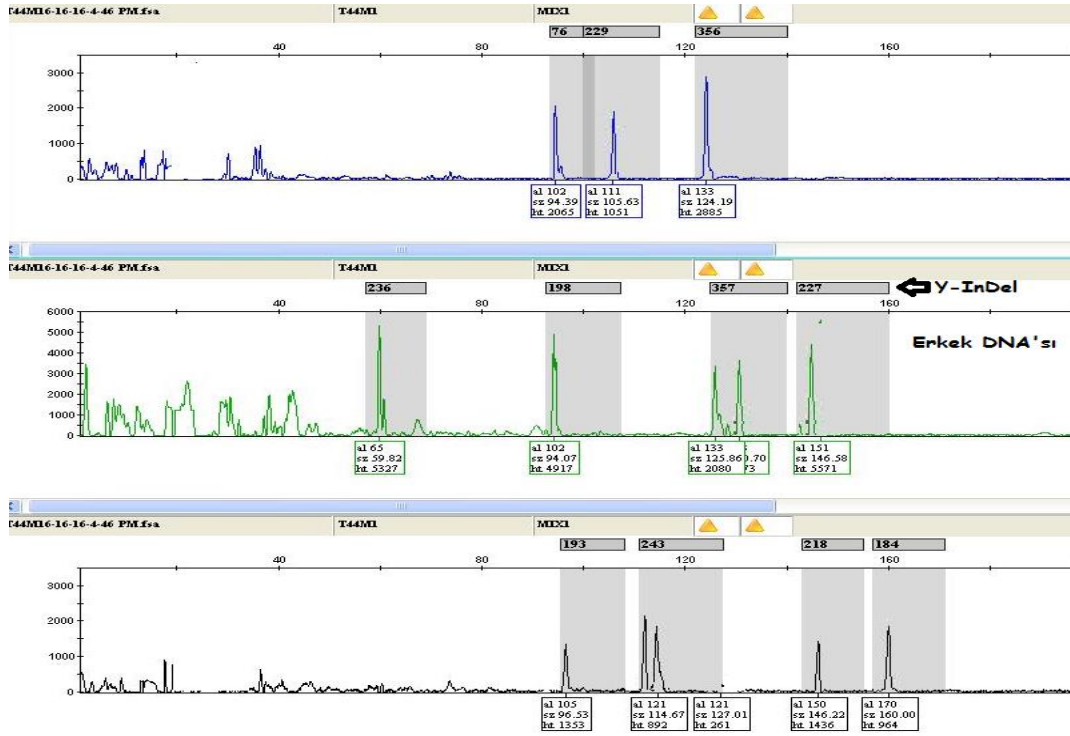
5.3.1.2. Primer konsantrasyonları

21 InDel lokusunun ayrı ayrı PCR’inde her lokus için 3 pmol/µl konsantrasyonunda primer kullanıldı ve tüm lokusların PCR’lerinde 2 ayrı multipleksinde de aynı oranda ve eşit hacimde primer karışımı kullanılmasına rağmen bazı lokuslarda alelik kayıplar ve alel pik dengesizliği gözlemlenmiştir (Şekil 31). Bu nedenle primer konsantrasyonları elektroforegramdaki pik

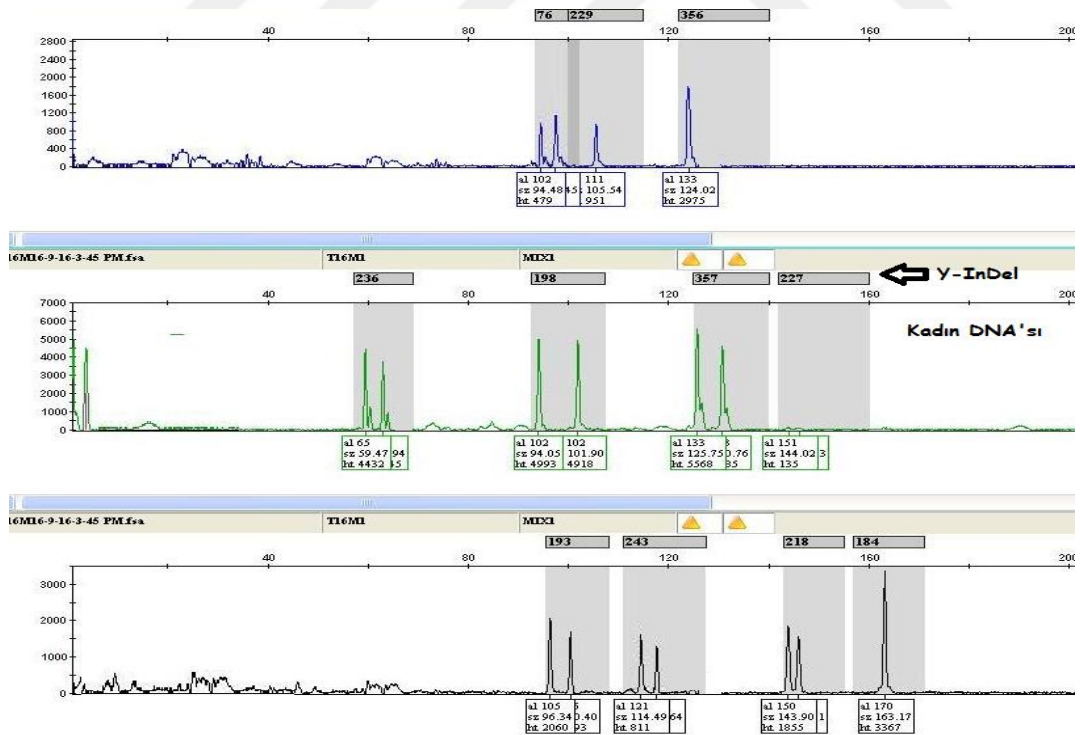
yüksekliklerine göre yeniden ayarlanarak 21 lokus 2 multiplekste optimize edilmiştir. (Tablo 9) (Şekil 32, 33, 34).



Şekil 31. 3 pmol/ µl primer konsantrasyonlarında multipleks PCR’de gözlenen alelik dengesizlikler.



Şekil 32. PCR koşulları optimize edilmiş 1. mütiplekse ait erkek DNA'sı elektroforegramı



Şekil 33. PCR koşulları optimize edilmiş 1.multiplekse ait kadın DNA'sı elektroforegramı



Şekil 34. PCR koşulları optimize edilmiş multipleks 2'ye ait elektroforegram

5.4. 21 InDel Lokusunun 2 multipleks olarak Validasyonu

21 gonozomal InDel lokusu 1 ve 2. multipleks panelin validasyonu için; analiz eşiği, dinamik alan, duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik basamakları uygulandı.

5.4.1. Analiz eşiği

Analiz edilen 10 negatif kontrol örneğinde gözlenen en yüksek piklerin RFU (Rölatif Floresan Unit) değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak:

Multipleks 1 için analiz eşiğinin 103,53 RFU; **Multipleks 2 için** 80,586 RFU olduğu saptandı (Tablo 12).

Tablo 12. Analiz eşik değeri

Multipleks 1			
Negatif Kontrol Çalışmasında elde edilen Pik Yükseklikleri (RFU)	Pik Yükseklikleri Ortalaması (RFU)	Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin Standart Sapması (EBPYS)	Analiz Eşiği (LOD) (RFU)
177	151,75	34,51	103,53
183			
137			
110			
Multipleks 2			
Negatif Kontrol Çalışmasında elde edilen Pik Yükseklikleri (RFU)	Pik Yükseklikleri Ortalaması (RFU)	Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin Standart Sapması (EBPYS)	Analiz Eşiği (LOD) (RFU)
126	91,25	26,862	80,586
93			
85			
61			

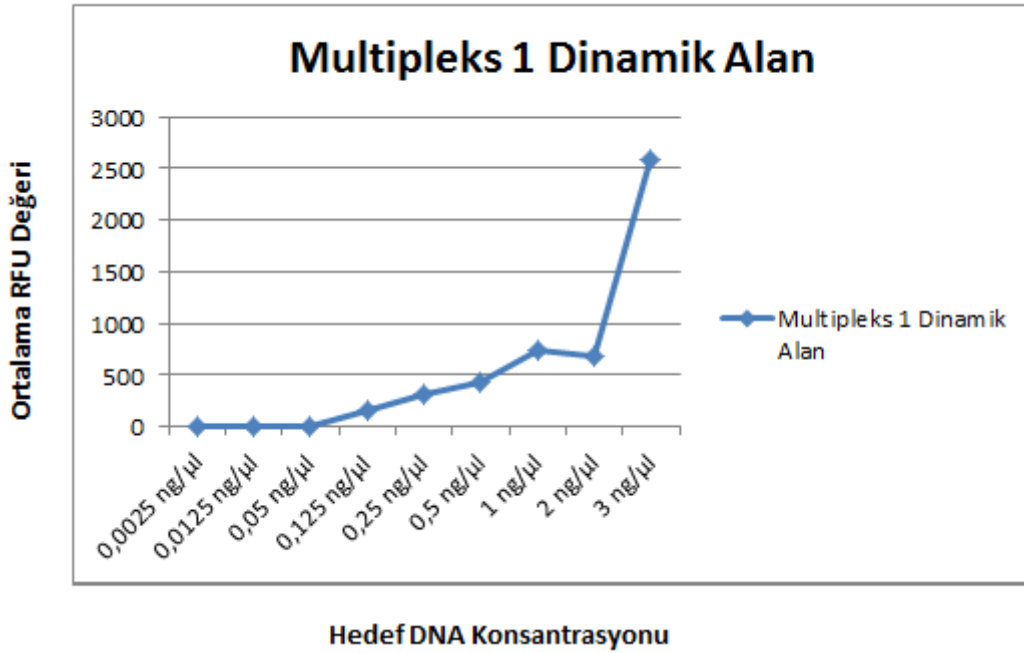
5.4.2. Dinamik Alan

DNA miktarı bilinen örnekten hazırlanan 9 farklı (0,0125 ng/μl, 0,025 ng/μl, 0,05 ng/μl, 0,125 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,5 ng/μl, 1 ng/μl, 2 ng/μl, 3 ng/μl) konsantrasyon için elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması (Tablo 13) alınarak, her bir konsantrasyona karşı pik yüksekliği ortalaması grafiği (Grafik 1,2) çizilerek her iki multipleksin analiz edilebildiği dinamik alan belirlendi.

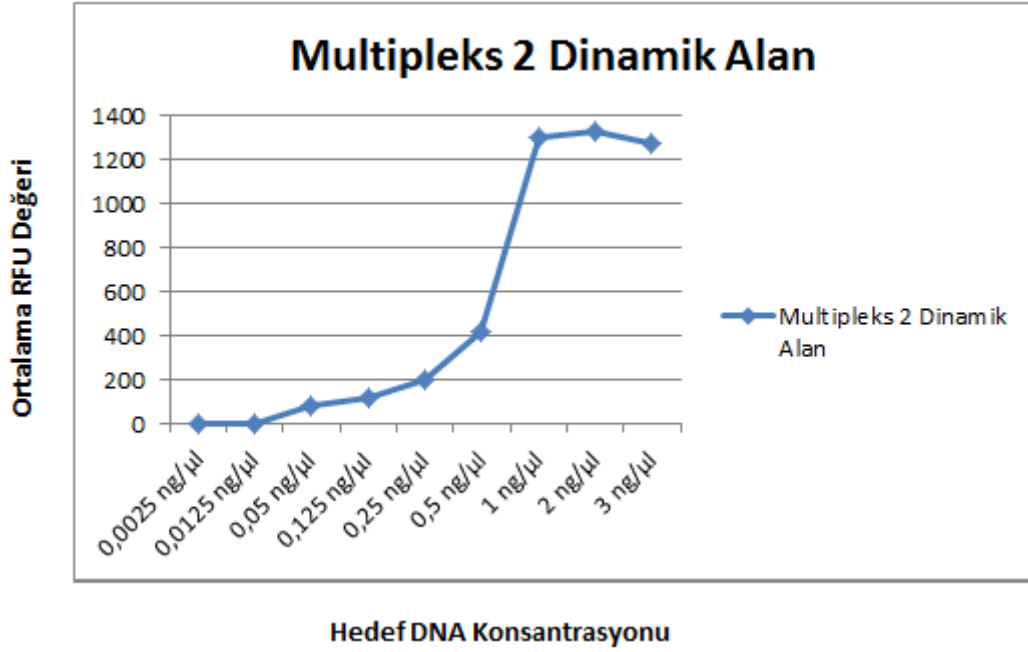
Tablo 13. 9 DNA konsantrasyonuna ait pik yükseklikleri ortalaması

Multipleks 1	
DNA Konsantrasyonu	Elde Edilen Pik Yükseklikleri Ortalaması (RFU)
3 ng/µl	2594
2 ng/µl	683,5
1 ng/µl	748
0,5 ng/µl	436,85
0,25 ng/µl	304,42
0,125 ng/µl	150,4
0,05 ng/µl	Analiz Eşiği Altında
0,0125 ng/µl	Analiz Eşiği Altında
0,0025 ng/µl	Analiz Eşiği Altında

Multipleks 2	
DNA Konsantrasyonu	Elde Edilen Pik Yükseklikleri Ortalaması (RFU)
3 ng/µl	1268
2 ng/µl	1328,3
1 ng/µl	1299
0,5 ng/µl	417,84
0,25 ng/µl	203,38
0,125 ng/µl	122,07
0,05 ng/µl	86
0,0125 ng/µl	Analiz Eşiği Altında
0,0025 ng/µl	Analiz Eşiği Altında



Grafik 1. Multipleks 1'e ait ortalama RFU değerlerine bağlı dinamik alan



Grafik 2. Multipleks 2'ye ait ortalama RFU değerlerine bağılı dinamik alan

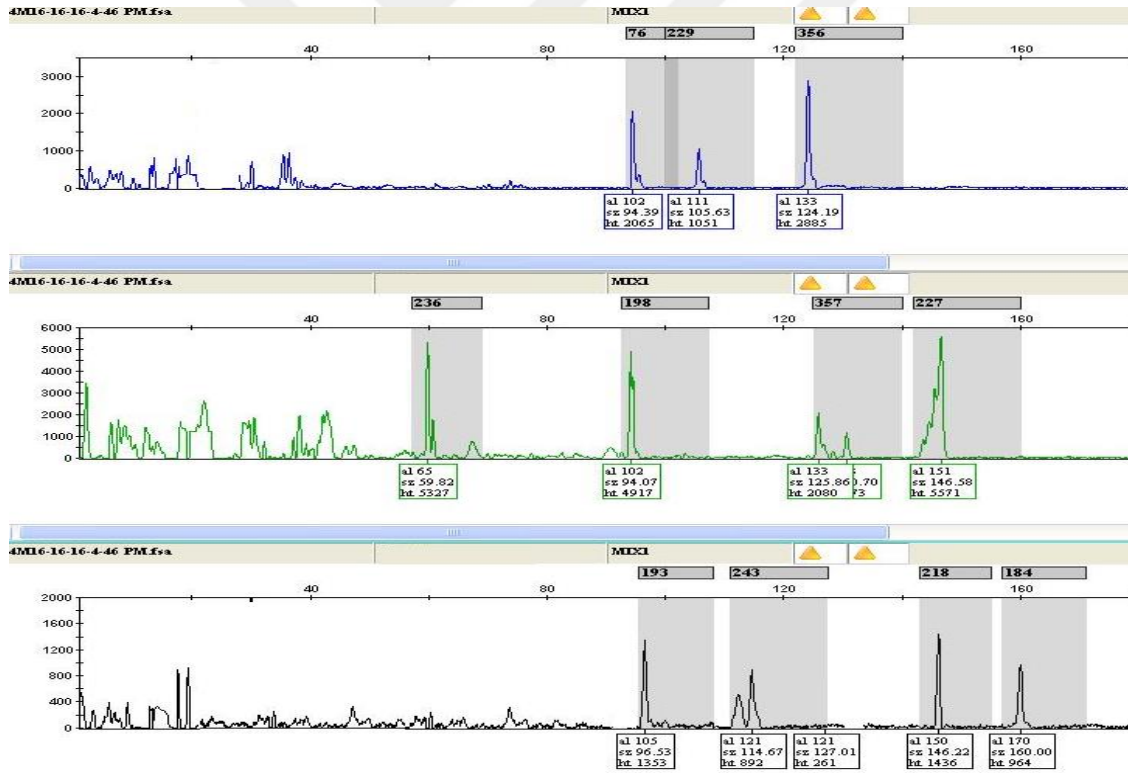
5.4.3. Duyarlılık (LOQ)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan dilüsyonların analizinde tam profil elde edilen en düşük iki konsantrasyonun 0,5 ng/µl ve 1 ng/µl olduğu belirlendi (Şekil 35-52). Duyarlılık için her konsantrasyon grubunda yer alan 5 örneğin analizinden elde edilmiş olan her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması ve standart sapmasına göre duyarlılık değerinin ortalaması alınarak:

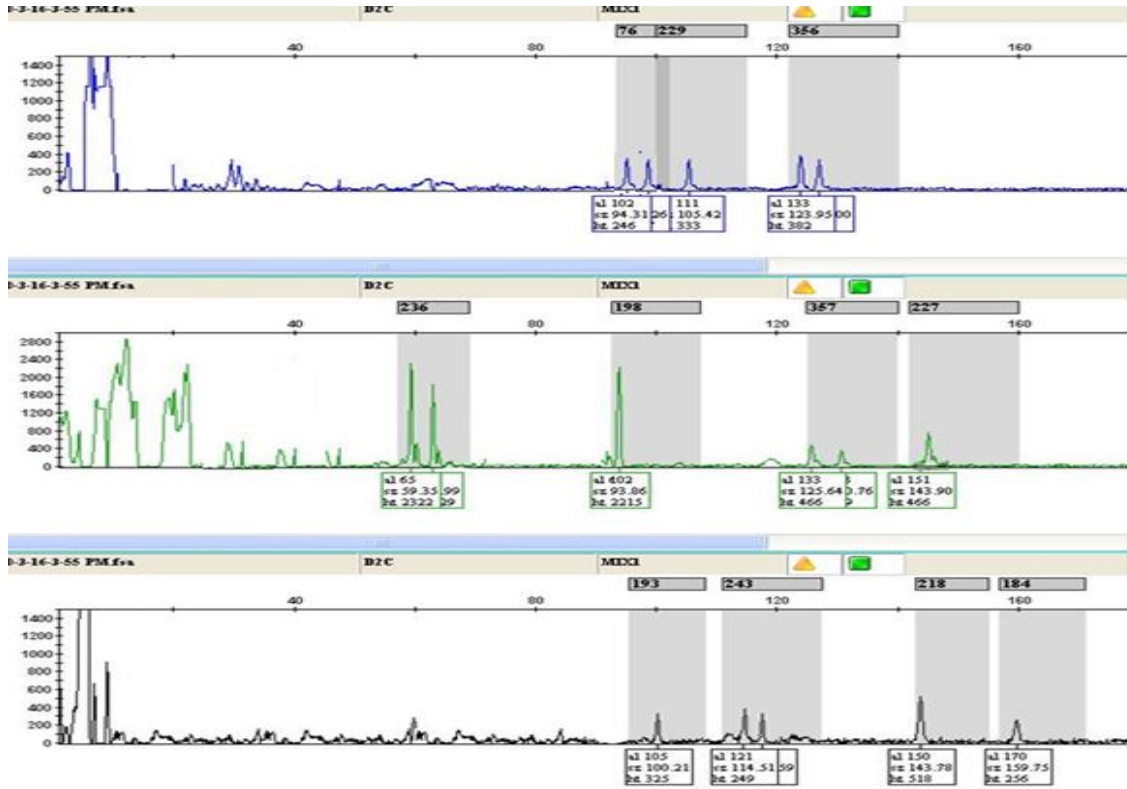
Multipleks 1 ve Multipleks 2'de 0,5 ng/µl konsantrasyon için duyarlılık sırasıyla; 211,43 RFU ve 320,20 RFU olduğu belirlendi. Bu şekilde tam profil elde edilen en düşük DNA konsantrasyonunun 0,5 ng/µl olduğu tespit edilmiş oldu (Tablo 14).

Tablo14. Duyarlılık sonucu

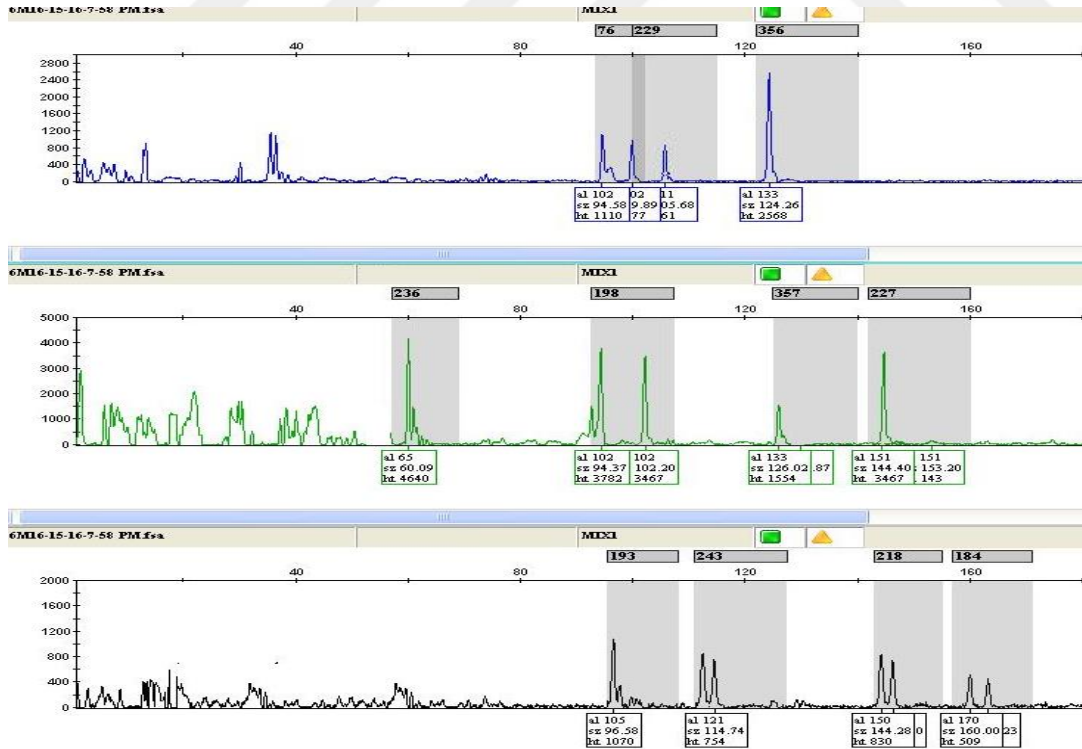
Multipleks 1			
DNA Konsantrasyonu	Hesaplanan Duyarlılık Değeri (RFU)	Analiz Eşik Değeri –LOD (RFU)	Duyarlılık(LOQ) Sonucu
1 ng/μl	513	103,53	0,5 ng/μl
0,5 ng/μl	211,43		
Multipleks 2			
DNA Konsantrasyonu	Hesaplanan Duyarlılık Değeri (RFU)	Analiz Eşik Değeri – LOD (RFU)	Duyarlılık(LOQ) Sonucu
1 ng/μl	569	80,586	0,5 ng/μl
0,5 ng/μl	320,20		



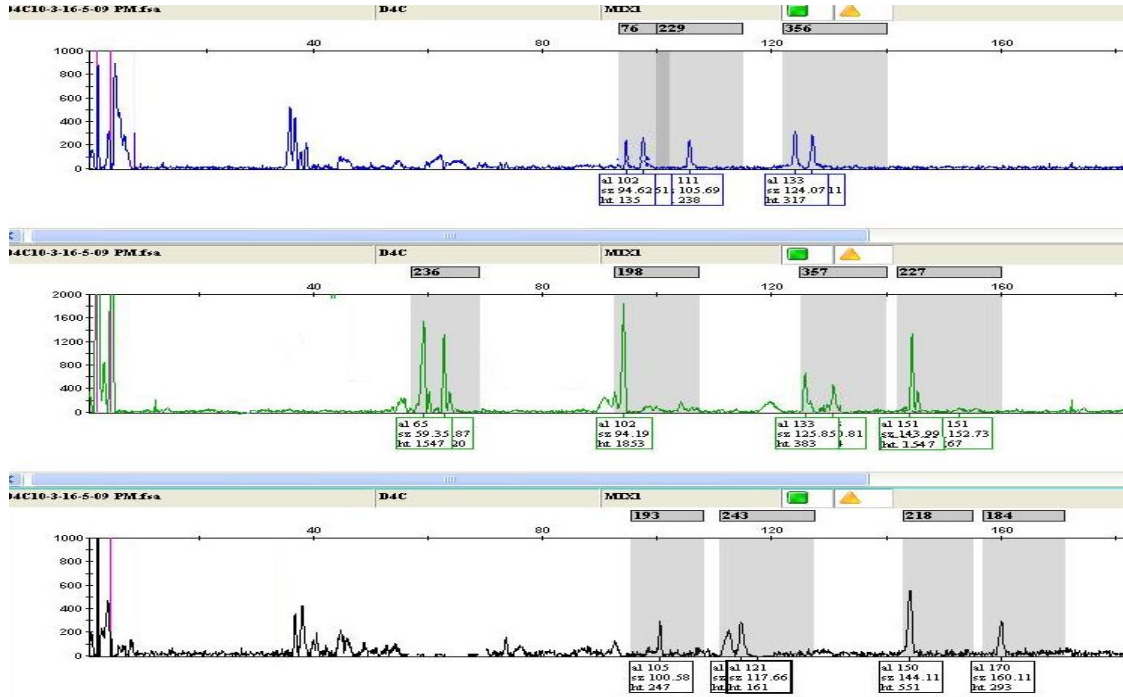
Şekil 35. 3 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



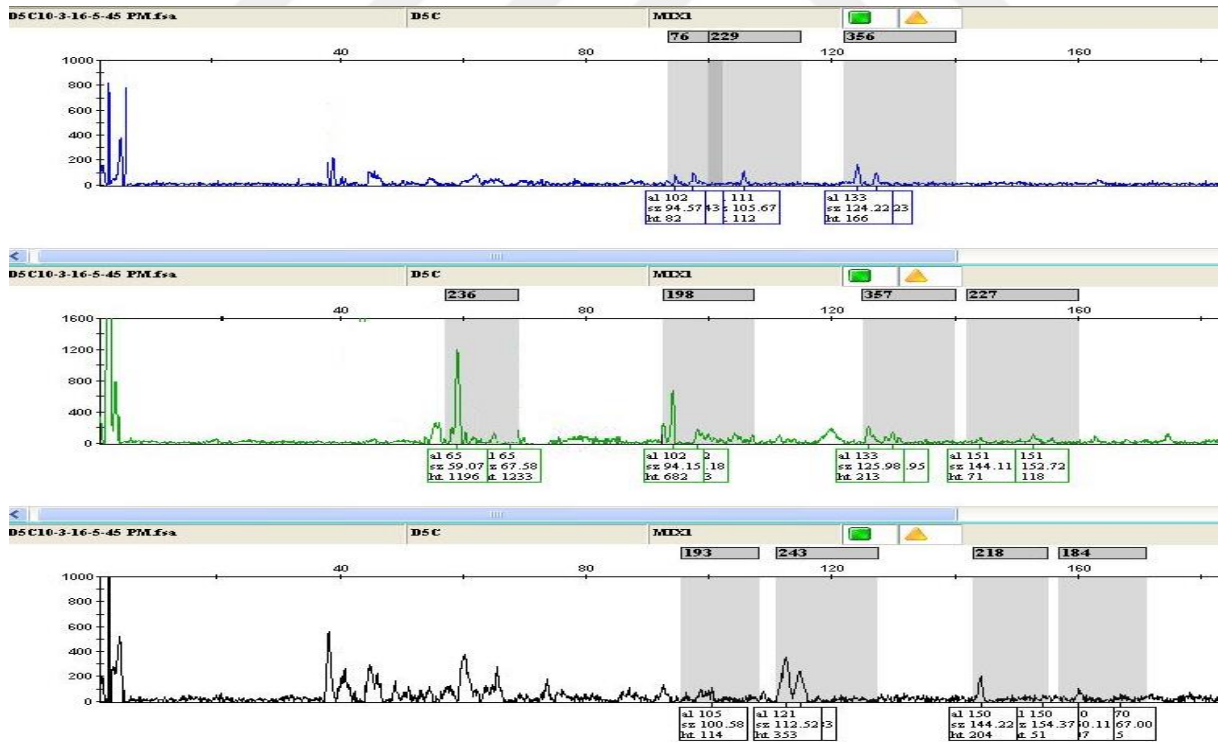
Şekil 36. 2 ng/μl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram



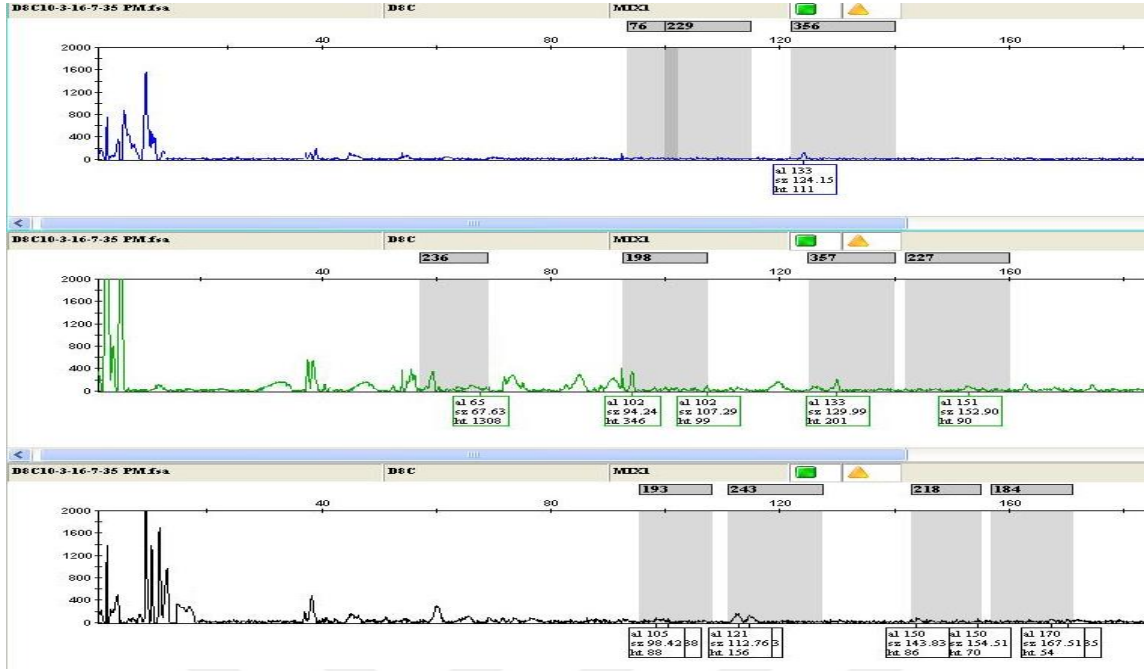
Şekil 37. 1 ng/μl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram



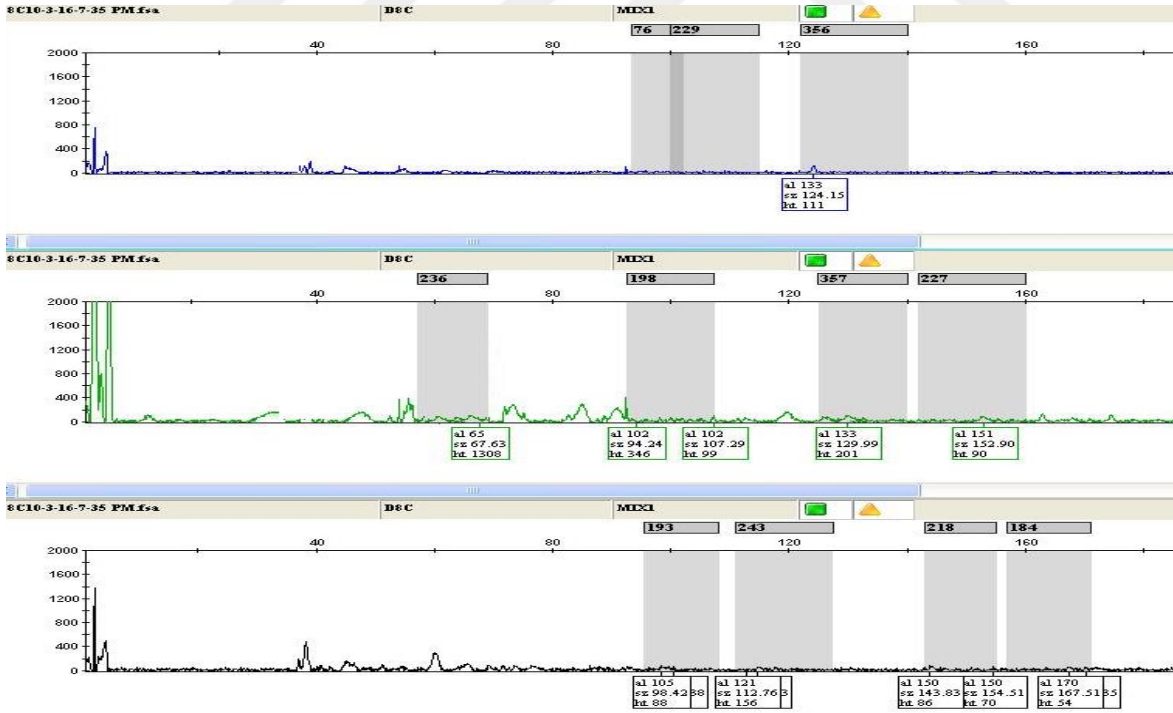
Şekil 38. 0,5 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



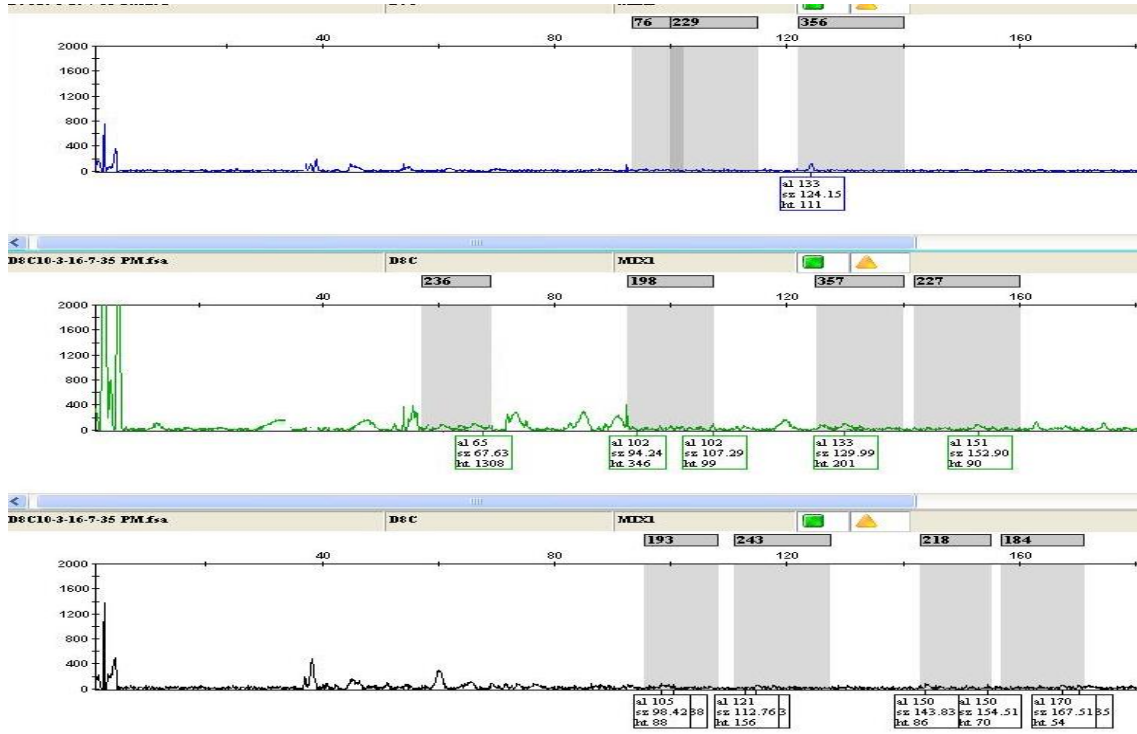
Şekil 39. 0,25 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



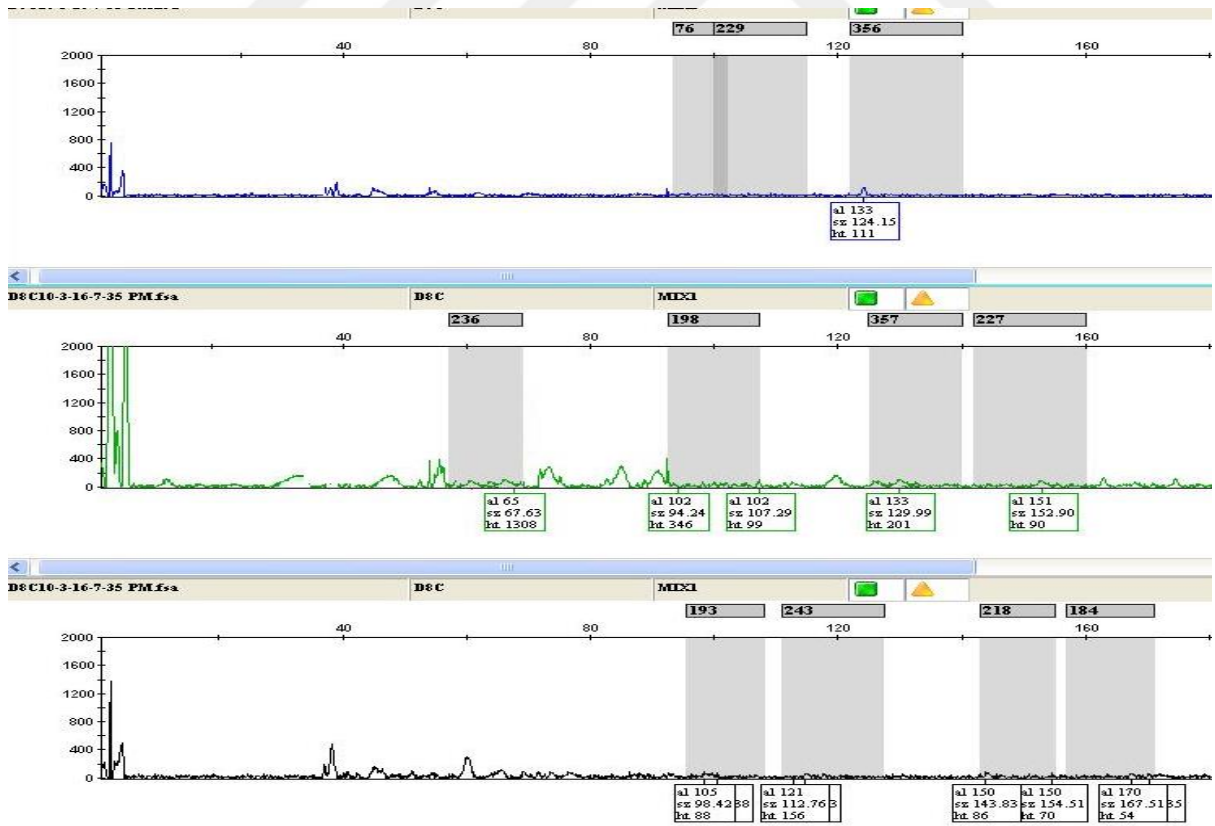
Şekil 40. 0,125 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



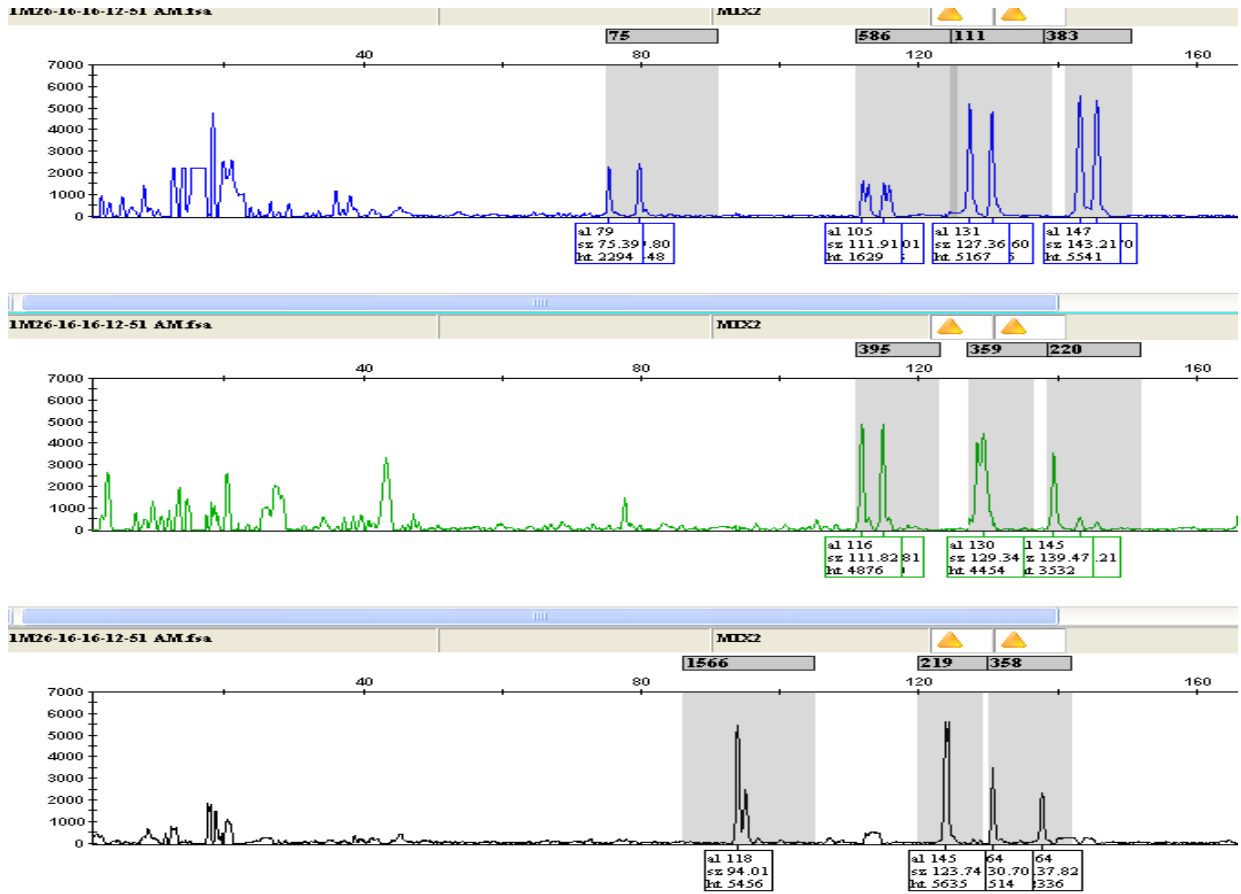
Şekil 41. 0,05 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



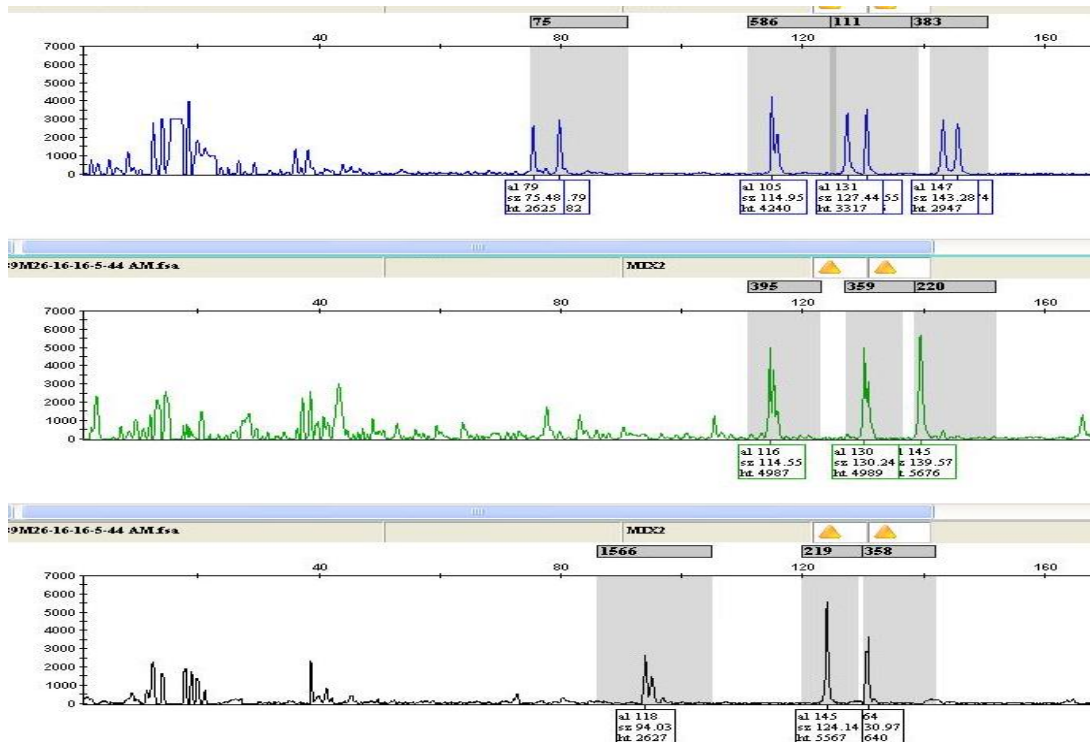
Şekil 42. 0,0125 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



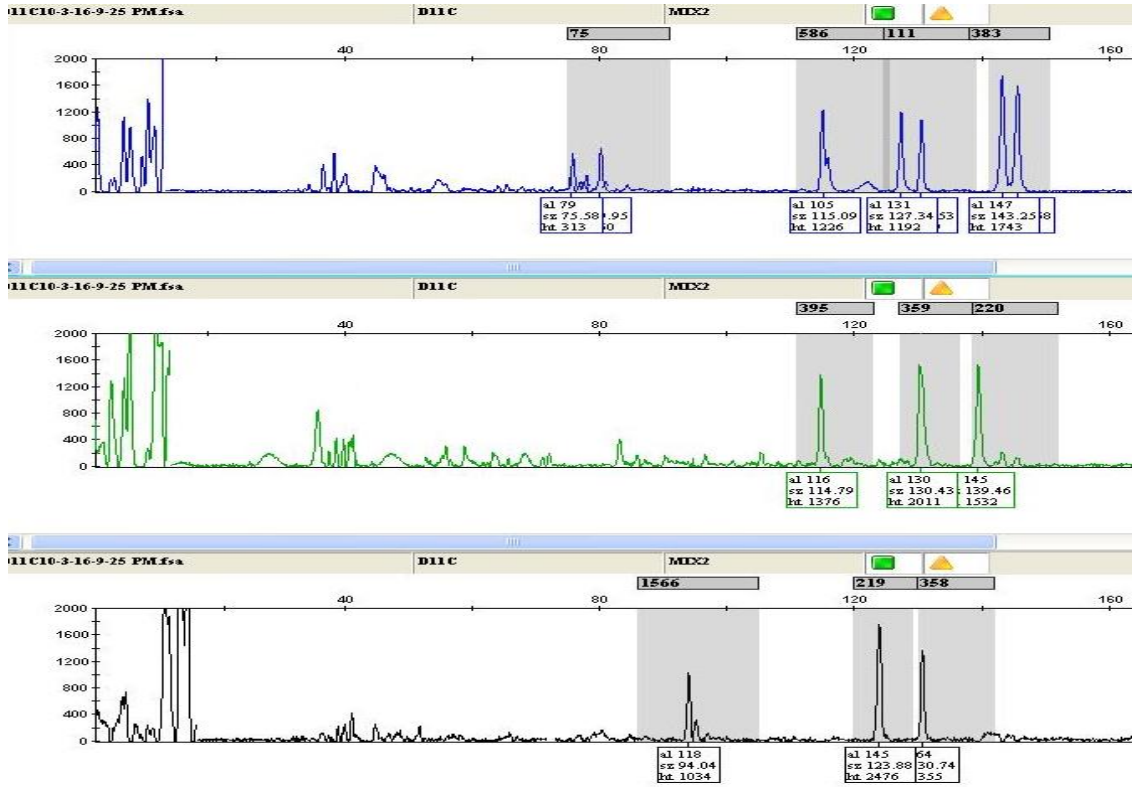
Şekil 43. 0,0025 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 1'e ait elektroforegram



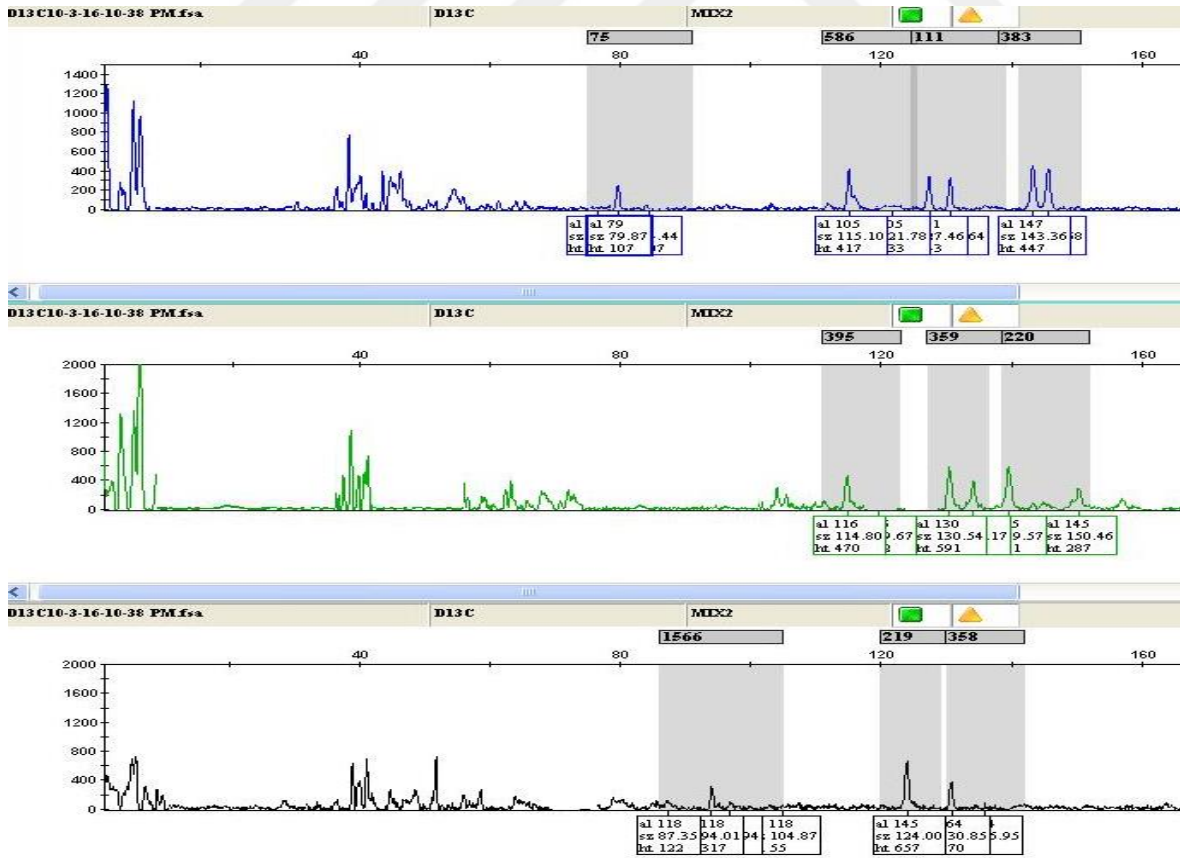
Şekil 44. 3 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



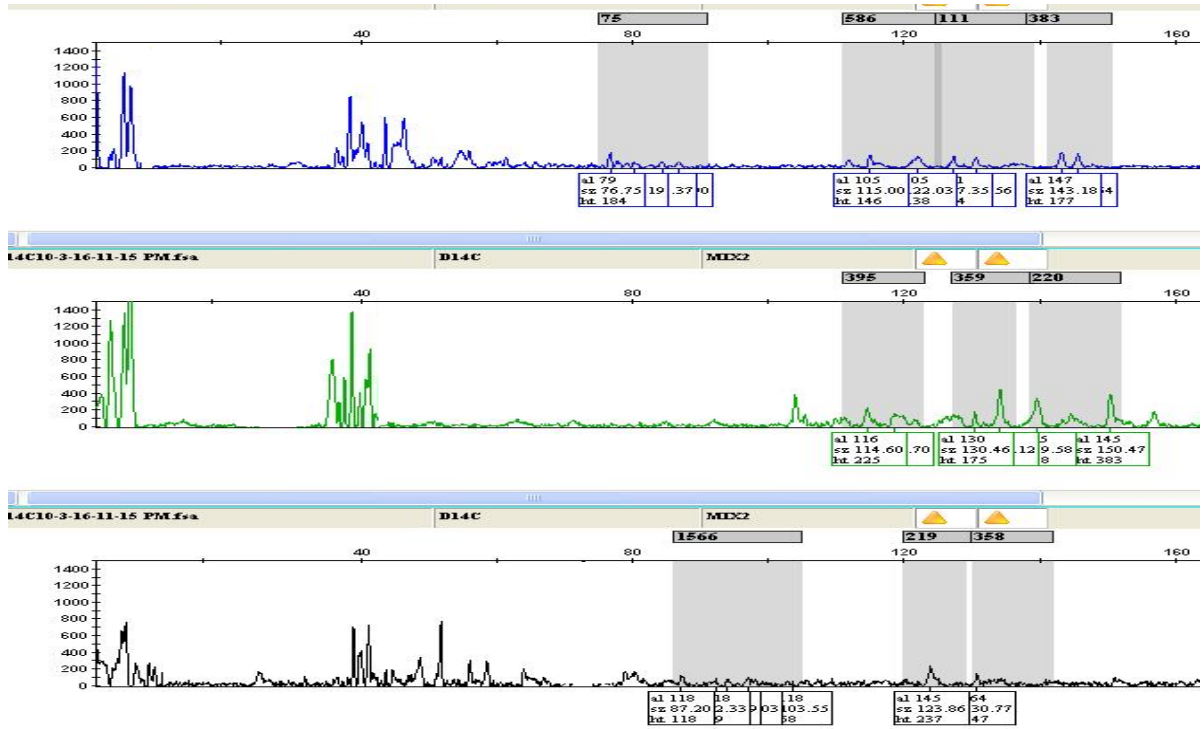
Şekil 45. 2 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



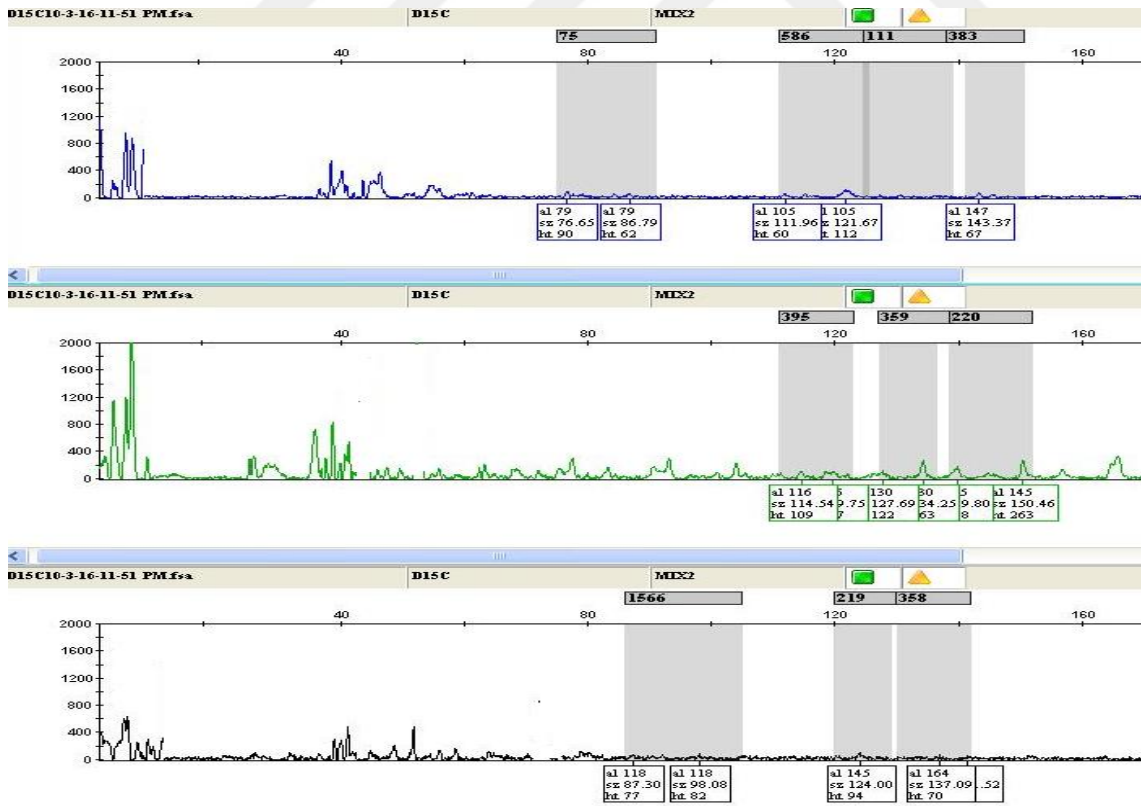
Şekil 46. 1 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



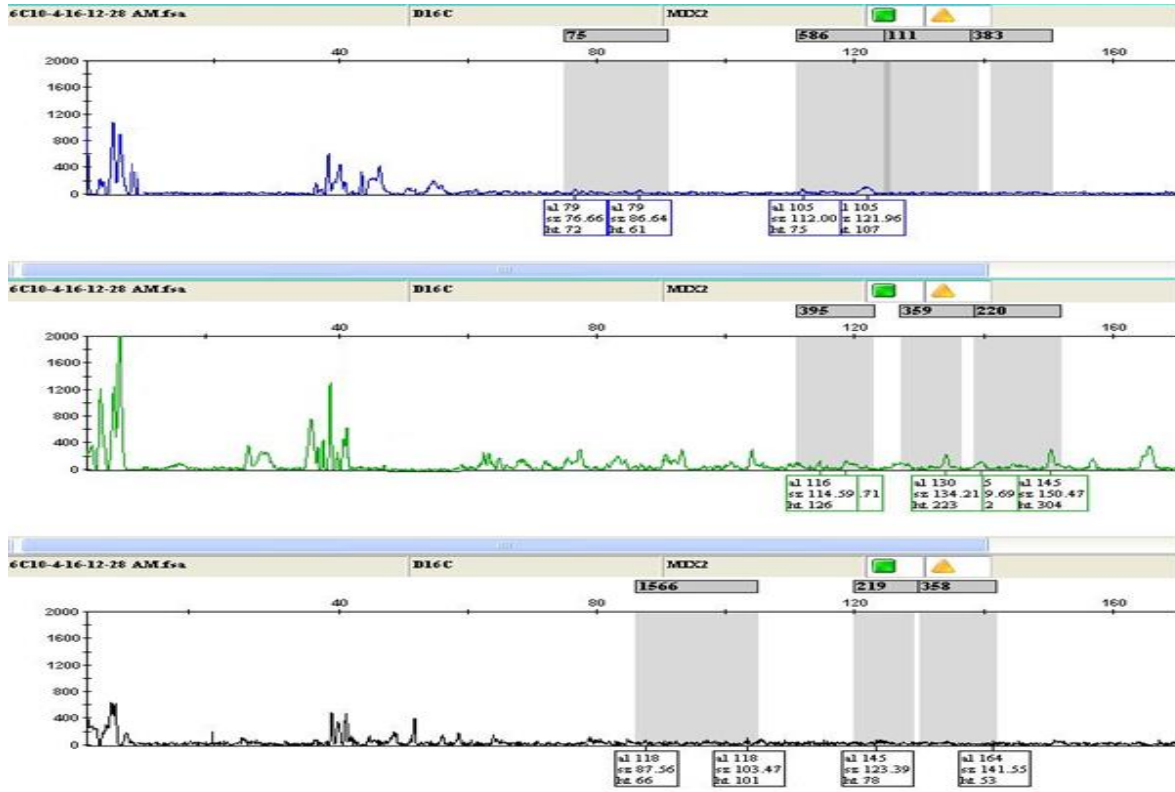
Şekil 47. 0,5 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



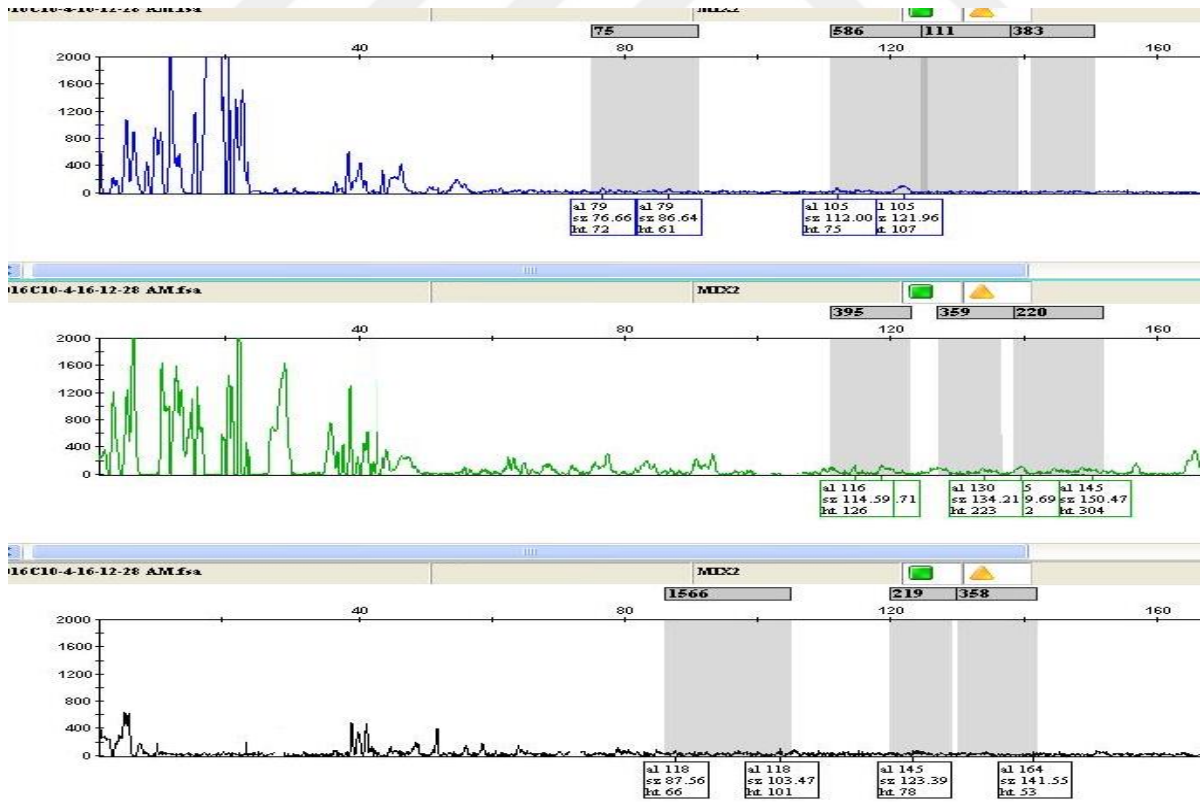
Şekil 48. 0,25 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



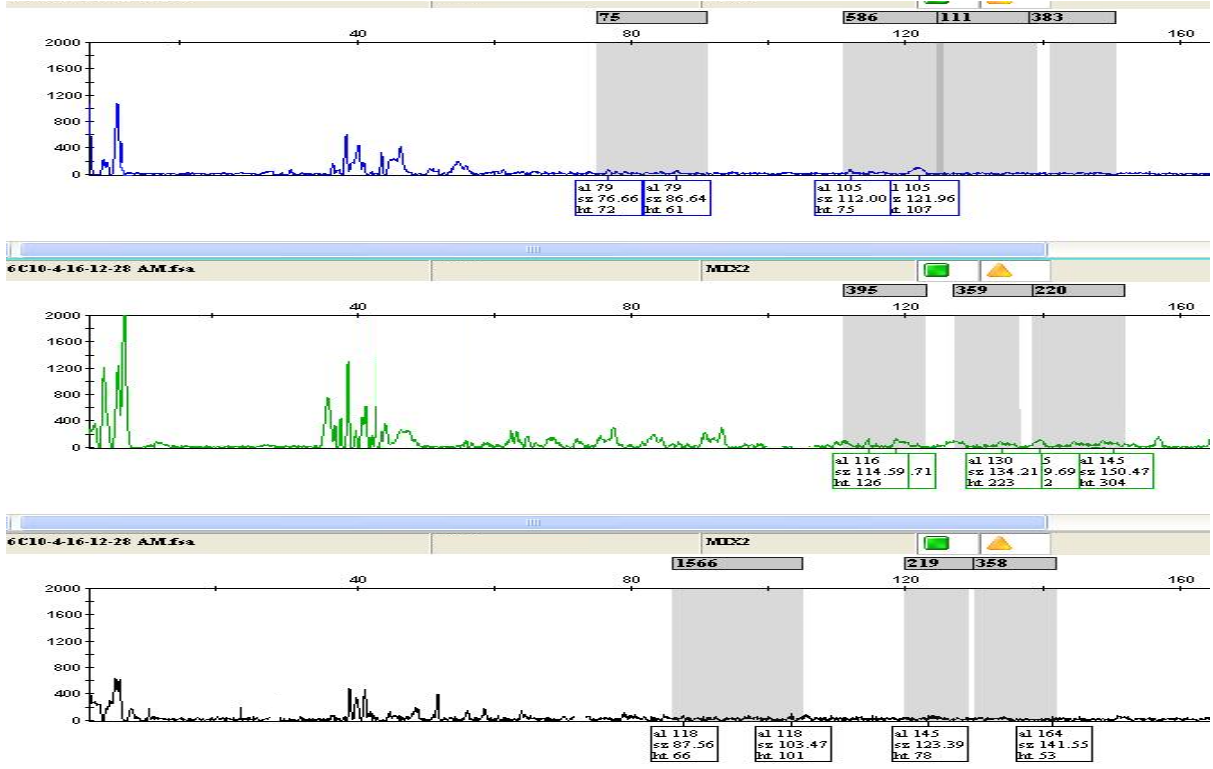
Şekil 49. 0,125 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 50. 0,005 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 51. 0,0125 ng/μl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 52. 0,0025 ng/µl DNA konsantrasyonunda multipleks 2'ye ait elektroforegramı belki çıkmayanlar

5.4.4. Stokastik Eşik

Tam profil elde edilebilen en düşük 2 konsantrasyondaki (0,5 ve 1 ng) DNA örneklerinde heterozigot InDel lokusları için kardeş alel pik yüksekliklerinin birbirine oranı ve standart sapmasına göre kardeş alel pik yükseklikleri oranı eşik değerinin:

Multipleks 1'de:

1 ng/µl için 58,73

0,5 ng/µl için 31,61

Multipleks 2'de:

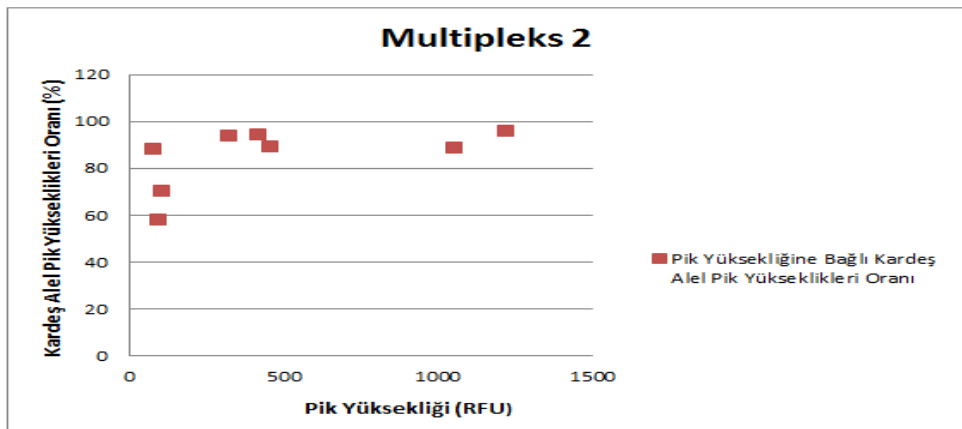
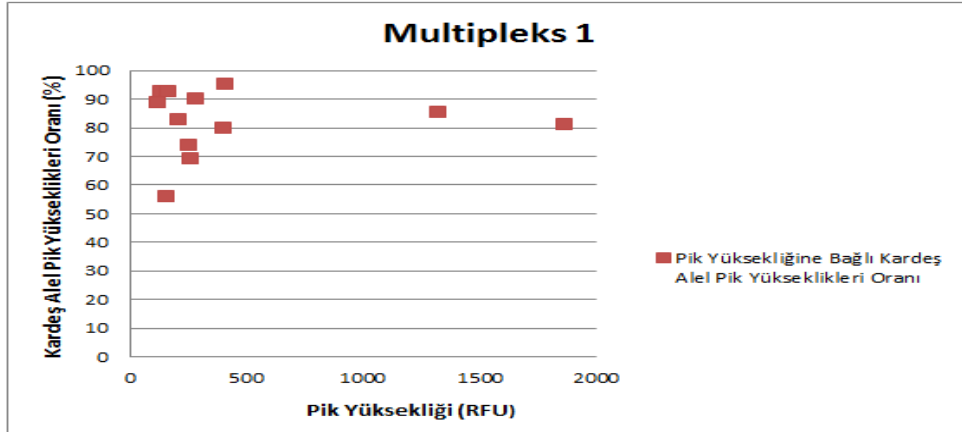
1 ng/µl için 79,03

0,5 ng/µl için 45,23 olduğu belirlendi (Tablo 15).

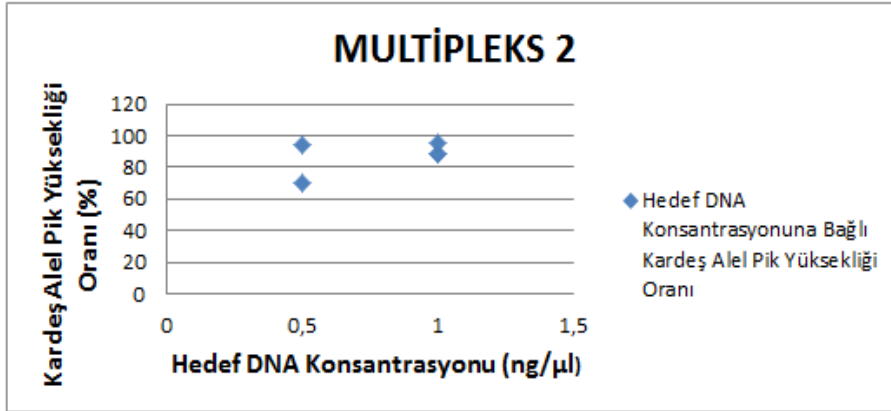
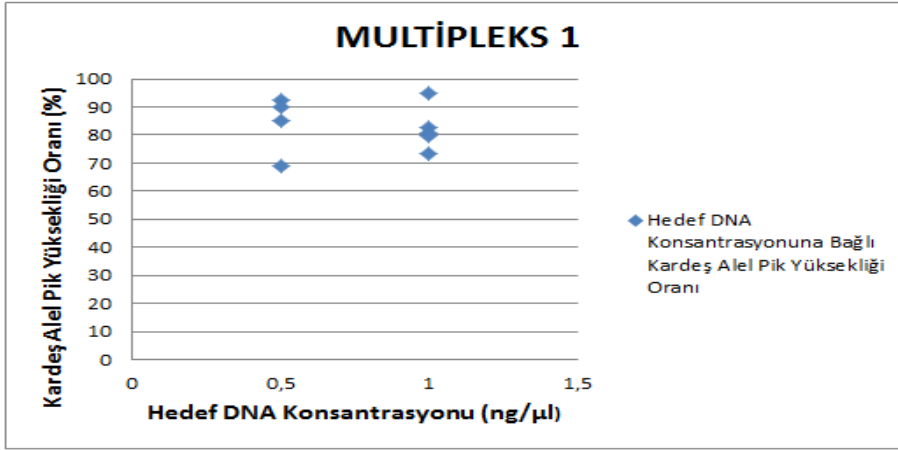
Sonrasında kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşılık gelen küçük pik yüksekliklerini veren grafik ve kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşılık gelen DNA konsantrasyonu grafiği elde edilmiştir (Grafik 3 ve 4).

Tablo 15. Stokastik eşik değeri

Multipleks 1			
Hedef DNA Konsantrasyonu	Kardeş Alel Pik Yükseklikleri Oranlarının Ortalaması	Standart Sapma	Kardeş Alel Pik Yükseklikliği Oranı Eşik Değeri
1 ng/μl	82,39	7,89	58,73
0,5 ng/μl	78,56	15,65	31,61
Multipleks 2			
Hedef DNA Konsantrasyonu	Kardeş Alel Pik Yükseklikleri Oranlarının Ortalaması	Standart Sapma	Kardeş Alel Pik Yükseklikliği Oranı Eşik Değeri
1 ng/μl	91,27	4,08	79,03
0,5 ng/μl	86,15	13,64	45,23



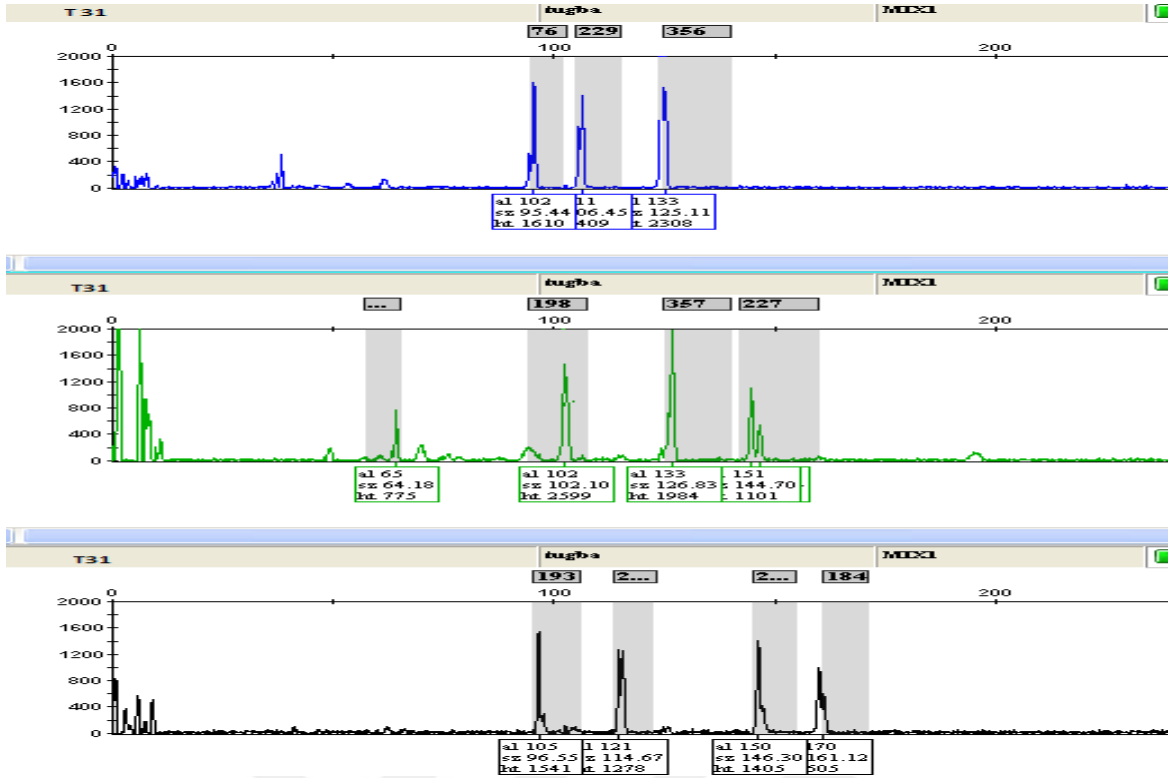
Grafik 3. Alellerin küçük pik yüksekliklerinin kardeş alel pik yükseklik oranına göre dağılımı



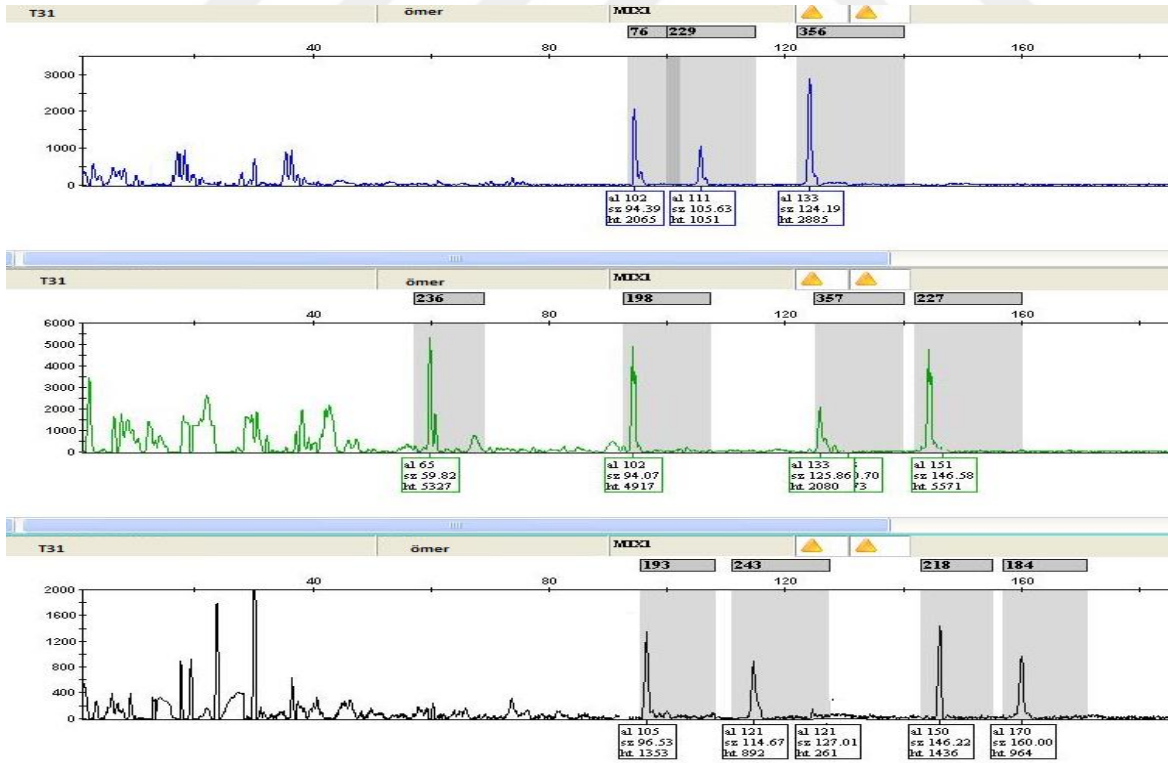
Grafik 4. Hedef DNA konsantrasyonlarına bağlı kardeş alel pik yükseklikleri oranı

5.4.5. Tekrarlanabilirlik

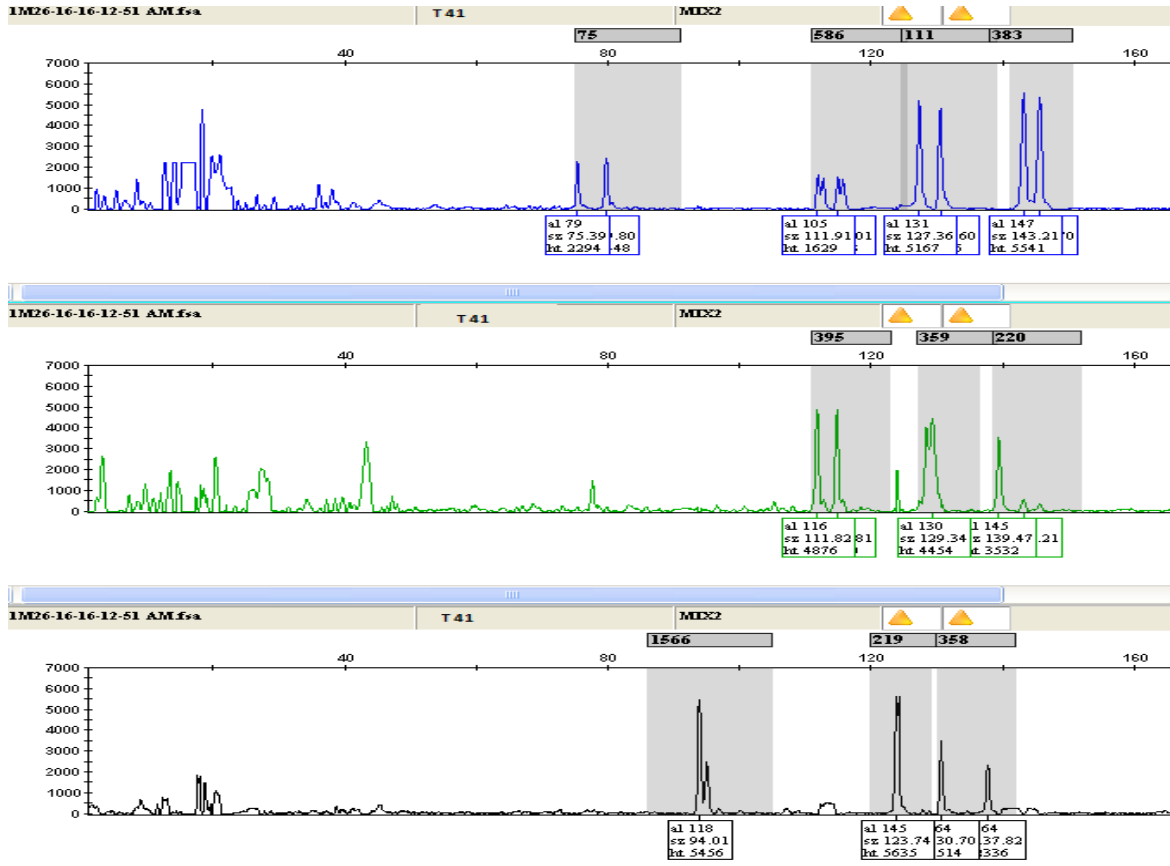
Genotipleri belirlenmiş 5 örneğin aynı laboratuvar ve cihazlarda farklı analist tarafından farklı bir zamanda çalışması sağlandı. Her iki çalışmada da aynı genotipler elde edildi (Şekil 53a,53b,54a,54b).



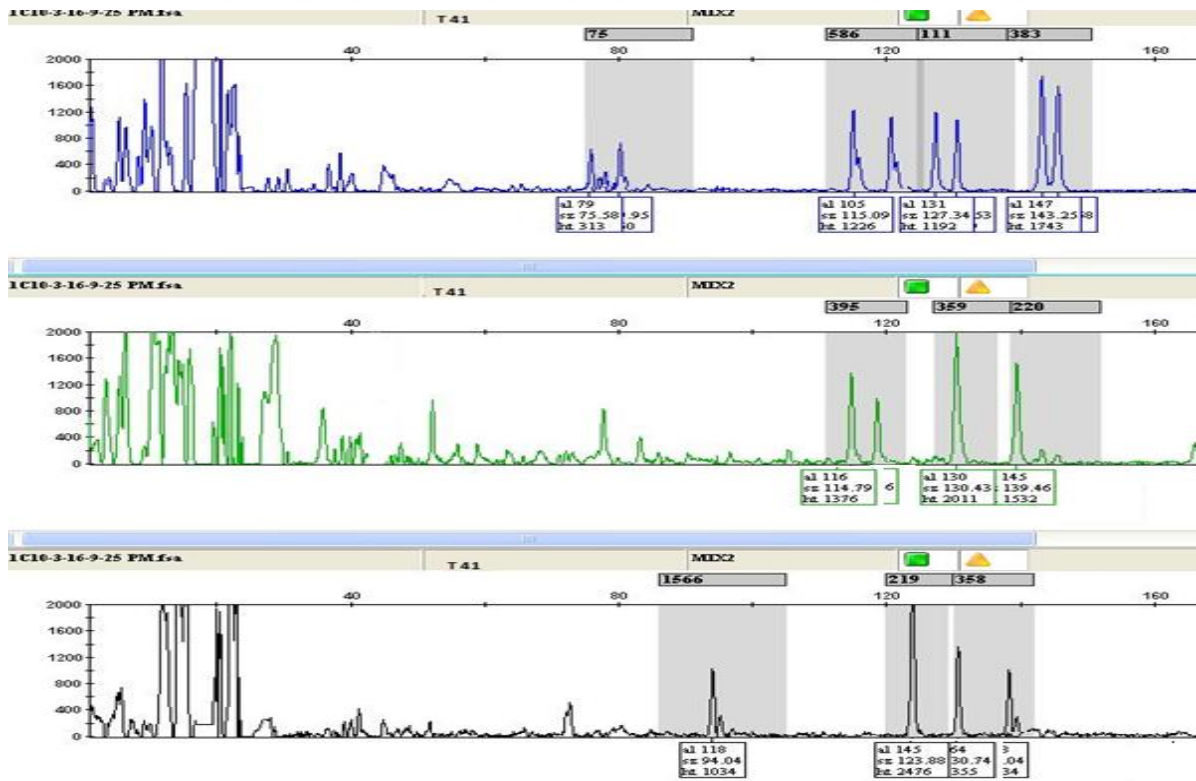
Şekil 53a. 1. Analistin çalışması sonucu multipleks 1'e ait elektroforegram



Şekil 53b. 2. Analistin çalışması sonucu multipleks 1'e ait elektroforegram



Şekil 54a. 1. Analistin çalışması sonucu multipleks 2'ye ait elektroforegram



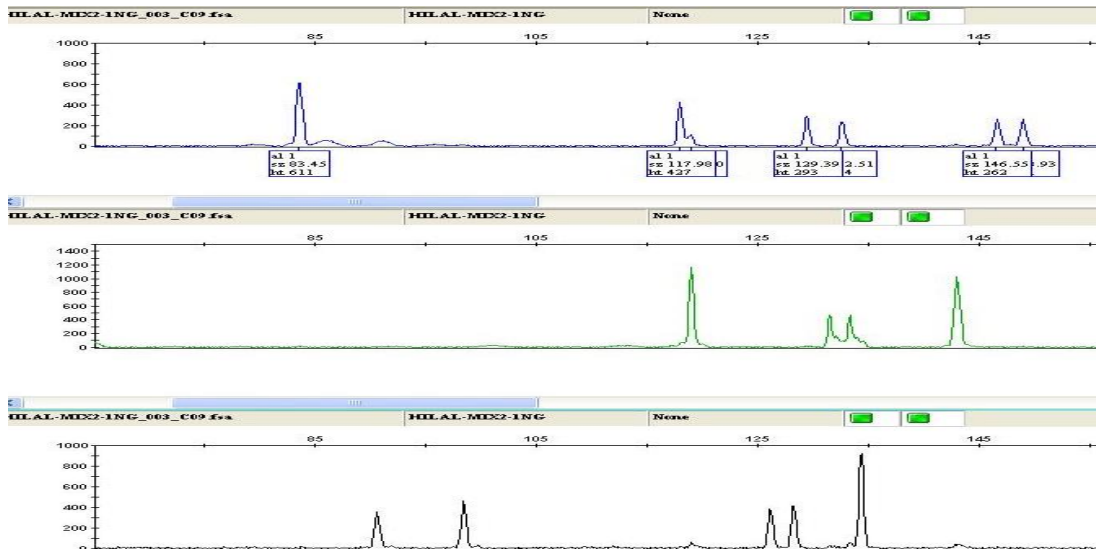
Şekil 54b. 2. Analistin çalışması sonucu multipleks 2'ye ait elektroforegram

5.4.6. Yeniden üretilebilirlik

Genotipleri belirlenmiş 5 örneğin farklı bir laboratuvar ve cihazlarda farklı analist tarafından farklı bir zamanda çalışması sağlandı. Farklı bir laboratuvarda, Applied Biosystems marka ABI 3130 Genetik Analizör cihazında da multipleks 1 ve 2'ye ait her lokusta aynı genotipler elde edildi (Şekil 55a, 55b). Farklı bir cihazdaki çalışmada çalışmanın panel ve binleri cihaza yüklü olmadığından elektroforegramda alel isimleri ve büyüklükleri gösterilmemektedir.



Şekil 55a. Farklı laboratuvarda farklı cihazda analiz edilen multipleks 1'e ait elektroforegram

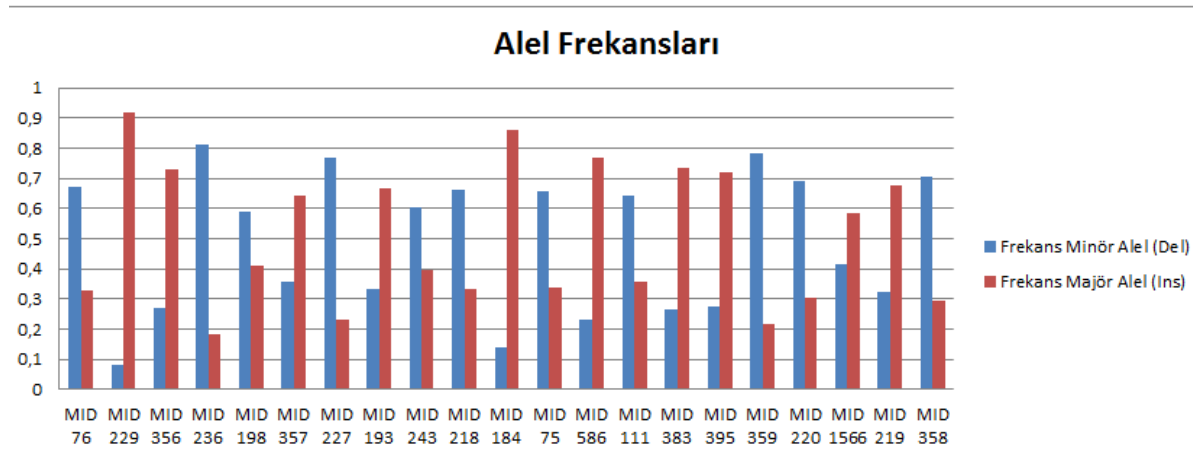


Şekil 55b. Farklı laboratuvarda farklı cihazda analiz edilen multipleks 2'ye ait elektroforegram

5.5. 21 InDel lokusuna ait Türkiye'deki alel sıklıkları

PCR optimizasyonu ve validasyonu yapılan 21 InDel lokusunun Türkiye popülasyonundaki gen sıklıklarını belirlemek için çalışmaya onay veren 100 kişiden alınan ağız içi sürüntü örneklerinde optimize edilen PCR bileşenleri (PCR Mix miktarı, primer konsantrasyonları) ve PCR programı kullanılarak genotipler belirlendi. 8 kişide multipleks 2'ye ait InDel lokusu; 1 kişide de Multipleks 1'e ait InDel lokusu tiplendirilemedi (Tablo 20 Ek 3'te verilmiştir). Gen sıklıkları için Arlequin ver 3.5.2.2 programı kullanılarak alel frekansları hesaplandı. Ayrıca adli istatistiksel parametreler de powerstat (promega) programları kullanılarak hesaplandı.

21 lokusa ait 98 kişiden elde edilmiş alel frekansları ve adli istatistiksel parametreler Tablo 16'da ve buna bağlı elde edilen lokuslar arası alel sıklık karşılaştırılması Grafik 5'te verilmiştir.



Grafik 5. Türkiye popülasyonunda 21 gonozomal InDel lokusları arası alel sıklık karşılaştırılması

Tablo 16. Türkiye populasyonunda 21 InDel lokusuna ait alel frekansları ve adli istatistik parametreler

No	Lokus	Frekans (Del)	Frekans (Ins)	Pm*	PD*	PIC*	PE*	TIP*
1	MID 76	0,670	0,329	0,394	0,606	0,34	0,059	0,70
2	MID 229	0,082	0,917	0,781	0,219	0,14	0,005	0,54
3	MID 356	0,270	0,729	0,449	0,551	0,32	0,045	0,67
4	MID 236	0,814	0,185	0,574	0,426	0,26	0,021	0,60
5	MID 198	0,587	0,412	0,349	0,651	0,37	0,077	0,75
6	MID 357	0,355	0,644	0,380	0,620	0,35	0,055	0,69
7	MID 227	0,768	0,231	0,484	0,516	0,29	0,051	0,68
8	MID 193	0,333	0,666	0,391	0,609	0,35	0,099	0,80
9	MID 243	0,603	0,396	0,436	0,564	0,36	0,253	1,15
10	MID 218	0,664	0,335	0,408	0,592	0,35	0,034	0,64
11	MID 184	0,139	0,860	0,608	0,392	0,21	0,041	0,66
12	MID 75	0,659	0,340	0,384	0,616	0,35	0,082	0,76
13	MID 586	0,230	0,769	0,500	0,500	0,29	0,034	0,64
14	MID 111	0,644	0,355	0,387	0,613	0,35	0,043	0,66
15	MID 383	0,266	0,733	0,461	0,539	0,31	0,036	0,64
16	MID 395	0,277	0,722	0,435	0,565	0,32	0,059	0,70
17	MID 359	0,781	0,218	0,516	0,484	0,28	0,032	0,63
18	MID 220	0,693	0,306	0,410	0,590	0,33	0,062	0,71
19	MID 1566	0,414	0,585	0,349	0,651	0,37	0,066	0,72
20	MID 219	0,322	0,677	0,415	0,585	0,34	0,036	0,64
21	MID 358	0,707	0,292	0,426	0,574	0,33	0,052	0,68
				Total PD	0,9999			

* Ayrım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (TPI)

5.5.1. Hardy-Weinberg dengesi

Hardy-Weinberg dengesini belirlemek için yine Arlequin programında 21 lokusa ait p-değerleri hesaplandı. Bonferroni düzeltmesi ile $p = 0,01/21$ uygulanarak anlamlılık düzeyi $p > 0,000476$ olarak alındı. Bonferroni düzeltmesi sonrası 7 lokusta Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlemlendi. Tüm lokusların ortalama heterozigotluğu 0,400 olarak bulundu. Beklenen heterozigotluk ve P değerleri Tablo 17’de verilmektedir.

Tablo 17. 21 InDel lokusunun hardy-weinberg denge tablosu

Locus	Beklenen Heterozigotluk	P-değeri HWE
MID 76	0,44442	0,00099
MID 229	0,15209	0,00068
MID 356	0,39703	0,00056
MID 236	0,30383	0,00005
MID 198	0,48715	0,00169
MID 357	0,46071	0,00010
MID 227	0,36043	0,17561
MID 193	0,44677	0,16535
MID 243	0,48122	0,09020
MID 218	0,44789	0,0000
MID 184	0,24085	1.00000
MID 75	0,45195	0,03220
MID 586	0,35657	0,00038
MID 111	0,46083	0,00002
MID 383	0,39330	0,00007
MID 395	0,40348	0,00946
MID 359	0,34337	0,00057
MID 220	0,42779	0,00542
MID 1566	0,48825	0,00070
MID 219	0,43923	0,00000
MID 358	0,41592	0,00167
21 Locus Ortalama Heterozigotluk	0,40015	

5.5.2. Populasyonlar arası alel frekanslarının karşılaştırılması

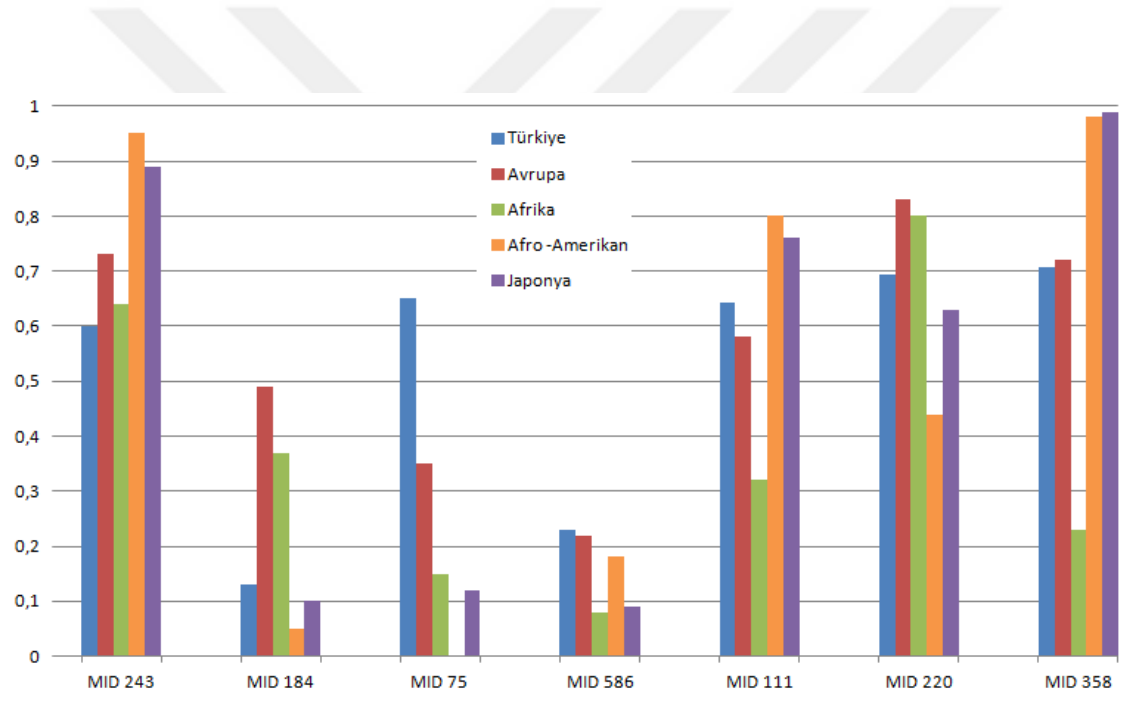
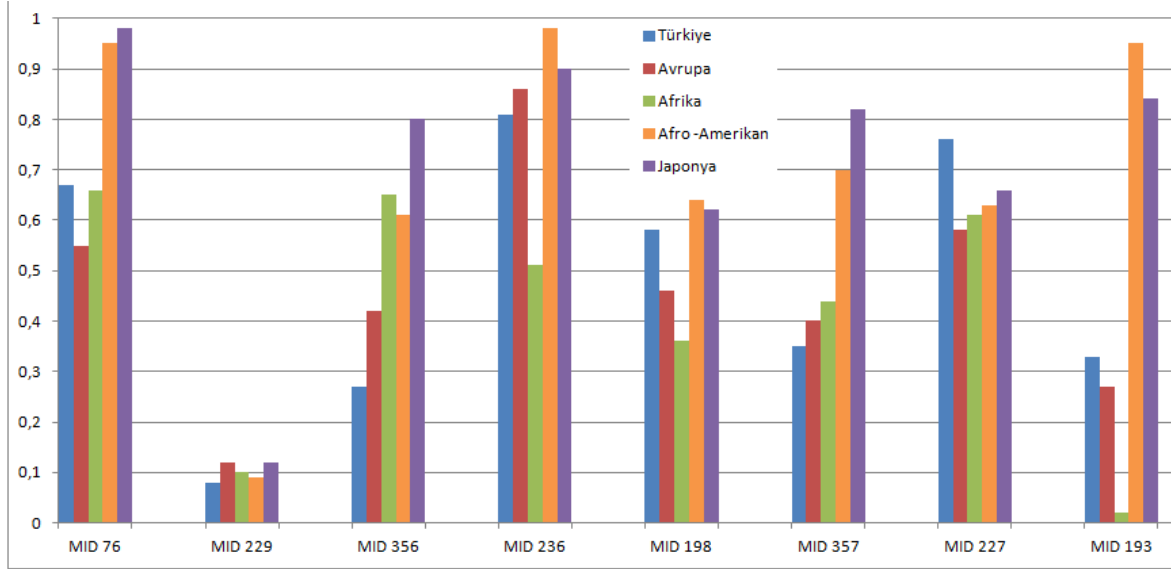
Mammalian Genotyping Service - Marshfield Clinic InDel veri bankasında yer alan farklı populasyonlara ait 21 InDel lokusunun belirlenmiş alel frekansları ve Türkiye’ye ait (bu tez

çalışması sonuçları) alel frekansları karşılaştırması Tablo 18’de ve Grafik 6’da gösterilmektedir.

Tablo 18. 21 InDel lokusuna ait popülasyonlar arası alel farklılıkları

Lokus	Türkiye		Avrupa		Afrika		Afro -Amerikan		Japonya	
	Frekans (Del)	Frekans (Ins)	Frekans (Del)	Frekans (Ins)	Frekans (Del)	Frekans (Ins)	Frekans (Del)	Frekans (Ins)	Frekans (Del)	Frekans (Ins)
MID 76	0,67	0,33	0,55	0,45	0,66	0,34	0,95	0,05	0,98	0,02
MID 229	0,08	0,92	0,13	0,87	0,11	0,89	0,09	0,91	0,13	0,87
MID 356	0,27	0,73	0,43	0,57	0,66	0,34	0,62	0,38	0,81	0,19
MID 236	0,82	0,18	0,86	0,14	0,52	0,48	0,98	0,02	0,90	0,10
MID 198	0,58	0,42	0,46	0,54	0,36	0,64	0,64	0,36	0,63	0,37
MID 357	0,36	0,64	0,41	0,59	0,45	0,55	0,71	0,29	0,82	0,18
MID 227	0,76	0,24	0,58	0,42	0,62	0,38	0,64	0,36	0,66	0,34
MID 193	0,34	0,66	0,27	0,73	0,03	0,97	0,95	0,05	0,85	0,15
MID 243	0,61	0,39	0,74	0,26	0,64	0,36	0,95	0,05	0,89	0,11
MID 218	0,66	0,34	- *	-	-	-	-	-	-	-
MID 184	0,13	0,86	0,49	0,51	0,37	0,63	0,05	0,95	0,11	0,89
MID 75	0,65	0,35	0,36	0,64	0,15	0,85	0,01	0,99	0,13	0,87
MID 586	0,23	0,76	0,28	0,77	0,08	0,92	0,18	0,82	0,09	0,91
MID 111	0,64	0,36	0,58	0,42	0,33	0,67	0,81	0,19	0,76	0,24
MID 383	0,26	0,74	-	-	-	-	-	-	-	-
MID 395	0,27	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-
MID 359	0,78	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-
MID 220	0,69	0,31	0,84	0,16	0,80	0,20	0,44	0,56	0,64	0,36
MID 1566	0,41	0,58	-	-	-	-	-	-	-	-
MID 219	0,32	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-
MID 358	0,71	0,29	0,72	0,28	0,24	0,76	0,98	0,02	0,99	0,01

- * (Popülasyonu çalışması yapılmamış lokuslar)



Grafik 6. 21 InDel lokusuna ait popülasyonlar arası alel frekans karşılaştırması

21 InDel lokusunun popülasyonlar arası karşılaştırılması Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanıldı. Elde edilen F_{ST} değerlerine (0-0,5 arası küçük farklılaşma, 0,05-0,15 orta düzey, 0,15-0,25 arası büyük, >0,25 çok büyük farklılaşma) göre farklılıklar saptandı. Bu farklılıklar Tablo 19’da verilmektedir.

Tablo19. Popülasyonlar arası F_{ST} -değerleri

Populasyon	Lokuslar															Populasyon	
	MID 76	MID 229	MID 356	MID 236	MID 198	MID 357	MID 227	MID 193	MID 243	MID 184	MID 75	MID 586	MID 111	MID 220	MID 358		
Türkiye	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	Türkiye
Avrupa	0,02122	-0,00060	0,03913	-0,00032	0,02170	-0,00282	0,05686	0,00314	0,03317	0,00000	0,17214	-0,00739	0,00352	0,05540	-0,00703	Türkiye	
Afrika	-0,01719	-0,01311	0,25836	0,17869	0,07989	0,00201	0,02777	0,21784	-0,01372	0,21884	0,40274	0,04419	0,17126	0,01653	0,34097	Türkiye	
Afro-Amerika	0,16506	-0,01444	0,20717	0,09883	-0,00814	0,19675	0,01722	0,51460	0,26099	0,01837	0,56632	-0,00640	0,03884	0,11260	0,19654	Türkiye	
Japonya	0,22440	-0,00318	0,41640	0,01139	-0,00814	0,33700	0,00734	0,38695	0,17799	-0,01236	0,41215	0,04290	0,01142	-0,00862	0,19654	Türkiye	

* 0-0,5 arası küçük farklılaşma

* 0,05-0,15 orta düzey farklılaşma

* 0,15-0,25 arası büyük farklılaşma

* > 0,25 çok büyük farklılaşma

6. Tartışma

Günümüzde kriminal laboratuvarlarda kimliklendirmede yaygın olarak STR sistemleri kullanılmaktadır. Adli bilimciler var olan sistemlere alternatif her türlü biyolojik örnekten sonuç alınabilen yeni polimorfik sistemler geliştirmektedirler (5). İnsersiyon/delesyon polimorfizmi insan genomunda bir veya birkaç bazın eklenmesi veya kaybolması şeklinde oluşur ve polimorfizme neden olur bu da adli olguların çözümünde kimliklendirme ve nesep tayininde kullanılabilir. Özellikle adli bilimlerde şüpheliye ve/veya mağdura ait olası biyolojik delillerde bulunan DNA miktarı az veya bozulmuş olduğu durumlarda STR sistemlerine alternatif DNA üzerinde daha az yer kaplayan sistemler tercih edilmektedir. Bu gibi durumlarda InDel polimorfizminden yararlanarak başarılı kimliklendirme yapılabilmektedir (6,7,8). Bu sistemlerin DNA üzerinde kapladıkları alan (60-200 bp) oldukça küçüktür. DNA parçalanmış olsa bile başarılı DNA profili elde etme potansiyeli yüksektir. Çünkü başlangıç DNA miktarı en fazla 0,5-1 ng olacak şekilde aynı anda multipleks PCR yapılabilmektedir. Bu da az miktardaki DNA'dan bir kişinin DNA profilinin çıkarılması ve diğer kişilerden ayırt edilmesini sağlamaktadır (6,7,8,68).

InDel'ler adli bilimlerde son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu tez kapsamında biri 10 diğeri 11 lokustan oluşan 2 multipleks olarak dizayn edilen 21 gonozomal InDel lokusunu (X kromozomuna bağlı 20 InDel: MID 76, MID 229, MID 356, MID 236, MID 198, MID 357, MID 193, MID 243, MID 218, MID 184, MID 75, MID 586, MID 111, MID 383, MID 395, MID 359, MID 220, MID 1566, MID 219, MID 358 ve Y kromozomuna bağlı bir InDel: MID 227) içeren panelin optimizasyonu ve validasyonu yapıldı. Ayrıca Türkiye'deki adli laboratuvarlarda kişilerin kimliklendirilmesinde, biyolojik anne-babanın belirlenmesinde, iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadıklarının belirlenmesinde v.b. olgularda kullanılabilmesi

için bu panelin Türkiye'deki gen sıklığını ve görülme şeklini belirlemeye yönelik 100 kişide de tiplendirildi.

InDel Lokuslarının Seçimi ve Multipleks Dizayını

Bu çalışmada kimliklendirmeye yönelik multipleks bir InDel kiti oluşturmak üzere konuyla ilgili literatürde çalışılan tüm InDel lokusları, patent ve kitler tarandı. Var olan çalışmaların dışında kalacak şekilde gonozomal kromozomlar (X ve Y) üzerindeki InDel lokusları Marshfield diallelic indels database - Mamalian Genotyping Service veri bankasından (<https://www3.marshfieldclinic.org/mgs/>) seçilmiştir.

Bu tez için başlangıçta, 20 X kromozomuna bağlı InDel ve 8 Y kromozomuna bağlı InDel bölgesinden oluşan 28 lokusun çalışılması tasarlanmış ancak 7 Y kromozomuna bağlı InDel'lerin hem kadın hem erkek DNA örneklerinde çoğalmasından dolayı bu bölgeler çalışmadan çıkarılmıştır. Çıkarılan bölgelere ait primerlerin X kromozomu üzerinde komplementeri olduğu NCBI primer-blast'ta daha sonra yapılan araştırmalarda belirlenmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Bu nedenle 7 Y-InDel çalışmadan çıkartılarak 1 adet Y-InDel 20 adet X InDel olmak üzere toplam 21 lokuslu multipleks tasarlandı. Multiplekstekteki 1 Y-InDel lokusu da cinsiyet ayrımında kullanılabilir.

Bu tez kapsamında geliştirilen 21 lokuslu paneli içeren başka bir çalışma bulunup bulunmadığını araştırmak için Google patents ve tr.espacenet.com' da tarama yapıldı. InDel'lerle ilgili 3 çalışma bulundu (bkz sayfa 35) Ancak geliştirdiğimiz panel bu çalışmaların kapsadığı InDel bölgelerinden farklıdır. Patent taramalarına ek olarak; Qiagen firmasına ait "Investigator DIPplex Kit" ve Genomica'ya ait "InDelPlex INDEL

Polymorphism Detection Kit” isimli InDel kitler bulunmaktadır ve ticari olarak adli laboratuvarlara pazarlanmaktadır. Bu kitler otozomal InDel'lere ait geliştirilmiş kitlerdir.

Bu tezde patenti alınmış ve ticari olarak üretilmiş InDel kitlerinin içerdiği gen bölgelerinin dışındaki lokuslar seçilmiştir. Ayrıca tüm kitler yurtdışında üretilmekte ve ülkemizde pazarlanmaktadır. Bu çalışma ile geliştirilen multipleks panel (kit) Türkiye’de geliştirilen ilk InDel kiti olma özelliğini taşımaktadır.

21 InDel lokusunun ayrı ayrı ve multipleks olarak optimizasyonunun değerlendirilmesi

Multipleks oluşturmak üzere seçilen InDel lokuslarının her biri öncelikle ayrı ayrı PCR ile çoğaltılıp analiz edildi. PCR karışımı olarak GML PCR Master Mix kullanılmış olup tekli lokus PCR bileşenleri için ürünün önerdiği miktarlar (Tablo 4) kullanılarak başarılı PCR yapıldı. Primer konsantrasyonları ise Rui ve arkadaşlarının 2012’deki çalışmasına uygun olarak 3 pmol/µl olarak belirlendi ve Tm sıcaklıklarına uygun PCR protokolü ve PCR döngü programı oluşturularak her bir InDel lokusu başarıyla çoğaltıldı (Şekil 8-28).

21 lokus içerisinde birbirine yakın büyüklükte lokuslar bulunduğundan 2 ayrı multiplekste çalışılmaya karar verildi (Tablo 6a, 6b). Multipleks PCR optimizasyonunda tekli lokus PCR’inde kullanılan PCR mix miktarları ve döngü sayısı belirli oranlarda arttırıldı. Her iki multipleksin primer konsantrasyonları, Tm sıcaklıkları dolayısıyla PCR döngü programı multipleks PCR’ye uygun şekilde optimize edildi.

Primer konsantrasyonları ilk önce tekli lokus PCR’inde kullanılan 3 pmol/ µl’den 2 kat arttırılarak 6 pmol/ µl’ye çıkarıldı. Ancak bazı lokuslarda alel düşmesi ve bazı lokuslarda da çok yüksek pikler elde edildi. Lokuslar arası alel pik yüksekliklerini dengelemek için primer

konsantrasyonları dengelendi. Çeşitli konsantrasyonlarda yapılan denemeler sonucu alel pik yüksekliklerinin en iyi elde edildiği konsantrasyonlar belirlendi (Tablo 9). Böylece tüm PCR koşulları multiplekse uygun hale getirilerek 21 InDel loksu 2 ayrı multiplekste (Multipleks 1 ve Multipleks 2) optimize edildi (Şekil 32,33,34).

21 InDel Lokusunun validasyonunun değerlendirilmesi

21 InDel lokusunun multipleks optimizasyonu tamamlandıktan sonra yöntemin geçerli kılınması için analiz eşiği, dinamik alan, duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik basamakları uygulandı.

Analiz eşiği Multipleks 1 için 103,53 RFU; Multipleks 2 için 80,586 RFU olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre multipleks 1 analizlerinde 103,53 RFU değerinin üzerindeki piklerin; multipleks 2 için 80,586 RFU değerinin üstündeki piklerin alel olarak kabul edilmesi gerektiği belirlendi.

Dinamik alanının ve duyarlılığın belirlenmesi için çeşitli konsantrasyonlarda (0,0125 ng/µl, 0,025 ng/µl, 0,05 ng/µl, 0,125 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,5 ng/µl, 1 ng/µl, 2 ng/µl, 3 ng/µl) 2 multipleks analiz edilerek dinamik alan grafikleri oluşturuldu (Grafik 1,2). Buna göre analiz eşiğinin üstündeki RFU değerinde olup tam profilin elde edilebildiği en az DNA konsantrasyonunun 0,5 ng/µl olarak belirlendi. DNA konsantrasyonu 2-3 ng/µl'ye yükseldiğinde piklerde dengesizlikler gözlemlendi. Dinamik alan için de optimum DNA konsantrasyonu 1 ng/µl olarak belirlendi (Şekil 35-52).

Stokastik eşik için her iki multiplekste tam profilin elde edilebildiği en düşük 2 DNA konsantrasyonundaki (0,5 ng/µl ve 1 ng/µl) heterozigot aleller yani genotipi "InDel" olan

profiller kullanılarak kardeş alel piklerinin birbirine olan oranları sonucunda elde edilen eşik değer multipleks 1’de: 1 ng/μl için 58,73- 0,5 ng/μl için 31,6 multipleks 2’de: 1 ng/μl için 79,03- 0,5 ng/μl için 45,23 olarak belirlendi (Tablo 15). Bu sonuçla kardeş alel pik yükseklikleri oranının multipleks 1’de 31,61; multipleks 2’de 45,23 altına düştüğünde pik dengelerinin bozulacağı ve kardeş alel piki olarak kabul edilemeyeceği belirlendi.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 5 örnek farklı bir analist tarafından farklı bir zamanda çalışılarak analiz edildi ve aynı genotipler elde edildi (Şekil 53a, 53b,54a,54b). Tekrar üretilebilirlik için yine 5 örnek farklı bir laboratuvar ve cihazda çalışıldı ve aynı genotipler elde edildi (Şekil 55a,55b). Bu da bize çalışmanın başka kişiler tarafından ve farklı laboratuvarlarda da çalışılabilir olduğunu göstermektedir.

100 kişiye ait DNA örneğinde 21 InDel multipleksinin çoğaltılması (PCR), elektroforezi ve tiplendirilmesi

Bu çalışma için aydınlatılmış onamları alınmış 100 kişiye ait DNA’dan 99’u başarı bir şekilde izole edilip miktarları belirlenmiştir (Tablo 10). Bu nedenle optimize edilen lokuslar 99 kişi ile çalışılmıştır. InDel genotiplendirmesi 1 kişide hiç yapılamazken 10 kişide de kısmi profil elde edilmiştir. Bunun nedeni DNA’nın nitel ve niceliğinin analize uygun olmamasından kaynaklandığı söylenebilir. 89 kişiye ait DNA örneğinde 21 InDel lokusuna ait tam profil elde edilmiştir (Tablo 20-Ek 3).

21 InDel Lokusunun Türkiye’deki Alel Sıklıklarının Değerlendirilmesi

Adli bilimlerde kullanılan genetik işaretlerin adli kimliklendirmede ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabilmesi için ilgili populasyona özgü gen sıklıklarının belirlenmesi gerekir. Çünkü analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde yapılan istatistiksel hesaplamalarda,

hangi toplumun veri tabanlarının kullanılacağı önemlidir. Olayla ilgisi olduğu düşünölen şüpheli ya da failin ait olduğu toplumun veri tabanının kullanılması gerekir (10,22). Bunun için bu tez kapsamında geliştirilen 21 gonozomal Indel lokusunun Türkiye’de olgu aydınlatmada kullanılabilmesi için alel sıklığını belirlenmesi gerekir. Bu amaçla alel sıklıkları ile ilgili ön bilgi edinmek üzere rızası alınmış 100 kişinin ağız içi sürüntü örnekleri kullanılarak 21 InDel lokusu tiplendirildi (Tablo 20-Ek 3). Arlequin ver 3.5.2.2 kullanılarak alel frekansları, Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olup olmadığı ve diğer popülasyonlarla karşılaştırdı. Ayrıca Powerstat (Promega) programı ile adli istatistiksel parametreler belirlendi.

21 gonozomal InDel lokusuna ait 3 lokusta (MID 229, MID 236, MID184) alel frekanslarının oranlarının (MID 229: 0,08/0,91; MID 236: 0,81/0,18; MID 184: 0,13/0,86) dengeli olmadığı ve heterozigotluk oranlarının düşük olduğu gözlemlendi. Bu lokusların adli istatistiksel parametreleri incelendiğinde alel frekans ve heterozigotluk oranlarına paralel olarak ayırım gücünün de diğerlerine göre daha düşük olduğu saptandı (Tablo 16). Bu da söz konusu lokusların kimliklendirmede en az tercih edilecek lokuslar olduğunu göstermektedir. Lokus içerisindeki alel frekans oranlarının dengeli; heterozigotluk oranlarının ve ayırım gücünün en yüksek olduğu lokuslar MID 243, MID 193, MID 198’dir. Bu lokusların kimliklendirme gücü yüksek olduğundan ileride bu tez kapsamında çalışılan diğer lokusları da içine alacak yeni bir gonozomal InDel multipleksi oluşturularak Türkiye’deki kriminal laboratuvarlarda kullanılabilir.

21 InDel lokusuna ait adli istatistiksel parametreler açısından ayrı ayrı her lokus ele alındığında; 2 lokusun ayırım gücünün düşük olduğu gözlenmiştir (MID229: 0,21; MID111: 0,392). Bu lokuslar dışındaki diğer lokusların ayırım güçlerinin yüksek olduğu saptanmıştır

(Tablo 16). 21 lokus birlikte çalışıldığında PD (Ayrım gücünün) % 99 olduğu saptandı. Buna göre bu lokuslar hem kimliklendirmede hem de akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabilir (Tablo 16).

Türkiye popülasyonuna ait 21 gonozomal InDel lokusunun HardyWeinberg dengesinde olup olmadığı incelendiğinde; birçok lokusta sapma olduğu gözlemlendi bunun için Bonferroni düzeltmesi yapılarak anlamlılık düzeyi $p > 0,000476$ ($0,01/21$) olarak alındı. 7 lokusta (MID 111, MID 218, MID 219, MID 236, MID 357, MID 383 ve MID 586 ve) p değerleri $0,000476$ 'den küçük olduğundan Hardy-Weinberg dengesinden sapma gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni; örneklemin küçük ve homojen toplanmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer 14 lokusta ise beklenenden farklı bir sapma gözlemlenmemiştir. Bu da 14 InDel lokusunun Hardy-Weinberg için Türkiye popülasyonunda dengede olduğunu göstermektedir (Tablo 17).

21 gonozomal InDel lokusunun heterozigotluk oranları da değerlendirilerek, heterozigotluk açısından düşük olan 2 lokus (MID 229: 0,152; MID184: 0,240) olduğu gözlemlendi. Tüm lokusların ortalama heterozigotluk oranının 0,400 olduğu saptandı (Tablo17). Bu da Türkiye popülasyonunda 21 gonozomal InDel lokusunun polimorfik olduğunu göstermektedir.

Marshfield diallelic indels database - Mamalian Genotyping Service veri bankasında (<https://www3.marshfieldclinic.org/mgs/>) bulunan Avrupa, Afrika, Afro-Amerika ve Japonya popülasyonlarının bu tez kapsamında çalışılan 21 lokusun 15'ine ait alel frekansları verileri bulunduğundan karşılaştırma sadece bu lokuslarla yapıldı. Buna göre; 3 lokusta (MID 76, MID356 ve MID 243) Afrika'yla, 1 lokusta (MID 229) Afro-Amerikalılarla, 3 lokusta (MID 227, MID 184, MID 220) Japonya'yla ve 8 lokusta (MID 236, MID 198, MID 357, MID 193,

MID 75, MID 586, MID 111, MID 358) Avrupa'yla gen sıklıklarının yakın olduğu dözlendi. Bu sonuçlara göre genel olarak en çok Avrupa'ya yakın olduğumuz söylenebilir (Tablo 18, Grafik 5,6).

Populasyonlar arası karşılaştırma istatistiksel analiz F_{ST} (F-istatistik) değerlerinin karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır (68). Türkiye ile Avrupa populasyonları arasında Sadece 1 lokusta (MID 75) büyük bir farklılaşma ($> 0,15$) gözlenirken diğer lokuslarda düşük düzeyde farklılaşmalar saptanmıştır (Tablo 19).

Türkiye ile Afrika populasyonu arasında 3 lokusta (MID 75, MID 356, MID 358) çok büyük farklılaşma ($>0,25$) gözlenirken 3 lokusta da (MID 236, MID 193, MID 111) büyük farklılaşma gözlendi. Diğer lokuslarda ise düşük düzeyde farklılaşma gözlendi (Tablo 19).

Türkiye ile Afro-Amerika populasyonu arasında 3 lokusta (MID 75, MID 193, MID 243) çok büyük, 4 lokusta (MID 76, MID 356, MID 357, MID 358) da büyük farklılaşma gözlendi. Diğer lokuslarda ise düşük düzeyde farklılaşma saptandı (Tablo 19).

Türkiye ile Japonya arasında 4 lokusta (MID 75, MID 356, MID 357, MID 193) çok büyük farklılaşma gözlenirken, 3 lokusta (MID 76, MID 243, MID 358) da büyük farklılaşma gözlendi diğer lokuslarda yine düşük düzeyde farklılaşma saptandı (Tablo 19).

MID 75 lokusunun Türkiye ile karşılaştırılan tüm populasyonlarda F_{st} değerlerinde görülen çok büyük farklılıklar nedeniyle bu lokusun Türkiye populasyonuna özgü gen sıklığı içerdiği ve heterozigotluk oranı yüksek olduğu için; bundan sonra biyocoğrafik soyla ilgili yapılacak çalışmalarda kullanılabileceği düşünölmektedir.

21 gonozomal InDel lokusunun benzer çalışmalarla karşılaştırması

Freitas ve ark. yaptıkları çalışmada 33 X InDel multipleks paneli geliştirmişlerdir (69). Çalışmamızın 2 lokusunun (MID356 ve 357) bu çalışmada kullanılan lokuslarla aynı olduğu saptandı. 33 X InDel multipleks panelinin ortalama heterozigotluk oranının 0,373 ve total ayırım gücünün (PD) %99 bildirilmiştir. Çalışmamızdaki 21 InDel lokusunun ortalama heterozigotluk oranı 0,400 ve total ayırım gücü de %99' olup bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Rui ve ark. çalışmalarında 32 X InDel lokusu ile ilgili bir panel geliştirip populasyon çalışması yapmışlardır (70). Çalışmada bir lokusun Hardy-Weinberg dengesine uymadığı, ortalama heterozigotluğun 0,388 olduğu ve tüm lokuslara ait total ayırım gücünün (PD) %99 olduğu bildirilmiştir. Bu tez kapsamında geliştirilen 21 gonozomal InDel paneli ile Rui'nin panelindeki 5 lokus ortaktır (MID111, MID198, MID356, MID357, MID243). Bu 5 lokustaki heterozigotluk oranları da benzerdir. Bu tez çalışmadaki 21 lokusunun 2 tanesi dışında (MID229, MID184) hepsinin alel frekansının 0,2'den büyük seçilmiş olup, ortalama heterozigotluk oranı 0,400, total ayırım gücü ise %99'dur.

Rui ve arkadaşlarının otozomal 38 InDel lokusundan oluşan diğer bir multipleks çalışmaları (6) Genomica firması ile ortak girişim ile hazır ticari InDel kiti olarak piyasada "InDelPlex INDEL Polymorphism Detection Kit" olarak yer almıştır. Bu kitin içerdiği 38 InDel lokusunun her birinin heterozigotluğu 0,30'un üstünde, ortalama heterozigotluğun 0,450 ve total ayırım gücünün (PD) %99 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki 21 gonozomal InDel lokusunun her bir lokusunun ayırım gücü 2 lokus hariç (MID 229 ve MID 184) 0,4 ve üstü, total heterozigotluğu 0,400 ve total ayırım güçleri %99'dur.

Düvenci 2015 yılında Qiagen firmasına ait olan hazır ticari otozomal InDel kitini (Investigator DIPplex Kit) kullanarak 30 otozomal InDel lokusunun Türkiye'deki gen sıklığını belirlemiştir (71). Buna göre: minimum alel frekansı 0,324, Türkiye popülasyonu için ortalama heterozigotluğun 0,487 ve total ayırım gücünün %99 olduğunu tespit etmiştir. Adli istatistiki parametreler açısından değerlendirildiğinde çalışmamızla uygunluk göstermektedir.

Bu tez ile benzer bir diğer çalışma ise Zhang ve arkadaşlarının 2015 yılında geliştirdikleri 18 X kromozomuna ait multiplekstir (72). Bu çalışmada 18 X kromozomuna ait InDel multipleksin total ayırım gücünün %99 olduğu bildirilmiştir. Bu tez kapsamında geliştirilen 21 gonozomal InDel paneli ile Zhang ve arkadaşlarının çalışmasının adli istatistiki parametreler açısından benzer olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak:

Bu tez kapsamında geliştirilen 21 lokuslu InDel multipleks panelinin heterozigotluk oranının ve ayırım gücünün yüksek olması, PCR ampikon uzunluklarının 60-160 bp boyutunda olması ve optimum 1ng/ µl DNA ile çalışılabilmesi nedeniyle olay yerinden gelen beklemiş ve eser miktardaki biyolojik örneklerde başarılı tiplendirme olasılığı yüksektir. Ayrıca 21 lokuslu multipleks ile kimliklendirme için gerekli ayırım gücüne ulaşılabildiği için kimliklendirmede, soy tayininde ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde günümüzde kullanılan STR ve SNP lokuslarıyla birlikte veya tek başına kullanılacak bir multipleks panel geliştirilmiştir. Bu multipleks panelin Türkiye'deki kriminal laboratuvarlarda rutinde çalışılabilmesi için Türkiye'nin genelini yansıtabilecek şekilde 200-250 kişide çalışılarak Türkiye'deki alel frekanslarının yeniden belirlenmesi gerektiği önerilmektedir.

7. Kaynaklar

1. Chan L. Advances in molecular biology with applications in clinical medicine, *Klin Lab.* 1992; 38: 2-4.
2. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey T, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats, *Genomics.* 1992; 12: 241-53.
3. Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71 (4) 854–862.
4. Aşıcıoğlu F. X Kromozomal STR Polimorfizmi ve Türk Toplumundaki Alel Frekansları. [PhD Tezi] İstanbul Üniversitesi: İstanbul, 2006.
5. Coble MD, Butler JM. Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Science.* 2005; 50: 43-53.
6. Pereira R, Phillips C, Cíntia AA, Amorim Carracedo A, Gusma L.. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms, *Electrophoresis.* 2009; 30:3682-3690.
7. Pereira R, Phillips C, Cíntia AA, Amorim Carracedo A, Gusma L. Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications, *Forensic Science International; Genetics Supplement Series.* 2009; 2:513-515.
8. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, Batista dos Santos SE, Amorim A, Carracedo A, Gusma L. Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing, *plos one.* 2012; 7: e29684
9. Reiner AP, Ziv E, Lind DL, Nievergelt CM, Schork NJ, Cummings SR, Phong A, Burchard EG, Harris TB, Psaty BM and Kwok PY. Population structure, admixture, and aging-related phenotypes in African American adults: the Cardiovascular Health Study, *Am J Hum Genet.* 2005; 76:463–477.

10. Martínez-Cortés G, Gusmão L, Pereira R, Salcido VH, Favela-Mendoza AF, Muñoz-Valle JF, Inclán-Sánchez A, López-Hernández LB, Rangel-Villalobos H. Genetic structure and forensic parameters of 38 Indels for human identification purposes in eight Mexican populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 17:149-52.
11. Bülbül Ö, Duvenci A, Zorlu T, Gurkan C, Phillips C, Lareu MV, Filoglu G. Studies of East European populations with a 46-plex ancestry-informative indel set”, *Forensic Science International-Genetics*, 2015; 5: 16-18
12. Manta F, Caiafa A, Pereira R, Silva D, Amorim A, Carvalho EF, Gusmão L. "İNDEL markers: Genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material". *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(5): 658-661.
13. Robertson J, Ross AM, Burgayne LA. *DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications.* London. 1990.
14. Jeffreys AJ, Wilson V. Thein SL. Hypervariable “minisatellit” regions in human DNA, *Nature.* 1985; 314: 67-73.
15. Robertson J, Ross AM, Burgayne LA. Properties of hypervariable single locus polymorphism and their application to identity testing. *DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications.* Editör: Balazs, I. London: Taylor& Francis e-library. 2002.
16. Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirnady F. DNA typing in forensic science I. Theory and background. *Am J Forensic Med Pathol.* 1994; 15:269-82.
17. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am J Hum Genet.* 1989; 44: 388-96.
18. Filoğlu G7 Tetrametrik STR lokusunun kriminal identifikasyondaki önemi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul. 1999.

19. Unsal T, Filoglu G, Altuncul H, Dastan K, Bulbul O. Profiling of 6 mini STR loci (D1S1677,D2S441,D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) on blood spots waited on various surfaces, *Medicine Science International Medical Journal*; Available online 23.08.2016 with doi: 10.5455/medscience.2016.05.8521. basımda.
20. Bülbül Ö, Argaç D, Shahzad MS, Filoğlu G, Altunçul H. Kimliklendirme ve Nesep Tayini için Otozomal SNP Lokuslarının Belirlenmesi. *Turkiye Klinikleri J Foren Med.* 2013; 10(1): 7-13.
21. Hongbao M. Development Application of Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of American Science.* 2005; 1(3): 1-47.
22. Brinkmann B. The use of STR's in stain analysis, *Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Madison, USA. 1992; 357: 73.
23. AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User's Guide Life Technologies, USA. 2009.
24. Sprecher C, Krenke B, Amiott B, Rabbach D, Grooms K. Profiles in DNA, Promega Corporation. 2000; 4(1): 3-6.
25. Investigator® ESSplex Plus Handbook. For multiplex amplification of the new European standard set of loci, plus Amelogenin, Qiagen, Germany. 2013.
26. GlobalFiler™ PCR Amplification Kit User Guide. Life Technologies, USA. 2016.
27. PowerPlex® Fusion 6C System Performance Packed. Promega Corporation, USA. 2016.
28. Investigator® 24plex QS Handbook. Qiagen, Germany. 2014.
29. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide, Life Technologies, USA. 2007.
30. Yfiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide. Life Technologies, USA. 2014.

31. PowerPlex® Y23 System Technical Manuel. Promega Corporation, USA. 2016.
32. Investigator® Argus Y-12 QS Handbook. Qiagen, Germany. 2015.
33. Investigator® Argus X-12 QS Handbook. Qiagen, Germany. 2015.
34. Filoglu G, Sah I, Dogan M, Nalcaoglu SB, Tavaci I, Bulbul O, Unsal T. Application of Next Generation Sequencing in Forensic Science, *Medicine Science International Medical Journal*, doi: 10.5455/medscience.2016.05.8518. basımda.
35. Guangyao, F, Yi Y, Haibo L, Yiping H. Screening of Multi-InDel markers on X-chromosome for forensic purpose”, *Forensic Science International-Genetics*. 2015; 5: 42-44.
36. Investigator® DIPplex Handbook. For multiplex amplification of 30 deletion/insertion polymorphisms, plus Amelogenin. Qiagen, Germany. 2014.
37. Campbell NA, Williamson B, Heyden RJ. *Biology: Exploring Life*, Pearson Prentice Hall; 2006 edition, ISBN-13: 978-0132508827. 2006; 11(6): 242-243.
38. Gordon A., Egner S. *Dynamic Biology for high school*, Sapling Learning, ISBN 1940789575, 9781940789576. 2013; 6 (3): 211-223.
39. Rodriguez-Murillo L. ve Salem RM. Insertion/Deletion Polymorphism. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. 2013; 1: 1076-1076.
40. Kondrashov AS, Rogozin IB. Context of deletions and insertions in human coding sequences. *Hum. Mutat*. 2004; 23 (2): 177–85.
41. Gelbart WM, Lewontin RC, Griffiths AJF, Miller JH. *Modern genetic analysis: integrating genes and genomes*, New York: W.H. Freeman and CO. ISBN 0-7167-4382-5. 2002; p. 736.
42. Gregory TR. Insertion-deletion biases and the evolution of genome size. *Gene*. 2004; 324: 15–34.

43. Gonzalez KD, Hill KA, Li K, ve ark. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline, *Hum. Mutat.* 2007; 28 (1): 69–80.
44. Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, Van Asch B, Pinto N, Gusmao L, Amorim A. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences, *Nucleic Acids Research.* 2010; 38 (22): e203–e203.
45. Szibor R, Hering S, Edelmann J. A new web site compiling forensic chromosome X research is now online. *Int J Legal Med.* 2005; 25:1–3.
46. Prinz M. ve Sansone M.Y. Chromosome-specific Short Tandem Repeats in Forensic Casework. *Croatian Medical Journal.* 2001; 42(3): 288-291.
47. Roewer L, Kayser M, de Knijff P, Anslinger K, Corach D, Füredi S, Geserick G, Henke L, Hidding M, Kärger HJ, Lessig R, Nagy M, Pascali VL, Parson W, Rolf B, Schmitt C, Szibor R, Teifel-Greding J, Krawczak M. A new method for the evaluation of matches in recombining genomes: application to Ychromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males. *Forensic Science International.* 2000; 114: 31-43.
48. Corach D, Risso FL, Marino M, Penacino G, Sala A. Routine YSTR typing in forensic casework. *Forensic Science International.* 2001; 118: 131-135.
49. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. editörler. *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press, 1990; 3-22.
50. Hadidi A, Levy L, Podleskis EV. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology.* Singh RP, Singh US, Raton B. Editörler. CRS Press. 1995; 167-187.
51. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 1976; 127 (3): 1550–7.

- 52.** Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239 (4839): 487–91.
- 53.** Henson JM, Ve Frech R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*. 1993; 31: 81-109.
- 54.** Newton CR. PCR essential data. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 1995; 75-81.
- 55.** Ünsal T, Filoğlu G, Sipahi E, Rayimoğlu G, Altunçul H. New Mini STR Loci D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Validation And Optimization On Blood and Blood Spots. *Forensic Science International: Genetics Supplement*. 2011; 3(1): 473-474
- 56.** Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Çeviri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M.). DNA ve kromozomlar. Hücrenin moleküler biyolojisi. Tüba Yayınları. 2008; 191-197.
- 57.** Klug WS, Cummings MR, Spencer C. DNA'nın yapısı ve analizi. Genetik kavramlar. Öner C. Editör. Palme Yayıncılık. 2009; 241-257.
- 58.** Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*. 1993; 3(3): 530-537.
- 59.** Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition. New York. 1992; 79-98.
- 60.** Erlich HA, Gelfand DH, Sninsky JJ. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*. 1991; 252:1643-1650
- 61.** Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*. 2008; 9(80): 1-12.

- 62.** ENFSI DNA Working Group. Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process. 2010; 001: 1-11
- 63.** Holt CL, Buoncristiani M, Wallin JM, Nguyen T, Lazaruk KD, Walsh PS. TWGDAM validation of AmpF&STR™ PCR amplification kits for forensic DNA casework. *J Forensic Sci.* 2002; 47(1): 66–96.
- 64.** Laurin N, Fre'geau C. Optimization and validation of a fast amplification protocol for AmpF&STR1 Profiler Plus1 for rapid forensic human identification. *Forensic Science International: Genetics.* 2012; 6: 47–57.
- 65.** Magnusson B. and Örnemark U. Eurachem Guide: Method performance characteristics. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.* 2014; 20-28 ISBN 978-91-87461-59-0.
- 66.** AutoMate Express™ DNA Extraction System User Guide. Life Technologies, USA. 2010.
- 67.** Qubit ssDNA Assay Kit Quick Reference Card. Life Technologies, USA. 2010.
- 68.** Wright S. Genetical structure of populations. *Nature.* 1950; 166 (4215): 247–9.
- 69.** Freitas NSC, Resque RL, Ribeiro-Rodrigues EM, Guerreiro JF, Santos NPC, Ribeiro-dos-Santos Â, Santos S. X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel. *Int J Legal Med.* 2010; 124: 589–593.
- 70.** Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A, Prata M J, Carracedo Á, Gusmão L. A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *Int J Legal Med.* 2012; 126: 97–105.
- 71.** Duvenci A. 30 İnsersiyon/Delesyon (INDEL) Lokusunun Türkiye'deki Polimorfizmi. [M.Sc Tezi] İstanbul Üniversitesi: İstanbul, 2015
- 72.** Zhang S, Sun K, Bian Y, Zhao Q, Wang Z, Ji C, Li C. Developmental validation of an X-Insertion/Deletion polymorphism panel and application in HAN population of China. *Nature / Scientific Reports.* 2015; 5 (18336): 1-7.

8. EKLER

EK 1. Aydınlatılmış Gönüllü Olur Formu

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde doktora tezi amacıyla yapılacak bir araştırmaya katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edinebilirsiniz.

Gonozomal InDel Lokuslarına Ait Multipleks Kit Geliştirilmesi

Adli bilimlerde babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve kriminal araştırmalarda olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin (kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, tükürük, tükürük lekesi kıl, kemik v.s) kimliklendirilmesi DNA analizleri ile yapılmaktadır. Kimliklendirmede, genellikle STR genetik işaretlerinden yararlanılmaktadır. Bu lokuslar halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen aşırı derecede bozunmuş biyolojik örneklerde tipleme sorunları yaşanabilmekte ve sonuç alınamamaktadır.

Son dönemlerde insersiyon-delesyon (InDel) sonucu meydana gelen kalıtsal değişiklikler de, insan genomunda genetik işaret olarak kullanılabilir. İnsersiyon/delesyon polimorfizmi insan genomunda tek bir bazın eklenmesi veya kaybolması şeklinde oluşur ve genomun yapısında değişikliğe sebep olur. InDel genomda sıklıkla görülür. InDel, insersiyon ve delesyon polimorfizmi, nokta mutasyonu olarak da adlandırılır. Tek veya birkaç bazın insersiyon veya delesyona uğraması polimorfizme neden olur ve adli bilimler için oldukça önemlidir. İnsersiyon/delesyon polimorfizminin (InDel) heterozigotluk oranının yüksek olması ayrıca dışlama ve ayırım gücünün diğer genetik işaretlerden daha yüksek olmasından dolayı, tercih edilmektedir. Ülkemizde STR, SNP ve InDel'lere ait optimizasyon, validasyon çalışmaları tamamlanmış hatta bu genetik işaretlere ait hazır ticari kit bulmak mümkündür. Ancak InDel konusunda hâlihazırda yalnızca otozomal InDel'lere özgü çalışmalar mevcuttur. Henüz gonozomal InDel üzerine çalışma yapılmamıştır.

Türkiye'de zorlu örneklerde kimliklendirmeye yardımcı olmak amacıyla gonozomal InDel bölgelerine ait multipleks bir kit geliştirilmesi amacımızdır.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. 6698 sayılı kanununun 11. Maddesi uyarınca öğrenme, bilgi talep etme, düzeltilmesini talep etme ve verileri yok etme hakkınız bulunmaktadır. Araştırmaya katıldığınızda, araştırmanın herhangi bir aşamasında bir gerekçe göstermeksizin ayrılabilirsiniz. Bunun için herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalması söz konusu değildir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Alınan kişisel veriler, hukuka ve dürüslük kurallarına, bilimsel çalışma kurallarına uygun olarak, işbu proje kapsamında ve projenin yapılması amacı ile sınırlı ve ölçüde anonim olarak kullanılacaktır. Kişisel veriler işbu projenin yapılıp bitirilmesi için gerekli olan süre ile sınırlı olarak muhafaza edilecektir. Kişisel veriler projenin sona ermesini müteakip proje yürütücüsü tarafından silinecek veya anonim hale getirilecektir.

Sizden araştırma ile ilgili herhangi bir para talebinde bulunulmayacağı gibi kendisine de ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumundan (SGK)dan herhangi bir ücret alınmayacaktır.

Araştırmanın sizin açınızdan hedeflenen herhangi bir klinik yararı bulunmamaktadır.

Araştırma konusu ile ilgili ve sizin araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde siz ya da yasal temsilciniz zamanında bilgilendirilecektir.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verilmektedir.

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü; 50-100 kişidir. Sizden pamuklu çubukla ağızdan sürüntü örneği alınacaktır. Sizden elde edilecek olan biyolojik materyal; proje yürütücüsü tarafından tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Araştırma ile ilgili analizler İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Öğrenci Laboratuvarında yapılacaktır.

Kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi almak istediğinizde, sorumlu araştırmacı Tuğba Ünsal'dır. Araştırmacıya günün 24 saatinde erişebilecek telefon numarası; 0(532) 7149285 'tir.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen görevli tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“Gonozomal InDel Lokuslarına Ait Multipleks Kit Geliştirilmesi” doktora tez çalışması kapsamında alınan ağız içi sürüntü-tükürük örneğinin (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

Gönüllünün Adı Soyadı:

Gönüllünün İmzası

Tarih:

Yetkin Araştırmacının Adı-Soyadı: Tuğba Ünsal

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

EK 2. Etik Kurul Kararı



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI



Sayı : 83045809/604.01/02 - 2/288
Konu:


İstanbul .../.../.....

10 Şubat 2015

I.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğüne

İlgi: 19.01.2015 tarih, 86669574-050.99-16667sayılı yazınıza:

Enstitünüz öğretim üyesi **Yard.Doç.Dr.Gönül FİLOĞLU'nun** danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Tuğba ÜNSAL'ın** yürütücülüğünde "**Gonozomal İndel Lokuslarına Ait Multipleks Kit Geliştirilmesi**" başlıklı **Doktora Tezi** çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **03 Şubat 2015** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; **Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)** desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim


Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:
1 dosya

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34098 Cerrahpaşa / İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:ctfetik@istanbul.edu.tr

Ek 3. 21 InDel Lokusuna Ait Genotipler

Tablo 20. 21 InDel Lokusuna Ait Genotipler

Örnek No	MID 76	MID 229	MID 356	MID 236	MID 198	MID 357	MID 227	MID 193	MID 243	MID 218	MID 184	MID 75	MID 586	MID 111	MID 383	MID 395	MID 359	MID 220	MID 1556	MID 219	MID 358
1	Del	Del	Del	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Del	Ins	Del	Del
2	Indel	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Del	Ins	Indel	Del
3	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	-	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
4	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Del	Del	Ins	-	-	Del	Del	Del	-	-	-	Ins	-
5	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Del	-	Del	Ins	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Ins	Del
6	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	-	Indel	Indel	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	Ins	Del
8	Ins	Ins	Del	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Indel	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del
9	Indel	Ins	Ins	Indel	Del	Ins	-	Indel	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
10	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Del
11	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	-	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Del
12	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	-	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	-	Indel	Del
13	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	-	Ins	Indel	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	Ins	Del
14	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Indel	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	Ins	Ins
15	Indel	-	Del	Del	Del	Del	Indel	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Ins	Del
16	Indel	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del
17	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins
18	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Indel	-	Indel	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Del	Indel	Del	Ins	Ins	Del	Indel
19	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	-	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Del
20	Indel	Ins	Del	Del	Indel	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Del
21	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	Ins	Indel	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Del	Del	Ins	Del	Del
22	Ins	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Indel	Ins	Del
23	Del	Del	Ins	Del	Indel	Ins	-	Ins	Indel	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	Del	Del
24	Indel	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Indel	Del
25	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Indel	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Ins	Indel

Örnek No	MID 76	MID 229	MID 356	MID 236	MID 198	MID 357	MID 227	MID 193	MID 243	MID 218	MID 184	MID 75	MID 586	MID 111	MID 383	MID 395	MID 359	MID 220	MID 1556	MID 219	MID 358
26	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	-	Ins	Del	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Del	Indel	Del	Ins	Del	Indel	Del
27	Indel	-	Del	Del	Indel	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
28	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	-	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Indel
29	Ins	-	Ins	Del	Indel	Ins	-	-	Indel	Del	Ins	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	Ins	Del
30	Del	Ins	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del
31	Ins	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Indel	Indel	Indel	Del
32	Del	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins	Indel	Ins	Del	Indel	Indel	Del	Del
33	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Del	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del
34	Indel	-	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
35	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	-	Del	Indel	Indel	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel
36	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	Del	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	-	Del	Ins	Indel
37	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
38	Ins	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins	-	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	Ins	Indel
39	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Indel	Indel	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
40	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	Indel	Indel	Indel	Ins	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Indel	Indel
41	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Ins	-	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Ins	Del	Del	Del	Indel	Ins	Indel
42	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	-	Del	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Indel	Del
43	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	-	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel
44	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	-	Ins	Indel	Del	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	Del	Ins	Del	Del	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	-	Indel	Indel	Indel	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Indel	-	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Del	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	-	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Indel
50	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del

Örnek No	MID 76	MID 229	MID 356	MID 236	MID 198	MID 357	MID 227	MID 193	MID 243	MID 218	MID 184	MID 75	MID 586	MID 111	MID 383	MID 395	MID 359	MID 220	MID 1556	MID 219	MID 358
51	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Indel	-	Ins	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Del	Indel	Del	Indel
52	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del	Del	Ins	Ins
53	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Indel	Del	Del	Del	Ins	Del	Del	Ins	Del	Del	Del	Ins	Del
54	Del	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins	-	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	-	Indel	Del	Ins	Del
55	Del	Ins	Del	Del	Ins	Del	-	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	Del	Del
56	Ins	Ins	Ins	Ins	Indel	Ins	Indel	Ins	Indel	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Del
57	Ins	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Ins
58	Del	Ins	-	Ins	Del	Ins	-	Indel	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Indel
59	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	-	Ins	Del	Indel	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	Indel
60	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Ins	Ins	Del
61	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	Indel	Ins	Ins	Del
62	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	Del	Del	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Ins	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Del
63	Indel	Ins	Ins	Indel	Indel	Indel	-	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Indel	Ins
64	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Del	Indel	Del	Del	Del
65	Indel	Indel	Indel	Del	Del	Indel	-	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Del	Indel	Del
66	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	-	Indel	Del	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Del
67	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Del	Indel
68	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Del	Del	Ins	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	-	Indel	Del	Indel	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	Ins	Del
70	Ins	Ins	Ins	Del	Indel	Del	-	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del	Del	Ins	Ins
71	Indel	Ins	Del	Del	Indel	Del	-	Indel	Del	Del	Ins	Indel	Ins	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel
72	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Indel	Ins	Del
73	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Ins
74	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	-	Indel	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins
75	Indel	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	-	Indel	Del	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Ins

Örnek No	MID 76	MID 229	MID 356	MID 236	MID 198	MID 357	MID 227	MID 193	MID 243	MID 218	MID 184	MID 75	MID 586	MID 111	MID 383	MID 395	MID 359	MID 220	MID 1556	MID 219	MID 358
76	Del	Ins	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Indel	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Ins	Ins	Indel
77	Ins	Ins	Del	Del	Del	Indel	-	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Del	Del	Indel	Ins	Indel
78	Del	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Indel	Indel	Indel	Indel	Del	Del	Ins	Ins	Indel
79	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Indel	Del	Del	Indel	Del	Ins	Indel	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Del	Indel
80	Del	Ins	Del	Del	Indel	Indel	-	Ins	Indel	Del	Ins	Del	Indel	Del	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Indel	Indel
81	Del	Indel	Ins	Del	Del	Ins	-	Del	Del	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Del	Indel
82	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Indel	-	Ins	Indel	Indel	Ins	Del	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Ins
83	Del	Indel	Ins	Del	Indel	Del	-	Del	Indel	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Del
84	Del	Indel	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Ins	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Del
85	Del	Ins	Ins	Del	Indel	Del	-	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Del	Indel	Ins	Indel	Del	Indel	Ins	Indel
86	Indel	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	-	Ins	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Indel	Indel	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Del
87	Del	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Del	Ins	Indel	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins
88	Del	Ins	Ins	Indel	Indel	Indel	-	Ins	Del	Del	Indel	Del	Del	Ins	Ins	Indel	Del	Del	Indel	Ins	Del
89	Ins	Ins	Indel	Del	Indel	Indel	-	Ins	Del	Del	Indel	Indel	Ins	Del	Indel	Indel	Del	Indel	Del	Ins	Indel
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Ins
91	Del	Ins	Ins	Del	Del	Indel	Del	Del	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Del	Ins	Del
92	Indel	Ins	Ins	Del	Del	Ins	-	Indel	Del	Indel	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Indel
93	Del	Ins	Indel	Del	Ins	Ins	-	Ins	Del	Indel	Ins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	Del	Ins	Ins	Del	Ins	Ins	Indel	Ins	Del	Indel	Ins	Del	Ins	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Ins	Ins
95	Indel	Ins	Indel	Del	Del	Ins	-	Ins	Del	Del	Ins	Indel	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Ins	Indel	Ins	Del
96	Indel	Indel	Ins	Del	Del	Ins	-	Ins	Ins	Indel	Indel	Del	Indel	Ins	Indel	Ins	Del	Del	Indel	Ins	Del
97	Del	Ins	Indel	Del	Indel	Ins	-	Del	Del	Indel	Ins	Del	Indel	Indel	Ins	Indel	Del	Indel	Ins	Indel	Del
98	Ins	-	Ins	Ins	Ins	Del	Indel	Ins	Ins	Del	Ins	Del	Ins	Ins	Ins	Ins	Del	Del	Ins	Ins	Ins

EK 4. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğba ÜNSAL

Doğum Tarihi: 08.05.1986

Doğum Yeri: Sinop

E-posta: tugbaunsal86@gmail.com

EĞİTİM DURUMU:

- İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Doktora programı (2011-halen)
- İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Yüksek lisans programı (2008 - 2011)
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004 - 2008)
- Antalya Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesi (2000 - 2004)

YÜKSEK LİSANS BİTİRME TEZİ:

D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni Mini STR Lokuslarının Kan Ve Kan Lekelerinde Optimizasyonu, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, 2010

LİSANS BİTİRME TEZİ:

Havasal Kaynaklı 2.22.2 Kodlu Aktinomiset Suşundan Fermentasyonla Antibiyotik Üretimi Ve Antibiyotik Üretimini Artırılmasında Deneysel Tasarım Kullanılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2008

YAYINLARI:

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities) Kapsamına Girmeyen

- Ünsal T., Filoğlu G., Sipahi E., Rayimoğlu G., Altunçul H. (2011) New Mini STR Loci D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Validation And Optimization On Blood And Blood Spots Forensic Science International: Genetics Supplement 3 (1) 473-474
- Sipahi E., Filoğlu G., Ünsal T., Altunçul H. (2011) Allel Frequencies Of NC02 Multiplex STR Loci (D1S1677, D2S441, D4S2364) In Turkey Forensic Science International: Genetics Supplement 3 (1) 538-539

- Filoglu G., Sah I., Dogan M., Nalcaoglu S.B., Tavaci I., Bulbul O., **Unsal T.** (2016) “Application of Next Generation Sequencing in Forensic Science”, Medicine Science International Medical Journal, doi: 10.5455/medscience.2016.05.8518 **basımda**
- **Unsal T.**, Filoglu G., Altuncul H. Dastan K., Bulbul O. (2016) “Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinde 6 Mini STR Lokusunun (D1S1677,D2S441,D4S2364,D10S1248,D14S1434,D22S1045) Profillendirilmesi”, Medicine Science International Medical Journal, doi: 10.5455/medscience.2016.05.8521 **basımda**

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

- **Ünsal T.**, Filoğlu G., Sipahi E., Rayimoğlu G., Altunçul H. New Mini STR Loci D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Validation And Optimization On Blood And Blood Spots 24th Congress of the International Society for Forensic Genetics August 29, to September, 3 2011 - Vienna, Austria
- Sipahi E., Filoğlu G., **Ünsal T.**, Rayimoğlu G., Altunçul H. Allel Frequencies Of NC02 Multiplex STR Loci (D1S1677, D2S441, D4S2364) In Turkey 24th Congress of the International Society for Forensic Genetics August 29, to September, 3 2011 - Vienna, Austria
- **Ünsal T.**, Filoglu, G., Rayimoglu G., Bulbul Ö., Altuncul H. Profiling Of 6 New Mini STR Loci (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677) On Waited Blood Spots, Int J Legal Med 126 (Suppl 1): 347, 2012.
- **Unsal T.**, Filoglu G., Bulbul O., Asicioglu F. “X Kromozomuna Bağlı Multipleks 20 InDel Lokusunun Optimizasyonu ve Adli Kimliklendirmede Kullanımı”, 1. Uluslararası TURAZ AKADEMİ Adli Tıp ve Patoloji Kongresi, Sözel bildiri, 13-16 Ekim 2016- Bakü, Azerbaycan
- Salman Yılmaz S., Filoglu G., **Unsal T.** “Yeni Nesil Dizilemede İş Akışı ve Adli Genetikte Kullanımı”, Poster, 1. Uluslararası TURAZ AKADEMİ Adli Tıp ve Patoloji Kongresi, 13-16 Ekim 2016- Bakü, Azerbaycan.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

- İlhan S., Yenice Gürsu B., **Ünsal T.**, Altın A. Ve Filik İşçen C., Antibiyotik Üretiminin Arttırılmasında Deney Tasarımı Kullanılarak Besinsel Gereksinimlerin Taranması 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon,2008
- **Ünsal T.**, Daştan K., Erkan I., Çavuş F., Rayimoğlu G., Yükseloğlu E. H. Adli Laboratuvarlarda İnsan Kimliklendirme için Yeni Nesil Sekans Sistemi Uygulamaları, 12. Adli Bilimler Kongresi Bildirisi, Üniversitesi, Isparta,2015
- Daştan K., Erkan I., **Ünsal T.**, Çavuş F., Rayimoğlu G. , Yükseloğlu E.H Isıtılan Kemığın DNA Çekitlemesi ve Verimliliği Açısından Değerlendirilmesi, 12. Adli Bilimler Kongresi Bildirisi, Isparta, 2015
- **Ünsal T.**, Daştan K., Yükseloğlu E.H. Türkiyedeki Adli Vakalarda CSI Etkisi, 13. Adli Bilimler Kongresi Bildirisi, Bodrum, 2016
- Karataş Arslan Z., Erkan I., Daştan K., **Ünsal T.**, Yükseloğlu E. H., Adli Olgularda Acil Servis Çalışanlarının Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi”, 27-30 Nisan 2016, 13. Adli Bilimler Kongresi, Bodrum, 2016
- **Ünsal T.** Gonozomal InDel Lokuslarının Adli Kimliklendirmede Kullanımı, Adli Genetik ve Hukuki Boyutu Sempozyumu, Sözlü bildiri, 9 Nisan 2016, İstanbul