

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
Danışman: Yard. Doç. Dr. E. Hülya Yükseloğlu

**OLAY YERİNDE BULUNAN
BAKTERİYEL KONTAMİNASYONA MARUZ KALAN
DIŞKI ve İDRAR ÖRNEKLERİNDE
DNA TIPLENDİRİLMESİ**

**FEN BİLİMLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yasemin Beril Orhanel
Biyolog**

İstanbul – 2012

Bu Tez, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje Numarası: 4476

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bilgilerinden istifade ettiğim, Enstitü’de okuma şansı veren
Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Salih CENGİZ’e,
Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte değerli vaktini ve bilimsel
desteğini sunan, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde
katkılarıyla beni yönlendiren, tez danışmanım ve hocam
Yard. Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU’na,
Tezimin Mikrobiyoloji kısmında desteğini esirgemeyen değerli hocam
Yard. Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN’a
Eğitimim aşamasında bilgilerinden yararlandığım
Yard. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU’na ve Yard. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL’a ve
Enstitüdeki bütün hocalarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar aşamasında beni yalnız bırakmayan, büyük yardımlarını gördüğüm
Biyolog Fulya Eylem YEDİAY’a,
Eğitimim süresince birlikte olduğum, dostum Ayşegül ÖZTUNÇ’a,
Okumalar sırasında yardımcı olan değerli bölüm arkadaşlarım İtir ERKAN ve Eylem GÜL’e,
Mikrobiyoloji Laboratuvar çalışmasında yardımını esirgemeyen Filiz Ekim ÇEVİK’e ve
Enstitü çalışanlarına dostlukları için teşekkürler.

Her zaman yanımda olan aileme, iyi ve kötü günümde her zaman yanımda olduğunu
bildiğim, beni benden çok düşünen, hakkını ne yapsam ödeyemeceğim anneme,
maddi ve manevi her türlü desteği veren babama,
kardeşi olduğu için kendimi hep çok şanslı saydığım ablama
çok teşekkür ederim.

Yasemin Beril ORHANEL

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
TABLolar LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Olay Yeri.....	3
2.2. Gaita	5
2.3. İdrar	8
2.4. Adli Bilimlerde Gaita Örneklerinin Önemi	9
2.5. Adli Bilimlerde İdrar Örneklerinin Önemi	11
2.6.1. Normal Flora	14
2.6.2. Barsak Kanalının Florası	15
2.6.3. Genitoüriner Kanalın Florası.....	17
2.7. Bakteriyel Kontaminasyon	17
2.7.1. Bakteriyel Enzimler.....	17
2.7.2. Bakteri ve İnsan DNA'sı.....	19
2.8. STR (Short Tandem Repeat - Ardışık Kısa Tekrarlar) ve DNA Tipleme si	20
2.9. AMPFISTR ® SGM Plus ™ Sisteminin İçerdiği Lokuslar.....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	25
3.2. Deneyde kullanılan Ticari Kitler	25
3.2.1. Çekitleme Aşaması'nda Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kit	25
3.2.2. Miktar Ölçümü İçin Kullanılan Ticari Kit.....	26
3.2.3. PCR Aşamasında Kullanılan Ticari Kit.....	26
3.2.4. Bakteriyel Kontaminasyon Çalışması için Kullanılan Besiyeri	26
3.3. DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ	26
3.3.1. Chelex İle Yanak İçi Epitel Sürüntüsünden DNA Çekitlemesi	26
3.3.2. Gaita Örneklerine Uygulanan Çevre Şartları	27
3.3.3. QIAamp DNA Stool Mini Kit İle Gaitadan DNA Çekitlemesi	30
3.3.4. İdrar Örneklerine Uygulanacak Çevre Şartları.....	31
3.3.5. Chelex İle İdrardan DNA İzolasyonu	33
3.4. DNA MİKTAR TAYİNİ	34
3.4.1. The Quant-iT™ Assay Kit ile DNA İzolatlarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	34
3.4.2. Quant-iT™ ssDNA HS Assay Kit ile DNA Konsantrasyon Belirlenmesi	34
3.4.3. Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA Konsantrasyon Belirlenmesi.....	35
3.5. PCR YÖNTEMİ	36
3.5.1. PCR Primerlerinin Seçimi	37
3.5.2. PCR Karışımının Hazırlanması	40
3.5.3. PCR Döngü Parametreleri	41
3.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Yürütülmesi	42
3.7. KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ	43
3.7.1. Örneklerin Yükleme ve Yürütme İçin Hazırlanması.....	43
3.7.2. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	43

3.7.3 Analizi Tamamlanan Örneklerin Sonuçlarının Görüntülenmesi	44
3.8 Gaita ve İdrar Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi	45
3.8.3 Gaita ve İdrar Örneklerinin Kültüre Edilmesi	45
4. BULGULAR	49
4.1 Gönüllü Bilgileri ve Gaita Örneklerinin DNA Miktarlarının Karşılaştırılması	50
4.2 Gönüllü Bilgileri ve İdrar Örneklerinin DNA Miktarlarının Karşılaştırılması	52
4.3 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Yürütülmesi	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. ÖZET	79
7. SUMMARY	81
8. KAYNAKLAR	82
EKLER	89
EK 1. Örnek Davalar	89
EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu	90
EK 3. Matriks Dosyasının Oluşturulması	91
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:	İnsan Sindirim Sistemi, Gaitanın Oluşumu ve İçindeki Sıvının Emilmesi	5
Şekil 2:	Üriner Sistem	8
Şekil 3:	İnsandaki Normal Flora Dağılımı	14
Şekil 4:	İntestinal Mikroflora	16
Şekil 5:	AmpFISTR® SGM Plus™ Multipleks Sisteminin İçerdiği Lokuslar	23
Şekil 6:	Gönüllünün Kullandığı Gaita Bulaşmış Kağıt Peçeteden Örnek Alımı	28
Şekil 7:	Dış Ortam, Kuru Toprak ve Direkt Güneş Işığı Altında Kurumaya Bırakılan Gaita Örneği	29
Şekil 8:	Dış Ortam, Nemli Toprak ve Gölgede Bırakılan Gaita Örneği	29
Şekil 9:	Gazlı Beze Damlatılan İdrardan DNA Çekilmesi	32
Şekil 10:	Örneklerin Uygun Besiyerlerine Ekimi	45
Şekil 11:	Örneklerin Uygun Besiyerlerine Ekimi	46
Şekil 12:	Öze'nin Steril Edilmesi	46
Şekil 13:	Endo Agara Ekilen Gaita Örneğinden Escherichia coli bakterisi	47
Şekil 14:	Kanlı Agara Ekilen İdrar Örneğinden Staphylococcus spp. bakterisi	48
Şekil 15:	PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi	54
Şekil 16–31:	1 – 16. Simülasyonların sonucu transfer edilen lokusların elektroforegram ile gösterimi	55 - 71
Şekil 32:	ABI PRISM 310 ile elde edilen bir matriks dosyası örneği	91
Şekil 33:	Matriks dosyası uygulanmamış elektroforegram görüntüsü	93
Şekil 34:	Matriks dosyası uygulanmış elektroforegram görüntüsü	93

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1:	SGM Plus PCR Primer dizileri	37
Tablo 2:	STR SGM Plus kit lokusları	38
Tablo 3:	Amp FISTR SGM Plus kit- Alelik Ladder ve kontrol DNA bilgileri	39
Tablo 4:	Kontrol amaçlı ağız içinden alınan DNA izolatlarının PCR döngü parametresi	41
Tablo 5:	Gaita ve İdrardan elde edilen DNA izolatlarının PCR döngü parametresi	41
Tablo 6:	Gönüllü bilgileri ve Gaita örneklerinin DNA miktarları	50
Tablo 7:	Gönüllü bilgileri ve İdrar örneklerinin DNA miktarları	52
Tablo 8:	1 - 7. Simülasyonlarının DNA analiz sonuçları	56
Tablo 9:	8. Simülasyonun DNA analiz sonucu	63
Tablo 10:	10. Simülasyonun DNA analiz sonucu	65
Tablo 11:	11. Simülasyonun DNA analiz sonuçları	66
Tablo 12:	12 - 13. Simülasyonun DNA analiz sonucu	67
Tablo 13:	14. Simülasyonun DNA analiz sonuçları	69
Tablo 14:	15 - 16. Simülasyonun DNA analiz sonuçları	70

KISALTMALAR

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ATPaz	Adenintrifosfataz
Bç	Baz Çifti
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMAC	Dimetilaminoasinaldehit
EDTA	Etilendiamin tetra-asetik asit (Ethylenediamine tetra-acetic acid)
ENFSI	Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı (European Network of Forensic Science Institutes)
EtBr	Etidyum bromür
FSS	Adli Bilimler Servisi (Forensic Science Service)
G	Guanin
HS	Yüksek duyarlılık (High Sensitive)
LCN	Düşük kopya sayısı (Low Copy Number)
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PGM	Fosfoglukomutaz
Rfu	Bağıl floresan ünite (Relative fluorescent unit)
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SGM	İkinci nesil multipleks (Second Generation Multiplex)
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
STR	Kısa Ardışık Tekrar (Short Tandem Repeat)
T	Timin
TBE	Tris + Borik asit + EDTA tamponu
Tm	Primer bağlanma sıcaklığı
TWGDAM	DNA Analiz Yöntemlerini Çalışan Teknik Grup (Technical Working Group on DNA Analysis Methods)
QIA	Qiagen
µl	Mikrolitre (Microlitre)
UV	Ultraviolet (Mor ötesi ışın)
V	Volt

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Toplumun huzurunu sağlamak amacıyla, emniyet güçleri bir yandan araştırma ve soruşturma tekniklerini geliştirirken, diğer yandan bilim dünyasının destek ve önerilerine daha fazla gereksinim duymaktadır. Bunun yanında bilimin, ceza hukukunda çok önemli ve vazgeçilmez bir yeri bulunur. Bilimin adalete hizmet için kullanımı ile “Adli Bilimler” kavramı ortaya çıkmıştır. Böylece adli olayların aydınlatılmasında bilimin önemi kabul edilmiş ve bilimsel yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Yükseloğlu H. ve Ark., 2008). Kriminalistik, bilimsel yöntem ve araçları kullanarak suçu aydınlatma ve suçluyu bulma tekniğidir. Günümüzde kriminalistik bilimi fiziksel, kimyasal ve biyolojik bulguların aranması ve değerlendirilmesiyle birçok olayda failin/faillerin kimliğine dair ipucu çıkaran bir noktaya ulaşmıştır (Kaygısız M. 2003).

Adli olaylar, kanunlarda açıkça suç olarak belirtilen fiil ve hareketlerin belirli bir zaman ve mekanda gerçekleşmesi ile ortaya çıkar. Adli olgunun üç temel unsuru; olay yeri, mağdur ve faildir. Adli bilimler, olay yerinde başlar. Zira Adli soruşturmanın en önemli unsurlarından biri olan olay yeri incelemeleri ancak doğru gerçekleştirildiğinde, adli olayların çözülmesinde doğru sonuca ulaşılabilir (Yükseloğlu H. ve Ark., 2008). Suçun öğrenilmesi ile olay yeri, suç – mağdur – sanık hakkında bir çok bilgi verir. Olay yerinde kriminal uzmanları, soruşturma uzmanı, adli tıp vb. uzmanlar modern teknikleri kullanarak olay yerini dikkatlice incelediklerinde çoğu zaman suçluya/suçlulara ulaşacakları ipuçları bulabilmektedirler. Burada yapılan çalışmalar soruşturmanın başlamasının, seyrinin değerlendirilmesine ipucu verir ve sonucu derinden etkiler (Kaygısız M. 2003).

Olay yeri incelemesinin amaçları; delil niteliği taşıyan örnekleri tanımlamak, delil niteliğini bozmayacak şekilde toplamak ve incelemenin yapılacağı laboratuvara ulaştırmaktır. Olayla bağlantısı olabileceği düşünülen ve laboratuvarda incelenen tüm belge ve materyaller fiziksel delildir. Bu delillerin özellikleri analitik tekniklerle belirlenir ve delillerin kaynaklarının bulunması amacıyla kontrol örnek ile karşılaştırılır. Kan, kemik, saç, kıl, diş, tırnak, doku, semen, tükürük, idrar gibi deoksiribonükleik asit (DNA) içeren tüm biyolojik deliller fiziksel delildir. Son yıllarda DNA içeren tüm fiziksel deliller kriminal incelemede önemli hale gelmiştir ve olay yerinin hemen her yerinde bulunabilmektedir. Biyolojik deliller DNA içerdiklerinden dolayı önem taşır ve DNA analizi yoluyla değerlendirilir. DNA elde edilebilen deliller yalnız kişileri suçlamakta kullanılmaz, aynı zamanda suçsuz olanın da haksız yere suçlanmasını engelleyecek çok güçlü bir veridir. Çünkü şüpheli, mağdur ve olay

yeri arasındaki bağlantıyı kurup yüksek ayırım gücü ile “kim” sorusunun cevabını verebilmektedir (Dönmez Ö., 2008). Suç sonrası failler tarafından olay yerinde bırakılan maddi deliller artık suçların çözümünde çok büyük rol oynamaya başlamış; kan, tükürük, kıl, meni, vb. maddi delillerin mahkeme önündeki “dilsiz tanıklıkları” her an yeni buluşlarıyla karşılaştığımız teknoloji dünyasının da yardımıyla reddedilmesi zor gerçekler olarak kabul görmeye başlamıştır (Kaygısız M., 2003).

Adli çalışmalarda biyolojik örnekler çok önemli ve vazgeçilmez bir yer tutarlar. Bu örneklerin içinde çok sık rastlanmasa da gaita materyali de bulunabilmektedir. Gaita, genellikle cinsel saldırı ile alakalı giysi veya yatak kılıfı gibi eşyalarda veya olay yerinde bırakılmış şekilde bulunmaktadır. Gaita materyalinden DNA çekilmesi ile genetik profilin çıkartılabilmesi adli bilimlerde başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir. Ancak; gaitada dökülen epitel hücrelerinden kaynaklanmış sınırlı miktarda insan nuklear DNA'nın bulunması, arka planda yüksek mikrobiyal DNA'nın olması, insan DNA'sı ile çekişlenebilen kompleks polisakkaritlerin, bilirubinin, safra tuzu gibi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) inhibitörlerinin olmasından dolayı, gaita materyalinden başarılı bir çekilme ve insan nuklear DNA tiplendirmesini başarmak zor olmaktadır. Bunlara ek olarak, gaitadaki nuklear DNA'nın zaman geçtikçe hızlı biçimde degrade olması ileri sürülmektedir ki bu aynı zamanda mevcut safra asitlerinin de sonucudur (Vandenberg N. ve Ark. 2002). Direkt gaita içeriğinin kullanılması PCR inhibisyonunu meydana getirmektedir, bu yüzden araştırmacılar, dilüsyon ve santrifugasyon ile hücrelerle diğer gaita döküntülerini birbirinden ayırarak bu sorunu çözmektedirler (Clement B. ve Ark., 2000).

Adli araştırmalarda kullanılan idrar lekesi, suç yerinin tespitini ve ölüm sebebinin anlaşılması için kullanılmaktadır. Böyle bir inceleme, idrarın insan kaynaklı olduğunun tespitini ve mevcut idrar lekesinden kimlik tayinini içermektedir. Bu iki inceleme birbirine paralel olarak kolayca uygulanmaktadır (Nakazono T., 2008).

Bu çalışmanın amacı, olay yerinde bulunan gaita ve idrar örneklerinin suçlunun kimliklendirilmesinde oldukça önemli ve kullanılabilir bir delil olduğunu onamları alınmış gönüllülerle kontrollü deneme modelleri kullanılarak kanıtlamaktır. Çalışmanın diğer bir amacı da; yapılan tüm aşamalarda elde edilen genetik profillerin insana ait olduğunu ve bakteri kaynaklı kontaminasyona ait bütün şüphelerin yok edilmesini sağlamak, bakteriye ait enzimlerinin insan DNA'sına zarar verip/vermediğini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Olay Yeri

Olay yeri, mağdur, fail ilişkisini ortaya koymak amacıyla olay yerinden elde edilen her türlü materyal, bir bulgudur. Mağdur, fail ve olay yeri arasındaki geçiş, “Her temas, bir iz bırakır.” ilkesi olarak bilinen Locard Prensibi ile açıklanır. Buna göre, iki nesne birbiriyle temas ettiğinde bir takım materyaller birinden diğerine aktarılır. Başka bir deyişle; bir şüpheli, olay yerine veya mağdura bir şeyler bırakır ve olay yerinden veya mağdurdan bir şeyler götürür. Bunun için adli bilimlerin olay yerinde başladığı kabul edilir (Yükseloğlu ve Ark., 2008). Adli bilimler; son yıllarda yeni teknikler kullanarak suçlunun veya masumun açığa çıkartılmasında, bazen de önceden verilmiş olan hükmün değişmesini sağlayıp, gerçek kararın verilmesine neden olan, adli davalarda önem kazanmış bilim dalıdır (Hunter, 2006).

Meydana gelen suçun aydınlatılmasına ve suçluların tespitine yarayan, ispat vasıtası olan bulgular ise birer delildir. Deliller; tanık, sanık ve diğer kişilerin ifadelerini içeren beyan deliller olabileceği gibi, laboratuvarında incelenerek değerlendirilecek maddi deliller de olabilir (Yükseloğlu ve Ark., 2008).

Adli soruşturmanın en önemli unsurlarından biri olan olay yeri incelemeleri ancak doğru gerçekleştirildiğinde, adli olayların çözülmesinde doğru sonuca ulaşabilmektedir (Yükseloğlu H. ve Ark., 2008). Ayrıca araştıran kişi fiziksel delilleri; doğru biçimde teşhis edemezse veya laboratuvardaki değerlendirmeler için uygun şekilde toplamazsa, yüksek kaliteli laboratuvar ölçümü veya ileri derece teknik uzmanlık olsa bile delillerin gerçekliğini sağlayamaz. Bu nedenle olay yeri çalışmaları büyük titizlik, ciddiyet ve belli bir eğitim almış görevliler tarafından yapılmalıdır (Saferstein R., 2001).

Olay yeri incelemesi ile elde edilecek en önemli unsur, maddi delile dönüşebilecek bulgulardır. Olay yerinde bulunabilecek kan, kıl, sigara izmariti, parmak izi, ayak izi, elbise parçası vb. nesne ve izler, meydana gelen suç olaylarını aydınlatabilecek delillere dönüşme olasılığı yüksek olan önemli bulgulardır. Bir ortamı terk eden kişinin orada bulunduğu dair iz bırakmaması ya da o ortamdaki bir şeyler alıp götürmemesi hemen hemen imkânsızdır. Olay yeri incelemesi ile elde edilecek en önemli şey maddi suç delilleridir. Bu tür deliller şüphelinin ve/veya mağdurun lehine veya aleyhine dilsiz birer tanıktır. Tanıklık yapan insanların varlığı bile onları yok edemez (Yükseloğlu H. ve Ark., 2008).

DNA analizi yapmak için olay yerinden, mağdur ve sanıktan biyolojik örnekler alınır. Olay yerinden alınan biyolojik örneğin orijini bilinmeyebilir ancak olay ile ilgisi olabilecek

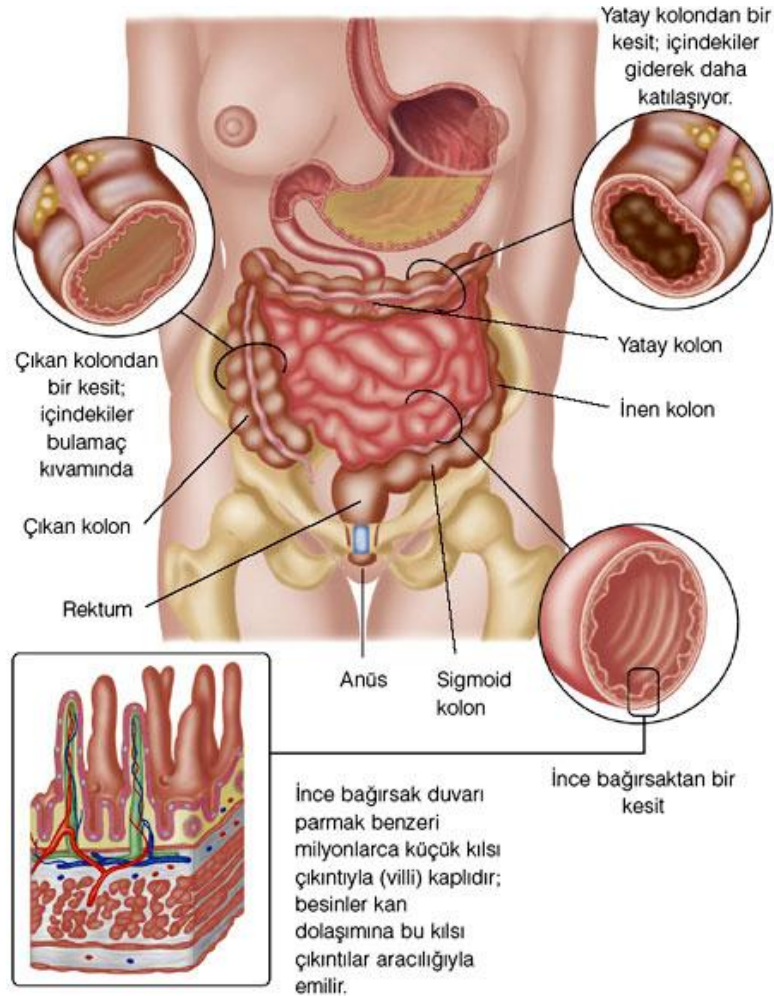
kişi ya da kişilerle mutlaka karşılaştırılmalıdır. Bu örneklerden DNA izole edilir ve DNA molekülü üzerindeki belirli bölgeler PCR ile binlerce kez çoğaltıldıktan sonra görünür hale getirilir. Tek yumurta ikizi olmadığı takdirde iki insanın aynı DNA profiline sahip olma ihtimali trilyonda birden azdır. Bir başka deyişle, yeryüzünde aynı DNA profiline sahip ikinci bir kişinin bulunması teorik olarak olanaksızdır. DNA profili yalnız saldırı ve cinayetlerin aydınlatılmasında değil aynı zamanda babalık tayinlerinin, akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında da tek güvenilir yöntemdir. DNA çalışmaları ile cinsiyeti belirlemek de mümkündür. Tabi bütün bunlar örnekler doğru biçimde toplanmasıyla ve gerektiği gibi incelenmesiyle mümkün olmaktadır. Bu koşullar yerine getirilirse DNA'dan daha güçlü bir delil bulunmamaktadır (Açıkgöz ve Ark., 2002).

Olay yerinde bulunan görevliler, olay yerinde vücut sıvıları ki bunlar; semen, saliva, vajinal sekresyonlar, ter, gaita ve nazal mukus gibi materyallerle karşılaşılabilirler. Kanıt olarak vücut sıvıları ile birçok suç türünde karşılaşılabilir. Laboratuvar bu sıvıların kimliklendirmesinde DNA'yı kullanmaktadır. Bu bilgilerin ışığında suçlu – mağdur arasındaki bağlantı kurulur (Saferstein R., 2001). Kişi masumsa bu incelemeler sonunda dışlanır, eğer profili tutuyorsa dahil edilerek belli bir olasılık belirtmek şartıyla suçlu olabileceğinden bahsedilir (Henry & Howard, 2000). Adli Bilimlerde, kan ve doku örnekleri dışında çeşitli vücut sıvıları, olayların aydınlatılması açısından büyük önem taşır (Yükseloğlu H., 1996).

Adli genetik laboratuvarları tükürük, kan veya epidermal hücreler gibi çeşitli tiplerdeki biyolojik materyallerden genetik profilleri sağlayabilmektedirler. Rutin dava çalışmalarında ideal DNA çekitleme prosedürü değişik çeşitteki örneklerden yüksek miktarda saf DNA eldesini sağlamalıdır. DNA çekitleme yöntemlerinin toksik olmaması ve hızlı yapılabilmesi tercih sebebidir. Ne yazık ki, evrensel DNA çekitleme protokolleri bütün bu kritikleri içermemektedir. Örneğin fenol kloroform gibi yöntemler PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılmasında etkili olsalarda elde edilebilecek DNA miktarını azaltabilmektedir. Chelex ise sağlanan DNA'yı önemli miktarda korurken, PCR inhibitörlerini uzaklaştırmada yeterli etkiyi gösterememektedir. Birçok araştırmacı silika membran tabanlı (QIAamp Stool Mini Kit) çekitleme prosedürünü Chelex ve Fenol kloroform gibi yöntemlerden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Castella V. ve Ark., 2006).

2.2. Gaita

Gaita sindirimin son ürünüdür. Sindirim ve emilim ağızdan anüse kadar uzanan kaslı bir boru şeklinde olan gastrointestinal alanın görevidir (Johnson D. ve Ark., 2005). Besinler ağızda dişler ve dil tarafından mekanik olarak parçalanırken, tükürük tarafından kimyasal olarak da bir ölçüde parçalanır. Daha sonra peristaltizm ile yemek borusundan (özofagus) mideye geçer. Burada mekanik parçalama işlemi devam eder. Büyük yiyecek parçaları daha küçük parçalara ayrılır. Bununla beraber, küçük miktarda kimyasal işlem de meydana gelir; özellikle proteinler midedeki enzimlerin yardımıyla kimyasal olarak parçalanmaya başlar. Besinler daha sonra ince bağırsağa girer ki burada enzimler ve bakteri yardımıyla parçalama işlemi meydana gelir ve yararlı partiküller emilir ve kan yoluyla taşınır. Kalan partiküller ise kalın bağırsaktan geçer ve sonunda gaita biçiminde vücuttan atılır (Şekil 1).



(URL-1; http://www.saglikpark.com/haber/sindirim_sistemi.htm 'den alınmıştır)

Şekil 1: İnsan Sindirim Sistemi, Gaitanın Oluşumu ve İçindeki Sıvının Emilmesi

Sindirim hem hormonlar hem de otonom sinir sistemi tarafından düzenlenir. Sindirim sisteminin görevlerini kontrol eden temel hormonlar mide ve ince bağırsak mukozasındaki hücreler tarafından salgılanır. Bu hormonlar, örneğin sekretin, gastrin ve kolesistokinin, kana sindirim borusu tarafından bırakılırlar ve sindirim sıvılarını uyarıp organ hareketlerine neden olurlar. Otonomik sinir sisteminin iki kolu da sindirim işlemini etkiler; parasempatik sinirler salgıları ve peristaltizmi uyarırken, sempatik sinirlerin etkisi daha baskılayıcıdır. Sindirim borusu aynı zamanda bağışıklık sisteminin bir bölümüdür. Midenin düşük pH (1-4 arası) seviyesi, mideye giriş yapan birçok mikroorganizma için ölümcüldür. Sindirim borusundaki diğer faktörler de bağışıklığa yardımcı olurlar; safra ve tükürükteki enzimler dahil. Sağlığa yardımcı bağırsak bakterileri de potansiyel olarak zararlı olabilecek sindirim borusundaki bakterilerin aşırı çoğalmasını önlemeye yardımcı olur. İnce bağırsağın görevi, midedeki yemeklerin ince bağırsaktan kalın bağırsağa geçip oradan da boşaltılmasıdır (Berne R. M. ve Ark., 2008).

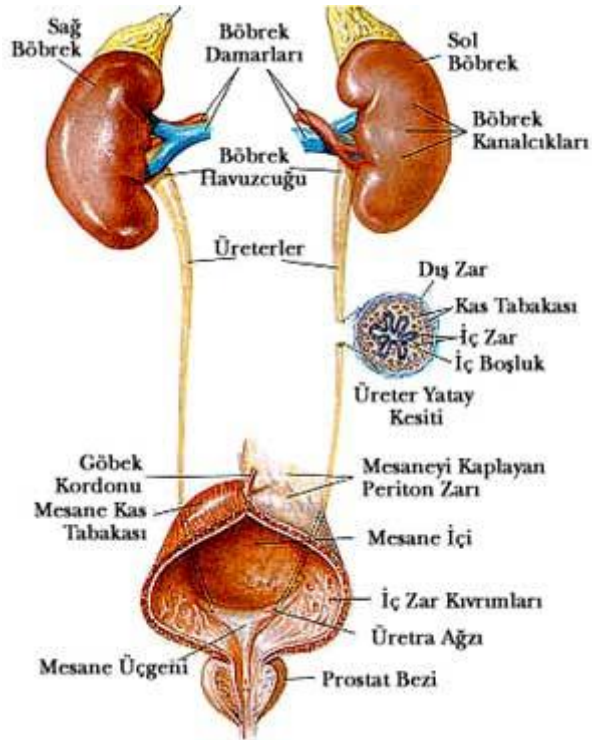
Gastrointestinal alan boydan boya ağırlıklı olarak epitelyum (hücre katmanı) ile sınırlandırılmış, peritonyum (membran) ile çevrelenmiştir. Epitel sınır 2 ila 6 gün arasında kendini yenilemekte, her gün tahminen 17 milyon hücre ince bağırsaktan dökülmektedir. İntestinal alan iki farklı epitel hücre tipini kapsamaktadır; bunlar, kolumnar absorpsiyon hücresi ve goblet hücresidir. Dökülen hücreler, sindirim işlevinde görevli salgılar tarafından zarar görmemiş, buna rağmen morfolojileri belirgin şekilde değiştirilmiş hücrelerdir. Bunlara ek olarak çekirdekli kübik epitel hücreleri defekasyon sürecinde anal kanaldan gaitaya geçmektedir (Johnson D. ve Ark., 2005). Besinler midede 1-3 saat, ince bağırsakta 2-6 saat ve kolonda 12-48 saat kalır. Normalde, sıvı emilimine olanak vermek için kolondan yavaş geçer. Emilim daha çok sağ taraftaki çıkan ve orta kolonda olur. Güçlü kasılmalarla bağırsak kasları katılmış gaitayı günde birkaç kez sigmoid kolona ve rektuma taşır. Kolondan geçiş zamanı genellikle erkeklerde kadınlara göre daha kısadır. Bu nedenle erkeklerin gaitası daha ağırdır (Guyton A.C., 1987). Kalın bağırsağın kasılma hareketleri ile gaitanın karışması ile kolondaki epitel alana maruz kalmasını sağlamaktadır. Her ne kadar gaitanın karışması defekasyonun meydana geldiği rektumda ve anal kanalda az olsa da, bu gaitanın yüzeyinde bulunan epitelyum hücrelerin konsantrasyonunun daha çok olmasına neden olmaktadır. (Johnson D. ve Ark., 2005).

Ortalama bir diyetten üretilen gaita, %75 su ve %25 solid materyaldir. Solid bileşen, bakteri (%30); inorganik materyal, başlıca kalsiyum ve fosfatlar (%15); yağ ve yağ türevlerini

(%5) içermektedir. Selüloz ve diğer sindirimi zor fiber çeşitlerinin miktarı diyetle göre farklılık göstermektedir. Adli protokol için insan gaitasından kimliklendirme de yapılacaksa, gaitanın yapısında bulunan alkali fosfatazı, IgA immünoglobulinleri, intestinal parazitleri, pankreatik alfa amilazı, ürobilinojenleri ve ürobilinleri ve bitkisel parçacıkların da göz önüne alınması gerekmektedir (Johnson D. ve Ark., 2005). Gaita muhtelif mikroorganizmaların kompleks karışımını, sindirilmiş ve sindirilmemiş besin kalıntılarını, mukusu, çözünebilir veya çözünmemiş gastrointestinal alan ürünlerini ve hücrelerden türemiş degradatif enzimleri, besin ve bakterileri kapsamaktadır (Vandenberg N. ve Ark., 2002).

2.3. İdrar

Üriner sistemi iki böbrek, iki üreter, vesika urinaria (idrar kesesi) ve üretra oluşturmaktadır (Şekil 2).



(URL-2; <http://www.bilimvesaglik.com/bosaltim-sistemi/default.asp> 'den alınmıştır)

Şekil 2: Üriner Sistem

Böbrekler kanın süzme işini yaparak idrarı oluştururlar. Oluşan idrar üreterler aracılığı ile idrar kesesinde toplanır ve üretra ile dışarıya atılır. İdrar ile atılan en önemli metabolizma artıkları üre ve ürik asit gibi nitrojen içeren artıklardır. Diğer bir deyişle nitrojen içeren atıkların en önemli boşaltım yeri böbreklerdir. Böbreklerin sürekli çalışmasıyla nitrojen artıkları, plazmadan toksik düzeylere erişmeden elimine edilmektedir. Nitrojen artıklarının en önemli kaynağı proteinler ve purin bazlarıdır. Proteinlerin yıkımı ile oluşan ürün amonyaktır. Amonyak, hücreler için çok toksik bir maddedir, bu nedenle karaciğerde üre haline dönüştürülür ve böbrek tarafından atılır. Purin bazlarının yıkım ürünü ise ürik asittir (Berne R.M. ve Ark., 2008)

Sağlıklı insan idrar örnekleri az sayıda (en fazla 400 hücre/ml) epitel hücresi (örneğin: renal tübul, değişici (transizyonel) epitel ve kübik epitel) içermektedir (Soltyszewski I. ve Ark. 2006). İdrar örneklerinin içinde; eritrositler, lökositler ve epitel hücreleri bulunur. Epitelyal tübüler hücrelerin atılma hızları bir kişide günler ya da aylar içinde göreceli olarak

sabit seyrederken, lökositlerin salgılanması bireyler arasında veya aynı bireyde büyük varyasyonlar gösterir. Ek olarak, tübüler epitelyal hücrelerin (ve eritrositlerin) salgılanması kadınlara kıyasla erkeklerde anlamlı yüksek iken, lökositlerin salgılanması kadınlarda anlamlı olarak daha yüksektir (Fogazzi G.B. ve Ark., 2010). Bunun yanısıra bazen spermatozoa ya da sekretör kişilerde de A, B, H antijenleri veya albumin, fibrin, miyogloblin gibi proteinler de bulunabilmektedir. Normal idrarda metabolik atılım ürünleri (üre, antibiyotik, vitamin gibi) yer almaktadır. Ancak bu maddelerin idrardaki derişimleri, birçok faktöre bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin diyet, beslenme aktiviteye ya da ilaç kullanımı veya sağlık durumu gibi bir takım faktörler Adli bilimler uygulamalarında bir takım kısıtlamalar getirmektedir. İşte bu kısıtlamaları en az düzeye indirgemek için moleküler DNA teknikleri bu aşamada kullanılmaya başlanmıştır (Yükseloğlu H., 1996).

2.4. Adli Bilimlerde Gaita Örneklerinin Önemi

Lochard'ın "her temas bir iz bırakır" sözü biyolojik delillerin vazgeçilmez olduğunu göstermektedir (Açıkgöz N. ve Ark., 2002). Gaita örnekleri Adli bilimlerde potansiyel olarak önemli bir yer tutmasına karşın, diğer biyolojik örnekler içerisinde çok kabul görmemiştir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi gaita örneği zaten kendi başına kontaminasyona sahip bir örnektir. Diğer bir nedeni de genellikle olay yeri içeriklerinden ötürü bozulmaya meyillidir. Birçok olay yeri çalışmasında karşımıza bütün gaita birikintisi şeklinde çıktığı gibi, eser miktarlarda da çıkmıştır. Örneğin az miktardaki gaita materyali fiili livata olgularında failin kişinin penisinden veya anal yolla giren objelerden transfer olabilir. Bunun dışında, suçlu olay yerine kasıtlı veya kasıtsız bir şekilde defekasyonunu yapabilir. Bir çok davada, gaita materyalinden kimliklendirme ve bireyselleştirme ile kurban ve saldırgan arasında ilişki kurmamıza yardımcı olmaktadır (Johnson D. ve Ark., 2005).

Gaitadan kromozomal DNA eldesi zor olsa da ileri analizler için uygun materyaldir. Genel olarak iki sorunla karşılaşılmaktadır. Birinci sorun, DNA uzun süre bekletilmiş örnekler degradasyona eğilimlidir. İkinci sorun ise, DNA PCR inhibitörü olan safra tuzu ve bilirubin gibi saflaştırılmamış gaitasal içeriklerden dolayı gibi enzimatik uygulamaya pek uygun değildir. Bu içeriklerin önemli miktarda azaltılması ile saflaştırılmış DNA elde edilebilmektedir (Deuter R. ve Ark., 1995).

Gaita örnekleri tek kanıt olarak, tuvalet kağıdına silinmiş şekilde veya kıyafete bulaşmış şekilde olay yerinde bulunabilir. Böyle durumlarda insan gaitası adli DNA kanıtı olarak değerli bir kaynaktır. Laboratuvara gelen gaita kanıtlarının DNA analizleri yapılarak, bu kaynak kimliklendirmede kullanılabilir (Roy R., 2003).

Gastrointestinal kanala hergün (yiyecek-içeceklerle 2 lt tükürük, 5 lt mide sekresyonu, 5 - 2 lt safra, 500 ml pankreas dış sekresyonu, 5 lt intestinal sekresyon) yaklaşık 9 lt sıvı girer ve bunun %90'ı ince barsaklardan absorbe olur. Kolona gelen sıvı içeriğinin 750 ml'si absorbe olur ve geriye kalan 50 ml kadar içerik gaita olarak atılır. Gaitanın yaklaşık 100 ml'si su 50 gramı soliddir (Özden A., 2005). Her ne kadar hergün 10 milyon hücre gastrointestinal alandan kaybedildiği göz önüne alınsada, mevcut DNA çekitleme yöntemleri ile DNA eldesi ve Ardışık Kısa Tekrar (STR) analizleri tahmin edildiği kadar kolay olmamaktadır (Iacovacci G. ve Ark., 2003). İnsan DNA'sının gaitadan çekitlenmesi gastrointestinal alanda bulunan mikrobiyal floradan dolayı zor olabilmektedir. Ayrıca, gaita içeriği çok miktarda DNA'yı degrade edebilecek ve PCR'ı inhibe edecek bileşiklere sahiptir ve bu bileşikler güvenilir bir DNA çekitleme analizi için mutlaka uzaklaştırılmalıdır. Dolayısıyla, geleneksel organik çekitleme yöntemleriyle DNA çekitlerken, PCR inhibitörlerini tam anlamıyla uzaklaştırılmadığında sonuçlar her zaman güvenilir olmamaktadır (Roy R., 2003). Bu nedenle PCR analizleri için DNA saflaştırması, DNA çoğaltılmasının öncesinde gereklidir; ayrıca çekitlemenin dilüsyonu ile inhibitörler azaltılabilmektedir fakat dilüsyonun etkisi ile hassas oran kaybedilebilir. STR analizlerinin başarısı minimum miktarda ki DNA miktarına, PCR inhibitörlerinin yokluğuna ve degradasyon seviyesine bağlı olmaktadır (Iacovacci G. ve Ark., 2003).

PCR çeşitli hastalıklarda tanı/teşhis amaçlı değerli ve hassas bir araç olarak kullanılmasına rağmen, bu uygulama insan gaita örneklerinde kimliklendirmede bazen başarılı sonuçlar vermemektedir. Nitekim, bu örnekler yapılarında çeşitli gaitaya ait kimyasal bileşikler bulundurmasından dolayı PCR'ı inhibe edip, kolaylıkla yanlış negatif sonuç vermektedir (Cavallini A. ve Ark., 2000). Yetişkin sağlıklı birey günde 200-650 mg safra tuzu salgılamaktadır ki bu miktar PCR inhibisyonunu sağlamaya yeter (Lantz P. ve Ark., 1997). Gaitanın yapısındaki bilirubin, safra tuzu az miktarda da olsa PCR'ı inhibe ettiği bilinir. Bu yüzden PCR analizlerinde DNA saflaştırma işlemi, çoğaltmadan önceki önemli adımdır ya da inhibitörler özütün seyreltilmesiyle azaltılabilir ama bunun eşliğinde dilüsyon faktörlerine bağlı hassasiyet aynı oranda düşmektedir (Hopwood A. ve Ark., 1996). PCR inhibitörlerinin

arasında polisakkaritler, polimeraz gibi DNA modifiye enzimlerle geniş alanda etkilerini göstermektedir. Monteiro ve arkadaşları gaita örneklerdeki yaygın inhibitörlerin diyetteki bitkisel tüketime dayalı kompleks polisakkaritlerin olduğunu göstermişlerdir (Monteiro L. ve Ark., 2000).

Bugüne kadar gaitaya uygulanan adli analitik prosedürlerde; gaita materyalinde bulunan ürobilinojen ile sayesinde mevcut gaita materyalini belirten Edelman testi, rektal içerikten ABO kan gruplandırması, anal swapla alınan gaita lekesinden fosfoglukomutaz (PGM) analizi içermektedir ki bunların hepsi genellikle delile ait özellikleri sınırlandırmıştır (Hopwood A. ve Ark., 1996). Yapılan araştırmalarda, birçok DNA veya RNA (ribonükleik asit) saflaştırma teknikleri, özellikle de insan gaita örneklerinden organik çözücülerle veya yüksek tuz konsantrasyonu ve kromatografi tabanlı metodların kombinasyonu ile bakteriyel DNA saflaştırma yöntemi birçok makalede rapor edilmiştir. Diğer bir teknikte de; spesifik bakterileri, manyetik boncukları antikorlarla kaplamayı ve bunu takiben de inhibitör faktörlerini kapsamlı bir yıkamayı içermektedir (Cavallini A. ve Ark., 2000).

2.5. Adli Bilimlerde İdrar Örneklerinin Önemi

Olay yerinde değişik birçok materyal bulunabilir ve adli laboratuvar bu materyallerin üzerindeki biyolojik lekelerin kimliklendirilmesini yapar (Cerri N. Ve Ark., 2003).

Vücuttan ilaç eliminasyonu böbrek, karaciğer, akciğer ve diğer organlarda çeşitli işlemlerden geçerek meydana gelmektedir. Renal klirens, idrarda ilacın ve metabolitlerinin görülmesinden dolayı en önemli eliminasyon mekanizmasıdır. Bu nedenle, insan idrarı sıklıkla adli toksikolojik amaçlı analiz edilmektedir. İdrar örneklerine kolay ulaşılabilirliğinden dolayı özellikle narkotik ilaç test alanında kullanılmaktadır (Nicole T. ve Ark., 1999).

Genel olarak idrar örnekleri; biyokimyasal ve toksikolojik testlerde ve doping kontrolü nedeniyle toplanmaktadır. Bu amaçla yapılan testlerde örnek değişikliği veya muameleden şüphe duyulmuyorsa, verilen örneğin kaynağının araştırılmasına gerek görülmeyebilir (Softyszewski I. ve Ark., 2006). Bazı durumlarda, idrar örneklerinin doğruluğu reddedilebilir ve örneğin kaynağının doğrulanması gerekebilir (Virkler K. ve Ark., 2009). İnsan idrar örneklerinin kimliklendirilmesi değişik durumlarda ortaya çıkmaktadır, örneğin klinik laboratuvarında karışık örneklerin incelenmesinde veya doping kontrolünde ve uyuşturucu

tarama programlarında, kanıtta değiştirme ve manipölasyon meydana gelebilecek durumda kullanılmaktadır (Prinz M. ve Ark., 1993). Çelişkili durumlarda, doping kontrol analizi içeren idrar örneğlerinin kimliklendirilmesi tespit edilmelidir; böyle materyallerin genetik tiplendirmesi genellikle zordur, çünkü örneğler birkaç hafta veya ay +4°C'de saklanmış olabilir. Daha da ötesi sağlıklı bireylerden alınan idrar, özellikle erkeklerde, çok az çekirdekli hücreler ve korunan maya hücreleri ve bakteriler içermektedir ki bunlar insan DNA'sının çoğaltılmasında zararlı olabilir. Üre gibi bazı idrar içerikleri PCR reaksiyonunu inhibe etmektedir (Castella V. ve Ark., 2006).

Günümüzde idrardan da DNA ekitlenebilmekte, niteliği ve niceliği belirlendikten sonra çeşitli tekniklerle tiplenebilmektedir. Bu tekniklerin bir çoğu yeterince güvenli, duyarlı, ekonomik ve Adli Bilimler açısından da oldukça bilgi vericidir (Yükseloğlu H., 1996).

Olay yeri çalışmalarında idrar analizi çok sık olmamakla beraber, özellikle cinsel saldırı davalarında kullanılmaktadır (Sołtyszewski I. ve Ark., 2006). İdrar lekesi adli incelemede, suç yerinin tespitinde ve ölüm sebebinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu tür incelemeler, idrarın insan kaynaklı olduğunun tespitini ve mevcut idrar damlasından kimlik tayinini içermektedir. İdrara uygulanacak olan tespit ve tayin testleri birbirine paralel olarak kolayca uygulanabilmektedir (Nakazono T. ve Ark., 2008).

Adli kanıt örneğleri kadın ve erkek insan DNA'sının karışımı şeklinde karışımıza çıkabilir. Daha da ötesi, adli biyolojik örnek değişik kötü evre şartlarına maruz kalıp DNA degradasyonu ile sonuçlanabilir ve PCR'ı inhibe eden bileşiklerle kontamine olabilir (Barbisin M. ve Ark., 2009). İdrar örneğinden ekitlenen DNA miktarı; çekitleme yöntemine, cinsiyetine, saklanma koşullarına, bakteriyel kontaminasyona ve hücrelerden salgılanan nükleaza da bağlıdır (Milde A. ve Ark., 1999).

Kadın ve erkek idrar örneğlerinde mevcut DNA niceliği söz konusu olduğunda belirgin fark bulunmaktadır. Erkek'de 200 µL idrardan idrar lekesi oluşturulduğunda tam DNA profili bazı lekelerden elde edilmesine rağmen kadında sadece 100 µL idrar kullanıldığında tam DNA profili başarıyla elde edilmektedir (Nakazono T. ve Ark., 2008). Kadınların idrarında, vajinal epitel hücrelerden dolayı daha fazla çekirdekli hücreye rastlanmaktadır (URL 3, 2011).

Bugüne kadar idrara uygulanan prosedürler, idrarın mevcut testlere hassasiyetinin düşük olmasından veya yanlış pozitif sonuç vermesinden dolayı adli bilimcileri zorlamıştır. Sıvılar yapısından dolayı sıçrayabilir ve kumaş yüzeyler tarafından emilebilir ve bu idrarın

bulunmasını zorlaştırır. Koku indikatör olabilir ama bu bütün damladığı alanla beraber her yeri kapsayabilir. Diğer vücut sıvılarında da yapıldığı gibi idrar da ultraviyole ışık altında floresan verebilir. Bu özellik idara spesifik değildir ve idrar özellikle diğer vücut sıvılarına oranla daha seyreltik olduğu için ve daha az floresans verdiği için daha zor konumlandırılır. İdrarda bulunan çeşitli kristal materyallerini ve üriner alan astarının karakteristik epitelyal hücrelerini içeren örnekler temel mikroskopik yöntemler uygulanarak çalışılmaktadır ve bu yöntem idrar damlası hariç diğer sıvı örneklerde uygun sonuçlar vermektedir. Ancak adli olgularda aynı başarı elde edilmeyebilir. Klorid, fosfat ve sülfat gibi inorganik iyonlar da ayrıca idrar tespitinde kullanılmaktadır. Bu iyonlar idrar için ayırt edici değildir ama fosfat ve sülfat diğer vücut sıvılarına oranla idrarda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır.

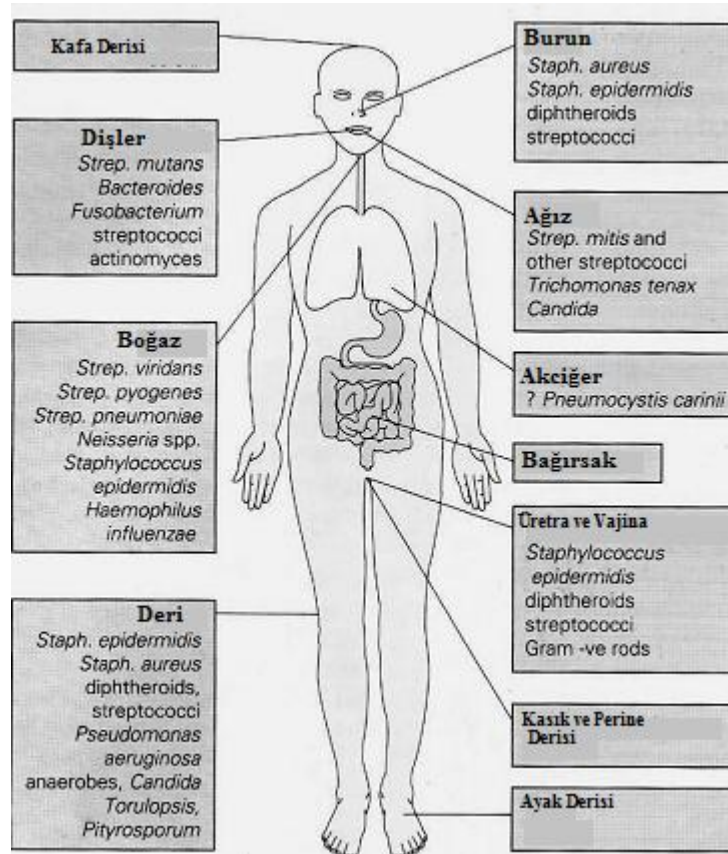
Üre; idrarda, diğer vücut sıvılarına oranla çok daha yüksek konsantrasyonda bulunan organik bir bileşiktir. Üre testi, üre yıkılımı ile amonyak ve karbondioksit açığa çıkartan üreaze enziminin aktivitesine bağlıdır. Amonyak, indikatör olarak p-dimetilaminosinaldehit'in (DMAC) kullanıldığı Nessler ayırıcı ile de tespit edilmektedir. Diğer yöntem üreaze ve bromtimol mavisi içeren ayırt edici sprey olup idrar damlasının tespitinde kullanılmaktadır. Pozitif sonuç, olay yerinde mavi nokta şeklinde görülmektedir. Semen ve ter damlaları üre içeriği bakımından zayıf yanlış pozitif sonuç vermektedir.

Kreatinin idrarda yüksek konsantrasyonda bulunan bir diğer organik bileşiktir. Bu da bilinmeyen damladan alınan ekstreden toluen veya benzendeki picric asidin çözeltisi ile tespit edilmektedir. Mevcut idrardaki kreatinin, picradin sonucunda kırmızı ürün meydana gelmektedir. Bu yöntem Jaffle test olarak bilinmektedir. Salkowski test sodyum nitroprusittin belirteç olarak kullanılır ve reaktif kreatinin ile ısıtılmasıyla mavi rengi verir (Virklar K. ve Ark., 2009).

2.6. İnsan İntestinal ve Üriner Florası

2.6.1. Normal Flora

Normal flora özellikle deri, orofarinks, kolon ve vajen gibi bazı vücut bölgelerinin sürekli yerleşikleri olan çeşitli bakteri ve fungusları tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Mikroorganizmaların diğer iki büyük grubu olan virüsler ve parazitler, bunların asemptomatik kişilerde bulunabilmelerine karşın genel olarak normal floranın üyeleri olarak kabul edilmez. Normal flora hem sayı hem de tür olarak bir bölgeden diğerine değişiklik gösterir. Normal floranın vücudun birçok bölgesini geniş şekilde doldurmasına karşın, iç organlar genellikle sterildir (Şekil 3). Merkezi sinir sistemi, kan, alt bronşiyoller ve alveoller, karaciğer, dalak, böbrek ve mesane gibi bölgeler, geçici olarak bulunan organizmalar bir yana bırakılırsa tümüyle mikroptan arınmış haldedir (Levinson W., 2006).



(URL-4, <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html> 'den alınmıştır.)

Şekil 3: İnsandaki Normal Flora Dağılımı

2.6.2. Barsak Kanalı Florası

İntestinal mikrobiyota insan fizyolojisinin asıl bileşenidir çünkü gastrointestinal alanda patojenik bakterilerin kolonizasyonuna karşı bariyer gibi davranıp, günlük beslenme içeriklerinin sindiriminde, ilaç, ksenobiyotiklerin ve besleyicilerin metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bunlar ayrıca sistem tarafından daha sonra absorbe edilen kısa yağ asitlerini, vitaminleri, ve diğer esansiyel besinleri temin ederler (Wang R. ve Ark., 2004).

Sağlıklı aç kişilerde düşük pH ve enzimlerin varlığı nedeniyle midede birkaç tane organizma bulunur. İnce barsakta genel olarak az sayıda Streptokok, Laktobasiller ve özellikle C.albicans olmak üzere mayalar vardır. Terminal ileumda bu organizmalar daha çok sayıda bulunur. Kalın barsak vücuttaki bakterilerin ana yerleşim yeridir. Gaitanın kabaca %20'si bakterilerden oluşur ve bu yaklaşık 10^{11} organizma/gram düzeyindedir (Levinson W., 2006).

İnsan intestinal florası, bireyin sağlığını teyit etmekte önemli rol oynayan dengeli bir ekosistemdir. İnsan gastrointestinal alanındaki mikrobiyota formu, bir gram içeriğinde 100 trilyondan fazla bakteri hücresi ve 400 bakteri türünden fazla kompleks topluluk popülasyonu içermektedir. Yaklaşık bu türlerin %90'ı 30 farklı cinsteki obligate anaerob olup, kültür metodları ile karakterize edilen predominant bakteri türleri; Bacterioides, Eubacterium, Bifidobacterium, Clostridium, Fusobacterium, Ruminococcus, Enterococcus ve Peptostreptococcus'dur (Şekil 4). Bu cinsler arasındaki en yaygın olan türler daha sıkı çalışılmış ve defalarca yeniden sınıflandırılmıştır. Bununla beraber, majör türlerin kişiden kişiye başlıbaşına büyük değişkenlik göstermesi, konakçının diyetine veya genel sağlık durumuna bağlı olabilir.



(URL-5; <http://wdict.net/gallery/gut+flora> 'dan alınmıştır)

Şekil 4: İntestinal Mikroflora

Bakterinin diğer türlerle ve kendi konakçısıyla etkileşimi ve çevresindeki intestinal mukoza ile yakın teması ile immünolojik, fizyolojik, anatomik, metabolik, beslenme, antibiyotik direnç gen transferini ve toksikolojik fonksiyonlar gibi birçok sistematik yanıtı etkilemekle olmaktadır.

Geleneksel olarak insan gastrointestinal alandaki anaerobik bakteri popülasyonu, mikroskopik, biyokimyasal, fizyolojik ve ayırıcı kültür ekimleriyle insan örneklerinden alınan gaita materyali ile karakterize edilmektedir. Son yıllarda insan gaita örneklerindeki bakteriyel topluluk çeşitli moleküler tekniklerle analiz yapılmaktadır. Moleküler analiz insan gastrointestinal mikrobiyotasındaki karışıklığı tespit etmede hızlı ve kesin yöntemdir (Wang R. ve Ark., 2004).

2.6.3. Genitoüriner Kanalin Florası

Erişkin bir kadının vaginal florası esas olarak *Lactobacillus* türlerinden kuruludur. *Lactobasiller* erişkin kadında vajen pH'sını düşük olarak tutan asit üretiminden sorumludur. Vagina anüse yakın yerleşmiş olup fekal floranın üyeleri tarafından kolonize edilebilir. Normal insanda mesanede idrar sterilse de üretranın en dış bölümünden geçerken sıklıkla *S.epidermidis*, koliformlar, difteroidler ve hemolitik olmayan streptokoklar ile bulaşır. Kadın ve sünnetsiz erkeklerde üretra ağzı çevresindeki bölge asite dirençli bir organizma olan *Mycobacterium smegmatis* taşıyan salgılar içerir (Levinson W., 2006)

2.7. Bakteriyel Kontaminasyon

2.7.1. Bakteriyel Enzimler

Canlı hücrelerdeki düşük sıcaklıkta kimyasal reaksiyonlarının olabilmesi için katalizörlere ihtiyaç vardır; bu katalizörler enzimlerdir. Enzimler bir canlı hücre tarafından yapılan katalitik araçlardır.

Bakteri enzimleri başlıca iki genel bölüm altında incelenebilirler. Bunlar da:

- 1) Ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler): Dış enzimler hücrenin bulunduğu ortamdaki besinleri, hücre içine girebilecek şekilde hazırlarlar (Unat K., 1997). Bu enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki gıda moleküllerinin ayrışmalarını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimler (hidrolitik enzimler) arasında, başlıca, proteinazlar (peptidaz, jelatinaz, kollajenaz, kazeinaz, fibrinolizin, vs), karbohidrazlar (sellülaz, amilaz, maltaz, laktaz, sukraz, hıyaluridaz, vs) ve lipazlar, nukleaz ve diğerleri bulunmaktadır. Bakteriyel toksik substansların bir kısmı da enzim özelliği taşırlar.
- 2) İntrasellüler enzimler: Bu tür enzimler de hücre içinde sentezlenmelerine karşın, dışarı çıkmayarak burada dissimilasyon ve assimilasyon reaksiyonlarında etkinlik gösterirler. İç enzimler hücrenin yapı maddelerini yapmaya ve hücreye gerekli enerjiyi sağlamak üzere katabolizma faaliyetlerini oluşturmaya yararlar (Unat K., 1997). Endoenzim olarak da tanımlanan bu özellikteki enzimler arasında, başlıca permeazlar

(sitoplasmik membranda bulunurlar ve aktif transportta etkinlikleri vardır, beta galaktosidaz gibi), hidrolazlar (hücre içinde hidrolitik reaksiyonlarda görev yaparlar), oksidoredüktazlar (hücre içinde oksidasyon redüksiyon olaylarında elektron transferini katalize ederler), transferazlar (karbonhidrat metabolizmasında ve yüksek enerjili fosfat bağlarının kurulmasında fonksiyonları vardır), DNA polimeraz (DNA'nın replikasyonunda), RNA polimeraz (DNA iplikçiklerinin birinden mRNA'nın meydana gelmesini katalize eder), nukleaz (DNA ve RNA'ların ayrışmasında), restriksiyon endonukleaz (DNA üzerinde belli baz aralıklarından kesmeler yapar), DNA ligaz (DNA'daki kopmaları tamirde ve birleştirmede fonksiyonu vardır), peptidil transferaz (iki aminoasit arasında peptid bağlarının kurulmasını katalize eder) ve bunlardan ayrı olarak, sayıları 100'leri geçen diğer fonksiyonel enzimler bulunmaktadır.

Enzimler tek başına veya başka gruplarla birleşmiş proteindirler. Bunlar ısıyla bozular, alkolle veya $(NH_4)_2SO_4$ gibi inorganik tuzların yüksek yoğunluktaki eriyiklerinde çökerler, yarı geçirgen zarlardan geçemezler. Enzimler çok etkilidir, bir molekül enzim onbin hatta bir milyon molekül maddeyi bir dakikada etkiler. Enzimler etkiledikleri madde bakımından ileri derecede özgüdürlü. Enzimlerin etkinliğinde; ortamın pH'sı ve sıcaklığından başka enzimin ve etkilenen maddenin yoğunlukları, son ürünlerin ortamda birikmesi etkilidir. Bakterilerin enzim sistemleri arasında farklılıklar vardır ve bundan dolayı onların maddelere karşı etkileri ayırdır; karbonhidratları bazıları parçalayamadığı halde bazıları parçalar. Bazı bakteriler glikoza tesir edemez, bazıları yalnız asit husule getirerek, diğer bazıları ise H_2O ve CO_2 teşkil ederek bunu parçalarlar (Unat K., 1997).

Bakterilerdeki enzim oluşumu iki şekilde olmaktadır.

- a. Detoksifiye edici veya oksidatif enzimler;
 - (1) Katalaz hidrojen peroksidi parçalar.
 - (2) Oksidaz hidrojeni bir yapıdan oksijene taşır.
- b. Proteolitik veya toksik enzimler; Jelatin erimesi proteolitik enzimler hakkında bilgi verir.
 - (1) Hemolizinler eritrosit membranını parçalarlar
 - i. Alfa hemolizinler eritrosit membranını parçalar ancak yok edemezler.

- ii. Beta hemolizinler hem eritrosit membranını parçalar hem de yok ederler.

(2) Koagülaz plazmanın pıhtılaşmasına neden olur.

Bakteriyel enzimler, lipopolisakkarid membranda (reseptör görevi yapan proteinler, fosfolipaz A ve lizofosfolipaz vs), periplasmik aralıkta (transmembran transportta ve kemotaksiste görev alan, elektrolit bağlayan enzimler, fosfotaz ve esteraz vs) ve sitoplasmik membranda (hücre duvarının sentezinde fonksiyonel enzimler, proton translokasyonu, ATPaz (Adenin trifosfat) ve bazı elektron-transfer proteinleri permeaz'ler vs.) lokalize olmuşlar (Kingsbury T. ve Ark., 1990).

2.7.2. Bakteri ve İnsan DNA'sı

PCR işleminin çok az miktardaki DNA'yı amplifiye edebilme özelliği, yeterli özen gösterilmediği takdirde bir dezavantaja dönüşebilir. İncelenen örneğin içinde başka bir DNA kaynağının transfer olması kontaminasyon anlamına gelmektedir. Kontaminasyonun gerçekleşmesi durumunda, incelenen materyalin DNA profilinin çıkarılmamasına sebep olabilir. Bu durum da suçlunun lehine bir sonuç doğurur.

Kontaminasyonun ilk kaynağı genellikle olay yeri ve inceleme ekibidir. Olay yerinde meydana gelen kontaminasyonun kontrolü ve engellenmesi zordur. Ancak laboratuvar kaynaklı kontaminasyon, uygun laboratuvar prosedürleri uygulanır ve uygun çalışma alanları sağlanırsa kontrol edilebilir (Dönmez Ö., 2008).

Biyolojik kontaminasyon, hayvan hatta bakteri gibi insan olmayan DNA tarafından meydana gelebilir, ancak bitki ve hayvan DNA'sından yanlış pozitif sonuç çıkmaz ve değerlendiren kişi tarafından insan DNA'sıyla karıştırılmaz. Aksine insan DNA'sı kolayca ayırt edilebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada insan DNA'sının belirlenmesinde bakteriyel kontaminasyon varlığı laboratuvar aşamasında sıkıntı yaratabilmesine rağmen kimliklendirme aşamasında bir tehlike arz etmediğini göstermektedir (Tyler B., 1996).

Bakteriler, enfekte olmayan idrarda bulunmazlar, ancak idrarın steril olmayan koşullarda toplanması, işlenmesi ve analizine bağlı olarak idrar sedimentinde bol miktarda bakteri görülebilir. İşeme ile idrarın değerlendirilmesi arasındaki zamanın uzun olması da bakteri üremesini kolaylaştırır.

“Kontamine edici” terimi mesaneyi terkettikten sonra idrara eklenen tüm maddeleri

kapsamaktadır. Olası kontamine ediciler çok sayıdadır. İnsan, laboratuvar veya çevre kökenli olabilirler. Kontamine ediciler tek başlarına önemli değildir, ancak yanlış değerlendirmeden kaçınmak için doğru olarak tanımlanmaları gerekir. Uygun hazırlanması, idrarın toplanması ve temiz çalışma şartları ile kontaminasyon önlenmelidir (Fogazzi G. ve Ark., 2010).

2.8. STR (Short Tandem Repeat - Ardışık Kısa Tekrarlar) ve DNA Tipleme

STR, 1 – 6 bç (baz çifti) uzunlukta tekrar bölgesi içeren ve genellikle uzunluğu 350 bç'den az olan allelleri kapsamaktadır. Adli vaka çalışmalarında STR'nin ilk kullanımı 1990'lı yılların başıdır. STR 10 yıllık süre sonunda, dünyada adli laboratuvarların kullandığı standart bir teknik haline gelmiştir. Adli genetik dava çalışmaları STR polimorfizminin analizini içermektedir ve bu durumun kolay kolay değişmeyeceği gözlenmektedir (Goodwin, Linacre, Hadi, 2007).

Günümüzde STR lokusları adli DNA tiplenmesinde başarıyla kullanılmaktadır. STR'ler yüksek polimorfik özelliktedir ve çok az materyalden multipleks çoğaltma ile tiplendirme yapabilmektedir (Butler M. ve Ark., 2003). PCR ile multipleks amplifikasyon ve STR lokusunun tiplendirmesi; adli örneklerden hassas, yüksek ayırım gücü ve hızlı tiplendirmeyi sağlamaktadır (Moretti T. ve Ark., 2001).

ABD'de ve birçok Avrupa ülkesinde adli amaçlı DNA analizi yapan laboratuvarlarda aynı STR bölgeleri incelenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm eyaletler çapında FBI tarafından 1990'da kurulan bir veri bankası olan Combined DNA Index System (CODIS) tarafından kabul edilen ve yeterli olduğu belirlenen 13 STR lokusu (CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11) vardır (Butler J.M., 2006). Çok sayıda STR lokusu karakterize edilmesine rağmen adli olgu çalışmalarında sadece ortak 13 tanesinin analizi yapılmaktadır (Goodwin, Linacre, Hadi, 2007).

Adli DNA analizinde temel amaç, kanıt olan örnekten STR profillerin elde edilmesi ile; kurban ve şüpheliden alınan referans örneklerin STR profilleri karşılaştırılıp, delil örneklerinin kimliklendirilmesidir. Identifiler, Profiler Plus, Cofiler, SGM Plus, Mini Filer ve Y Filer gibi STR genotiplendirme kitleri ticari olarak bulunmaktadır.

Genotiplendirme protokolü; biyolojik örnekten DNA çekitlenmesini, DNA miktar tayinini, STR lokusu için DNA çoğaltılmasını ve Genetik Analizörde dizin analizini içermektedir. Olay yerinde bulunan biyolojik örneklerden DNA eldesi ve miktarının

belirlenmesinde karşımıza çıkabilecek olan problem öncelikli olarak, örneğin kontamine olmuş olmasıdır. Kontamine olan örnekteki insan DNA'sı sıklıkla bakteri DNA'sı da içerebilir. İşte böyle bir örnekten insan DNA'sı çekilemek ve STR analizi yapabilmek önemli bir adımdır; çünkü STR genotipleme sistemlerinin başarısı PCR aşamasında kullanılacak olan DNA miktarına bağlıdır; şöyle ki çok az miktardaki DNA'dan ancak kısmi profil elde edilebilirken, çok fazla DNA miktarı da skala dışı bilgi üretip inhibisyona neden olabilir. Adli analizcilere göre, genellikle sınırlı miktarda olan adli kanıt örneklerinden, yorumlanabilir STR profillerinin eldesi için validasyon sonucu belirlenmiş güvenilir miktar tayin yöntemleri seçilmelidir (Barbisin M. ve Ark., 2009).

Olay yeri çalışmalarında bulunan biyolojik örneklerdeki DNA her zaman taze ve saf değildir. Şöyle ki, çeşitli kimyasallar veya ısıya belli bir süre maruz kalırsa; bakteriyel, biyokimyasal veya oksidatif işlemlere bağlı olarak degradasyon meydana gelir. Bunlara ek olarak adli örnekler çevresel kontaminasyonlara da maruz kalabilir. Bu tür örneklerde STR analizinde başarılı olunmayabilir. Bunun en önemli nedeni STR ürünlerindeki sinyal kaybıdır. Bu sinyal kaybına ya biyolojik örneklerdeki PCR inhibitörleri ya da kalıp DNA'nın istenmeyen küçük parçalara bölünmesi neden olabilir (Butler M. ve Ark., 2003).

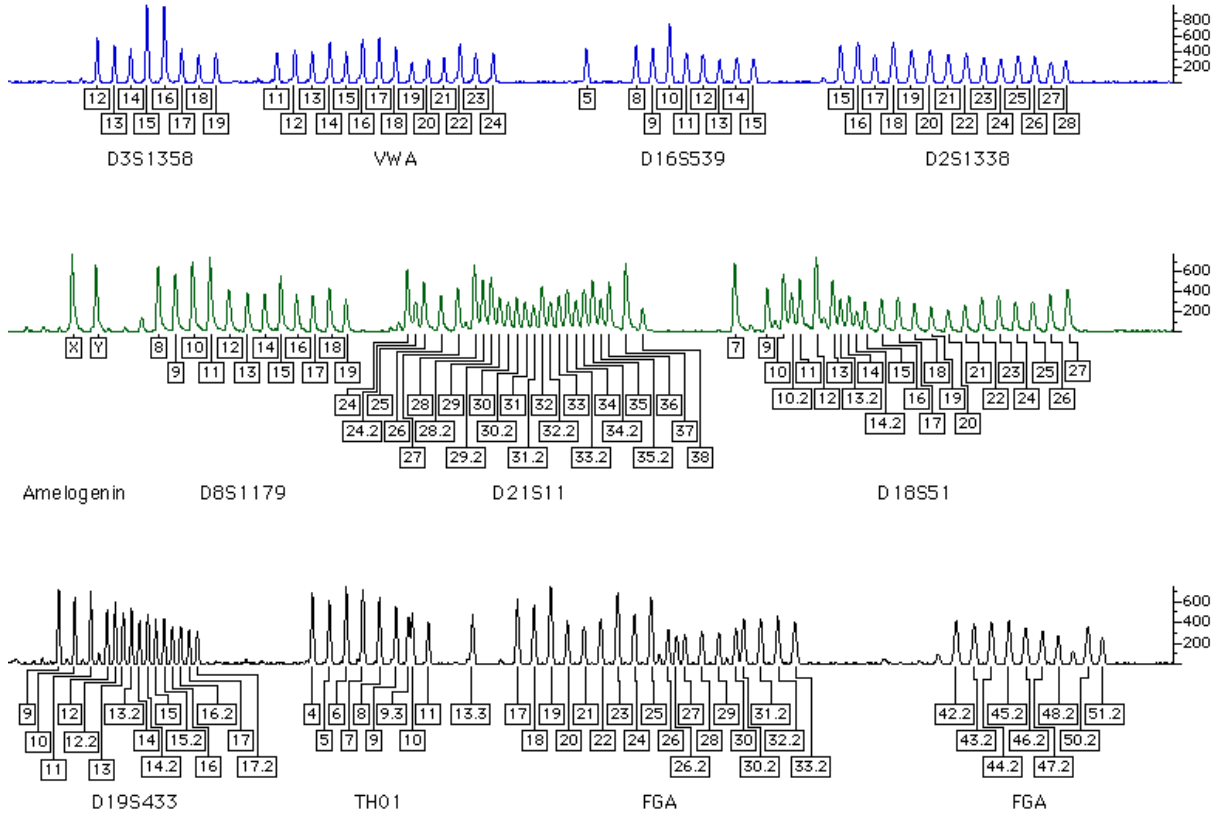
Mevcut kullanılan bütün STR multipleks kitlerinin yapısında X ve Y kromozomlarını bulunduran cinsiyet markerı olan amelogenin dahil edilmiştir. (Goodwin, Linacre, Hadi, 2007).

2.9. AMPFISTR® SGM Plus™ Sisteminin İÇerdiği Lokuslar

AmpFISTR®SGM Plus™ multipleks sistemi Applied Biosystems (ABI) tarafından üretilen DNA profillemeye sistemi olup 1999'da piyasaya sunulmuştur ve 2000 yılında adli olgu çalışmalarında kullanılmak üzere standardizasyonu tamamlanmıştır. AmpFISTR SGM Plus PCR Amplification Kiti, Adli Bilimler Servisi (FSS)'nin İkinci nesil multipleks (SGM) versiyonunun geliştirilmiş modelidir. AmpFISTR SGM Plus PCR Amplification Kiti SGM'de bulunan 6 STR lokusunu içermektedir. Bu lokuslar 4 adet interpol lokusunu (D21S11, FGA, TH01 and vWA) ve D8S1179, D18S51 ve cinsiyet belirleyicisi olan Amelogenin'i bulundurmaktadır.

AmpFISTR SGM Plus kiti meydana getirirken, tek PCR ile aydınlatıcı sonucu elde etmek için, 4 ilave STR lokusu, esas SGM lokusuna eklenmiş ve toplamda 10 STR lokusunu ve amelogenini içermektedir (Şekil 5). D3S1358 ve D19S433 lokusları küçük baz çiftlerine (100- 150 bp) ve düşük moleküler ağırlığa sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı çok az miktarda olan ya da degradasyona uğramış DNA içeren adli örneklerde sonuca gidebilme olasılığını arttırmakta yarar sağlayacaklarından dolayı seçilmişlerdir. Standardize edilen bu multipleks sistem Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) ve DNA analiz yöntemleri üzerinde çalışan teknik grup (Technical Working Group on DNA Analysis Methods, TWGDAM) tarafından da önerilmiştir. Yapılan birçok çalışma ile sistemin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği rutin çalışmalarda eski, bozulmuş örneklerde test edilmiş ve onaylanmıştır.

AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit reaktifleri ve protokolleri adli analiz çalışmaları için hassasiyet ve özgüllük sağlamaktadır. Sağladığı bu özgüllük sayesinde primat olmayan DNA kontaminasyonlarından etkilenmemektedir. (AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit User's Manual; Cotton ve ark., 2000)



(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

Şekil 5: AmpF/STR® SGM Plus™ multipleks sisteminin içerdiği lokuslar

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında materyal olarak, onam formu imzalatılmış 23 – 70 yaşları arasında olan (bkz. Aydınlatılmış onam formu ek: 2) 30 gönüllüden temin edilmiş gaita, idrar ve kontrol için yanak içi sürüntü örnekleri kullanılmıştır. Çalışmanın laboratuvar aşaması İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvar'ında Mayıs 2010 – Haziran 2011 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma 4 aşamayı içermektedir:

1. Aşama: Aydınlatılmış onam formlarını imzalayan gönüllü bireylerden gaita ve idrar örnekleri alındı. 30 yetişkin gönüllünün DNA miktarını saptamak için gaita, idrar ve ağız içi sürüntü örneklerinden DNA'ları izole edildi. İzole edilen DNA'ların miktar tayini yapıldı.
2. Aşama: Gönüllülerden alınan gaita ve idrar örnekleri çeşitli çevre şartlarına belirli saat/gün/haftalarda bırakılıp, olay yerinde karşımıza çıkabilecek durumlar sağlandı, böylece biyolojik örneklerin çevre şartlarındaki DNA degradesyonuna bakıldı.
3. Aşama: Çevre şartlarına bırakılan biyolojik örneklerde bakteri kontaminasyonunun etkisini araştırmak ve bakteri DNA'sının kimliklendirmede sorun çıkartıp çıkarmadığını anlamak için, örnekleri besiyerlerine ekip, çoğalan bakteri kolonisinden DNA'ları çekitlendi. Çekitlenen DNA'ların miktar tayini yapıldı.
4. Aşama; elde edilen DNA örnekleri AmpF/STR SGM Plus PCR amplifikasyon kiti (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, Amelogenin, D8S1179b, D21S11, D18S51, D19S433, THO1, FGA) kullanılarak çoğaltıldı ve ABI Genetik Analizör cihazında kapiller elektroforez yapılarak tiplendirildi.

Araştırmanın laboratuvar kısmı 2 bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölüm: Gaita, idrar ve yanak içi sürüntü örneğinden;

- DNA çekitlemesi,
- DNA miktarlarının belirlenmesi,
- PCR işlemi,
- PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi,
- PCR ürünlerinin ABI 310 ile kapiler elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi,

İkinci bölüm: Gaita ve idrar örneklerini kültür için uygun besiyerlerine ekimi sonucunda elde edilen bakteri kolonisinden;

- DNA çekitlemesi,
- DNA miktarlarının belirlenmesi,
- PCR işlemi,
- PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi,
- PCR ürünlerinin ABI 310 ile kapiler elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesini içermektedir.

3.1 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Mikro santrifüj (ALC PK 121C)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Buzdolabı (Sharp SJ-PT69R)
- PCR Cihazı (Geneamp 9700)
- Etüv (Nüve en-SCO)
- Vorteks (Mixer uzusio vtx-3000L)
- Applied Biosystems Bilgisayar kontrollü Genetik Analyzer 310 (ABI PRISM® 310)
- Florimetri Cihazı (Fluorometer Qubit)

3.2 Deneyde kullanılan Ticari Kitler

3.2.1 Çekitleme Aşaması'nda Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kit

- QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)
- Chelex 100

3.2.2 Miktar Ölçümü İçin Kullanılan Ticari Kit

- The Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- The Quant-iT™ ssDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

3.2.3 PCR Aşamasında Kullanılan Ticari Kit

- AmpFISTR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit (Applied Biosystems)

3.2.4 Bakteriyel Kontaminasyon Çalışması için Kullanılan Besiyeri

- Kanlı Agar
- Endo Agar

3.3 DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ

Onam formu imzalayan, gönüllü 15 kadın ve 15 erkekten gaita ve idrar örnekleri ve bu materyallerin yanında kontrol grubu için ağız içinden swap alındı. Gönüllülerden alınan taze gaita ve idrar örnekleri hemen çalışıldı, bu çalışmadan sonra alınan biyolojik örnekler çeşitli çevre ortamlarına bırakılıp değişik saat/gün/haftalarda çalışılmaya devam edildi.

Gaitadan DNA çekilmesi QIAamp DNA Stool Mini Kit ile, idrar ve kontrol amaçlı olarak gönüllülerden alınan ağız içi epitelyum doku örneklerinden DNA eldesi ise Chelex yöntemi kullanılarak yapıldı.

3.3.1 Chelex İle Yanak İçi Epitel Sürüntüsünden DNA Çekilmesi

Gönüllünün yanak içi epitelinden kontrol amaçlı olarak; yanak swap'ı aracılığı ile sürüntü örneği alındı. İzolasyon aşamasına kadar steril bir ortamda muhafaza edildi.

1. İçinde 1 ml steril deiyonize su bulunan mikrosantrifüj tüpüne yanak içi sürüntü

örneği eklendi. Yavaşça karıştırılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

2. Ağız içi sürüntü örneği çıkartıldıktan sonra 3 dakika 15000 rpm’de santrifüj edildi.

3. Tüpte en az 20 µl kalacak şekilde üst faz atıldı, 200 µl %5 Chelex 100 çözeltisi eklendi.

4. 30 dakika 56°C inkübe edildi, 10 saniye yüksek hızda vortexlendi.

5. 8 dakika 100°C kaynatıldı ve 10 saniye yüksek hızda vortexlendi.

6. 3 dakika 15000 rpm’de santrifüj edildi ve DNA çekitleri 2 – 8°C muhafaza edildi.

3.3.2 Gaita Örneklerine Uygulanan Çevre Şartları

- Gönüllüden alınmış gaita bekletilmeden çalışıldı.

Gönüllünün sabah yaptığı taze gaita, hiçbir olumsuz çevre koşuluna maruz kalmadan, en geç 2 saat içinde laboratuvarda DNA çekitlemesi yapılmıştır.

- 1 hafta, 2 hafta ve 3 hafta -20°C’de bekletilmiş örneklerle çalışma yapıldı.

Gönüllüden alınan, steril olmayan gaita örnek kabında saklanan gaitayı, -20°C’de hiç erimeye maruz bırakmadan, aynı örnekten 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta steril bistüri - swap ile örnek alıp DNA çekitleme çalışması yapılmıştır.

- Aynı örnekte, QIAamp DNA Stool Mini Kit protokolünde bulunan InhibitEx Tablet kullanmadan / kullanılarak çekitleme yapıldı.

- Gönüllünün kullandığı gaita bulaşmış kağıt peçeteden swapla örnek alındı.

Gönüllünün kendi evinde kullandığı steril olmayan tuvalet kağıdından, 1 saat içinde, steril bistüri ile 2 cm X 2,5 cm kesit alınmasıyla DNA çekitlemesi yapılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: Gönüllünün kullandığı gaita bulaşmış kağıt peçeteden örnek alım aşaması

- Gönüllünün kullandığı tuvaletten, gönüllü tuvaletini yaptıktan, sifonu çektikten sonra tuvaletin gaita bulaşan kısmından steril swap'la sürüntü örnek alındı.

- 1 hafta ve 2 hafta dış ortamda, kuru toprakta ve direkt güneş ışığı altında kurumaya bırakılmış, yaklaşık 5 - 20°C arasında bulunan gaitadan örnek alındı (Şekil 7).



Şekil 7: Dış ortam, kuru toprak ve direkt güneş ışığı altında kurumaya bırakılan gaita örneği

- 1 hafta ve 2 hafta; Dış ortamda, nemli toprakta ve gölgede yaklaşık 5 - 20°C arasında bulunan gaitadan örnek alındı (Şekil 8).



Şekil 8: Dış ortam, nemli toprak ve gölgede bırakılan gaita örneği

3.3.3 QIAamp DNA Stool Mini Kit İle Gaitadan DNA Çekilmesi

Taze ve çeşitli çevre şartlarına maruz bırakılmış gaita örneklerinden DNA toplama işlemi, steril bistüri ile gaitanın çeşitli yerlerinden alınarak yapıldı. Elde edilen DNA'ların çekilmesi QIAamp DNA Stool Mini Kit ile yapıldı.

1. Çalışılacak alan Zefirol ile kağıt havlu kullanılarak temizlendi, kullanılacak pipet ve mikrosantrifüj tüpleri otoklavlandı, böylece sterilizasyon sağlandı.

2. 200 mg gaita 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, buz kalıplarında bekletildi.

3. 1.6 ml ASL tamponu her bir gaita örneğine eklendi. 1 dakika boyunca vortexlendi, gaita tam anlamıyla homojenize oluncaya kadar santrifüj edildi.

4. Topaklaşmış gaita parçaları 14000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

5. Yeni 2 ml mikrosantrifüj tüpüne 1.4 ml süpernatant koyuldu.

6. Her bir örneğe InhibitEX tablet eklendi 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilip inhibitörlerin inhibitex matrix tarafından absorblanması sağlandı sonra da 1 dakika boyunca, tablet tamamen eriyinceye kadar vortexlendi.

7. Gaita topakları ve inhibitörler InhibitEX matrix'te sınırlansın diye örneği 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.

8. Santrifüj durduktan sonra bütün süpernatantı yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne koyup, gaita topakları uzaklaştırıldı. Örneği 3 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edildi.

9. Yeni 2 ml mikrosantrifüj tüpüne 25 µl Proteinaze K pipetlendi.

10. Eldeki süpernatandan 600 µl pipetlendi ve Proteinaze K içeren tüpe eklendi.

11. 600 µl AL tamponu eklendi ve 15 saniye vortexlendi.

12. 10 dakika boyunca 70°C'de inkübe edildi.

13. Hazırlanan izolata 600 µl etanol (%96 – 100) eklendi ve vortexle karıştırıldı.

14. Hazırlanan izolattan 600 µl çekip 2 ml'lik atık tüpüne oturtulmuş QIAamp spin kolona dikkatli şekilde aktarıldı. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve atık tüpü yenisiyle değiştirildi.

15. QIAamp spin kolon dikkatli şekilde açıldı ve izolattan ikinci kez 600 µl çekip

kolonuna aktarıldı. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve atık tüp yenisiyle değiştirildi.

16. Spin kolona 500 µl AW 1 tamponu eklendi ve 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve atık tüp yenisiyle değiştirildi.

17. Spin kolona 500 µl AW 2 tamponu eklendi ve 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve atık tüp yenisiyle değiştirildi.

18. Kolon 1.5 ml'lik tüp içine yerleştirildi ve 100 µl AE tamponu eklendi, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi ve 14000 rpm'de santrifüj yapılarak çekit hazır hale getirildi.

3.3.4 İdrar Örneklerine Uygulanacak Çevre Şartları

- Gönüllüden taze idrar örneği, alındıktan en geç 2 saat içinde DNA çekilmesi yapıldı.
- Oda sıcaklığında (22°C) ve -20°C'de 1 hafta ve 2 hafta bekletilmiş idrardan örnek alındı.
- Taze alınan idrar 2 defa, 1 saat -20°C'de dondurup, 3 saat oda ısısına maruz bırakıp eritildi.
- Gönüllünün idrarını steril şırınga yardımı ile çekip 1 damla petri kabına damlatıldı ve damlanın kuruması için oda sıcaklığında dış ortamda 1 gün bekletildi, kurumuş damladan steril distile su ile nemlendirilmiş steril swap'la sürüntü örneği alındı ve DNA çekilmesi yapıldı.

- İdrar yapıp sifonu çekilen/çekilmeyen tuvaletten örnek alınıp, gönüllü ile karşılaştırma yapıldı.

Gönüllü idrarını yaptıktan sonra, tuvaletten hem sifonu çekmeden önce hem de sifonu çektikten sonra idrarın bulaşmış olduğunu tahmin ettiğimiz yerlerinden steril swap'la sürüntü örneği alındı.

- 3 ml idrar, gazlı beze damlatıldı, kuru havada oda sıcaklığında kurutuldu ve bekletilen parçadan steril bistüri ile 2 cm X 2,5 cm kesit alınmasıyla DNA çekilmesi yapıldı (Şekil 9).



Şekil 9: Gazlı beze damlatılan idrardan DNA çekilmesi

3.3.5 Chelex İle İdrardan DNA İzolasyonu

Çeşitli şartlar altında tutulmuş idrar örneklerinden DNA toplama işlemi steril nemli koton swap'la yapıldı. Elde edilen DNA'ların çekitilmesi Chelex yöntemi ile yapıldı.

1. 2 ml mikrosantrifüj tüpüne 1000 µl idrar örneği eklendi, 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
2. Tüpte 20 – 30 µl kalacak şekilde üst faz atıldı, 200 µl %5 Chelex 100 çözeltisi eklendi.
3. 20 – 30 dakika 56°C'de inkübe edildi, 10 saniye yüksek hızda vortexlendi.
4. 8 dakika 100°C 'de kaynatıldı ve 10 saniye yüksek hızda vortexlendi.
5. 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve DNA çekitleri 2 – 8°C 'de muhafaza edildi.

3.4 DNA MİKTAR TAYİNİ

Bu tez çalışmasında örneklerin DNA miktarları Florometrik yöntem ile Qubit® Florometre (Invitrogen) cihazı ile tayin edildi. Çalışılan örneklerin DNA miktarlarının ölçümleri, çekitleme aşamasında çalışılan yöntemlere göre değişiklik göstermektedir. Yanak içi epitel hücre sürüntüsünün ve idrarın çekitleme aşamasında kullanılan Chelex®100 yöntemi ile tek zincirli DNA elde edildiği için The Quant-iT™ ssDNA HS (High Sensitive) Assay Kit (Qubit ssDNA Kit Quick Reference Card, 2010), QIAamp® Stool DNA Mini Kit ile çift zincirli DNA elde edildiği için The Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA miktarı belirlenmiştir. Floresans teknolojisine dayalı cihaz ile DNA miktarları 260 nm dalga boyunda, aşağıdaki adımlar izlenerek ölçülmüştür.

3.4.1 The Quant-iT™ Assay Kit ile DNA İzolatlarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

3.4.2 Quant-iT™ ssDNA HS Assay Kit ile DNA Konsantrasyon Belirlenmesi

1. Çalışılacak örneklerin sayısı ve cihazın her çalışmada yapılan kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart (S1 – S2) ile toplam sayıya göre 0.5 ml’lik steril tüpler ayarlandı, örneklerin adı tüplerin kapak kısmına yazılıp S1 ve S2 örneklerle karışmasın diye ayrı bir yere koyuldu.

2. Quant-iT™ ssDNA HS Assay Kitinin içinde bulunan Quant-iT ssDNA HS reaktifi, ölçüm yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT çalışma solusyonu ile seyreltilerek, tüplere 200µl’lik karışımlar hazırlandı.

Washing Solusyonunun Hazırlanışı

Quant-iT Buffer 199 x n (µl) + Quant-iT Reagent x n (µl)

3. Hazırlanan karışımdan, standartların çalışılacağı tüplere 190 µl, örneklerin çalışılacağı tüplere de 199 µl konuldu.

4. Standartların hazırlanmasında; S1 ve S2 için olan özel standartlardan 10µl alınarak 190 µl’lik karışım olan tüplere eklendi.

5. Ölçülecek her bir örneğe ait izolatlardan 1 µl alarak 199 µl’lik karışım olan tüplere

eklendi. Bu aşamadan önce çalışılacak izolatlar 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj yapıldı, izolatın supernatant kısmından pipetaj yapıldı.

6. Hazırlanan karışımlar vortexlendi, hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.

7. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. İlk önce cihazın kalibrasyonunun yapılması için hazırlanan standartlar; Qubit florometer cihazında ölçülerek DNA konsantrasyonları belirlendi. Sonrasında ölçüm için hazırlanan örnekler sırasıyla işleme tabi tutuldu, miktarları dikkatli şekilde not alındı.

3.4.3. Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA Konsantrasyon Belirlenmesi

1. Çalışılacak örneklerin sayısı ve cihazın her çalışmada yapılan kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart (S1 – S2) ile toplam sayıya göre 0.5 ml’lik steril tüpler ayarlandı, örneklerin adı tüplerin kapak kısmına yazılıp S1 ve S2 örneklerle karışmasını diye ayrı bir yere koyuldu.

2. Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kitinin içinde bulunan Quant-iT dsDNA HS reaktifi, ölçüm yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT çalışma solusyonu ile seyreltilerek, tüplere 200µl’lik karışımlar hazırlandı.

Washing Solusyonunun Hazırlanışı

Quant-iT Buffer 199 x n (µl) + Quant-iT Reagent x n (µl)

3. Hazırlanan karışımdan, standartların çalışılacağı tüplere 190 µl, örneklerin çalışılacağı tüplerde 199 µl konuldu.

4. Standartların hazırlanmasında; S1 ve S2 için olan özel standartlardan 10µl alınarak 190 µl’lik karışım olan tüplere eklendi.

5. Ölçülecek her bir örneğe ait izolatlardan 1 µl alarak 199 µl’lik karışım olan tüplere eklendi.

6. Hazırlanan karışımlar vortexlendi, hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.

7. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. İlk önce cihazın kalibrasyonunun yapılması için hazırlanan standartlar; Qubit florometer cihazında ölçülerek DNA konsantrasyonları belirlendi. Sonrasında ölçüm için hazırlanan örnekler sırasıyla işleme tabi tutuldu, miktarları dikkatli şekilde not alındı.

3.5 PCR YÖNTEMİ

Bu çalışmada ABI Prism 310 Genetik Analyzer aleti için Applied Biosystems tarafından üretilen ve standardize edilerek kullanıma sunulan AmpFISTR SGM Plus Amplifikasyon kiti kullanıldı.

AmpFISTR SGM Plus Amplifikasyon kitinin içerdiği malzemeler ve saklama koşulları şöyledir:

- AmpFISTR PCR Reaksiyon Karışımı (1.1 mL/tüp olarak iki tüp) (2 - 8°C)

İki tüp içinde tampon, tuz ve:

- ❖ MgCl₂
- ❖ dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- ❖ %0.05 sodyum azid (NaN₃)
- ❖ BSA (Bovine serum albumin)

- AmpFISTR SGM Plus™ Primer seti (1.1 mL) (2 - 8°C)

Lokus spesifik 5-FAM-, JOE- ve NED floresan olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, ve FGA STR lokusları ve cinsiyet marker'ı olan amelogenin'e özgü primer çiftleri bulunmaktadır.

- AmpliTaq Gold DNA Polimeraz (50 µL/tüp olarak iki tüp) (-20°C)

5 U/µL aktiviteli enzim

- AmpFISTR Control DNA 007 (0.3 mL) (2 - 8°C)
- Mineral yağ (5 mL) (Oda sıcaklığında)

Damlalıklı şişe halinde

- AmpFISTR SGM Plus Alelik Ladder (50 µL) (2 - 8°C)

Bir tüp AmpFISTR SGM Plus Alelik Ladder amplifiye alleller içermektedir.

AmpFISTR SGM Plus PCR Amplifikasyon kitinde bulunan malzemelerden AmpFISTR PCR Reaksiyon Karışımı, AmpFISTR SGM Plus™ Primer seti, AmpFISTR Control DNA, ve AmpFISTR SGM Plus Alelik Ladder 2-8 °C'de; AmpliTaq Gold DNA Polimeraz ise -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca primerlere bağlanan floresan boyalar ışığa duyarlı olduğu için primer seti ışıktan korundu.

3.5.1. PCR Primerlerinin Seçimi

Tablo 1: SGM Plus PCR Primer dizileri

Lokusun Adı	Primer Dizini (5' – 3')
D3S1358	İleri ACTGCAGTCCAATCTGGGT OH Geri ATGAAATCAACAGAGGCTTGC
vWA	İleri GCCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATGTG OH Geri GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG TMR
D16S539	İleri GGGGGTCTAAGAGCTTGTA AAAAG OH Geri GTTTGTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC JOE
D2S1338	İleri ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG OH Geri TGTATTAGTCAATGTTCTCCAGAGAC FL
Amelogenin	İleri CCCTGGGCTCTGTAAAGAA TMR Geri ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG OH
D8S1179	İleri ATTGCAACTTATATGTATTTTTGTATTCATG OH GeriACCAAATTGTGTTTCATGAGTATAGTTTC TMR
D21S11	İleri ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG OH Geri TGTATTAGTCAATGTTCTCCAGAGAC FL
D18S51	İleri TTCTTGAGCCCAGAAGGTTA FL Geri ATTCTACCAGCAACAACACAAATAAAC OH
D19S433	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG)
TH01	İleri GTGATTCCCATTTGGCCTGTTC FL Geri ATTCCTGTGGGCTGAAAAGCTC OH
FGA	İleri GGCTGCAGGGCATAACATTA TMR Geri ATTCTATGACTTTGCGCTTCAGGA OH

(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

Tablo 2: STR SGM Plus kit lokusları

Lokus ismi	Kromozom alanı	Ortak Dizin Motifi	Boyut Aralığı (bp)	İşaretili Boya
D3S1358	3p	TCTA (TCTG)1-3 (TCTA) _n	114–142	5-FAM
vWA	12p12-pter	TCTA(TCTG)3-4(TCTA) _n	157–209	5-FAM
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n	234–274	5-FAM
D2S1338	2q35–37.1	(TGCC) _n (TTCC) _n	289–341	5-FAM
Amelogenin	X: p22.1–22.3	—	107	JOE
	Y: p11.2		113	
D8S1179b	8	(TCTR) _{nc}	128–172	JOE
D21S11	21q11.2–q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA)3TA(TCTA)3TCA (TCTA)2TCCA TA] (TCTA) _n	187–243	JOE
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	26–345	JOE
D19S433	19q12–13.1	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) _n	106–140	NED
TH01	11p15.5	(AATG) _n	165–204	NED
FGA	4q28	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC)2	215–353	NED

(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

Tablo 3: AmpF/STR® SGM™ Plus kit- Alelik Ladder ve kontrol DNA bilgileri

STR lokusu	AmpFI STR Alelik Lader alel	Bildirilen diğer aleller	Kontrol DNA 007 genotip
D3S1358	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	9, 10, 11, 15.2, 16.2, 17.1, 20	15, 16
vWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	10, 15.2, 18.2, 18.3, 19.2, 25	14, 16
D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	—	9, 10
D2S1338	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	—	20, 23
Amelogenin	X, Y	—	X, Y
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6, 7, 20.2, 21.2	12, 13
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	25.2, 26.1, 27.2, 27.3, 28.3, 29.1, 29.3, 30.1, 31.1, 31.3, 32.1, 32.3, 33.3, 34.3, 35.3, 36.2, 36.3, 37.2, 38.2	28, 31
D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	8, 9.2, 12.2, 15.1, 15.2, 15.3, 16.2, 16.3, 17.1, 17.2, 17.3, 18.1, 18.2, 19.2, 20.1, 20.2, 21.2, 23.1	12, 15
D19S433	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	18, 18.2, 19	14, 15
TH01	4,5,6,7,8,9,9.3,10,11,13.3	3,5,3,6.1,6.3,7.1,7.3,8.3,10.3, 14	7,9.3
FGA	17,18,19,20,21,22,23,24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	12.2,13,15,16,16.1,16.2, 17.1, 17.2, 18.1, 18.2, 19.1, 19.2, 19.3, 20.1, 20.2, 20.3, 21.2, 22.1, 22.2, 22.3, 23.2, 23.3, 24.1, 24.2, 24.3, 25.1, 25.2, 25.3, 26.1, 27.1, 27.3, 28.1, 29.2	24,26

(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

3.5.2. PCR Karışımının Hazırlanması

Çoğaltılacak örneklerle birlikte, biri pozitif diğeri negatif iki kontrol örnek de göz önüne alınarak, PCR karışımı şu şekilde hazırlandı;

1. Gerekli sayıdaki 0.2 mL'lik MicroAmp kapaklı PCR tüpleri, tüp tutucuya yerleştirildi ve tüplerin isimlendirilmesi yapıldı. Ayrıca negatif ve pozitif kontrol tüplerin işaretlenmesi yapıldı.

2. AmpFISTR® PCR Reaksiyon karışımı, AmpFISTR® SGM Plus Primer Seti ve AmpliTaq Gold DNA Polimeraz 5 saniye vortexlendi. Kapakta herhangi bir sıvı kalmasın diye tüpler kısa bir süre santrifüj yapıldı.

3. 1.5 mL'lik Steril ependorf tüp içine AmpFISTR® SGM Plus Master Mix aşağıdaki miktarda hazırlandı:

- Gaita örneklerinin çoğaltılması için:

Örnek Sayısı x 9.5 µL AmpFISTR® PCR Reaksiyon Karışımı

Örnek Sayısı x 4,5 µL AmpFISTR® SGM Plus Primer Seti

Örnek Sayısı x 0.5 µL AmpliTaq Gold DNA Polimeraz

2 µL BSA

- İdrar örneklerinin çoğaltılması için:

Örnek Sayısı x 10.5 µL AmpFISTR® PCR Reaksiyon Karışımı

Örnek Sayısı x 6 µL AmpFISTR® SGM Plus Primer Seti

Örnek Sayısı x 0.5 µL AmpliTaq Gold DNA Polimeraz

2 µL BSA

4. Karışım orta hızda 5 saniye vortexlendi.

5. Kapakta sıvı kalmamasını sağlamak için karışım kısa bir süre mikrosantrifüj yapıldı.

6. Her tüpe Master Mix'den gaita örneklerinin çoğaltılması için 14.5 µL, idrar örneklerinin çoğaltılması için 17 µL eşit şekilde dağıtıldı.

7. PCR tüplerine Gaita için 5 µL DNA, İdrar için 10 µL DNA eklendi.

8. Hazırlanan PCR tüplerini GeneAmp PCR Systems 9700 cihazına yerleştirildi ve

program başlatıldı.

9. PCR sonunda program, +4°C'ye bağlanarak, örneklerin oda sıcaklığında kalıp bozulması engellendi. Ayrıca PCR ürünleri uzun süre saklanacağından -20°C' de muhafaza edildi.

3.5.3. PCR Döngü Parametreleri

PCR döngü parametreleri kitin yönergesine uygun olarak aşağıda yazıldığı gibi ayarlandı:

Tablo 4: Kontrol amaçlı ağız içinden alınan DNA izolatlarının PCR döngü parametresi

Aşama	Başlangıç İnkübasyonu	28 döngü			Son uzama aşaması	Saklama sıcaklığı
		Denatürasyon	Bağlanma	Uzama		
Sıcaklık (°C)	95 °C	94 °C	59 °C	72 °C	60 °C	4°C
Zaman	11 dakika	1 dakika	1 dakika	1 dakika	45 dakika	∞

(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

Tablo 5: Gaita ve İdrar'dan elde edilen DNA izolatlarının PCR döngü parametreleri

Aşama	Başlangıç İnkübasyonu	34 döngü			Son uzama aşaması	Saklama sıcaklığı
		Denatürasyon	Bağlanma	Uzama		
Sıcaklık (°C)	95 °C	94 °C	59 °C	72 °C	60 °C	4°C
Zaman	11 dakika	1 dakika	1 dakika	1 dakika	60 dakika	∞

(AmpF/STR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual'dan alınmıştır)

PCR işlemi bittikten sonra, program +4°C'ye bağlanarak örneklerin oda sıcaklığına maruz kalması engellendi, böylece bozulması önendi. Ayrıca PCR ürünleri uzun süre saklanacağından -20°C'de muhafaza edildi.

3.6 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Yürütülmesi

% 2'lik agaroz jel için; beher içerisinde 1 gr agaroz tartıldı ve üzerine 50 ml 0,1X Tris Borat Edta (TBE) buffer eklendi. Tampon içindeki agaroz eriyip ve şeffaflaşana kadar ısıtıcıda kaynatıldı. Etidyum bromür (EtBr) eklendi ve karıştırılarak homojen bir jel elde edildi. Jelin ılıması için biraz beklendi. Daha sonra jel agaroz tepsisine döküldü ve tarak yerleştirilerek polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra tarak yavaşça çıkarıldı ve tepsi tankın içerisine yerleştirildi. Tank, jelin üstünü kapatacak kadar 0,1X TBE buffer ile dolduruldu. 5 µl örnek 1 µl yükleme tamponu (bluedye) ile karıştırılarak jele yüklendi. Örneklerin yanında 1 kb DNA Ladder, 1 tane pozitif ve 1 tane de negatif kontrol jele yüklendi. Jel 90 V'da 1 saat yürütüldü ve mor ötesi ışın (UV) altında incelendi, daha sonra fotoğrafları çekilerek saklandı.

3.7 KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ

Kapiller elektroforez yöntemi Applied Biosystems tarafından üretilen ABI PRISM 310 aleti kullanılarak yapıldı.

3.7.1 Örneklerin Yükleme ve Yürütme İçin Hazırlanması

1. Yürütülecek örneklerle birlikte, biri pozitif diğeri negatif iki kontrol örnek ve tiplene yapmak için gerekli olan Ladder da göz önüne alınarak, yeterli sayıda tüp alındı.

2. Gerekli miktardaki deiyonize formamidi ve GeneScan-500 (ROX) Size Standardı tekli mikrosantrifüj tüpüne aşağıda belirtilmiş şekilde kombine edildi;

(Örnek Sayısı +2) x 12 µL deiyonize formamid

(Örnek Sayısı +2) x 0.5 µL GeneScan-500 (ROX) Size Standart

3. Tüpün içindeki içeriğin iyice karışması için vortex yapıldı, bu işlemden sonra kısa bir süre (5-10sn) mikrosantrifüj uygulandı.

4. 12.5 µL formamid/GeneScan-500 (ROX) içeren karışımı 0.5 mL'lik Genetic Analyzer tüplerine eşit miktarda dağıtıldı. Dağıtım öncesi tüplerin isimlendirilmesi yapıldı.

5. PCR ürünlerinden 1.5 µL alıp, isimleri yazılan tüplere koyuldu. Pipetaj yapılarak örneğin karışması sağlandı.

6. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek, 3 dakika 95 °C'de denatüre olması sağlandı.

7. Denatüre olan örnekler 3 dakika da buz üzerinde bekletildi.

3.7.2 Örneklerin Yüklmesi ve Yürütülmesi

1. Denatüre edilip buzda bekletilen örnekleri içeren tüpler, enjeksiyon listesinde yazıldığı sırayla ABI 310 aletinin tepsisine yerleştirildi. Üzerine ikinci tepsi oturuldu. Lastik tıkaçlarla kapatılarak, beyaz kapakla kilitlendi.

2. Isısı 60°C'ye gelmiş olan aletin kapakları açılarak, otomatik örnekleyici kolu öne getirildi ve örnek tepsisi kol üzerindeki alana yerleştirildi.

3. Otomatik örnekleyici kolu geri gönderilerek, kapiler ve elektrodun tampon kabı

içine yerleşmesi sağlandı. Aletin kapakları kapatıldı. Enjeksiyon listesinden ‘Run’ komutu ile yürütme başlatıldı.

4. Alet, önce şırınga kolunu iterek kapilerin içini polimerle doldurduktan sonra kapilerin ve elektrodun ucunu distile su kabında temizleyip, tampon kabına gitti. Akımı başlatarak, içine çektiği örneği kapilerde yürüttü. Bir örneğin yürütmesi bittikten sonra, o örnek için kullanılmış polimeri, içinde distile su bulunan atık kabına boşalttı. Daha sonra tekrar şırınga kolunu iterek kapilerin içini yeni polimerle doldurdu ve aynı işlemleri sırasıyla tekrar ederek tüm örnekler yürütüldü. Standart olarak 500 (ROX) kullanıldı.

3.7.3 Analizi tamamlanan Örneklerin Sonuçlarının Görüntülenmesi

1. Örneklerin analizleri bittiğinde, Gen Tarama Yazılımı penceresi otomatik olarak açıldı ve örneklerle ilgili veriler aynı dosya içine kaydedilerek, yorumlanabilecek sonuçlara dönüştürüldü.

2. ABI PRISM 310 cihazında veri toplama sırasında floresans işaretleri CCD kamera üzerinde yayılan ışın ile kendi dalga boylarına göre grafik oluşturdu. Bu üç floresans boya AmpFISTR STR SGM Plus amplifikasyon kitinde yer alan 5-Fam, Joe ve Ned boylarıdır. Dördüncü boya olan Rox standart boya olarak kullanıldı (Ek 2. Matriks dosyasının oluşturulması). Bu aşamadan sonra ‘Display’ komutu verilerek, açılan ekrandan sonuçlar incelendi. Örneklerle birlikte ayrı bir tüpte yürütmesi yapılan Ladder da aynı şekilde incelendi.

3. Örnek sonuçları Ladder sonuçları ile üst üste getirilerek, örnek tiplmesi yapıldı. Örneğin yazılı olduğu alan ile birlikte Ladder’ın yazılı olduğu alan da seçilerek, ikisinin de aynı renklerle verilen sonuçlarının aynı kutulara gelmesi sağlandı. Daha sonra ‘Display’ komutu verilerek, örnek ile Ladder’ın üst üste getirilen sonuçlarının bulunduğu ekranda, örneğin ya da Ladder’ın her alandaki rengi değiştirildi ve ikisi arasında fark yaratılarak örneğin piklerinin Ladder’ın hangi alellerine denk geldiği daha doğru bir şekilde tespit edildi. Ekranın altındaki sayısal veriler de kullanılarak, her pikin boyutu ile denk geldiği ladder alelinin SGM Plus PCR Amp kitinin kullanıcı kılavuzunda yer alan tablodaki verilere göre olması beklenen boyutu karşılaştırıldı ve buna göre tüm örneklerdeki aleller tespit edildi.

3.8 Gaita ve İdrar Örneklerinin Mikrobiyolojik Analizi

3.8.3 Gaita ve İdrar Örneklerinin Kültüre Edilmesi

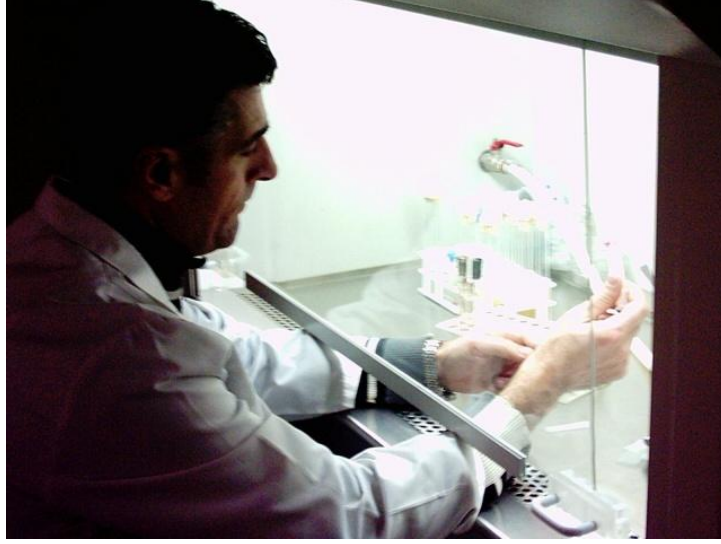
Örneklerin ekileceği plak besi yerinin alt kısmına gönüllünün numarası yazıldı. Steril luplu özenin uç kısmı örneğin içinde karıştırıldı. Bir öze dolusu örnek alındı. Öze örnek kabının cidarına değdirilmeden çıkarıldı.

Ekim yapılacak plak besi yeri, sol elin baş ve işaret parmağı serbest kalacak şekilde, avuç içinde kavranarak hafif dik konumda tutuldu. Plak besi yeri yüzeyinde hayali olarak dört ekim alanı oluşturuldu. Petri kutusunun kapağı, öze ucunun rahatlıkla gireceği bir aralık oluşturacak şekilde sol elin başparmağı ile yarım olarak açıldı. Yarı açık kapak işaret parmağı ile desteklenerek açıklık sabitleştirildi

Petri kapağı açıklığından öze ucu petri kutusu içine sokuldu. Hayali oluşturulan 1. ekim alanındaki besi yeri yüzeyine, bir öze dolusu örnek, petri iç duvarından 4 mm uzaklıkta dar açılı zikzak ekim çizgileri oluşturularak aktarıldı (Şekil 10 - 11).

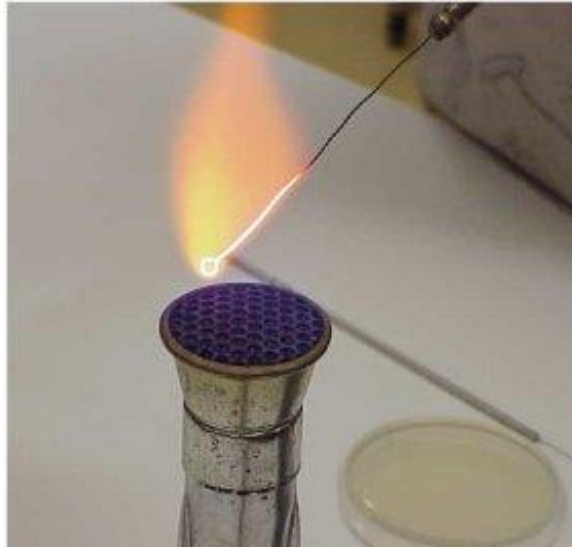


Şekil 10: Örneklerin Uygun Besiyerlerine Ekimi



Şekil 11: Örneklerin Uygun Besiyerlerine Ekimi

Öze tekniğine uygun olarak Şekil 12’de gösterildiği gibi steril edildi. Plak besi yeri birinci ekim alanı üstte olacak şekilde elde çevrilerek plak kapağı tekniğine uygun açıldı. Steril edilmiş özenin sıcak ucu besi yeri yüzeyinde ekim çizgilerinin oluşturulacağı alan dışında veya petri kutusu iç duvarından besi yeri alt tabanına sokularak besi yerine zarar vermeden bir süre bekletilerek soğutuldu.



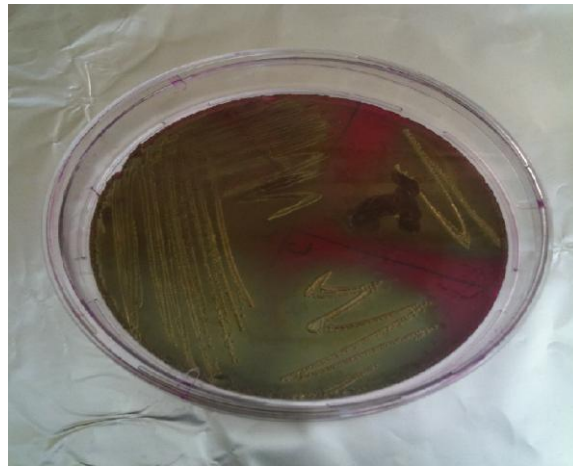
Şekil 12: Öze’nin Steril Edilmesi

Besi yerinin 1. ekim alanına aktarılmış örnek üzerinde özeyle sık aralıklarla üstüste gelecek şekilde birbirine paralel zikzaklar çizildi. Aktarılan örneğin iyice özeyle bulaşması sağlandı. Öze ucundaki örnek 1. ekim alanına birbirine paralel zikzak ekim çizgileriyle yayılarak dolduruldu. Öze dışarı çıkarılarak petri kutusunun kapağı kapatıldı. Bu şekilde besi yerinin 1. ekim alanında ekim işlemi tamamlandı. Öze tekniğine uygun olarak tekrar steril edildi.

Plak besi yeri 2. ekim alanı üstte olacak şekilde elde çevrilerek plak kapağı tekniğine uygun açıldı. Öze ile ikinci ekim alanı, birinci ekim alanında oluşturulan ilk ekim çizgilerinin uç kısımlarına degecek şekilde zikzak ekim çizgileriyle dolduruldu. Öze dışarı çıkarılarak petri kutusunun kapağı kapatıldı. Bu şekilde 2. ekim alanında ekim işlemi tamamlandı.

Plak yüzeyinin 3. ve 4. ekim alanlarında da aynı yöntemle ekime devam edilerek ekim işlemi sonlandırıldı.

Gaita örneğini Endo agara, idrar örneklerini de Kanlı ve Endo agara ektikten sonra 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası şüpheli kolonilerden tekrar pasajlar alınarak gerek mikroskopik gerekse biyokimyasal tanı yöntemleri ile bakterilerin identifikasyonu sağlandı. Elde edilen kolonilerden steril swap'la sürüntü örneği alındı (Şekil 13, 14) ve Chelex yöntemi ile bakteri DNA çekilmesi yapıldı. Çekitlenen örneklerin miktar tayini Quant-iT™ ssDNA HS Assay Kit ile yapıldı. PCR ve Yürütme aşaması için, gaita ve idrar örneklerindeki prosedür uygulandı.



Şekil 13: Endo agara ekilen gaita örneğinden Escherichia coli bakterisi



Şekil 14: Kanlı agara ekilen, idrar örneğindeki *Staphylococcus* spp. bakterisi

4. BULGULAR

Çalışmanın laboratuvar kısmı İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışma 4 aşamayı içermektedir. İlk aşama, aydınlatılmış onam formlarını imzalayan gönüllülerden gaita, idrar ve kontrol amaçlı ağız içi sürüntü örnekleri örnekleri alındı. 15 kadın 15 erkek toplam 30 yetişkin gönüllünün DNA miktarını saptamak için taze gaita, idrar ve ağız içi sürüntü örneklerinden DNA'lar izole edildi ve miktar tayinleri yapıldı. Daha sonraki aşamada, gönüllülerden alınan gaita ve idrar örnekleri çeşitli çevre şartlarına belirli saat/gün/haftalarda bırakılıp, olay yerinde karşımıza çıkabilecek durumlar sağlandı, böylece biyolojik örneklerin çevre şartlarındaki DNA degradasyonuna ve bakteriyel kontaminasyondan etkilenip/etkilenmediğine bakıldı. Tezin mikrobiyolojik açıdan çalışması ise, çevre şartlarına bırakılan biyolojik örneklerden çoğalan bakterileri uygun besiyerlerine ekip, çoğalan bakteri kolonisinden DNA'ları izole edildi. Son aşamada da, elde edilen bütün DNA örnekleri AmpF/STR SGM Plus PCR amplifikasyon kiti kullanılarak çoğaltıldı ve ABI Genetik Analizör cihazında kapiller elektroforez yapılarak tiplendirildi.

Bu çalışmanın amacı, onam formu imzalayan gönüllü kişilerin verdiği gaita ve idrar örneklerini olay yerinde karşılaşılabileceğimizi düşündüğümüz çeşitli çevre şartlarına maruz bırakıp, meydana gelebilecek degradasyonu değerlendirmek, gaita ve idrar örneklerinden failin DNA'sını tespit edilebileceğini ve kimliklendirilebileceğini kontrollü deneme yöntemleriyle kanıtlamaktır.

4.1 Gönüllü bilgileri ve Gaita Örneklerinin DNA Miktarlarının Karşılaştırılması

Gaita çalışmasında 23-70 yaşları arasında; 15 kadın, 15 erkek olmak üzere 30 gönüllü katıldı. Taze çalışılan örneklerin miktar tayinleri 0.19 µg/ml – 6.77 µg/ml aralığında çıktı. -20°C’de bekletilmiş örneklerde, tuvaletten alınan sürüntü örneğinde ve çevre ortamına bırakılmış örneklerde DNA miktarların arttığı gözlemlenmiştir. Tuvalet kağıdı sürüntüsünden elde edilen miktarın azaldığını ve InhibitEX tablet kullanılmayan örneklerden ise miktar tayini yapılamadığı gözlenmiştir.

Tablo 6: Gönüllü bilgileri ve Gaita örneklerinin DNA miktarları

Örnek No	Cinsiyet	Materyal	Örneğe Uygulanan Çevre Koşulu	DNA Miktarı	Elde Edilen Lokus Sayısı
1	Erkek	Gaita	Taze materyal	3.92 µg/ml	11
		Gaita	1 hafta -20°C’de bekletildi	4.4 µg/ml	11
		Gaita	2 hafta -20°C’de bekletildi	5.67 µg/ml	3
		Gaita	1 hafta kuru toprakta güneş altında bekletildi	3.43 µg/ml	5
		Gaita	1 hafta nemli toprakta gölgede bekletildi	1.9 µg/ml	6
		Gaita	2 hafta kuru toprakta güneş altında bekletildi	8.49 µg/ml	3
		Gaita	2 hafta nemli toprakta gölgede bekletildi	4.75 µg/ml	1
2	Kadın	Gaita	Taze materyal	1.21 µg/ml	10
		Gaita	1 hafta -20°C’de bekletildi	2.54 µg/ml	9
		Gaita	1 hafta kuru toprakta güneş altında bekletildi	1.38 µg/ml	4
		Gaita	1 hafta nemli toprakta gölgede bekletildi	1.26 µg/ml	5
		Gaita	2 hafta kuru toprakta güneş altında bekletildi	14.1 µg/ml	2
		Gaita	2 hafta nemli toprakta gölgede bekletildi	6.22 µg/ml	3
3	Kadın	Gaita	Taze materyal	2.54 µg/ml	11
		Gaita	21 gün -20°C’de bekletildi	88.3 µg/ml	2
4	Kadın	Gaita	Taze materyal	3.76 µg/ml	11
		Gaita	21 gün -20°C’de bekletildi	94.4 µg/ml	2
5	Kadın	Gaita	Taze materyal	2.45 µg/ml	11
		Gaita	21 gün -20°C’de bekletildi	28.9 µg/ml	1
6	Kadın	Gaita	Taze materyal	6.52 µg/ml	11
		Gaita	Tuvalet kenarı sürüntüsü	24.3 µg/ml	4
7	Kadın	Gaita	Taze materyal	16.9 µg/ml	6
		Gaita	14 gün -20°C’de bekletildi	57.7 µg/ml	2
8	Kadın	Gaita	Taze materyal	6.64 µg/ml	9
		Gaita	14 gün -20°C’de bekletildi	12.8 µg/ml	4
9	Kadın	Gaita	Taze materyal	2.62 µg/ml	11
10	Erkek	Gaita	Taze materyal	5.15 µg/ml	8
11	Kadın	Gaita	Taze materyal	3.92 µg/ml	7
12	Erkek	Gaita	Taze materyal	4.91 µg/ml	11
		Gaita	Tuvalet kağıdı sürüntüsü	0.28 µg/ml	11
13	Erkek	Gaita	Taze materyal	3.5 µg/ml	11

Örnek No	Cinsiyet	Materyal	Örneğe Uygulanan Çevre Koşulu	DNA Miktarı	Elde Edilen Lokus Sayısı
14	Kadın	Gaita	Taze materyal	6.2 µg/ml	11
		Gaita	1 hafta -20°C'de bekletildi	10.3 µg/ml	9
15	Erkek	Gaita	Taze materyal	3.63 µg/ml	11
16	Kadın	Gaita	Taze materyal	6.77 µg/ml	8
17	Erkek	Gaita	Taze materyal	2.99 µg/ml	6
18	Kadın	Gaita	Taze materyal	0.5 µg/ml	7
19	Kadın	Gaita	Taze materyal	3.48 µg/ml	8
20	Kadın	Gaita	Taze materyal	1.22 µg/ml	9
21	Erkek	Gaita	Taze materyal	1.38 µg/ml	9
22	Kadın	Gaita	Taze materyal	1.2 µg/ml	11
23	Erkek	Gaita	Taze materyal	1.06 µg/ml	11
		Gaita	1 hafta -20°C'de bekletildi	2.69 µg/ml	10
24	Erkek	Gaita	Taze materyal	1.84 µg/ml	11
25	Erkek	Gaita	Taze materyal	0.77 µg/ml	11
26	Erkek	Gaita	Taze materyal	2.02 µg/ml	10
27	Erkek	Gaita	Taze materyal	0.19 µg/ml	7
		Gaita	InhibitEX tablet kullanılmadı	<0.50 µg/ml	0
28	Erkek	Gaita	InhibitEX tablet kullanılmadı	<0.50 µg/ml	0
29	Erkek	Gaita	InhibitEX tablet kullanılmadı	<0.50 µg/ml	0
30	Erkek	Gaita	Taze materyal	3.50 µg/ml	9
		Materyal	Elde Edilen Bakteri	DNA Miktarı	
		Gaita	Escherichia spp. bakterisinin çökütlemesi	28.6 µg/m	0

4.2 Gönüllü bilgileri ve İdrar Örneklerinin DNA Miktarlarının Karşılaştırılması

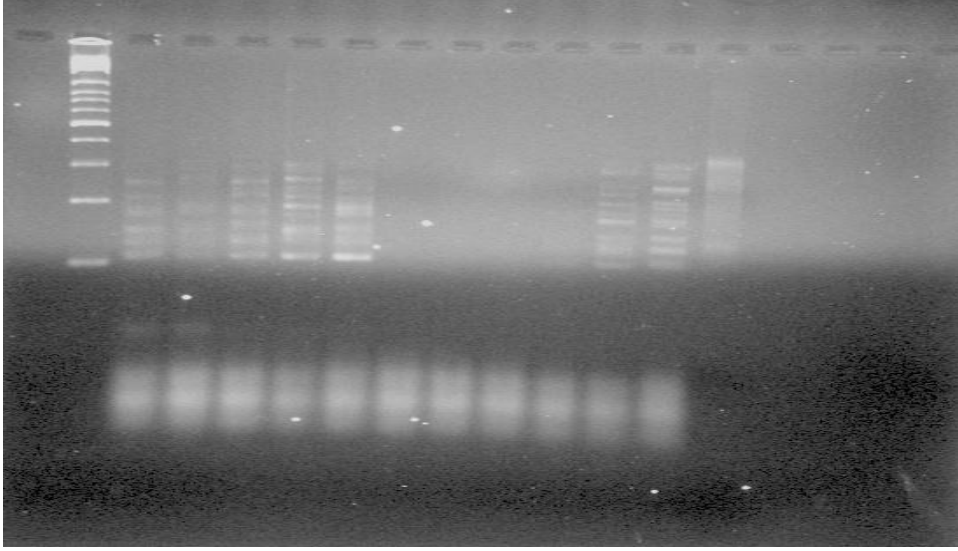
İdrar çalışmasında 21-56 yaşları arasında; 15 kadın, 15 erkek olmak üzere 30 gönüllü katıldı. Taze çalışılan idrar örneklerinde, kadınlarda 1.83 – 12.7 µg/ml, erkeklerde ise 1.15 – 5.21 µg/ml aralığında miktar tayini yapılmıştır. 18. ve 19. gönüllülere ait kurutulmuş örneklerden ve 2 defa dondurulup-eritilen 9, 10, 13 ve 14 numaralı idrar örneklerinden miktar tayini yapılamadı. Genel olarak kadın gönüllülerde daha başarılı sonuç alındığı gözlemlendi.

Tablo 7: Gönüllü bilgileri ve İdrar örneklerinin DNA miktarları

Örnek No	Cinsiyet	Materyal	Örneğe Uygulanan Çevre Koşulu	DNA Miktarı	Elde Edilen Lokus Sayısı
1	Kadın	İdrar	Taze materyal	3.2 µg/ml	4
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	2.07 µg/ml	2
2	Kadın	İdrar	Taze materyal	10.3 µg/ml	9
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	<0.50 ng/ml	0
3	Kadın	İdrar	Taze materyal	1.54 µg/ml	9
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	<0.50 ng/ml	0
4	Kadın	İdrar	Taze materyal	4.64 µg/ml	7
		İdrar	Sifon çekmeden tuvaletten swap'la örnek alımı	350 ng/ml	0
		İdrar	Sifon çektikten sonra tuvaletten swap'la örnek alımı	210 ng/ml	0
5	Kadın	İdrar	Taze materyal	7.51 µg/ml	6
6	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.38 µg/ml	4
7	Erkek	İdrar	Sifon çekmeden tuvaletten swap'la örnek alımı	330 ng/ml	2
		İdrar	Sifon çektikten sonra tuvaletten swap'la örnek alımı	230 ng/ml	2
8	Kadın	İdrar	Taze materyal	3.83 ng/ml	11
9	Kadın	İdrar	Taze materyal	6.57 µg/ml	8
			2 defa Dondurulup-Eritilen örnek	<0.50 ng/ml	0
10	Kadın	İdrar	Taze materyal	2.08 µg/ml	11
			2 defa Dondurulup-Eritilen örnek	<0.50 ng/ml	0
11	Erkek	İdrar	Taze materyal	300 ng/ml	6
12	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.89 µg/ml	4
13	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.29 µg/ml	4
		İdrar	2 defa Dondurulup-Eritilen örnek	<0.50 ng/ml	0
14	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.15 µg/ml	5
			2 defa Dondurulup-Eritilen örnek	<0.50 ng/ml	0
15	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.35 µg/ml	3
16	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.58 µg/ml	4
17	Erkek	İdrar	Taze materyal	830 ng/ml	6

Örnek No	Cinsiyet	Materyal	Örneğe Uygulanan Çevre Koşulu	DNA Miktarı	Elde Edilen Lokus Sayısı
18	Erkek	İdrar	Taze materyal	2.36 µg/ml	6
		İdrar	Kurumuş damla	<0.50 µg/ml	0
		İdrar	Gazlı beze bulaşmış lekeden	250 ng/ml	2
		İdrar	1 gece bekletilmiş idrar	4.94 µg/ml	5
19	Kadın	İdrar	Taze materyal	2.35 µg/ml	11
		İdrar	Kurumuş damla	<0.5 µg/ml	0
		İdrar	Gazlı beze bulaşmış lekeden	480 ng/ml	0
		İdrar	1 gece bekletilmiş idrar	2.52 µg/ml	4
20	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.18 µg/ml	5
21	Kadın	İdrar	Taze materyal	1.83 µg/ml	8
22	Kadın	İdrar	Taze materyal	2.45 µg/ml	11
23	Erkek	İdrar	Taze materyal	3.07 µg/ml	3
24	Kadın	İdrar	Taze materyal	5.18 µg/ml	7
25	Erkek	İdrar	Taze materyal	2.08 µg/ml	5
26	Erkek	İdrar	Taze materyal	5.21 µg/ml	10
27	Kadın	İdrar	Taze materyal	12.7 µg/ml	11
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	6.75 µg/ml	10
28	Kadın	İdrar	Taze materyal	5.46 µg/ml	11
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	3.08 µg/ml	8
29	Erkek	İdrar	Taze materyal	1.94 µg/ml	7
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	2.97 µg/ml	6
30	Kadın	İdrar	Taze materyal (Hamile gönüllü örneği)	6.86 µg/ml	11
		İdrar	1 hafta -20°C'de bekletildi	9.16 µg/ml	10
		Materyal	Elde Edilen Bakteri	DNA Miktarı	
		İdrar	Staphylococcus spp. bakterisinin çektilemesi	9.57 µg/m	0

4.3 PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi



Şekil 15: PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde yürütülmesi

Bu çalışmada, genotipleri belirlenen kişilere ait taze gaita, idrar örnekleri ve çeşitli çevre şartlarına maruz kalmış biyolojik materyallerinden DNA tiplendirmeleri yapıp/yapılmayacağı araştırıldı. İlk aşamada gönüllülerin verdiği gaita ve idrar örnekleri, alındığı gün bekletilmeden çekitleme çalışması yapıldı. Geri kalan kısmı daha önce belirtilen çevre koşullarına maruz bırakılarak belli saat ve gün sonrasında çekitleme çalışmaları yapıldı.

Gaita çalışmasında; 1, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25 numaraları ile kodlanmış gönüllülerden alınan taze gaita örneklerinden, 1 numara ile numaralanmış hafta -20°C'de bekletilmiş örneklerden, ve 12 numaralı gönüllünün tuvalet kağıdı sürüntü örneğinden yapılan çekitleme sonucunda tam profil elde edilebilmiştir.

2 hafta -20°C'de bekletilmiş örneklerden, 1 hafta güneşli ortamda ve 1 hafta nemli ortamda bekletilmiş gaita örneklerinden yarı profil elde edildiği ancak 2 hafta ve üzerinde -20°C'de ve çevre ortamında bekletilen örneklerden sağlıklı sonuç alınmadığı gözlemlenmiştir.

6 numara ile kodlanmış gaita örneğinin, gönüllünün gaitasını yaptığı tuvaletten, sifonu çektikten sonra aldığımız sürüntü örneğinden, kontaminasyondan kaynaklanan farklı kişilere ait lokuslar elde edilmiştir.

İdrar çalışmasında; 8, 10, 19, 22, 27, 28 ve 30 numaraları ile kodlanmış idrar

örneklerinden tam profil elde edilmiştir. 28 numaralı idrar örneğinin 1 hafta -20°C 'de bekletilmiş halinden de tam profil elde edilmiştir. Kadınların tiplendirilmesi erkeklere oranla daha başarılı olmaktadır. 18 ve 19 numaralı örneklerin idrar leke çalışmaları, 4 ve 7 numaralı gönüllülere ait örneklerle uygulanan, tuvalete dökülerek yapılan modelleme çalışmasında ise istenilen başarıyı elde edememiştir.

Gaita ve idrar örneklerinin uygun besi yerlerine ekimi sonucunda; *Escherichia spp.*, *Staphylococcus spp* bakterilerine ait koloniler meydana gelmiş, bu kolonilerden yapılan DNA çekilmesi ve yürütme sonucunda bakteriye ait lokuslar elde edilmemiştir.

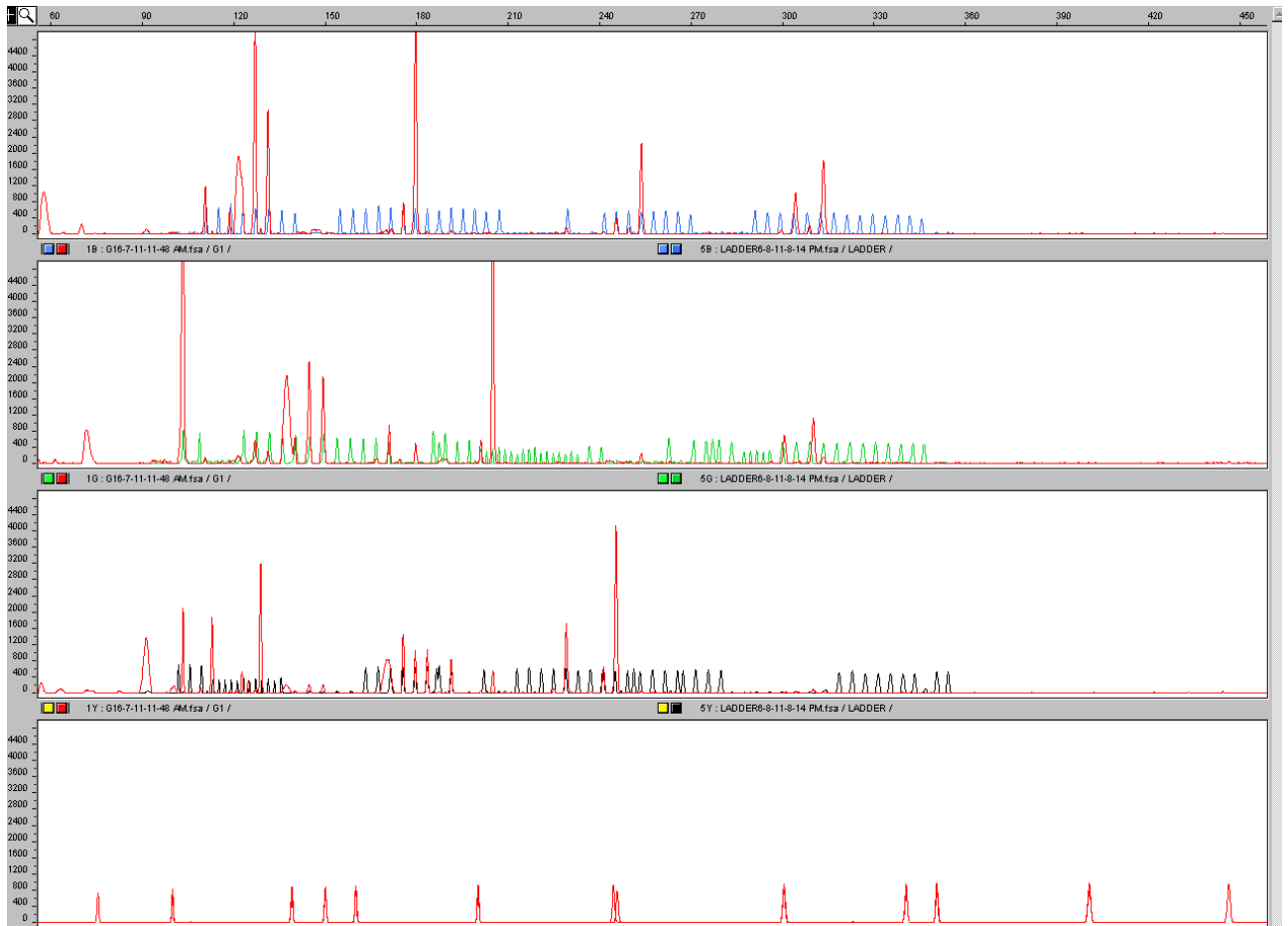
Tablolarda ilk kolonda gönüllüye ait yanak içi sürüntü örneğinden elde edilen genotipi bulunmaktadır. Diğer kolonlarda siyah ile gösterilen lokuslar kişinin genotipini belirtmektedir. Yeşil ile gösterilen lokuslar kontaminasyondan kaynaklı başka birey ya da bireylerden kaynaklanan lokusları temsil etmektedir. Kırmızı ile gösterilen lokuslar ise heterozigot allelerin homozigot olarak görüldüğünü belirtmektedir.

1. Simülasyon

Tablo 8: 1 – 7. Simülasyonlarının DNA Analiz Sonuçları

Lokuslar	G-1 yanak içi sürüntü	G-1 Taze Örnek	G-1 1. Hafta -20°C'de	G-1 2. Hafta -20°C'de	G-1 Güneşli Ortam 1. Hafta	G-1 Nemli Ortam 1. Hafta	G-1 Güneşli Ortam 2. Hafta	G-1 Nemli Ortam 2. Hafta
D3S1358	16 - 17	16 - 17	16 - 17	17 - 17	14 - 15 -16	15 - 16	17 - 17	13 - 13
vWA	17 - 17	17 - 17	17 - 17	-	17 - 17	-	-	-
D16S539	11 - 11	11 - 11	11 - 11	11 - 11	-	-	11 - 11	-
D2S1338	18 - 20	18 - 20	18 - 20	-	-	-	-	-
Amelogenin	X - X	X - X	X - X	X - X	X - X	X - X	X - X	X - X
D8S1179b	12 - 14	12 - 14	12 - 14	12 - 12	9 - 12	12 - 14	12 - 12	-
D21S11	29 - 29	29 - 29	29 - 29	-	29 - 29	29 - 29	-	-
D18S51	16 - 18	16 - 16 (18)	16 - 18	18 - 18	-	-	18 - 18	-
D19S433	12 - 16	12 - 16	12 - 16	16 - 16	12 - 12	12 - 16	16 - 16	-
TH01	8 - 9	8 - 9	8 - 9	-	8 - 8	8 - 8	-	-
FGA	21 - 25	21 - 25	21 - 25	-	-	25 - 25	-	-

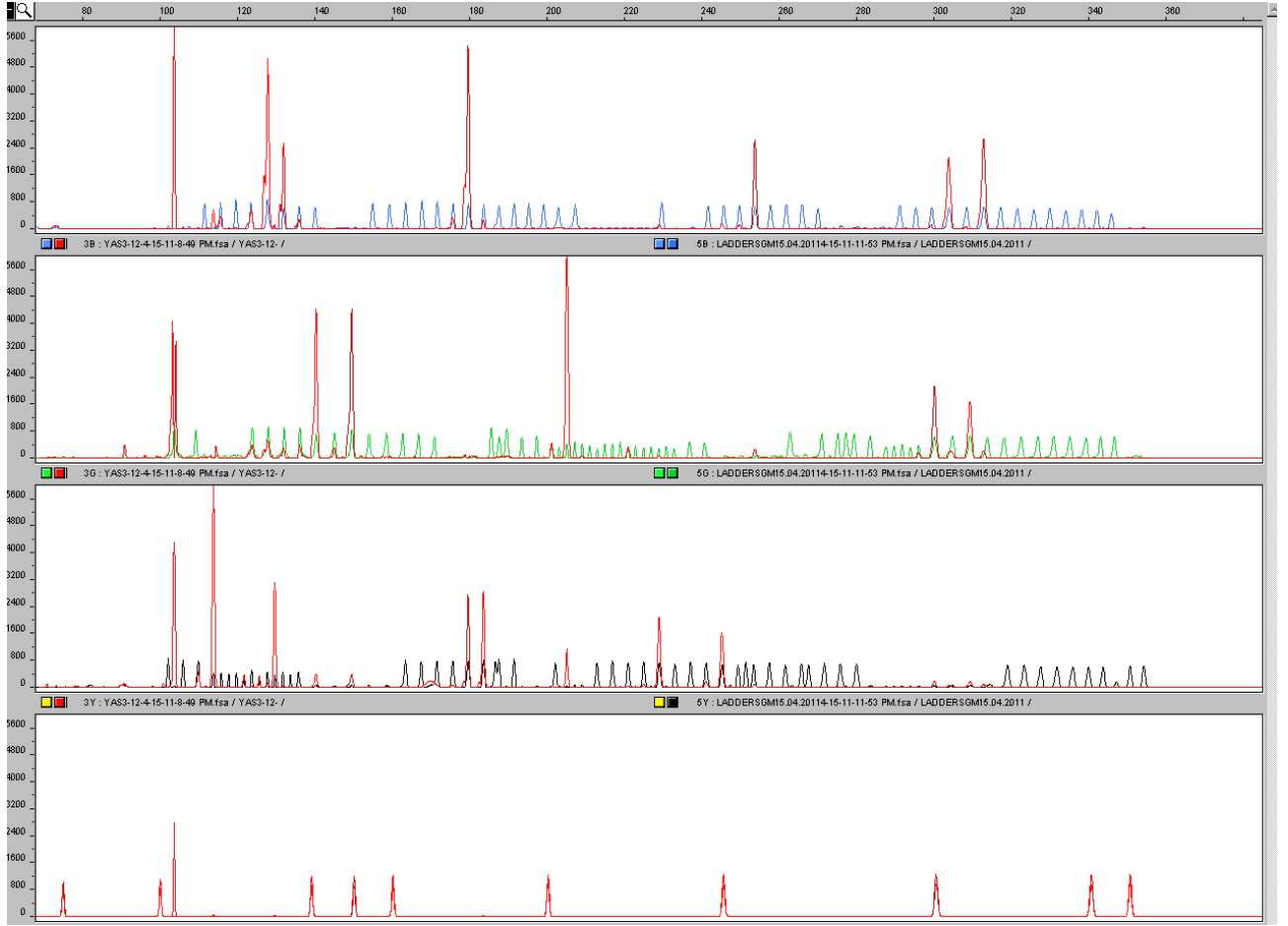
Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi
Yeşil: Kontaminasyon kaynaklı alleler



Şekil 16: 1. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

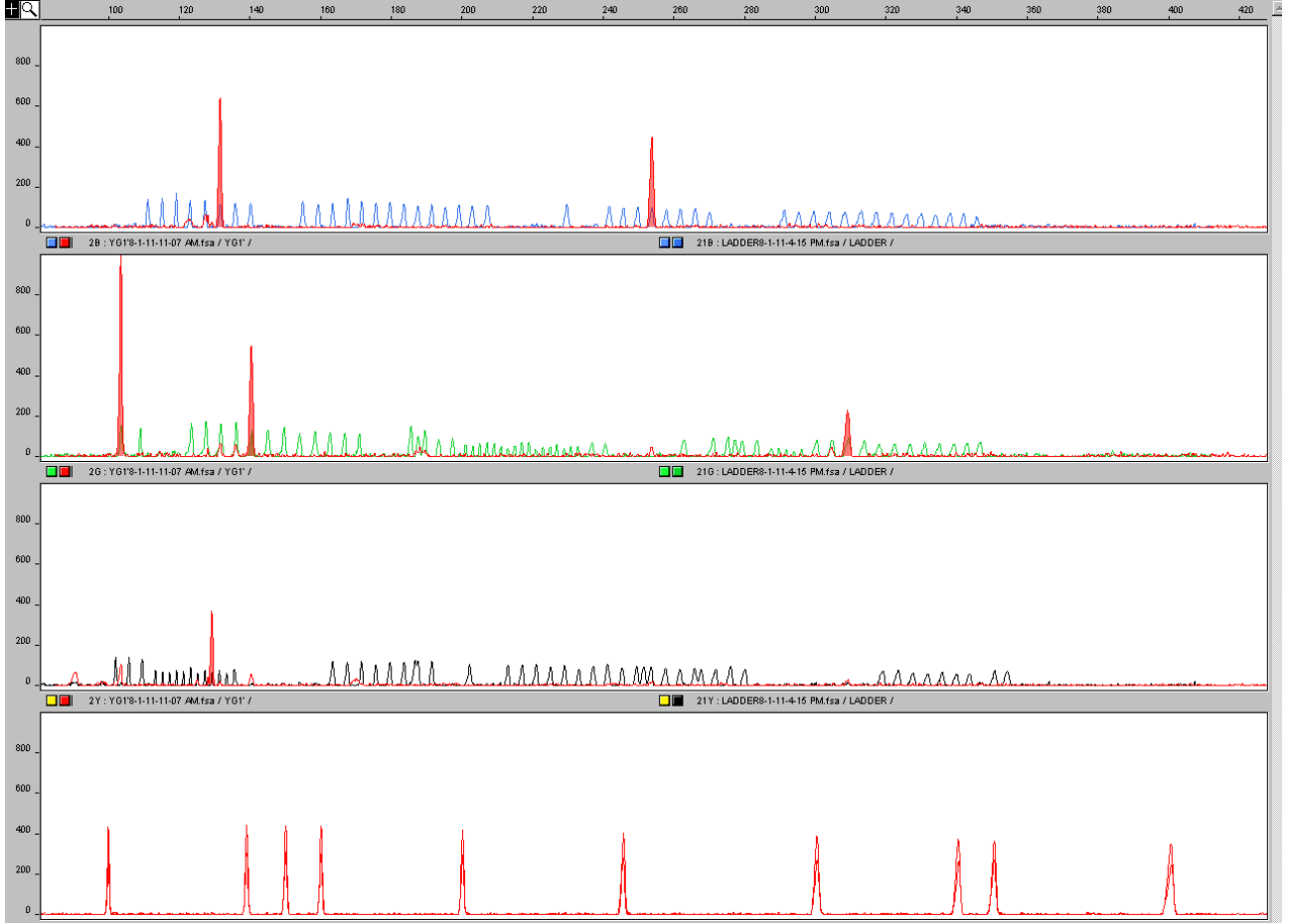
(G-1 ait, taze gaita örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

2. Simülasyon



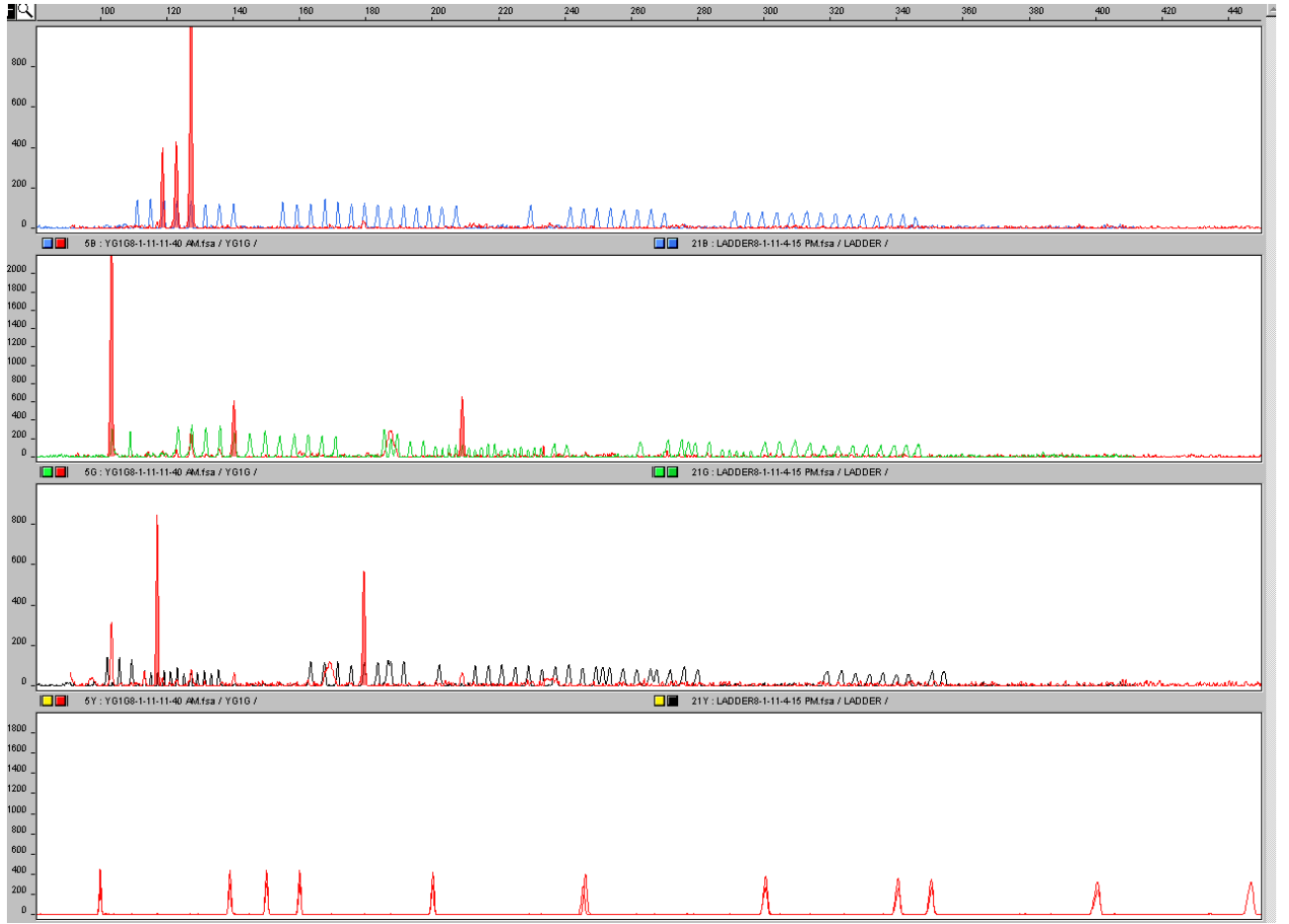
Şekil 17: 2. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi
(G-1 ait, 1 hafta -20°C 'de bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

3. Simülasyon



Şekil 18: 3. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi
(G-1 ait, 2 hafta -20°C’de bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

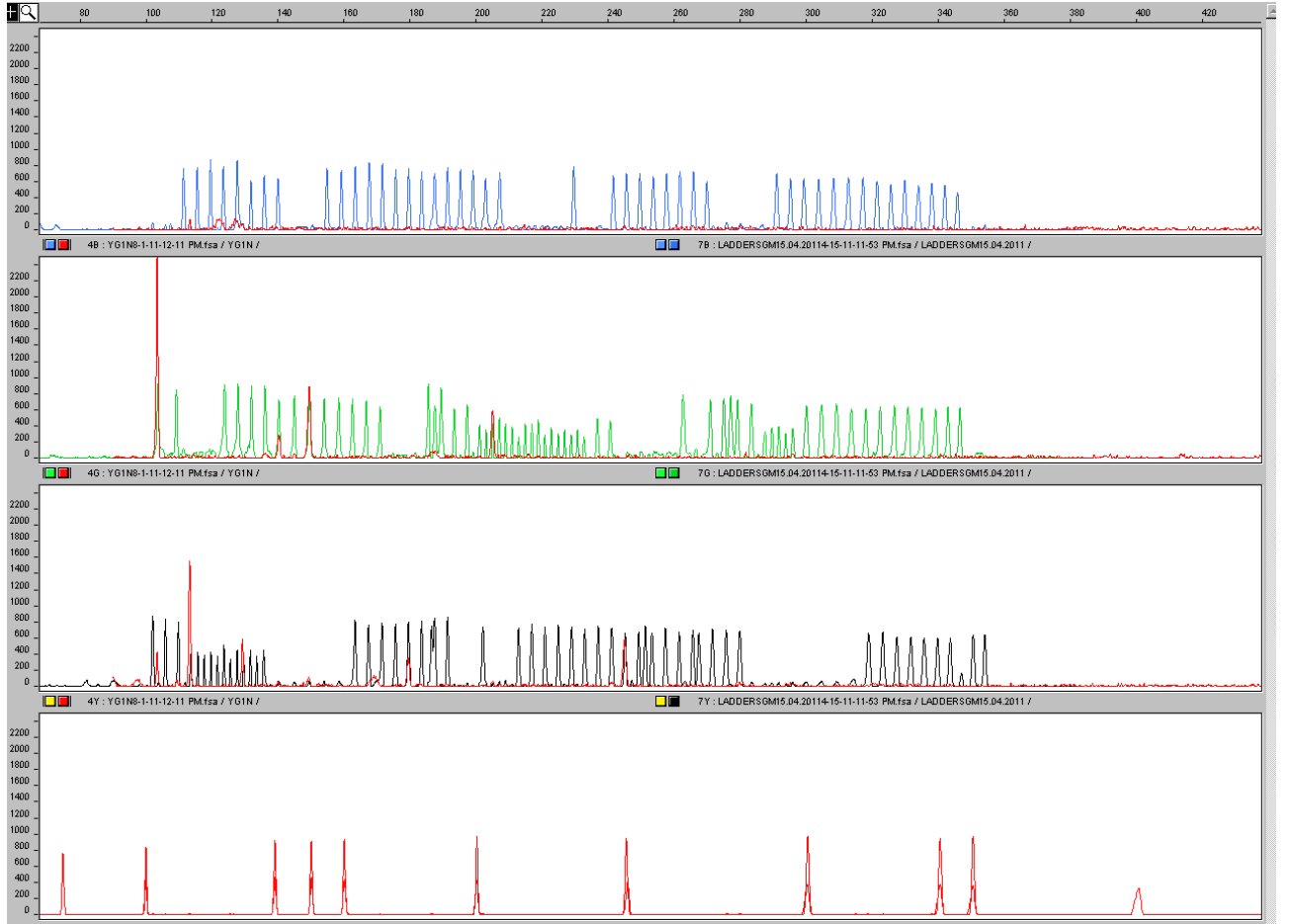
4. Simülasyon



Şekil 19: 4. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(G-1 ait, 1 hafta kuru toprak üstünde güneş ışığı altında bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

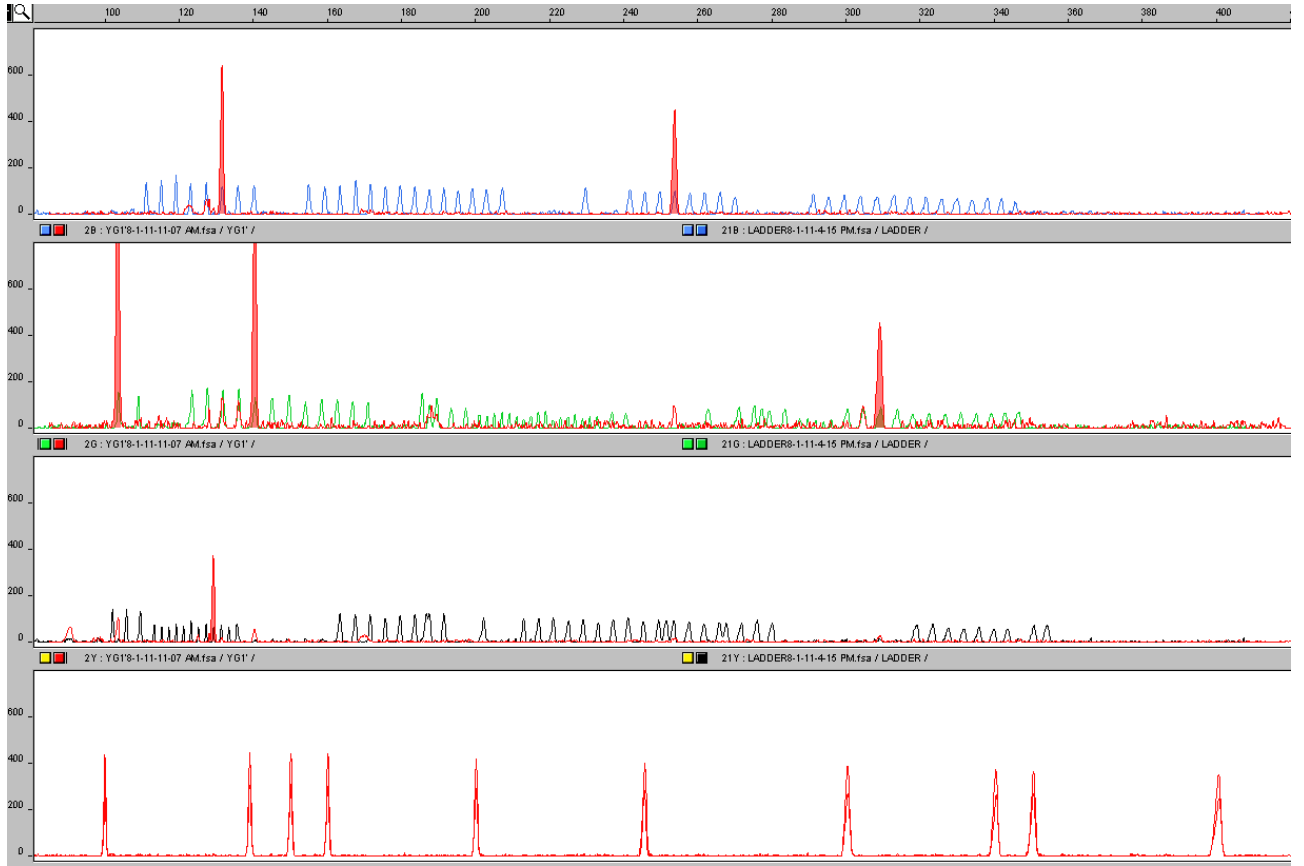
5. Simülasyon



Şekil 20: 5. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(G-1 ait, 1 hafta nemli toprak üstünde gölgede bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

6. Simülasyon



Şekil 21: 6. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(G-1 ait, 2 hafta kuru toprak üstünde güneş ışığı altında bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

7. Simülasyon



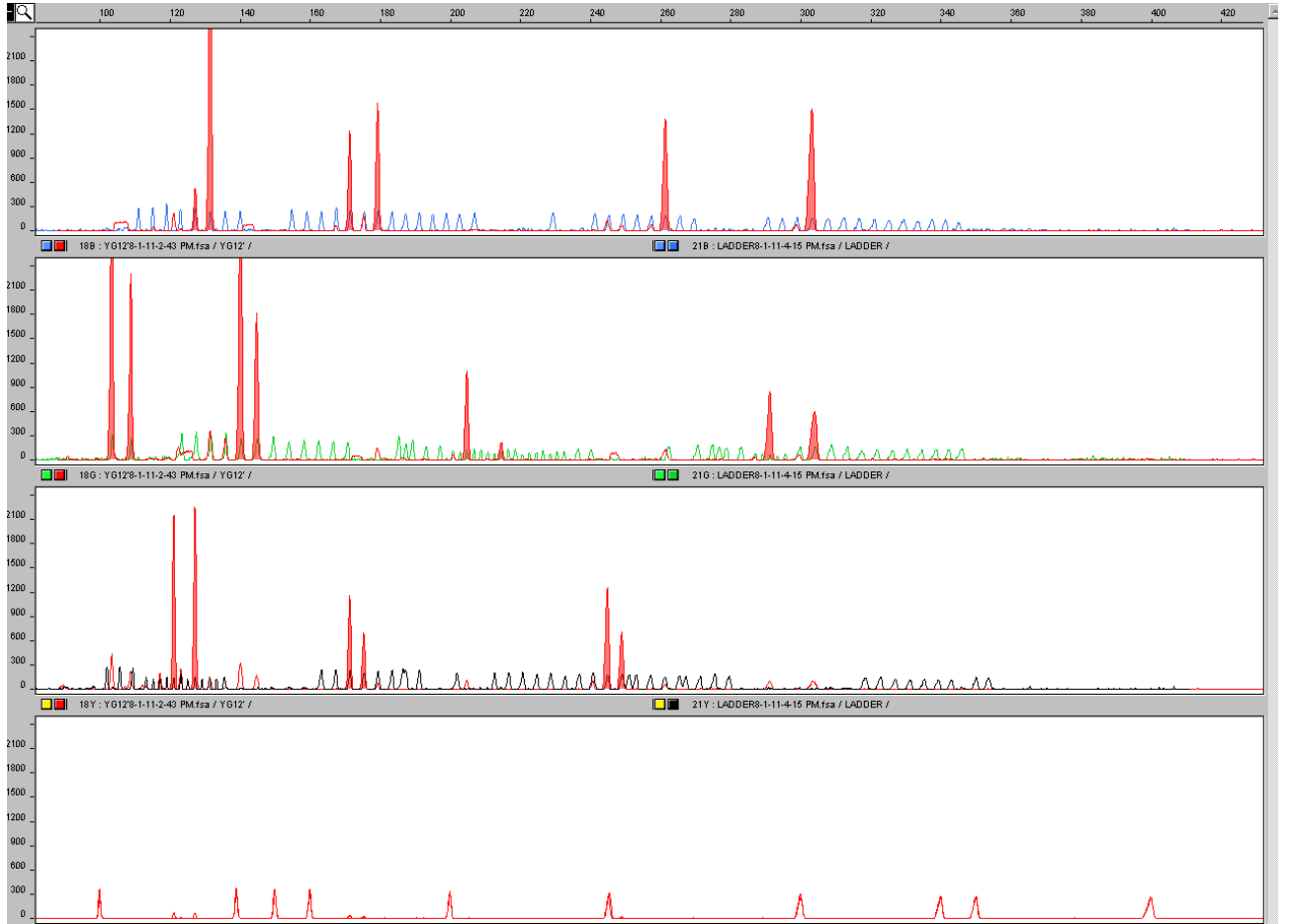
Şekil 22: 7. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(G-1 ait, 2 hafta nemli toprak üstünde gölgede bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

8. Simülasyon

Tablo 9: 8. Simülasyonun DNA Analiz Sonucu

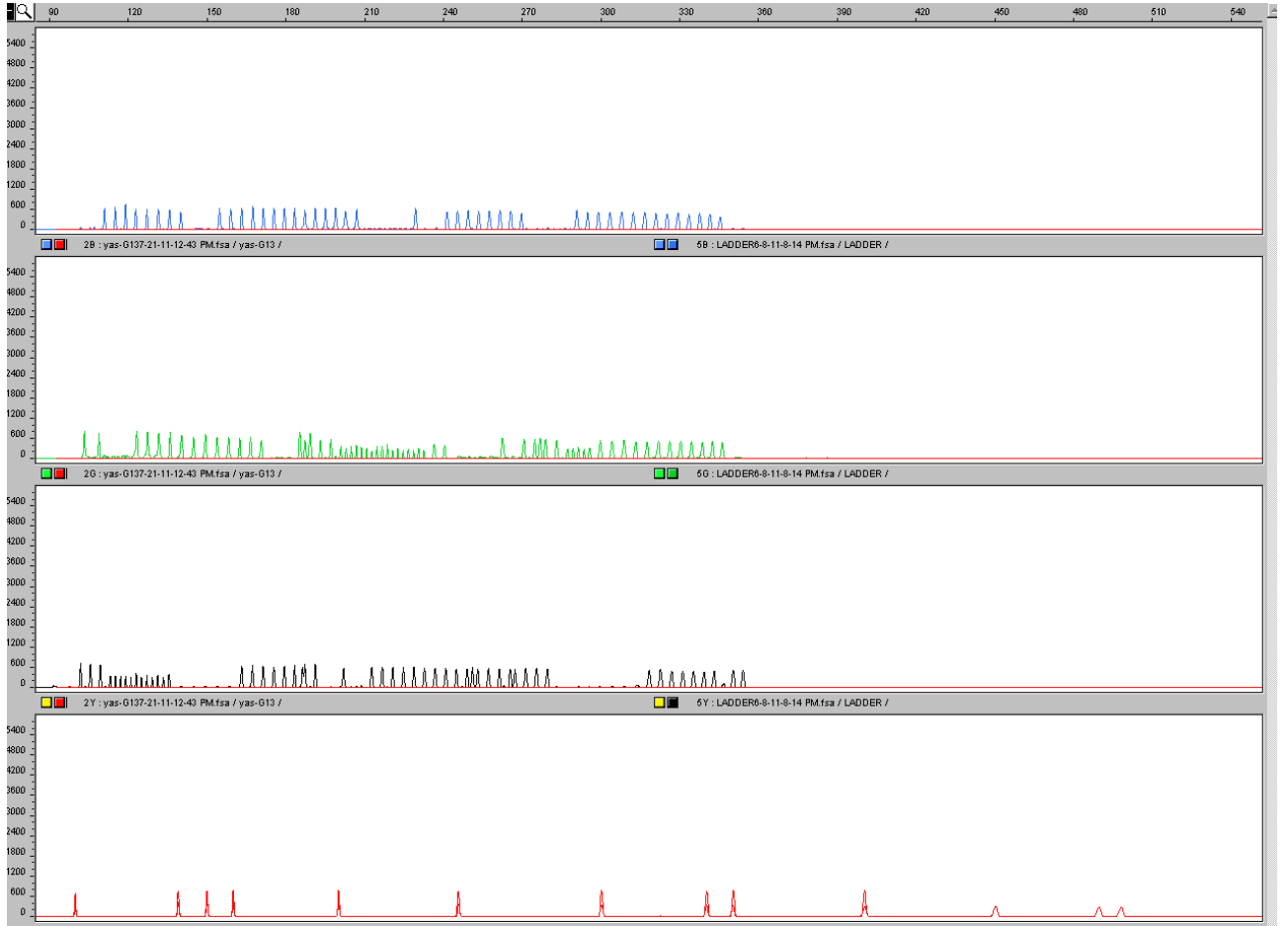
Lokuslar	G-12 Yanak İçi Sürüntü	G-12 Tuvalet Kağıdı Sürüntü
D3S1358	16 - 17	16 - 17
vWA	15 - 17	15 - 17
D16S539	13 - 13	13 - 13
D2S1338	18 - 18	18 - 18
Amelogenin	X - Y	X - Y
D8S1179b	12 - 13	12 - 13
D21S11	29 - 31.2	29 - 31.2
D18S51	14 - 17	14 - 17
D19S433	14 - 15.2	14 - 15.2
TH01	6 - 7	6 - 7
FGA	25 - 26	25 - 26



Şekil 23: 8. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(G-12 ait, Tuvalet kağıdından sürüntü örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

9. Simülasyon



Şekil 24: 9. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

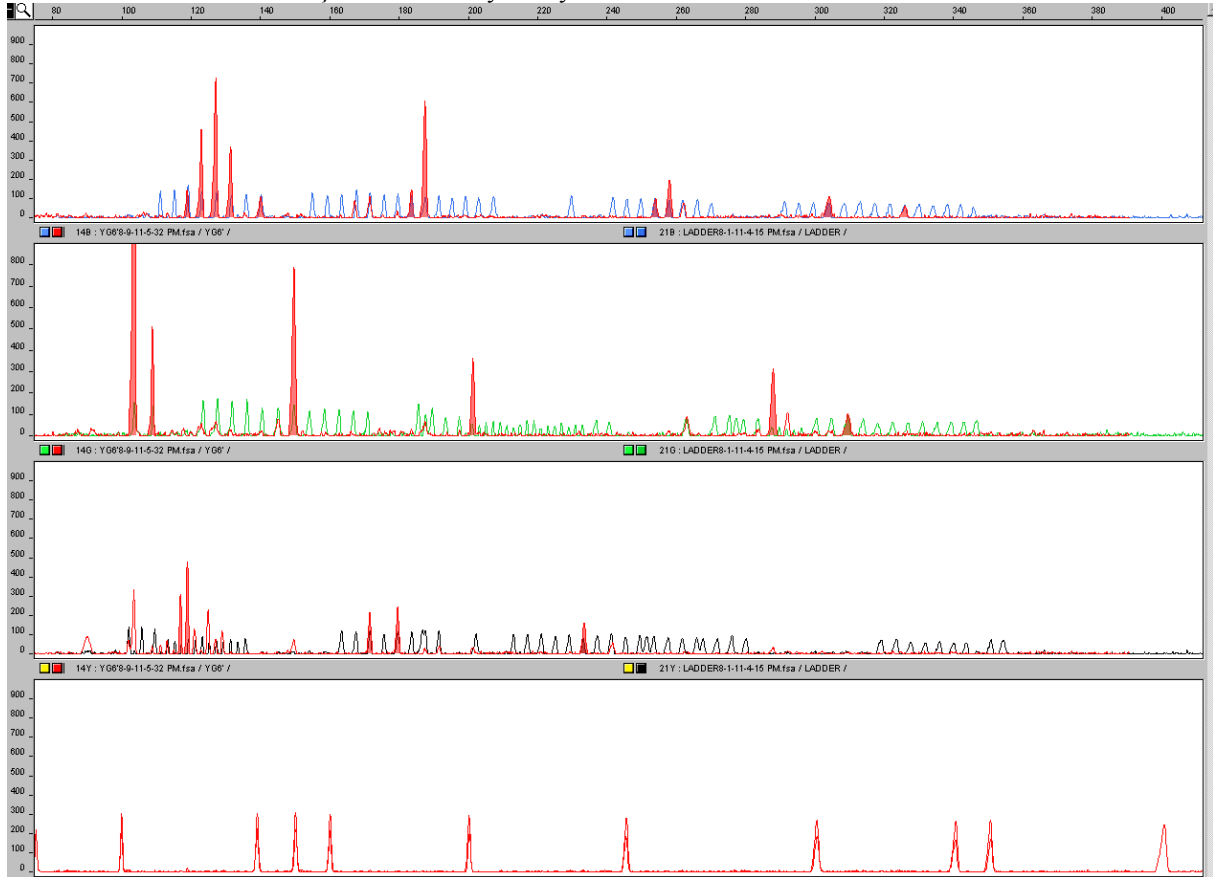
(*Escherichia* spp. bakterisine ait, 2 hafta nemli toprak üstünde gölgede bekletilmiş örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

10. Simülasyon

Tablo 10: 10. Simülasyonun DNA Analiz Sonucu

Lokuslar	G-6 (Kadın) Yanak içi Sürüntü	G-6 (Kadın) Tuvalet sürüntüsü
D3S1358	15 – 16	14-15-16-17-19
vWA	18 – 19	18 – 19
D16S539	12 – 13	11 - 12 – 13
D2S1338	19 – 23	18 – 23
Amelogenin	X – X	X – Y
D8S1179b	14 – 14	14 – 14
D21S11	28 – 30	28 – 28
D18S51	13 – 14	13 – 14 – 19
D19S433	13 – 13.2	13 – 13.2
TH01	6 – 8	6 – 8
FGA	22 – 24	22 – 22

Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi
Yeşil: Kontaminasyon kaynaklı alleler



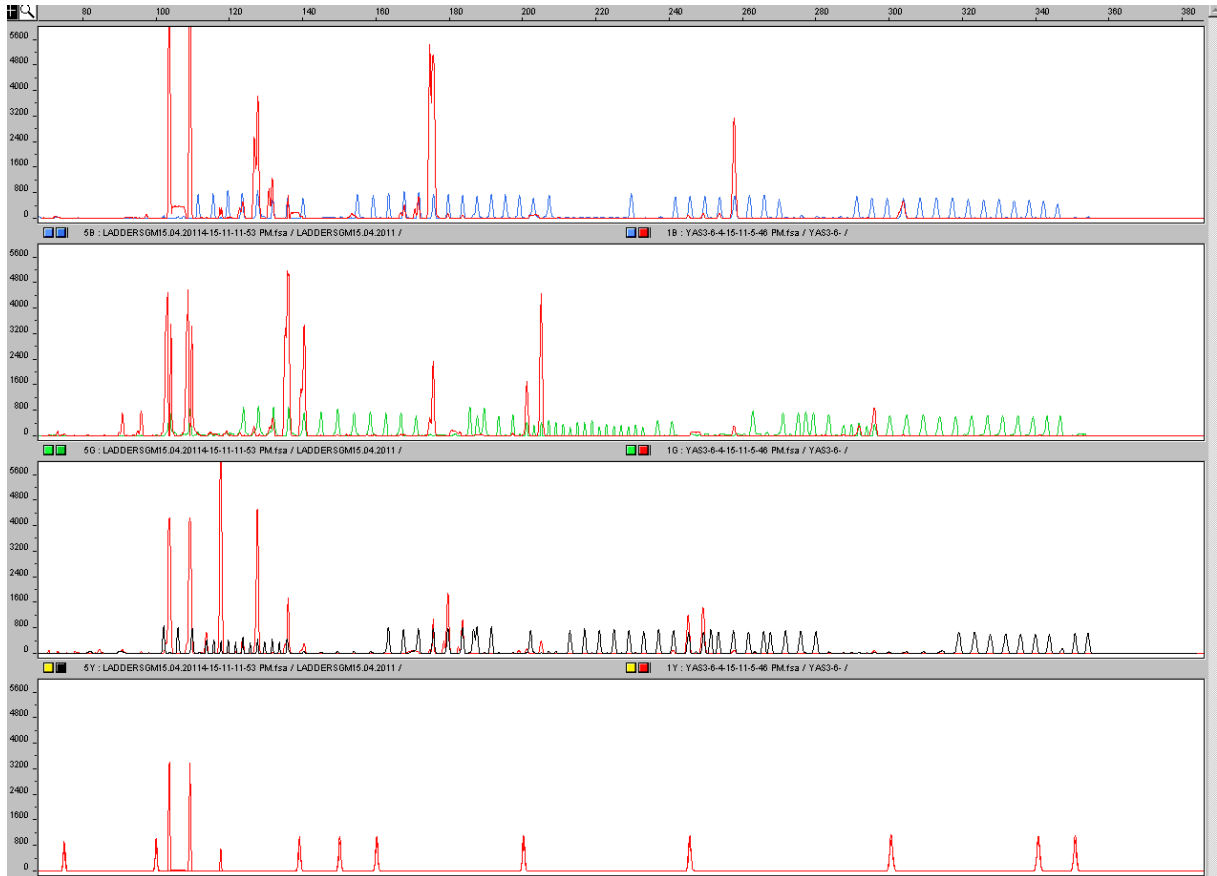
Şekil 25: 10. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi (G-6'ya ait, tuvaletten alınan sürüntü örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

11. Simülasyon

Tablo 11: 11. Simülasyonun DNA Analiz Sonucu

Lokuslar	İ-26 (Erkek) Yanak içi Sürüntü	İ-26 (Erkek) Taze İdrar
D3S1358	16 - 17	16 - 17
vWA	16 - 16	16 - 16
D16S539	12 - 12	12 - 12
D2S1338	16 - 18	18 - 18
Amelogenin	X - Y	X - Y
D8S1179b	11 - 12	11 - 12
D21S11	28 - 29	28 - 29
D18S51	14 - 15	14 - 15
D19S433	13 - 15.2	13 - 15.2
TH01	8 - 9	8 - 9
FGA	25 - 26	25 - 26

Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi



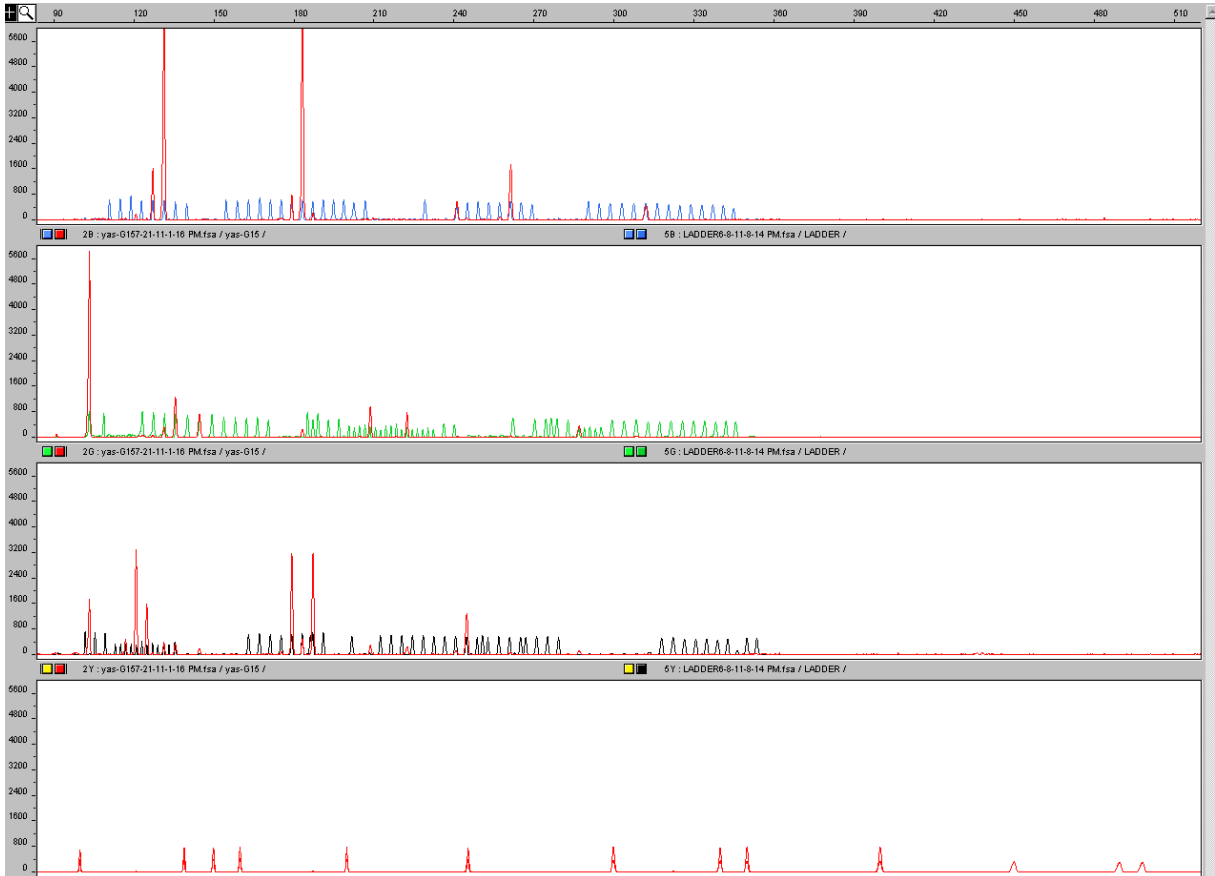
Şekil 26: 11. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi (İ-26 (erkek) ait, taze idrar örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

12. Simülasyon

Tablo 12: 12 – 13. Simülasyonlarının DNA Analiz Sonuçları

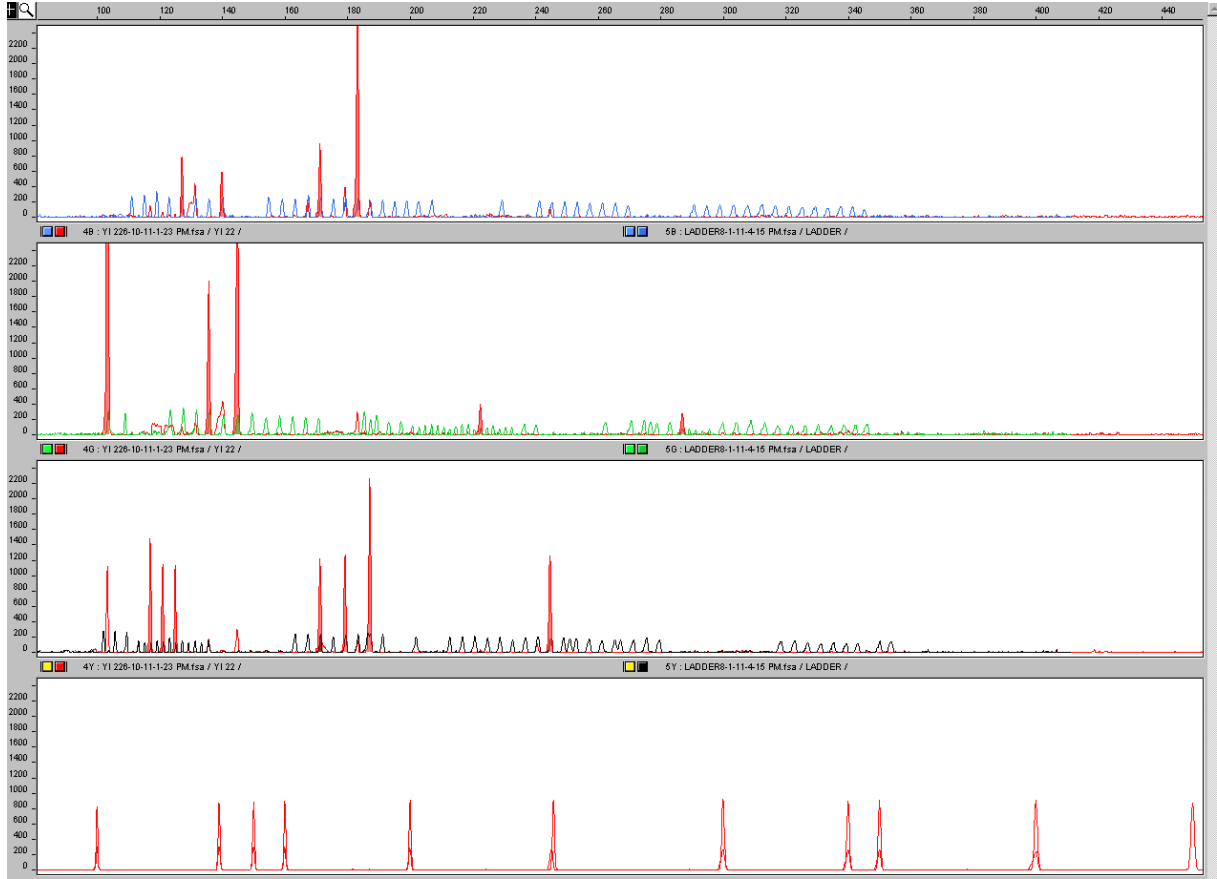
Lokuslar	İ-19 (Kadın) Yanak içi Sürüntü	İ-19 (Kadın) Taze İdrar	İ-19 (Kadın) 1 Gece bekletilmiş idrar
D3S1358	16 - 17	16 - 17	16 - 19
vWA	18 - 18	18 - 18	15 - 18
D16S539	8 - 13	8 - 13	9 - 9
D2S1338	20 - 20	20 - 20	-
Amelogenin	X - X	X - X	X - X
D8S1179b	11 - 13	11 - 13	11 - 13
D21S11	30 - 33.2	30 - 33.2	33.2 - 33.2
D18S51	13 - 13	13 - 13	13 - 13
D19S433	14 - 15	14 - 15	13 - 14 - 15
TH01	8 - 10	8 - 10	6 - 8 - 10
FGA	25 - 25	25 - 25	25 - 25

Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi
Yeşil: Kontaminasyon kaynaklı alleler



Şekil 27: 12. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi (İ-19 (kadın) ait, taze idrar örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

13. Simülasyon



Şekil 28: 13. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(İ-19 (kadın) ait, 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiş idrar örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

14. Simülasyon

Tablo 13: 14. Simülasyonun DNA Analiz Sonuçları

Lokuslar	İ-28 (Kadın) Yanak içi Sürüntü	İ-28 (Kadın) 1 Hafta Buz dolabında Bekletilmiş İdrar
D3S1358	15 - 16	15 - 16
vWA	18 - 19	18 - 19
D16S539	9 - 12	9 - 12
D2S1338	24 - 25	24 - 25
Amelogenin	X - X	X - X
D8S1179b	12 - 12	12 - 12
D21S11	29 - 31	29 - 31
D18S51	14 - 15	15 - 15
D19S433	15 - 15.2	10 - 12 - 15.2
TH01	9 - 9.3	9 - 11
FGA	22 - 23	22 - 23

Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi
Yeşil: Kontaminasyon kaynaklı alleler



Şekil 29: 14. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

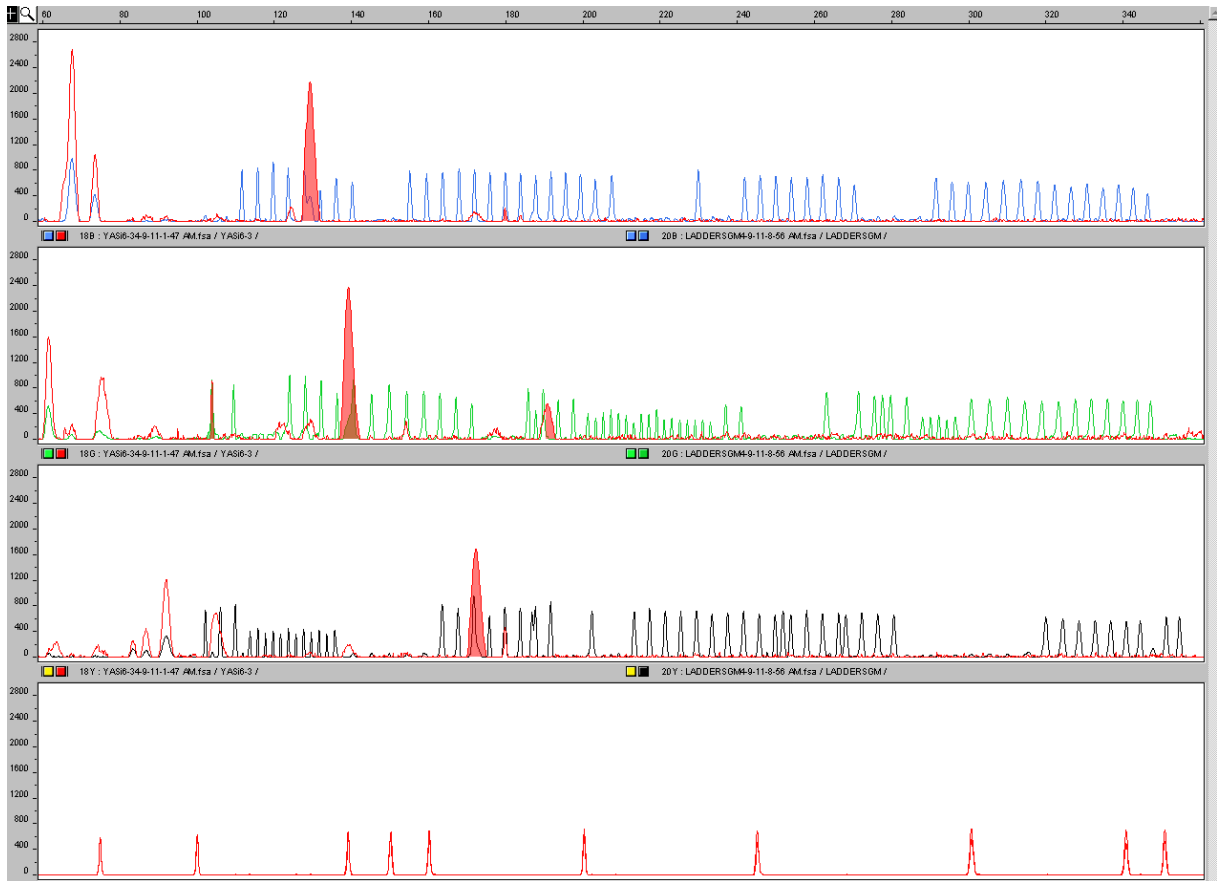
(İ-19 (kadın) ait, 1 hafta -20°C'de bekletilmiş idrar örneğinin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

15. Simülasyon

Tablo 14: 15 – 16. Simülasyonların DNA Analiz Sonuçları

Lokuslar	İ-7 (Erkek) Yanak içi Swap	İ-7 Sifon çekmeden tuvalet'den swapla örnek alımı	İ-7 Sifon çektikten sonra tuvalet'den swapla örnek alımı
D3S1358	16 - 16	16 - 16	16 - 17
vWA	17 - 18	15 - 18 - 19	15 - 18
D16S539	9 - 10	-	-
D2S1338	17 - 24	-	18 - 18
Amelogenin	X - Y	X - X	X - Y
D8S1179b	14 - 14	12 - 15	12 - 12
D21S11	30.2 - 31	25 - 25	25 - 25
D18S51	14 - 17		14 - 14
D19S433	13 - 15	10 - 10	10 - 10
TH01	8 - 9	6 - 8	6 - 6
FGA	21 - 24	-	-

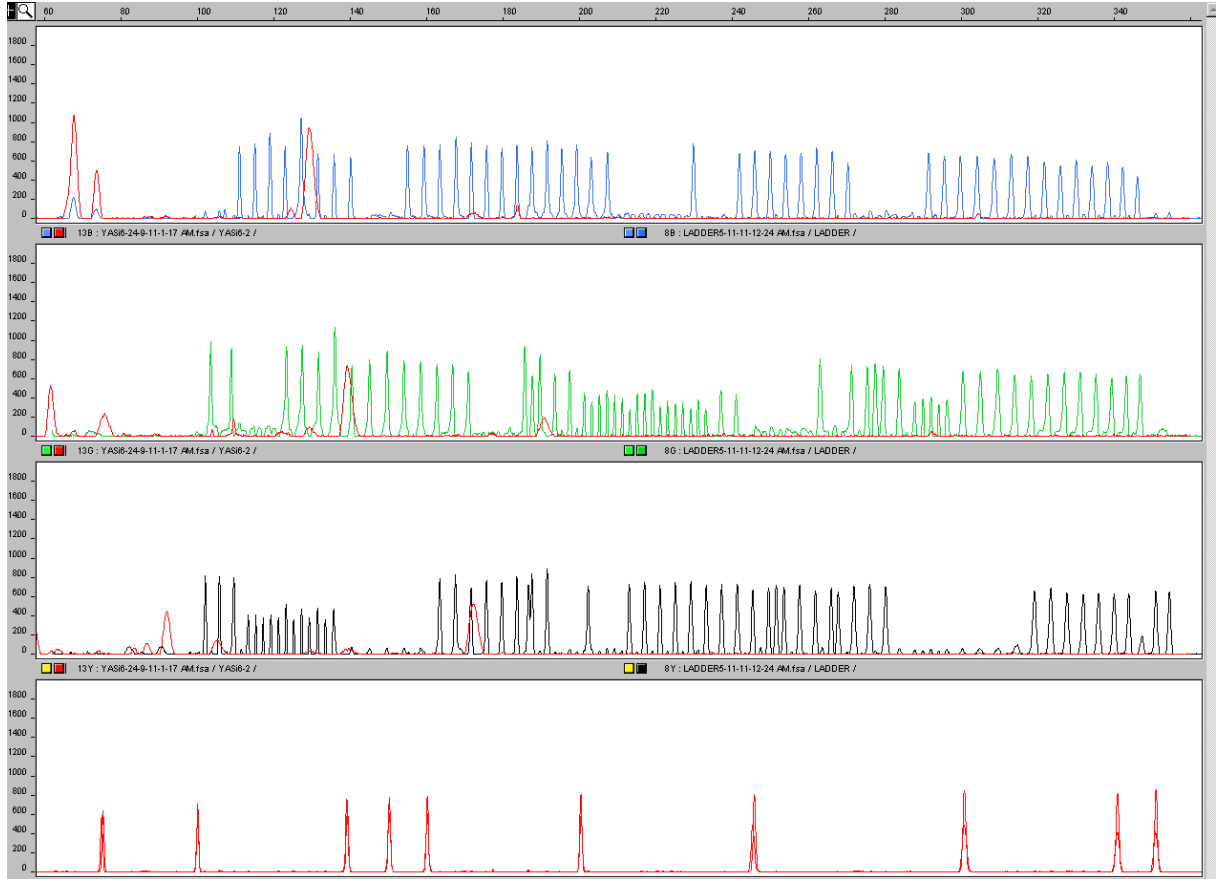
Kırmızı: Heterozigot alleler homozigot olarak gözlemlendi
Yeşil: Kontaminasyon kaynaklı alleler



Şekil 30: 15. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(İ-7 (erkek) ait, Tuvaletten idrar yapıldıktan sonra sifonu çekmeden, swap'la sürüntü alınan örneğin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

16. Simülasyon



Şekil 31: 16. Simülasyon Sonucu DNA lokuslarının elektroforegram ile gösterimi

(İ-7 (erkek) ait, Tuvaletten idrar yapıp sifonu çektikten sonra, swap'la sürüntü alınan örneğin tiplendirilmesi sonucu elde edilen DNA analiz sonucu)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fiziksel kanıtların bir alt grubunu oluşturan biyolojik kanıtlar kimliklendirme konusunda, adli davaların incelenmesinde giderek önem kazanmaktadır (Hedman J. ve Ark., 2009). Özellikle olay yerinden delilin toplanması, korunması, paketlenmesi ve transferi adli analizlerin başarısını doğrudan etkilemektedir. Delilin hukuka uygun ve doğru bir şekilde toplanması kriminal olguların çözümlenmesinde büyük katkıda bulunmaktadır (Budowle B., 2006).

PCR spesifik DNA segmentlerinin in vitro şekilde çoğaltılması tekniğidir. Oldukça hassas olan bu yöntem, çok az miktardaki hedef DNA'nın tespitinde ve tanısında kullanılmaktadır. Ancak birçok faktör PCR'ı aksatmaktadır (Monteiro L. ve Ark., 1997). Adli uygulamada kullanılan DNA analizleri genellikle PCR inhibitörü olarak adlandırılan, çoğaltılmayı etkileyen bileşikler yüzünden sınırlandırılmaktadır. Birçok içerik PCR inhibitörü olarak, bazıları da kendi PCR inhibisyon mekanizmasıyla tanınmaktadır (Hedman J. ve Ark., 2009). Değişik örnekler arasındaki PCR inhibitörlerinin nicelik ve nitelik farkları vardır. Fenol bileşikleri, glikojen, yağlar, selüloz, hedef olmayan nükleik asitler ve ağır metaller gibi birçok PCR inhibitörleri karakterize edilmiştir. Gaita, çeşitli sayıdaki bakterilerin yanı sıra değişik çeşitte degrade olmuş besin ürünlerini barındıran kompleks biyolojik örnekleri teşkil eder (Monteiro L. ve Ark., 1997). Gaita örneklerinde bulunan bu inhibitörler, değişik diyetel faktörlere, bağırsak florasına veya diğer çevresel ve yaşam tarzı ile alakalı faktörlerle de ilgisi araştırılmaktadır (Oikarinen S. ve Ark., 2009).

PCR inhibisyonunu aşmadaki ortak yaklaşım, etkili DNA saflaştırmasıdır. Monteiro ve arkadaşları (Monteiro L. ve Ark., 1997) selektif bağlayıcı özelliği olan QIAamp doku metodunu çalışmışlardır. Ancak PCR inhibitörlerinden kısmi uzaklaştırmayı başarmışlardır. Inhibitörlerin bulunduğu örnekleri 1:2 veya 1:10 dilüe ettiklerinde, etkilerini azaltmaya yeterli olduğunu göstermişlerdir. Çekitlenen örnek dilüe edilebilir ama bu uygulama DNA konsantrasyon miktarı çok yüksek olan örnekte yapılmalıdır (Hedman J. ve Ark., 2009). Ayrıca QIAamp doku metodu ile yaptıkları çekitleme sonucunda örnekler hala inhibitörleri ihtiva ediyorlarsa, inhibitörlerin ısı ile degrade olmadığını, kloroform çekitlemesi ile uzaklaştırıldığını çalışmasında belirtmiştir (Monteiro L. ve Ark., 1997).

İnsan gaitası adli davalarda sıklıkla olmasa da, karşılaşıldığında kimliklendirmede önemli bir rol oynayan biyolojik delildir (Iacovacci G. ve Ark., 2003). Çalışması bir çok

açından zor bir biyolojik örnek olmasına rağmen dikkate alınması gereken gaita örnekleri genellikle hırsızlık ve tecavüz olaylarında karşımıza çıkmaktadır (Benecke M., 2005). Biyolojik örneklerden gaita; sindirilmiş veya sindirilmemiş yemek kalıntılarının, mukus, çözünmüş veya çözünmemiş gastrointestinal alan ürünlerinin ve hücrelerden salgılanan degradatif enzimlerin ve bakterilerin kompleks karışımından oluşmaktadır (Iacovacci G. ve Ark., 2003). Gaita numune kalıntıları, DNA çekitilmesi ve çoğaltılması bakımından en zor örneklerdendir (Monteiro L. ve Ark., 1997). Her ne kadar 10 milyon hücre gastrointestinal alandan hergün kaybedildiği düşünülse de, rutin STR analizleri Chelex 100, fenol kloroform gibi mevcut çekitleme yöntemleri ile DNA çekitilmesi pek mümkün olmamaktadır (Iacovacci G. ve Ark., 2003). Monteiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gaita örneklerinin ısıtılması ile bazı proteinlerin yapısının bozulabileceğini ve inhibitörlerin ısıtılmayla uzaklaşmadığını belirtmiştir. Ayrıca kloroform çekitleme yöntemi ile lipitlerin uzaklaştırıldığını ancak inhibitörlerin uzaklaştırılmadığını belirtmiştir (Şen N. ve Ark., 2005).

Gaita özütünün yapısında bulunan PCR inhibitörleri daha önceden yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Gaitanın yapısında bulunan mevcut PCR inhibitörleri bilirubin, safra tuzu ve kompleks karbonhidratlardır (Nechvatal J. ve Ark., 2008). Gaita bileşenleri içinde bulunan bilirubin ve safra tuzları az konsantrasyonda olsalar bile PCR'ı inhibe edebilmektedir. Bu nedenle PCR analizleri için DNA saflaştırması çoğaltılma öncesinde gereklidir. STR analizlerinin başarısı minimum miktardaki DNA'ya, PCR inhibitörlerinin yokluğuna ve DNA degradasyon seviyesine bağlı olmaktadır. Gaita örneklerinde bütün bu faktörlerin varlığına ve başarılı çekitleme yönteminin uygulanmasına bağlıdır (Iacovacci G. ve Ark., 2003).

Bu tez çalışması 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada gönüllülerin yanak içi sürüntü örnekleri alındı ve yapılan çalışma sonunda gönüllülerin genotipleri belirlendi. İkinci aşamada gönüllülerden alınan gaita ve idrar örnekleri gönüllülerden alındığı gün içinde çalışıldı. Böylece hiçbir çevresel faktöre maruz kalmadan elde edilebilecek profillere bakıldı. Çalışmanın 3. aşamasında gönüllülerden alınan gaita ve idrar örnekleri daha önceden belirtilen çevre koşullarına bırakıldı. Son aşamada ise belirtilen çevre şartlarına maruz kalmış örneklerin bakteriyel kontaminasyondan etkilenip/etkilenmediğini ve yürütme aşamasında bakteriyel DNA'nın çalışmalara etkisi olup/olmadığına bakılmıştır.

Çalışmada gaita örneklerinden DNA çekitilmesi için tercih edilen QIA amp® DNA Stool Mini Kit kullanıldı. QIAamp DNA Stool Mini Kit'in hasarlı DNA yapısını onarmasına ve gaitanın yapısında bulunan PCR inhibitörlerini ortamdan uzaklaştırdığı için kullanıcıya

kolaylık sağlamaktadır. QIAamp DNA Stool Mini Kit ile insan nükleer DNA'sının çekitlenmesi, bu yöntem için özel olan absorpsiyon matriksi, InhibitEX tableti içermektedir. Kitin başarısında önemli rol oynayan tabletin reaktifin kimyasal içeriği tescillidir. Kullanım kılavuzunda belirtildiği üzere, DNA'ya hasar verebilecek maddeler ve PCR inhibitörleri InhibitEX tablet matriksinde absorblanıp, santrifugasyon ile DNA'dan ayrılması sağlanmaktadır (Johnson D. ve Ark., 2005). Ek olarak, etkili lizis tampon kullanarak, silika-jel membrana bağlanan DNA'yı arttırıp metodun başarısına katkıda bulunmaktadır (Vandenberg N. ve Ark., 2002). Bu durum bizim yaptığımız çalışmada da ortaya şu şekilde çıkmıştır; gönüllüden aldığımız gaita örneğini ikiye ayırıp, bir kısmı ile çekitleme prosedüre uygun şekilde InhibitEX tablet kullanarak diğer kısmının çekitlenmesini de InhibitEX tablet kullanmayarak yaptık. Elde ettiğimiz sonuç Tablo 6'daki 27, 28, 29 numaraları ile kodlanmış örneklerde belirtilmiştir. InhibitEX tablet kullandığımız gaita örneklerinde profil elde ederken kullanmadıklarımızdan profil elde edemedik.

Adli analizlerde PCR inhibisyonun oluşmasındaki en önemli neden, olay yerinde örneğin maruz kaldığı çevre koşullarına bağlı olmaktadır (Hedman J. ve Ark., 2009). Bu tez çalışmasında gaitaya uygulanan çevre koşullarına göre; gaita örnekleri gönüllülerden alındıktan 2 saat sonra çalışıldığında 30 örnekten 14 tanesinde tam profil elde ettik. Ayrıca 4 tane gaita örneğini 1 hafta -20°C'de bekletildiğinde de en az 9 lokus elde ederek sağlıklı sonuç aldık. Ancak 2. haftadan sonra örneklerden sağlıklı sonuç alınmadı. Dış ortamda; hem kuru toprakta direkt güneş ışığına maruz kalan gaitalardan hem de nemli toprakta gölgede bekletilen gaita örneklerinden 1. ve 2. hafta da başarılı sonuçlar alınamadı. Uygulanan çevre şartları ve elde edilen lokus miktarı Tablo 6'da belirtilmiştir.

Olay yerinde karşımıza çıkabilecek diğer bir durumda, failin gaitasının bulaşmış olduğu tuvalet kağıdının olay yeri inceleme ekipleri tarafından laboratuvara gönderilmesidir. Bu tez çalışmasında uygulanan modelleme çalışmasında, 12 numaralı gönüllünün kullandığı tuvalet kağıdından yapılan çalışmada tam profil elde edilmiştir. Olay yerinde gaitanın bulunabileceği diğer bir durum da, gaitanın klozetin iç kısmına bulaşmış şeklinde bulunabilir. Bu tez çalışması için 6 numaralı gönüllünün gaitasına uyguladığımız modelleme çalışmasında, gönüllü gaitasını yaptıktan ve sifonu çektikten sonra steril swap'la aldığımız sürüntü örneğinde yarı profil sağlanmış ancak laboratuvar kaynaklı olmayan başka kişilere ait lokuslarda elde edilmiştir.

Gaita kalıntı örnekleri DNA çekitlenmesi, çoğaltması ve çalışılması açısından zor örneklerdir. Gaita; kompleks bileşenler içeren, PCR problemlerine neden olabilecek

polisakkarritleri, değişik çeşit degrade olmuş besin maddelerini, metabolik ürünleri geniş miktarda ilgisiz DNA ve birçok sayıda bulunan bakterileri içermektedir (Şen N. ve Ark., 2005). *Johnson* ve arkadaşları (*Johnson D. ve Ark., 2005*) yaptığı çalışmada QIAamp kitlerinin silika tabanlı çekitleme prosedürünü kullanarak nispeten daha hızlı olduğunu, gaitada bulunan PCR inhibitörlerini başarıyla uzaklaştırdığını belirtmiş, ayrıca kitin prosedüründe bakteri hücresinden öncelikli olarak insan hücre lysisini seçilir kılındığını belirtmişlerdir. İnsan intestinal alanında 400 – 500 bakteriyel türün bulunduğunu bunun sonucunda da gaitanın her gramında 10^{10-11} bakteri hücresi olabileceği tahmin edilmektedir. Bir çok çalışmada, kompleks mikrobiyal popülasyonun bileşimi ve aktivitesinin insan sağlığında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (*Li K. ve Ark., 2009*). Bakteri ve diğer mikroorganizmalar örneğin *Candida*, insan bağırsağının normal florasında bulunur. *Brooks*'un araştırmalarına göre, sigmoid kolonun ve rektumun bakteriyel konsantrasyonu intestinal içerikte gram başına 10^{11} hücre bulunmaktadır. Bu çalışmada gaitada bulunan insan hücresi ve diğer organizmaların birbirinden ayrılması QIAGEN prosedüründe bulunan hücre lizis aşaması ile sağlandı. QIAamp DNA Stool Mini Kit kılavuzunda belirtildiği gibi ASL tamponu oda sıcaklığında insan hücre lizis etkisini göstermektedir. Bu etkiye ters olarak ASL tamponu 70-95 °C'de bakteri hücrelerini ve parazitleri etkilemektedir. Tercih edilen insan hücrelerinin lizisini kısa sürede yapmaktır, böylece DNA degradasyonuna neden olabilecek içeriklere maruz kalmasını sınırlamaktadır (*Johnson D. ve Ark., 2005, Qiagen*). Bu tez çalışmasında çevre ortamına bırakılmış gaita örneklerinden elde edilen bakteri türlerinin yürütme sonuçları 9. Simülasyon 17 numaralı şekilde gösterilmiştir. Yürütme sonuçları incelendiğinde bakteri kaynaklı bir pik görülmemiştir.

Adli DNA tiplendirmenin başarısı, olay yerinde bulunan dışkı örneklerindeki PCR inhibitörlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına bağlıdır. Geleneksel olarak PCR inhibitörleri, etkili DNA saflaştırılması ile uzaklaştırılmaktadır ancak bu yöntemler de DNA kaybına yol açmaktadır. DNA polimeraz – tampon sisteminin uyarlanması ile inhibisyon etkisini hafifletmede alternatif bir yol izlenmiştir (*Hedman J. ve Ark., 2011*). DNA polimerazın tercihi ile inhibisyon direnci etkisiz hale getirilebilir. Standart olarak kullanılan birçok ticari kitte bulunan *AmpliTaq Gold DNA Polimeraz* inhibisyona en duyarlı polimerazdır. Reaksiyonda DNA polimerazın miktarı çoğalması veya özellikle kanda bulunan inhibitörlere direnç gösteren BSA (Bovine Serum Albumin) gibi ilave maddelerin kullanılması kanıtlanmış yöntemlerdir (*URL 6, 2011*). *Hedman* ve arkadaşlarının (*Hedman J. ve Ark., 2009*) yaptığı çalışmada belirtildiği gibi BSA; insan kemiği, fenol, hemoglobin ve proteaz gibi inhibitörleri

uzaklaştırarak PCR aşamasını kolaylaştırmaktadır. *Oikarinen* ve arkadaşlarının (Oikarinen S. ve Ark., 2009) yaptığı çalışmada da, BSA'nın PCR inhibitörleri üzerindeki uzaklaştırıcı etkisini araştırmışlardır. BSA'nın gaita örneklerinde PCR inhibitörlerini inaktive ettiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da BSA kullandığımız örneklerin daha iyi sonuç verdiğini gözlemledik.

Birçok çalışmada belirtildiği gibi değişik kaynaklı thermostable DNA polimerazlarının çeşitli PCR inhibitörlerine farklı farklı etkileri vardır. Örneğin *Thermus aquaticus* (*Taq*)'dan elde edilen DNA polimeraz insan kanında bulunan hemoglobin, immünoglobulin G ve laftoferrin gibi inhibitörlere *Thermus thermophilus* (*Tth*)'dan elde edilen DNA polimeraza oranla daha hassastır. *Taq* türevi AmpliTaq Gold adlı DNA tiplendirmesinde geniş kapsamlı olarak kullanılan AmpFISTR SGM Plus (Applied Biosystems) ve PowerPlex 16 (Promega) kitlerin içinde bulunan standart DNA polimeraz olarak kullanılmaktadır (Hedman J. ve Ark., 2009).

Genito-üriner alandaki epitel hücreler ve lökositler üriner DNA'nın elde edildiği başlıca kaynaklardır (Nicole T. ve Ark., 1999). Birçok faktör genetik kimliklendirme yöntemini etkilemektedir. Temel nedenlerin başında örneklerden elde edilen DNA miktarıdır. Bu miktar örneğin doğal yapısından kaynaklandığı kadar saklama koşullarına ve DNA çekitmesinde kullanılan prosedürüne bağlıdır. İdrar genellikle az sayıdaki çekirdekli hücre içerdiğinden dolayı DNA profillemeye sonuçlarında sıkıntı yaşanmaktadır (Castella V. ve Ark., 2006). İdrar içeriğinde epitel hücre ve lökosit gibi çekirdekli hücreler az miktarda bulunduğundan üriner kaynaklı DNA çekitleme işlemleri öncesinde idrar örneklerindeki hücreleri sedimantasyon veya diafiltrasyon gibi işlemleri gerekli kılmaktadır (Benecke M., 2005).

Nakazono ve arkadaşları (Nakazono T. ve Ark., 2005) yaptıkları çalışmada idrardaki DNA miktarını 260nm UV spektrometrede ölçümlemeye çalışmışlar ancak idrar örneklerindeki DNA miktarı çok az olduğu için ölçümlenemediğini belirtmişlerdir. Erkeklerde genotiplendirme profilini elde edebilmek için 100-200µL idrar gerekirken kadınlarda 40-80µL idrar ile tam profil sağlanabildiklerini belirtmişlerdir. Buna bağlı olarak, tam profili kadınlara ait örneklerden elde edebilmek erkek örneklerine oranla daha kolay sağlanmaktadır. Aynı sonuçlar Prinz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da elde edilmiş, bu durumun sebebini de, kadınların idrarında erkeklere oranla daha çok epitel hücrelerin bulunduğunu ve DNA miktarının cinsiyete özgü farklılığa bağlı olduğunu belirtmiştir. Nakazono ve arkadaşları bu görüşü dikkate alarak yaptığı idrar damlasından DNA tiplendirme çalışması da benzer

sonuçları vermektedir. Söz konusu çalışma bizim tarafımızdan da yapılmış olup, istenilen başarı elde edilememiştir. Bu tez çalışmasında da kadındaki profillemeye başarısı erkeklere oranla daha fazladır. Taze idrardan DNA çekieme çalışması sonucunda kadın ve erkek idrar örneklerinden çıkan sonuç $12.7 \mu\text{g/ml} - 1.83 \mu\text{g/ml}$ ve $5.21 \mu\text{g/ml} - 1.15 \mu\text{g/ml}$ 'dir. Bundan dolayı erkek idrar damlasından profillemeye yaparken kadınlara oranla daha fazla miktarda idrarın gerekli olduğu belirtilmiştir. Adli araştırmalarda olay yerinde bulunan idrar damlasından DNA tiplendirmesi yapılacak olan, kadın ve erkek idrar örneklerinin içerdikleri DNA miktarı dikkate alınmalıdır. Bu farktan dolayı, olay yerinde bulunan idrar damlasının kime ait olduğu ve cinsiyeti bilinmediği için mutlaka örnek alırken çok miktarda idrar örneği alınmalıdır.

Mikroskobik olarak yapılan çalışmalarda DNA miktarlarının bekletilmiş örneklerde azalmasını hücrelerin azalması ile bağdaştırabiliriz. Uzun süre bekletilmiş örneklerde mutlaka belli miktarda bozulmadan kalan epitel hücreler bulunmaktadır ve çekitlenen DNA'nın yüksek moleköl ağırlıklı olması şaşırtıcı değildir. Azalan insan DNA miktarını ancak insan spesifik propların hibridizasyonu ile tespit edebiliriz. Çünkü bekletilmiş örneklerde bakteri ve maya hücrelerinin artışı olmaktadır (Prinz M. ve Ark., 1993). Bizim çalıştığımız 3 ve 29 numaralı örneklerin 1 hafta buz dolabında beklettiğimizde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Qubit Florometre ile yaptığımız miktar tayinlerinde, taze örneğe oranla bekletilmiş idrardaki DNA miktarlarının yüksek çıktığı ancak kapiler elektroforez ile yaptığımız yürütme sonucunda beklenen başarıyı gösteremediği belirlenmiştir. *Prinz* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilen diğeri bir nokta da, bekletilmiş örneklerde hücre konsantrasyonu ve DNA miktarının, kadın ve erkek arasındaki farklılık taze örneklerde olduğu gibidir. Kadınlarda daha fazla hücre konsantrasyonu ve DNA miktarındaki fazlalık gözlenmektedir, bu çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Üre idrardaki inhibitör faktörlerdendir. İdrardaki inhibisyon mekanizması, idrarın içindeki üre, kreatinin ve elektrolitlerin konsantrasyonu ile ilgilidir. Khan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PCR inhibisyonunda ürenin başlıca rol aldığı ve konsantrasyonunun 50mM 'den fazla olmasıyla tamamen inhibisyon sağlanmaktadır. Yetişkin sağlıklı bireyin idrarında 330mM üre bulunmaktadır (Khan G. ve Ark., 1991).

Taze gaita ve idrar örneklerindeki bakteriyel aktivitenin azaltılmasını sağlamak için örnekleri -20°C 'de saklamamız gerekmektedir (Benecke M., 2005). *Toshihiro* ve arkadaşlarının belirttiği ve bizim yaptığımız çalışmada göstermektedir ki bir hafta -20°C 'de bekletilmiş örnekten tam tiplendirme yapılabilinmesine rağmen ilerleyen haftalarda başarı

oranı azalmaktadır. Elde edilen lokus sayıları Tablo 7’de belirtilmiştir. Ancak iki defa dondurulup eritilen örneklerde başarılı sonuç elde edilememiştir. *Soltyszewski* ve arkadaşlarının da belirttiği gibi bu durum dondurma ve erime döngüsü DNA kalitesinde negatif etkisi gözlenmiş, bu döngünün sonucunda idrar örneklerinde bulunan üreter epitel hücrelerin parçalanmasına neden olmakta, bu duruma bağlı olarakta nükleer DNA’nın idrar matriksine salınması ve böylece DNA’nın idrardaki mevcut endojen nükleik enzimlerle hidroliz olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak dondurma ve erime döngüsü mevcut DNA kaynağını azaltmaktadır (*Soltyszewski ve Ark., 2006*). Bu çalışmada da benzer sonuç elde ettik; 9, 10, 13 ve 14 numaralı gönüllülerin idrar örneklerini iki defa dondurup erittikten sonra yürütme sonucu tiplendirme yapılamadı.

Gün içindeki epitelyal hücre miktarı karşılaştırıldığında en fazla sabah idrarında epitelyal hücre dökülmektedir, bundan dolayı idrar eğer sabah salgılandysa, idrardan DNA tiplendirmesi daha başarılı sonuçlar vermektedir. Ayrıca idrardaki hücreleri toplamak için idrar mutlaka santrifüj edilmelidir. Böylece hücreler çökeceği için daha başarılı sonuçlar alınacaktır (*Benecke M., 2005*). Bu sebepten dolayı yaptığımız çalışmada, gönüllüden aldığımız idrarı çalışmadan önce santrifüj edip, ondan sonra çekitleme aşamasına geçtik. Bu durumda sonuçların daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

Gebelik sırasında üriner sistemde üreterlerin dilatasyonu, üretral peristaltizmde ve mesane tonusunda azalma gibi bazı değişiklikler meydana gelir. Ayrıca gebelerde plazma volümü fizyolojik olarak artar, idrar konsantrasyonu azalır, idrar progesterin ve östrojenleri yükselir (*Kaçmaz B. ve Ark., 2004*). Böylece hamileler idrarlarında daha fazla üriner epitelyum hücre dökmeaktedirler. Bu nedenle hamile idrar örneğinden kimliklendirme yapabileme şansımız daha yüksektir. İdrar çalışmasındaki 30 numaralı gönüllü hamile olup, yapılan yürütme sonucunda kimliklendirme yapılabilmıştır.

Olay yerinde karşılaşılabileceğimiz durumları modellediğimizde, idrar açısından çok başarılı sonuçlar elde edemedik. 4 ve 7 numaralı gönüllülerin idrarını, tuvalete hem sifon çekmeden önce hemde sifonu çektikten sonra aldığımız swap örneği sonucunda farklı kişilere ait lokuslar elde edilmesinin yanında faile ait lokuslar istenilen miktarda elde edilememiştir. Bir diğer olay yeri modellemesinde de, 18 ve 19 numaralı gönüllülere uygulanmış; gazlı beze bulaşmış idrar lekesinden ve kurutulmuş idrar damlasından elde edilen sonuçlar da başarılı olmamıştır.

Çevre koşullarının biyolojik materyallere zarar verdiği ve çalışmayı zorlaştırdığı adli bilimler camiası tarafından kabul edilen bir gerçektir. Biyolojik materyalleri çevre koşulları

etkilediği kadar bakterilerinde etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmadan da elde edilen sonuçlara göre de; bakterilerin biyolojik materyalleri salgıladıkları enzimlerle zarar verdiği ancak yürütme aşamasında, kullanılan kitlerdeki lokusların insana özgü olmasından dolayı çalışmayı etkilemediği ve bakterilere ait lokusların yapılan yürütmede çıkmadığı gözlenmiştir.

Adli olgularda deliller suçun aydınlatılmasında ve suçlunun bulunmasında çok önemli rol oynamaktadır. Biyolojik delillerden elde edilen DNA sayesinde kimliklendirme yapabildiğimiz için suçlunun bulunması daha kolay ve daha doğru olmaktadır. Günümüzde en sık kullanılan biyolojik delillerin başında kan, tükürük ve semen gelmektedir. Bu çalışmanın yapılmasındaki en önemli amaçlardan biri; adli olgularda gaita ve idrarın kan, tükürük ve semen kadar önemli olduğunu, özellikle hırsızlık ve cinsel suçlarda sıklıkla karşımıza çıkabileceğini göstermektir. Yaptığımız taze örnek ve modelleme çalışmaları sonucunda; gaita örneklerindeki kimliklendirme yapılmasının daha başarılı sonuçlar verdiğini, idrardaki kimliklendirmenin özellikle erkek bireylerde daha zor olduğu gözlenmiştir.

Olay yerinde herhangi bir zemin üzerinde ya da çeşitli materyallere bulaşmış olarak karşımıza çıkabilecek gaita ve idrar örnekleri kimliklendirmede bizi sonuca götürebilecek önemli delillerdendir. Adli bilimlerde gaitaya ait çözülmüş olgular Ek 1'de belirtilmiştir. Uygulanan çevre şartlarında; idrarın özellikle -20°C'de ve 1 gece dış ortamda sağlıklı sonuçlar vermesine rağmen, gaitanın idrara oranla daha başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Her ne kadar bu tür kanıtlarla çalışmak laboratuvar aşamasında zorluklar yaratsa da gelişen teknoloji ile bu sorunların önüne geçmek mümkün olabilmektedir.

6. ÖZET

Olay yerinde bulunan biyolojik materyallerden suçun anlaşılması ve suçlunun bulunması adli bilimlerin görevlerinden biridir. Biyolojik materyallerden kanın, semenin, tükürüğün kullanımı adli vakalarda daha yaygındır. Bunların yanında idrar ve dışkının da kullanımı mevcuttur. Bunlar genellikle cinsel saldırı veya taciz davalarında karşımıza çıkar. Delil olarak dışkıyı en yaygın olarak fiili livata olgularında o veya anal yolla girmiş herhangi bir materyalden alacağımız örnekten elde edebiliriz. Çalışmamda, bu gibi davalarda önem kazanan dışkı ve idrarın, hangi şartlarda nasıl etkilendiğini anlamak, yapılacak test sonuçlarında hangi etmenlerden etkilenip etkilenmediğini anlamak için bir dizi deney yaptım. Projede 30 gönüllü kişiden rıza formu doldurularak temin edilen dışkı ve idrar örnekleri ile çalışıldı. Çalışmanın laboratuvar kısmı İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvarında yapıldı. Gönüllülerden alınan materyallerin yanında kontrol grubu için ağız içinden swap alındı. Kontrol DNA örneklerinin DNA ekstraksiyonu Chelex ile yapıldı, çeşitli ticari kitlerle miktar tayini ve amplifikasyonu yapıldı ve elektroforezle tiplenmesi yapıldı. Çeşitli şartlar altında tutulmuş idrar ve dışkı örneklerinin yüzeyinden DNA toplama işlemi steril nemli koton swap'la yapıldı. Dışkıdan elde edilen DNA'ların ekstraksiyonu ticari kit ile, idrardan ise Chelex yöntemi ile yapıldı. Dışkı ve idrardan elde edilen DNA için miktar tayini ve amplifikasyonu çeşitli ticari kitler ile yapıldı, kapiller elektroforez ile tiplendi. Ayrıca floramızda bulunan bakteri popülasyonunun uygulayacağımız çevre koşullarından nasıl etkilendiğini ve bu etkilenme sonucunda bizim çalışmamızı nasıl etkileyeceğine bakıldı. Yapılacak bu işlemler sonucunda; gerek ışık, nem, soğukluk, sıcaklık gibi fiziksel etmenler gerekse bakteriler gibi diğer organizmalardan etkilenip etkilenmediğine bakıldı.

Projenin sonunda; olay yerinde çeşitli şekillerde karşımıza çıkabilecek bu biyolojik materyallerin, çeşitli çevre şartlarına göstermiş oldukları bozunmayı veya dayanıklılığını hakkında bilgi sahibi olup dışkı ve idrarında diğer biyolojik materyaller gibi kullanışlı olduğunu, gözardı edilmemesi gerektiğini kanıtlamaya çalıştım.

7. SUMMARY

Biological evidence in crime scenes has a great importance in both identifying perpetrators and revealing crimes. Although blood, semen, saliva are the most common biological material, urine and stool can also be rarely found in the crime scene. Urine and/or fecal samples may be either intentionally left behind or neglected as in the example of used toilet papers. This type of evidence is also valuable in sexual assault cases for DNA analysis in forensic identification. In the project, I studied with the stool and urine samples of 30 volunteers who had filled the approval form. Laboratory work of the project was conducted at the Forensic Molecular Genetic Laboratory of Istanbul University Forensic Medicine Institute. As well as the samples taken from the volunteers, swap from mouth will also be obtained from the control group. This study initially aims to demonstrate in which conditions the urine and fecal samples, therefore the results of the analyses can be affected. The second aim of this research is to analyze the bacterial contamination since the urine and stool have specific bacterial flora and furthermore the environmental factors also have an effect on this media. It is also evaluated in this research whether these bacteria affect DNA isolation and amplification or not, a false identification due to microorganisms in urine and stool might be possible or not. An experimental design was used considering a crime scene modelling. Human urine and stool samples of the volunteers were subjected to various environmental conditions. DNA was extracted using Chelex and QIAamp DNA Stool Mini Kit. Amplifications were carried out using AmpFISTR SGM Plus PCR Amplification Kit and the samples were electrophoresed on ABI 310 Genetic Analyzer. Saliva samples of the volunteers were also analyzed as controls. The results reveal that the urine and stool samples are significant and beneficial evidence for forensic identification in particular when there is not any other biological evidence in the crime scene.

8. KAYNAKLAR

Açıkgöz, N., Hancı, H., Çakır, H. (2002) DNA Laboratuvarının İşleyişi, *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi*, **11 (4)** : 126-128.

AmpFISTR SGM Plus PCR Amplifikasyon Kit User's Manual (2006) Applied Biosystems.

Barbisin, M., Fang, R., O'Shea, C.E., Calandro, L.M., Furtado, M.R., Shewale, J.G. (2009) Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples, *J Forensic Sci.*, **54 (2)** : 305-19.

Benecke M. (2005) Forensic DNA samples – Collection and handling, *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 500-504.

Berne, M. R., Levy, M. N., Koeppen, B. A., Stanton, B. A. (2008) *Fizyoloji*, 5. Baskı, 539-703, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara.

Budowle, B., Schutzer, S.E., Burans, J.P., Beecher, D.J., Cebula, T.A., Chakraborty, R., Cobb, W.T., Fletcher, J., Hale, M.L., Harris, R.B., Heitkamp, M.A., Keller, M.P., Kuske, C., LeClerc, J.E., Marrone, B.L., McKenna, T.S., Morse, S.A., Rodriguez, L.L., Valentine, N.B., Yadev, J. (2006) Quality sample collection, handling, and preservation for an effective microbial forensic program, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol:72, No:10, pp.6431-6438.

Butler, J. M., Shen, Y., McCord, B.R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J Forensic Sci.* **48 (5)** : 1054-1064.

Butler J.M. (2006) Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing, *J Forensic Sci.*, **51 (2)** : 253-265.

Castella, V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., Mangin, P. (2006) Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure, *Forensic Science International*, **156** : 70-73.

Castella, V., Dimo-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., Robinson, N., Saugy, M., Taroni, F., Mangins, P. (2006) Forensic identification of urine samples: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers, *Int. J. Leg. Med.* **120** : 67-72.

Cavallini, A., Notarnicola, M., Berloco, P., Lippolis, A., Di Leo, A. (2000) Use of macroporous polypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples, *Journal of Microbiological Methods*, **39** (3) : 265-270.

Cerri, N., Franchi, M., Mascadri, S., De Ferrari, F. (2003) DNA Typing from biological stains: a casework experience, *International Congress Series* 1239, 881-884.

Clement, B.G., Kitts, C.L. (2000) Isolating PCR-Quality DNA from Human Feces with a Soil DNA Kit, *BioTechniques*, **28** (4) : 640-646.

Cotton, E.A., Allsop, R.F., Guest, J.L., Frazier, R.R., Koumi, P., Callow, I.P., Seager, A., Sparkes, R.L. (2000) Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework., *Forensic Science International*, **112** : 151-161.

Deuter, R., Pietsch, S., Hertel, S., Müller, O. (1995) A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR, *Nucleic Acids Research*, **23** (18) : 3800-3801.

Dönmez, Ö. (2008) DNA Analizinde, Laboratuvar Kaynaklı Kontaminasyonun Tespiti ve Adli Bilimler Açısından Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Fogazzi, G., Ponticelli, C., Ritz, E. (2010) İdrar Sedimentü Entegre Bir Bakış, 2.Baskı, 135-137, Palme Yayıncılık, Ankara.

Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007) An Introduction to Forensic Genetics, pp. 51-61, John Wiley&Sons Ltd., England.

Guyton, A.C. (1987) Tıbbi Fizyoloji, 1. Baskı (Textbook of Medical Physiology, 7. Edition), Cilt 2, 1083-1130, Merk Yayıncılık, İstanbul

Hedman, J., Nordgaard, A., Rasmusson, B., Ansell, R., Radström, P. (2009) Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polimerases and statistical modeling of DNA profiles. *BioTechniques*, **47** : 951-958.

Hedman, J., Albinsson, L., Nore'n, L., Ansell R. (2011) Evaluation of three new forensic

DNA profiling kits on PCR-inhibitory crime scene samples, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **3 (1)** : 457-458.

Henry, C., Lee, H.A., Harris (2000) *Physical Evidence in Forensic Science*, Second Edition, Chapter 7, 67-72

Hopwood, A.J., Mannucci, A., Sullivan, K.M. (1996) DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med*, **108** : 237-243.

Hunter P. (2006) All the Evidence, *European Molecular Biology Organization*, **4 (7)** : 352-354.

Iacovacci, G., Serafini, M., Berti, A., Lago, G. (2003) STR typing from human faeces: a modified DNA extraction method. *International Congress Series*, **1239** : 917-920.

Johnson, D.J., Martin, R.L., Roberts, K.A. (2005) STR Typing of human DNA from human fecal matter using the QIAGEN QIAamp Stool Mini Kit, *J Forensic Sci.* **50 (4)** : 1-7.

Kaçmaz, B., Çakır, F.Ö., Aksoy, A., Asyalıbiri, A. (2004) Gebelerde Aseptomatik Bakteriüri Araştırılması, *ANKEM Dergi*, **18 (3)** : 153-156.

Kalfoğlu, E.A., Yükseloğlu, H., Ziyalar, N., Başkan, T., Rayimoğlu, G., Atasoy, S. (2003) Personel Identification from fecal material: A case report, *Forensic Science International*, **136 (1)** : 66.

Kaygısız, M. (2003) Suç Soruşturmasında Olay Yerinde Personel ve İşlevleri, *Polis Bilimleri Dergisi*, **5** : 3-4

Khan, G., Kangro, H.O., Coates, P.J., Heath, R.B. (1991) Inhibitory effects of urine on the polimerase chain reaction for cytomegalovirus DNA, *Journal of Clinical Pathology*, **44** : 360-365.

Kingsbury, D., Wagner, G. (1990) *The National Medical Series for Independent Study Microbiology*, 2. Edition, pp. 7-8, Harwal Publishing Company, Pennsylvania.

Lantz, P., Matsson, M., Wadström, T., Radström, P. (1997) Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR, *Journal of Microbiological Methods*, **28** : 159-167.

Levinson, W. (2006) Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, 8. Edition, pp. 27- 31 Lange Tıp Kitapları.

Li, K., Chen, B., Zhou, Y., Huang, R., Liang, Y., Wang, Q., Xiao, Z., Xiao, J. (2009) Multiplex quantification of 16S rDNA of predominant bacteria group within human fecal samples by polimerase chain reaction – ligase detection reaction (PCR-LDR), *Journal of Microbiological Methods*, **76** : 289-294.

Milde, A., Haas-Rochholz, H., Kaatsch, H. (1999) Improved DNA typing of human urine by adding EDTA, *International Journal of Legal Medicine*, **112** (3) : 209-210.

Monteiro, L., Bonnemaıson, D., Vekris, A., Petry, K., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Megraud, F. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model, *Journal of Clinical Microbiology*, **35** (4) : 995-998.

Moretti, T. R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Smerick, J.B., Budowle, B. (2001) Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples, *Journal of Forensic Sciences*, **46** (3) : 647-660.

Nakazono, T., Kashimura, S., Hayashiba, Y., Hara, K., Miyoshi, A. (2005) Successful DNA typing of urine stains using a DNA purification kit following dialfiltration, *J Forensic Sci.* **50** (4) : 1-5.

Nakazono, T., Kashimura, S., Hayashiba, Y., Hara, K., Matsusue, A., Augustin, C. (2008) Dual examinations for identification of urine as being of human origin and for DNA-typing from small stains of human urine, *J Forensic Sci.* **53** (2) : 359-363.

Nechvatal, J.M., Ram, J.L., Basson, M.D., Namprachan, P., Niec, S.R., Badsha, K.Z., Matherly L.H., Majumdar, A.P.N., Kato, I. (2008) Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces, *Journal of Microbiological Methods*, **72** : 124-132.

Norris, D., Bock, J. (2000) Use of fecal material to associate a suspect with a crime Scene: Report of two cases, *J. Forensic Sci*, **45(1)** : 184-187.

Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viscari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., Hyöty, H. (2009) PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants, *Journal of Clinical Virology*, **44** : 211-214.

Özden, A. (2005) Gastro-intestinal sistem ve probiyotik - prebiyotik synbiyotik, *Güncel Gastroloji*, **9 (3)** : 124-133.

Prinz, M., Greller, W., Schmitt, C. (1993) DNA Typing of urine samples following several years of storage, *International Journal of Legal Medicine*, **106** : 75-79.

QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook (2007) QIAGEN.

Roy, R. (2003) Analysis of human fecal material for autosomal and Y chromosome STRs, *J Forensic Sci*. **48(5)** :1035-1040.

Saferstein, R. (2004) *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science*, 7.Edition, pp.33-34, Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Sołtyszewski, I., Pepiński, W., Dobrzyńska-Tarasiuk, A., Janica, J. (2006) DNA typeability in liquid urine and urine stains using AmpFlSTR SGM Plus, *Advances in Medical Sciences*, **51** : 36-38.

Şen, N., Yılmaz, Ö., Şimşek, İ., Küpelioglu, A., Ellidokuz, H. (2005) Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients, *Helicobacter*, **10 (4)** : 353-359.

Tyler, B. (1996) Fundamental misunderstandings about DNA contamination: Does it help or hurt the criminal defendant, *Beverly Hills Bar Association Journal* Winter/Spring

Unat, E.K. (1997) Temel Mikrobiyoloji, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayın, 3. Baskı, No:207, pp. 101-103, İstanbul.

URL-1, http://www.saglikpark.com/haber/sindirim_sistemi.htm (27.09.2011).

URL-2, <http://www.bilimvesaglik.com/bosaltim-sistemi/default.asp> (14.01.2012)

URL-3,

<http://www.promega.com/~media/files/resources/conference%20proceedings/ishi%2010/poster%20abstracts/38smuts.ashx?la=en> Smuts, A.L., Pogue P.D., (27.09.2011) DNA From Urine As A Potential Source Of Identification.

URL-4, <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html> (27.09.2011)

URL-5, <http://wdict.net/gallery/gut+flora> (14.01.2012)

URL-6, <http://www.promega.com/resources/articles/profiles-in-dna/2007/an-introduction-to-pcr-inhibitors/> Bessetti J. (27.09.2011) An introduction to PCR inhibitors. Profiles in DNA.

URL-7, <http://www.koat.com/news/20678117/detail.html> (13.11.2011)

Vandenberg, N., van Oorschot, R.A. (2002) Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit, *J Forensic Sci.* **47 (5)** : 993-995.

Virkler, K., Lednev, I. (2009) Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Science International* **188** : 1-17.

Vu Nicole, T., Chaturvedi, A.K., Canfield, D.V. (1999) Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: Effects of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing, *Forensic Science International* **102** : 23-34.

Yasuda, T., Iida, R., Takeshida, H., Ueki, M., Nakajima, T., Kaneko, Y., Mogi, K., Tsukahara, T., Kishi, K. (2003) A simple method of DNA extraction and STR typing from urine samples using a commercially available DNA/RNA extraction kit, *Journal of forensic sciences*, **48 (1)** : 108-110.

Yükseloğlu, H.E. (1996) HLA-DQA1 Lokusunun Polimeraz Zincir Tepkimesine (PCR) Dayanan 2 Farklı Teknik ile Tiplenmesinin Adli Bilimler Açısından Değerlendirilmesi,

Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Yükseloğlu, H.E., Özcan, Ş., Ceylan, B. (2008) Olay Yeri İncelemesi ve Türkiye'deki Uygulamalar, *Polis Bilimleri Dergisi*, **10 (1)** : 61-80.

Wang, R., Beggs, M., Erickson, B., Cerniglia, C. (2004) DNA microarray analysis of predominant human intestinal bacteria in fecal samples, *Molecular and Cellular Probes*, **18 (4)** : 223-234.

EKLER

EK 1. Örnek Davalar

Dışkı Materyalinden Kimliklendirme: Dava Raporu

Yüksek saflıkta kimyasallar üreten bir şirket, farklı günlerde şirketin temizlik odasına bırakılmış gaitadan genetik tiplendirme yapılması için mahkemeye başvurmuştur. Şirket bu davranışın kasıtlı olarak yapıldığına, yapan kişinin de çalışanlar arasında olduğuna inanmaktaydı. Gaitadan elde edilen genotip ile 21 çalışanın genotipleri ile karşılaştırılması gerekliydi. Kuruma gelen bilgiler doğrultusunda gaita laboratuara gelene kadarki süre zarfında oda sıcaklığında saklanmış, çalışmaya başlandığında da gaita 1 haftalık olmuştu. Örnekler gaitanın en fazla epitelyal hücre bulundurduğu kenar kısmından alındı ve gerekli olan çekitleme çalışması ve çoğaltma aşaması yapıldı. Elde edilen sonuç doğrultusunda suçlu bulunmuş, suçunu itiraf etmiştir (Kalsoğlu E. ve Ark, 2003).

Valencia County

1 Eylül 2009'da Valencia'da eve gelen hırsız, ev içinde yemek yemiş, aldığı içkileri içmiş ve tuvaletini yapmıştır. Şerif Rene Rivera olay yerindeki gaitayı görünce kriminal laboratuvara gaitayı kanıt olarak göndermiş, laboratuardaki başarılı DNA çekitlemesi sonucunda hırsızın profili elde edilmiştir. DNA veri bankasından yapılan karşılaştırma sonucunda hırsızın eski mahkumlardan olduğu ortaya çıkmıştır (URL-7).

EK 2. Bilgilendirilmiş Onam Formu

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü tarafından yürütülen ve aşağıda adı geçen araştırma projesinde kullanılmak üzere biyolojik örnek verme yoluyla katkıda bulunmanızı dileriz.

Projenin Adı: Olay yerinde bulunmuş, bakteriyel kontaminasyona maruz kalmış dışkı ve idrar örneklerinden DNA tiplendirilmesi.

Genetik inceleme kişinin DNA'sının, DNA ürünlerinin veya kromozomlarının incelenmesi yolu ile yapılır. Bu tür incelemelerin sonuçları kişiye özeldir ve kişinin rızası olmadığı sürece açıklanamaz.

Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir bu durumda, katılımcının örnekleri derhal imha edilecektir. Başka bir amaç için kullanılmayacaktır. Ayrıca araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Gönüllü katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri gizli tutulacaktır ve kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda, tüm kayıtları silinecektir.

Yukarıda adı geçen çalışma için biyolojik örnek vermeyi kabul ediyorum. İ. Ü. Adli Tıp Enstitüsünün genetik inceleme sonuçlarımı anonim bir şekilde bilimsel yayınlarında kullanmalarını kabul ediyorum.

Araştırmaya Katılan Kişinin

Adı – Soyadı:

Tarih:

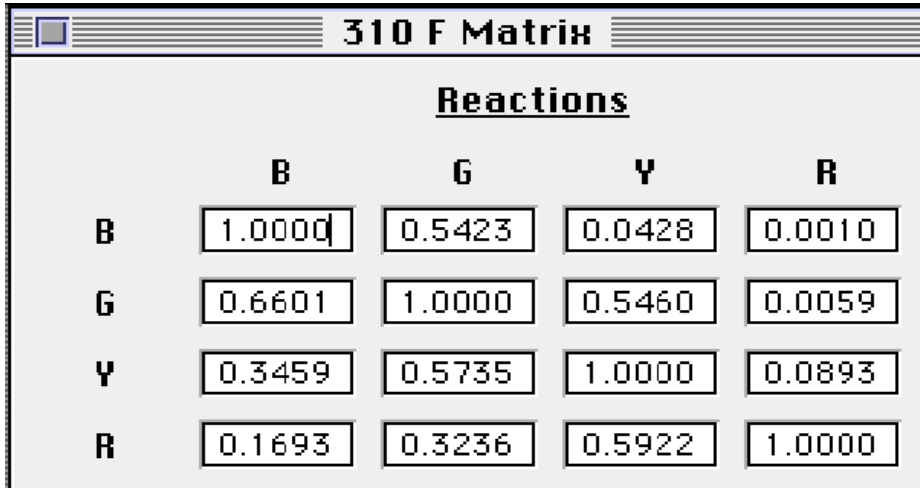
İmza:

EK 3. Matriks Dosyasının Oluşturulması

5-Fam, Joe, Ned ve Rox boyları ile işaretlenmiş DNA parçaları matriks standart örnekleri olarak isimlendirilir. Matriks dosyası dört sütun ve dört satır ve ile sayılardan oluşan bir tablo içermektedir.

Bu dört boya arasında gözlenen örtüşme ve floresans şiddetleri rakamlar ile normalize edilmektedir.

Matriks dosyasındaki satırlar sanal filtreleri, sütunlar ise boya ile işaretlenmiş PCR ürünlerini temsil eder. Soldaki 1.0000 değeri 5-Fam boyası ile işaretlenmiş PCR ürününün floresans değerini temsil eder.



310 F Matrix				
<u>Reactions</u>				
	B	G	Y	R
B	1.0000	0.5423	0.0428	0.0010
G	0.6601	1.0000	0.5460	0.0059
Y	0.3459	0.5735	1.0000	0.0893
R	0.1693	0.3236	0.5922	1.0000

Şekil 32: ABI PRISM 310 ile elde edilen bir matriks dosyası örneği

Matriks hesaplama Gene Scan Analiz Yazılım Programı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmektedir

Bir jel ya da kapiler kullanılarak yürütülen örnekler daha önce Filtre Seti F kullanılarak oluşturulmuş matriks dosyası kullanılarak analiz edilmelidir.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Matriks Dosyasının Oluşturulması

ABI PRISM 310 Toplama Yazılım Enjeksiyon Listesi'nde, her bir örnek için GS STR POP4 (1mL) F modülü seçilir.

Dört tane matriks standart örneği vardır (5-FAM, JOE, NED ve ROX).

1. Her matriks örneğinden 1 µL alınarak 25 µL deiyonize formamide ile karıştırılır.
Her matriks standart örneği için bir tüp hazırlanır.

Not: Rox hariç.

2. 95 ° C'de 3 dakika denatürasyona uğratılan örnekler daha sonra hemen buz üzerine alınır.

3. ABI PRISM 310 Toplama Yazılım uygulaması başlatılır.

4. Örnek ismi olarak Örnek Adı sütunundaki her satır için / numaralar girilir.

5. Dosya menüsü altında, 'yeni' bölümünden Gene Scan Enjeksiyon Listesi simgesi seçilir.

6. a) Enjeksiyon Listesinde, uygun örnek sayısı,
b) Modül açılır menüden, her enjeksiyon için GS STR POP4 (1 mL) F,
c) Her matriks standart numune için Matriks Dosya sütununda 'Yok ' seçilir.

7. Başlat' a basılır.

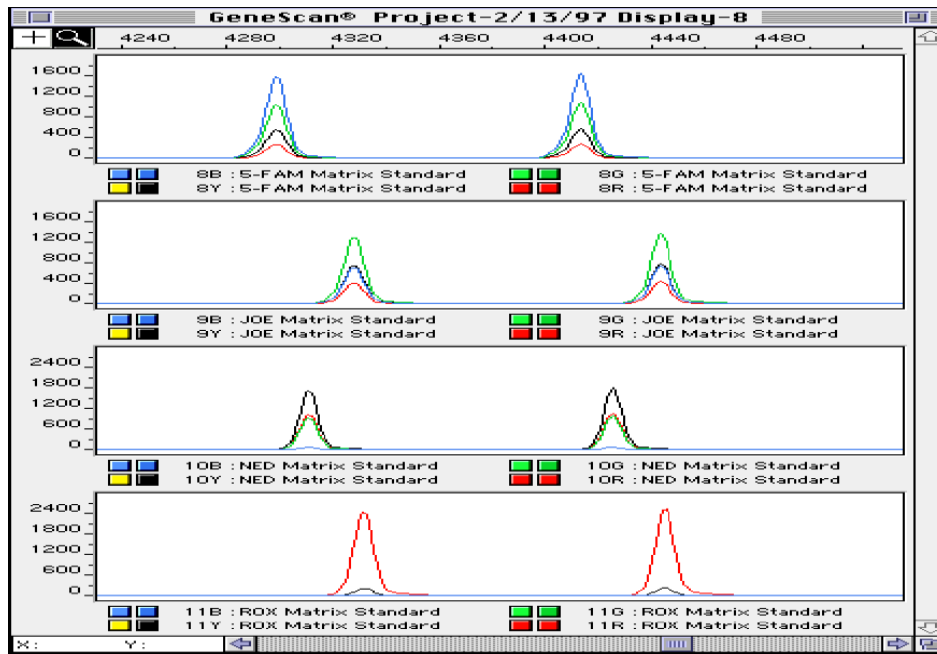
8. Enjeksiyonların yapıldığı sırada, GeneScan Analiz Yazılımında şu adımlar izlenir:

- a) Dosya menüsü altındaki yeni butonunu seçilir.
- b) Matrix simgesi tıklanır.

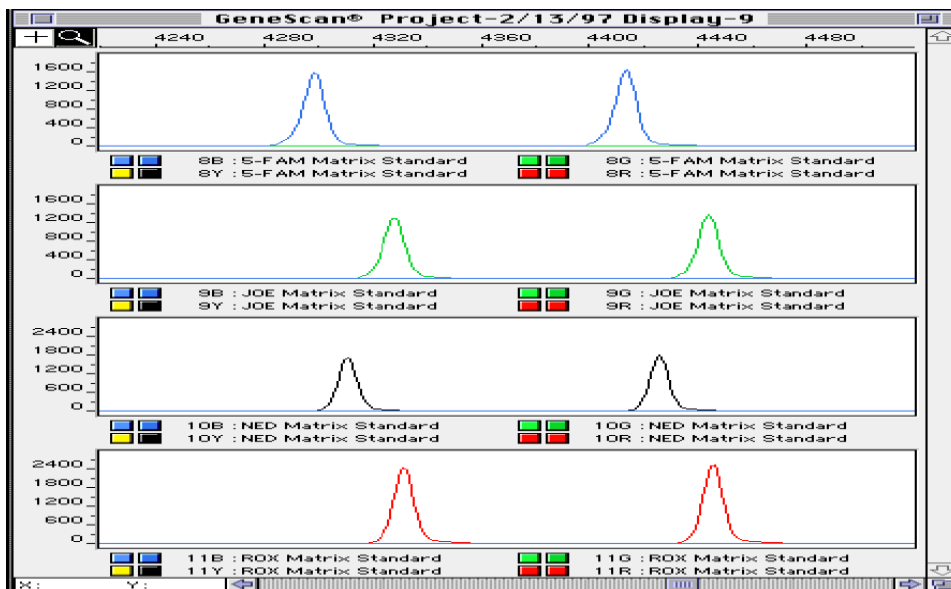
Açılan pencerede, her bir matriks standart boyanın rengine karşılık gelen örnek dosyaları göstermektedir.

- c) Böylece matriks dosyası oluşturulur.

Matriks Standartlarının incelenmesi



Şekil 33: Matriks dosyası uygulanmamış elektroforegram görüntüsü



Şekil 34: Matriks dosyası uygulanmış elektroforegram görüntüsü

ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı : Yasemin Beril ORHANEL

Doğum Tarihi : 08.07.1983

Doğum Yeri : Ankara

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri

(2008-Halen)

Üniversite : Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü

(2001-2005)

Lise : Kültür Koleji

(1998-2001)