

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**Danışman: Prof. Dr. Müjgan CENGİZ**

**TOPRAĞA DÖKÜLMÜŞ KAN ÖRNEKLERİNİN TOPRAK  
BİLEŞİMİNE ETKİSİ VE  
FARKLI TOPRAKLARA DÖKÜLEN KAN LEKELERİNİN  
DNA MİKTARININ TAYİNİ VE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

**Mol. Biyolog Muhammad Saqib Shahzad**

**İstanbul – 2009**

## TEŞEKKÜR

Praise to the **grace of Allah**, The Gracious, The Merciful. He bestowed man with intellectual power and understanding and gave him spiritual insight enabling him to discover his “Self” know his Creator through His wonders and conquer nature. Bow in obeiscene, I before my Lord, Who bestows me to fortitude and impetus to accomplish this task and elucidate a drop of already existing ocean of knowledge.

Next to all His Messenger **Hazrat Muhammad** (*Peace Be Upon Him*) Who is an eternal torch of guidance and knowledge for humanity.

It is indeed my honour and pleasure due to **Prof. Dr. Imdat Elmas**, Director Institute of Forensic sciences, Istanbul University for providing me this opportunity to work in Molecular Genetics department with all necessary lab. facilities.

I have no word of Thanks for “**Prof Dr. Salih CENGİZ**” Director Basic Sciences Department, whose kind behavior coupled with friendly attitude towards science was a source of inspiration for me. The work presented in this manuscript was accomplished under his enthusiastic guidance, sympathetic attitude and intellectual supervision.

It seems impossible to pay thanks to my Kind and worthy Advisor “**Prof Dr. Müjgan CENGİZ**” whose kind behavior, keen interest and guidance, throughout the course of this study, helped me to do the task in time. I am greatly thankful to her for great assistance and continuous encouragement during the span of my study and helping me to reach the destination.

I am Thankful to my jewery member and beloved teacher **.Dr. Gönul Filoğlu**” who provided me greatest support not only in research work but also writing this manuscript. Her pleasing guidelines encouraged me all the way during my stay in the institute. I am also thankful to “**Dr. Havva Altuncul**” for her unlimited support in laboratory and course work pulled me up through the bumpy roads.

I am thankful to **Özlem Bülbül**, Research Officer Molecular Genetics laboratory and my closest friend for her inspiring guidance and all that I learned from her throughout starting from course work upto submission of this manuscript. I highly appreciate the attention and contributions paid by her. Her friendly attitude will always with me as an inspiration. Thanks for being a light.

With profound gratitude and deep sense of devotion and obligation, I wish to especially recognize the help and encouragement of “**Selda Mercan and Mehmet Karaya**l” whose friendly attitude and selfless support enabled me to complete my laboratory work and evaluating the results. Thanks for being so nice.

I have no words but greatest feelings of gratitude for **Gülten Reyimoglu, Selda Darı, Zeynep Türkmen and Beril Anilanmert** from University for her sincere attitude and support in laboratory work.

I am lucky to have friends and good class fellows, who provided me the environment of home in the Institute. I am thankful to **Doruk Argac, Gulden Onur, Nazli Demirtaş, Erhan Acar (Ablası), Fulya Özsoy, Hüsnü Cangil, Hacı İlhan and Levent Tutanc** for being so kind and gracious.

I wish to extend my thanks to my **Father, brothers, sisters, Bhabis and Friends** from Pakistan whom prayers, encouragement, moral and material support enabled me to reach over stairs of life smoothly.

Last but not the least, I am enormously grateful to all para scientific staff especially **Elvan Emral, Sema Hanım, Hülya Hanım, Yüksel Güven and Emine Aslantürk** for their smiling and pleasing manners which encouraged me to do work in friendly environment.

I am also thankful to all those who taught me even a single word of knowledge.

I am Thankful to BAP and TUBITAK for their material support to end up this research.

**M. Saqib Shahzad Ch.**

# İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar

Tablolar Dizini

Şekiller Dizini

I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	4
II.1. Adli DNA Tiplendirilmesinin Tarihi	4
II.1.1 Adli Amaçlı Çalışmalarda Kullanılabilen Maddeler	7
II.2. Kısa ardışık tekrarlı giriş (STR)	9
II.3. DNA ve Toprak Analizi İçin Kullanılan Teknikler	10
III. GEREÇ VE YÖNTEM	19
III.1. Toprağa Kan Dökülmesi	19
III.2. Kestle Mayer Test	19
III.3. Toprağa Dökülmüş Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	20
III.3.1. Fenol Kloroform İzomil yöntemi	20
III.3.2. Sodyum Sitrat Sodyum Klorür yöntemi	22
III.3.3. % 0.9 Sodyum Klorür Yöntemi	22
III.3.4. Chelex Yöntemi	23
III. 4. İzole edilen DNA Miktarının Belirlenmesi	23
III.4.1. Spektrofotometre	23
III.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi	24
III.5. DNA'nın PowerPlex® 16 Sistemi kullanılarak PCR'da çoğaltılması	25
III.5.1 PowerPlex 16 Sistemi İçin Gerekli Malzemeler	25
III.5.2 Çoğaltma İşlemi	26
III.5.3 Termal Döngünün Çoğaltılması	27
III.6. Çoğaltılan DNA Örneklerinin ABI PRISM® 310 Genetik Analizör ile Tiplendirilmesi	28
III.6.1 ABI Prism 310 Genetik Analizör için gerekli materyaller	28
III.6.2. Örnek Hazırlama	28
III.6.3. ABI PRISM® 310 Genetik Analizörün Yürütme İçin Hazırlanması	29
III.6.4. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi	29
III.7. ICP-MS ile inorganik katı madde analizi	30
III.7.1. ICP-MS ile analizde kullanılan standartlar	30
III.7.2. CRM#700Organikçe Zengin Katı Madde	30
III.7.2.1. Katı maddede ayrıştırılabilir Eser miktar metaller için asetik asid ayırma yöntemi	30
III.7.3. CRM#7002 hafif kumlu Katı Madde	31
III.7.3.1. Toplam element içeren ve ayrıştırılabilir element bileşimli katı maddede nitik asid ekstraksiyon yöntemi	31
III.8. Mikro Dalga Parçalaması İçin Örnek Hazırlama	31
III.8. 1. ICP-MS için Katı analiz Yöntemi	32
III.8. 1.1. Standart hazırlama	32

III.8. 1.2. CRM standartları ve katı madde standartları hazırlanması	32
III.9 CRM standartları ve katı madde standartlarının hesaplanması	33
IV.BULGULAR	34
V.TARTIŞMA	65
VI.ÖZET	82
VII. SUMMARY	83
VIII. KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	95

## KISALTMALAR

A	Adenin
ASO	Allel Spesifik Oligonükleotid
BSA	Bovine serum albumin
C	Sitozin
CODIS	Combined DNA Index Sistem
CRM	Sertifikalı Referans Materyal
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Ethilendiamintetra Asetik Asid
EDNAP	European DNA Propiling Group
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes
FBI	Federal Bureau of Investigation
FP	Floresans Polarizasyon
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
G	Guanin
HPLC	High Performance Liquid Chromotography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms (Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi)
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
SDS	Sodyum dodesil sülfat (Sodyum lauril sülfat)
SNP	Single Nükleotid Polimorfizim (Tek Nokta Polimorfizmi)
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Tekrar Dizinleri)
T	Timin

Taq	Thermus Aquaticus
UV	Ultraviyole
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeats (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizinleri)

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> PowerPlex® 16 Sistem Alelik Ladder Bilgisi ve Lokus Bilgisi	12
<b>Tablo 2:</b> Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemleri için Uyuşma Olasılığı	14
<b>Tablo 3:</b> Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemlerinin Tipik Babalık Testi İçeriği.	14
<b>Tablo 4:</b> Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemlerinin Dışlama Gücü	15
<b>Tablo 5:</b> PowerPlex® 16 Sistemi için PCR Master Mix	26
<b>Tablo 6:</b> GeneAmp® PCR Sistem 9700 Isı Döngü için protokol	27
<b>Tablo 7:</b> ABI PRISM® 310 Genetik Analizör için parametreler	29
<b>Tablo 8:</b> Pakistan’da Bahçeden Alınan Toprak Örnekleri	36
<b>Tablo 9:</b> Pakistan’da İnşaat Alanından Alınan Toprak Örnekleri	37
<b>Tablo 10:</b> Pakistan’da Mezarlıktan Alınan Toprak Örnekleri	38
<b>Tablo 11:</b> Pakistan’da Kanal Kenarından Alınan Toprak Örnekleri	39
<b>Tablo 12:</b> Türkiye’de Bahçeden Alınan Toprak Örnekleri	41
<b>Tablo 13:</b> Türkiye’de İnşaat Alanından Alınan Toprak Örnekleri	42
<b>Tablo 14:</b> Türkiye’de Mezarlıktan Alınan Toprak Örnekleri	43
<b>Tablo 15:</b> Türkiye’de Kanal Kenarından Alınan Toprak Örnekleri	44
<b>Tablo 16:</b> Türkiye ve Pakistan’dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Bahçe Toprakları için PCR Sonuçları	46
<b>Tablo 17:</b> Türkiye ve Pakistan’dan 6 Farklı Zamanda Toplanan İnşaat Toprakları için PCR Sonuçları	47
<b>Tablo 18:</b> Türkiye ve Pakistan’dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Mazar Toprakları için PCR Sonuçları	48
<b>Tablo 19:</b> Türkiye ve Pakistan’dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Nehir Kinarındaki Toprakları için PCR Sonuçları	49
<b>Tablo 20:</b> ICP-MS:Pakistan’dan Gelen Toprak Örneklerinin Mikrodalga ile Yaş Yakması	52



<b>Tablo 21:</b> ICP-MS:Türkiye’den Gelen Toprak Örneklerinin Mikrodalga ile Yaş Yakması	54
<b>Tablo 22:</b> CRM700 Standartı Kullanarak Türkiye Bahçe Toprağının Değerlendirilmesi	57
<b>Tablo 23:</b> CRM700 Standartı Kullanarak Türkiye Mezarlık Toprağının Değerlendirilmesi	58
<b>Tablo 24:</b> CRM700 Standartı Kullanarak Pakistan Bahçe Toprağının Değerlendirilmesi	59
<b>Tablo 25:</b> CRM700 Standartı Kullanarak Pakistan Mezarlık Toprağının Değerlendirilmesi	60
<b>Tablo 26:</b> CRM7002 Standartı Kullanarak Türkiye İnşaat Toprağının Değerlendirilmesi	61
<b>Tablo 27:</b> CRM7002 Standartı Kullanarak Pakistan İnşaat Toprağının Değerlendirilmesi	62
<b>Tablo 28:</b> CRM73002 Standartı Kullanarak Türkiye Nehir Kenarındaki Toprağının Değerlendirilmesi	63
<b>Tablo 29:</b> CRM73002 Standartı Kullanarak Pakistan Nehir Kenarındaki Toprağının Değerlendirilmesi	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> İnternal Uzunluk Standardın (ILS) fragmentleri ve baz uzunlukları	15
<b>Şekil 2.</b> ICP-MS limit aralığı	16
<b>Şekil 3.</b> ICP-MS çalışma prensibi	17
<b>Şekil 4:</b> Mikrodalga parçalaması için CEM MARS Fırın	30
<b>Şekil 5:</b> Örnek girişinden tespit edilmesine kadar ICP-MS çizimi	33
<b>Şekil 6:</b> Çalışan bir ICP-MS akış şeması	33
<b>Şekil 7:</b> Pozitif (a) ve Kontrol Toprak (b) Örneklerinin Kestle Mayer Test Sonuçları	34
<b>Şekil 8:</b> Kan ile Lekelenmiş Toprak Örneklerindeki Genomik DNA'nın Ürün Jel Elektroferez Gösterimi	35
<b>Şekil 9:</b> Bahçe Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)	36
<b>Şekil 10:</b> İnşaat Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)	37
<b>Şekil 11:</b> Mezarlık Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)	38
<b>Şekil 12:</b> Kanal Toprağı Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)	39
<b>Şekil 13:</b> Pakistan'dan Alınan Toprakların Karşılaştırması	40
<b>Şekil 14:</b> Bahçe Toprağı Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)	41
<b>Şekil 15:</b> İnşaat Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)	42
<b>Şekil 16:</b> Mezarlık Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)	43
<b>Şekil 17:</b> Kanal Kenarı Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)	44
<b>Şekil 18:</b> Türkiye'den Alınan Toprakların Karşılaştırması	45
<b>Şekil 19:</b> ABI 310 Genetik analizörde yürütülen bir örneğin elektroferogramı. Kontaminasyon ve alel düşmelerinin bir arada görüldüğü bir örnek.	50
<b>Şekil 20:</b> ABI 310 Genetik analizörde yürütülen bir örneğin elektroferogramı. Tüm alellerin elde edildiği bir örnek.	51

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Bilimsel bilgilerin adli bilimlerdeki uygulamaları, kriminal ve sivil yasaların adalet sistemi tarafından uygulanmasına yardımcı olmaktadır (Evelt ve ark., 1996). Kan, dünyadaki kriminal davalarda en yaygın olarak bulunan, en iyi bilinen ve belki de en önemli kanıttır. DNA, nükleus taşıyan ve kanda bulunan beyaz kan hücrelerinden izole edilir. Genel olarak, DNA parmak izi terimi her bireyde yüksek karakteristik gösteren modelleri ifade etmektedir. DNA parmak izinin genetik karakteri oldukça geniştir (Jefferys ve ark., 1986). Daha önceki yıllarda DNA testleri 6 ile 8 hafta sürerken günümüzde sadece birkaç saatte gerçekleştirilmektedir (Butler, 2001). Son yıllarda geliştirilen tekniklerle tek bir saç kökünden bir bireyi diğer tüm bireylerden ayırt etmek mümkün olmaktadır (Cornwell ve ark., 1992).

Edmund Locard "Locard'ın Değiş Tokuş Prensipleri" olarak bilinen bir teori geliştirmiştir. Bu teoriye göre bir kişi başka bir kişi veya nesne ile temas ettiğinde küçüğe olsa karşılıklı partikül değişimi oluşur, kurban veya suçludan geriye iz kalabilir (Thornton, 1997). Locard bu partikülleri toz veya kir olarak tanımlamıştır ancak günümüzde bunların tüm taşınmış toprak izlerinin de içerdiği anlaşılmıştır. Dünya yüzeyinde bulunan mineral ve organik maddeler iklim, organizmalar ve zaman gibi çevresel faktörler ve genetik faktörlerin etkilerine açıktır (SSSA, 1996). Toprak, farklı mineral, kimyasal, biyolojik ve fiziksel özelliklerden oluşan kompleks bir karışımdır. Mineraller toprağın oldukça önemli bileşenleridir dolayısıyla minerallerin belirlenmesi adli toprak kimliklendirilmesi için gereklidir.

Toprağın organik içeriği ile ilgili çok sayıda bilgi mevcuttur. Karmaşıklığı nedeniyle adli bilimciler toprağın organik yapısının incelenmesine yeterince özen göstermemişlerdir. Adli toprak araştırmalarında toprak mikroorganizmaları ve onların aktivitesi hakkındaki uygulamalar oldukça azdır. 1975 yılında toprakta fosfataz, arilsülfataz, üreaz, tripsin ve invertaz aktiviteleri gerçekçi bir yaklaşımla ölçülmüş ve bu bilgiler yayınlanmıştır (Thornton, J.I., 1975).

Kastle-Meyer testinde (Kastle J. St., 1909) bir örneğin kan olup olmadığını belirlemek için fenoftalein kullanılır. Belirleme, koruma, izolasyon ve DNA miktarının belirlenmesi, ayrıca suç mahalinde bulunan biyolojik materyallerden DNA'nın geri alınmasını kolaylaştıran yöntemler geliştirilmektedir (Nicklas, ve ark.,2003). 1990'larda adli örneklerde DNA uzunluk

polimofizmelerini belirleyen PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tabanlı sistemler oluşturulmuştur. PCR tabanlı DNA tiplemesinin yapılması ile birlikte yeni yöntemler de geliştirilmeye başlanmıştır (Mullis and Faloona, 1987). PCR ile çoğaltılan STR ürünleri denature poliakrilamid jel elektroforezi ile ayırdıktan sonra gümüş boyama ile görünür hale getirilir (Bassam ve ark., 1991). Kapiler elektroforez (CE) STR analizlerinin yapılmasında pek çok laboratuvarın seçtiği bir yöntemdir (Butler, J.M., ve ark., 2004).

Toprak örneklerinin analizinde sıklıkla kullanılan adli teknik yoğunluk gradient tüp tekniğidir. 1995 yılında kil minerallerinin XRD analizi için hızlı bir hazırlama tekniği önerilmiştir (McAlister JJ., 1995). Otomatize SEM-EDX sistemi kullanılarak bir partikül araştırma ve analiz tekniği geliştirilmiştir (McVicar MJ., 1997). 1999 yılında adli toprağın ayrımı için partikül boyutunun dağılımının doğruluğu incelenmiştir (Marumo Y ve ark., 2001, 1999). Polarize mikroskop ile minerolojik inceleme için kimliklendirme cetvelinin kullanımı konusunda bir girişim olmuştur. Kullanışlı kimliklendirme cetveli 1999 yılında önerilen 200 mineral içerir (Ishiwatari A., 1999). Kısa zaman önce toprağın organik içeriğini analiz için mükemmel bir yöntem olan Fourier dönüştürücü infrared absorpsiyon spektrofotometri (FTIR) tekniği geliştirilmiştir (Cox RJ.ve ark., 2000). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) kullanılarak yapılan diferansiyel analiz, toprağın inorganik bileşenlerinin milyar (trilyon) başına (pbb) parça düzeyindeki farklılıklarını belirlemek için kullanılmaktadır. Şüphesiz bu analiz sadece topraklar arasında değil ayrıca aynı alanın farklı bölümlerindeki toprakların karşılaştırılmasında iyi sonuçlar verebilir. Eğer standartlar ile karşılaştırma yapılırsa toprak bileşenlerindeki küçük değişimler belirlenebilir ve değerlendirilebilir. Bölgeden bölgeye farklılık gösteren topraklar, şüpheli ile suç bölgesi arasındaki bağlantının kanıtlanması için toprağı değerli bir delil haline getirebilir.

Toprak, kriminal araştırmalarda taşınan kanıt olarak önemli bilgiler sağlayabilir çünkü birçok kriminal davada suçlu veya kurbanla taşınan toprak oldukça önemlidir. Bu nedenle, özellikle kan ile lekelenmiş toprak cinayet davalarında iyi bir kanıt olabilir. Kan ile lekelenmiş toprak örnekleri olaydan sonra elde edilebilir. Bu amaçla toprak tiplerinin, bozulmanın oranının ve toprağın farklı biyolojik materyalleri tutma yeteneğinin araştırılması gerekmektedir.

Kanla lekelenmiş toprağın miktarı olaydan olaya değişebilir ve örneklerin çok dikkatli bir şekilde toplanması gerekmektedir. Bazen, örnek sıcaklık, nem, yağmur gibi çevresel koşullar

altında bulunabilir. Böyle davalarda ve yerlerde örneklerin kullanılabilirliği toprağın pH'sı, rengi, besleyici maddeler, humus ve toprakta bulunan mikroorganizmalardan doğrudan etkilenir. Mikroorganizmalar, nemin ve çürümüş materyallerin çok olduğu alanlarda bol miktarda bulunabilir. Böyle topraklar humuslu toprak olarak adlandırılır ve bu tip topraklardaki bozulma oranı mikroorganizma bulunmayan normal topraklara göre çok daha fazladır. Toprak rengi farklı kaynaklardan gelen toprakların ayırt edilmesinde önemlidir. Toprak pH'ı ise bölgeye, burada yetişen ürünlere ve varolan materyallere bağlı olarak bazikten yüksek asidik aralığında yer alabilir. Hava koşulları toprak ve özellikleri üzerinde oldukça etkilidir. Çorak bölgelerdeki toprak tropik bölge toprağı ile karşılaştırıldığında farklı bileşenler gösterir. Şiddetli yaz görülen bölgelerdeki topraklar kış iklimi gözlenen yerlerdeki topraklardan farklı özellik gösterir. Toprak, organik ve inorganik materyallerin miktarındaki farklılıklarla ilişkin olarak değişiklik gösterebilir. Aynı bölgede bile topraktaki besinlere bağlı olarak karmaşık dağılım olabilir. Üzerinde kan olan toprak ile kan olmayan toprak farklılık gösterebilir.

Bu çalışmanın amacı adli kanıt olarak toprağın önemini göstermektir. Toprağın organik yapısı; farklı tipteki toprakları, toprağın DNA tutma yeteneğini, zaman ile toprakta bulunan DNA miktarına etkilerini, saflık ve bozulmayı göstermektedir. Çalışmamızda PCR sonuçları ve genotiplerin değerlendirmeleri için kullanılan DNA'lar farklı kaynaklardan alınan toprakların kan ile lekelenmesi sonucu elde edilmiştir.

Diğer taraftan, inorganik analiz ve ICP-MS ile olan karşılaştırmalarda farklı kaynaklardan elde edilen toprakların inorganik yapısının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## II.GENEL BİLGİLER

### II.1. Adli DNA Tiplendirmenin Tarihi:

Adli bilimler, bilimsel bilgi ve yöntemlerin, yasal problemler ve kriminal araştırmalara uygulanmasıdır. Adli bilimlerin amacı olayyeri delillerini analiz ederek, suçun spesifik koşullarını belirleyip polise ve adli cemiyetlere yardımcı olmaktır. Biyolojik delilin bulunduğu suçlarda, DNA tiplemesi delilin belirli bir şahıstan olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Böyle bir ilişki, olay yerine şüpheliyi yerleştirmeye yardımcı olabilirse önemlidir (Becherer, 2000). Genetikçiler insan genomunun yaklaşık % 97den fazlasının birçok bireyde çok benzer olduğunu, DNA'nın bariz değişkenlerinin kodlanmayan DNA bölgelerinde bulunduğunu belgelediler. (Lander ve ark., 2001; Venter ve ark., 2001). Bireylerin genetik eşsizlikleri insan biyolojisinin ana prensibidir. Bu eşsizlik bireyin ebeveylelerinden miras kalan genetik işaretleyicilerin kombinasyonu ile tanımlanır. Genetik işaretleyiciler protein seviyesinde veya DNA varyasyonunda analiz edilebilir. DNA teknolojisi, insan çeşitliliğini genetik materyali olan DNA seviyesinde incelemeye olanak sağlar (Rebecca ve ark., 1991).

İnsan adli kimlik testinin modern orijinlerinin izleri, 19. yy sonlarında, Arjantin ve Avrupa'daki bazı bireylerin, ki bunlara İngiliz fizikçi/genetikçi Sir Francis Galton da dahil olmak üzere, parmak izi analizinin adli bilimlerdeki kullanımının yararını fark etmeleriyle oluşur. (Galton, F., 1892; Cole, S., 2001). Geçen yüzyılın çoğunda, babalık testinde kan grubu antijen tiplemesi ve diğer kan hücresi enzimleri veya serum proteinlerindeki kalıtsal değişkenlerin belirlenmesi için laboratuvar teknikleri hem sivil örnekler hem de suç örneklerinde yaygın olarak kullanılmışlardır. Kan grubu tiplemesinin ayırt edici özelliği DNA tiplemesi ile kıyaslanamazken, DNA bazlı genetik tiplemesinden önce dünya genelinde kullanılıyordu.

Bireysel genetik varyasyonun DNA seviyesinde tayin metotları 1970'lerin ortasında kullanılmaya başlanmasıyla beraber; tıbbi araştırma, tanı ve adli bilimde uygulanmaları hızla arttı. İlk kez Alec Jeffreys İngiltere'de tecavüzcünün kimliklendirilmesinde DNA tiplemesi

kullandı (Jeffreys ve ark., 1985). 1977'de pek çok Avrupa ülkesi bilinen ve itham edilen suçluların vücut sıvılarının DNA profilleri verilerini toplamaya başlamıştı (Benecke, M., 1997).

' Toprak' yeryüzünün en üst tabakasını tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir terimdir. Yerli kayaçların biyosfer, atmosfer ve hidrosfer ile temasından oluşan maddenin ince tabakasıdır (<http://www.forsci.com/Services/soil.htm>). Her toprağın karakteristik analizinin tiplmesi yoluyla, bazen bu karakteristiğin spesifik yer ve mevkiyle ilişkilendirilmesi mümkün olabilir (Steck, 2004). [http://www.crimeandclues.com/soil\\_analysis.htm](http://www.crimeandclues.com/soil_analysis.htm). Toprak mineralleri, oksitleri, organik maddeleri, mikroorganizmaları ve onların maddeleri gibi bileşenlerinin yanı sıra parçacık boyutu ve yoğunluğu gibi fiziksel yapısı ile de aşırı komplekstir. Örneğin granit tek başına dikkate alınırsa, neredeyse sınırsız sayıda cins vardır. Murray'ın raporuna göre (Murray RC., 1991), Almanya'da Georg Popp 1904'teki cinayet vakasının çözümünde toprak delilini inceleyen ilk bilim adamıdır. Son yıllarda çıkan birkaç ilginç makalede, pek çok tarihi vakanın aydınlatılmasında ve kriminal araştırmalarda toprak delilinin ve jeologların katkısının önemi anlatılmaktadır. (Murray RC. 2000, 1991, 1975; Mcphee J.1996)

Adli jeoloji delil olarak çeşitli maddelerin analiziyle ilgilenir, bunlar toprak, giysi, saç, kan, ayakkabı izi, parmak izi, alet izi, metal, cam, boya, leke, organik (botanik veya zoolojik) madde, inorganik (mineralojik) madde, tahta, toz, sigara ve kül, kağıt, lif, makine yağı ve yağ, dokümanlar, konteynir ve inşaat ve/veya ambalaj maddesi olabilir. Bu temelde toprak ile ilgilidir (Murray ve Tedrow, 1975). Toprakta üç genel grup vardır; bölgesel toprak, iklimin ve bitki örtüsünün etkisinin gösterir; bölgesel olmayan toprak bu etkiyi göstermez; ve bölge içi toprak, yağ ve engebe gibi başka faktörlerin etkisini gösterir (Clark, 1998). Toprak, doğa tarafından tortu veya taşınma yoluyla oluşur (Murray ve Tedrow, 1975). Dört ana bileşenler adli delili oluşturur; (1) toprağın kendisi, (2) kayalar, (3) mineraller, ve (4) fosiller. Madde örneğine ışık, mikroskop ve diğer aletler kullanılarak en temel işlem olan 'benzerlik karşılaştırması' testleri uygulanır ve araştırmacının, örneğin yeryüzündeki bir yere benzeyip benzemediğini söyleyebilmesi için olanak sağlar (Murray, 2004).

Toprağın jeokimyasal analizi, toprak örneğindeki temel eser elementlerin kimyasal testler yoluyla tayinini içerir. Toprakta bulunan temel eser elementler silika, demir ve alüminyumdur.

Silika zengini toprak genelde soğuk iklimlerde bulunur, demir ve alüminyum genelde sıcak ortamda bulunur. ABD'deki her eyaletin ve bütün köylerinin toprağının eser mineral içeriği haritalanmış ve indekslenmiştir. FBI ve pek çok suç laboratuvarı, toprak örneğinin geldiği yere ait ipucu bulmaya yardımcı olan bu bilgiye ulaşabilir. World Reference Base tüm dünya toprağıyla ilgili bilgileri içerir (Bridges, 1997). Pek çok toprak bilimci dünyada tamamen aynı toprağına sahip iki nokta olmadığı konusunda hemfikirdirler (Murray ve Tedrow, 1975). Yer kömürü, bataklık benzeri alan veya kıyı bölgelerinde bulunur ve bitki örtüsü (yer kömürünü oluşturan), tuzluluk oranı ve gelgit olayında olduğu gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Benzer şekilde fazla miktarda polen ve spor içeren toprak (1 mısır püskülü 50 milyon tane polen içerir) bu maddelerin yüzlerce mil seyahat etmesi nedeniyle kesin olarak analizlenemiyebilir. Sporların ve polenlerin incelenmesini içeren Palinoloji bilimi, adli jeolojinin giderek gelişen bölümü olarak ortaya çıkmıştır. (Moore, 1991).

Renk araştırması, minerallerin ve toprağın özelliklerinin belirlenmesinde en basit yoldur. Böyle bir maddede spektrumun neredeyse bütün renkleri bulunur. Örneğin baskın renk genelde toprağın doğal rengini gösterir. Buna rağmen örnek, absorblandıktan bir süre sonra ve/veya elemenden sonra renk değiştirebilir, fakat sonra bile tabaka rengi 'renk tarihi' ni sağlayabilir. Koyu renk tabaka kaplama genelde organik maddenin (ayrıca humus denir, hidrojen peroksit kullanılarak yükseltgenip gerçek rengi elde edilebilir) varlığına işaret eder. Örneği elemek de ayrıca rengi değiştirebilir, küçük parçalar daha kırmızı veya kırmızımsı kahverengi olmaya eğilimlidirler, bunun aksine büyük parçalar genelde gri ve sarıdır. Adli örnekler genelde 100<sup>0</sup>C de kurutulur ve sonra renk için incelenip Munsel Renk Sistemine göre sınıflandırılır (renk çarkı). Mikroskopik inceleme ve diğer testler renk sınıflandırmasından sonra yapılır.

Toprağın farklı ve heterojen yapısı adli bilimlerde iki soruna yol açar. Birincisi, doğru karşılaştırmanın sağlanması için bilinen toprakların örneklendirilmesi gereklidir. Toprak örneğini ayırmak imkansızdır. Adli toprak karşılaştırması, söz konusu toprak örneğinin yeryüzündeki belirli bir alandan, söz konusu kaynaktan gelip gelmediğini sorgular. Organik kısım ekstrakte edilip, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilebilir. Mineralojik fraksiyon yoğunluk, X-Işını kırılması, X-ışını floresansı, ICP-MS, ve/ya iyon kromatografisi (IC) ile ayrıştırılıp, karşılaştırılabilir. <http://www.forsci.com/Services/soil.htm>.



### II.1.1 Adli Amaçlı Çalışmalarda Kullanılabilen Maddeler

Kanın bulunması, her zaman kurban ile sanık ve şiddetin yeri arasında bağlantı kurar. Kan su, hücre, enzim, protein ve inorganik maddelerden oluşan, vasküler sistemle yiyecek, oksijen ve atık taşımaya yapan, biraz bazik sıvıdır. Kanın sıvı kısmının daha çok su olan plazma ve beyaz hücreler ve trombosit içeren serumdan oluşur (Moenssens ve ark., 1986). Islak kan, daha çok test yapılabilirdiği için kuru kandan daha değerlidir. Kan, havaya 3-5 dakika maruz kaldıktan sonra kurumaya başlar. Kurduğunda ise rengi kahverengi ve siyaha döner. Olay yerindeki kan göl, damla, sıçrama ve tortu halinde olabilir (Saferstein R.,1998).

Kan tortusu, kan olduğundan emin olunması için kristallendirme metodlarıyla test edilmelidir. Adli bilimciler renk veya kristalline testleri kullanırlar. Benzidin testi kanserojen olduğu öğrenilene kadar popüler bir testti ve daha sonra kimyasal fenolftalein kullanılan Kastle-Meyer testi (Kastle J. St., 1909) bu testin yerini aldı. Fenolftalein, hemoglobin ile temas edince, parlak pembe renk oluşturan peroksidaz enzimleri salar (patates ve bayır turpundaki peroksidazla da aynı reksiyonu verir). Luminol görünmez kan lekelerini tespitinde halılara ve mobilyalara sıkılarak oradaki kan lekelerini (ve diğer lekeler) karanlıkta hafif fosforesans ışık açığa çıkarmak için kullanılan bir kimyasaldır. Uzun süre kurumuş kan kristalize olmaya meyillidir veya değişik tuz-asit karışımları halinde kristalize olabilir. Bu testler Teichman testi, Takayama testi veya Wagenhaar testi olarak adlandırılır (Borrmann ve ark., 1977).

Adli bilimciler pek çok biyolojik materyalle karşı karşıya gelirler, bunların çoğu çevresel bozunmaya maruz kalır ve bu yüzden kötü kalite ve düşük nicelikte DNA içerir. Bugünün STRlerinin kullanımı sigara izmariti (Hochmeister ve ark., 1991), dudak kozmetiği (webb ve ark., 2001), iskelet kalıntısı (Hochmeister ve ark., 1995), idrar (Brinkmann ve ark., 1992, Benecke ve ark., 1996), silah ağzındaki ve kurşunlardaki doku (Karger ve ark., 1996) parçalanmış ve çürümüş vücut kısımları (Schmitt ve ark., 1995), parafinlenmiş tümör dokusu, tırnak altındaki kir (Capelli ve ark., 1998), ısırık izinden tükürük DNA'sı, yeni doğanların mumyaları, etanolde saklanan kurt sineği (Sperling ve ark., 1994), yanmış ceset (Weihser ve ark., 1996), diş (Lessig ve Edelman., 1996), kurumuş sakız (Fregeau ve ark., 1999), kitlesel felaket sonrası bulunan vücut parçaları (Whittaker ve ark., 1995, Clayton ve ark., 1995, Manucci

ve ark., 1995), insan dışkısı (Hopwood ve ark., 1996) ve iskelet haline gelmiş sel kurbanından yapılabılır (Munucci ve ark., 1998). DNA'nın tayini, korunması, ekstraksiyonu ve kantitasyonu ile ilgili yeni metotlar sürekli geliştirilmekte ve olay yerindeki biyolojik materyalde bulunan DNA'nın geri kazanımına yardım etmektedir (Nicklas ve ark., 2003).

Toprak yapısı gereği yeryüzeyinde olduğu için olay yeri ile insanları ilişkilendirmede yararlı bilgi sağlayabilir. Toprağın delil olarak değeri karakteristiğindeki büyük varyasyona dayanır. Toprak sadece mineraller, oksitler, organik maddeler, mikroorganizmalar ve onların maddelerinden dolayı değil, ayrıca yoğunluk ve parçacık boyutu gibi fiziksel yapısından dolayı fazlaca komplekstir. Adli toprak incelemesinin, toprağın karmaşık yapısından dolayı çok zor olduğu düşünülür fakat bu çeşitlilik ve karmaşıklık bize toprak örneklerini yüksek ayırıcı güçle ayırt etmemizi sağlar ([www.interpol.int/public/Forensic/IFSS/meeting13/Reviews/Soil.pdf](http://www.interpol.int/public/Forensic/IFSS/meeting13/Reviews/Soil.pdf)).

Kısa süre önce adli dergilerde çıkan birkaç ilginç makale, toprak delilinin önemini ve kriminal araştırmada jeologların katkısını göstermiştir. Kaliforniyadaki cinayet vakasında, kurbanın vücudu 300 mil güneyden getirilen çakılın kullanıldığı petrol kuyusunun yanına düşmüştü. Şüphelinin arabasında bulunan toprak örneği, petrol kuyusu civarındaki ile karşılaştırıldı. Kaya parçaları içeren arabadan alınan söz konusu örnek ile taşınan çakılın aynı olduğu bulundu (Murray RC., 1975, 1991, 2000; Mcphee J., 1996).

Sistematik olarak alınan toprak örneklerinin, havada kurutulmuş toprak rengi ve parça boyutu dağılımının ayırıcı gücü incelenir (Junger EP., 1996). 1998' de adli polen analizi adli amaçla kullanılmıştır (Horrocks M.ve ark., 1998). Bock ve Norris (Bock JH, Norris DO. 1997) bitki anatomisinin katkısını, adli botaniğin bir parçası olarak tanımladı. Diatomlar, değişik ortamlarda, hatta kısa süreli geçici nemli koşullarda bile hızla çoğaldıkları için toprakta sıkça gözlenir. Toprakta organların parçalandığı vakalarda uzuvlara diatom testinin uygulanması önerilmektedir (Gruspier K.L., Pollanen M. S., 2000). Toz, değişik parçaların ve liflerin farklı biçimde kompleks karışımıdır, kriminal araştırmalar için zengin bilgi içerebilir. Mikroskopik analizler için beş ana toz örnekleme metodu tanımlanmıştır (Millette JR, Few P. 2001).

## II.2. Kısa Ardışık Tekrarlara Giriş (STR)

Genomik DNA tekrarlayan diziler kodlanmış ve kodlanmamış bölgeler içerir. Bu tekrarların sayısı bireylere göre değişir ve bu farklı uzunlukta alellerin oluşmasına neden olur. Polimorfizmin bu çeşidi uzunluk polimorfizmidir. Aynı lokusta pek çok tek nükleotid varyasyonu bulunabilir buna dizi polimorfizmi denir (Wyman ve White, 1980). DNA analizi ile kimliklendirme, Jeffreys'in (1979) insan genomunda çok değişken "minisatellit" olarak veya değişken sayıda dizin tekrarı (VNTR) bölgelerini tanımlamasıyla gerçekten pratik hale gelmiştir. Tekrarlayan kodlanmamış DNA dizinleri ailesine ait olan "Mikrosatellit" veya kısa dizin tekrarları (STR), tekrarlanan motifin kopya sayısındaki varyasyonlara neden olan bir başka polimorfik işaretleyici kaynağı sağlar. VNTR/STR bölgelerinin PCR'a dayalı tiplmesi adli analizde ve babalık testinde önemi artan teknik olmuştur (Evet ve ark., 1996).

STR bölgeleri DNA parmakizinden 5 yıl sonra bulunmuştur (Edwards A., 1991, Rand ve ark., 1992). Texas'taki Baylor Üniversitesi profesörü Thomas Caskey ve arkadaşları adli DNA analizindeki kısa dizin tekrarlarının kullanılmasını öneren ilk makaleyi yayınladılar (Caskey ve ark., 1992). Bu STR bölgeleri genomdaki hemen her kromozomda bulunur ve çeşitli polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak çoğaltılabilir. STR bölgeleri üç ile yedi nükleotid uzunluğunda temel birimden oluşur. Bu temel birimleri en fazla 80-450 baz çiftinin (bç) tamamının uzunluk sınırında tekrar edebilir. İnsan genomunda her 1000 bç uzunluktan sonra yüzlerce STR bölgesi yayılmıştır. Her bölgede STR bölgelerinin çok alleli olduğunu gösteren, genelde 5 ile 10 arası sınırlı miktarda olası alleler gözlenir. Herhangi bir insan her STR bölgesi homozigot ya da heterozigot olabilir. Popülasyondaki alellerin çeşitliliği çok sayıda STR bölgesi araştırılarak elde edilebilir (Kimpton ve ark., 1996). STR sistemlerinin istenilen özellikleri yüksek heterozigotluk, düzenli tekrarlayan birim, tanınabilir aleller ve PCR kullanımında güçlü amplifikasyonu içerir (Gill ve ark., 1995).

Gerçekte, insan genomu haritasında yüzlerce STR sistemi bulunur (The Utah Marker geliştirme grubu, 1995). Bu STR sistemlerinden birkaç düzinesinin insan kimliklendirmesi testine uygulanması araştırılmıştır (Hammond ve ark., 1994). Tetranükleotit tekrarlar, PCR amplifikasyonundaki aslına uygunluğa göre adli bilim adamları için en popüler olanlardır. Buna

rağmen bazı tri veya penta-nükleotit tekrarları da hala kullanılmaktadır (Fregeau ve Fourney, 1993, Hammond ve ark., 1994, Tagliabracci ve ark., 1998).

Değişik STR bölgeleri her lokusta bulunan tekrarların bir arada bulunmalarına dayanarak basit, bileşik veya kompleks olarak sınıflandırılabilir (Moller ve ark., 1994). Microsatellit DNA'nın kısa (2–6 baz çiftlik) motifli, pek çok kez tekrar eden bölgeleridir (mesela, ATATATATAT). Mikrosatellitlerin kullanımı adli bilimler, gen haritası ve evrim çalışmalarını içerir. Alellerin çok sayıda olmasından dolayı, bireyler birkaç bölgedeki alel durumlarına göre benzersiz şekilde tanımlanabilirler (Chakraborty ve Jin 1993). Aynı özellik aile bağlantılı çalışmalarda haplotiplerin çözümüne yardımcı olur (Dib ve ark., 1996). Bu makalede uygulamadaki en fazla ilgi evrim çalışmalarındadır. Filogenetik akrabalıklar ve/veya demografik olaylar popülasyon seviyesindeki tekrar uzunluk dağılımından kaynaklanıyor olabilir (Mountain ve Cavalli-Sforza 1997; Di Rienzo ve ark. 1998; Kimmel ve ark. 1998; Reich ve Goldstein 1998; Reich ve ark. 1999, Gornik ve ark. 2002). Yanlış sonucun riskiyle ilgili olarak savaş kurbanlarının kimliklendirilmesinde reverse babalık ile çalışmıştır. Örneğin üç olayda 10 STR bölgesinin eşleştiği ve bir olayda anne ve çocuk ve çocuğun babasına ait olmayan iskelet kalıntılarının 11 STR bölgesinin eşleştiği görülmüştür.

Kısa dizin tekrarları içeren amplifiye edilebilir sistemler, tekrar kayması işlemine yatkın olabilir (Levinson and Gutman., 1987), bu genelde orijinal allelden dört tekrar birimi daha küçük olan 'stutter bant veya gölge bandı'na neden olur. Genelde bu problemlere yol açan STR bölgeleri kullanılmaz. Buna rağmen bütün STR bölgelerinde bu olay replikasyon enziminin tekrarlayan kaymasına bağlı olarak az yada çok gözlenmiştir (Schlotterer ve Tautz., 1992). PCR işleminin bir diğer hatası gümüş boyamada görüldüğü gibi orijinal allel bandından bir baz altta hafif bant görülmesidir. Bunun nedeni amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin 3 terminine tek adenin nükleotit eklenmesi için Taq DNA polimerazın terminal transfer aktivitesini kaybetmesi olabilir (Clark, J.M., 1988).

### **II.3. DNA ve Toprak Analizi İçin Kullanılan Teknikler**

STR tiplmesi amplifikasyon ürünleri, AMP-FLP (Budowle, B. ve ark., 1991) veya VNTR (Nakamura, Y. ve ark., 1987) analizleri kullanılarak tayin edilen materyalden daha küçük,

500 bç den daha kısadır. Bu avantajları ile diğer tiplene metodlarına göre DNA örneklerini daha iyi şekilde değerlendirilmektedir. STR tiplene PCR ile uyumlu çeşitli hızlı DNA saflaştırma tekniğine uyum sağlayabilir, fakat Southern blot temelli analiz için uygun kalitede yeterince DNA sağlanamaz.

Promega STR ürünleri ile yapılan amplifikasyon ürünleri genelde farklı ve ayrılabilir uzunluklarda olurlar. Bu her lokustaki biraz veya bütün bilinen alellerin aynı uzunluğundaki parçaları içeren alelik merdivenler yapımına izin verir. Alelik merdiven ile çoğaltılmış örneklerin karşılaştırılması görsel ya da yazılıma dayalı olarak aynı bölgenin alellerin ayrılmasının hızlı ve doğru olmasına olanak verir. PowerPlex® 16 Sistem kullanılarak elde edilen sonuçlar dijital formatta saklanabilir, depolanan verilerle doğrudan kıyaslama olanağı sunar. Popülasyon analizi popülasyon verisinin tanımlanmış sabit kutu (Bin) kullanmasına gerek olmaz (Budowle, B. ve Monson, K.L. 1989).

PowerPlex® 16 Sistemdeki bölgelerin seçilme nedeni dünya genelindeki birkaç temel standardizasyonların gereklerini karşıladığındandır (Griffiths, R. ve ark., 1998). Mesela FBI, sanıkların profillerinin ABD ulusal veritabanı CODIS'te (Combined DNA Index Sistem) araştırmadan ve örneklerin girilmesinden önce tiplene için 13 STR temel bölge seçmiştir. PowerPlex®16 Sistem bütün CODIS temel bölgelerini tek reaksiyonda amplifiye eder. Bu kit iki düşük-stutter, yüksek polimorfik pentanükleotit tekrar bölgeleri Penta E ve Penta D içerir. Bu eklenen bölgeler sistemin ayırıcı gücünü anlamlı bir şekilde artırır. PowerPlex® 16 Sistem tek amplifikasyon sistemi yaparak babalık şüphesine çözüm getirmede yeterli dışlama gücünü sağlar. Bunun yanında stutter artefaktın aşırı düşük seviyede Penta E ve Penta D ile görülmesi bunu genelde adli tıp vakalarında karşılaşılan DNA karışımlarını değerlendirmek için ideal bölge yapar. PowerPlex® 16 Sisteminde bulunan Amelogenin bölgesi her örneğin cinsiyetinin tayinin sağlar. Aşağıdaki Tablo 1'de PowerPlex® 16 sistemi bölge bilgisinde işaretler, kromozomal bölgeleri, GenBank lokusu ve STR'dan alınan lokus tanımlaması 5' den 3' sonlanma bölgelerindeki tekrar dizilerinde ve alelik işaretleyici bileşenlerin tekrar numaraları listelenmiştir.

**Tablo 1:** PowerPlex® 16 Sistem Alelik Ladder Bilgisi ve Lokus Bilgisi

STR Lokus	İşaret	Kromozomal bölge	GenBank® Lokusu ve Lokus Tanımlaması	Tekrar Dizisi 5'-----3'	Alel Belirleyici Bileşenin Tekrar Sayısı
Penta E	FL	15q	NA	AAAGA	5-24
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (23)	8-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA	24, 24.2, 25, 25.2, 26, 28,28.2,29,29.2,30, 30.2,31,31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, insan tirozin hidroksilaz geni	AATG (23)	4-9, 9.3, 10-11, 13.3
D3S1358	FL	3p	NA	TCTA	12-20
FGA	TMR	4q28	HUMFIBRA, insan fibrinojen alfa zincir geni	TTTC	16-18, 18.2, 19, 19.2,20,20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23,23.2,24, 24.2, 25, 25.2, 26-30, 31.2, 43.2,44.2, 45.2, 46.2
TPOX	TMR	2p24-2pter	HUMTPOX, insan tiroid peroksidaz geni	AATG	6-13
D8S1179	TMR	8q	NA	TCTA	7-18
vWA	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31, insan von Willebrand faktör geni	TCTA	10-22
Amelogenin	TMR	Xp22.1-22.3 and Y	HUMAMEL insan Y chro.	NA	X, Y
Penta D	JOE	21q	NA	AAAGA	2.2, 3.2, 5, 7-17
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO,	AGAT	6-15
D16S539	JOE	16q24-qter	NA	GATA	5, 8-15
D7S820	JOE	7q11.21-22	NA	GATA	6-14
D13S317	JOE	13q22-q31	NA	TATC	7-15
D5S818	JOE	5q23.3-32	NA	AGAT	7-16

STR bölgeleri dikkatlice seçilir. Primerler, tekrar kayması ve terminal nükleotit katılması gibi Taq DNA polimeraz ile bağlantılı olanları içeren artefaktı azaltmak veya önlemek için tasarlanmışlardır. Tekrar kayması (Levinson G. ve Gutman G.A. 1987), bazen “n-4 bandı”, “stutter” veya “gölge bandı” olarak adlandırılır. DNA amplifikasyonunda tekrar biriminin kaybolması, DNA’daki somatik varyasyon veya her ikisine de bağlıdır. Bu gözlenen artefakt miktarı genelde bölgeye ve amplifiye edilen DNA dizinine bağlıdır (Schlotterer C. ve Tautz D. 1992).

Terminal nükleotit eklenmesi (Smith J.R. ve ark., 1995) Taq DNA polimeraza nükleotit eklediği zaman oluşur, genelde adenin, kalıptan bağımsız şekilde amplifiye edilmiş DNA parçalarının 3’ ucuna eklenir. Burada oluşan yeterlilik farklı primer bölgelerine göre değişir (Magnuson V.L. ve ark., 1996). Bu yüzden bazen beklenenden bir baz daha kısa artefakt bandı (örneğin, terminal eklemenin kaybolması) görülebilir. Çalışmamızda primer bölgeleri modifiye ettik ve amplifikasyon protokollerinde önerilen kalıp DNA miktarı kullanıldığında gerekli terminal nükleotit eklenmesi için koşullarını sağlamaya yönelik 30 dakika için 60°C’de son uzama basamağı ekledik (Walsh P.S., Fildes N.J.ve Reynolds R. 1996).

Mikrovaryant alellerin bulunması durumunda (tekrar uzunluğundan farklı uzunlukta birinden diğerine değişen aleller) alellerin tanımlanması ve çalışılması daha karmaşık olur. Burada yüksek derecede polimorfizm, mikrovaryant eğilimi ve artan mutasyon oranı arasında korelasyon görülür (Moller A. ve ark., 1994 ve Brinkmann B. ve ark., 1997). FGA ve D21S11 genelde birçok ortak mikrovaryantlar görülür. Henüz bilinmeyen sebeplerden dolayı, yüksek polimorfik Penta E bölgesi çok fazla mikrovaryant göstermez.

### **II.3.1. Ayırma Gücü**

PowerPlex® 16 Sistemi ile amplifiye edilmiş onbeş STR bölgesi çok güçlü ayırıcılık sağlar. Tablo 2-5’te bu bölgelerin popülasyon istatistikleri ve onların çeşitli multipleks kombinasyonları gösterilmiştir. Bu veriler (Levadokou E.N. ve ark., 2001) The Bode Technology Group (Springfield VA), North Carolina Bureau of Investigation (Raleigh NC), Palm Beach County Sheriff’s Office (West Palm Beach, FL), Virginia Division of Forensic Science

(Richmond VA) ve Charlotte/Mecklenburg Police Department Laboratory (NC) nin ortak çalışmaları sonucu oluşturulmuştur. Veriler 200'den fazla Afrikan-Amerikan, Kafkas-Amerikan ve İspanyol-Amerikan popülasyonundan bireylerin analizlerini içerir. Asya- Amerikanların verisi 150'den fazla birey içerir (Lins A.M. ve ark., 1998, Puers C. ve ark., 1993, Hammond, H ve ark., 1994, Bever R.A. ve Creacy S. 1995, Sprecher C.J. ve ark.,1996 ve Lins A.M. ve ark., 1996).

Tablo 2 değişik popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemleri için uyuşma olasılığını gösterir. PowerPlex® 16 Sistem için uyuşma olasılığı Kafkas-Amerikanlar için 1 ile  $1.83 \times 10^{17}$ , Afrikalı-Amerikalılar için 1 ile  $1.41 \times 10^{18}$  arasındadır. (Jones, D.A. 1972)

**Tablo 2:** Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemleri için Uyuşma Olasılığı

STR Sistemi	Afro-Amerikan	Kafkas-Amerikan	İspanyol-Amerikan	Asya-Amerikan
PowerPlex® 1.2 Sistem (8 STR)	1 in $2.77 \times 10^8$	1 in $1.15 \times 10^8$	1 in $1.45 \times 10^8$	1 in $1.32 \times 10^8$
PowerPlex® 16 Sistem (15 STR)	1 in $1.41 \times 10^{18}$	1 in $1.83 \times 10^{17}$	1 in $2.93 \times 10^{17}$	1 in $3.74 \times 10^{17}$

Babalık testinde genelde kullanılan ayırıcılık ölçütü **Paternity Index (PI)** , annenin, çocuk ve şüpheli babanın genotiplerinden genetik ayrımlarını gösterme biçimidir (Brenner C. ve Morris J.W. 1990). PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemleri için tipik babalık testi içeriği aşağıdaki Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemlerinin Tipik Babalık Testi İçeriği

STR Sistemi	AfroAmerikan	Kafkas-Amerikan	İspanyol-Amerikan	Asya-Amerikan
PowerPlex® 1.2 Sistem	497	262	318	471
PowerPlex® 16 Sistem	2,510,000	1,520,000	522,000	4,110,000

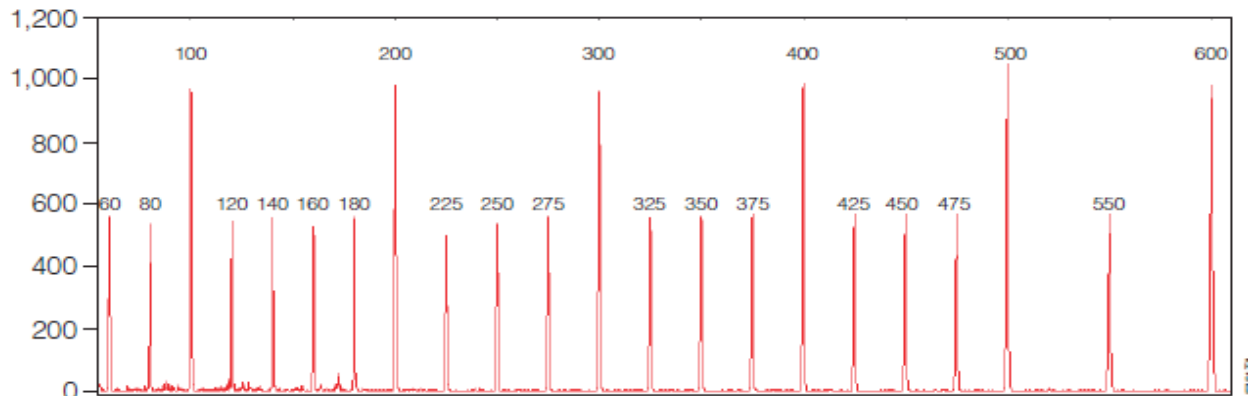


PowerPlex® 16 sistemi her popülasyon grubunda 500 000'den fazla tipik babalık testi indeksi sağlar. Babalık analizinde kullanılan alternatif hesaplama dışlama gücüdür (Brenner, C. ve Morris, J.W. 1990). PowerPlex® 16 Sistemi için hesaplanan bu değer, test edilen bütün popülasyonlarda 0.999998 in üzerindedir (Tablo 4 aşağıdadır).

**Tablo 4:** Farklı Popülasyonlardaki PowerPlex® 1.2 ve 16 Sistemlerinin Dışlama Gücü

STR Sistemi	AfroAmerikan	Kafkas-Amerikan	İspanyol-Amerikan	Asya-Amerikan
PowerPlex® 1.2 Sistem	0.9982042	0.9968863	0.9973367	0.9981793
PowerPlex® 16 Sistem	0.9999996	0.9999994	0.9999983	0.9999998

İnternal Uzunluk Standardı (ILS) 600, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 ve 600 baz uzunluğunda 22 DNA fragment içerir (Şekil 1). Her kısım carboxyX-rhodamine (CXR) ile işaretlenmiş ve PowerPlex® 16-amplifiye edilmiş materyalin varlığında ayrı ayrı tayin edilebilir (dördüncü renk gibi). PowerPlex® 16 Sistemi kullanılarak yapılan analizin doğruluğunu arttırmak için ILS 600 her jelde veya KE enjeksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanmıştır.



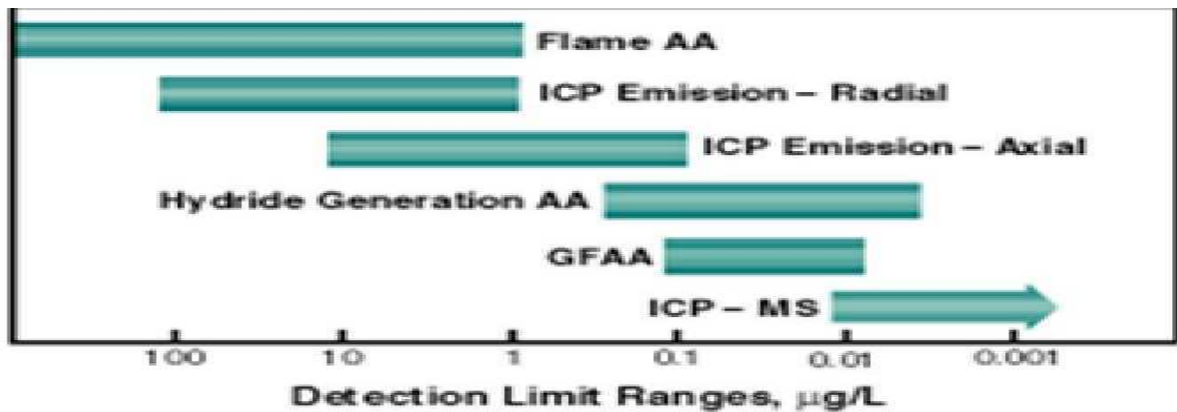
**Şekil 1.** İnternal Uzunluk Standardın (ILS) fragmentleri vebaz uzunlukları

Omelyanyuk ve arkadaşları, mikroflora araştırmasının geleneksel metodu saf kültürün ayrışması gerektiğinden daha komplike olduğundan adli toprak karşılaştırması için multisubstrat test metodunu önermiştir (MT ) (Omelyanyuk ve ark., 1999). MT, tetrazolium tuzunun renginin değişimi gözlenirken farklı kaynaklardan gelen organik karbonun asimilasyon şiddetini

kullanarak kompleks doğal mikrobiyal kolonilerin tamamen fonksiyonel karakterizasyonuna dayalıdır. Bu metotta 11 karbon kaynağı kullanıldı: asetat, sodyum, sorbitol, şeker, laktoz, arabinoz, lizin, serin, valin, sistein, timidin ve tween. Toprak örnekleri suda 30 saniye sonik muameleden sonra ekstrakte edildi. Su süspansiyonları, substrat seti (11 tip) ve mikroorganizmaların büyümesinin belirteci olarak tetrazolium moru mikrotiter kaba konuldu. İnkübasyon 27 °Cde 72 saat sürdü. Renk değişimi gözlemlendi ve MT sistemine eklenen mikroplaka tarayıcısı kullanarak kaydedildi. Bu metod gerçek olay çalışmalarında etkili şekilde uygulanmaktadır.

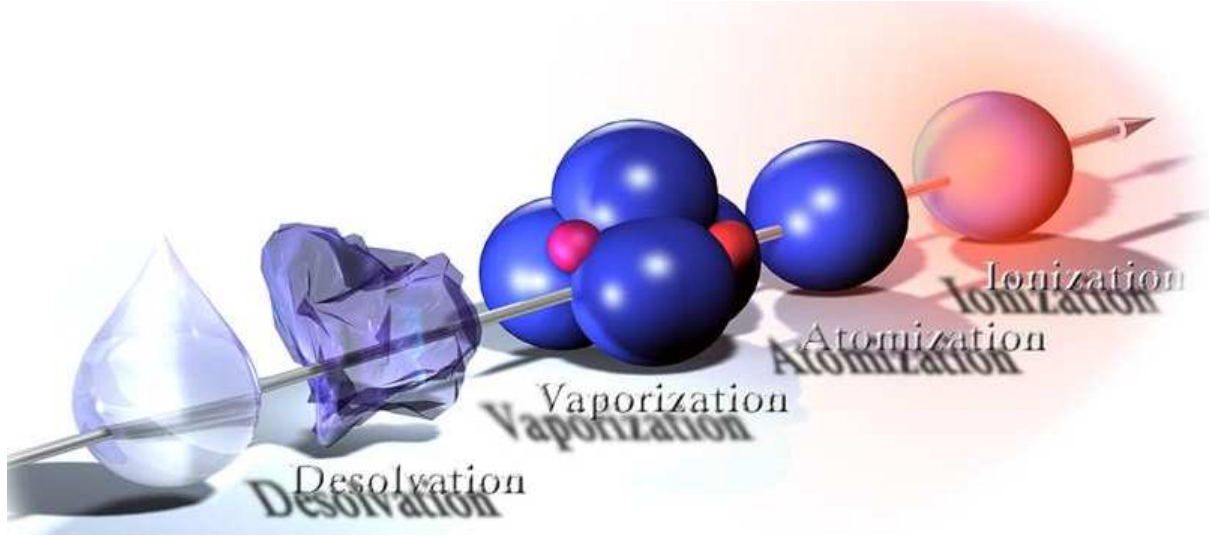
Horrocks ve meslektaşları (1998) adli polen analizini adli amaçlı kullandılar. Aynı bölgesel alandan alınan örnekler büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Diğer yandan, aynı coğrafik bölgede olsa bile, aynı bitki örtüsüne sahip farklı yerlerdeki polen benzerliği bariz farklılıklar gösterir (Horrocks ve ark., 1999).

Örneklerin ayırt edilmesi için havada kurutulmuş toprağın renk kıyaslaması tek başına yetersizdir. Sugita ve Marumo ayırma gücünü arttırmak için (Marumo, Y.ve Sugita, R., 1996) toprak örneklerinde pek çok renk gözlemi çalışması yaptılar. Righi ve Elsass (Righi D.1996) kompleks kil karışımlarının tayini için bozunma eğrisi programı olarak adlandırılan XRD diyagramlarının matematiksel muamelesinin yararlarını bildirdiler. Cengiz ve Sakul (Cengiz S, Sakul, O. 2001) adli toprak ayırt edilmesi için anyon analizinin uygulanmasını bildirdiler. Kapiler elektroforez ile toprağın klorit, nitrat, sülfat ve fosfat içeriği karşılaştırılır. Inductively coupled plasma coupled to mass spectrometry (ICP-MS) toprağın elementel bileşiminin analizini yapılabilmektedir.



Şekil 2. ICP-MS limit aralığı

Argon gazıyla oluşturulan plazma radyo frekansı alanında akarken kısmi iyonizasyon durumunda tutulur gaz kısmi elektriksel yüklü parçacıklar içerir. Bu yaklaşık 10,000°C ye kadar yüksek sıcaklıklara ulaşılmasına olanak sağlar. Analiz edilen örnek plazmaya düzgün aerosol damlaları halinde gelir. ICP-MS, ICP ile kütle spektrometresinin (MS) bileşiminden oluşur. ICP-MS tarafından oluşturulan iyonlar, iyonları kütle/yük oranına göre ayıran yere, MS kütle spektrometresine yönlendirilir. Böylece seçilmiş kütle/yük oranlı iyonlar tayin edilip ölçülebilir.



**Şekil 3.** ICP-MS çalışma prensibi

PCR gibi moleküler yöntemler, PCR için ekstrakte edilen DNA'nın uygunluğuna bağlı olduğu için sınırlıdır (Wilson I.G, 1997). Toprak, gübre veya organik gübreden ekstrakte edilen DNA, özellikle PCR amplifikasyonu sırasında soruna yol açan humik ve fulvik asitler gibi kontaminantları da içerebilir (Al-Soud, ve ark., 1998, Fortin, N. ve ark., 2004). Humik ve fulvik asitlerin yanında toprakta bulunan diğer bileşenler de PCR çalışmalarının uygulanmasını zorlaştırır (Watson R. J. ve ark., 2000). Ayrıca farklı substratların arasındaki biyokimyasal bileşenlerin çeşitliliği (Al-Soud ve ark., 1998, Wilson I.G, 1997) DNA ekstraksiyon metodlarında verimliliği değiştirir (Lloyd-Jones G. ve ark., 2003, Theron.J. ve ark., 2000). Bu yetersizliklere bağlı olarak farklı çevresel substratlarda bulunan patojenlerin doğru kantifikasyonu PCR gibi moleküler teknikler kullanılarak henüz başarıyla yapılamamıştır. Zhou ve ark. 1996, farklı topraklardan DNA kazanımını araştırmış, fakat sadece bir DNA ekstraksiyon metodu kullanmıştır.

Çalışmamız toprak delilinin önemini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Toprağın organik yapısının karşılaştırılması, toprağın DNA tutma kabiliyetini, zamanla toprağın DNA miktarına etkisini, saflığı ve bozunmayı göstermektedir. Bu çalışmanın asıl ilgi alanı, PCR sonuçları ve elde edilen genotiplerin analizinin değerlendirilmesidir. Diğer taraftan inorganik analizler ve ICP-MS ile karşılaştırmalar, farklı orijinlerdeki toprağın inorganik gradyanlarını ve zamanla organik moleküllere etkisini gösterir. Türkiye ve Pakistan'dan alınan toprakların karşılaştırmaları, farklı orijinlerden gelen toprakların farklı gradyanı olduğunu, DNA tutmadaki davranışları ve belirli bir süre sonra toprağın miktardaki azalmayı nasıl etkilediğini göstermiştir. SPSS kullanılarak yapılan istatistik analizleri bu çalışma için alınan standart sapma, ortalama, varyans, kovaryans, ve korelasyon faktörünü göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, olay yerinde bulunan az miktardaki kirli toprağın değerini araştırmacıların anlamasına yardım edecektir. Öte yandan sonuçlar, farklı orijinlerden gelen toprak bileşenlerini ve DNA'nın nicelik ve niteliğine etkilerini karşılaştırmada yardımcı olabilecektir.

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmanın laboratuvar aşaması dokuz bölümden oluşmaktadır.

- Toprağa Kan Dökülmesi
- Kestle Mayer Test:
- Toprağa Dökülmüş Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu
- İzole edilen DNA Miktarının Belirlenmesi
- DNA'nın PowerPlex® 16 Sistemi kullanılarak PCR'da çoğaltılması
- Çoğaltılan Parçaların ABI PRISM® 310 Genetik Analizör ile Belirlenmesi
- ICP-MS ile İnorganik Katı Madde Analizi
- Micro Dalga Parçalaması İçin Örnek Hazırlama
- İstatistiki Hesaplamalar

#### III.1. Toprağa Kan Dökülmesi

Çalışmamızda olay yerinde bulunma ihtimali olan topraklar seçildi. Çalışmada kullanılan kan örneği dört farklı toprağa döküldü. Bu toprakların alındığı yerler; bahçe, inşaat alanı, mezarlık ve nehir kenarı olarak belirlendi. Topraklar Pakistan ve Türkiye'den seçildi. Toprak koşulları (renk, pH gibi) çalışmaya başlamadan önce kaydedildi. Çevresel koşullar ve hava durumundaki değişimler sistematik olarak kaydedildi.

Bir gönüllüden alınan kan örneği (250 ml) düzenli olarak aynı günlerde dört ayrı toprağa döküldü. Negatif kontrol örneği ilk kan örneği dökülmeden önce alındı. Herbir toprak alanının 3 farklı bölgesi seçildi ve her bölge uygun şekilde işaretlendi. Herbir bölgeye 20 ml kan (her toprağa 60 ml) rastgele döküldü. Örnek toplama günleri 1, 5, 10, 20, 30 ve 60. gün olarak planlandı. Örnekler belirlenen tarihlerde 15ml falkon tüplere gün, örnek adı, örneğin yeri yazılarak toplandı. Örnekler +4 °C'de saklandı.

#### III.2. Kestle Mayer Test

Kestle Mayer test (Kestle J. St., 1909) kan varlığının belirlenmesinde kullanılır. Test aşağıdaki kimyasal eşitlikten yola çıkılarak uygulanır.



Kestle Mayer testi aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Her örnekten küçük bir miktar alınıp filtre kağıdına kondu.
2. Örneklerin üzerine iki üç damla etanol damlatıldı.
3. Fenolfitalein çözeltisinden iki damla damlatıldı.
4. Bu aşamada renk oluşumu beklenmez ve 2- 3 damla 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi.
5. Koyu pembe rengin oluşumu peroksidaz aktivitesi hemoglobinin varlığını göstermektedir.
6. Test Pakistan ve Türkiye’den toplanmış her toprak örneği için uygulandı.
7. Testin kontrolü için negatif kontrollerde yapıldı.

### III.3. Toprağa Dökülmüş Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyon yöntemleri kan dökülmüş toprak örnekleri için optimize ve valide edildi. DNA izolasyonu; modifiye fenol kloroform izoamil alkol (Singer ve ark., 1988), Sodyum-sitrat sodyum-klorat (SSC izolasyon yöntemi) ([www.genome.ou.edu/protocolbook/protocol\\_partIII.html#\\_III.H](http://www.genome.ou.edu/protocolbook/protocol_partIII.html#_III.H)), Proteinaz K ve inkübasyon eklenerek modifiye edilmiş Sodyum Klorür (Yeates ve ark., 1997) ve Chelex (Walsh PS., 1991) yöntemleri ile yapıldı. Bu dört izolasyon yönteminin saflık ve DNA miktarının karşılaştırılması sonucunda SSC yöntemi tüm örneklerde uygulanacak yöntem olarak seçildi. Uygulanan izolasyon yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

#### III.3.1. Fenol Kloroform İzoamil yöntemi

1. 2 gr toprak örneği tartılarak 2ml eperdorf tüpüne kondu. Örneğin üzerine 1 ml 1 X SSC eklenerek 37°C’de 5 dakika bekletildi.
2. Tüpler 1 dakika vortekslendi ve kan lekeleri ile 1 X SSC karışması sağlandı. Kırmızımsı renkli kısım başka bir ependorf tüpe aktarıldı ve renk kaybolana kadar işlem tekrarlandı.
3. Örnekler 14000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Supernatant kısmı döküldü. Tüpün dibinde küçük bir pellet kaldı.
4. Pellet aşağıdaki kimyasallarla karıştırıldı
 

1.	Pellet	=	25-50µl
2.	0.2 M sodyum asetat (pH =5.2)	=	350µl

3. 10% SDS = 50µl

4. Proteinaz-K (2U/µl; 40 mg/ml) = 10µl

5. Karışım 56°C'de 2 saat veya tüm gece inkübe edildi. 2 saat veya tüm gece inkübasyondan sonra örnekler fenol eklendi.

Örnek hacmi = 400-450µl

Fenol tamponu (pH =8) = 120µl

6. Karışım 30 saniye karıştırıldı ve 14000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.

7. Süpernatant dikkatlice alınıp başka tüplere aktarıldı.

8. Süpernatana fenol-kloroform-izoamil alkol eklendi.

Örneğin sıvı fazı = 400-450µl

Fenol-kloroform-izoamil alkol = 120µl

9. Karışım 30 saniye karıştırıldı ve 14000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.

10. Süpernatant dikkatlice alınıp başka tüplere aktarıldı.

11. Süpernatana %95'lik soğutulmuş etanol eklendi.

Süpernatant = 400µl

Soğutulmuş 95% Etanol = 1000µl

12. Karışım 10 dakika karıştırıldı ve 14000 rpm de 10 dakika santrifüjlendi.

13. Süpernatant pelete zarar vermeden dikkatlice atıldı.

14. Pellete %70 etanol eklendi ve 14000 rpm de 1 dakika santrifüjlendi.

15. Süpernatant pelete zarar vermeden dikkatlice atıldı.

16. Birkaç dakika tüplerin ağzı açık olarak dışarıda bekletildi.

17. Kurumuş pelete 120 µl TE buffer (pH -8.0) eklendi ve 56°C'de 30dakika inkübe edildi.

18. Örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'de, uzun süreli saklama için -20°C'de muhafaza edildi.

### III.3.2. Sodyum Sitrat Sodyum Klorür yöntemi

1. 2 gr toprak örneği tartılarak 2ml eperdorf tüpe koyuldu. Örneğin üzerine 750 µl 1XSSC eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Örnek 56°C’de 45 dakika inkübe edildi.
2. Süpernatant döküldü ve örneğe tekrar 1XSSC eklendi, vortekslendi ve inkübe edildi. Temiz bir faz elde edilene kadar bu işlem tekrar edildi.
3. Örnekler 14000 rpm de 8 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü. Tüpün dibinde küçük bir pellet kaldı.
4. Pellete, solüsyonun inaktivasyonu ve örneklerden proteinlerin uzaklaştırılması için 0.2 M sodium asetat (pH =5.2), 10% SDS, Proteinaz-K (2U/µl; 40 mg/ml) eklendi.
5. Karışım 56°C’de 2 saat veya tüm gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örneğin toplam hacmine ( 400-450µl ), 120µl Fenol: kloroform: izo-amil-alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnek 14000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
6. Üst faz dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı ve 1000µl %95’lik soğutulmuş etanol eklendi. Karışım 10 dakika karıştırıldı ve 14000 rpm de 10 dakika santrifüjlendi
7. Pellete 500µl %70 etanol çözeltisi eklendi ve 14000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.
8. Kurumuş pellete 120 µl TE buffer (pH -8.0) eklendi.
9. 56°C’de 30dakika inkübe edildi. Örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C’de, uzun süreli kullanım için -20°C’ de saklandı.

### III.3.3. % 0.9 Sodyum Klorür Yöntemi

1. Toprak örnekleri 2 mililitrelik eperdorf tüpe kondu. Örneğin üzerine %0.9 Sodyum klorür çözeltisi eklendi ve vortekslendi. Topraktaki kanın çözelti ile süpernatant karışması için örnekler 60°C’de 2 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresi boyunca örnekler 2-3 defa karıştırıldı.
3. Örnekler 14000 rpm’de 4 dakika santrifüjlendi. Üst fazlar atıldı. Pellet üzerine 1ml %70lik etanol eklendi, vortekslendi.14000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Üst faz atıldı ve birkaç dakika tüplerin kapakları açık olarak bekletildi. Tüplere 120 µl AE tamponu eklendi.



5. İnkübasyon yapıldı ve örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'de, uzun süreli kullanım için -20°C' de saklandı.
6. Bu işlemde bazı modifikasyonlar da yapıldı. 3. aşamadan sonra örneğe Proteinaz K, 0,6 M Sodyum asetat ve % 20 lik SDS çözeltileri eklendi. Bir gece inkübasyonda bırakıldı. Normal işleme bu aşamadan sonra devam edildi.

### III.3.4. Chelex Yöntemi

1. 100mg- 2gr toprak örneği ependorf tüpe alındı ve 1 ml steril distile su eklendi. 45 dakika oda ısısında inkübe edildi.
2. Örnekler 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Tekrar 1 ml distile su eklendi ve 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
4. Supernatan kısmı dikkatlice döküldü. Tüpün dibinde küçük bir pellet kaldı.
5. Pellete 100 µl distile su eklendi ve 1 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Son hacmi 300 µl olacak şekilde % 5 Chelex<sup>R</sup> 100 çözeltilisi eklendi. Bir saat 56°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra 5-10 saniye yüksek hızda vortekslendi. 8 dakika 100°C'de kaynatıldı.
8. Örnekler 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Daha sonra örnekler +4 °C'de saklandı.

## III. 4. İzole edilen DNA Miktarının Belirlenmesi

T.E. tamponu içinde bulunan izole edilmiş DNA miktarının belirlenmesi için aşağıdaki yöntemler kullanıldı.1- Spektrofotometre 2- Agaroz Jel Elektroforezi

### III.4.1. Spektrofotometre

DNA' nın miktarı, spektrofotometrede 260nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmektedir. Bir optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml' ye karşılık gelmektedir. DNA'nın saflığı A260/A280 oranı ile belirlenir. A260/A280 oranı 1.5 ve 1.8 arasında olan örneklerde yüksek kalitede DNA bulunur. (Wilfinger W., 1997; Glasel 1997; Manchester 1995).

1. DNA stok çözeltisi, su ile 1:100 oranda sulandırıldı.
2. Çalışmada “Perkin Elmer çift ışıklı spektrofotometre kullanıldı.
3. İlk önce referans olarak kullanılacak 500µl steril distile su kuartz tüpe kondu.
4. Spektrofotometre ilk okuma yapılmadan önce sıfırlandı.
5. 1 ml DNA örneği iyice karıştırıldı ve kuartz tüpe kondu.
6. DNA 260nm-280nm boylarında UV radyasyonunda tarandı.
7. Her örneğin 260nm-280nm değeri kaydedildi ve A260/A280 oranları hesaplandı.
8. Çözelti içindeki DNA miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı:

DNA miktarı(µg/ml)=260 nm'deki OD (Absorbans değeri)X sulandırma oranı (DF)X50

Sulandırma oranı(DF) aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$D.F = \frac{\text{Dilüsyonun toplam hacmi}}{\text{Dilüsyondaki stok DNA hacmi}}$$

Dilüsyondaki stok DNA hacmi

9. UV spektrofotometre ile hesaplanan DNA miktarları ile, 100µl TE içinde 5ng/µl dilüsyon hazırlandı.

10. Dilüsyon aşağıdaki gibi hazırlandı.  $C_2 \times V_2$

$$V_1 = \frac{\quad}{\quad}$$

$C_1$

$C_1$ = Stok çözeltideki DNA miktarı.

$V_1$ = Stok çözeltideki hacmi.

$C_2$ = Hazırlanacak dilüsyon içindeki DNA miktarı (5ng/µl).

$V_2$ = Hazırlanacak dilüsyonun hacmi (100ml).

11. Tüm dilüsyonlar 4°C’de saklandı.

### III.4.2 Agaroz Jel Elektroforezi

1. 0,8 gr agaroz 250 mililitrelik erlende tartıldı ve üzerine 100 ml 1XTBE tamponu eklenerek % 0,8 lik agaroz hazırlandı.

2. Hazırlanan karışım agarozun tamponda tam olarak çözülüp, homojen karışması için kaynatıldı. Sonra oda ısında soğutuldu.
3. Jelin ısısı yaklaşık 55°C'ye geldiğinde, 10µl 5mg/ml etidyum bromür jele eklendi ve karıştırıldı.
4. Jel yürütme iki taraflı tepsiye döküldü (Hoefer scientific Inc.) ve katılaşmaya bırakıldı.
5. Jel katılaştıktan sonra, içinde 1XTBE tamponu olan tanka yerleştirildi. Yürütülecek örnek aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Stok DNA	= 2µl
10X yükleme tamponu	= 2µl
Distile su	= 6µl
-----	
Son hacim	= 10µl

6. Örnekler jele dikkatlice yüklendi.
7. Jel 60V/cm ve 47 mA'da yaklaşık 1 saat yürütüldü.
8. Jel elektroforezinden sonra, Ultraviyole Translüminatör jel DNA görüntüleme sisteminde her bir örnekteki yaklaşık DNA miktarı belirlendi.
9. Tüm örnekler son hacimleri 5 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

### **III.5. DNA nın PowerPlex® 16 Sistemi kullanılarak PCR'da Çoğaltılması**

#### **III.5.1 PowerPlex 16 Sistemi İçin Gerekli Malzemeler**

- GeneAmp® PCR 9700 Sistemi (Applied BioSystems)
- Mikrosantrifüj
- 0.2ml MicroAmp® reaksiyon tüpleri (Applied BioSystems)
- 1.5ml amber-colored mikrosantrifüj tüpleri (Fisher Cat. # 05-402-26)
- Filtreli pipet uçları
- AmpliTaq Gold® DNA polymerase (Applied BioSystems)
- Nükleazsız su (Cat. # P1193)

0.5–1ng kalıp DNA, 25µl reaksiyon hacmi olacak şekilde aşağıda detayları yazılı olan protokole göre çoğaltıldı. Bu kit ile küçük lokuslar dahi çoğaltmak mümkündür. İstenilen pik yükseklerinin görülmesi için tavsiye edilen kalıp miktarları kullanılmalıdır. PowerPlex® 16 Sistemi, GeneAmp® PCR 9700 termal döngü cihazı için optimize edilmiştir.

### III.5.2 Çoğaltma İşlemi

1. Gold STAR 10X Buffer ve PowerPlex® 16 10X Primer karışımı oda ısısına getirildi. Karışımlar her kullanımdan önce 15 saniye vortekslendi. Primer konsantrasyonu PCR tüpünün dibinde birikmesini önlemek için 10X Primer karışımı santrifüj yapılmadı.
2. Her PCR'da örneklerle beraber pozitif ve negatif kontroller de çoğaltıldı. Pipetleme hatalarından kaçınmak için reaksiyon karışımları ortak hazırlandı. Böylece her bir örnek için eşit miktarda karışım yapıldı.
3. Steril 0.2ml veya 0.5ml PCR tüpleri hazırlandı ve üzerlerine örnek kodları yazıldı.
4. PCR için gerekli olan bileşenler ve reaksiyon başına kullanılması gereken hacimler aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

**Tablo 5:** PowerPlex® 16 Sistemi için PCR Master Mix

PCR Master Mix bileşenleri	Reaksiyon hacmi
Nükleazsız su	25.0 mikrolitrelik son hacim
Gold STAR 10X tamponu	2.5µl
PowerPlex® 16 10X Primer Karışımı	2.5µl
AmpliTaq Gold® DNA polimeraz	0.8µl (4u)
kalıp DNA (0.5–1ng)	19.2µl ye kadar
<b>toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>25µl</b>

5. Hazırlanan PCR karışımı her bir tüpe aktarıldı.
6. Kalıp DNA (0.5-1 ng) PCR karışımının içine katıldı.
7. Pozitif kontrol için 9947A DNA kullanıldı ve 0.5ng olacak şekilde sulandırılıp PCR tüpüne koyuldu.
8. Negatif kontrol için kalıp DNA ile aynı miktarda nükleaz-free su PCR tüpüne eklendi.
9. GeneAmp® PCR Sistem 9700 termal döngü cihazı ve MicroAmp® PCR tüpleri kullanıldığında mineral yağı eklemeye gerek yoktur.

### III.5.3 Termal Döngünün Çoğaltılması

- GeneAmp® PCR Sistem 9700 termal döngü cihazına PCR tüpleri yerleştirildi.
- Uygun program seçildi. GeneAmp® PCR Sistem 9700 termal döngü cihazı için uygun program aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.
- PCR sonrasında örnekler -20°C’de ışık geçirmeyen kutularda saklandı.

**Tablo 6:** GeneAmp® PCR Sistem 9700 Thermal Cyler için protokol

İşlem sayısı	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95°C	11dak.	1
2	96°C	1dak.	1
3	Ramp 100% 94°C Ramp 29% 60°C Ramp 23% 70°C	30saniye. 30 saniye. 45 saniye.	10
4	Ramp 100% 90°C Ramp 29% 60°C Ramp 23% 70°C	30 saniye. 30 saniye. 45 saniye.	22
5	60°C	30 saniye.	1
6	4°C	Sonsuz .	

## III.6. Çoğaltılan DNA Örneklerinin ABI PRISM® 310 Genetik Analizör ile Tiplendirilmesi

### III.6.1 ABI Prism 310 Genetik Analizör için gerekli materyaller

- 95°C kuru ısıtıcı blok, su banyosu veya termal döngü cihazı
- 310 kapiller, 47cm × 50µm
- Performans optimize polymer 4 (POP-4™)
- 10X genetic analizör tamponu (EDTA'lı)
- Örnek tüpü ve septa
- Pipet ucu
- Hi-Di™ formamide (Applied BioSystems Cat. # 4311320)
- PowerPlex® Matriks Standartları, 310 (Cat. # DG4640)
- Buz kabı

### III.6.2. Örnek Hazırlama

Her yürütme için Internal Lane Standartı 600 (ILS 600) ve Hi-Di™ formamide aşağıdaki şekilde hazırlandı.

$$[(1.0\mu\text{l ILS 600}) \times (\# \text{injeksiyon})] + [(24.0\mu\text{l Hi-Di}^{\text{TM}} \text{formamide}) \times (\# \text{injeksiyon})]$$

- Çözelti 10-15 saniye vortekslendi.
- Hazırlanan 25.0 µl karışıma 1.0µl PCR ürünü eklendi.
- Hazırlanan 25.0 µl karışıma 1.0µl PowerPlex® 16 Alelik Ladder karışımı eklendi.
- Hava kabarcıklarını yoketmek için kısa bir santrifüj yapıldı.
- Karışım 95°de 5 dakika ve buzda 5 dakika bekletilerek yürütme öncesi denatüre edildi.
- Örnekler örnek tepsisine yerleştirildi.

- Örnek tepsisi yerine yollandı ve yürütme için cihazın kapakları kapatıldı.

### III.6.3. ABI PRISM® 310 Genetic Analizörün Yürütme İçin Hazırlanması

ABI PRISM® Data Collection Software 3.0 (*Applied BioSystems*) kullanılarak örnek listeleri hazırlandı ve GeneScan GSPOP-4 (1ml) A modül parametresi ayarlandı. Analizde aşağıdaki tabloda görülen GS POP-4 (1ml) A modül parametreleri seçildi.

**Tablo 7:** ABI PRISM® 310 Genetik Analizör için parametreler

Parametre	GS POP-4 (1ml) A
Matrix	PowerPlex Matrix 22010
Enjeksiyon süresi	3 san.
Electroforez ve İşlem voltajı	15 kV
İşlem süresi	30 dak.
İşlem sıcaklığı	60°C
Şırınga pompalama süresi	150 san.

### III.6.4. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi

Verilerin analizi GeneScan Analysis software 3.1.2 (*Applied BioSistems*) kullanılarak yapıldı.

### III.7. ICP-MS ile inorganik katı madde analizi

#### III.7.1. ICP-MS ile analizde kullanılan standartlar

Bu çalışmada 3 sertifikalı katı referans maddesi (CRM) kullanılmıştır.

1) Organikçe zengin katı madde için avrupa referans komite bürosu kurulu CRM#700 (Ayrıştırılabilir içeriği Cd, Cu, Cr, Ni, Pb ve Zn'dan oluşmaktadır.)

2) Demir ve çelik için NC SZC 73002 Çin Ulusal Analiz Merkezi.

3) Az Kumlu Katı Madde(Al, As. Ce, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, La. Mn. Na, Rb, Se. Sm. Ti. V, ve Zn dan oluşmaktadır.) için Çek Cumhuriyeti Metroloji Enstitüsü CRM#7002.

Mikrodalga parçalanması Cem-Mars fırın kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4: Mikrodalga parçalaması için CEM MARS Fırın

#### III.7.2. CRM#700Organikçe Zengin Katı Madde

##### III.7.2.1. Katı maddede Ayrıştırılabilir Eser miktar metaller için asetik asid ayırma yöntemi

- 0.43 mol/L asetik asid çözeltisinden 200 mL eklenmiş, bir ekstraksiyon şişesine 5 g katı örnek aktarılır.Elde edilen karışım oda sıcaklığında ( $20 \pm 4$  °C ) end-over-end çalkalayıcı kullanılarak yaklaşık 16 saat 30 rpm'de çalkalanmıştır (bir gece boyunca).



- Hem şişenin içindeki ekstraksiyon çözeltilisinin sıcaklığı hem de odanın sıcaklığı başlangıçta ve ekstraksiyon sonunda çalkalama süresi bitene kadar ölçülmüştür.
- Ekstrakt aniden ayrılmıştır. Santrifüj tüpündeki bir kısım ekstraktın tortusunu ayırmak için, 10 dakika santrifüj yaklaşık 3000 g'da edilmiştir. Supernatant(süzüntü) sıvı analiz edilene kadar 4°C 'de polietilen kaplarda saklanmıştır.

### **III.7.3. CRM#7002 hafif kumlu Katı Madde**

#### **III.7.3.1. Toplam element içeren ve ayrıştırılabilir element bileşimli katı maddede nitik asid Ekstraksiyon yöntemi**

- 250 mL polietilen şişe içine 10 g ( $\pm 0.002$  g) tartılmış örnek ve 2 mol/L 2lik nitric asidin 100 mL eklenir. Elle karıştırılarak çalkalanır, şişe bir kapak ile kapatılır ve karışım 16 saat ( bir gece) boyunca laboratuvar sıcaklığında ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) bekletilir. Sonra şişe kapatılır ve mekanik olarak 1 saat boyunca end-over-end çalkalayıcıda (dönen çalkalayıcı,  $50 \pm 5$  rpm.) çalkalanır. Orta yoğunlukta bir filtre kağıdı ile bir kurutucuda filtre edilir.

### **III.8. Mikro Dalga Parçalaması İçin Örnek Hazırlama**

Örnekler ICP-MS analizinden önce mikrodalga parçalanması için aşağıdaki yolu izlemektedir:

- 100 mg toprak örneği tartıldı ve alikotlara ayrılan örnekler teflon kaplarda saklandı.
- %65'lik HNO<sub>3</sub>'den 6 mL eklenmiştir.
- Numuneler 10-15 dakika oda sıcaklığında saklanmıştır.
- Teflon küvet sıkıca kapatılıp parçalanma için mikrodalga sistemine yerleştirilmiştir.
- Parçalama için CEM Corporation "Mars5" mikrodalga sistemi kullanılmıştır.
- Mikrodalga parçalaması şu veriler ayarlanarak yapılmıştır:

Sıcaklık 20 dakika dwell (bekleme, kalma) zamanı takiben 20 dakikada (200 psig basınç ayarı ile) 200 °C'ye çıkartılmıştır.

- Yöntem tamamlandıktan sonra, küvetler 60-90 dakika soğutulur ve havalandırıldıktan sonra açılır.
- Soğutmadan sonra, parçalanmış madde ICP-MS analizi için % 4-5 konsantrasyonda HNO<sub>3</sub>'e ulaşmak amacıyla ultrasaf su ile son hacim olan 50 mL'ye seyreltilir,
- Çözünmeyen katı madde bir fırında kurutulur ve tartılır. Farklılıklar not edilir bu da mikro dalga parçalamasından toplam parçalanmayı gösterir.
- Örnekler + 4°C'de buzdolabında saklanır.

### III.8. 1. ICP-MS için Katı analiz Yöntemi

#### III.8. 1.1. Standart hazırlama:

Blank: (kör-boş)	Internal Standart(Indium)	25ul
Standart 5ppb:	M. Standart 12.5ul +	250ul (Indium)(indiyum)
Standart 10ppb:	M. Standart 25ul +	250ul (Indium)
Standart 20ppb:	M. Standart 50ul +	250ul (Indium)
Standart 50ppb:	M. Standart 125ul +	250ul (Indium)

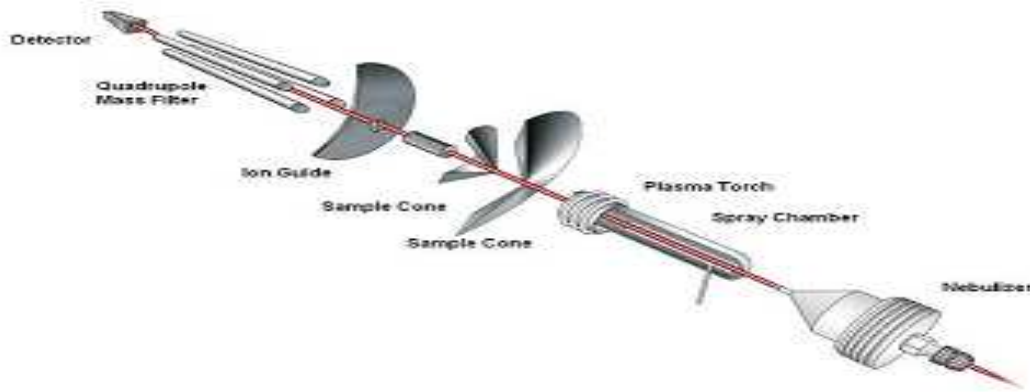
Toplam hacim % 2'lik HNO<sub>3</sub> ile 25 mL yapılır. Örnekler ICP-MS analizinden önce vorteks ile karıştırılır.

\* İç Standart olarak İndiyum kullanılmıştır.

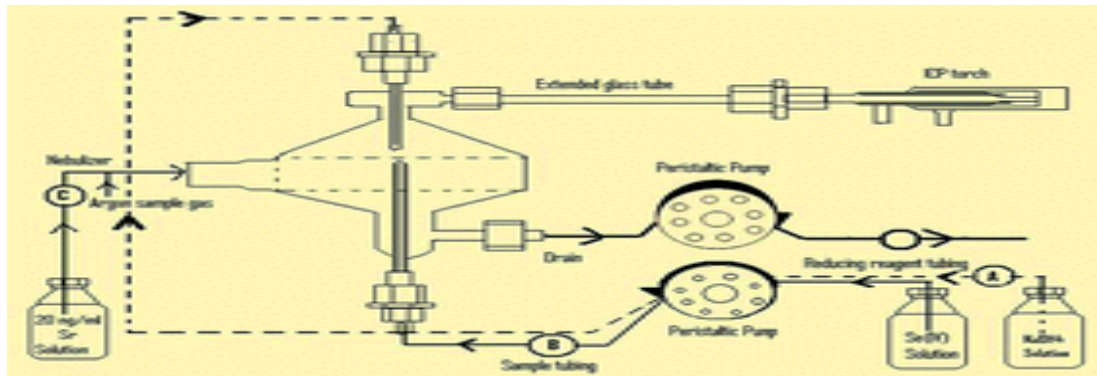
#### III.8. 1.2. CRM standartları ve katı madde standartları hazırlanması:

parçalanmış katı madde	200ul + 100ul (Indium)
parçalanmış CRM700	200ul + 100ul (Indium)

Toplam hacim % 2'lik HNO<sub>3</sub> ile 10 mL yapılır( 9.7 mL %2 lik HNO<sub>3</sub> eklenmiştir.) Örnekler ICP-MS analizinden önce vorteks ile karıştırılır.



Şekil 5: Örnek girişinden tespit edilmesine kadar ICP-MS çizimi



Şekil 6: Çalışan bir ICP-MS akış şeması

### III.9 CRM standartları ve katı madde standartlarının hesaplanması

Sonuçlar elde edilip, Pakistan ve Türkiye'den getirilmiş farklı katı numuneler her bir zaman dilimi için ayrı ortalaması alınmıştır. Element kompozisyonunun gelişim karşılaştırması SPSS ve T testi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma için bahçeden ve mezardan alınan toprak örnekleri için CRM700, inşaattan alınan toprak örneği için CRM7002 ve nehir kenarından alınan toprak örneği için CRM 73002 standartları kullanılarak ortalama değer, standart hata ve varyans hesaplanmıştır.

## IV. BULGULAR

### Örnek Toplama ve Saklama

Topraklar bahçeden, inşaat halindeki bina veya bölgelerden, mezarlık ve kanal veya nehir kenarı olmak üzere dört farklı yerden toplandı. Buralardan elde edilen topraklar kan ile lekeleni. Kan örnekleri (250 ml) bir gönüllüden alındı ve aynı gün sistematik olarak dört farklı tip toprağa serpildi. Negatif kontroller ise toprak kan ile lekelemeden önce alındı. Yaklaşık 60 ml kan her bir toprak örneğinin üzerine (tek bir toprağın 20 ml'lik her bir bölümü) gelişigüzel serpildi. Örnekleme işlemi 1., 5., 10., 20., 30. ve 60. gün olmak üzere belli bir zaman periyodu planlanarak yapıldı. Örnekler toplandıktan sonra buzdolabında 4°C'de saklandı. Şekil 7'de toplanan toprak örnekleri ve negatif kontroller için Kestle Mayer testi (Kastle J. St., 1909) testi sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 7: Pozitif (a) ve Kontrol Toprak (b) Örneklerinin Kestle Mayer Test Sonuçları

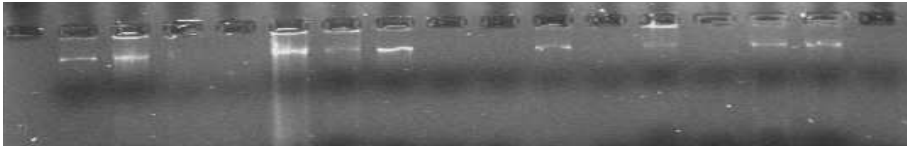
### Genomik DNA Ekstraksiyonu ve Jel Elektroforezi

DNA ekstraksiyon prosedürü kan ile lekelenmiş toprak örnekleri için optimize ve valide edilmiştir. DNA ekstraksiyonu Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (Singer et al., 1988), Sodyum Sitrat Sodyum Asetat (SSC ekstraksiyon Methodu) Kan ile lekelenmiş toprak örnekleri için ekstraksiyon prosedürleri optimize ve valide edilmiştir. Ekstraksiyon prosedürleri Fenol-Kloroform-İzoamil alkol, Sodyum Sitrat Sodyum Klorit ([www.genome.ou.edu/protocol](http://www.genome.ou.edu/protocol))

[book/protocol\\_partIII.html#III.H](#)), inkübasyon ve Proteinaz K kullanılarak modifiye edilerek %0.9'luk Sodyum Klorür (Yeates et al., 1997) ve Chelex yöntemlerinin (Walsh PS., 1991) modifiye edilmesiyle uygulanmıştır. Ekstraksiyonlar SSC ekstraksiyon metodu ile yapılmıştır.

Spektrofotometre ve agaroz jel DNA'nın konsantrasyonlarını belirlemede kullanıldı. Şekil 8'de 10ng/µl standart DNA'ya sahip olan örneğin DNA konsantrasyonunun agaroz jel elektroforezi gösterilmektedir. Tablo 8-11 Pakistan'dan toplanan kan ile lekelenmiş topraklardaki spektrofotometre sonuçlarını ve Şekil 9-13 Pakistan'dan alınan örneklerin grafiklerini göstermektedir. Tablo 11-14 ise Türkiye'den toplanan kan ile lekelenmiş topraklardaki spektrofotometre sonuçlarını ve Şekil 14-18 Türkiye'den alınan örneklerin grafiklerini göstermektedir.

L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12 L13 L14 L15 L16 L17



**Şekil 8:** Kan ile Lekelenmiş Toprak Örneklerindeki Genomik DNA'nın Ürün Jel Elektroforez Gösterimi

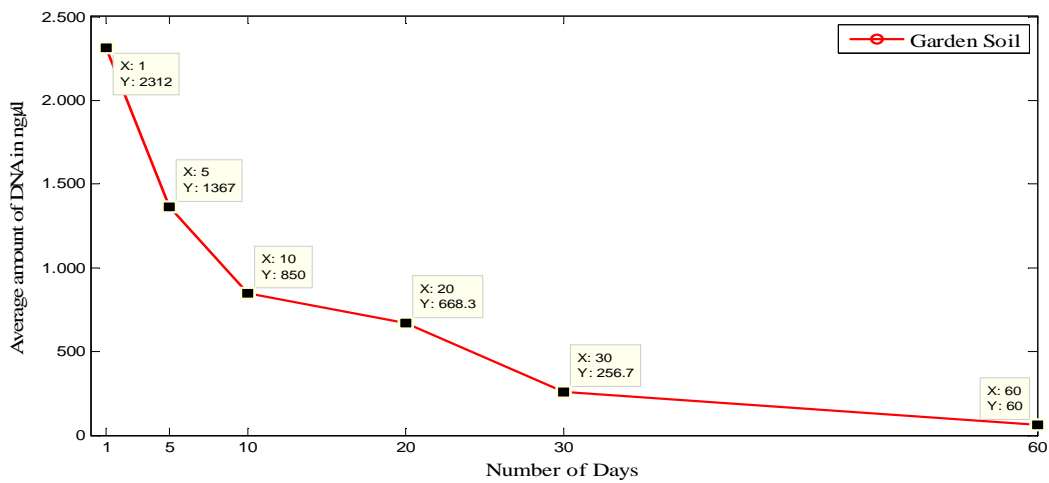
- L1 = Boş
- L2 = 10ng Standart DNA
- L3 = Ekstrakte DNA
- L4-5 = Boş
- L6-8 = Ekstrakte DNA
- L11 = 10ng Standart DNA
- L12, 14, 17 = Boş
- L13, 15, 16 = Ekstrakte DNA

### **Spektrofotometre ile Örneklerin DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

Aşağıdaki sonuçlar spektrofotometre değerlerinden elde edilmiştir (Wilfinger, W., 1997; Glasel, 1997; Manchester, 1995).

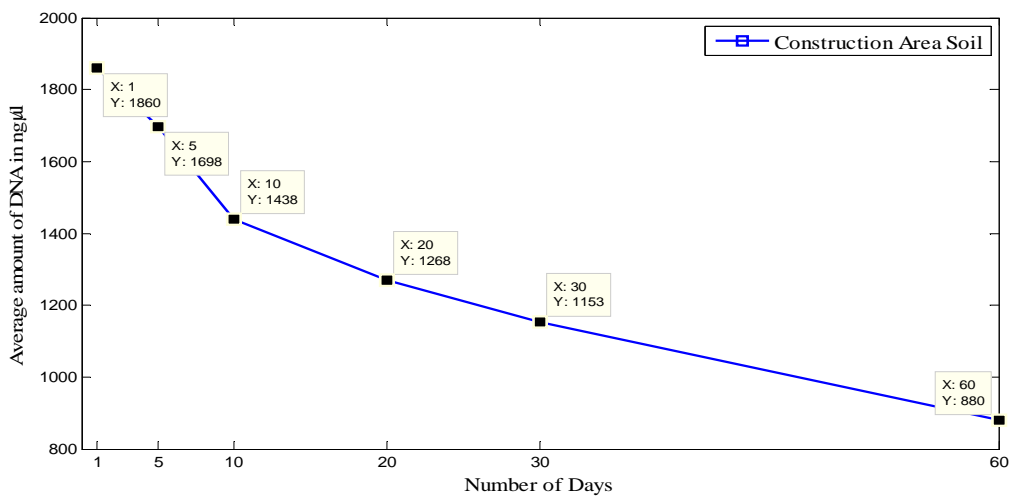
**Tablo 8:** Pakistan'da Bahçeden Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/µl
1	0,471	0,284	1,658		2355	
2	0,485	0,311	1,559		2425	
3	0,431	0,279	1,545	<b>1,588</b>	2155	<b>2311,67</b>
13	0,238	0,134	1,776		1190	
14	0,254	0,154	1,649		1270	
15	0,328	0,248	1,323	<b>1,583</b>	1640	<b>1366,67</b>
25	0,143	0,093	1,538		715	
26	0,159	0,101	1,574		795	
27	0,208	0,13	1,600	<b>1,571</b>	1040	<b>850,00</b>
37	0,112	0,081	1,383		560	
38	0,122	0,085	1,435		610	
39	0,167	0,111	1,505	<b>1,441</b>	835	<b>668,33</b>
49	0,042	0,036	1,167		210	
50	0,049	0,041	1,195		245	
51	0,063	0,052	1,212	<b>1,191</b>	315	<b>256,67</b>
61	negatif	negatif	0,000		0,000	
62	negatif	negatif	0,000		0,000	
63	0,036	0,031	1,161	<b>0,387</b>	180	<b>60,00</b>
73	Negatif	negatif	0,000		0,000	
74	negatif	negatif	0,000		0,000	
75	negatif	negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>

**Şekil 9:** Bahçe Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)

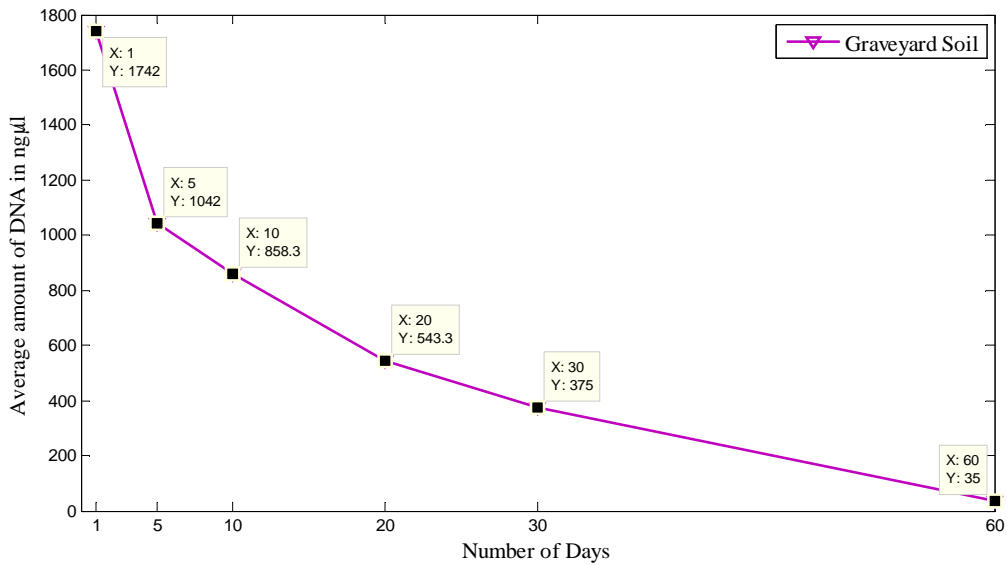
**Tablo 9:** Pakistan'da İnşaat Alanından Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ µl
4	0,327	0,213	1,535		1635	
5	0,411	0,29	1,417		2055	
6	0,378	0,217	1,742	<b>1,565</b>	1890	<b>1860,00</b>
16	0,325	0,227	1,432		1625	
17	0,404	0,286	1,413		2020	
18	0,29	0,197	1,472	<b>1,439</b>	1450	<b>1698,33</b>
28	0,293	0,201	1,458		1465	
29	0,337	0,261	1,291		1685	
30	0,233	0,167	1,395	<b>1,381</b>	1165	<b>1438,33</b>
40	0,251	0,192	1,307		1255	
41	0,301	0,208	1,447		1505	
42	0,209	0,153	1,366	<b>1,373</b>	1045	<b>1268,33</b>
52	0,226	0,199	1,136		1130	
53	0,271	0,238	1,139		1355	
54	0,195	0,181	1,077	<b>1,117</b>	975	<b>1153,33</b>
64	0,167	0,143	1,168		835	
65	0,208	0,184	1,130		1040	
66	0,153	0,133	1,150	<b>1,150</b>	765	<b>880,00</b>
76	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
77	negatif	Negatif	0,000		0,000	
78	Negatif	negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>

**Şekil 10:** İnşaat Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)

**Tablo 10:** Pakistan’da Mezarlıktan Alınan Toprak Örnekleri

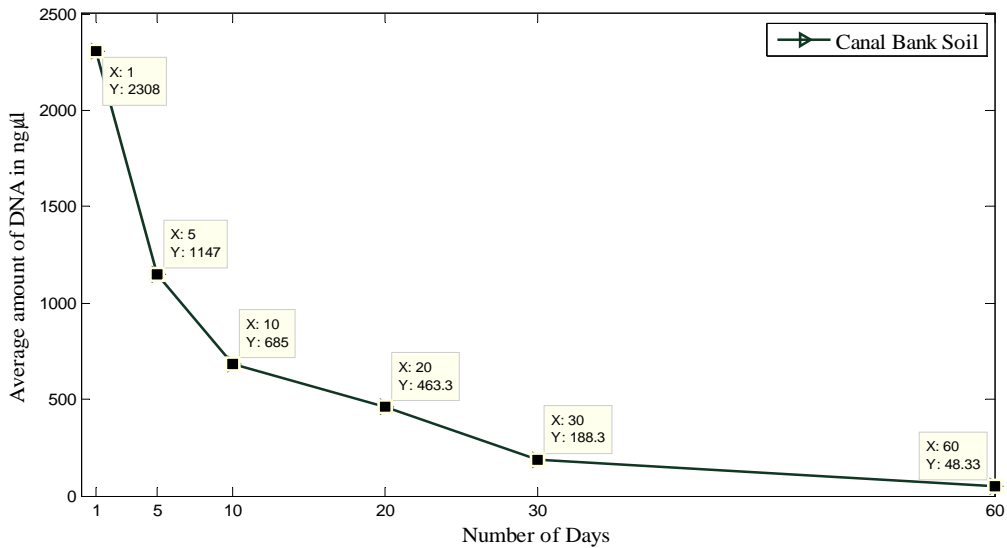
Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ $\mu$ l
7	0,349	0,213	1,638		1745	
8	0,341	0,209	1,632		1705	
9	0,355	0,212	1,675	<b>1,648</b>	1775	<b>1741,67</b>
19	0,182	0,11	1,655		910	
20	0,224	0,153	1,464		1120	
21	0,219	0,122	1,795	<b>1,638</b>	1095	<b>1041,67</b>
31	0,155	0,103	1,505		775	
32	0,196	0,124	1,581		980	
33	0,164	0,104	1,577	<b>1,554</b>	820	<b>858,33</b>
43	0,096	0,079	1,215		480	
44	0,123	0,101	1,218		615	
45	0,107	0,088	1,216	<b>1,216</b>	535	<b>543,33</b>
55	0,074	0,063	1,175		370	
56	0,088	0,071	1,239		440	
57	0,063	0,059	1,068	<b>1,161</b>	315	<b>375,00</b>
67	Negatif	negatif	0,000		0	
68	0,021	0,018	1,167		105	
69	Negatif	Negatif	0,000	<b>0,389</b>	0,000	<b>35,00</b>
79	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
80	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
81	negatif	Negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>

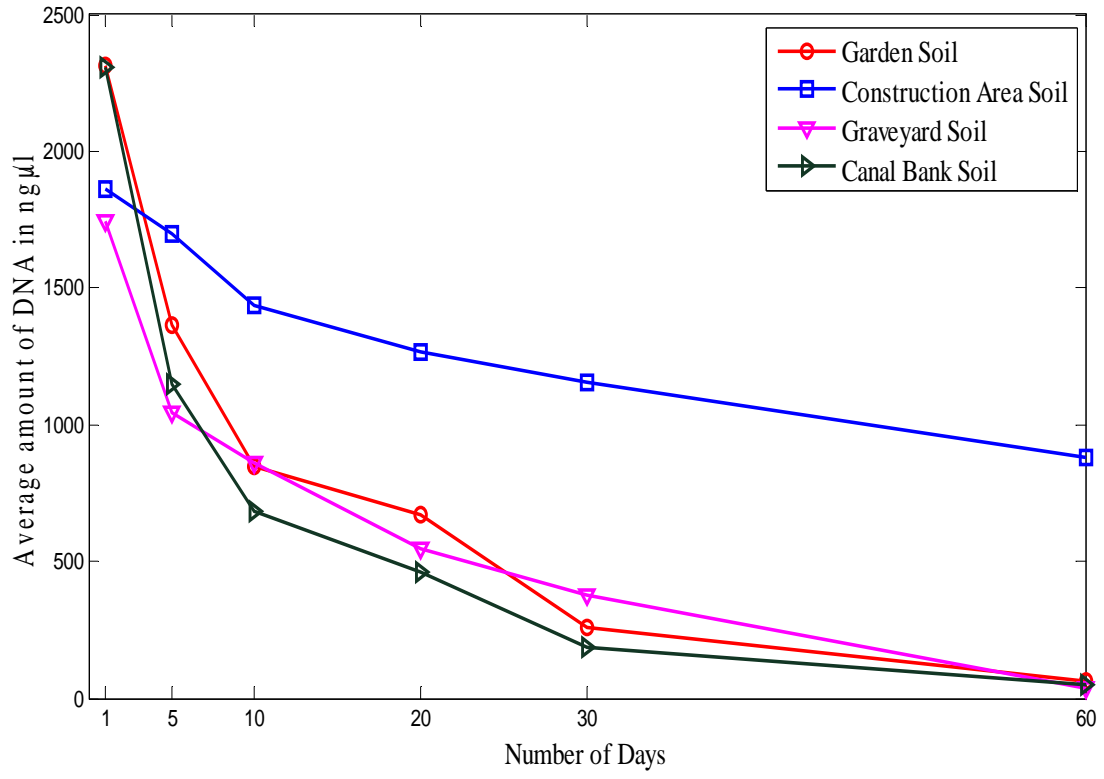
**Şekil 11:** Mezarlık Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)



**Tablo 11:** Pakistan'da Kanal Kenarından Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ $\mu$ l
10	0,405	0,272	1,489		2025	
11	0,514	0,32	1,606		2570	
12	0,466	0,328	1,421	<b>1,505</b>	2330	<b>2308,33</b>
22	0,214	0,139	1,540		1070	
23	0,243	0,167	1,455		1215	
24	0,231	0,161	1,435	<b>1,476</b>	1155	<b>1146,67</b>
34	0,13	0,092	1,413		650	
35	0,155	0,102	1,520		775	
36	0,126	0,086	1,465	<b>1,466</b>	630	<b>685,00</b>
46	0,099	0,081	1,222		495	
47	0,107	0,087	1,230		535	
48	0,072	0,059	1,220	<b>1,224</b>	360	<b>463,33</b>
58	0,028	0,023	1,217		140	
59	0,034	0,029	1,172		170	
60	0,051	0,047	1,085	<b>1,158</b>	255	<b>188,33</b>
70	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
71	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
72	0,029	0,026	1,115	<b>0,372</b>	145	<b>48,33</b>
82	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
83	0,017	0,015	1,133		85	
84	Negatif	Negatif	0,000	<b>0,378</b>	0,000	<b>28,33</b>

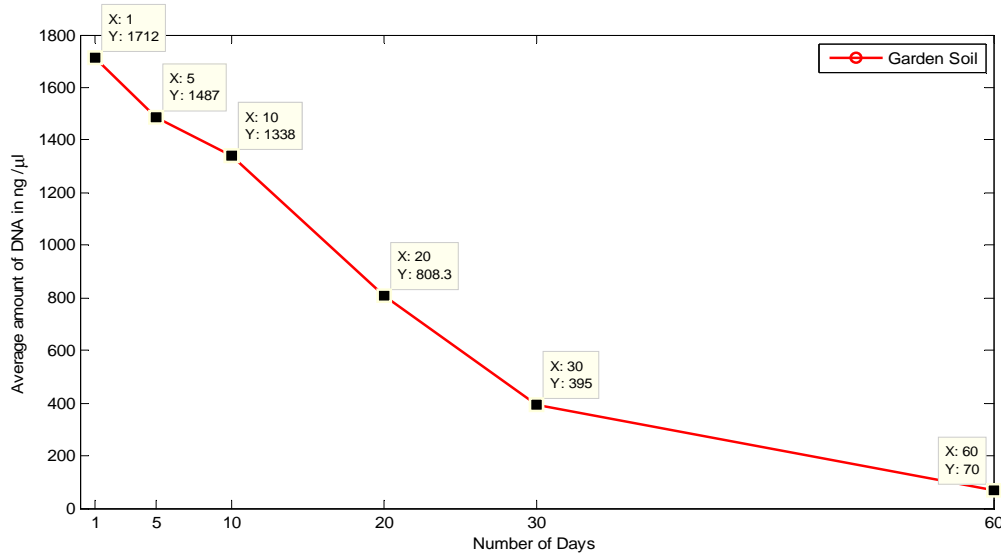
**Şekil 12:** Kanal Toprağı Alanı Ürün Grafiği (Pakistan)



Şekil 13: Pakistan'dan Alınan Toprakların Karşılaştırması

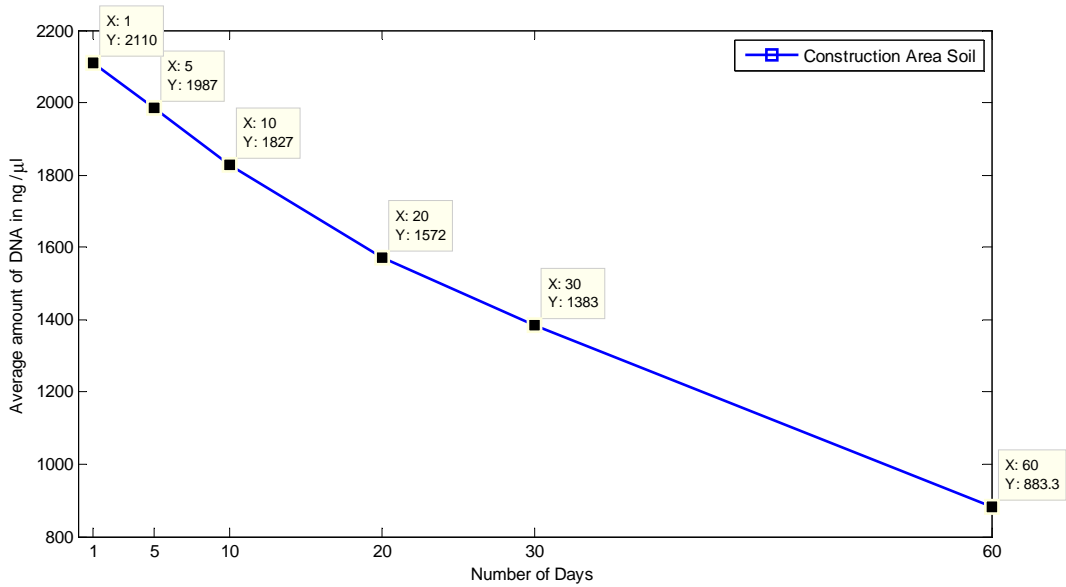
**Tablo 12:** Türkiye’de Bahçeden Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ µl
1	0,346	0,219	1,580		1730	
2	0,332	0,211	1,573	<b>1,587</b>	1660	<b>1711,67</b>
3	0,349	0,217	1,608		1745	
13	0,289	0,179	1,615		1445	
14	0,297	0,192	1,547	<b>1,493</b>	1485	<b>1486,67</b>
15	0,306	0,232	1,319		1530	
25	0,254	0,191	1,330		1270	
26	0,262	0,202	1,297	<b>1,323</b>	1310	<b>1338,33</b>
27	0,287	0,214	1,341		1435	
37	0,153	0,102	1,500		765	
38	0,16	0,133	1,203	<b>1,308</b>	800	<b>808,33</b>
39	0,172	0,141	1,220		860	
49	0,086	0,061	1,410		430	
50	0,057	0,051	1,118	<b>1,278</b>	285	<b>395,00</b>
51	0,094	0,072	1,306		470	
61	0,018	0,014	1,286		90	
62	0	0	0,000	<b>1,095</b>	0,000	<b>70,00</b>
63	0,024	0,012	2,000		120	
73	Negatif	Negatif	0,000		0,000	
74	Negatif	Negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>
75	Negatif	Negatif	0,000		0,000	

**Şekil 14:** Bahçe Toprağı Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)

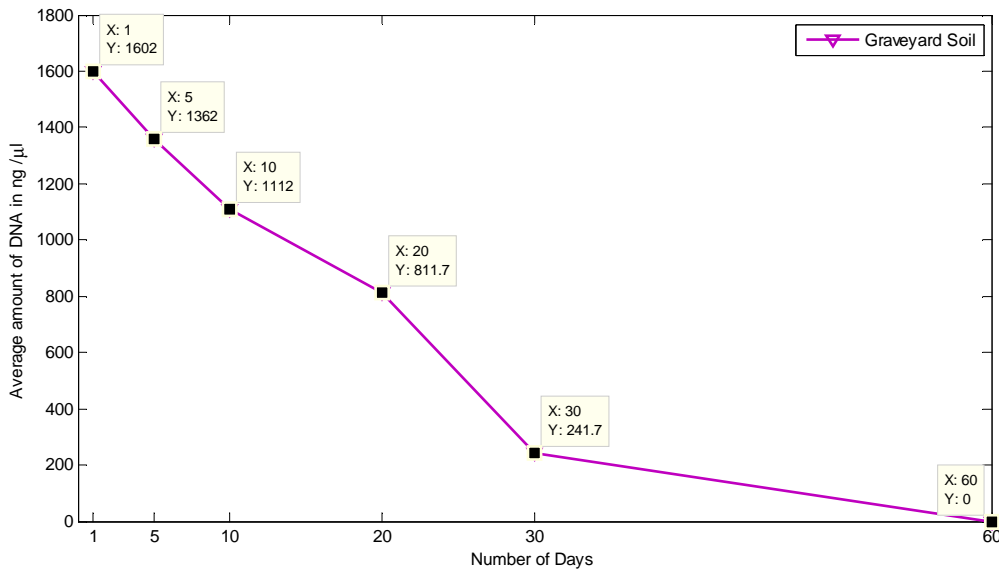
**Tablo 13:** Türkiye’de İnşaat Alanından Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ $\mu$ l
4	0,412	0,29	1,421		2060	
5	0,445	0,284	1,567	<b>1,481</b>	2225	<b>2110,00</b>
6	0,409	0,281	1,456		2045	
16	0,399	0,299	1,334		1995	
17	0,406	0,296	1,372	<b>1,470</b>	2030	<b>1986,67</b>
18	0,387	0,227	1,705		1935	
28	0,358	0,217	1,650		1790	
29	0,394	0,286	1,378	<b>1,464</b>	1970	<b>1826,67</b>
30	0,344	0,252	1,365		1720	
40	0,322	0,237	1,359		1610	
41	0,324	0,239	1,356	<b>1,449</b>	1620	<b>1571,67</b>
42	0,297	0,182	1,632		1485	
52	0,276	0,194	1,423		1380	
53	0,291	0,242	1,202	<b>1,334</b>	1455	<b>1383,33</b>
54	0,263	0,191	1,377		1315	
64	0,188	0,152	1,237		940	
65	0,206	0,151	1,364	<b>1,325</b>	1030	<b>883,33</b>
66	0,136	0,099	1,374		680	
76	negatif	negatif	0,000		0,000	
77	Negatif	negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>
78	negatif	negatif	0,000		0,000	

**Şekil 15:** İnşaat Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)

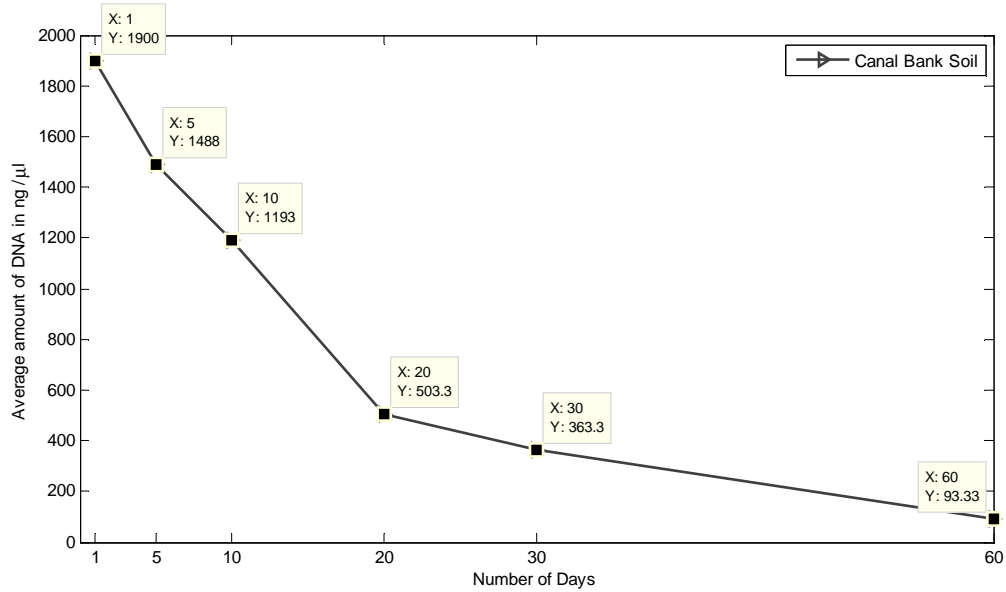
**Tablo 14:** Türkiye’de Mezarlıktan Alınan Toprak Örnekleri

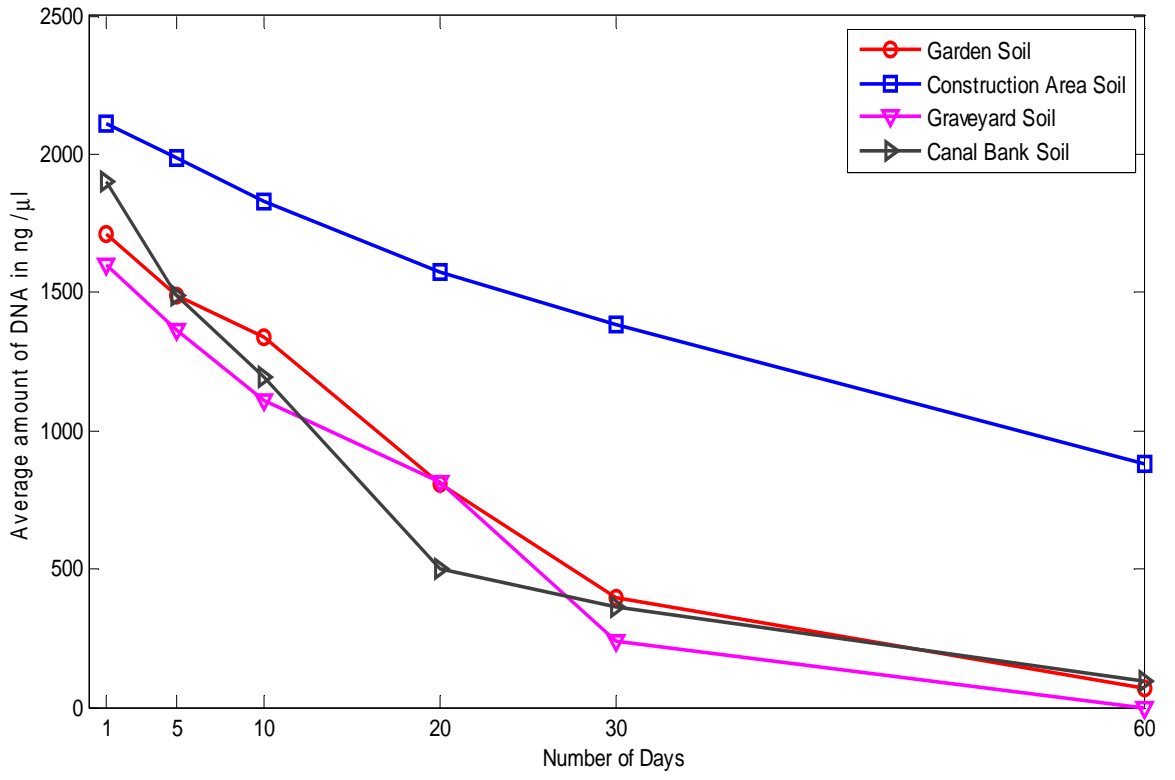
Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ µl
7	0,318	0,213	1,493		1590	
8	0,324	0,227	1,427	<b>1,477</b>	1620	<b>1601,67</b>
9	0,319	0,211	1,512		1595	
19	0,284	0,199	1,427		1420	
20	0,277	0,184	1,505	<b>1,431</b>	1385	<b>1361,67</b>
21	0,256	0,188	1,362		1280	
31	0,233	0,196	1,189		1165	
32	0,227	0,156	1,455	<b>1,392</b>	1135	<b>1111,67</b>
33	0,207	0,135	1,533		1035	
43	0,171	0,137	1,248		855	
44	0,154	0,155	0,994	<b>1,322</b>	770	<b>811,67</b>
45	0,162	0,094	1,723		810	
55	0,082	0,061	1,344		410	
56	0	0		<b>1,278</b>	0	<b>241,67</b>
57	0,063	0,052	1,212		315	
67	0	0	0,000		0	
68	0	0	0,000	<b>0,000</b>	0	<b>0,00</b>
69	0	0	0,000		0,000	
79	negatif	Negatif	0,000		0,000	
80	Negatif	negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>
81	negatif	negatif	0,000		0,000	

**Şekil 16:** Mezarlık Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)

**Tablo 15:** Türkiye’de Kanal Kenarından Alınan Toprak Örnekleri

Örnek	OD 260	OD 280	260/280	Ortalama 260/280	Miktar ng/ul	Ortalama ng/ $\mu$ l
10	0,346	0,234	1,479		1730	
11	0,472	0,332	1,422	<b>1,446</b>	2360	<b>1900,00</b>
12	0,322	0,224	1,438		1610	
22	0,28	0,202	1,386		1400	
23	0,361	0,257	1,405	<b>1,387</b>	1805	<b>1488,33</b>
24	0,252	0,184	1,370		1260	
34	0,207	0,157	1,318		1035	
35	0,297	0,206	1,442	<b>1,385</b>	1485	<b>1193,33</b>
36	0,212	0,152	1,395		1060	
46	0	0	0,000		0	
47	0,183	0,126	1,452	<b>1,380</b>	915	<b>503,33</b>
48	0,119	0,091	1,308		595	
58	0	0	0,000		0	
59	0,126	0,093	1,355	<b>1,283</b>	630	<b>363,33</b>
60	0,092	0,076	1,211		460	
70	0	0	0,000		0	
71	0,056	0,045	1,244	<b>1,244</b>	280	<b>93,33</b>
72	0	0	0,000		0	
82	negatif	Negatif	0,000		0,000	
83	Negatif	negatif	0,000	<b>0,000</b>	0,000	<b>0,00</b>
84	negatif	negatif	0,000		0,000	

**Şekil 17:** Kanal Kenarı Alanı Ürün Grafiği (Türkiye)



Şekil 18: Türkiye'den Alınan Toprakların Karşılaştırması

**Tablo 16:** Türkiye ve Pakistan'dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Bahçe Toprakları için PCR Sonuçları

Örneğin toplandığı gün	Menşei	Örnek Numara	Amplifiye edilmiş lokus/Alel Sayısı	Allel/Lokus Düşmesi	Kontaminasyonu	Muhtemel potansiyel sebep	Öneriler
1. Gün	Türkiye	1, 2	16, 16	0	Hayır		
	Pakistan	3	16	0	Hayır		
5. Gün	Türkiye	13	16	0	Hayır		
	Pakistan	14, 15	16, 16	0	Hayır		
10. Gün	Türkiye	26	15	1	Hayır	Su ve Humus	Quantifiler, MiniFiler
	Pakistan	25, 27	16, 16	0	Hayır	Sıcaklık ve Humus	
20. Gün	Türkiye	37, 39	15, Amp. yok	1	Evet	Su ve Humus	Quantifiler, MiniFiler ve Amp.Duo
	Pakistan	38	amp. yok	-	-	Sıcaklık ve Humus	
30. Gün	Türkiye	49	Amp.yok	-	Evet	Su ve Humus	
	Pakistan	49, 51	14, Amp.yok	2	Evet	Sıcaklık ve Humus	SNP kit ve Amp.Duo
60. Gün	Türkiye	61, 62	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	63	Amp.yok	-	-		
Negatif	Türkiye	73	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	75	Amp.yok	-	-		



**Tablo 17:** Türkiye ve Pakistan'dan 6 Farklı Zamanda Toplanan İnşaat Toprakları için PCR Sonuçları

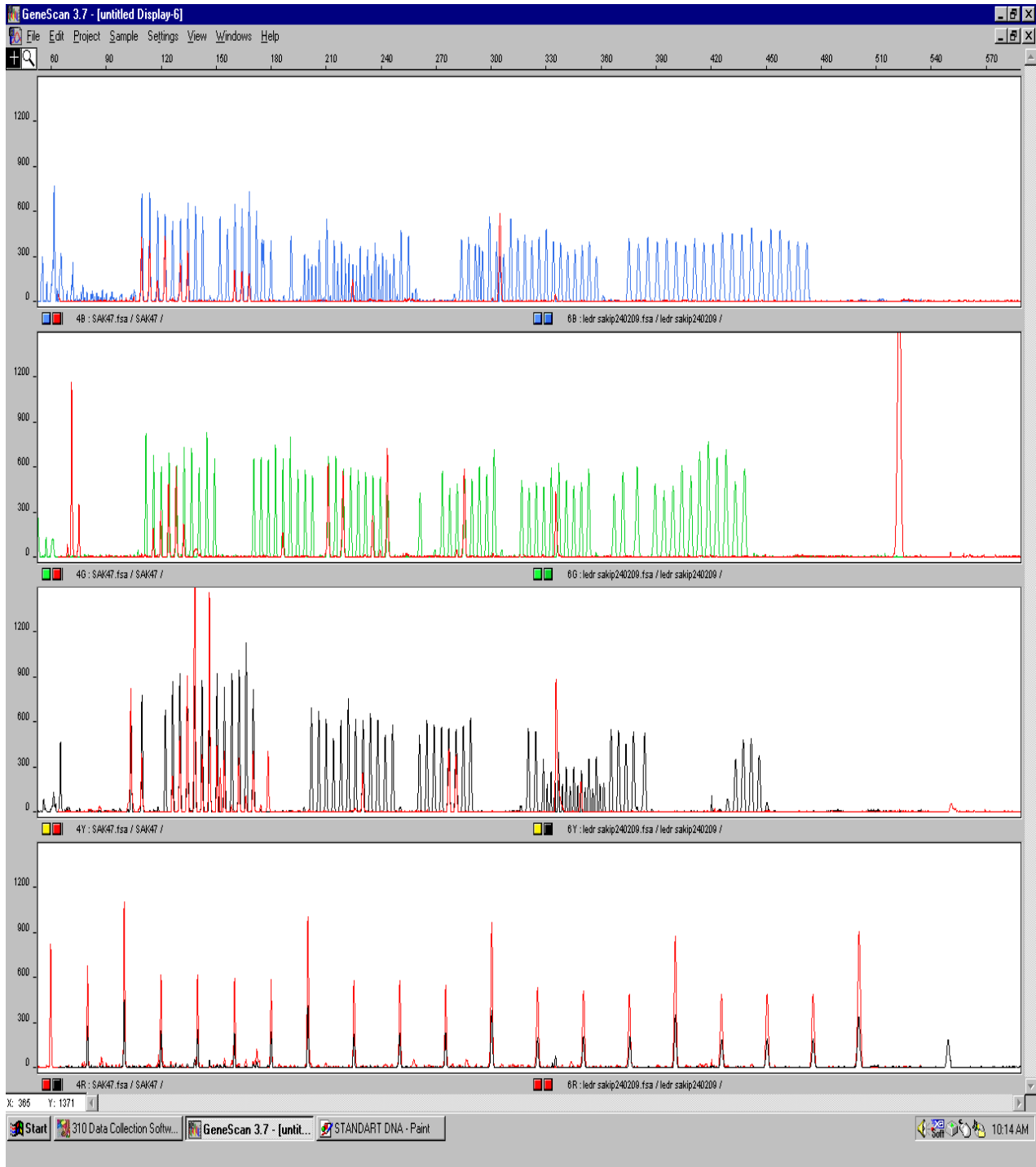
Örneğin toplandığı gün	Menşei	Örnek Numara	Amplifiye edilmiş lokus/Alel Sayısı	Allel/Lokus Düşmesi	Kontaminasyonu	Muhtemel potansiyel sebep	Öneriler
1. Gün	Türkiye	5	16	0	Hayır		
	Pakistan	6	16	0	Hayır		
5. Gün	Türkiye	16	16	0	Hayır		
	Pakistan	18	16	0	Hayır		
10. Gün	Türkiye	28	16	0	Hayır		
	Pakistan	30	16	0	Hayır		
20. Gün	Türkiye	42	16	0	Hayır		
	Pakistan	42	16	0	Hayır		
30. Gün	Türkiye	53	16	0	Hayır		
	Pakistan	54	16	0	Hayır		
60. Gün	Türkiye	64	16	0	Hayır		
	Pakistan	65	16	0	Hayır		
Negatif	Türkiye	78	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	78	Amp.yok	-	-		

**Tablo 18:** Türkiye ve Pakistan'dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Mazar Toprakları için PCR Sonuçları

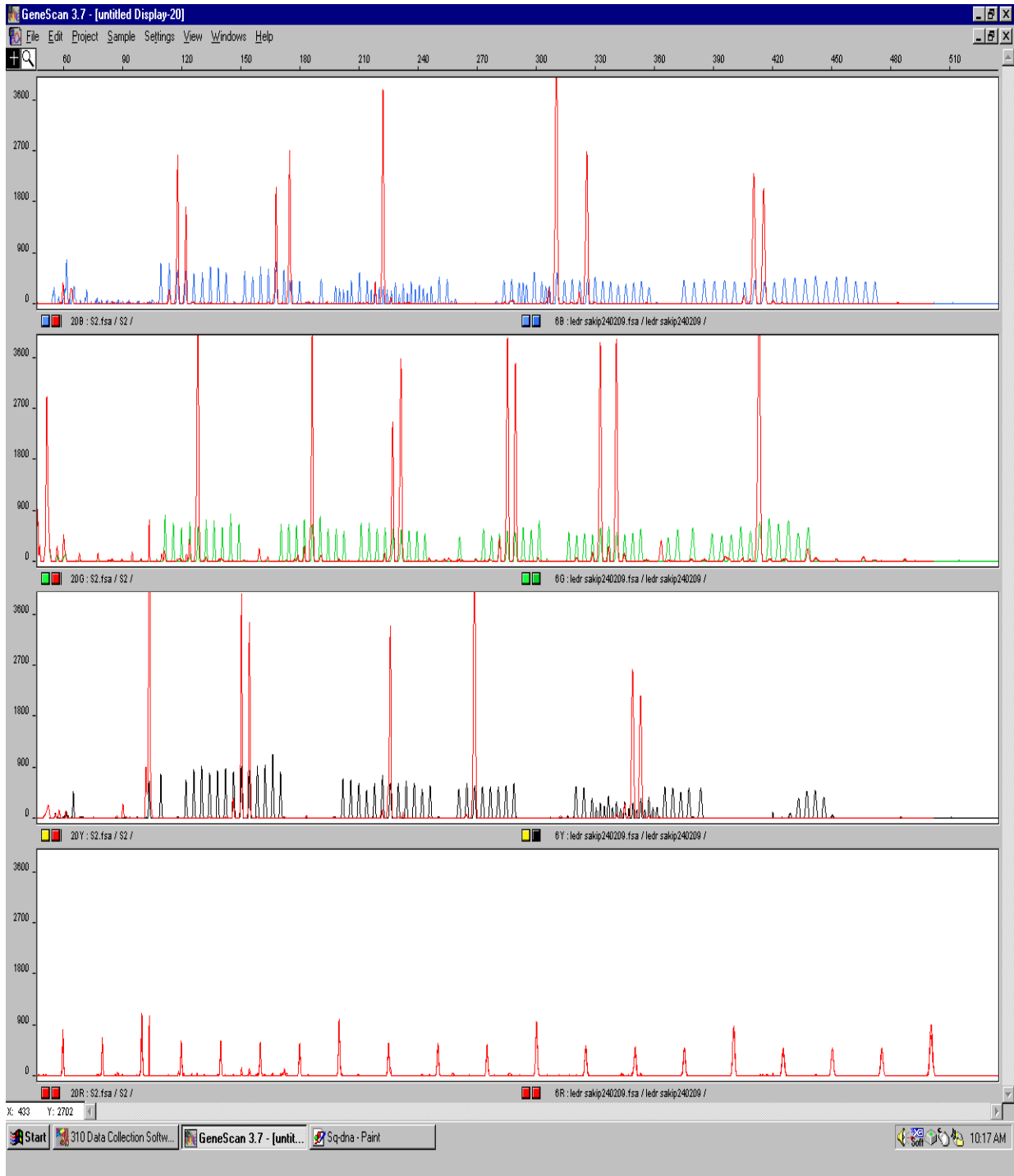
Örneğin toplandığı gün	Menşei	Örnek Numara	Amplifiye edilmiş lokus/Alel Sayısı	Allel/Lokus Düşmesi	Kontaminasyonu	Muhtemel potansiyel sebep	Öneriler
1. Gün	Türkiye	7	16	0	Hayır		
	Pakistan	9	16	0	Hayır		
5. Gün	Türkiye	20	16	0	Hayır		
	Pakistan	19	16	0	Hayır		
10. Gün	Türkiye	31,33	14, 12 ve düşük pik	2-4	Evet	Su ve Mikroorg.	Quantiduo, MiniFiler, SNPs
	Pakistan	32	16	0	Hayır		
20. Gün	Türkiye	43	14 ve düşük pik	2	Evet	Su ve Mikroorg.	Quantiduo, MiniFiler, SNP
	Pakistan	44, 45	15, 14 Stutter	1-2	-	Sıcaklık	Quantifiler, MiniFiler
30. Gün	Türkiye	56, 57	Amp. yok	-	-	Su ve Mikroorg.	
	Pakistan	56	10 ve düşük pik	6	Evet	Sıcaklık	SNP kit ve Amp.Duo
60. Gün	Türkiye	67, 68	Amp. yok	-	-		
	Pakistan	68	Amp. yok	-	-		
Negatif	Türkiye	79	Amp. yok	-	-		
	Pakistan	81	Amp. yok	-	-		

**Tablo 19:** Türkiye ve Pakistan'dan 6 Farklı Zamanda Toplanan Nehir Kenarındaki Topraklar için PCR Sonuçları

Örneğin toplandığı gün	Menşei	Örnek Numara	Amplifiye edilmiş lokus/Alel Sayısı	Allel/Lokus Düşmesi	Kontaminasyonu	Muhtemel potansiyel sebep	Öneriler
1. Gün	Türkiye	10	16	0	Hayır		
	Pakistan	12	16	0	Hayır		
5. Gün	Türkiye	22, 23	16, 16 Fazla pik	0	Evet	Kontaminasyon	QuantifilerDuo.
	Pakistan	24	16	0	Hayır		
10. Gün	Türkiye	34	14 Fazla pik	2	Evet	Su konst. Ve su	QuantifilerDuo., MiniFiler, SNPs
	Pakistan	35, 36	13, 13 düşük pik	3	Hayır	Su konst. Ve su	Quantifiler, MiniFiler, SNPs
20. Gün	Türkiye	46, 48	Amp.yok	-	-	Su konst. Ve su	
	Pakistan	47	12 düşük pik	4	Evet	Su konst. Ve su	Quantifiler, MiniFiler, SNPs
30. Gün	Türkiye	58	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	59, 60	9 (Stutter) Amp.yok	7	Evet	Su konst. Ve su	SNP kit ve Amp.Duo
60. Gün	Türkiye	70, 71	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	72	Amp.yok	-	-		
Negatif	Türkiye	84	Amp.yok	-	-		
	Pakistan	82	Amp.yok	-	-		



**Şekil 19:** ABI 310 Genetik analizörde yürütülen bir örneğin elektroferogramı. Kontaminasyon ve alel düşmelerinin bir arada görüldüğü bir örnek.



**Şekil 20:** ABI 310 Genetik analizörde yürütülen bir örneğin elektroferogramı. Tüm alellerin elde edildiği bir örnek.

**Tablo 20:** ICP-MS:Pakistan'dan Gelen Toprak Örneklerinin Mikrodalga ile Yaş Yakması

<b>Örnek</b>	<b>Toprak Ağırlığı (g)</b>	<b>Eklene HNO<sub>3</sub> hacmi (ml)</b>	<b>Kuru Toprak Ağırlığı (g)</b>	<b>Yaş Yakmadaki Kayıp Toprak Miktarı (g)</b>
1	0.100	6	0.0593	0.0407
2	0.100	6	0.0568	0.0432
3	0.100	6	0.0408	0.0592
4	0.100	6	0.0503	0.0497
5	0.100	6	0.0542	0.0458
6	0.100	6	0.0461	0.0539
7	0.100	6	0.0683	0.0317
8	0.100	6	0.0714	0.0286
9	0.100	6	0.0786	0.0214
10	0.100	6	0.0676	0.0324
11	0.100	6	0.0525	0.0475
12	0.100	6	0.0575	0.0425
13	0.100	6	0.0681	0.0319
14	0.100	6	0.0357	0.0643
15	0.100	6	0.0367	0.0633
16	0.100	6	0.0572	0.0428
17	0.100	6	0.0518	0.0482
18	0.100	6	0.0581	0.0419
19	0.100	6	0.0690	0.031
20	0.100	6	0.0696	0.0304
21	0.100	6	0.0722	0.0278
22	0.100	6	0.0623	0.0377
23	0.100	6	0.0452	0.0548
24	0.100	6	0.0622	0.0378
25	0.100	6	0.0526	0.0474
26	0.100	6	0.0376	0.0624
27	0.100	6	0.0423	0.0577
28	0.100	6	0.0598	0.0402
29	0.100	6	0.0471	0.0529
30	0.100	6	0.0234	0.0766
31	0.100	6	0.0707	0.0293
32	0.100	6	0.0381	0.0619
33	0.100	6	0.0494	0.0506
34	0.100	6	0.0629	0.0371
35	0.100	6	0.0423	0.0577
36	0.100	6	0.0502	0.0498

37	0.100	6	0.0478	0.0522
38	0.100	6	0.0521	0.0479
39	0.100	6	0.0309	0.0691
40	0.100	6	0.0616	0.0384
41	0.100	6	0.0630	0.037
42	0.100	6	0.0509	0.0491
43	0.100	6	0.0667	0.0333
44	0.100	6	0.0550	0.045
45	0.100	6	0.0528	0.0472
46	0.100	6	0.0760	0.024
47	0.100	6	0.0747	0.0253
48	0.100	6	0.0613	0.0387
49	0.100	6	0.0513	0.0487
50	0.100	6	0.0352	0.0648
51	0.100	6	0.0578	0.0422
52	0.100	6	0.0420	0.058
53	0.100	6	0.0341	0.0659
54	0.100	6	0.0395	0.0605
55	0.100	6	0.0674	0.0326
56	0.100	6	0.0502	0.0498
57	0.100	6	0.0613	0.0387
58	0.100	6	0.0597	0.0403
59	0.100	6	0.0455	0.0545
60	0.100	6	0.0416	0.0584
61	0.100	6	0.0618	0.0382
62	0.100	6	0.0547	0.0453
63	0.100	6	0.0266	0.0734
64	0.100	6	0.0526	0.0474
65	0.100	6	0.0598	0.0402
66	0.100	6	0.0585	0.0415
67	0.100	6	0.0714	0.0286
68	0.100	6	0.0795	0.0205
69	0.100	6	0.0732	0.0268
70	0.100	6	0.0634	0.0366
71	0.100	6	0.0607	0.0393
72	0.100	6	0.0582	0.0418
73	0.100	6	0.0371	0.0629
74	0.100	6	0.0369	0.0631
75	0.100	6	0.0240	0.076
76	0.100	6	0.0495	0.0505
77	0.100	6	0.0439	0.0561
78	0.100	6	0.0471	0.0529
79	0.100	6	0.0659	0.0341

80	0.100	6	0.0661	0.0339
81	0.100	6	0.0701	0.0299
82	0.100	6	0.0582	0.0418
83	0.100	6	0.0504	0.0496
84	0.100	6	0.0517	0.0483

**Tablo 21:** ICP-MS:Türkiye'den Gelen Toprak Örneklerinin Mikrodalga ile Yaş Yakması

Örnek	Toprak Ağırlığı (g)	Eklene HNO <sub>3</sub> hacmi (ml)	Kuru Toprak Ağırlığı (g)	Yaş Yakmadaki Kayıp Toprak Miktarı (g)
1	0.100	6	0.0574	0.0426
2	0.100	6	0.0579	0.0421
3	0.100	6	0.0553	0.0447
4	0.100	6	0.0597	0.0403
5	0.100	6	0.0594	0.0406
6	0.100	6	0.0365	0.0635
7	0.100	6	0.0393	0.0607
8	0.100	6	0.0761	0.0239
9	0.100	6	0.0272	0.0728
10	0.100	6	0.0822	0.0178
11	0.100	6	0.0657	0.0343
12	0.100	6	0.0248	0.0752
13	0.100	6	0.0566	0.0434
14	0.100	6	0.0622	0.0378
15	0.100	6	0.0624	0.0376
16	0.100	6	0.0474	0.0526
17	0.100	6	0.0519	0.0481
18	0.100	6	0.0582	0.0418
19	0.100	6	0.0461	0.0539
20	0.100	6	0.0445	0.0555
21	0.100	6	0.0539	0.0461
22	0.100	6	0.0396	0.0604
23	0.100	6	0.0196	0.0804
24	0.100	6	0.0529	0.0471
25	0.100	6	0.0611	0.0389
26	0.100	6	0.0651	0.0349
27	0.100	6	0.0640	0.036
28	0.100	6	0.0452	0.0548
29	0.100	6	0.0633	0.0367
30	0.100	6	0.0525	0.0475



31	0.100	6	0.0369	0.0631
32	0.100	6	0.0643	0.0357
33	0.100	6	0.0523	0.0477
34	0.100	6	0.0818	0.0182
35	0.100	6	0.0582	0.0418
36	0.100	6	0.0681	0.0319
37	0.100	6	0.0654	0.0346
38	0.100	6	0.0626	0.0374
39	0.100	6	0.0592	0.0408
40	0.100	6	0.0536	0.0464
41	0.100	6	0.0524	0.0476
42	0.100	6	0.0544	0.0456
43	0.100	6	0.0428	0.0572
44	0.100	6	0.0520	0.048
45	0.100	6	0.0517	0.0483
46	0.100	6	0.0753	0.0247
47	0.100	6	0.0769	0.0231
48	0.100	6	0.0741	0.0259
49	0.100	6	0.0765	0.0235
50	0.100	6	0.0686	0.0314
51	0.100	6	0.0700	0.03
52	0.100	6	0.0589	0.0411
53	0.100	6	0.0747	0.0253
54	0.100	6	0.0195	0.0805
55	0.100	6	0.0594	0.0406
56	0.100	6	0.0529	0.0471
57	0.100	6	0.0898	0.0102
58	0.100	6	0.0886	0.0114
59	0.100	6	0.0811	0.0189
60	0.100	6	0.0779	0.0221
61	0.100	6	0.0623	0.0377
62	0.100	6	0.0664	0.0336
63	0.100	6	0.0777	0.0223
64	0.100	6	0.0835	0.0165
65	0.100	6	0.0716	0.0284
66	0.100	6	0.0372	0.0628
67	0.100	6	0.0484	0.0516
68	0.100	6	0.0563	0.0437
69	0.100	6	0.0782	0.0218
70	0.100	6	0.0828	0.0172
71	0.100	6	0.0397	0.0603
72	0.100	6	0.0857	0.0143
73	0.100	6	0.0635	0.0365

74	0.100	6	0.0700	0.03
75	0.100	6	0.0260	0.074
76	0.100	6	0.0722	0.0278
77	0.100	6	0.0663	0.0337
78	0.100	6	0.0532	0.0468
79	0.100	6	0.0716	0.0284
80	0.100	6	0.0522	0.0478
81	0.100	6	0.0637	0.0363
82	0.100	6	0.0780	0.022
83	0.100	6	0.0856	0.0144
84	0.100	6	0.0785	0.0215

**Tablo 22:** CRM700 Standartı Kullanarak Türkiye Bahçe Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	79.11	1.00	78.19	1.00	82.85	1.00	79.15	1.00	76.64	1.00	73.16	1.00
111Cd	58.20	0.74	58.89	0.75	51.82	0.63	57.39	0.73	56.78	0.74	51.49	0.70
137Ba	1.31	0.02	1.03	0.01	1.02	0.01	0.94	0.01	1.03	0.01	0.83	0.01
208Pb	2.23	0.03	1.56	0.02	1.19	0.01	2.12	0.03	1.61	0.02	0.17	0.00
24Mg	1.25	0.02	1.68	0.02	1.63	0.02	1.49	0.02	1.14	0.01	0.62	0.01
31P	3.15	0.04	3.14	0.04	2.86	0.03	2.83	0.04	3.67	0.05	3.02	0.04
39K	1.84	0.02	1.01	0.01	1.68	0.02	1.26	0.02	2.00	0.03	1.15	0.02
44Ca	25.64	0.32	21.50	0.27	21.81	0.26	22.27	0.28	21.71	0.28	24.79	0.34
51V	0.50	0.01	0.45	0.01	0.26	0.00	0.84	0.01	0.41	0.01	0.22	0.00
52Cr	2.35	0.03	2.48	0.03	2.42	0.03	2.50	0.03	2.35	0.03	1.88	0.03
55Mn	1.40	0.02	1.93	0.02	1.34	0.02	1.81	0.02	0.92	0.01	0.49	0.01
56Fe	1.83	0.02	1.55	0.02	1.60	0.02	1.93	0.02	1.85	0.02	1.77	0.02
59Co	0.72	0.01	1.93	0.02	2.10	0.03	1.87	0.02	1.56	0.02	1.17	0.02
60Ni	2.10	0.03	2.38	0.03	2.82	0.03	2.32	0.03	3.02	0.04	2.26	0.03
65Cu	0.98	0.01	1.89	0.02	1.23	0.01	1.01	0.01	1.62	0.02	1.58	0.02
66Zn	16.79	0.21	13.23	0.17	16.40	0.20	17.16	0.22	16.88	0.22	17.17	0.23
75As	3.82	0.05	3.59	0.05	3.50	0.04	4.32	0.05	5.48	0.07	5.97	0.08
88Sr	1.55	0.02	0.30	0.00	0.01	0.00	0.51	0.01	0.65	0.01	0.99	0.01
9Be	21.65	0.27	28.72	0.37	22.87	0.28	28.89	0.36	27.03	0.35	28.56	0.39

**Tablo 23:** CRM700 Standartı Kullanarak Türkiye Mezarlık Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	59.44	1.00	58.27	1.00	59.86	1.00	58.29	1.00	57.87	1.00	58.90	1.00
111Cd	57.46	0.97	52.47	0.90	44.50	0.90	46.03	0.79	46.17	0.80	49.37	0.84
137Ba	1.65	0.03	1.55	0.03	1.48	0.03	1.06	0.02	1.06	0.02	1.50	0.03
202Hg	18.98	0.32	32.39	0.56	11.17	0.56	26.70	0.46	28.18	0.49	22.93	0.39
208Pb	0.97	0.02	1.45	0.02	0.92	0.02	1.26	0.02	0.54	0.01	0.77	0.01
24Mg	1.45	0.02	1.29	0.02	1.30	0.02	0.99	0.02	0.97	0.02	1.01	0.02
31P	2.82	0.05	1.98	0.03	2.65	0.03	2.13	0.04	2.05	0.04	1.81	0.03
39K	1.03	0.02	1.12	0.02	1.99	0.02	1.73	0.03	1.75	0.03	1.65	0.03
44Ca	1.33	0.02	1.66	0.03	1.38	0.03	1.42	0.02	1.12	0.02	0.96	0.02
51V	0.83	0.01	0.53	0.01	0.24	0.01	0.32	0.01	0.65	0.01	0.34	0.01
52Cr	2.30	0.04	2.42	0.04	2.24	0.04	2.45	0.04	2.26	0.04	2.25	0.04
55Mn	0.73	0.01	0.76	0.01	0.71	0.01	0.73	0.01	1.13	0.02	0.71	0.01
56Fe	1.07	0.02	1.21	0.02	0.94	0.02	0.97	0.02	0.87	0.02	0.84	0.01
59Co	3.47	0.06	2.57	0.04	2.26	0.04	2.31	0.04	2.39	0.04	2.56	0.04
60Ni	3.75	0.06	3.73	0.06	3.58	0.06	3.08	0.05	3.21	0.06	2.97	0.05
65Cu	1.83	0.03	2.56	0.04	2.13	0.04	1.67	0.03	1.68	0.03	1.45	0.02
66Zn	4.60	0.08	3.90	0.07	3.81	0.07	2.65	0.05	1.23	0.02	2.96	0.05
75As	9.32	0.16	8.35	0.14	8.49	0.14	8.39	0.14	7.95	0.14	8.22	0.14
88Sr	1.13	0.02	1.31	0.02	1.10	0.02	0.96	0.02	0.92	0.02	0.87	0.01
9Be	27.79	0.47	25.42	0.44	21.14	0.44	20.94	0.36	23.03	0.40	22.46	0.38

**Tablo 24:** CRM700 Standartı Kullanarak Pakistan Bahçe Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	52.56	1.00	51.63	1.00	51.98	1.00	50.80	1.00	52.88	1.00	48.84	1.00
111Cd	15.34	0.29	16.44	0.31	14.49	0.28	15.63	0.30	15.72	0.30	15.97	0.30
137Ba	1.84	0.04	0.29	0.01	1.72	0.03	1.64	0.03	1.47	0.03	1.86	0.04
208Pb	2.95	0.06	1.71	0.03	1.27	0.02	0.70	0.01	3.04	0.06	2.28	0.04
24Mg	0.87	0.02	0.97	0.02	1.05	0.02	0.47	0.01	0.78	0.01	0.73	0.01
31P	4.57	0.09	3.95	0.08	3.88	0.07	3.16	0.06	4.93	0.09	4.07	0.08
39K	0.90	0.02	0.79	0.02	0.65	0.01	0.35	0.01	0.97	0.02	0.65	0.01
44Ca	0.97	0.02	0.99	0.02	1.00	0.02	0.97	0.02	0.87	0.02	0.91	0.02
51V	0.87	0.02	0.83	0.02	0.80	0.02	1.34	0.03	0.52	0.01	0.74	0.01
52Cr	1.44	0.03	1.28	0.02	1.74	0.03	1.57	0.03	1.36	0.03	1.27	0.02
55Mn	0.59	0.01	0.57	0.01	0.93	0.02	0.61	0.01	0.72	0.01	0.94	0.02
56Fe	0.91	0.02	0.63	0.01	0.40	0.01	0.49	0.01	0.48	0.01	0.42	0.01
59Co	2.14	0.04	2.83	0.05	2.14	0.04	2.33	0.04	2.43	0.05	2.13	0.04
60Ni	1.62	0.03	1.27	0.02	1.76	0.03	1.32	0.03	1.23	0.02	1.85	0.04
65Cu	13.80	0.26	9.92	0.19	9.49	0.18	8.68	0.17	9.36	0.18	9.35	0.18
66Zn	1.83	0.03	1.63	0.03	1.14	0.02	1.72	0.03	1.81	0.03	1.65	0.03
75As	2.96	0.06	2.81	0.05	3.21	0.06	2.95	0.06	2.71	0.05	3.36	0.06
88Sr	0.95	0.02	0.41	0.01	0.81	0.02	0.55	0.01	0.52	0.01	0.54	0.01
9Be	38.32	0.73	34.36	0.65	33.05	0.63	36.01	0.69	31.29	0.60	39.49	0.75

**Tablo 25:** CRM700 Standartı Kullanarak Pakistan Mezarlık Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	56.30	1.00	52.02	1.00	54.00	1.00	52.36	1.00	52.45	1.00	51.89	1.00
111Cd	18.11	0.32	17.17	0.30	17.86	0.32	18.35	0.33	19.38	0.34	18.08	0.32
137Ba	1.52	0.03	1.48	0.03	0.74	0.01	0.69	0.01	0.42	0.01	0.75	0.01
208Pb	3.04	0.05	1.96	0.03	0.90	0.02	2.36	0.04	1.45	0.03	1.30	0.02
24Mg	1.90	0.03	1.24	0.02	0.97	0.02	0.89	0.02	0.79	0.01	0.19	0.00
31P	3.71	0.07	3.76	0.07	3.50	0.06	3.62	0.06	3.72	0.07	3.23	0.06
39K	2.62	0.05	1.07	0.02	1.17	0.02	1.29	0.02	1.00	0.02	0.96	0.02
44Ca	2.32	0.04	1.14	0.02	1.65	0.03	0.80	0.01	1.33	0.02	1.24	0.02
51V	2.08	0.04	1.59	0.03	1.04	0.02	1.39	0.02	1.77	0.03	1.85	0.03
52Cr	4.02	0.07	2.66	0.05	2.72	0.05	2.03	0.04	2.56	0.05	2.47	0.04
55Mn	1.95	0.03	1.47	0.03	0.79	0.01	0.93	0.02	0.98	0.02	0.96	0.02
56Fe	1.07	0.02	9.32	0.17	0.63	0.01	0.25	0.00	0.57	0.01	0.79	0.01
59Co	1.05	0.02	1.28	0.02	1.37	0.02	1.33	0.02	0.56	0.01	1.61	0.03
60Ni	5.20	0.09	4.20	0.07	4.12	0.07	3.90	0.07	4.22	0.07	3.51	0.06
65Cu	15.12	0.27	11.09	0.20	12.52	0.22	11.37	0.20	11.85	0.21	10.46	0.19
66Zn	1.41	0.03	1.20	0.02	0.86	0.02	1.75	0.03	1.31	0.02	1.05	0.02
75As	8.14	0.14	8.76	0.16	7.01	0.12	8.23	0.15	8.79	0.16	8.63	0.15
88Sr	1.06	0.02	1.74	0.03	1.97	0.04	0.73	0.01	1.31	0.02	1.01	0.02
9Be	29.94	0.53	24.85	0.44	29.75	0.53	21.25	0.38	24.54	0.44	26.69	0.47
202Hg	55.27	1.00	19.59	0.35	43.99	0.80	29.41	0.53	19.69	0.36	28.93	0.52



**Tablo 27:** CRM7002 Standartı Kullanarak Pakistan İnşaat Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	51.20	1.00	51.86	1.00	51.60	1.00	51.51	1.00	48.08	1.00	49.30	1.00
111Cd	14.92	0.29	13.54	0.26	14.51	0.28	13.07	0.26	13.19	0.26	13.26	0.26
137Ba	9.55	0.19	9.71	0.19	9.81	0.19	9.44	0.18	9.09	0.18	9.59	0.19
208Pb	8.61	0.17	6.39	0.12	10.98	0.21	8.89	0.17	10.62	0.21	8.34	0.16
24Mg	3.34	0.07	2.00	0.04	2.82	0.06	1.05	0.02	2.13	0.04	2.39	0.05
31P	16.53	0.32	15.96	0.31	15.50	0.30	16.19	0.32	15.29	0.30	15.03	0.29
39K	15.76	0.31	15.43	0.30	15.52	0.30	14.10	0.28	13.09	0.26	13.42	0.26
44Ca	10.88	0.21	9.03	0.18	9.61	0.19	9.04	0.18	9.61	0.19	10.22	0.20
51V	6.85	0.13	6.38	0.12	4.56	0.09	5.04	0.10	6.45	0.13	6.80	0.13
52Cr	3.93	0.08	3.59	0.07	4.23	0.08	3.81	0.07	3.04	0.06	3.93	0.08
55Mn	2.58	0.05	2.46	0.05	2.10	0.04	3.24	0.06	2.64	0.05	2.33	0.05
56Fe	7.90	0.15	7.42	0.14	7.28	0.14	6.80	0.13	7.46	0.15	7.39	0.14
59Co	12.85	0.25	11.18	0.22	12.39	0.24	12.38	0.24	12.46	0.24	11.64	0.23
60Ni	4.14	0.08	4.61	0.09	3.98	0.08	4.60	0.09	4.22	0.08	3.92	0.08
65Cu	7.68	0.15	7.17	0.14	6.88	0.13	6.92	0.14	7.89	0.15	6.50	0.13
66Zn	3.78	0.07	3.87	0.08	3.87	0.08	4.17	0.08	3.47	0.07	4.23	0.08
75As	1.27	0.02	1.40	0.03	1.61	0.03	1.97	0.04	2.43	0.05	2.57	0.05
88Sr	3.85	0.08	3.82	0.07	4.41	0.09	3.70	0.07	3.73	0.07	3.23	0.06
9Be	36.98	0.72	32.27	0.63	34.34	0.67	37.65	0.74	35.82	0.70	34.64	0.68
202Hg	8.47	0.17	15.50	0.30	13.90	0.27	19.33	0.38	18.72	0.37	15.85	0.31



**Tablo 28:** CRM73002 Standartı Kullanarak Türkiye Nehir Kenarındaki Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	75.77	1.00	78.24	1.00	74.16	1.00	74.53	1.00	74.36	1.34	73.63	1.00
111Cd	22.08	0.29	26.53	0.35	26.15	0.35	24.08	0.32	26.17	0.35	202.80	2.68
137Ba	2.99	0.04	2.74	0.04	0.74	0.01	2.18	0.03	1.98	0.03	2.05	0.03
208Pb	2.09	0.03	3.26	0.04	4.45	0.06	2.84	0.04	2.78	0.04	1.85	0.02
24Mg	2.81	0.04	1.93	0.03	1.08	0.01	1.20	0.02	1.97	0.03	1.20	0.02
31P	17.19	0.23	56.62	0.75	69.74	0.92	29.47	0.39	146.68	1.94	29.93	0.39
39K	8.98	0.12	17.90	0.24	16.88	0.22	16.78	0.22	16.27	0.21	17.38	0.23
44Ca	6.68	0.09	6.92	0.09	5.36	0.07	6.97	0.09	7.26	0.10	6.57	0.09
51V	3.49	0.05	3.80	0.05	3.15	0.04	3.10	0.04	4.19	0.06	3.31	0.04
52Cr	2.51	0.03	2.09	0.03	2.35	0.03	2.97	0.04	2.17	0.03	3.41	0.05
55Mn	1.07	0.01	0.86	0.01	1.46	0.02	0.97	0.01	1.12	0.01	2.66	0.04
56Fe	2.80	0.04	2.38	0.03	2.29	0.03	2.37	0.03	1.25	0.02	1.69	0.02
59Co	8.20	0.11	8.15	0.11	12.25	0.16	9.07	0.12	12.79	0.17	9.01	0.12
60Ni	3.21	0.04	3.91	0.05	4.56	0.06	3.79	0.05	5.20	0.07	3.22	0.04
65Cu	8.02	0.11	14.73	0.19	14.48	0.19	8.82	0.12	7.67	0.10	7.72	0.10
66Zn	4.07	0.05	3.79	0.05	1.70	0.02	4.41	0.06	4.31	0.06	3.36	0.04
75As	1.77	0.02	0.98	0.01	0.78	0.01	0.05	0.00	0.33	0.00	1.95	0.03
88Sr	3.91	0.05	2.90	0.04	1.47	0.02	3.77	0.05	2.33	0.03	3.19	0.04
9Be	47.38	0.63	41.16	0.54	45.50	0.60	40.70	0.54	48.35	0.64	47.73	0.63
202Hg	55.54		131.50		246.36		140.58		1129.43		16.46	

**Tablo 29:** CRM73002 Standartı Kullanarak Pakistan Nehir Kenarındaki Toprağının Değerlendirilmesi

Elementler	Toprak (1.gün)		Toprak (5.gün)		Toprak (10.gün)		Toprak (20.gün)		Toprak (30.gün)		Toprak (60.gün)	
	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri	Q Test değeri	Normalize değeri
23Na	61.13	1.00	62.05	1.00	62.82	1.00	62.44	1.00	60.24	1.00	60.48	1.00
111Cd	34.28	0.56	33.39	0.55	33.29	0.54	30.75	0.50	38.49	0.63	31.71	0.52
137Ba	2.71	0.04	1.94	0.03	2.90	0.05	2.53	0.04	1.12	0.02	1.96	0.03
208Pb	3.05	0.05	2.75	0.05	1.37	0.02	3.44	0.06	3.05	0.05	3.78	0.06
24Mg	1.83	0.03	1.04	0.02	0.24	0.00	0.47	0.01	1.37	0.02	1.19	0.02
31P	3.63	0.06	3.48	0.06	3.15	0.05	3.38	0.06	3.61	0.06	9.67	0.16
39K	6.52	0.11	6.18	0.10	6.55	0.11	8.55	0.14	7.46	0.12	5.70	0.09
44Ca	1.11	0.02	1.51	0.02	1.74	0.03	1.47	0.02	2.21	0.04	0.90	0.01
51V	3.58	0.06	3.03	0.05	3.82	0.06	4.77	0.08	3.43	0.06	2.57	0.04
52Cr	2.90	0.05	1.85	0.03	1.55	0.03	2.58	0.04	3.97	0.06	1.68	0.03
55Mn	1.15	0.02	1.05	0.02	0.82	0.01	1.01	0.02	1.50	0.02	1.21	0.02
56Fe	4.63	0.08	3.78	0.06	3.15	0.05	3.29	0.05	2.00	0.03	2.77	0.05
59Co	4.06	0.07	3.62	0.06	4.19	0.07	3.81	0.06	3.04	0.05	3.63	0.06
60Ni	4.38	0.07	3.65	0.06	4.13	0.07	3.45	0.06	5.40	0.09	1.74	0.03
65Cu	5.17	0.08	5.05	0.08	4.27	0.07	6.39	0.10	6.48	0.11	6.80	0.11
66Zn	9.13	0.15	8.30	0.14	8.70	0.14	8.61	0.14	11.09	0.18	8.76	0.14
75As	2.59	0.04	1.17	0.02	1.06	0.02	1.29	0.02	1.70	0.03	2.59	0.04
88Sr	2.26	0.04	1.84	0.03	1.44	0.02	1.79	0.03	1.60	0.03	1.44	0.02
9Be	37.72	0.62	35.42	0.58	36.14	0.59	35.83	0.59	35.81	0.59	35.42	0.58
202Hg	68.12	1.11	61.61	1.01	56.68	0.93	34.59	0.57	40.89	0.67	66.59	1.09

## V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda toprağın adli kanıt olarak öneminin gösterilmesi amaçlanmaktadır. Toprağın organik içerik olarak karşılaştırılması toprak çeşitlerini, toprağın DNA tutma yeteneğini, zamana bağlı olarak DNA miktarı, saflığı ve bozulması üzerine etkisini göstermektedir. Bu çalışmanın ana ilgi noktası kan ile lekelenmiş topraktan ekstrakte edilen DNA'dan PCR sonuçlarının elde edilip ve genotiplerin değerlendirilmesidir. Bununla birlikte inorganik analiz ve ICP-MS ile yapılan karşılaştırma farklı orijinlerdeki toprakların inorganik bileşimini göstermektedir. Renk, pH gibi toprak koşulları toprak kan ile lekelenmeden önce not edilmiştir. Toprak lekelenmeden önce çevre koşulları ve sıcaklıktaki değişimler sistematik olarak kaydedilmiştir.

Kestle mayer testinin amacı farklı tipteki topraklardan farklı zamanlarda toplanan toprak örneklerinde hemoglobin (kan) varlığını belirlemektir. Kristal testleriyle de örneğin kan olduğu doğrulanmalıdır (Borrman ve ark., 1977). Kestle Mayer testi (Kastle J. St., 1909) hemoglobinle reaksiyona giren (bazen patates ve yaban turbu) kimyasal fenolfitaleyni kullanır, fenolfitaleyn açık pembe renk oluşmasına neden olan peroksidaz enzimini açığa çıkarır. Kestle Mayer testi 1:10<sup>7</sup> dilüsyonlardaki kanı bile tespit edebilir (Meyer ve ark., 2006, Cox M., 1991). Zaman geçtikçe kan proteinleri ve kan bileşenleri zarar görebilir ve örnekler toplandıktan sonraki toprak analizinde mevcut olmayabilir veya çok az miktarlarda bulunabilir, toprak kanı etkileyebilir veya zamanla birlikte topraktaki kan elemanları bozulabilir. Bu hipotezi doğrulamak için kestle mayer testinden sonra nicel ve nitel analizler yapılmalıdır. Tüm örnekler laboratuvarında manuel olarak hazırlanan reaktiflere tek tek maruz bırakıldı. Toprak örnekleri kurutuldu fakat içerisinde kan bileşenleri olduğu için çok az miktarda alındı ve reaktifler uygulandı. Beklenildiği ve belirtildiği üzere birçok örnek pozitif sonuç verdi, açık pembe renk oluştu, birçok örnekte hem grubu belirlendi (Şekil 7).

Negatif örneklerde herhangi bir renk oluşmadı. Kestle mayer testi doğrulayıcı bir test değildir ve zayıf bir testtir. Hem grubu ile temas eden fenolfitaleynin peroksidaz enzimini harekete geçirmesi sonucu pembe renk oluşur. Ancak patates ve yaban turpu gibi ürünlerle de peroksidaz enzimi bazen yalancı pozitif sonuç verebilir (Borrman ve ark., 1977). Şunu da belirtmek gerekir ki çalışmanın ileri aşamalarında kestle mayer testinde yalancı pozitif olan bazı sonuçlar ICP-MS ile çalışırken negatif sonuçlar vermiştir. Aynı tip sonuçlar PCR sonrasında ABI

310 genetik analizör cihazındaki analizde de gözlenmiştir. Bu durum, bahçe topraklarında bu enzimin varlığına bağlı olarak test boyunca oluşan renk oluşumu sebebiyle yanlış pozitif sonuçlar verilebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın diğer bir amacı ise farklı toprak örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapmaktır. Toprak örnekleri Pakistan ve Türkiye'nin doğal çevresinden alındı. Pakistan'da yaz sıcaklığı aralığı 38-47°C olduğundan bu şartlarda örnekler fazla bozulmuştu. Araştırmaya göre, ısı şokları (41-50°C) intra-nükleer mega protein-nükleik asit kompleksleri içindeki protein topluluklarını değiştiren nükleer protein açılmalarına neden olmaktadır (Roti ve ark., 2007). Yüksek sıcaklık, kuru iklim, düşük nem ve pH'ın yüksek olması nedeniyle mikroorganizmalar kışın az görülmektedir. Türkiyede yazın sıcaklık aralığı 30-38°C'de toprak örnekleri aynıdır fakat nem ve mikroorganizma popülasyonu Pakistan ile karşılaştırıldığında daha fazladır. Bununla birlikte humus nedeniyle toprak verimlidir ve organik bileşenler açısından zengindir. Kazutoshi (2009) tarafından yapılan bir çalışmada toprağın organik durumunun DNA adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemiştir. Bunun için hidrojen peroksidad ile muamele edilmiş, ısıtılmış (400°C) ve çamur eklenmiş örnekler kullanılmıştır. Bu çalışmada çamur eklenmiş olan toprağın orjinal toprağa göre önemli ölçüde daha az DNA adsorbladığı gösterilmiştir.

Farklı çevrelerden alınan örnekler için DNA ekstraksiyon işlemi fazla zaman alır ve modifikasyon yapılabilir çünkü bilinen kanla lekelenmiş toprak örneklerinde DNA ekstraksiyon protokolü bildirilmemiştir. Fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi (Singer ve ark., 1988) uygulanan toprak örneklerinin hepsinde iyi sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle topraktan mikrobiyal DNA ekstraksiyonu için bildirilen başka bir yöntemde (Walsh PS., 1991) bazı modifikasyonlar yapılarak denendi fakat yine de iyi sonuçlar elde edilememiştir. Bütün topraklardan ekstraksiyon yapıldığında özellikle 20 günden sonra alınan örnekler için ekstraksiyon başarılı değildi. Sodyum klorür-sodyum asetat yöntemi (SSC ekstraksiyon Metodu) ([www.genome.ou.edu/protocol\\_book/protocol\\_partIII.html#III.H](http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_partIII.html#III.H)) kullanıldı. %0.9 sodyum klorür yöntemine (Yeates ve ark., 1997) başvuruldu ve sonuçlar elde edildi. Hem SSC hem de %0.9 NaCl yöntemi ürün ve kaliteye ilişkin iyi sonuçlar verdi. Deneysel işlemler sonuç kısmında ayrıntılı olarak açıklanmıştır. İyi ürün verdiği, az zaman gerektirdiği ve diğer metodlara göre ucuz olduğu için DNA ekstraksiyon yöntemi olarak SSC kullanılmasına karar verildi. Proteinaz K uygulanması ve inkübasyon süresi ile ilgili bazı modifikasyonlar yapıldı ve iyi sonuçlar elde

edildi. Bu çalışmada farklı topraklardan DNA ekstraksiyonu için yeni yöntem optimize ve valide edildi.

Tüm toprak tiplerinde DNA izolasyonu yapıldı, nicel ve nitel analizler gerçekleştirilip karşılaştırma yapıldı (Şekil 8). Toprak yüzey özellikleri ve yapısı nedeniyle kişiler ile olay yeri arasında bağlantı kurulmasıyla ilgili oldukça önemli bilgiler sağlayabilir. Toprağın delil olarak değeri onun karakteristiğindeki değişime dayalıdır (Murray, RC., 1975, 1991, 2000). Pakistan'dan toplanan bahçe toprakları organik açıdan zengindir ancak düşük nem ve yüksek sıcaklık nedeniyle düşük mikroorganizma aktivitesi görülür. Bock and Norris (Bock JH, Norris DO. 1997) adli botaniğin bir parçası olarak bitki anatomisinin katkısını tanımlamıştır. Türkiye'den alınan bahçe toprağı ise humus bakımından zengindi, mikroorganizma bol miktarda bulunmaktaydı ve bu nedenle bahçe toprağının karmaşık bir yapısı vardır. Sadece mineral, oksitler, organik madde, mikroorganizmalar ve onların materyalleri gibi bileşenleri içermez, ayrıca partiküllerin büyüklüğü ve yoğunluk gibi fiziksel yapısı da önemlidir (Murray, RC., 1975, 1991, 2000, Mcphee, J., 1996). Yüksek sıcaklık nedeniyle DNA'nın niteliği ve niceliği de etkilenmektedir. Roti ve arkadaşlarına göre, nükleer yapı ve DNA tamir yollarıyla ilgili yeni bilgiler, hiperterminin bu süreç içinde yer alan proteinler üzerine etkisi için yeni bakış açıları getirmiştir. Nükleus, DNA'nın paketlenmesi, tamiri, replikasyonu ve transkripsiyonu gibi çeşitli nükleer fonksiyonları yürüten mega protein-nükleik asit komplekslerinden oluşmaktadır (Roti ve ark., 2007). Böylece, yüksek sıcaklık bu süreçlere ve DNA ürününe zarar verebilir. Örneklerden sırasıyla 1, 5, 10, 20, 30 ve 60 günlük zamanlardan sonra örnek alınarak 2311, 1366, 850, 668, 256 ve 60ng/ul DNA ürünü elde edildi. Görüldüğü kadarıyla ilk üç toplamada OD 1.5 olarak hesaplanarak yüksek kalitede DNA görüldü ancak zamanla azalmaya başladı. DNA miktarı, A260/A280 değerinin sulandırma faktörü ve çift zincirli DNA için sabit bir değer olan 50 ile çarpılarak hesaplanır. A260/A280 oranı DNA saflığını hesaplamak için kullanılır. A260/A280 oranı 1.5 ile 1.8 arasında ise genellikle yüksek kalitede DNA örneği olarak kabul edilir. Oran nükleik asitsiz A320 absorbansı düşüldükten sonra hesaplanabilir (Wilfinger W., 1997; Glasel, 1997; Manchester, 1995). 10 gün sonra DNA kalitesi PCR yapılması için iyi bir kalite olarak görülmeyen 1.4'e düştü. 20.günden sonra OD değeri düşmeye devam etti ve 1.19 oldu. PCR sonuçları düşük kalite sonuçları elde edilmesiyle zamanın oldukça büyük bir etkisi olduğu doğrulanmış ve bazı örneklerde kapiler elektroforez yapıldığında bir çoğalma olmadığı görülmüştür. 30. günde toplanan örneklerde kalite yine düştü. En fazla bozulma ise 60. günde

toplanan örneklerde görüldü ve OD değerleri insan DNA'sı için olmayan 0.387 olarak belirlendi (Tablo 8, Şekil 9). Roti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DNA replikasyon komplekslerindeki sıcaklık artışına bağlı değişimler ile sıcaklıkla ürünün azalması arasında bağlantı olabileceğini göstermektedir (Roti ve ark.,2007). Bu değerler DNA bulunduğunu fakat bunun insan kaynaklı olmayabileceğini ancak mikroorganizma DNA'sı olabileceğini ve PCR için önerilen bir durum olmadığını göstermektedir. Bu örneklerde yapılan kestle mayer testi çok düşük miktarlarda olsa dahi hemoglobin olduğunu gösteren pozitif sonuç vermiştir fakat agaroz jel elektroforezi ve PCR bu hipotezi desteklememiştir. Meyer ve arkadaşları, (2006) ve Cox M., (1991)e göre, örnek içindeki oksitlenen türler yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Bakır ve nikel tuzları gibi oksidan kimyasallar Kastle-Meyer reaktifinin pembe renge dönüşmesine neden olabilir. Bu örneklerdeki renk oluşumu bu tuzlardan herhangi birinin varlığından kaynaklanabilir. Bahçe toprağından alınan negatif örneklerde DNA ürünü görülmemiştir bu nedenle PCR sonucuda yoktur. Grafik açıkça DNA'nın zamanla bozulmasını ayrıca zor hava koşulları nedeniyle kalitenin azalışını da göstermektedir. Chernikov, DNA'ya en fazla sıcaklık-artışı zararlarının (depürinasyon, guaninin 8-oksiguanine oksidasyonu, sitozinin urasile deaminasyonu) çevredeki oksijen içeriğinin artmasına bağlı olduğunu göstermiştir (Chernikov ve ark., 2006). Kanın absorbansı elde edilen diğer bir faktördür. Bahçe toprağının gözenekli yapısı nedeniyle kan toprak üzerinde yayılmış, tamamen absorblanmış ve zamanla DNA'nın bozulması ile ilgili sonuçlar vermiştir.

Türkiye'den alınan topraklarda, ilk gün bile toprak tipinin farklı ürünler verdiği açıkça görülebilmektedir. Burada elde edilen DNA (1711ng/ul) Pakistan'daki bahçe toprağından elde edilene göre daha azdır (2311ng/ul). Belirli aralıklardaki DNA ürünü 1711, 1486, 1338, 808, 395 ve 70ng/ul'dir. DNA'nın (kalite) bozulma oranı Pakistan bahçe toprağından daha fazladır, bu durum muhtemelen mikroorganizma varlığından kaynaklanabilir. Ancak, hava koşulları nedeniyle kademeli olarak miktardaki düşüş çok fazla değildir. Az ürün olması humus nedeniyledir diyemeyiz, çünkü humusun DNA absorpsiyonu üzerindeki etkisi azdır. Kazutoshi, yaptığı bir araştırmada toplam karbon içeriği (T-C) ile bir toprağın DNA absorpsiyonun arasında herhangi bir bağlantı olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar toprağın organik yapısının DNA adsorpsiyonu üzerine katkısının az olduğunu öne sürmektedir (Kazutoshi ve ark.,2009). Toprak tipi ve hava koşullarının özellikle suyun DNA kalitesi ve miktarı üzerine çakışan etkisi vardır. Suyun moleküler hafıza özelliğinin DNA'nın yoğunlaştırılmış halinin stabilizasyonunu ve

şeklini etkilediği gösterilmiştir (Tsygankov V. S. ve ark., 2002). Dolayısıyla üründeki azalma suyun DNA'sının yoğunlaşmış hali üzerine etkisi nedeniyle oluşabilir. Üründeki kademeli azalma yavaştır ve uygun miktar 2 ay sonrasında elde edilebilir fakat kalitesi PCR yapabilecek ve ABI 310 genetik analizörde analizi yapılabilecek kadar iyi değildir. Grafikselleştirme, DNA miktarı üzerine zor hava şartlarının etkisini açıkça belirtirken mikroorganizma, humus ve organik içeriğin zamanla DNA kalitesi üzerine etkisini göstermektedir. Kalite değerleri ilk gün 1.5'ten başlarken 60 gün sonra 0.6 olmuştur. Kestle mayer testi sonuçları bazı örnekler için 60 gün sonra pozitif ancak daha sonraki analizler bu örneklerde kontaminasyon ve alel düşmesi gibi problemlerle sonuçlar oluşabildiğini göstermiştir (Tablo 12, Şekil 14).

Her iki bölgeden alınan bahçe toprağının karşılaştırmalı sonuçları zaman periyodu, toprak tipi ve çevre şartlarının birbirleriyle paralel gittiği ve bunlardan herhangi birindeki değişimin biyolojik materyalin kalite ve miktarını değiştirebileceğini göstermektedir. Bunun yanında mikroorganizmaların DNA kalitesi ve kan içeriği üzerine büyük etkisi vardır. Ekstraksiyon sonrası agaroz jelde örneklerdeki mikrobiyal ve insan DNA'larının varlığını gösteren düşük moleküler ağırlıklı DNA fragmentleri görülmüştür. Sıcaklığın biyolojik materyale doğrudan etkisi incelendiğinde Pakistan'dan alınan örneklerde Türkiye'den alınanlara oranla daha az miktarda ürün elde edilmiştir.

PCR farklı topraklardan 6 zaman aralığında seçilen örneklerde yapılmıştır. STR tipleme diğer tipleme yöntemlerine göre daha toleranslıdır çünkü amplifikasyon ürünü 500 baz çiftinden daha kısadır. AMP-FLP (Budowle, B. ve ark., 1991) kullanılarak veya VNTR analizinde (Nakamura, Y. ve ark., 1987) belirlenen materyalden daha küçüktür. Ayrıca STR tipleme PCR'a uyumlu olan çeşitli hızlı DNA saflaştırma tekniklerine uygundur fakat Southern blot esaslı analizler için yeterli kalitede DNA sağlayamaz. Çalışmamızda Promega PowerPlex® 16 System STR tipleme için kullanıldı. PowerPlex® 16 Sistem'de yer alan lokuslar seçildi çünkü bunlar dünya genelinde birçok standardizasyon şartlarını sağlamaktadır (Griffiths, R. ve ark., 1998). Her iki ülkenin bahçe topraklarından toplam 20 örnek PCR deneyleriyle analiz edildi, sonuçlar ABI 310 genetik analizörde analiz edildiğinde 8 örnek tek bir reaksiyonda tüm profili verdi. The PowerPlex® 16 Sistem tek bir reaksiyonda tüm CODIS lokuslarını amplifiye eder (Levinson, G. and Gutman, G.A. 1987). Örneklerin toplanmasında 10 güne kadarki sürede bir problem gözlenmedi. Sadece Minifiler kullanıldığında 10. günde bazı bozulmalar görülebileceği tahmin edildi ve tek bir lokusun kaybolduğu görüldü (Penta E). Daha sonraki periyotlarda

amplifikasyon veya alel düşmesine rastlanmadı. Alel düşmesi bir örnek tiplendiğinde oluşur ve bir veya daha fazla alel kaybolmaktadır. Bu durum başlangıçtaki DNA miktarının çok az olması sonucu örnekte bir veya daha fazla alelin amplifiye olmaması gibi çeşitli faktörler nedeniyle oluşabilir. Primer bağlanma bölgesindeki bir mutasyon alelin çoğalmasını engelleyebilir. Alel boyutu belirli bir lokus için normal bulunma alanı dışında ise belirlenemez (Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992). DNA kalitesi ve miktarı humus, su ve sıcaklık nedeniyle değişti böylece örneklerde bu faktörlerin ürünlere ve bozulmaya olan doğrudan etkisi nedeniyle alel düşmesi görüldü. Minifiler kit yüksek oranda bozulmuş ve inhibe olmuş DNA örnekleri için önerilmektedir. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (MiniFiler kit) bozulmuş örneklerin ve/veya inhibe olmuş DNA örneklerinin genotiplenmesi için optimize edilmiş bir sistemdir. MiniFiler kit tek bir PCR'da sekiz otozomal STR lokusunu (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO and FGA) ve cinsiyet tayininde kullanılan Amelogenini çoğaltabilmektedir (Applied Biosystems MiniFiler kit User manual, 2007). ABI prism 310 genetik analizör için olan kimya referansında ve GeneScan Referans rehberinde pozitif kontrolden iyi sinyaller alınabileceği ancak örnek DNA'dan zayıf sinyal alınabileceği veya hiç sinyal alınamayacağı belirtilmiştir. Bu durum örneğin PCR inhibitörleri (örnek olarak hem bileşenleri, EDTA veya bazı boyalar) nedeniyle oluşabilir. Bu problem Quantitate DNA kullanılarak, gerekli olan en az hacmi eklemek için dilüe ederek, çoğaltma işlemini tekrarlayarak, örneği Amicon Centricon-100 kolonda yıkayarak veya PCR reaksiyon karışımına sığır serum albumin (bovine serum albumin-BSA) ekleyerek çözülebilir (GenScan Reference Guide, 2000) (Tablo 16).

Bu çalışma için alınan diğer toprak tipi inşaat alanından alındı. Bu tip toprak fazla miktarda kum, çimento, CaCO<sub>3</sub> bileşeni içerir. Kanın etkisi kalite ve miktara ilişkin olarak farklı olabilir. Bunun yanı sıra bu gibi alanlardaki toprak herhangi bir olay için potansiyel kaynak olabilir, bu durumda kanıtların (kan) ne kadar sürede toplanabileceği ve DNA'nın ekstrakte edilebileceği önemlidir. Junger tarafından sistematik olarak toplanan toprak örneklerinden havayla kurutulan toprak renginin ayırım gücü ve partikül büyüklüklerinin dağılımı incelenmiştir (Junger EP., 1996). Örnekler belirli aralıklarla toplandı, ürün ve kalite ölçüldü. Üründeki kademeli olarak düşüş birinci gün 1860ng/ul'den başlayarak 5.gün 1698ng/ul, 10.gün 1438ng/ul, 20.gün 1268ng/ul, 30.gün 1153ng/ul ve 60.gün 880ng/ul olarak belirlendi (Tablo 9, Şekil 10). İnşaat alanındaki toprak doğası gereği yoğundur, kireçli kum ve silt partiküllerden oluşur



dolayısıyla tüm bu içerik geçirgen yapısı sayesinde sızma etkisi daha fazla olan diğer toprak tiplerine göre kanın yüksek miktarlarda absorblanma şansını azaltır. Kan, parçalanma olmadan, renkte ve diğer fiziksel özelliklerde değişim olmadan bu tip topraklarda uzun süre kalabilir. Diğer örneklerde ise absorbans ve hava koşulları nedeniyle kanın rengi ve fiziksel özellikleri zamanla değişebilir. Belirli periyotlar boyunca kalite değerleri (Wilfinger, W., 1997; Glasel, 1997; Manchester, 1995) beklenildiği kadar yüksek değildir (1.5-1.1). Bunun nedeni tozla beraber olan karbonat ve kalsiyum partiküllerinin varlığı olabilir. Mikroorganizma aktivitesi neredeyse sıfırdı dolayısıyla kalite mikrobiyal aktivitesi yüksek olan yerlerden toplanan örneklerle kıyasla daha iyiydi. Örneklerde renk oluşumu bu tuzların varlığı nedeniyle olabilir.

Aynı şekilde Türkiye'deki inşaat alanından elde edilen toprak örnekleri çevresel değişimlere karşı sabit ve kararlı idi. Yüksek miktarlarda DNA elde edildi. Bu örneklerdeki ürünler 2110ng/ul ile başladı ve 1996ng/ul olarak elde edilen miktar ile 5 gün sonra bile dikkate değer bir değişim gözlenmedi. Önemli bir düşüşün yaşanmadığı aynı durum ileriki periyotlarda da görüldü. 60 gün sonra 883ng/ul DNA elde edildi (aynısı Pakistan inşaat alanındaki toprak örneklerinde de elde edildi). Alanlardan elde edilen ürünlerde açıkça belli olan gerçek düşük mikroorganizma ve düşük organik içeriklerde DNA ürünleri sabittir. Az nemli topraktaki bozulma da azdır ve sonuçlar sabittir. Yan Xun'a göre, bağıl nemin düşmesiyle gerilim aralığı sınırlanmaya başlar ve maksimum iletkenlik doğrusal olmayan bir şekilde azalır. Bağıl nem belli bir değere ulaştığında DNA iletkenliği sabit bir duruma yaklaşır. stabilize (Yan Xun ve ark.,2006). Biyolojik materyaldeki az bozulma nedeniyle kalite de yüksektir. PCR yapabilmek ve ABI 310 genetik analizörde değerlendirme yapabilmek için iyi kalitede DNA'yı gösteren OD değerleri 1.5-1.3 arasında olması gereklidir (Tablo 13, Şekil 15).

İki farklı yerdeki toprak örneklerinin sonuçları karşılaştırıldığında, zamanla kalite ve miktar yüksek kalmakta, kanın yanı sıra içindekiler (DNA) üzerinde fazla bir etkisi olmamaktadır. Kurumuş kan lekeleri Kestle mayer testinde iyi sonuçlar verir ve sonrasında ekstraksiyon yapılır. Agaroz jel elektroforezinde de iyi sonuçlar elde edildi ancak toprakta mikroorganizma olmaması nedeniyle örneklerde düşük moleküler ağırlıklı DNA yoktu. İnşaat alanından elde edilen örnekler değişime ve hızlı hasara karşı dirençlidir. Örneklerde görülen kalite varlığı uzun zaman sonra bile DNA profillemesi yapılmasında yararlıdır.

İnşaat alanından alınan topraklarda PowerPlex® 16 System oldukça iyi sonuçlar verdi ve ilk günde alınan örneklerle son günde alınan örneklerde bir zorlukla karşılaşılmadı. Bu tür bir

toprak, yapısı gereği uzun süreli koruyucu olduğundan biyolojik materyaller için iyi bir kaynaktır (Tablo 17). Diğer toprak türlerinde biyolojik materyallerin, inhibisyonu ve yıkımına neden olan faktörler (hem grupları gibi), bu topraklarda daha az olduğundan biyolojik materyaller daha uzun süreli korunurlar..

İçerdiği doğal elementlere bağlı olarak toprak zenginleşir. Zamanla bu içerik tekrar karışır ve topraklar potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfat ve iyonca zenginleşir. Ölü vücudun çürümesi ve parçalanması bu bölgedeki toprağın organik içeriğini mikroorganizmalarca ve diğer küçük böcekler ve hayvanlarca zengin duruma getirir. Pek çok olayın gerçekleştiği çakıllı toprak iyi bir delil kaynağı olabilir. Bir kazada şüphelinin arabasında bulunan toprak örneği aracın döşemesinde bulunan örnek ile karşılaştırılmıştır. Arabadan alınan küçük kaya parçaları (örnek) ile olay yeri olan çakıllı topraktan alınan örnekleri karşılaştırıldığında örneklerin aynı olduğu görülmüştür (Murray, RC., 1975, 1991, 2000, Mcphee, J., 1996). Mezarlık toprakları benzersizdir ve toprağın alt tabakasından üst tabakasına kadar her bölümünde farklı nem içeriği görülür. Bu topraklar doğal por yapısına sahiptir ve kan toprağa döküldüğünde toprak tarafından kan hemen absorbe edilir. Bu tezde belirli periyotlarda mezarlık toprağından toplanan örneklerin zamana bağlı olarak saflık ve miktar değişiklikleri çalışıldı. Sonuçlara göre bütün topraklarda DNA miktarının en hızlı düştüğü zaman ilk örnek alımından sonraki zamandır. İkinci örnek alımında ise DNA miktarının hemen hemen yarıya indiği görüldü. Örnekler 1, 5, 10, 20, 30 ve 60. günlerde toplandı ve 1741, 1031, 856, 543, 375 ve 35 ng/µl DNA elde edildi. Bu sonuçların zamana göre miktar değişikliği grafik olarak çizildiğinde DNA miktarlarında düşüşler görüldü. Çok sayıda hayvan ve mikroorganizma biyolojik materyalin (kanın) çok fazla zarar görmesine neden olur. Kanın rengi incelendiğinde renkte de değişiklikler gözlemlendi. Grafik çizimlerinde düşük kalite değerleri görüldü (Wilfinger, W., 1997; Glasel, 1997; Manchester, 1995). İzolasyon sonrasında düşük moleküler ağırlıklı DNA ile insan DNA'sı agaroz jelde yürütüldüğünde farklı bölgelerde bantlar görüldü. Bu toprağın çoğu örneğinde aynı problem görüldü. 20 günden sonra alınan örnekler PCR sonrasında analiz edildiklerinde tam profiller elde edilemedi. Alel düşmeleri (allel drop out) ve kontaminasyonlar görüldü. 60 günden sonra alınan örneklerde DNA bulunmasına karşın CODIS lokuslarını içeren Powerplex kit (Griffiths, R. ve ark., 1998) ile yapılan PCR sonucunda bu lokusların hiçbirinin çoğalmadığı görüldü (Tablo 10, Şekil 11). Bu sonuç elde edilen DNA'nın insan kaynaklı olmadığını göstermektedir. QuantiDuo kit DNA miktarını ölçmekle beraber DNA'nın insan DNA'sı olup olmadığını da belirler. Bu tür

kontamine örneklerde DNA'nın insana ait olup olmadığının anlaşılması için QuantiDuo kit kullanılması karışıklıkları çözebilir.

Türkiye mezarlık topraklarından elde edilen sonuçlar Pakistan mezarlık toprakları ile benzerlik göstermektedir. Ancak saflık değerleri karşılaştırıldığında bu değerlerin farklı olduğu görüldü. 60 günden sonra alınan toprak örneğinin DNA miktarı 1601ng/μl olmasına rağmen DNA elde edilemedi. Bu iki sebepten kaynaklanabilir. Birincisi Pakistan ile karşılaştırıldığında Türkiye'deki topraklarda daha yüksek nem vardır. İkincisi toprakta bulunan mikroorganizmaların ve diğer canlıların yüksek dekompozite oranlarından kaynaklanabilir. Ayrıca örnek toplama periyodu içinde yağın yağmur örnekleri uzaklaştırdığı için 60 günden sonraki örneklerden DNA elde edilememiş olabilir (Tablo 14, Şekil 16). Biyolojik örneklerde yüksek degradasyon gösteren Türk mezarlık toprakları Pakistan mezarlık toprakları ile karşılaştırıldığında daha nemli, verimli ve zengin içerikli olduğu görüldü. Örneklerin daha fazla bozulmaları Türk topraklarında daha fazla mikroorganizma popülasyonunun bulunduğunu göstermektedir. Buna göre DNA miktarındaki düşme çevresel faktörler ve mikroorganizma popülasyonuna bağlıdır. Pakistan'dan alınan örneklerde degradasyon ve düşük moleküler ağırlıklı DNA görülmüştür ve QuantiDuo kit kullanılması önerilebilir.

Örneklerin saflık değerleri çok yüksek değildi ve PCR yapıldığında kabul edilebilir sonuçlar alınamadı. DNA saflığı da nem ve su içeriğinden etkilenmektedir. Son zamanlarda alınan bozulmuş toprak örneklerinde alel düşmeleri, stutter artefaktlar görülmüştür. 60 günden sonra OD değeri 1.278 olmasına rağmen ABI 310 genetik analizörde yapılan fragment analizinde hiçbir genotip elde edilemedi. Türk örneklerinde de saflık nemli çevreden etkilenmiştir ve alel düşmeleri görülmüştür.

Mezarlık toprağına ait örneklerin PCR ve fragment analizleri için beklenen sonuç alınamadı. Kontaminasyon, düşük pik yükseklikleri ve stutter artefaktlar görüldü. PowerPlex® 16 Sistem iki düşük stutter olasılığı içeren, beş nükleotid tekrarlarından oluşan yüksek polimorfik Penta E ve Penta D lokuslarını içerir. Penta E ve Penta D lokuslarında az görülen stutter artefaktı adli olaylarda karışık örneklerin analizine uygun lokuslardır. Kit içerisindeki stutter oluşma oranı az olmasına rağmen; DNA'da nem, mikroorganizma popülasyonu ve sıcaklığa bağlı olarak oluşan degradasyonlarda çok fazla stutter artefakt görülebilir. Tekrar eden kaymalar (repeat slippage) (Levinson, G. and Gutman, G.A. 1987) diğer bilinen isimleriyle n-4 bandlar, stutter veya gölge bantlar; DNA amplifikasyonu boyunca tekrar ünitelerinin eksilmesi,

DNA'daki somatik varyasyon veya ikisinin birden etkisi ile oluşur. Stutter artefaktlar DNA tiplemedesinde esas alel pik yüksekliğinin % 15' inin altında görülür. Karışık ve tek kaynaklı örneklerin ayırımında stutter artefaktı DNA tipleme yapılrken yanılgıya sebep olabilir. Bu artefaktın miktarı lokusa ve amplifiye olmuş DNA dizilerine bağlıdır. Bu artefaktın oranı öncelikle çalışılan lokusa ve çoğaltılan DNA bölgesine bağlıdır (Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992). Bu çalışmada 18 mezarlık toprağı analiz edildi. Bunlardan 2 negatif kontrolün dışındaki 16 örnekten sadece 5 tanesinde tam profil elde edildi. Türk örneklerinde 10. günden sonra, Pakistan örneklerinde ise 20. günden sonra düşük pik yükseklikleri, kontaminasyon ve stutter artefaktı görüldü. Bu gibi problemleri azaltmak için amplifiye edilecek örnekteki insan DNA miktarının yanı sıra örneğin cinsiyetini (erkek) belirleyen QuantiDuo kit kullanılmalıdır. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit, hem toplam çoğaltılabilir insan DNA miktarını hem de örnekteki erkek DNA'sını belirler (Applied Biosystems Quantifiler Duo user manual, 2008). 20. günden sonra toplanan fazla degrade örnekler için MiniFiler kullanılmalıdır (Applied Biosystems MiniFiler kit User manual, 2007). Toprakta çok uzun süre sonra toplanmış çok düşük DNA miktarına bağlı olarak genotiplenemeyen örneklerde SNP analizleri daha iyi sonuçlar verebilirler. Analiz sonucunda fazla piklerin oluşması kontaminasyon, spesifik olmayan primer bağlanması (primer ile kalıp DNA'nın yanlış eşleşmesi vb.) ve başka bir DNA varlığı sebebiyle olabilir (Tablo 18). HotStart teknik ile üretilen AmpliTaq Gold DNA Polimeraz kullanılarak bu gibi sorunlar önlenabilir (GenScan Reference Guide, 2000).

Son örnek grubu ise nehir kanalı kenarındaki toprağa dökülmüş kan örneğidir. Bu topraklar doğal çevresel şartlarda, insan ve hayvanların bulunduğu, su ve tuz içeriğı ve diğer faktörlerin etkisinde kalan kaynaklardır. Kontaminasyon ve degradasyon olasılığı çalışılan diğer toprak türlerinden daha fazladır. DNA ve biyolojik materyaller sulu ve nemli çevre koşullarına daha hassastır. Bu topraklarda degradasyon oranı çölden, inşaat alanından ve bahçeden alınan toprak örneklerdeki degradasyon oranından yüksektir. Hücrelerin etrafını çeviren sular DNA'nın yapısını bozabilir ve DNA kalitesinde ve miktarından degradasyona neden olur. Tsygankov ve arkadaşlarının yaptığı araştırmaya göre NMR difüzyon yönteminin verileri hücre içindeki suyun hızlıca soğumasını gösterir. Su ile yüzey-aktif madde oranı (1.26/5) belirli bir aralıkta olduğunda hücre içinde DNA yoğunlaşması meydana gelir. Eğer serbest su yoksa veya revers miseller içindeki serbest su fraksiyonu %50'nin üstünde ise DNA yoğunlaşması azalır (Tsygankov, V. S.

ve ark., 2002). Toprağın porlu, siltli ve killi yapısı nedeniyle toprağa dökülen kan hemen absorbe edilir.

Kan örneği toprağa döküldükten birkaç saat sonra yüzeyde görülmedi. Kanın döküldüğü bölge daha sonra örnek toplayabilmek için dikkatlice işaretlendi. Nehir çevresindeki bitkiler, diatomlar, çalılar ve diğer botanik türler asıl canlılardır. Diatomlar toprakta bolca bulunurlar ve düşük sıcaklıklarda nemli ve ıslak ortamlarda hızlıca çoğalabilirler. Diatom testler pek çok vakada uygulanabilmektedir (Gruspier K.L., Pollanen M. S., 2000). Nehir kenarından örnekler toplandığında ve izolasyonu yapıldığında beklenildiği gibi yüksek oranlarda degradasyon görüldü. Günler sonra alınan örneklerde DNA saflığı ve miktarında çok fazla azalmalar oldu. Kan; nemli ve tuzlu bir ortama maruz bırakıldığında yok olur. Nehir kenarlarında çok fazla tuz depolanır ve bu tuzluluk biyolojik materyallere zarar verir. Pek çok kan hücresi nemli ve tuzlu toprağa maruz bırakıldığında zarar görmüştür. Çalışmalara göre yüksek tuz konsantrasyonu süperkoloid DNA'nın konfigürasyonunu, enerjisine ve dinamiğine etki etmektedir. Çeşitli tuz konsantrasyon serileri hazırladığında (0.005'den 1.0 M sodyum) süperkoloid DNA'nın (1000 ve 3000 baz çifti) konfigürasyonunun ve enerjisinin tuza maruz bırakıldığında çok fazla değiştiği görülmüş. Yüksek tuz konsantrasyonunda DNA'nın içindeki sarmal durum sertleşmekte ve sıkışmaya başlamaktadır. Bundan dolayı DNA'nın bükülen bölgesindeki enerji miktarı artarken diğer kısımlardaki elektrostatik enerji azalmaktadır. Bu bükülme ve kıvrılma DNA'nın yapısına zarar verirken kolayca kırılmasına sebep olur (Schlick ve ark., 1994). Sodyum klorür DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini ve trombositleri parçalamak için kullanılır. Düşük tuz konsantrasyonlarında DNA süpersarmalı daha fazla açılır ve sarmal tekrar kapanamaz ve elektrostatik içerikleri baskılanır. 30 yıldır yapılan çalışmalara göre elektrostatik enerji diğer faktörlerden on kat daha fazla etkilenir (Schlick ve ark., 1994). Kanın toprak ile birleşmesinden sonra DNA doğal faktörler olan sıcaklık, nem ve tuz konsantrasyonuna maruz kalır. Tamar'a göre tuz süpersarmal DNA'da, kapalı dairesel DNA'ya olduğu gibi doğrusal DNA'nın da yuvarlak bölgelerinde regülatör rolü oynar. Konsantrasyondaki bu değişiklikler DNA'ya çok büyük zararlar verirler (Tamar ve ark., 1994). Yukarıdaki görüşlerden sonra şunu söyleyebilir ki tuz hem dairesel DNA'nın hemde lineer DNA'nın küçük yuvarlak bölgelerinin yapısını bozar.

Nehir kenarı topraklarında DNA miktarının çok azaldığı görüldü. Kan dökülür dökülmez alınan örneklerde DNA miktarı yüksek miktarda ölçüldü. İlk gün 2308 ng/μl olan DNA

miktarının sonraki günlerde alınan örneklerde çok fazla düştüğü görüldü. Beş gün sonra alınan örnekte 1146 ng/μl ölçülen DNA miktarı ilk güne oranla yarı yarıya düştü. Bu miktar düşüşü son örneğe kadar devam etti. 60 günün sonunda DNA miktarı 28 ng/μl'ye kadar düştü. Buradaki düşüşü etkileyen en büyük faktörler su ve sodyum konsantrasyonudur. DNA'nın saflık oranı (OD değeri) iki ay içinde 1.5- 0.38 aralığında ölçüldü. DNA'nın zamana göre grafiğinde en fazla düşüş bu örneklerde görüldü (Tablo 11, Şekil 12). Nehir kenarından alınan örneklerin izolasyon yöntemlerinin iyi olmasına karşın düşük DNA miktarları gözlemlendi. Bu da örnek toplama noktasının çevresinde mikrobiyal bulaşıkların bulunduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar izolasyon sonrasında yapılan agaroz jelde farklı bantların görülmesiyle doğrulandı.

Türk deniz kıyısından alınan örneklerinde daha yoğun değişimler görüldü. Pakistan örnekleriyle karşılaştırıldığında Türk örneklerinde yüksek tuz konsantrasyonuna bağlı olarak biyolojik materyallerde daha fazla bozulma görüldü. Dieter'in yaptığı araştırmaya göre tuz DNA'daki moleküler dinamik hareketleri etkilemektedir. Yüksek tuz konsantrasyonunda DNA süpersarmal zincirinin düzgün ancak fazla sert olduğu, düşük tuz konsantrasyonunda ise DNA'nın zayıf sarmal ve çok hareketli olduğu belirtilmiştir (Dieter ve ark., 2004). Bu görüşler DNA dizisindeki kırılmaları ve bozulmaların sonuçlarını göstermektedir. 5 ve 10. günden sonra alınan örneklerin saflık değerlerinin çok kötü olduğu görüldü. DNA miktarları ilk günden 60. güne kadar 1900 ng/μl den 93 ng/μl'a kadar düşmüştür (Tablo 15, Şekil 17). DNA saflıkları (OD değerleri) ise ilk örnekte 1.5 iken diğer günlerde oldukça düşük değerlerde ölçüldü (Wilfinger, W., 1997; Glasel, 1997; Manchester, 1995). Normalde düşük saflıktaki DNA, PCR için önerilmez. Kestle Mayer testinde pozitif sonuç veren bazı örnekler PCR ile amplifikasyon sonucunda negatif sonuçlar vermiştir. Meyer ve arkadaşlarına(2006); Cox M. (2001) göre örnekte oksidasyon olması yanlış pozitif sonuç verebilir. Bu örneklerdeki renk değişimleri tuz varlığından da olabilir. Nehir kenarından alınan örneklerde yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük pH'a bağlı olarak beklenmeyen sonuçlar elde edildi Yüksek tuz konsantrasyonu örnekler kadar genetik analizör içinde zararlıdır. Bu yüzden yüksek tuz konsantrasyonu içeren örneklerin kapiller elektroforeze uygulanması tehlikeli olabilir. Bu problemi çözmek için pek çok araştırmacının önerdiği gibi PCR yapmadan önce örneklerin 1-2 kez saflaştırılması gerekmektedir. PCR ürünleri %2'lik sodyum asetat ile saflaştırıldı. Bu saflaştırmadan sonra örnekler genetik analizörde çalışıldı. Örneklerden az sayıda profil elde edildi ve kontaminasyon ve alel düşmeleri görüldü (Tablo 19).

Weiliang'a göre elektrolit zeminindeki (BGE) orta yükseklikteki iyonik konstarasyon, joule ısınması ve piklerin yapısının bozulmasına yol açar. 0.5 M tuz konsatrasyonu olan örneklerde BGE konsantrasyonu ve örneklerin konsantrasyonları dengelendiğinde doğrudan analiz yapılabilir. Kapillerin merkezindeki sıcaklık, 280  $\mu$ A iken 49°C hesaplandı. Yüksek tuz konsantrasyonu elektroforetik ve elektroozmotik mobilite de büyük ölçüde zararlar yaratmaktadır (Weiliang ve ark., 2005). Analiz edilen toplam 19 örnekten yalnızca 5 örnekte tam genetik profil elde edildi. 5. günden 60. güne kadar olan diğer örneklerde kontaminasyon, mikrovaryant aleller, düşük pik yükseklikleri, stutter artefaktlar ve ekstra pikler görüldü. Analiz sonuçlarındaki ekstra pikler, farklı pik yükseklikleri analizlerin yorumlanmasını ve alellerin tanımlanmasını zorlaştırdı. FGA ve D21S11 lokuslarında sebebi bilinmeyen çok fazla pik gözlenirken, yüksek polimorfizm gösteren Penta E lokusunda fazla pikler ve mikrovaryant aleller görülmedi (Moller, A. ve ark., 1994 and Brinkmann, B. ve ark., 1997). Elektroforezde tüm lokusların değil sadece bazı lokusların görülmelerinin sebebi PCR inhibitörleri (hem bileşenleri, yüksek tuz konsantrasyonu, EDTA veya bazı boyalar vs.) veya DNA örneğinin yıkılması olabilir. Bu problemin çözümü için insan DNA miktarı ölçülmeli ve daha fazla kalıp eklenmeli, amplifikasyon tekrar edilmeli, tuz miktarı düşürülmeli ve DNA'nın saflaştırılmasında Amicon Centricon-30 kolonlar kullanılmalıdır (GenScan Reference Guide, 2000). Bu tür örneklerde PCR başlamadan önce GC enhancerlar kullanılırsa iyi sonuçlar alınabilir ve PCR'da PCR solüsyonu kullanılmalıdır. Saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi ile daha iyi sonuçlar alınabilir ve kontaminasyon ve alel düşmeleri önenebilir (Şekil 19).

Farklı orijinlerden lekeli toprakların inorganik analizi için İndüktif eşleşmiş plazma - Kütle spektrometresi (Inductively coupled plasma - Mass spectrometry - ICP/MS) kullandı Çalışmanın ICP-MS bölümünde, 3 tane Sertifikalı Toprak Referans Materyali (CRM) seçildi ve Pakistan ve Türkiye'den alınan 4 tip toprak örneği için kullanıldı. Standart referans materyaller, organik madde bakımından zengin topraklar (bahçe ve mezarlık toprak örnekleri) için Referans Topluluk Bürosu Avrupa Komisyonundan CRM 700, demir ve çelik (kumsaldan alınan toprak örnekleri) için Çin Ulusal Analiz Merkezinden CRM 73002 ve hafif kumlu toprak (inşaat alanı toprağı) için Çek Metroloji Enstitüsünden CRM 7002' dir. Topraklar, % 65'lik HNO<sub>3</sub> kullanılarak yaş yakma maruz bırakıldı. Bu yöntem farklı araştırmacılar tarafından kullanılmış ve iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Kovacs ve ark., 2000 ve Melaku S ve ark., 2005). Toprak

örneklerinin yaş yakması için  $\text{HNO}_3$  tercih edilmesinin nedeni hem aromatik hem de alifatik organik bileşikler ile kolaylıkla tepkimeye girmesidir. Gorsuch (1970) alkol ve karbohidrat gibi hidroksi bileşiklerini yükseltmek için  $\text{HNO}_3$  ile yaş yakma kullanılabileceğini bildirmektedir. Böylece bitki örneklerinin hazırlanmasında (Kovács *et al.*, 1996) kullanılan genel prensibin, toprak için de doğruluğu tekrar kanıtlanmıştır. 1 g kuru toprak için 6 ml nitrik asit için kullanıldı. 1 g kuru ağırlığa sahip topraktaki element konsantrasyonu yeteri kadar yüksektir. Analitlerin bu aralıktaki anlamlı farklılığının düşük olduğu görüldü. Topraktaki elementel konsantrasyonun yüksek değerinden dolayı, kuru ağırlık artırıldığında hassasiyet aynı kalır. Bu nedenle, yukarıda bahsedilenlere dayanarak, % 65'lik 5 cm<sup>3</sup>  $\text{HNO}_3$  ve 1 g kuru ağırlık kullanımı tavsiye edilmektedir (Kovacs *et al.*, 2000). Yaş yakmasından sonra, örnekler ICP-MS'e verilmeden önce internal standart olarak indiyum kullanılarak hazırlandı. ICP-MS' ten elde edilen veriler karmaşıktı ve bunları değerlendirip sonuç elde etmek oldukça güçtü. Adli toprak incelemesinin standardizasyonu toprak örneklerinin çeşitliliği nedeniyle zordur (Cengiz S ve ark., 2004). Bu nedenle, aynı gün içerisinde toprağın farklı kısımlarından toplanan toprak örneklerinin ortalaması alınmıştır. Bu uygulamadaki amaç, verilerin düzenliliğindeki devamlılığı sağlamaktır. Q-testte düzenlenen veriler teşhis ve dışlama için kullanıldı. Bu test tutumlu bir şekilde ve bir veri setinde asla birden fazla kullanılmamalıdır. Kötü verilere Q Test uygulamak için, yükselen değerler sırasına göre veri düzenlenir ve Q hesaplanır (Dean R. B., 1951). Bu test sonrasında elde edilen veri değerleri normalize edilir. Normalizasyon, 0 ve 1 veya [0, 1] aralığında performans indeksi olarak benzerlik veya uzaklık koymaktır. Kendi değerlerinden elde edilen veri indeksini 0 ve 1 aralığında düzenleme ve dönüştürme süreci olan normalizasyon, verileri karşılaştırılabilir hale getirmek için kullanılır (<http://people.revoledu.com/kardi/tutorial/Similarity/Normalization>). Bu prosesin ardından alınan ICP-MS verileri değerlendirildiğinde toprak örneklerinin her birini birbirinden ayırmada iyi sonuçlar verebilecek, oldukça olumlu ve anlaşılır veri değerleri (Tablo 22-29) elde edildi. İki ülkeden alınan farklı toprak örneklerinin inorganik elementel bileşimi değerlendirildi.

Bahçelerden alınan toprak örnekleri için CRM 700 kullanıldı. Normalizasyonun ardından, Na'un değeri 1 olarak kabul edildi ve elementel bileşimi incelendi. Veriler, farklı aralıklarda toplanan elementler için değerler arasındaki yakınlığı göstermektedir. Toprağın negatif değerleri ile karşılaştırıldığında, değerler herhangi bir değişim olmaksızın neredeyse aynıydı. Ortalamadan sapan birkaç element vardı ancak büyük çoğunluğu aralık içerisindeydi. Çevrenin ve zamanın



elementel bileşimdeki etkisi ya çok azdı ya da hiç yoktu. Negatif örneklerle karşılaştırıldığında sadece cıva ve kurşun ortalama değerden sapma göstermiştir. Q-test ve normalizasyon ile düzenlenemeyen çok büyük miktarda cıva ve kurşun vardı. Bu iki element değerleri arasında herhangi bir yakınlık veya uyum yoktu. Diğer elementel değerler birbirlerine oldukça yakındı. Pakistan'daki bahçe toprağında Cd, Pb, P, Cu ve Be (Tablo 24) için sıradışı sonuçlar elde edilirken, Türkiye'deki bahçe toprağında Cd, P, Ca, Cr, Zn, As ve Be' da (Tablo 22) içeren diğer elementler normalize edilmiş değerlerden saptığı gözlemlendi. Diğer elementler negatifler ile aynı değerleri göstermiştir. Bahçe toprak örnekleri arasında 20 elementin 13'ü aynı kalırken 7'si sapma göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak adli toprak örneklerini onların elementel bileşimlerini karşılaştırarak yapabiliriz. Pakistan toprak örneğiyle kıyasladığımızda Türkiye'deki bahçe toprağı örneğinin ayırıcılığı daha düşükken Pakistan'daki elementlerin değerlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer elementlere ait değerlerin yüksek olduğu Pakistan toprak örnekleri ile karşılaştırıldığında Türkiye'den toplanan bahçe toprağı örnekleri, elementler arasında düşük bir ayırım gösterdi. Fakat bütün bu 20 elementin dışında, eğer 13 element aynı elementel bileşimi gösterirse, bahçe toprağını toprak topoğrafisini ve bölgesini tanımlamada güçlü bir araç olarak kullanabiliriz.

Aynı şekilde iki ülkedeki mezarlık toprağı standart toprak (CRM 700) kullanılarak incelendiğinde cıva hesaplanamayan değişik değerler göstermiştir. Normalize değerler eğer Hg değerini 1 kabul edersek oldukça yüksek olur, bu yüzden Hg değerleri veri analizinde dikkate alınmamıştır. Sodyum değeri yeniden 1 olarak kabul edildi. Pakistan mezarlık toprağında sadece Hg için sapma gözlenirken, Türkiye'deki mezarlık toprağında ise Cd, Hg ve Be'da (Tablo 23), normalize değerlerden sapmalar görüldü. Gözleme dayanarak 20 elementin 3'ü elementel bileşimlerine dayanarak negatif toprak örnekleriyle kıyaslanmazken, 17 tanesi toprağın bölgesi ile ilgili iyi bilgi verir. Türkiye'deki mezarlık toprak örneği kıyaslandığında Pakistan'daki mezarlık toprağının adli açıdan ayırım gücünün daha fazla olacağı düşünülmektedir. Böylece mezarlıktan gelen toprağın analizi, CRM 700 standardı kullanılırsa iyi sonuçlar elde edilebilir. Mezarlık toprağı, yüksek ayırım gücüne sahip olduğu için diğer topraklardan ayırt edilebilir.

İki ülkedeki inşaat sahasından alınan toprak örnekleri için CRM 7002 kullanıldı. Bu toprakların normalize edilmiş değerleri, toprak bileşimleri arasında karşılaştırılabilir sonuçlar gösterdi. Türkiye'deki inşaat sahasına ait pozitif (kan içeren) ve negatif toprak örnekleri arasında Hg ve Pb için negatif değerler gözlemlendi. Ancak Pakistan toprak örneklerinde görülen Hg ve Pb

değerleri ise farklılık göstermiştir. Bu durum bir veri hatası olabilir, çünkü Hg ve Pb neredeyse bütün toprak tiplerinde oldukça tutarsız sonuçlar vermektedir (Tablo 26). Na değeri 1 olarak düşünüldü ve veriler analiz edildi. Verilerde sıfır değeri gösteren Hg ve Pb hariç, diğer bütün elementler inorganik bileşim olarak oldukça benzerdir. 20 elementten 18'i, toplandığı zamandan bağımsız olarak birbirleriyle uyum içinde olduğu görülmüştür. Bu durum elementel bileşimine dayanarak inşaat toprağının diğer toprak tiplerinden ayrımını açıkça göstermektedir. Pakistan'dan getirilen inşaat toprağı örnekleri Cd, Pb, Ba, P, K, Co ve Hg gibi elementlerde sapma göstermektedir (Tablo 27). Bunu şu şekilde açıklayabiliriz, Pakistan'da inşaat toprağı deniz kenarından alınmaktadır ve bu alanlarda büyük miktarda atık kontaminasyonu vardır. 5 tane element (Hg ve Pb hariç), 1 olarak alınan Na'un üzerinde değerler göstermiştir. Bütün elementler arasında elementel bir benzerlik gösteren Türkiye'den olan topraklar ile karşılaştırıldığında ayırım gücünün daha düşüktür. Bu sonuçlarla inşaat alanı toprak tipi normalizasyon teknikleri ile incelenebileceğini ve diğer örnekler ile karşılaştırılabileceğini açıkça söyleyebiliriz. Hg ve Pb için bu toprak tipinde daha fazla çalışma ve incelemelere gerek duyulduğunu düşünmekteyiz.

Deniz kenarından alınan toprak için CRM 73002 kullanıldı. Alınan topraklarda Na konsantrasyonu açısından büyük bir farklılık vardır. Bu farklılık Türkiye'deki örnekler deniz kenarından alınırken, Pakistan'da nehir kenarından alınması sebebiyledir. Sadece Hg değerlerinde sapma görüldü ve bu veri dikkate alınmayarak dışlandı. Sodyum değeri 1 olarak kabul edildi ve veriler incelendi. 20 elementten 19'u bütün örneklerde aynı değerleri gösterdi, burdan da deniz kenarı toprağının inorganik bileşimini incelemek için kullanılabileceğini açıkça görebiliyoruz (Tablo 28). 19 element arasındaki benzerlik bu toprağı adli incelemeler yönünden en elverişli toprak haline getiriyor. Aynı durum Pakistan'dan alınan nehir kenarı örneklerinde de geçerlidir, veriler incelendiğinde 19 element çok yakın değerler göstermiştir (Tablo 29). Sadece Hg değeri çok yüksekti bu nedenle değerlendirme dışı tutuldu. Türkiye ve Pakistan'daki su kenarı toprak örneklerinin ICP-MS'ten sonra ortaya çıkan yüksek ayırım gücü, elementel bileşimin aynı kaldığını göstermiştir. Su kenarı toprağı adli toprak analizinde güvenle kullanılabilir ve sadece toprak tipi ile ilgili bilgi vermekle kalmaz ayrıca elementel bileşimi hakkında da faydalı bilgiler vermektedir.

Bu çalışmada Lazer Aşındırma ICP-MS ile adli soruşturmalarda toprak delillerinin incelenmesinde numune çok az miktarda bile olsa hızlı, güvenilir ve kesin sonuçlar elde

edilebileceği gösterilmiştir. Normalize edilen değerler karşılaştırıldığında; aynı toprakların elementel analiz sonuçları için aynı, buna karşılık farklı topraklar için farklı normalize değerler elde edildi. Toprakların bu yöntemle farklılandırılabilceği anlaşılmıştır. Yaş yakma, LA ICP-MS, Q-test ve Normalizasyon gibi tekniklerin bileşimi, toprağın elementel bileşiminin karşılaştırılmasında oldukça büyük etki ve ayırım gücü sağlamıştır.

## VI. ÖZET

1985'ten beri adli tıpta ve kriminal incelemelerde, biyolojik materyalin DNA'sının tiplenmesi en güçlü gereç haline gelmiştir. Toprak, pek çok kriminal olguda, bir suçluya veya kurbanı taşıyabildiği için, kriminal incelemelere delil taşıyıcısı olarak önemli bilgiler sağlayabilir. Toprağın yer yer var olan çeşitliliği, bir suçlu ile bir olay yeri arasında bağlantı kurabilmek için onu çok değerli bir delil yapmaktadır. Bu çalışmada bir gönüllüden alınan kan kullanıldı. Kan örnekleri, doğal çevre şartlarında belirlenen topraklara döküldü. Örnek alma sistematik olarak yapıldı. Tüm örnekleri kapsayan uygun bir DNA izolasyon yöntemi geliştirildi. Farklı bölgelerden alınan örneklerde zamana ve çevresel koşullara bağlı olarak farklı etkiler gözlemlendi. Bahçe, mezarlık ve nehir kenarından toplanan örneklerde çok fazla miktar azalması ve düşük saflık değerleri gözlemlendi. Humus, tuz konsantrasyonu, su ve ısı DNA üzerinde en fazla etki eden koşullar olarak belirlendi. İnşaat alanından alınan örneklerde DNA'nın diğer topraklara oranla daha uzun süreli korunduğu görüldü. PCR kiti, hedef bölgelerden DNA çoğaltmak için kullanıldı. Bu çoğaltılan örneklerin kapiler elektroforezi için ABI genetik analizör kullanıldı. Örneklerin çoğunda kontaminasyon, alel düşmesi, stutter artefakt görüldü ve bazılarında ise çoğalma olmadı. Nehir kenarından alınan örneklerin tiplemesinde yüksek tuz konsantrasyonu sebebiyle olumsuz sonuçlar gözlemlendi.

Farklı orijinlerden lekeli toprakların inorganik analizi için İndüktif eşleşmiş plazma - Kütle spektrometresi (Inductively coupled plasma - Mass spectrometry - ICP/MS) kullandı. Aynı topraklardan farklı zamanlarda alınan örneklerin analiz sonuçlarının birbirlerini tutmadığı görüldü. Sonra değerler Q-test ve Normalizasyonları hesaplandı. Normalize edilen değerler karşılaştırıldığında; aynı toprakların elementel analiz sonuçları için aynı, buna karşılık farklı topraklar için farklı normalize değerler elde edildi. Toprakların bu yöntemle farklılandırılacağı anlaşılmıştır. Sonuç olarak ICP-MS adli topraklarda elementel analizde kullanılacak alternatif bir yöntem olabilir.

## VII. SUMMARY

Soil can provide important information to criminal investigations as transfer evidence because many criminal cases take place under circumstances such that soil transfers to a criminal or victim. The variation in soils from place to place makes soil valuable evidence to prove linkage between a suspect and a crime scene. Blood from volunteers was drawn and these soils will be stained with blood by spraying or putting whole blood onto the soil in natural environmental conditions. Sampling was being done in a very systematic way. After the soil has been collected, the proper procedure for the extraction of DNA from these soils was developed, estimation was done for DNA extracted from each soil. It was noticed that there was a tremendous effect of time period and environment on the samples collected from different locations. The soils from garden, graveyard and canal bank shows a great decrease in yield as well as quality with time. The humus, salt concentration, water and heat have remarkable effect on DNA. While the soils from construction area due to their persistent nature can hold the biological samples for longer period of time than other soils. PCR kit was used to amplify DNA from the targeted regions. Results were analysed using ABI genetic analyzer. The issues of contamination, allele/locus dropout, stutter and no amplifications were faced. The samples collected from canal bank were difficult to genotype because of high salt concentration which is harmful for genetic analyser too.

Inductively coupled plasma coupled to mass spectrometry (ICP-MS) analyses the elemental composition of the soil. This technique can be helpful in finding out the differences among inorganic components of soils collected from different origin. The soils samples were prepared using nitric acid extraction procedure and were introduced to ICP-MS for differential analysis. The averages were taken, Q test was applied to reject the unwanted data and normalization was calculated for every sample. Finally the comparison was made among soils from different origins. The elemental composition remains the same when collected in different period of time but significant values were obtained for the soils collected from two countries. The results shows the importance of ICP-MS for forensic soils which can be differentiated based on their elemental composition.

## VIII. KAYNAKLAR

(<http://www.77investigators.com/dnaarticle.html>).

(<http://www.forsci.com/Services/soil.htm>).

(Steck, 2004) [http://www.crimeandclues.com/soil\\_analysis.htm](http://www.crimeandclues.com/soil_analysis.htm)

1. Al-Soud, W. A., and P. Rådström. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3748-3753.
2. Applied BioSystems, AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (2007). User Manual pp. 1-2.
3. Applied BioSistem Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (2008) User Manual pp. 1-2.
4. Becherer, D. (2000). The Use of Short Tandem Repeats (STRs) in Forensic Science. <http://www.wustl.edu/~jstader/becherer.html>
5. Benecke, M. (1997). DNA typing in forensic medicine and in criminal investigation: a current survey. *Naturwissenschaften.* 84(95): 181-188
6. Benecke, M., Schmitt, C. and Staak, M. (1996). Development of a fast new STR triplex System for identification of urine samples. Poster at the First European Symposium on Human Identification. Toulouse, 29 -31.5. Promega Co.
7. Bever, R.A. and Creacy, S. (1995). Validation and utilization of commercially available STR multiplexes for parentage analysis. In: *Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification 1994.* Promega Corporation, 61–8.
8. Bock JH, Norris DO. (1997). Forensic Botany: An Under-Utilized Resource. *Journal of Forensic Sciences;* 42(3): 364-367.
9. Borrmann, Dodd and Lincoln. (1977). *Blood Group Serology*, Churchill Livingstone.
10. Brenner, C. and Morris, J.W. (1990) In: *Proceedings from the International Symposium on Human Identification 1989*, Promega Corporation, 21–53.
11. Bridges, E. (1997). *World soils*, 3e. NY: Cambridge University Press.
12. Brinkmann, B., Moller A. and Wiegand, P. (1995). Structure of new mutations in 2 STR Systems. *Int. J. Leg. Med.* 107, 201–3.

13. Brinkmann, B., Rand, S. and Bajanowski, T. (1992). Forensic identification urine samples. *Int. J. Leg. Med.* 105: 59-61.
14. Budowle, B. and Monson, K.L. (1989). In: *Proceedings of an International symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis*, Government Printing Office, Washington, DC.
15. Budowle, B. ve ark., (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 137–44.
16. Budowle, B., Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A. and Keys, K. M. (1999). Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *Jour. of For. Sci.* 44 (6): 1277-1286.
17. Butler J.M. *Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markers.* (2001). New York, Academic Press.
18. Capelli, C., Hall, D. and Maviglia, R. (1998). Fingerprints from fingernails. *Advances in forensic Genetics.*7: 100-102.
19. Caskey, C. T., Pizzuti, A., Fu, Y-H., Fenwick, J. and Nelson, D. L. (1992). Triplet repeat mutations in human disease. *Science.* 256:384-388.
20. Cengiz S, Sakul O. (2001). *Capillary Electrophoresis in Forensic Soil Analysis.*Proceeding of American Academy of Forensic Sciences; 53rd: B60.
21. Cengiz S, Karaca A.C., Cakır I, Uner H. B, Sevindik A. (2004). SEM–EDS analysis and discrimination of forensic soil. *Forensic Science International* 141 (2004) 33–37
22. Chakraborty, R. and L. Jin. (1993). A unified approach to study hyper variable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness and population distances, pp. 153–175 in *DNA Fingerprinting: State of the Science*, edited by S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen and A. J. Jeffreys. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
23. Chernikov, A. V., Gudkova S. V., Shtarkman I. N. and Bruskov V. I. (2006). Oxygen Effect in Heat-Induced DNA Damage. *Biofizika*, 2007, Vol. 52, No. 2, pp. 244–251
24. Clark, A. (1998). *Penguin dictionary of geography*, 2e. NY: Penguin Books
25. Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Research.* 16: 9677-9686.
26. Clayton, T. M., Whitaker, J. P. and Maguire, C. N. (1995). Identifications of the bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat loci. *For. Sci.* 45(2): 432-5.

27. Cole, S. (2001). *Suspect Identities: A History of Fingerprinting and Criminal Identification*. Cambridge, MA, Harvard University Press.
28. Cornwell, Patricia: *All That Remains*. Avon Books. (1992). Great forensic fiction, with a fun twist on DNA testing.
29. Cox RJ, Peterson HL, Young J, Cusik C, Espinoza EO. (2000). The Forensic Analysis of Soil Organic by FTIR. *Forensic Science International*, 108; 107-116.
30. Cox, M. (1991). A Study of the Sensitivity and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood. *J. Foren. Sci.* 36(5).
31. Di Rienzo, A., Donnelly, P., Toomajian, C., Sisk, B. and Hill, A. (1998). Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci, and implications for human demographic histories. *Genetics*. 148:1269-1284.
32. Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D. and Drouot, N. (1996). A comprehensive map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
33. Dieter W., Gruenwedel, Chi-Hsia Hsu (2004). Salt effects on the denaturation of DNA. *Biopolymers*. Volume 7 Issue 4, Pages 557 – 570
34. Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with tri-meric and tetra-meric tandem repeats. *American journal of Human Genetics*. 49:746-756.
35. Evett, I.W., Lambert, J.A., Knight, S.D., Fairley, M. and Lee, L.D (1996). A study of independence between STR and conventional blood type loci. *Forensic Sci. Int.* 79:163-166.
36. Fortin, N., Beaumier D., Lee K., and Greer C. W.. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Methods* 56:181-191.
37. Fregeau, C. J., Bowen K. L. and Fournery R. M. (1999). Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat Systems using two generations of DNA sequences. *Journal of Forensic Sciences*. 44(1): 133-66.
38. Galton, F. (1892). *Fingerprints*. Macmillan, London.
39. Gorsuch, T. T. (1970). *The Destruction of Organic Matter*. Pergamon Press, Oxford.
40. GenScan Reference Guide (2000). Chemistry reference for ABI prism 310 genetic analyser. Troubleshooting chapter 11 pp 1-7.



41. Gill, P., Kimpton, C. P., Urquhart, A., Oldroyd, N. J., Millican, E. S., Watson, S. K. and Downes, T. J. (1995). Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework-a strategy for the future. *Electrophoresis*. 16:1543-1552.
42. Glasel, J.A. (1997). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18**, 62–3.
43. Gornik, I., Marcikic, M., Kubat, M., Primorac, D. and Lauc, G. (2002). The identification of war victims by reverse paternity is associated with significant risks of false inclusion. *Int J Legal Med*. 116(5): 255-257.
44. Griffiths, R. ve ark., (1998). New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR Sistem. *Int. J. Legal Med*. 111, 267–72.
45. Gruspier KL, Pollanen MS. (2000). Limbs Found in Water:Investigation Using Anthropological Analysis and the Diatom Test. *Forensic Science International*; 112: 1-9.
46. Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C. T. and Chakraborty, R. (1994). Evaluation of 13 short Tandem Repeat loci for use in personal Identification Applications. *American Journal of Human Genetics*. 55: 175-189.
47. Hammond, H. ve ark., (1994). Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet*. 55, 175–89.
48. Hochmeister, M. N., Budowle, B., Borrer, U. V., Rudin, O., Bohnert, M. and Dirnhofer, R. (1995). Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiple PCR amplification and typing Kits. *J. For. Sci*. 40 (4): 701-5.
49. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Jung, J., Borer, U.V., Comey, C.T. and Dirnhofer, R. (1991). PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *International Journal of Legal Medicine*. 104: 229-233.
50. Hopwood, A. J., Mannucci, A. and Sullivan, K. M. (1996). DNA typing from human faeces. *Int J. Legal Med*. 108: 237-243.
51. Horrocks M, Coulson SA, Walsh KAJ. (1998). Forensic Palynology: Variation in the Pollen Content of Soil Surface Samples. *Journal of Forensic Sciences*; 43(2): 320-323.
52. Horrocks M, Coulson SA, Walsh KAJ. (1999). Forensic Palynology: Variation in the Pollen Content of Soil on Shoes and in Shoeprints in Soil. *Journal of Forensic Sciences* 44(1): 119-122.
53. Horrocks M, Walsh KAJ. (1999). Fine Resolution of Pollen Patterns in Limited Space: Differentiating a Crime Scene and Alibi Scene Seven Meters Apart. *Journal of Forensic Sciences* 44(2): 417-420.

54. Ishiwatari A. (1999). An Easy Identification Chart for Major Rock-Forming Minerals by Polarizing Microscope. *Journal of Geological Society of Japan*; 105(2);156-158.
55. Jeffereys, A. J. (1979). DNA sequence variants in the G-gamma, delta and  $\beta$ - globbin genes of man. *Cell*. 18:1-10.
56. Jefferys, A. J., Wilson, V., Thein, L. S., Weaterall, D. J. and Ponder, B. A. J. (1986). Forensic DNA data banking by state crime laboratories. *Am. J. Hum. Genet.* 39: 11.
57. John M. Butler, Eric Buel, Federica Crivellente, Bruce R. McCord<sup>3</sup>. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25, 1397–1412
58. Jones, D.A. (1972). Blood samples: Probability of discrimination. *J. Forensic Sci. Soc.* 12, 355–9.
59. Junger EP. (1996). Assessing the Unique Characteristics of Close-Proximity Soil Samples: Just How Useful Is Soil Evidence?. *Journal of Forensic Sciences*; 41(1): 27-34.
60. Karger, B., Meyer, E., Knudsen, P. J. T. and brinkman, B. (1996). DNA typing of cellular material on performing bullets. *Int. J. Legal Med.* 108 (4): 177-9.
61. Kastle J. St and Norman Roberts: (1909). Tests for Pus and Blood. From the Division of Chemistry, Hygienic Laboratory, U.S. Public Health and Marine hospital Service, Washington, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 6.
62. Kazutoshi Saeki and Masao Sakai (2009). The Influence of Soil Organic Matter on DNA Adsorptions on Andosols. *Microbes and Environments* Vol. 24 No. 2 pp.175-179
63. Kimmel, M., Chakraborty R., King J P., Bamshad M., and Watkins, W. S. (1998). Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. *Genetics* 148:1921-1930.
64. Kimpton, C. P., Oldroyd, N. J., Watson, S. K., Frazier, R. R. E., Johnson, P. E., Millican, E. S., Urquhart, A., Sparkes, B. L. and Gill, P. (1996). Validations of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification Systems for individual identification. *Electrophoresis*. 17: 1283-1293.
65. Kovács, Béla, Prokisch, József, Györi, Zoltán, Kovács, Andrea Balla and Palencsár, Attila József (2000). Analytical methods and quality assurance', *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31:11, 1949 — 1963.

66. Kovács B., Z. Györi, J. Prokisch, J. Loch and P. Dániel. (1996). A study of plant sample preparation and inductively coupled plasma emission spectrometry parameters. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27(5-8): 1177-1198.
67. Lander, E. S., Linton, L. M. and Birren, B. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409: 860-921.
68. Lessig, R. and Edelmann, J. (1996). Speech at the 75th annual meeting of the Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin, Zurich, 24-28 Sept.
69. Levadokou, E.N. ve ark., (2001). Allele frequencies for fourteen STR loci of the PowerPlex® 1.1 and 2.1 multiplex Systems and Penta D locus in Caucasians, African-Americans, Hispanics, and other populations of the United States of America and Brazil. *J. Forensic Sci.* 46, 736–61.
70. Levinson, G. and Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mis-pairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biological Evolution.* 4: 203.
71. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4, 203–21.
72. Lins, A.M. ve ark., (1996). Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci— silver stain and fluorescent detection. *BioTechniques* 20, 882–9.
73. Lins, A.M. ve ark., (1998) Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex Sistem. *J. Forensic Sci.* 43, 1168–80.
74. Lloyd-Jones, G., and D. W. F. Hunter. (2003). Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 33:2053-2059.
75. Magnuson, V.L. ve ark., (1996). Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* 21, 700–9.
76. Manchester, K.L. (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19, 208–10.
77. Manucci, A., Casarino, L., Bruni, G., Lomi, A. and De Stefano, F. (1995). Individual identification of flood victims by DNA polymorphism and autopsy findings. *Int. J. Leg. Med.* 107: 213-215.
78. Marumo Y, Sugita R. (1999). Validity of Simple Techniques for Screening Soil 15th: P13.

79. Marumo Y, Sugita R. (2001). Screening of Soil Evidence by a Combination of Simple Techniques: Validity of Particle Size Distribution. *Forensic Science International*; In press.
80. Marumo Y, Sugita R. (1996). Validity of Color Examination for Forensic Soil Identification. *Forensic Science International*; 83: 201-210.
81. McAlister JJ, Smith BJ. (1995). A Rapid Preparation Technique for X-Ray Diffraction Analysis of Clay Minerals in Weathered Rock Materials. *Microchemical Journal*; 52: 53-61.
82. McPhee J. (1996). *Annals of Crime. The New Yorker* January; 29: 44-69.
83. McVicar MJ, Graves WJ. (1997). The Forensic Comparison of Soils by Automated Scanning Electron Microscopy. *Canadian Society of Forensic Science Journal*; 30(4): 241-261
84. Melaku S, T. Wondimu, R. Dams and L. Moens (2005). Multi-element analysis of Tinishu Akaki River sediment, Ethiopia, by ICP-MS after microwave assisted digestion. *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc* Vol.50 issue 1 pp. 31-40.
85. Meyers, Thomas C. (2006). "Chapter 21: Serology". in Wecht, Cyril H.; Rago, John T.. *Forensic Science and Law: Investigative Applications in Criminal, Civil, and Family Justice*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 410-412.
86. Millette JR, Few P. (2001). Sample Collection Procedures for Microscopical Examination of Particulate Surface Contaminants. *Microscope*; 49(1): 21- 27.
87. Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B. (1994). Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Leg. Med.* 106, 319–23.
88. Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B. (1994). Different types of structural variations in STRs: HumFES\FPS, HumVWA and HumD21S11. *International Journal of Legal Medicine*. 106:319.
89. Moore, P. ve ark., (1991). *Pollen analysis, 2e*. NY: Blackwell.
90. Mountain, J. L. and Cavalli-Sforza, L. L. (1997). Multilocus genotypes, a tree of individuals, and human evolutionary history. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 705-718.
91. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
92. Munucci, A., Verdiani, S., Casarino, L., Costa, M.G., De Stefano, F and Canale, M. (1998) Maternity exclusion of skeletal remains by mt DNA minisequencing. *Advance in Forensic Genetics*. 7: 126-128.

93. Murray RC. (1975). The Geologist as Private Eye. *Natural History Magazine* February.
94. Murray RC. (2000). Devil in the Details, *The Science of Forensic Geology*. *Geotimes* February; 14-17.
95. Murray RC. Soil in Trace Evidence Analysis. (1991). *Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of Trace Evidence*: 75-78.
96. Murray, R. & Tedrow, J. (1975). *Forensic geology: Earth sciences and criminal investigation*. New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press.
97. Murray, R. (2004). *Evidence from the Earth: Forensic geology and criminal investigation*. Missoula, MT: Mountain Press.
98. Nakamura, Y. et al., (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616–22.
99. Newman, M. E., H. Ceri, and B. Kooyman (1996). The Use of Immunological Techniques in the Analysis of Archaeological Materials-A Response to Eisele; with Report of Studies at Head-Smashed-In Buffalo Jump. *Antiquity* 70:677-682.
100. Nicklas, J. A.; Buel, E. (1993). *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 1160-1167.
101. Omelyanyuk GG, Alekseev AA, Somova NG (1999). The Possibility of Application of the Multisubstrate Testing Method in Soil Criminalistic Investigation. *Proceedings of the International Association of Forensic Science*; 15th: P12.
102. Puers, C. (1993). Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic STR locus HUMTH01[AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles in population analysis using a locus-specific allelic ladder. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 953–8.
103. Rand, S., Puers, C., Skowasch, K., Wiegand, P., Budowle and Brinkmann, B. (1992). Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLPS. *International Journal of Legal Medicine*. 104 (6): 329-33.
104. Reich, D. E. and Goldstein, D. B. (1998). Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8119-8123.
105. Reich, D. E., Feldman M. W., and Goldstein, D. B (1999). Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. *Mol. Biol. Evol.* 16:453-466.
106. R. B. Dean and W. J. Dixon (1951). Simplified Statistics for Small Numbers of observations. *Anal. Chem.*, 1951, 23 (4), 636–638.

107. Righi D, Elsass F. (1996). Characterization of Soil Clay Minerals: Decomposition of XRay Diffraction Diagrams and High-Resolution Electron Microscopy. *Clays and Clay Minerals*; 44(6): 791-800.
108. ROTI Joseph L. Roti (2007). Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication. *International journal of hyperthermia*. vol. 23, no.1, pp. 3-15
109. Schlick, T, B. Li, and W. K. Olson (1994). The influence of salt on the structure and energetics of supercoiled DNA. *Biophys J*. 1994 December; 67(6): 2146–2166.
110. Schlotterer, C. and Tautz, D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20:211.
111. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic. Acids Res*. 20, 211–5.
112. Schmitt, C., Madea, B. and Prinz, M (1995). Corpse dismemberment with sequential identification and classification of body parts. *Archiv Fur Kriminologie*. 196(5-6): 129-37.
113. Signer, E., Kuenzle, C. C., Thomann, P. E. and Hubscher, U. (1988). DNA fingerprinting: Improved DNA extraction from small blood samples. *Nucleic Acids Research*. 16:7738.
114. Smith, J. P., Hinson-Smith, V (2001). *Analytical Chem*. 73, 327–331.
115. Smith, J.R. ve ark., (1995).. Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Res*. 5, 312–7.
116. Soil Science Society of America (SSSA). (1996). *Glossary of Soil Science Terms*. SSSA, Madison, WI.
117. Sperling, F.A., Anderson, G.S. and Hickey, D.A. (1994). A DNA based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. for. Sci*. 39(2): 418-27.
118. SSC Extraction Method  
[www.genome.ou.edu/protocol\\_book/protocol\\_partIII.html#III.H](http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_partIII.html#III.H)
119. Tagliabracci, A., Buscemi, L., Bianchi, F., Sassaroli, C., Ricci, U., Neri, T.M. and Rodriguez, M.D. (1998). Polymorphism and sequences variation of the HumCD4 pentameric microsatellite in an Italian population sample. *Journal of Forensic Sciences*, 43:841-844.

120. Tamar Schlick, Bin Li, and Wilma K. Olson (1994) The Influence of Salt on the Structure and Energetics of Supercoiled DNA. *Biophysical Journal* Volume 67 2146-2166
121. The Utah marker Development Group (1995). A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. *American Journal of Human Genetics*. 57:619-28.
122. Theron, J., and T. E. Cloete. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26:37-57.
123. Thornton JJ, Crim D, McLaren AD (1975). Enzymatic Characterization of Soil Evidence. *Journal of Forensic Sciences*; 20(4): 674-692.
124. Thornton, John I. (1997). "The General Assumptions and Rationale of Forensic Identification", written at St. Paul, in David L. Faigman, David H. Kaye, Michael J. Saks, & Joseph Sanders, *Modern Scientific Evidence: The Law And Science Of Expert Testimony*, vol. 2, West Publishing Co.
125. Tsygankov, V. S., S. A. Sementin, A. O. Kucherenko, and L. K. Okhotnikova (2002). Influence of Water on DNA Structure in a Model Microemulsion System *Biofizika* vol. 47, n 5, pp. 858-863.
126. Venter, JC., Adams, MD., Meyers, EW. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291(5507), 1304-1351.
127. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic. Acids Res.* 24, 2807-12.
128. Walsh, PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10(4):506-13.
129. Watson, R. J., and B. Blackwell. (2000). Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 46:633-642.
130. Webb, LG., Egan, SE., Turbett, GR. (2001). Recovery of DNA for forensic analysis from lip cosmetics, *Jour. of For. Sci.* 46 issue 6 1474-1479.
131. Weihser, D., Gerhard, M. (1996). *Kriminalistik*. 50, 648 Cited in paper by Beneck, M.
132. Weiliang Ding, Michelle J. Thornton, Dr. James S. Fritz (2005). Capillary electrophoresis of anions at high salt concentrations. *Electrophoresis* volume 19 Issue 12, Pages 2133 – 2139

133. Whittaker, J.P., Calyton, T., Urquhart, A.J., Millican, E.S., Downes, T.J., Kimpton, C.P. and Gill, P. (1995). Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster high success rate and characteristics amplification pattern in highly degraded samples. *Bio techniques*. 18, 670.
134. Wilfinger, W., Mackey, M. and Chanczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474–80.
135. Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3741-3751.
136. Yan Xun-Ling, Dong Rui-Xin<sup>1</sup> and Lin Qing-De (2006). Humidity Effects on Conductivity of DNA Molecules. *Commun. Theor. Phys.* 46 381-384
137. Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA (1997). PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology*;25:303-307.
138. Zhou, J., M. Bruns, and J. M. Tiedje. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316-322.



**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı	MUHAMMAD SAQİB SHAHZAD CHAUDHARY
Adres	İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Cerrahpaşa Kampüsü, İSTANBUL
Telefon	Gsm: 0090 555 636 67 29
E-posta	<a href="mailto:saqib1330@yahoo.com">saqib1330@yahoo.com</a>
Doğum tarihi-yeri	15-03-1977, PAKİSTAN

**Educational Background:****M. Phil in Molecular Biology (Feb. 2001-Feb. 2003) Marks Obtained: 71%**

Thesis Title: "Development of STR Multiplex Sistem (FGA, D3S1358 and Sex Typing Marker Amelogenin) for Forensic Casework". National Center of Excellence in Molecular Biology, University of the Punjab, Lahore.

**B.Sc (Hons.) Plant Breeding & Genetics (Dec.1996-Dec.2000) Marks Obtained: 78%**

University of Agriculture, Faisalabad. Awarded by the Faculty of Agriculture (Four Years Degree Program)

**F.Sc pre-medical (12<sup>th</sup> Grade) (1996) Marks Obtained: 70%**

Major Subjects: Biology, Chemistry, and Physics

Government Degree College Muzaffar Garh, Pakistan.

**Computer Literacy**

Masters in Computer Sciences, Organization of Computer Sistem, Typing, Windows & Mac OS X operating Sistem, MS Office, Primer 3. GeneMapper 4, IDX, SeqScap.

**Curricular Activities:**

- 2009 Verbal Presentation in "**Crime Scene Investigations Conference**" from 24-26 June 2009 in Tehran.
- Training of 3130 and 3130XL Genetic analyzer (2009)
- Training of 7500 Real Time PCR (7500 series) (2009)
- 2008 Presentation in "**1<sup>st</sup> International Eurasian Congress of Forensic Sciences on Fight Against Terrorism, Interactive Relationship Among Forensic Disciplines**", 8-11 October Istanbul, Turkey
- 2007 Attended A Scientific Conference on '**Bioterrorism**' in Military Academy, Ankara Turkey
- 2006 Attend the 12th Scientific Meeting of the "**International Association for Craniofacial Identification: New Challenges, New Solutions**" 1- 4 November, University of Istanbul, Turkey.
- 2003 Attend 7<sup>th</sup> International Conference on "**New Trends in Biochemistry and Molecular Biology**" Organized by Pakistan Society of Biochemistry and Molecular Biology from April 2-5.

- 2003 Oral Presentation in 23<sup>rd</sup> Pakistan “**International Congress of Zoology**” in University of Arid Agriculture Rawalpindi, Organized by The Zoological Society of Pakistan from March 3-5.

### **Articles Published in Peer Reviewed Journals:**

**Shahzad, M.S**, Ozlem Bulbul, Gulten Reyimoglu, , Gonul Filoglu, Mujgan Cengiz. Effect of Blood Stained Soils and Time Period on DNA and Allele drop out using Promega 16 Powerplex® Kit. **Forensic Science International, Genetics Supplement Series, (2009) FSIGSS-D-09-00205.**

Ozlem Bulbul, Doruk Argac., **Shahzad, M S**, Gonul Filoglu, Havva Altuncul. Internal validation of 29 autosomal SNP-multiplex with ABI 310 Genetic Analyzer. **International, Genetics Supplement Series, (2009) FSIGSS-D-09-00206.**

Doruk Argac., Ozlem Bulbul, **Shahzad, M S**, Havva Altuncul, Gonul Filoglu. Optimization and Validation of 10 Mitochondrial DNA SNPs using SNaPshot Kit. **Forensic Science International, Genetics Supplement Series, (2009) FSIGSS-D-09-00207.**

Gulden Onur, Ozlem Bulbul, Doruk Argac., **Shahzad, M S**, Erdal Polat. STR and SNP Analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae’s gut contents. **Forensic Science International, Genetics Supplement Series, (2009) FSIGSS-D-09-00181.**

Eran Acar, Ozlem Bulbul, **Shahzad, M S**, Doruk Argac, Gonul Filoglu, Havva Altuncul. Optimization and Validation Studies of The Mentype® Argus X-8 kit for Forensic Cases. **Forensic Science International, Genetics Supplement Series, (2009) FSIGSS-D-09-00199.**

**Shahzad, M. S.**, Bokhari, S. Y., Rahman R., Bulbul O\*, and Zia R. Development of STR Multiplex for Six Markers and Genetic Analysis of Pakistani Population. **5<sup>th</sup> Issue of the Islamic Countries of Forensic Medicine (ICOFM) Journal, 2009.**

Faraz Malik, Mahmood A. Kayani, M.Ansar, Obaidullah, Muhammad Sahafeeq, Shahid Chohan, Yassir Abbas, **Saqib Shahzad**, Faizan Riaz, Rahat Rehman, Zia ur Rahman and Zahoor Ahmad. Development of 19-Plex Y-STR Sistem and Polymorphism Studies in Pakistani Population. **ACAD J XJTU, China 2008 20 (4): 267-273**

Abdul Qayyum Rao, Syed Sarfraz Hussain, **M. Saqib Shahzad S.** Yassir Abbas Bokhari, M. Hashim Raza, Allah Rakha, MAjeed A., Shahid A. Ali, Zafar Saleem, Tayyab Husnain and S. Riazuddin. Somatic Embryogenesis in Wild Relatives of Cotton (*Gossypium Spp.*). **J Zhejiang Univ Sci B. 2006 April; 7(4): 291–298.**

Beenish Bashir, **M. Saqib Shahzad**, S. Yassir Abbas Bokhari, M. Hashim Raza, Nadeem Ahmad, Zahoor Ahmad and S. Riazuddin (2005). Mutation Analysis of Insulin Gene in Patients with Type 1 *Diabetes Mellitus* (IDDM). **Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Zoological Congress of Pakistan.**

S. Yassir Abbas, **Saqib Shahzad**, Abdul Qayyum Rao, M. Hashim Raza, F. Arshad, M. Shafique, Ziaur Rahman, A. Ali Shahid, Zahoor Ahmed, and S. Riazuddin. (2005). Development of STR Multiplex System (D5S818, D7S820 And D18S51) for Forensic Casework. **Pak. J. Zoology. (Proceedings of 23<sup>rd</sup> Pakistan Congress of Zoology), Vol. 23: 167-174.**

**Saqib Shahzad**, S. Yassir Abbas, Abdul Qayyum Rao, M. Hashim Raza, ObaidUllah, **Ziaur Rahman**, A. Ali Shahid, Zahoor Ahmed, and S. Riazuddin (2004). Population Studies of STR Markers Loci D3S1358, D5S818, D7S820, D18S51 and FGA (FIBRA) in Sindhi and NWFP Populations of Pakistan for Forensic Use. **ARCH. MED. SAD. KRYM. Vol. LIV: 215-222**

Azhar Saeed, Sibtain Afzal, Muhammad Wajid Hussain, Syed Yassir Abbas Bokhari, **Muhammad Saqib Shahzad**, Abdul Qayyum and M. Hashim Raza (2003). Effect of Aflatoxin B<sub>1</sub> on Different Body Tissues of *Gallus domesticus*. **Journal of Animal and Veterinary Advances 2 (2): 76-78, 2003**

#### **Presentations and Abstract Published:**

**Shahzad, M S.**, Ozlem Bulbul, Gulden Reyimoglu, Mujgan Cengiz, Salih Cengiz . Comparison of Blood stained soils and differentiation of elemental composition by ICP-MS. **Oral Presentation in Intentional Conference on Crime Scene investigation in Iran from 22-25 June, 2009.**

**Shahzad, M S.**, Mujgan Cengiz, Salih Cengiz. Yield Analysis of DNA from Blood Stained Soils and influence of Time Period on Degradation of DNA for Genetic Analysis. **Intentional Conference on Forensic Sciences in Glasgow from 8-11 September, 2009.**

Bulbul Ozlem, **Shahzad M. Saqib**, Argac Doruk, Filoglu Gonul, Altuncul Havva, Cengiz Mujgan (2008). Optimization And Comparison Of Different Methods Of DNA Extraction From Minute Amounts Of Biological Materials. **1st International Eurasian Forensic Science Congress, Istanbul, Turkey on 8-11th October 2008**

Nusratullah Khan, S. Yassir Abbas Bokhari, **M. Saqib Shahzad**, M. Hashim Raza, Malik Zafar and Abdul Qayyum (2003). Evaluation of Concentration of Cardiac Enzymes, Lipids and their Relationship with

*Myocardial infarction*. Published in **Proceeding of 7<sup>th</sup> International Conference on Trends In Biochemistry and Molecular Biology**, from April 2-5 2003 pp. 50.

Muhammad Hashim, S. Yassir Abbas Bokhari, **M. Saqib Shahzad**, Abdul Qayyum, M. Idrees and S. Riazuddin (2003). Detection of GB Virus C/Hepatitis G Virus RNA in Patients with HCV and HBV, Using Nested PCR. **Published in Proceeding of 7<sup>th</sup> International Conference on Trends In Biochemistry and Molecular Biology**, from April 2-5 2003 pp. 70.

Abdul Qayyum Rao, Tayyab Husnain, Syed Sarfraz Hussain, S. Yassir Abbas Bokhari, M. Hashim Raza, **M. Saqib Shahzad** and S. Riazuddin (2003). Transformation of Cotton with Phytochrome-B Gene. Published in **Proceeding of 7<sup>th</sup> International Conference on Trends In Biochemistry and Molecular Biology**, from April 2-5 2003 pp. 109.