

48776

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
Danışman: Doç.Dr.Ersi ABACI-KALFOĞLU

**HLA-DQA1 LOKUSUNUN POLİMERAZ
ZİNCİR TEPKİMESİNE (PCR) DAYANAN
2 FARKLI TEKNİK İLE TİPLENMESİNİN
ADLI BİLİMLER AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biolog E.Hülya (Şişman) YÜKSELOĞLU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİZASYON MERKEZİ

İstanbul - 1996

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans çalışmalarım süresince bilgilerinden yararlandığım İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü değerli hocam Sayın Prof.Dr. Sevil ATASOY'a,

Deneyimlerinden yararlandığım İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdür Yardımcısı değerli hocam Sayın Prof.Dr. A. Sedat ÇÖLOĞLU'na,

Yetişmemde büyük emeği geçen, kişiliği ve mesleki deneyimi ile öğrenciliğim süresince beni bilgilendiren, güçlendiren ve bu alanda yetişmemde daima desteğini gördüğüm çalışmamın yürütülmesi ve yönlendirilmesinde kıymetli teşvik ve ilgilerini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı tez danışmanım Hocam Sayın Doç.Dr. Ersi ABACI-KALFOĞLU'na,

Tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof.Dr. Mahmut ÇARİN'e, Sayın Dr. Fatma (Savran) OĞUZ'a,

Derin bilgilerinden yararlandığım Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürü değerli hocam Sayın Prof.Dr. Salih CENGİZ'e

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Recep ÖZTÜRK ve ekibine,

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Yard.Doç.Dr. Nur SAYHAN ve ekibine,

Ayrıca çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli meslektaşlarım ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tezimin yazılmasında emeği geçen Sayın Saadet ÖZER'e ve çalışmalarım sırasında gösterdikleri anlayışlarından ötürü sevgili eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hülya (Şişman) YÜKSELOĞLU



İÇİNDEKİLER

	Sayfa	
1	GİRİŞ ve AMAÇ	1
2	GENEL BİLGİLER	3
2.1	İNSAN LÖKOSİT ANTİJENLERİNDEN DQA1'İN YAPISI (HLA DQA1)	3
2.1.1	HLA kompleksinin genetik organizasyonu	6
2.1.2	HLA DQA1 Polimorfizmi	7
2.1.3	HLA DQA1 Genlerinin Adlandırılması	8
2.1.4	HLA DQA1 Lokusunun Hastalıklarla İlgisi	10
2.1.5	HLA DQA1 Lokusunu Tiplemede Kullanılan Teknikler	11
2.2	DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ	13
2.2.1	Fenol Kloroform Yöntemi	13
2.2.2	Chelex Yöntemi	13
2.2.3	Trimetil Amonyum Bromür Tuzu Yöntemi	14
2.2.4	NaCl Çekilmesi (Salting Out) Yöntemi	15
2.3	POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (PCR)	16
2.4	ÇALIŞMADA KULLANILAN İKİ TİPLEME TEKNİĞİ	18
2.4.1	Alele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu (PCR-ASO)	18
2.4.2	Nokta Emdirimi (DOT BLOT) Tekniğinde görünürleştirme	20
2.4.3	Membran Şeritleri Üzerindeki Sonuçların Yorumlanması	21

2.4.4	Dizine Özgü Primer Tekniği (PCR-SSP)	23
2.5	<i>HLA DQA1 LOKUSU TİPLEMESİNİN ADLİ BİLİMLERDE UYGULAMA ALANLARI</i>	24
2.5.1	Kimlik Belirtimi ve HLA DQA1	24
2.5.2	Kemik Dokusu, Kıl ve Tırnakta HLA DQA1 ile Kimlik Belirleme	24
2.5.3	Tükrükte HLA DQA1	26
2.5.4	İdrarda HLA DQA1	26
2.5.5	Semende HLA DQA1	27
2.5.6	Düşük Miktarlardaki DNA'dan Yararlanma	28
3	GEREÇ ve YÖNTEMLER	29
3.1	<i>DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ</i>	29
3.1.1	Chelex Kullanımı ile DNA Çeketlenmesi	29
3.1.2	Trimetil Amonyum Bromür Tuz Kullanımı ile DNA Çekitlemesi	30
3.1.3	Tuz-NaCl-(Salting Out) Kullanımıyla DNA Çekitlemesi	31
3.2	<i>DQA1 GEN BÖLGESİNİN POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (PCR) İLE TİPLENDİRİLMESİ</i>	32
3.2.1	Alele Özgü Oligonükleotid Kullanımı ile Ters Nokta Emdirimi	32
3.2.2	PCR Döngü Parametreleri	32
3.2.3	Su Altı Agaroz Jel Elektrofözezi	34
3.2.4	Agaroz Jelinin Hazırlanması	34
3.2.5	Jelin Yüklenmesi ve Elektroförez	34

3.2.6	DNA Hibridizasyonu	35
3.2.7	Renklendirme ve Görünürleştirme	36
3.2.8	Dizine Özgü Primer Yöntemi (SSP)	37
3.2.9	PCR Döngü Parametreleri	37
3.2.10	SSP Tiplemesinin Jel Elektroforez ile Görünürleştirilmesi	38
3.3	DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER	39
3.3.1	DNA Çekitleme Çözeltileri	39
3.3.2	DNA Hibridizasyon ve Yıkama Çözeltileri	41
3.3.3	Renklendirme Çözeltisi	42
3.3.4	SSP Yönteminde PCR Çoğaltma Çözeltileri	43
3.3.5	SSP Yönteminde PCR Çözeltisi	43
3.3.6	Elektroforetik Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması	44
3.4	KİMYASAL MADDELER	45
3.5	KULLANILAN GEREÇLER	47
4	BULGULAR	48
5	TARTIŞMA ve SONUÇ	56
6	ÖZET	63
7	SUMMARY	64
8	KAYNAKLAR	65

KISALTMALAR

ARFP	Çoğaltılarak sınırlandırılmış parçacık polimorfizmi
ASO	Alele özgü oligonükleotid
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
DTAB	Dodesil trimetil amonyum bromür
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
HLADQA1	İnsan lökosit antijenleri DQA1 lokusu
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
PM	Poli Markır
RDB	Ters nokta emdirimi
RFLP	Sınırlandırılmış parçacık uzunluk polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SSCP	Tek zincirli konformasyonel polimorfizmi
SSO	Dizine özgü oligonükleotid
SSP	Dizine özgü primer
STR	Kısa tekrar dizinleri
TBE	Tris borat edta
TMB	Tetra metil benzidin
VNTR	Değişken sayıda ki tekrar dizinleri

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Adli Bilimlerin kapsamı içinde olan, akrabalık ilişkilerini belirleme ve kişi idantifikasyonunda gerek protein gerekse DNA varyasyonları şeklinde görülen genetik polimorfizm kullanılır (Cavalli-Sforza, 1994).

Bu tür polimorfik sistemlerden biri olan HLA 100'den fazla gen içerir ve 4 milyon baz çiftinden oluşan bir kromozomal alan kapsar (Klein, J. ve ark., 1993). Temelde I ve II olmak üzere iki sınıfta toplanan HLA genlerinde HLA DQ, 6. kromozomun kısa kolunda bulunur ve yüksek çeşitlilik gösteren bir dizi heterodimerik proteinin kodlanmasını sağlar (Mayr, W.R. ve ark. 1993).

HLA polimorfizminin tiplenmesi, çeşitli konvansiyonel serolojik ve histokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve babalık tayini ile idantifikasyonda geniş çapta uygulanmıştır (Hopkinson 1993). Ancak son yıllarda geliştirilen DNA düzeyinde tipleme, konvansiyonel tekniklere oranla çok daha kesin olduğu gibi az miktarda örnek gerektirdiğinden, günümüzde Adli Bilimler laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pai ve ark. 1995).

Bu amaçla, özellikle HLA DQA1 lokusunu incelemek için PCR-direkt dizin analizi (Gyllensten ve ark 1988), PCR alele özgü oligonükleotid hibridizasyonu (Saiki ve ark. 1986) PCR-dizine özgü primer (Olerup, O., 1993) ve PCR uzunluk polimorfizmi (Uryu ve ark. 1990) gibi birçok farklı teknik kullanılmıştır.

Herhangi bir tekniğin, olgu aydınlatmada kullanılabilmesi için önce Adli Bilimlere uygunluğu saptanmalıdır. Ayrıca genetik işaretler yoluyla kişi idantifikasyonuna gidebilmek için ilgili popülasyon veya popülasyonların alel/fenotip frekanslarının bilinmesi şarttır. Bu şekilde bir genetik profilin dışlama gücünü hesaplama olanağı ortaya çıkar (Budowle ve ark. 1995).

Bu alışmada, HLA DQA1 lokusunun PCR-alele özü nükleotid ile ters nokta emdirimi ve PCR-dizine özü primer adlı iki farklı teknikle tiplenmesi, Adli Bilimler açısından incelendi ve sistemin idantifikasyon amacıyla kullanılabilmesi için alellerin gen/fenotip frekansları saptandı.



2. GENEL BİLGİLER

Adli amaçlı DNA analizleri, sağladıkları yararlar ile kısa zamanda geçerliliğini kanıtlayarak suç ve suçluların idantifikasyonuna ve babalık davalarına doğruluk ve hız getirmiştir.

Çeşitli ülkelerde DNA testleri adli makamlar ve bilim adamlarının işbirliği ile cezai ve hukuki davaların çözümünde kesin delil sağlamak amacı ile kullanılmaktadır. Bu davaların kapsamına çeşitli cinayet ve tecavüz olaylarının çözümü, babalık (nesep) belirtimi ve diğer akrabalık ilişkilerinin aydınlatılması girmektedir.

Son yıllarda, insan DNA'sında birçok yeni genetik polimorfizm gösteren bölge bulunmuş, bunların incelenmesi ve kullanılabilirliği saptanmıştır.

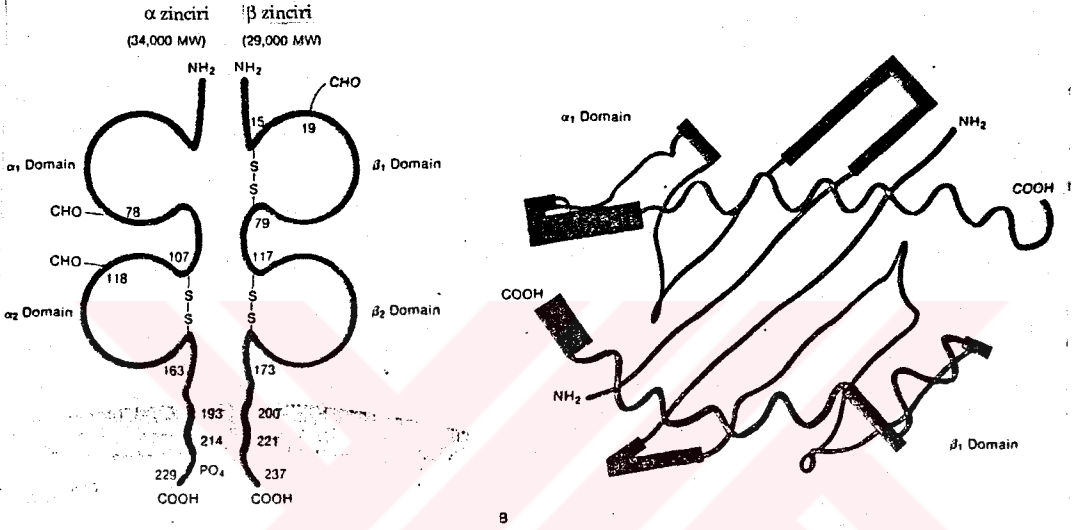
Günümüzde genetik yapısı, kesinlik kazanmış lokuslardan biri HLA II grubu antijenlerini kodlayan HLA DQA1'dir.

2.1 İNSAN LÖKOSİT ANTİJENLERİNDEN DQA1'İN YAPISI (HLA DQA1)

HLA DQA1, büyük doku uygunluk kompleksinin (MHC) gen ürünlerinden biri olup, II. sınıf HLA antijenleri grubuna dahil edilir. Antijeni kodlayan gen polimorfiktir ve 6 nominal allel ile bunların alt gruplarını içerir (Helmuth, R. ve ark., 1990), (Brown, J.H. ve ark., 1988).

II. sınıf HLA molekülleri α (34000 = ma) ve β (ma = 29000) olmak üzere 2 glikoprotein zincirinden oluşur (Şekil 1). Her iki zincir hücre zarı içerisine girer ve her zincir 3 ayrı bölgeye ayrılır. Amino ucundan başladığında, hidrofilik bir hücre dışı kısım, hidrofobik bir transmembran kısım ve intrasitoplazmik bir hidrofilik kuyruk bulunur. Her hücre dışı bölüm, kendi

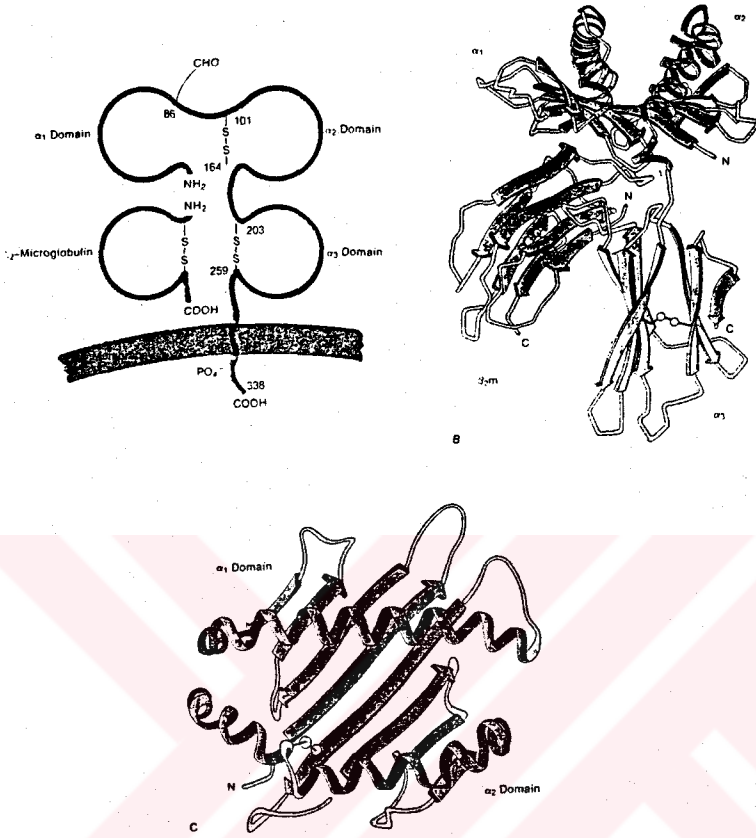
içinde, a zinciri için $\alpha 1$ ve $\alpha 2$, b zinciri için $\beta 1$ ve $\beta 2$ olarak adlandırılan 2 kısma ayrılabilir.



Şekil 1. II. sınıf HLA moleküllerinin yapısı.

$\alpha 2$ ve $\beta 2$ kısımları, immunoglobülinlerde bulunan sabit kısım ile benzerlik gösterdiğinden II. sınıf molekülleri, immunoglobülin supergen ailesine dahil edilmektedir (Schwartz, B.D., 1992).

Ayrıca $\alpha 2$ ve $\beta 2$ kısımlarının, molekülün hücre membranına proksimal bölümlerinin olduğu ve distal etkileşen bölümlere destek oluşturdukları bildirilmektedir (Bugawan, T.L. ve ark., 1988). Şekil 2'de, CD4⁺T lenfositlerindeki T-hücre reseptöründe $\alpha 1$ ve $\beta 1$ kısımların hipotetik görünüşleri verilmektedir.



Şekil 2. CD4⁺T lenfositlerindeki T-hücresi reseptöründe $\alpha 1$ ve $\beta 1$ kısımların hipotetik görünüşleri

HLA II. sınıf molekülleri organizmada özellikle B hücreleri, makrofajlar ve etkin T hücrelerinde bulunur ve CD4⁺T hücrelerinin yabancı antijenik peptidleri tanınmasında yardımcı olur.

Bazı durumlarda sentezleri, interferon γ etkisi ile, normal şartlarda sentezlenmedikleri endotel, tiroid, epidermal ve renal hücrelerde indüklenebilmektedir. Yeni sentezlenen HLA sınıf II molekülleri hücre zarına taşındıkları sırada asidik endosomal bölgede, entiferik peptidlere bağlanırlar. Hücre zarı üzerinde, sınıf II moleküllerinin α heliksleri, bağlanmış oldukları peptid ile birlikte, bir CD4⁺T hücresi reseptörü için

ligand görevi görürler. II. sınıf HLA genleri aynı zamanda bağışıklık sisteminin kontrol mekanizmasında, immün cevabın verilmesinde düzenleyici ve sınırlandırıcı olmak üzere anahtar bir rol oynarlar.

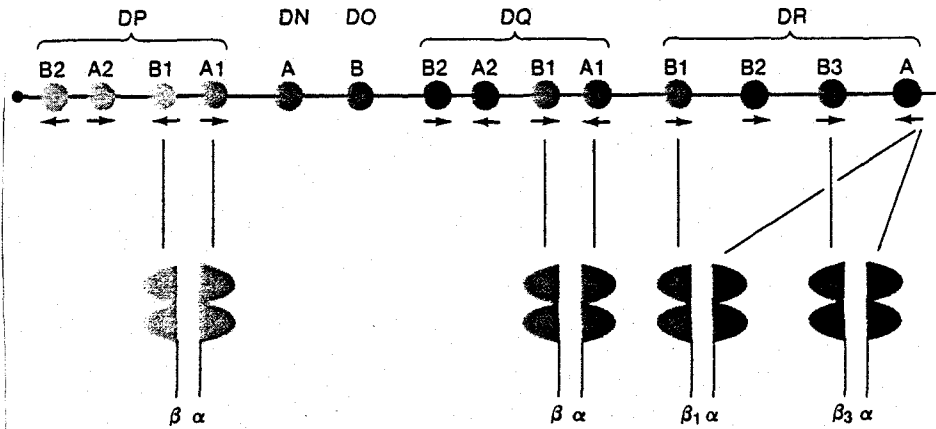
Timusdaki pozitif ve negatif seleksiyon ile olgun T-hücrelerinin miktarını kontrol ederler, T-hücrelerine antijen tanıtımında moleküler destek sağlarlar, böylece immün cevabı başlatmada bir görev üstlenirler.

Bu düzenleyici rollerinden dolayı II. sınıf gen ürünleri (aynı zamanda bunlar Ia molekülleri olarak da bilinirler), özgün ve sınırlandırılmış hücre tipi bir dağılım gösterirler. HLA II sınıf genleri, bağışıklık sistemindeki yabancı antijenlere karşı geliştirdikleri yanıt ve ökaryotik gen regülasyonundan dolayı önemli bir yer tutarlar (Benoist, C. ve ark., 1990), (Auffray, C. ve ark., 1987).

2.1.1 HLA kompleksinin genetik organizasyonu

HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolunda bulunur (Şekil 3). HLA genleri 3 grupta toplanır.

6. Kromozom



Şekil 3. HLA kompleksinin genetik organizasyonu.

- a) Klasik doku uygunluk kompleksini oluşturan sınıf I olarak da adlandırılan HLA-A, B ve C lokusları,
- b) Sınıf II olarak bilinen HLA DR, DQ ve DP lokusları,
- c) Bir dizi suda çözünür protein kodlayan genler. Bu gen dizisi topluca sınıf III olarak da adlandırılmaktadır. Bf, C2, C4A ve C4B lokusları, properdin faktör B ve kompleman sisteminin 2. ve 3. bileşenlerini kodlar.

Ayrıca, HLA kompleksine yakın konumda, TNF α ve TNF β lokusları, tümör nekrozis faktör a ve b (limfositotoksin) ve HSP70 lokusu hücre stresinde rol oynayan bir proteini kodlayan genler bulunur (Kappes, D. ve ark., 1988), (Morzycka, E., 1993), (Del Pozzo, G. ve ark., 1990).

DNA düzeyinde, DQ alt bölgesi 2 çift A ve B geni içerir. DQA2 ve DQB2 olarak bildirilen çift, psödogen olup ürün kodlamaz. Diğer çift DQA1 ve DQB1'dir ve DQ $\alpha\beta$ molekülünün sentezini sağlar.

2.1.2 HLA DQA1 Polimorfizmi

HLA DQA1 lokusunda yaygın olarak gözlenen 12 polimorfik alel tanımlanmıştır. Bu aleller DQA1 0101, 0102, 0103, 0104, 0201, 0301, 0302, 0401, 0501, 0502, 0503 ve 0601'dir. Bu 12 farklı alel 78 homozigot ve heterozigot kombinasyon meydana getirirler. Ayrıca DQA1 0101 alelinin 01021 ve 01022 ve 0501 alelinde 05011, 05012 ve 05013 olmak üzere sırasıyla 2 ve 3 alt tipi bulunmaktadır (Olerup, O., 1993), (Fogdell, A. ve ark., 1994).

II. sınıf polimorfik genler büyük ölçüde 2. eksonda bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar MHC polimorfizminin çok eski olduğunu ve evrimsel değişikliklerin diğer memeli genlerinden çok farklı olmadıkları düşüncesindedirler, ancak Güney Amerika yerlilerinde bazı yeni HLA B varyantlarının bulunması diversifikasyon hızının yüksek olduğu savını desteklemektedir (Titus, E.A. ve ark., 1994).

DQ antijeninin α alt ünitesini kodlayan gen (HLA DQA1) çok yüksek polimorfizm sergilemektedir (Del Pozzo, G. ve ark., 1992). Bu polimorfizm immunolojik ve moleküler analiz metodlarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu lokuslardaki polimorfizm;

1- Lokus başına çok fazla sayıda alel olması; yüksek organizmaların protein kodlayan bölgelerini çok polimorfik yapması;

2- Kısa delesyonları da kapsayan birden fazla konumlardaki alellerin farklılığı ile birlikte bir lokustaki aleller arasındaki geniş çeşitlilik;

3- Alel frekanslarının dağılımının birçok nükleer genden farklı olması;

4- Sürekli olarak beta (β) zincirini şifreleyen lokusun α zincirini şifreleyen lokustan çok daha polimorfik olması ile karakterize edilebilir (Gyllensten, U.B. ve ark., 1990).

Hafif zinciri şifreleyen B genleri ağır zinciri şifreleyen A genlerinden daha polimorfiktir. Fakat HLA DQA1 ağır zincir geni bu genel kuralın dışında önemli bir farklılık gösterir. Çünkü HLA DQA1'in hem DNA düzeyinde hem de serolojik düzeyde polimorfik olduğu çeşitli analizlerle kanıtlanmıştır (Del Pozzo, G. ve ark., 1992).

Çeşitli araştırmacılar, dünya popülasyonlarında, sözkonusu lokusun frekanslarını belirlemişlerdir (Tablo 1).

2.1.3 HLA DQA1 Genlerinin Adlandırılması

HLA adlandırma komisyonu, yüksek polimorfizm gösteren bu sistem için bir lokus sayısı ve 4 numaradan oluşan bir adlandırma yöntemi geliştirmiştir (Tablo 2) (Bodmer, J.G. ve ark. 1994).

Tablo 1. Çeşitli dünya popülasyonlarında HLA DQA1 gen frekanslarının dağılımı.

	0101	0102	0103	0201	0301	0401	0501	0601	n (denek sayısı)	
OKYANUSYA MAORI	0,27	0,57	0,68	0,25	0,20	0,43	-	-	34	Stringer, P., 1985
AME PASİFİK ADALARI	0,67	0,61	0,13	0,01	0,43	0,26	-	-	196	Stringer, P., 1985
AME FLORIDA	0,13	0,20	0,63	0,17	0,17	0,22	-	-	914	Crouse, A., 1994
AME ABD	0,17	0,34	0,65	0,97	0,79	0,38	-	-	145	Budowle, B., 1995
AME ABD (BEYAZLAR)	0,22	0,76	0,91	0,18	0,216	0,38	-	-	148	Budowle, B., 1995
AME GÜNEY AMERİKA	0,377	0,39	0,06	0,35	0,04	0,76	0,65	0,006	161	Cerna, M., 1992
AME CINGENELELER	0,41	0,25	0,24	0,24	0,25	0	0,25	0,029	31	Cerna, M., 1992
AS TAYVAN (ÇİNLİLERİ)	0,62	0,161	0,65	0,25	0,351	0,29	0,178	0,079	121	Pal, C.Y., 1995
AS ÇİN	0,12	0,174	0,92	0,28	0,258	0,25	-	-	250	Te, J., 1995, Huang, N.E., 1995
AS MALEZYA	0,181	0,92	0,69	0,77	0,1	0,381	-	-	280	Koh, C.L., 1994
AS HİNDİSTAN	0,24	0,24	0,23	0,131	0,157	0,157	-	-	274	Koh, C.L., 1994
AS KORE	0,155	0,21	0,16	0,09	0,382	0,27	-	-	116	Woo, K.M., 1995
AS SUUDİ ARABİSTAN	0,65	0,138	0,165	0,010	0,138	0,78	-	-	94	Hayes, J.M., 1995
AS JAPONYA	0,126	0,137	0,166	0,061	0,427	0,006	0,065	0,030	916	Hashimoto, M., 1994
AS-AV BDT	0,140	0,211	0,170	0,064	0,300	0,130	-	-	39	Kurth, J.H., 1992
AV İNGİLİZLER	0,161	0,184	0,42	0,133	0,237	0,220	0,017	0,005	354	G.Derek, 1992
AV BAŞI POLONYA	0,65	0,66	0,164	0,018	0,451	0,246	-	-	122	Stringer, P., 1985
AV İSVİÇRE	0,148	0,193	0,65	0,150	0,145	0,275	-	-	200	Hochmeister, M.N., 1994
AV G.DOĞU İSPANYA	0,181	0,154	0,60	0,160	0,191	0,234	-	-	94	Budowle, B., 1995, Castillo, 1995, Crespillo, M., 1995
AV G.BATI İSPANYA	0,141	0,135	0,631	0,094	0,229	0,370	-	-	96	Budowle, B., 1995, Santos, S.M., 1995
AV İTALYA	0,1845	0,2067	0,631	0,162	0,437	0,336	-	-	103	Tagliabranzi, A., 1992
AV FİNLANDİYA	0,174	0,201	0,67	0,68	0,174	0,26	-	-	112	Sajantila, A., 1991
AV ÇEKOSLAVAKYA	0,233	0,33	0,162	0,34	0,152	0,40	0,35	0,010	99	Cerna, M., 1992
AV İSVEÇ	0,102	0,248	0,62	0,68	0,240	0,20	-	-	354	Allen, M., 1983
AV ALMANYA	0,137	0,197	0,65	0,109	0,201	0,271	-	-	826	Helmuth, R., 1990, Hakenbeck, W., 1995, Wierchhold, G. M., 1983
OKYANUSYA YENİ ZELANDA	0,138	0,215	0,47	0,15	0,177	0,233	-	-	254	Stringer, P., 1985

Tablo 2. HLA DQA1 sisteminin adlandırılması (Ollerup, O ve ark. 1993), (Bodmer, J.G. ve ark., 1994).

HLA Alelleri	Eski Adlandırma
DQA1*0101	DQA 1.1, 1.9
DQA*10102	DQA 1.2, 1.19
DQA1*0103	DQA 1.3, 1.18
	DRw8-DQw1
DQA1*0104	-
DQA1*0201	DQA 2, 3.7
DQA1*03011	DQA 3, 3.1, 3.2
DQA1*03012	DQA 3, 3.1, 3.2, DR9-DQw3
DQA1*0302	DQA 3, 3.1, 3.2, DR9-DQw3
DQA1*0401	DQA 4.2, 3.8
DQA1*0501	DQA 4.1, 2
DQA1*05011	DQA 4.1, 2
DQA1*05012	DQA 4.1, 2
DQA1*05013	DQA 4.1, 2
DQA1*0502	-
DQA1*0601	DQA 4.3

Örneğin HLA DQA1 lokusunun ikinci alleli, HLA DQA1*0201 olarak gösterilmektedir. Gösterimdeki ilk iki sayı (02) allel tarafından kodlanan molekülün oluşturduğu antijenik belirleyiciye aittir. Yani HLA DQA1 *0201 alleli HLA DQA1,2 molekülünü belirler. Son iki sayı, farklı alelleri belirler (Schwartz, B.D., 1992).

2.1.4 HLA DQA1 Lokusunun Hastalıklarla İlgisi

HLA DQA1 lokusunun insüline bağlı diyabet ile bir bağlantısının olup olmadığı üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, de Zimbabwe'deki homojen zenci populasyonundan alınan materyalde, PCR ürünlerinin nokta emdirimi tekniği ile tiplendirildikten sonra, DQA1 DRB1 ve DQB1 genotiplerinde bir takım farklılıklar

görüldüğü saptanmıştır. Şöyle ki, insüline bağlı şeker hastalarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, DR4'ün alt tipi DRB1 0405, DR3 alttipi DRB1 0301, DQB1 0201 ve DQB1 0302 ve DQA1 0301 ve DQA1 0501 tiplerinin diyabetlilerde önemli derecede artış gösterdiğini, oysa DRB1 11, DQB1 0602 ve DQA1 0102'nin azaldığı bildirilmiştir. İnsüline bağlı şeker hastalığının kalıtım materyalinin % 60'ının büyük doku uygunluk kompleksinde yer aldığı bilinmektedir. Bu hastalığın henüz kesin olarak kaç genle ilgili olduğu anlaşılamamıştır ancak güçlü ve yaygın olan bu genlerin DQ bölgesinde yer aldığıdır (Garcia-Pacheco, J.M. ve ark., 1992).

HLA bölgesi polimorfizmi ile Hodgkin ve lupus eritematozus arasında, birçok araştırmacı ilgi kurmaya çalışmış, hernekadar HLA B antijenleri ile ilgi kurulmuşsa da HLA DQA1 ile belirlenen hiçbir ilgiye rastlanmamıştır (Klitz, W. ve ark., 1994), (So, A.K.L. ve ark., 1990).

Romatoid artrit, multipl skleroz ve üreme bozuklukları ile ilgili olarak, HLA'ya bağlı başka bir lokusun var olduğu, ve bozukluklara bunun neden olduğu öne sürülmektedir (Jin, K. ve ark., 1995), (Doherty, D.G. ve ark., 1992).

HLA DQA1 Lokusunu Tiplemede Kullanılan Teknikler

HLA DQ antijenleri önceleri serolojik yöntemlerle belirlenmekte idi. Ancak serolojik DQ tipleri sıklıkla olmasa da pratikte güçlük yaratıyor, ya da yanlış sonuçlara neden oluyordu.

Popülasyon genetiği çalışmalarında, frekans belirlemeleri amacıyla İsveç gibi, tümüyle karakterize edilmiş, genetik olarak homojen toplumlarda, DQB1 ve DQA1 alelleri, haplotip analizi ile doğru olarak belirlenmiştir (Olerup, O. ve ark., 1991). Ancak bu yöntem, zaman kaybına neden olmakta ve heterojen toplumlardaki DQ alellerini tanımlamaya yetmemektedir.

DNA tetkik yöntemlerinin gelişmesiyle bu konuya da el

atılmış, ve alel ile frekans belirlemek için çeşitli yollar denenmiştir. Gerek tıp, gerekse adli bilimler alanında kullanılabilir bir sistem olduğundan, DNA düzeyinde HLA DQ tiplenmesi için birçok tekniğin standardize edilmesine gidilmiştir.

Bu teknikler arasında, temelde, yalnızca görünürleştirme farkı vardır. Esasen tümü, DNA'daki hedef bölgenin polimeraz zincir tepkimesi (PCR) denilen yöntemle çoğaltılmasına dayanır.

Şu ana kadar yedi farklı tiplene yöntemi kullanılmıştır.

- (1) sabitleştirilmiş, alele özgü prob ile nokta emdirimi (PCR-ASO)
- (2) dizine özgü primerlerle çoğaltılma (PCR-SSP)
- (3) çoğaltılmış DNA'da parçacık polimorfizmi (PCR-AFLP)
- (4) dizine özgü oligonükleotid problemlerle çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin hibridizasyonu (PCR-SSO)
- (5) PCR ürünleri üzerinde sınırlandırılmış parçacık uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP)
- (6) tek zincirli konformasyonel polimorfizm PCR-SSCP
- (7) PCR ürünleriyle doğrudan dizin analizi

2., 4. ve 5. yöntemler, büyük doku uygunluk kompleksinin II. sınıf alelleri için kemik iliği transplantasyonunda doğru bir tiplene sağlar (Olerup, O. ve ark., 1991), (Uryu, N. ve ark., 1990).

Sözü edilen tekniklerden ilk ikisi (PCR-ASO, PCR-SSP), tezin temelini oluşturan tekniklerdir.

DNA düzeyinde HLA DQA1 lokusunun incelenmesi temelde hücrelerden genomik DNA çekitlenmesi, hedef bölgenin çoğaltılması ve görünürleştirme basamaklarından oluşur. Her basamak için farklı araştırmacılar farklı önerilerde bulunmuşlardır. Bu kısımda bu basamaklar ve prensipleri kullanılan teknikler irdelenmektedir.

2.2 DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ

DNA analizi çalışmalarında, örneklerden DNA çekitlemek için şimdiye kadar bir çok farklı yöntem kullanılmıştır. Çekitleme yapılırken; çevre şartları, kontaminasyon, elde edilen materyalin az ya da çok olması veya kullanılacak teknikler gibi birçok parametre göz önüne alınmaktadır.

2.2.1 Fenol-Kloroform Yöntemi

DNA çekitlemesinde kullanılan yöntemlerden ilki fenol kloroform yöntemidir. Bu yöntemde DNA çekitlemesinde önce proteinler fenol:kloroform kullanılarak uzaklaştırılır. Daha sonra yalnız kloroform kullanılarak bütünüyle saf DNA eldesi amaçlanır. Bu işlemin en büyük avantajı diğer inorganik çözücülerden daha saf ve verimli DNA elde edilmesidir. Fenol proteinleri etkili bir şekilde denatüre etmesine karşın RNAaz'ların aktivitesini bütünüyle engelleyemez. Bu durumda fenol:kloroform:izoamil alkol karışımının kullanılması önerilmektedir (Sambrook, J. ve ark., 1989).

2.2.2 Chelex Yöntemi

Yukarıda sözü edilen yöntem fazla miktardaki örneklerden yüksek moleküler ağırlıklı DNA elde etmede başarılı olmasına rağmen, birçok işlem basamakları gerektirmektedir ve bu basamaklarda DNA çekitin başka kaplara aktarımında veya yıkama gerektiren çeşitli ticari filtrelerin veya kolonların kullanıldığı tuz arıtma işlemini de içermektedir. Bu ara basamaklar kontaminasyon başlamasına ya da örneklerin karşı-transfer oluşturmaya (cross-transfer) neden olur (Walsh, S.P. ve ark., 1991).

Son zamanlarda az miktardaki doku kültürü hücrelerinden DNA'yı çekitlemede Chelex 100 adlı bir maddenin kullanıldığı ve elde edilen DNA'ların PCR aşamasında da oldukça başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Chelex 100 polivalent

metal ionlarına karşı yüksek afiniteye sahip kelatlaştırıcı reçinedir. Chelex çift iminoasetat ionlarını içeren stirin divinilbenzen kopolimerlerinden oluşmuştur ve kelatlaştırıcı grup olarak etkindir. Kaynatma işlemi süresinde Chelex'in varlığında, ionik gücünü düşük çözeltilerde yüksek sıcaklıkta, kelatlaştırıcı metal ionlarının katalizör gibi davranarak DNA'nın kırılmasını ve bozulmasını önlediği bildirilmiştir.

Bu yöntem adli amaçlı örneklerle de uygulanabilmektedir. Yöntemde kaynatma işlemi hücre süspansiyonunun üzerine % 5'lik Chelex çözeltisi eklenmesi ile yapılır. En son aşamada önerilen miktarda süpernatant alınarak PCR çoğaltmasında kullanılır. Chelex süspansiyonunun alkalinitesi pH 10-11 olması ve 100°C ısıya maruz bırakılması sonucunda hücre membranının bozulur ve DNA'nın denatürasyonu meydana gelir. Bu yüzden Chelex çekilmesi sonucunda DNA örneği denatüre olduğundan dolayı bu işlem RFLP analizi için uygun değildir.

Chelex 100 kelatlaştırıcı reçine kullanımı adli amaçlı örneklerle çalışırken de büyük kolaylık sağlamaktadır (Wilson, R.B. ve ark., 1994).

Bu işlemler örnek tiplenmesinin büyük bir çoğunluğunda kolay, hızlı olmasıyla beraber ayrıca ne organik çözücü ve ne de çok fazla tüp transferi gerektirmezler.

Chelex yöntemi, tam kan, kan lekesi, sperm lekelerinden, vajinal sekresyondan, kıl kökü ve cinsel ilişki sonrası elde edilen materyaller gibi birçok farklı örnek tiplerinden HLA DQA1 lokusunda DQA1 genotipleri tiplenmesinde ve çoğaltılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Walsh, S.P. ve ark., 1991).

2.2.3 Trimetil Amonyum Bromür Tuzu Yöntemi

DNA'nın tam kandan çekitlenmesinde kullanılan alternatif yöntemlerden birisi de, güçlü bir denatürasyona neden olan, yüksek tuz derişimi içerisindeki (1 M NaCl) ionik deterjan,

dodesiltrimetil amonyum bromür (DTAB) ve çökelmeye neden olan düşük tuz derişimi içerisinde bulunan katyonik deterjan, setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) kullanımıyla çalışılan bir yöntemdir. Bu yöntemle elde edilen DNA, ilgili uygulamalarda (sınırlandırılmış enzim sindirimi, PCR, vb.) başarıyla kullanılabilir.

Bu yöntemle, 300 µl tam kandan genomik DNA çekilmesi yapılabilir. Yöntemin ilk aşaması, 68°C'de yüksek tuz derişimi içerisinde güçlü bir denatürasyona neden olan katyonik deterjan DTAB'nin kullanımıyla kanın lizis olmasıdır. İkinci aşamada ise deterjan ve denatüre olmuş proteinler, kloroform çekilmesiyle ortamdan uzaklaştırılır. Denatüre olan proteinler organik ve sulu faz arasında katı bir çökelti oluştururlar. Genomik DNA'nın bulunduğu sıvı kısım yeni bir tüpe aktarılır. Bu aktarım aşamasında pipet kullanılmadığından DNA'nın bütünlüğü korunur, geri kazanımı arttırılır. Üçüncü aşama ise düşük tuz (NaCl) derişimi içerisindeki CTAB'nin eklenmesiyle genomik DNA'nın çökeltilmesidir. Tüm yöntem bir saatten daha az bir zaman içerisinde tamamlanır ve sonuçta 300 µl'den elde edilen DNA \pm 1.5 µg'dır.

Elde edilen DNA'nın niteliği oldukça yüksektir. Spektrofotometredeki ölçüm 260/280 O.D. oranı 2.0 ± 0.1 'dir (Gustincich, S. ve ark., 1991).

2.2.4 NaCl'e bağlı DNA Çekilmesi (Salting out)

DNA çekilmesinde kullanılan klasik fenol, kloroform yöntemindeki en önemli aşama hücrelerin deproteinizasyonu aşamasıdır.

Bazı toksik olmayan çekilme yöntemleri de vardır. Fakat bunlar ya filtre kullanımlarını gerektirir ya da pahalı dializ kullanımı ile ayırma işlemleri gerektirir. 1988 yılında Miller ve arkadaşları deproteinizasyon (proteinli bir maddedeki proteinin uzaklaştırılması), işlemini basitleştiren hızlı,

güvenilir ve pahalı olmayan bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem, doymuş NaCl çözeltisi kullanarak dehidrasyon ve çökeltme ile hücre proteinlerinin uzaklaştırılmasına, dışarı çıkartılmasına dayanır.

Bu yöntemle elde edilen DNA'nın saflığı, fenol-kloroform yöntemiyle çektirilen DNA ile karşılaştırıldığında aynı olduğu görülmüştür. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyunda okunan değerlerin birbirine oranında 1.8-2.0 değeri elde edilmiş, bu da iyi bir deproteinizasyon sağladığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Miller, S.A. ve ark., 1988).

2.3 POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (PCR)

Bu tür incelemelerde, polimeraz zincir tepkimesi (PCR) olarak bilinen ve günümüzde teknolojinin dönüm noktası olarak nitelendirilen teknik kullanılmaktadır (Corney, C.T. ve ark., 1991).

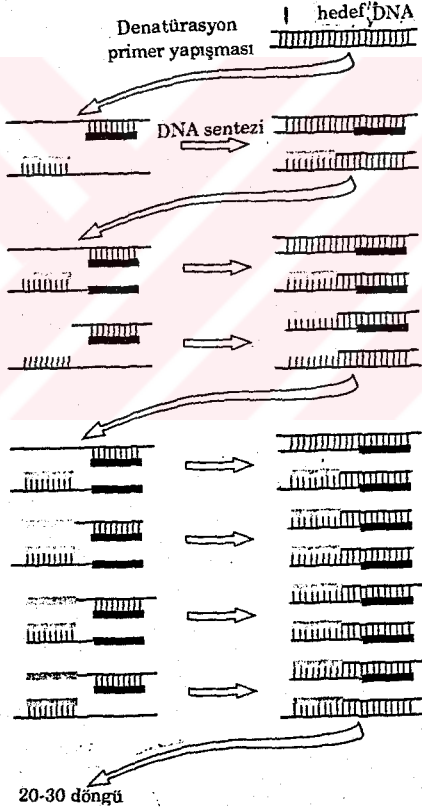
Söz konusu teknik çok geniş bir alanda uygulanabilmektedir. Doğum öncesi tanıda, kalıtsal hastalıklarda, diyabet ve kanser gelişimine neden olan gen mutasyonlarının araştırılmasında ve adli amaçlı uygulamalarda büyük kullanım alanına sahiptir.

Adli bilimler alanında polimeraz zincir tepkimesi ile kontamine olmuş veya çok az miktarda DNA içeren birçok biyolojik delil, örneğin, olay yerinde bulunan bir tek saç kılı, kemik parçası, kan lekesi, vajina epitel hücreleri ile karışık semen ve tırnakların altında bulunabilecek doku parçaları gibi örneklerin analizi mümkün olabilmektedir (Gyllensten, U.B. ve ark., 1992), (Akane, A. ve ark., 1995).

Polimeraz zincir tepkimesi, araştırılması istenen hedef gen dizinini çoğaltır. Bu teknoloji bir dizi DNA'nın kendini eşleme döngüsünü içerir ve DNA polimeraz enzimi kullanımıyla hedeflenen dizinin milyonlarca kopyası yapılır. Yöntemin en önemli özelliği oldukça az miktarlardaki biyolojik materyalin başlamak için gerekli olan çoğaltmaya yeterli kabul

edilmesidir (Graul, A.I., 1989).

Polimeraz zincir tepkimesinde yöntem; primer (ya da amplimer) adı verilen yapay oligonükleotitlerin, denatüre edilerek ayrılmış DNA zincirlerine bağlanması (primer annealing), hedef bölgede karşılık gelen zincirin DNA polimeraz etkinliği ile primerden başlanarak okunması (primer extention) ve oluşturulan zincirlerin denatüre edilerek birbirlerinden ayrılması şeklinde 3 temel aşamayı içermektedir. Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilir ve döngü sayısı amaç doğrultusunda arttırılır. Deneyin sonunda çoğaltılmış hedef bölge elektroforeze tabi tutularak gözlemlenir (Şekil 4) (Ross, W.D. ve ark., 1990).



Şekil 4. Polimeraz zincir tepkimesinin görünümü.

PCR yöntemi, önce detaylı bir şekilde tarif edilmesine rağmen, Cetus şirketinde Mullis ve ark. tarafından isimlendirilmiş ve tam olarak otomasyona sokulmuştur. PCR'ın kullanımı, ısıya karşı dayanıklı polimerazların yaygın olarak kullanılabilmesinin anlaşılmasına kadar kısıtlıydı (Taylor, G.R., 1992).

Önceleri PCR işlemi *Escherichia coli* bakterisinden elde edilen DNA polimerazın kullanımı ile yapıyordu. Ancak bu polimeraz çok yüksek sıcaklıkta aktif değildi ve bu yüzden her bir sonraki döngünün başlangıcında ortama yeni enzim eklenmesi gerekiyordu, bu da oldukça zor ve pahalı bir işlemdi.

Bu sorun, bilim adamlarının yüksek sıcaklıkta bile aktif olan bir bakteriyi keşfetmeleriyle çözüldü. Bu bakteri sıcak su birikintilerinde ve doğal sıcak su kaynaklarında yaşayan *Thermus Aquaticus* adlı bir bakteridir. Kısaca Taq olarak isimlendirilen bu bakteriden elde edilen DNA polimeraz, PCR'ın ısı döngülerinde hiç bir zarara uğramadan görevini yerine getirebilmektedir (Graul, A.I., 1989), (Gyllensten, U.B. ve ark., 1988).

2.4 ÇALIŞMADA KULLANILAN İKİ TİPLEME TEKNİĞİ

2.4.1 Alele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu (PCR - ASO)

PCR amplifikasyonu ve alele özgü oligonükleotid hibridizasyonu (ASO), ikinci eksonda bulunan HLA DQA1 lokusundaki genetik polimorfizmi ve alelik çeşitliliği analiz etmek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. Alele özgü oligonükleotid (ASO) sadece eşleşmesi gereken dizine yapışmaktadır. Yöntemin duyarlılığını özgünlüğünü ve basitliğini arttırmak için ASO ile hibridizasyondan önce, HLA DQA1 bölgesinin özgün bölgesini enzim kullanılarak çoğaltabilmek amacıyla PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) kullanılmaktadır (Saiki, K.R. ve ark., 1986a).

Bu PCR'a bağlı yöntemde, örnekteki hedef dizin çoğaltılarak

test edilmektedir. Çoğaltılan DNA, özel bir naylon membran üzerine sabitleştirilmekte ve her bir membran işaretli oligonükleotid problarla, uygun şartlar altında hibridizasyona sokulmaktadır. Bu teknik **nokta emdirimi** (dot-blot) tekniği olarak adlandırılır. Bu yöntemde, her bir prob sadece bir çoğaltılmış DNA ile hibritleşmelidir. Ancak yanlış hibritleşme sonucunda hatalı pozitif sonuçlar alındığından, teknik geliştirilerek ters nokta emdirimi şekline dönüştürülmüştür. Bu teknikteki temel fark, naylon membran üzerine, çoğaltılmış DNA'ların değil, alele özgü oligonükleotidlerin emdirilmesidir. Bu oligonükleotidlerin naylon membran üzerinde hareketsizleştirilmesi (immobilize edilmesi) için mor ötesi ışık kullanılır ve sabitleştirilme bu şekilde gerçekleştirilir. Membranları mor ötesi ışığa maruz bırakmak DNA'daki timin bazlarını aktifleştirir ve molekül naylon membran üzerinde bulunan birincil aminlerle kovalent bağ yapar.

Çekitlenen DNA'daki hedef dizin (HLA-DQA1 bölgesi) biotinle işaretli primerler kullanılarak çoğaltılır. PCR ürününün hareketsizleştirilmiş oligonükleotidlerle hibridizasyonu gerçekleşir ve sonra enzim konjugatın, biotinlenmiş primerlere bağlanması kendiliğinden oluşur (Saiki, R.K. ve ark., 1986b).

DNA üzerindeki HLA-DQA1 lokusunun PCR ile çoğaltılıp ters nokta emdirimi ile tiplenebilmesinin Adli Bilimlere sağladığı yarar, özellikle gerek kişi idantifikasyonunda gerekse babalık belirtiminde çok fazladır.

ASO tekniğinde yorumlamada herhangi bir güçlkle karşılaşıldığında; bunun bir çok farklı teknik nedeni olabilir. Örneğin fazla PCR ürünü sonucunda, hibridizasyon ve yıkama aşamalarında sıcaklığın optimal şartlarda sağlanmaması sonucunda aleller arasında çapraz hibritleşmenin engellenmesi ya da hibridizasyon süresince örneklerin fiziksel kontaminasyona maruz kalınabilmesidir.

HLA DQA1 lokusunda bulunan 6 alel 1, 2, 3, 4, 1.3 ve 1.2; 1.3, 4 aleli Perkin Elmer'in ters nokta emdirim yöntemine dayanan DQA1 Ampli type kiti ile tiplenebilirken DQA1

alellerinin 4.1 (0501), 4.2 (0401) ve 4.3 (0601) alt tipleri tiplenememektedir. Daha sonraları Salazar, M. ve ark. bu üç alelin DQA1 amplitype kitinden elde edilen PCR ürünlerini, endonükleaz enzimleriyle keserek bu alelleri tiplediler (Salazar, M. ve ark., 1994).

Çoğaltılarak sınırlandırılmış parçacık polimorfizmi - (Amplification restriction fragment polymorphism (ARFP)) olarak adlandırılan bu teknikte DQA1 PCR ürünü, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek elektroforeze tabi tutulur (Harrington, C.S. ve ark., 1991), (Maeda, M. ve ark., 1989).

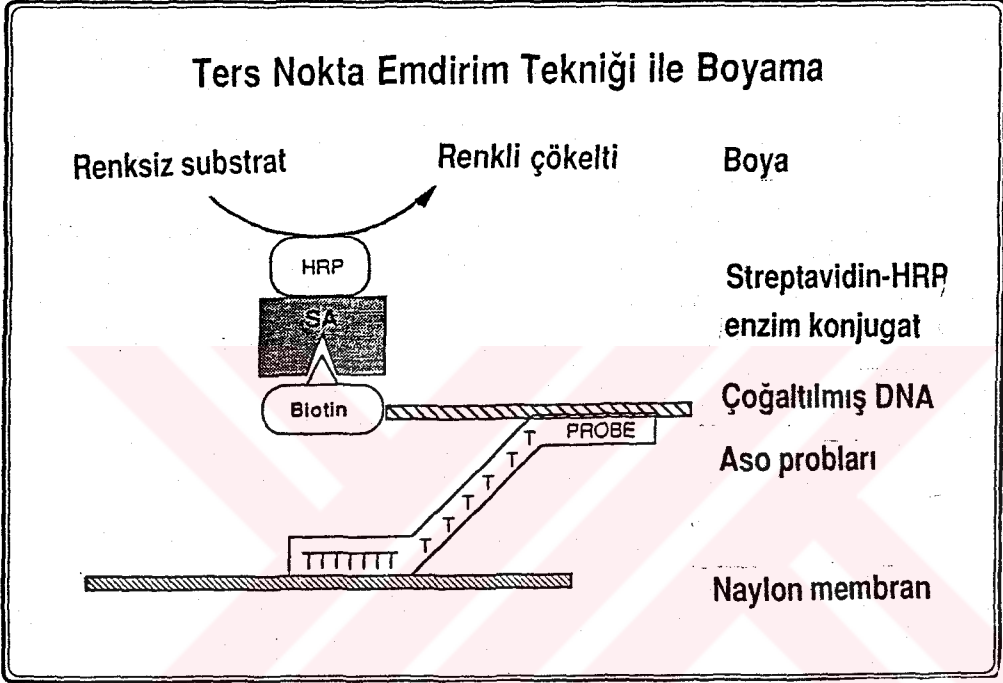
Ancak bazen kullanılan restriksiyon enzimleriyle sindirim tam anlamıyla kontrol edilememekte, bu hem zaman hem de kaynak kaybına neden olmaktadır.

2.4.2 Nokta Emdirimi (DOT BLOT) Tekniğinde Görünürleştirme

Hibridizasyon aşamasında, çoğaltılmış DNA'lar 95°C'de denatüre olduktan sonra prob lar tarafından yakalanır ve prob şeritleri (naylon membran) üzerinde sabitleştirilir ve DQA1 alelleri prob dizinleri ile eşleşerek hibridizasyon gerçekleştirilir.

HLA DQA1 PCR tepkime karışımı içerisinde bulunan biotin molekülü primerlerin 5' sonuna kovalent olarak bağlanmıştır. Çoğaltma aşamasında DQA1 DNA sarmalının her biri bir primere bağlanır. Hibridizasyon aşaması boyunca prob şeritleri üzerinde sabitleştirilmiş olan çoğaltılmış DQA1 DNA'sı biotin uçlarından dolayı tanımlanır. Enzim (streptavidin-horseradish peroksidaz) konjugat'ın kullanıldığı renk gelişimi aşamasında prob şeritleri üzerinde biotinle birleşmiş olan DNA belirlenir. Streptavidin biotine yüksek bir afinite ve özgünlükle bağlanır. Horseradish peroksidaz çözünebilir renksiz tetrametilbenzidin (TMB) oksidasyonunu katalizleyerek çözünebilir mavi ürün oluşturur. Prob noktalarına yerleşen bu boya prob şerit membranının üzerinde sabitleşir ki bu da DQA1 alellerinin tamamıyla prob lar

tarafından yakalandığının göstergesidir.



Şekil 5. Görünürleştirme mekanizması.

2.4.3 Membran Şeritleri Üzerindeki Sonuçların Yorumlanması

Prob Şeritleri üzerindeki mavi noktalar, örnek DNA içerisindeki DQA1 alellerin varlığını gösterir. Prob şeritlerinin değerlendirilmesine, öncelikle C kontrol noktasının incelenmesiyle başlanır. Bu nokta boyanmış naylon şeritte en açık renkte olması gereken noktadır ve değerlendirme için bir eşik değeri oluşturur. Eğer şerit üzerinde C noktası okunamıyorsa HLA DQA1 genotipleri tiplenemez. C noktasının varlığı uygun tiplleme ve alt tiplleme için bir garanti sağlar. Membran üzerindeki diğer DQA1 genotiplerini gösteren

noktalar "C" kontrol noktasından daha açık renkte ise, bu DNA kontaminasyonunu, ya da çok fazla miktarda DNA varlığı yüzünden problemlerin düşük düzeyde cross(karşı)-hibridizasyon yaptığını gösterir. Yöntem ile ilgili hatalarda buna neden olabilir.

Analiz edilen DNA'daki DQA1 genotipini tanımlamak için prob tipleri ve alt tipleri kullanılır.

Pozitif noktaların her biri uygun DQA1 allelinin varlığını gösterir.

"1" noktası sadece DQA 1.1, 1.2 ve 1.3 alellerinin varlığında pozitiftir.

"2" noktası sadece DQA 2 alellinin varlığında pozitiftir.

"3" noktası sadece DQA 3 alellinin varlığında pozitiftir.

"4" noktası sadece DQA 4 alellinin varlığında pozitiftir.

4 tane DQA1 alt-tipleme prob'u DQA 1.1, 1.2 ve 1.3'ü ayırtmada kullanılır.

"1.1" noktası sadece DQA 1.1 alellinin varlığında pozitiftir.

"1.3" noktası sadece DQA 1.3 alellinin varlığında pozitiftir.

DQA 1.2 için özgün bir prob yoktur.

"1.2, 1.3, 4" noktası DQA 1.2, 1.3, 4 alellerinin varlığında pozitiftir.

Alt-tiplemede kullanılan diğer bir prob (All but 1.3) 1.3 dışında hepsi ise 1.2, 1.3 genotipini 1.3, 1.3 genotipinden ayırt etmek için gereklidir. Bu nokta 1.3 haricinde ki tüm DQA1 alellerinin varlığında pozitiftir.

"1.3 dışında hepsi" noktası 1.3, 4 genotipinde "C" noktasından daha zayıf olabilir. "All but 1.3" prob'u DQA 1.3 ve DQA 4 dizinlerinde uyumsuz (mismatch) bir baz çiftine sahiptir. DQA 4 dizinindeki bu yanlış eşleşmek, bir G'nin bir T'le eşleşmesinden dolayıdır. Bu yanlış eşleşme kısmen kalıcı olmadığı zamanlar, 4 dizini bu noktada zayıf bir sinyal verir.

Tablo 3. HLA DQA1 sisteminde kullanılan problar.

Prob	Tanımlanan DQA1 Alelleri
1	DQA 1.1, 1.2, 1.3
2	DQA 2
3	DQA 3
4	DQA 4
C	DQA 1.1, 1.2, 1.3, 2.3, 4 (bütün DQA alelleri)
1.1	DQA 1.1
1.2, 1.3, 4	DQA 1.2, 1.3, 4
1.3	DQA 1.3
All but 1.3	DQA 1.1, 1.2, 2, 3, 4

2.4.4 Dizine Özgü Primer Tekniği (PCR - SSP)

Daha önce sözü edilen PCR-ASO ya da PCR-ARFP teknikleri DQA1 sisteminin tüm alelleri tanımlamada ve tüm heterozigot ve homozigot kombinasyonları ayırmada başarılı olamamıştır. Denenmiş olan **dizine özgü primerlerle PCR çoğaltılması** genetik çeşitliliği, tek baz çifti hatalı uyumlarını bile belirleyebilen çok güçlü bir yöntemdir. Bu teknik, 3' sonunda ki bir veya birkaç yanlış uyumlu primerden çok PCR reaksiyonunda çok verimli olarak kullanılan primerlerin tamamıyla çaprazlanması temeline bağlıdır. Bu tekniğin ayırım gücü özellikle heterozigotlarda oldukça yüksektir. Her bir primer çifti aynı kromozom üzerinde bulunan iki dizin motifini tanımlar. PCR çoğaltılması sonrası tiplemeyi tamamlamak hayli kolay ve hızlıdır. Görünürleştirme de jel üzerinde PCR ürünlerinin var olup olmadığına yani çoğalma olup olmadığına bakılmaktadır. Çünkü aleller arasındaki ayırmaya enzime bağlı olarak invitro DNA çoğaltılması sırasında yer almaktadır (Olerup, O. ve ark., 1993).

PCR-SSP yöntemi özellikle organ transplantasyonunda

alıcı-verici çiftleri için çok yararlı olmaktadır. Çünkü serolojik tiplemedeki pahalı reaktifler, özgün antiserum eldesi ya da canlı hücrelerin gereksinimi gibi bir takım güçlüklerin üstesinden gelmiştir (Salazar, M. ve ark., 1993), (Olerup, O, 1990).

2.5 HLA DQA1 LOKUSU TIPLEMESİNİN ADLİ BİLİMLERDE UYGULAMA ALANLARI

2.5.1 Kimlik Belirtimi ve HLA DQA1

HLA DQA1 lokusunun, adli bilimlerde özellikle kimlik belirtimi için yararlılığı bir çok çalışmayla kanıtlanmıştır.

Sajantıla ve ark. 1991 yılında yanarak ölen ve tanınması çok zor olan 10 kişinin yumuşak dokularından genetik tanımlama için polimeraz zincir tepkimesi ile 2 farklı lokus araştırdılar. Bu farklı analizlerden birisi D1S80, diğeri HLA-DQA1 lokusundaki dizin polimorfizmi oldu. Farklı bireylerden alınan tüm örneklerde her iki lokus ve genotiplerin başarı ile tiplenebildiğini bildirilmiştir (Sajantıla, A. ve ark., 1991).

2.5.2 Kemik Dokusu, Kıl ve Tırnakta HLA DQA1 ile Kimlik Belirleme

İnsan dokularından DNA örneklerinin en iyi korunduğu doku kemiktir. Kemikten DNA izolasyonu ve HLA DQA1 lokusu tiplenmesi rutin hale gelmiştir. Her ne kadar çok eski kemiklerde eski bakteriyel kontaminasyon problem oluşturuyorsa da, lokusun tiplenmesi çeşitli araştırmacılar tarafından önerilmektedir (Previdere ve ark., 1993).

Ayrıca kıl örneklerinden yararlanmak da kolaydır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kıl kökünden yararlanılmaktaydı. Ancak HLA DQA1 tiplemesinin sadece saç gövdesinden de yapılabileceği kesinlik kazanmıştır (Caenazzo, L. ve ark., 1993), (Pizzamiglio, M. ve ark., 1993).

Hochmeister ve ark. 1995 yılında yaklaşık bir yıl önce kaçırıldığı bildirilen bir kadının bulunan iskelet kalıntılarından idantifikasyon amacıyla multipleks PCR sistemleri - AmpliType™ PM ve HLADQA1 ve Gene Print™ STR Tripleks sistemlerini kullandılar. Femur kemiğinden elde edilen DNA profili, kadının saç fırçasından çıkarılan saçlarından çekitlenen DNA sonuçları ile karşılaştırıldı. Buna ek olarak cinsiyet tayinine gidebilmek için X-Y homolog gen amelogenini araştırdılar (Hochmeister, M.N. ve ark., 1995).

HLA DQA1 sistemi, ayrıca doğal felaketlerde kazalarda ve savaşlarda ölen ve aradan uzun yıllar geçtikten sonra bulunan insan kalıntılarından (kemik, tırnak, diş, v.b.) kimlik belirtiminde de diğer sistemlerle birlikte kullanılmaktadır. Holland, M.M., ve ark. 1993 yılında Vietnam savaşında esir düşen ya da öldürülen askerlerin kemiklerinden DNA çekitlenerek HLA-DQA1, VNTR (değişken sayıda tekrar dizinleri-variable number of tandem repeat) ve mt DNA dizini analizini kimlik tesbiti için birlikte kullanmışlardır (Holland, M.M. ve ark., 1993).

Higuchi ve ark. 1988 yılında, saç kökünün protein kılıfından, taze koparılmış saç köklerinden ve bir tek saç kılından mitokondri ve nükleer DNA dizinlerini araştırdılar. Bu çalışmada DNA tiplemesi için 3 farklı yöntem kullanılmıştır. PCR'a bağlı DNA analizinde HLA DQA1 lokusunu alele özgü oligonükleotid problemleriyle, ters nokta emdirim tekniği ile çalıştıklarını ve başarılı sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Bu yöntemle saç köklerinden <10 ng'dan daha az DNA ile sonuç aldıklarını bildirmişlerdir (Higuchi, R. ve ark., 1988), (Möller, A ve ark, 1993).

Yakın tarihte tırnak dokusunun incelenmesi ile ilgili araştırmalar da yürütülmüş, ırza geçme ve genel olarak şiddet içeren her türlü olguda bulunabilecek bu materyalden yararlanılmaya gidilmiştir. M. A. Tahir ve arkadaşları tırnakta HLA DQA1 araştırması yapmışlar ve kan sonuçları ile karşılaştırıldığında, önerdikleri teknikle 100 % başarıya ulaşmışlardır. Çürüme açısından düşünüldüğünde dayanıklı olan bu doku tipinde HLA DQA1 sonuçlarının kesin ve güvenilir olması yararlılık açısından kayda değerdir (Tahir, M.A., 1995).

2.5.3. Tükürükte HLA DQA1

Çeşitli çocuk kaçırma, bombalı mektup, tehdit ve gasp olaylarında zarf ve puldan elde edilebilecek deliller çok önemlidir. Tükürük epitel hücrelerinin DNA açısından incelenmesi bu tür olaylara açıklık getirmede önemli bir parametredir.

Ancak bu tür örneklerde hangi DNA lokuslarının güvenilir sonuç verdiği öncelikle kesinlik kazanmalıdır. Yapılan araştırmalarda her ne kadar elde edilen DNA miktarları çok az olsa da (250 pikogram - 2 ng) HLA DQA1 lokusunun zarf ve pullardan rahatlıkla tiplenebildiği ve kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Presley, L.A., 1993).

HLA DQA1 sigara izmaritlerinden de tiplenebilmektedir.

Sigara izmaritleri bazen olay yerinde bulunan tek delil olabilmektedir. Böyle bir delilden maksimum yarar sağlayabilmek için üstünde kalmış olan epitel hücrelerinden DNA tiplemesine gidilmiş ve HLA DQA1 lokusu başarıyla incelenebilmiştir (Sanz ve ark., 1993).

2.5.4 İdrarda HLA DQA1

Adli Bilimlerde, kan ve doku örnekleri dışında çeşitli vücut sıvıları, olayların aydınlatılması açısından büyük önem taşır.

Olay yerinde bulunan ya da şüpheli kişilerden alınan idrar örneklerin toksikolojik analizlerden elde edilen sonuçların ise yararlığı şüphe götürmez bir gerçektir. Ancak bu tür analizlerle çalışılan örneklerde hata payının fazla olması, % 0.05 gibi, bir takım sorunlarında beraberinde getirmektedir. Günümüzde idrardan da DNA çekitlenebilmekte ve niteliği, niceliği belirlendikten sonra çeşitli tekniklerle tiplenebilmektedir. Bu teknikler, örneklerin bir çoğu için yeterince güvenli, duyarlı, ekonomik ve Adli Bilimler açısından da oldukça bilgi vericidir. İdrar örneklerinin içinde, eritrositler, lökositler ve epitel hücreleri bulunur. Bunun yanı sıra bazen spermatozoa ya da

sekretör kişilerde de A, B, H antijenleri veya albumin, fibrin, miyogloblin gibi proteinler de bulunabilmektedir. Normal idrarda metabolik atılım ürünleri (üre antibiyotik, vitamin gibi) yer almaktadır. Ancak, bu maddelerin idrardaki derişimleri, birçok faktöre bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğın diet, beslenme aktivite ya da ilaç kullanımı veya sağıık durumu gibi bir takım faktörler Adli Tıp uygulamalarında bir takım kısıtlamalar getirmektedir. İşte bu kısıtlamaları en az düzeye indirmek için moleküler DNA teknikleri bu aşamada kullanılmaya başlanmıştır. Medintz ve arkadaşları idrar örneklerinde RFLP ve PCR'a bağılı HLA DQ1 ters nokta emdirimi tekniklerini denediler. DNA çekitlemesinde, RFLP tekniğı için fenol / kloroform / izoamil yöntemini PCR - HLA DQA1 tekniğı için de Chelex yöntemini kullandılar (Medintz, I. ve ark., 1994).

2.5.5 Semende HLA DQA1

Özellikle cinsel saldırılarda ve ırza tecavüz vakalarında da HLA DQA1 lokusu kan lekelerinde, çeşitli vücut sıvıları lekelerinde, semen lekelerinden tiplenebilmekte ve şüpheli kişilerden alınan kan örnekleriyle kontrol edilerek suçsuz kişinin dışlanmasına ya da şüpheli kişinin bulunmasına olanak tanınmaktadır. Roy, R. ve ark. semen preparatlarını boyayarak spermatozoaları mikroskopta gördükten sonra bu preparatlardan DNA çekitlemesi yapılarak HLA DQA1 lokusunda çoğaltma ve tipleme yapmışlar, tüm çalışmalarından başarılı sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir (Roy, R. ve ark., 1995).

Adli olaylarda sıklıkla biyolojik örnekler karışmış halde bulunabilmektedir. Özellikle materyalin büyük bir bölümü kurbandan, çok az miktarda da suça katılan kişi veya kişilerden oluşmaktadır. İki genotipin fiziksel ayrımı bazen mümkün olabilmesine rağmen, bazen de, ayrımı tamamiyle gerçekleştirebilmek, hücrelerin lizis olmasından ya da kaybolmasından dolayı mümkün olamamaktadır. Örneğın ırza geçme olaylarından sonra vajinal yayma ile alınan örnekler kurbandan epitel hücreler ve suçludan ise çeşitli miktarlarda

sperm karışımı içerir. Ayrıca bu durum kan lekeleri için de geçerlidir. HLA DQA1 lokusu için geliştirilen enzimatik çoğaltma sistemi ile bu güçlüğünde üstesinden gelinebilmektedir. Bu sistem karışmış genotipli örneklerde bulunan her bir alelinin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca yine bu sistemle çok az miktardaki örneklerde de çalışılabilmektedir. Bu gibi çalışmalarda da HLA DQA1 lokusunun iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Gyllensten, U.B. ve ark., 1992), (Jung, J.M. ve ark., 1991).

2.5.6 Düşük Miktarlardaki DNA'dan Yararlanma

Adli Bilimleri ilgilendiren olgularda, genellikle delil oluşturabilecek örnek bulmada, güçlükle karşılaşılır. Bulunan örneklerde madde miktarı az, dolayısıyla çok değerlidir.

İşte bu noktadan hareketle, Hochmeister ve arkadaşları, çoğaltılmış ve HLA DQA1 açısından incelenmiş örneklerden tekrar incelenebilecek DNA eldesine gitmişlerdir.

Geri kazanılan DNA'dan HLA DQA1 görünürleştirmesine benzer bir teknikte düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDRL) glikoforin A(GYPA) hemoglobin G gammaglobin (HBGG), D7S8 ve gruba özgü bileşen (GC) olarak bilinen 5 ayrı lokusu inceleyebilmişlerdir.

Herşeye rağmen araştırmacılar bu tekniğin rutin olarak kullanılmasının sakıncalı olabileceğine dikkat çekmektedirler (Hochmeister ve ark., 1995).

Örneklerden maksimum yarar sağlayabilme mantığı ile kişi idantifikasyonunda çok gerekli olan cinsiyet belirlenmesi de HLADQA1 lokusu ile birlikte incelenebilmektedir. Basit güvenilir ve tekrarlanabilir bir teknikle HLADQA1 lokusu, amelogenin lokusu ile birlikte çoğaltılarak tiplenebilmektedir.

Başka bir açıdan bakıldığında HLA DQA1 lokusunun, çoğaltılırken başka PCR ürünlerinin varlığından etkilenmediği görülmekte, sistemin güvenilirliği artmaktadır (Casarino, L. ve ark., 1995).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışmada ters nokta emdirimi (Reverse Dot Blot) ve dizine özgü primer tiplemesi (SSP typing) için 3 farklı DNA çekitlemesi yapıldı. Çekitlenen bu DNA'larda spektrofotometrik miktar tayini yapıldı. Chelex, trimetil amonyum bromür tuzlarının kullanımı ile çöktürme ve NaCl (salting out) yöntemleriyle çekitlenen DNA örneklerinin kör kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boyunda okunmasıyla miktar tayinine gidildi.

3.1 DNA ÇEKİTLEME YÖNTEMLERİ

3.1.1 Chelex Kullanımı ile DNA Çekitlemesi

Bu yöntemde tam kan veya kan lekeleri aşağıdaki gibi çekitlendi.

1- 1 ml distile steril su 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine pipetlendi. Aşağıdaki materyallerden bir tanesi eklendi ve yavaşça karıştırıldı.

a) 3 µl tam kan

b) Yaklaşık 3 mm²'lik kan lekesi

2- Bu karışım oda ısısında 15-30 dak. inkübe edildi. Ara sıra yavaşça karıştırıldı veya alt üst edildi.

3- 10.000 - 15.000 xg arasında 2-3 dakika mikrosantrifüj aleti kullanılarak santrifüj edildi.

4- Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant (üst faz) alınarak döküldü fakat tüpte 20-30 µl arasında örnek bırakıldı.

5- Son hacim 200 µl olacak şekilde % 5'lik Chelex çözeltisi eklendi.

Karışım:

6- 56°C'de 15-30 dak. inkübe edildi.

7- 5-10 saniye yüksek hızda vortekslendi.

8- 8 dakika kaynayan su banyosunda inkübe edildi.

9- 5-10 saniye süre ile yüksek hızla vortekslendi.

10- 2-3 dakika 10.000-15.000 xg'de santrifüj yapıldı.

11- Bu karışım PCR amplifikasyonu için kullanıldı.

12- Örnekler 2-8°C'de veya derin dondurucuda saklandı.

Örneği tekrar kullanmak için 9-11 işlemler tekrar edilir (Walsh, S.P. ve ark., 1991b).

Chelex için spektrofotometrik ölçümde çekitlenen DNA miktarı değeri OD₂₆₀/OD₂₈₀ dalga boylarının birbirine oranında 1.2 - 1.4 olarak elde edildi.

3.1.2 Trimetil-Amonyum Bromür Tuz Kullanımı ile DNA Çekilmesi

1- EDTA'lı 450 µl kan üzerine 450 µl DTAB (% 12) çözeltisi eklendi. 15 saniye yavaşça karıştırıldı. Hücreler lizis olduğunda kanın kırmızı renginin kahverengiye dönüştüğü gözlemlendi.

2- Sıcak su banyosunda, 68°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Ara sıra alt üst edilerek ısı dağılımının eşit olması sağlandı.

3- Tüpler su banyosundan alındıktan sonra üzerine 900 µl kloroform eklendi ve 15 saniye yüksek devirde vortekslendi.

4- 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

5- Süpernatant, içinde 100 µl CTAB (% 5) ve 900 µl dH₂O bulunan ependorflara alındı. DNA-CTAB presipitasyonu oluşana kadar yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

6- Süpernatant dökülerek, DNA-CTAB pelete 300 µl 1.2 M NaCl eklenerek vortekslendi. Bu karışımın üzerine 750 µl % 99.5'lük etanol eklendi. Yaklaşık 2 dakika tüp elde çevrilerek DNA'nın çökmesi gözlemlendi.

7- Karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant dökülerek 1000 µl % 70'lik etanol ile yıkandı.

8- Karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve etanol döküldü.

9- Pamuk uçlu aplikatör kullanılarak eppendorf tüpünün duvarlarındaki ve içindeki etanol DNA peletine dokunulmayarak alındı.

10- Elde edilen DNA'nın 50-200 µl'lik dH₂O içerisinde 30 saniye vorteksenerek çözülmesi sağlandı.

11- Çekitlenen DNA miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi.

12- DNA derişimi 50 ng DNA/µl'ye ayarlandı.

13- Elde edilen DNA -20°C'de saklandı (Gustincich, S. ve ark., 1991).

Bu yöntem ile çekitlenen DNA miktarı değeri OD₂₆₀/OD₂₈₀ dalga boylarının birbirine oranında 1.6 - 1.8 olarak elde edildi.

3.1.3 Tuz-NaCl (Salting-Out) Kullanımıyla DNA Çekilmesi

1- 2 ml eppendorf tüpü içerisindeki 500 µl EDTA'lı ya da heparinli kan üzerine 1 ml 1x eritrosit hücre lizis tamponu (1x red cell lysis buffer) eklendi. 30 saniye yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. 1 ml dH₂O ile yıkandı ve tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

2- Süpernatant döküldü ve peletin üzerine 80 µl 5x proteinaz-K tamponu, 30 µl proteinaz K (10 mg/ml . dH₂O) 20 µl % 20'lik SDS ve 240 µl dH₂O eklendi

3- 55°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı.

4- Oda ısısına getirildikten sonra 6M 100 µl doymuş NaCl çözeltisi eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. 13.000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek proteinlerin alt kısımda çökmesi sağlandı. Süpernatant 1.5 ml'lik eppendorfa aktarılarak 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

5- Elde edilen süpernatant tekrar 1.5 ml eppendorfa aktarılarak üzerine % 99.5'lük etanol eklendi. Yaklaşık 2 dakika DNA'nın çökmesi için beklendi ve 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

6- Süpernatant dökülerek % 70'lik etanol ile pelet yıkandı ve 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

7- Etanol dökülerek, pamuk-uçlu aplikatör yardımı ile ependorf tüpü içerisindeki fazla etanol alındı.

8- Elde edilen DNA 50-200 µl dH₂O içerisinde 30 saniye vorteksenerek çözüldü ve spektrofotometrede optik dansitesi okundu DNA konsantrasyonu 50 ng DNA ml'ye ayarlandı. Her bir 10 µl'lik PCR reaksiyonu için 2 µl DNA kullanıldı.

9- Elde edilen DNA -20°C'de saklandı (Miller, S.A. ve ark., 1988).

Bu yöntem ile çektirilen DNA miktarı değeri OD₂₆₀/OD₂₈₀ dalga boylarının birbirine oranında 1.6 - 1.8 olarak elde edildi.

3.2 DQA1 GEN BÖLGESİNİN POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (PCR) İLE TİPLENDİRİLMESİ

3.2.1 Alele Özgü Oligonükleotid Kullanımı ile Ters Nokta Emdirimi

3.2.2 PCR Döngü Parametreleri

1- Isı döngü aleti (Thermal Cycler) aşağıdaki parametrelere uygun olarak ayarlandı.

- a) 94°C 1 dakika (denatürasyon)
- b) 60°C 30 saniye (yapıştırma)
- c) 72°C 30 saniye (uzatma)

Bu çoğaltma için 32 döngü yapıldı. Bu aşamalardan sonra örnekler ısı döngü aletinde; 7 dakika 72°C'de inkübe edildi.

Tablo 4'te HLA DQA1 lokusunun çoğaltımında kullanılan PCR primerlerinin oligonükleotid dizinleri görülmektedir (Erlich, H.A. ve ark., 1990).

HLA Genleri	Primer İsimleri	5' den 3' e Primer Dizinleri	PCR çoğaltma şartları		
			Denatürasyon	Yapıştırma	Uzatma
DQA1	GH26	GTGCTGCAGGTGT AAACTTGTACCAG	94°C	60°C	72°C
	GH27	CACGGATCCGGTA GCAGCGGTAGAGT TG			

2- PCR reaksiyon tüpleri işaretlendi.

3- Her bir tüpe önce 50 µl PCR tepkime karışımı pipetlendi (Negatif ve pozitif kontrol tüpleri de dahil olmak üzere).

4- Daha sonra PCR tepkime karışımının üzerine 50 µl MgCl₂ çözeltisi eklendi. Bunu yaparken karışmayı en aza indirmek için pipetin hafif bir açı yapılarak kullanılmasına dikkat edildi. Mümkün olduğunca bu karışımın tüp çeperine sıçratılmaması gerekmektedir.

5- Her bir tüpteki bu karışımın üzerine 2 damla mineral yağı eklendi.

6- Her bir PCR tepkime tüpüne çekitlenen DNA örneklerinden 2 ile 40 µl, pipet yardımıyla mineral yağ katmanından geçerek tüpün dip kısmına eklendi.

7- Pozitif kontrol PCR reaksiyon tüpüne 20 µl genomik kontrol DNA'dan eklendi. Negatif kontrol tüpüne DNA eklenmedi.

PCR tepkime tüplerindeki son hacim, eklenen DNA miktarına bağlı olarak 100 µl ve 140 µl arasında değişti.

8- PCR tepkime tüpleri ısı döngü aletine yerleştirildi ve program başlatıldı.

PCR çoğaltma programı yaklaşık 2.5 saatte tamamlandı (HLA DQA1 Package Insert).

Tiplemesi hedeflenen DQA1 dizinlerinin, çoğalıp çoğalmadığını jel üzerinde kontrol etmek amacı ile su altı jel elektroforezi kullanıldı.

3.2.3 Su Altı Agaroz Jel Elektroforezi

PCR aşaması sonrası örnek DNA'nın miktarını ve moleküler ağırlığını tayin etmek amacı ile agaroz jel elektroforezi yapıldı.

3.2.4 Agaroz Jelinin Hazırlanması

1) 2 g Agaroz üzerine 100 ml'lik 0.5 x TBE tamponu eklenerek ısıtıldı ve homojen bir karışım elde edildi.

2) Bu karışım, oda ısısında 50 - 60°C'ye soğutuldu.

3) Bu karışıma 10 mg/ml olarak hazırlanan 1 ml etidyum bromür çözeltisinden 5 µl eklendi.

4) Bu karışım jel tabağına dökülerek 3 mm kalınlığında bir jel oluşturuldu. Döküldükten hemen sonra jele kuyucuk oluşturma tarağı yerleştirildi ve oda sıcaklığında 20-30 dakika jelin oluşması beklendi. Jel tamamıyla oluştuğundan sonra tarak dikkatlice jelden çıkarıldı.

5) Jel oluştuğundan sonra içinde 0.5 TBE tamponu bulunan elektroforez aletine yerleştirildi. Tamponun jelin kuyucuklarını doldurması ve yaklaşık 1 mm jelin üzerini kaplamasına dikkat edildi.

3.2.5 Jelin Yüklenmesi ve Elektroforez

1) 0.5 ml mikrosantrifüj tüpüne 5 µl DNA eklendi ve üzerine 1 µl 6 x agaroz jel yükleme karışımı eklenerek yavaşça karıştırıldı.

(*Elektroforezde kullanılan Marker Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.)

2) Her bir DNA örneği için bu karışım hazırlandıktan sonra; mikropipet yardımıyla, her bir kuyucuğa karışımın tümü (yaklaşık 5 µl) pipetlendi. Bu pipetleme aşaması sırasında kuyucukları delmemeye ve bozmamaya dikkat edildi.

3) Örnekler kuyucuklara yerleştirilmeden önce ilk kuyucuğa, örneklerimizin moleküler ağırlıklarını tayin etmek ve kaç baz çiftlik olduğunu belirlemek için, 5 µl Marker size 8* olarak adlandırılan değişik boyutta (19-1114 baz çifti arasında; 19, 26, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900, 1114 olmak üzere) 17 parçacıktan oluşan bir karışım kullanıldı. Marker karışımında bulunan parçacıklar HPA II ile kesilen PUCBM21 DNA'sı ve DRA I ve Hind III ile kesilen PUCBM21 DNA'sından oluşmaktadır.

4) Yükleme tamamlandıktan sonra elektrotlar takılarak jel 100 V'da 15 dakika oda ısısında bromfenol mavisi jelin sonlarına gidene kadar yürütüldü.

5) Bu aşamadan sonra jel mor ötesi ışında 300 nm'de incelendi ve yorumlandı. Fotoğrafi çekilerek saklandı.

3.2.6 DNA Hibridizasyonu

1- Sallamalı su banyosu 55°C'ye ısıtıldı. Hibridizasyondan önce su sıcaklığının 55°C'de sabit olması sağlandı.

2- Hibridizasyon ve yıkama çözeltisi 37°C'de etüvde ısıtıldı.

3- DNA prob şeritleri cımbız yardımı ile tüpten çıkarıldı ve işaretlendi.

4- DNA ısı döngü aleti, DNA'yı denatüre etmek için 10 dakika 95°C'ye programlandı.

5- Cam bir beher içinde 1 örnek için x 3.3 ml önceden ısıtılmış hibridizasyon çözeltisi ve x 27 µl Enzim Conjugate (enzim birleşimi) yavaşça karıştırıldı.

6- PCR tepkime tüpleri DNA ısı döngü aletine yerleştirildi. 95°C'de 10 dakika olmak üzere program başlatıldı.

7- İşaretli prob şeritleri özel DNA tiplene tabaklarına yerleştirildi ve yukarıda hazırlanan çözeltilerden her bir prob şeridinin üzerine 3 ml eklendi.

8- PCR tepkime tüpleri ısı döngü aletinden alındı. Hibridizasyon ve enzim çözeltisi eklenmiş olan işaretli prob

şeritlerinin üzerine 35 µl denatüre edilmiş örnek DNA'larından eklendi.

9- DNA tiplendirme tabakları 55°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi. 20 dakika 90 rpm'de hibridizasyon gerçekleştirildi.

10- Hibridizasyon'dan sonra, tabaklardaki hibridizasyon çözeltileri döküldü. DNA prob şeritlerinin her birinin üzerine 10 ml yıkama çözeltisi eklendi.

11- Eklenen yıkama çözeltileri birkaç saniye hafifçe çalkalandıktan sonra döküldü.

12- Tekrar her bir kuyucuktaki prob şeritlerinin üzerine 10 ml yıkama çözeltisi eklenerek 55°C'de 12 dakika çalkalamalı su banyosuna yerleştirilerek "son yıkama" yapıldı.

13- Yıkama bittikten sonra tabaklardaki yıkama çözeltileri dökülüp tekrar 10 ml yıkama çözeltisi eklendi. Orbital sallayıcıda 5 dakika 50 rpm'de oda ısısında çalkalama yapıldı.

3.2.7 Renklendirme ve Görünürleştirme

1- Tabaklardaki yıkama çözeltisi döküldü, tabaktaki her bir kuyucuğa 10 ml sitrat tamponu eklendi ve orbital çalkalayıcıda 50 rpm'de 5 dakika yıkama yapıldı.

2- Bu aşamada renklendirme çözeltisi hazırlandı.

3- Tabaklardaki sitrat tamponu dökülerek, tabaktaki prob şeritlerinin bulunduğu her bir kuyucuğa 10 ml yeni hazırlanan renklendirme çözeltisi eklendi.

4- Tabaklar alüminyum folyoya sarılarak renklendirme için 50 rpm'de 20-30 dakika oda ısısında orbital sallayıcıda renklendirildi.

5- Tabaklardaki renklendirme çözeltileri dökülerek renklendirmeyi durdurmak için her bir kuyucuk 10 ml deionize su ile 5-10 dakika 50 rpm'de orbital sallayıcıda yıkandı.

6- Temiz bir filtre kağıdı üzerine alınan prob şeritleri yorumlandı ve kaydedildi. Şeritler kurduktan sonra fotoğraflandı ve dosyalanarak saklandı.

3.2.8 Dizine Özgü Primer Yöntemi (SSP) (Specific Sequence Primer)

PCR tepkime karışımının hazırlanması

1) Her bir PCR tüpüne SSP setinden 5 µl primer çözeltisi pipetlendi.

2) Her bir örnek için 16 ayrı PCR tepkimesi hazırlandı.

a) Önce örnek DNA'sı ve Taq DNA polimerazı içeren PCR çözeltisi ile PCR tepkime çözeltisi karıştırılarak bir PCR ön-karışımı hazırlandı.

b) PCR çözeltisi, örnek DNA ile Taq polimeraz hafifçe vortekslenerek karıştırıldı.

c) PCR ön-karışım (PCR tepkime ve PCR çözeltisi; örnek DNA'sı ve Taq polimeraz) primerlere eklenmeden önce iyice vortekslenerek karıştırıldı.

3) 5 µl ön-karışım, içinde primer çözeltisi olan PCR tüplerine pipetlendi.

4) Her bir tüpün üzerine 20-30 µl mineral yağ eklenerek PCR-ısı döngü aletine yerleştirildi (Dynall SSP protocol, 1995).

3.2.9 PCR Döngü Parametreleri

DYNAL SSP seti için PCR programı yaklaşık olarak Gene Amp™ PCR sistem 480'de 1 saat 20 dakika olarak çalışıldı.

1. Denatürasyon aşaması 94°C 2 dakika (denatürasyon)
2. 10 döngü 94°C 10 saniye (denatürasyon)
65°C 60 saniye (yapıştırma ve uzatma)
3. 20 döngü 94°C 10 saniye (denatürasyon)
61°C 50 saniye (yapıştırma)
72°C 30 saniye (uzatma)

yapıldı.

3.2.10 SSP Tiplemesinin Jel Elektroforez ile Görünürleştirilmesi

1- 0.5 x TBE tamponu içerisinde % 2 (w/v) agaroz eklenerek agaroz jel hazırlandı.

a) 2 g agaroz 100 ml 0.5 TBE tamponuna eklendi ve ısıtıcıda kaynatılarak tamamıyla çözünerek homojen bir jel elde edildi. Jel 60°C'ye soğutulduktan sonra 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi.

b) 3-4 mm kalınlığında ve kuyucuklar arası 3 mm olmak üzere 4 jel tıraşı kullanılarak (20 x 20 cm) döküldü, bir kişi için 16 kuyucuk kullanıldı ve 15 dakika tamamıyla jelin oluşması için beklendi.

2- PCR ürünlerinin her birinin tümü (10 µl) jele yüklendi. PCR tepkime karışımı boya ve gliserol içerdiğinden, yükleme tamponuna gerek duyulmadı.

3- Tüm örnekler jele yüklendikten sonra, jel tabağı içinde 0.5xTBE tamponu bulunan su altı elektroforez aletine yerleştirildi ve (20 x 20 cm) için 10 V/cm'da 15 dakika yürütüldü.

4- Jel mor ötesi ışın (UV) da incelendi ve yorumlandı. Daha sonra fotoğrafları çekilerek saklandı.

3.3 DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1 DNA Çekitleme Çözeltileri

% 12 DTAB çözeltisi (w/v) 100 ml

12 g dodesiltrimetilamonyum bromür (DTAB)
45 ml 5 M NaCl
15 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.6
15 ml 0.5 M EDTA

DTAB, NaCl, Tris-HCL ve EDTA içinde çözüldü ve deionize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

% 5 CTAB çözeltisi (w/v) 100 ml

5 g setiltrimetilamonyum bromür (CTAB)
8 ml 5 M NaCl

CTAB 80 ml deionize su içerisinde çözüldü ve NaCl eklendi. Son hacim deionize su lie 100 ml'ye getirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

1.2 M NaCl 100 ml

24 M 5 M NaCl 76 ml deionize su ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı.

Kloroform (% 100) 1 L hazırlanarak oda ısısında saklandı.
Etanol (% 99.5) 1 L hazırlanarak oda ısısında saklandı.
Etanol (% 70 ml) 1 L hazırlanarak oda ısısında saklandı.

5 x eritrosit hücre lizis tamponu 1 L

548 g Sukroz
50 ml Triton x - 100
25 ml 1 M MgCl₂ . 6H₂O
60 ml 1 M Tris-HCl pH 7-5
Sukroz 500 ml dH₂O içinde çözüldü içine Triton X-100, MgCl

ve Tris-HCl eklendi. Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı.

5 x proteinaz K - Tamponu 10 ml

750 µl 5 M NaCl

2.4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 0.45 µm milipor filtre ile filtre edildi. 4°C'de saklandı.

Proteinaz K enzim çözeltisi 9.3 ünite/mg 1ml

10 mg proteinaz K

1 ml dH₂O içinde çözündü ve -20°C'de saklandı.

SDS (% 20) 10 ml

2 g sodyum dodesil sülfat (SDS)

8 ml dH₂O içinde çözündü ve son hacim dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Doymuş NaCl (6M) çözeltisi 1 L

- 350.6 g NaCl 800 ml dH₂O içinde çözündü ve 1 litreye tamamlandı.

- Otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

% 5'lik Chelex® 100 çözeltisi (w/v) (Stok çözelti)

5 g Chelex tartılarak 100 ml otoklavlanmış steril deionize su ile bir süspansiyon karışım elde edildi.

Bu stok çözeltiden 50 ml'lik bir beher kabına 15 ml % 5'lik Chelex çözeltisinden eklendi ve rutin olarak kullanıldı +4°C'de saklandı.

Tris-HCl 1 M çözeltisi (pH=8.6) 1 L

121.1 g Tris-base 800 ml deionize suda çözündü, (yoğun) HCl eklenerek pH 8.6'ya getirildi ve deionize su kullanılarak son hacim 1 litreye getirildi. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

Doymuş NaCl (5 M) çözeltisi 1 L

191.1 g NaCl

800 ml deionize su içerisinde çözündü ve son hacim deionize su ile 1 litreye getirildi. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

MgCl₂ . 6H₂O 1 M çözeltisi 0.5 L

1016 g MgCl₂ . 6H₂O 400 ml deionize su içinde çözündü ve tekrar dH₂O eklenerek son hacim 500 ml getirildi. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

EDTA pH 8.0 0.5 M çözeltisi 1 L

186.1 g disodyum etilendiamintetra asetik asit (EDTA)

EDTA, 800 ml'lik deionize H₂O içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündü ve pH'ı NaOH (~ 20g NaOH pellet) ile 8.0'e ayarlandı. Son hacim (deionize) dH₂O ile 1 litreye getirildi. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

3.3.2 DNA Hibridizasyon ve Yıkama Çözeltilerinin Hazırlanması

Enzim Konjugat: HRP-SA 2.0 ml Horseradish peroxidase-streptavidin konjugat tampon içerisinde Ampli Type HLA DQA1 çoğaltma ve tiplleme kiti içerisinde hazır olarak alındı ve 4°C'de saklandı.

20 x SSPE Tamponu: 3.6 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄ . H₂O, 20 mM EDTA, pH: 7.4 (1 L)

7.4 g Etilendiamintetra asetik asit disodyum dihidrat tuzu (Na₂ EDTA . 2H₂O) 800 ml deionize su içerisinde çözündü. 10 N NaOH ile pH 6'ya ayarlandı. 210 g sodyum klorür (NaCl) ve 27.6 g sodyum fosfat monobazik monohidrat, (NaH₂PO₄ . H₂O) eklendi ve yaklaşık 10 ml 10 N sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek pH: 7.4'e getirildi. Deionize su ile son hacim 1 litreye getirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

% 20 (w/v) SDS (1 L): Sodyum dodesil sülfat (SDS) 800 ml deionize su içinde ısıtılarak (35 ile 50°C) çözünmesi sağlandı ve deionize su ile son hacim 1 litreye getirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

Hibridizasyon çözeltisi: 1 L 5 x SSPE, % 0.5 (w/v) SDS
250 ml 20 x SSPE tamponu ile 25 ml % 20 (w/v) SDS
karıştırıldı ve üzerine 725 ml deionize su eklenerek son hacim
1 litreye getirildi.

Kullanılmadan önce 60°C'de ısıtılarak berrak hale getirildi.
Oda sıcaklığında saklandı.

10 N NaOH: 10 ml 4 g NaOH tartıldı ve 10 ml deionize suda
çözündü. Oda sıcaklığında saklandı.

Yıkama çözeltisi: 2.5 SSPE, % 0.1 (w/v) SDS (2 L)
250 ml 20 x SSPE tamponu ve 10 ml % 20'lik (w/v)
karıştırıldı 1,740 ml deionize su ile 2 litreye getirildi.
Kullanılmadan önce 35 ile 50°C'de ısıtılarak çözülmesi
sağlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

3.3.3 Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanması

Sitrat tamponu: 0.1 M Sodyum sitrat pH : 5.0 (1 L)
18.4 g trisodyum sitratdihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) deionize
suda çözüldü ve 6 g sitrik asit monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
eklenerek pH: 5'e ayarlandı. Deionize su eklenerek son hacim 1
litreye getirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

Kromojen çözelti: 60 mg 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin (TMB)

Ampli Type HLA-DQA1 çoğaltma tiplleme kiti içerisindeki
60 mg TMB'ye 30 ml % 100'lük etanol eklenerek yatay
çalkalayıcıda çözülerek kullanıma hazır hale getirildi. 2° ile
8°C'de şişenin ağzı parafilmle sarılarak saklandı.

Hidrojen peroksit çözeltisi (% 3): 100 ml
% 30'luk hidrojen peroksitten (H_2O_2) 10 ml alındı. Üzerine
90 ml deionize su eklenerek folyoya sarıldı ve 4°C'de saklandı.

Bir örnek için:
10 ml sitrat tamponu,

10 µl % 3'lük hidrojen peroksit
0.5 ml kromojen
karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlandı.

3.3.4 SSP Yönteminde PCR Çoğaltma Çözeltilerinin Hazırlanması

<u>10 x PCR Tamponu</u>	<u>100 ml</u>
3.7 g KCl	
1.5 ml 1 M MgCl ₂ · 6H ₂ O	
10 ml 1 M Tris-HCl pH: 8.3	
0.01 g jelatin (son derişim 0.01 % w/v)	

KCl 80 ml'lik dH₂O içerisinde çözüldü ve geri kalan kimyasal maddeler eklendi. dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak -20°C'de saklandı.

<u>Krezol Kırmızısı</u>	<u>1 ml</u>
10 mg krezol kırmızısı 1 ml dH ₂ O içinde çözüldü ve +4°C'de saklandı.	

3.3.5 SSP Yönteminde PCR Çözeltisinin Hazırlanması

16 µl 10 x PCR tamponu
500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,
100 mM Tris HCl. pH: 8.3, 0.01 w/v jelatin

250 ml gliserol (d=1.25 g/ml) (% 99.5 gliserol son derişim % 5)

3.2 µl d ATP (10 mM)

3.2 µl d CTP (10 mM)

3.2 µl d GTP (10 mM)

3.2 µl d TTP (10 mM)

1.6 µl krezol kırmızısı (10 mg/ml son derişim 100 µg/ml)

300 µl otoklavlanmış dH₂O ependorf tüpünde karıştırıldı.

Her bir örnek DNA'sı için hazırlanan PCR çözeltisinden 48 µl alındı. PCR ön-karışımına eklenmeden önce vortekslenerek karışması sağlandı. Bu arada PCR ön-karışımı hazırlandı ve

bu karışım PCR çözeltisi ile karıştırıldı.

PCR ön-karışımının hazırlanması:

Bir kişi için gerekli olan 16 PCR tepkime ependorf tüpü için örnek DNA'dan 31 µl (~ 50 ng/µl) ve Tag DNA polimerazdan 1.3 µl (6.5 ünite/µl) alınarak karıştırıldı, 48 µl'lik PCR çözeltisine eklendi ve yüksek devirde vortekslendi.

3.3.6 Elektroforetik Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması

10 x TBE (stok çözeltisi)

0.89 M Tris borate - 0.025 M EDTA 1 l.

108 g Tris-baz-(Trisbase) (0.90 M)

55 g Borik asit (0.9 M)

40 ml 0.5 M EDTA pH: 8.0 (20 mM EDTA)

Tris baz ve borik asit 700 ml dH₂O içinde çözüldü ve EDTA eklendi. Deionize ya da distile su kullanılarak son hacim 1 litreye getirildi. Plastik şişe içerisinde oda ısısında saklandı.

0.5 x TBE tamponu

1 L

10 x TBE'den 50 ml alınarak 950 ml dH₂O ile karıştırılarak plastik şişe içerisinde oda ısısında saklandı.

Etidyum bromür çözeltisi

100 L

1 g etidyum bromür 100 ml dH₂O içinde (10 mg/ml) manyetik karıştırıcı kullanılarak tamamıyla çözünmesi sağlandı. Alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklandı.

6 x Agaroz jel yükleme çözeltisi

% 0.25 bromfenol mavisi,

% 0.25 ksilen siyanol, % 30 w/v gliserol,

25 mM EDTA (10 ml)

3 g gliserol'ün üzerine 9.5 ml deionize su ve 0.5 ml EDTA eklendi. 25 mg bromfenol mavisi ve 25 mg ksilen siyanol çözeltiye eklenerek çözünür hale getirildi. Toplam hacim 10 ml'lik bir çözelti elde edildi.

3.4 ÇÖZELTİLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	Serva	38640
Etilendiamin tetra asetik asit disodyum tuzu dihidrat ($Na_2EDTA \cdot H_2O$)	Sigma	ED2SS
Etanol (100 %), (% 70)	Delta kimya Sanayi, Labor Kimya	
Hidrojen peroksit % 50 (H_2O_2)	Aksın Kimya	
Sodyum Klorür ($NaCl$)	Merck	6400
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)	Merck	12012
Ultra-pure, elektroforez grade		
10N Sodyum hidroksit ($NaOH$)	Merck	C647762
Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Sigma	S9638
Trisodyum sitrat, dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	Sigma	S4641
Borik asit (H_3BO_3)	Serva	15165
Tris Baz (Tris base) Tris hidroksimetil amino metan	Sigma	T8524
Etidyum bromür	Sigma	E7637
DTAB (dodesiltrimetilamonyum bromür) $C_{12}H_{25}N[CH_3]_3Br$	Sigma	D8638
CTAB (hekzadesiltrimetilamonyum bromür) $C_{16}H_{33}N[CH_3]_3Br$	Sigma	H5882
Kloroform	Raftel Kimya Sanayi	
Kresol Kırmızısı	Sigma	C9877
Gliserol	Sigma	G7757

Hidroklorik asit (HCl)	Merck	314
Sakroz (Sucroze)	Sigma	S2395
Triton X-100	Sigma	X100
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Mağnezyum klorür 6 sulu)	Merck	5832
Proteinaz K	Sigma	P4914
Brom fenol mavışı	Merck	8122
Ksilen cyanol (ksilen sayanol)	Sigma	X4126
Chelex [®] 100 (Chelating resin) (Iminodiasetik asit)	Sigma	C7901
Nusieve Agaroz, elektroforez grade (Molecular Biology Reagent)	Sigma	A9539
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma	P9541
Ampli Taq polimeraz	Promega	
dATP	Promega	
dCTP	Promega	
dTTP	Promega	
dGTP	Promega	

3.5 KULLANILAN GEREÇLER

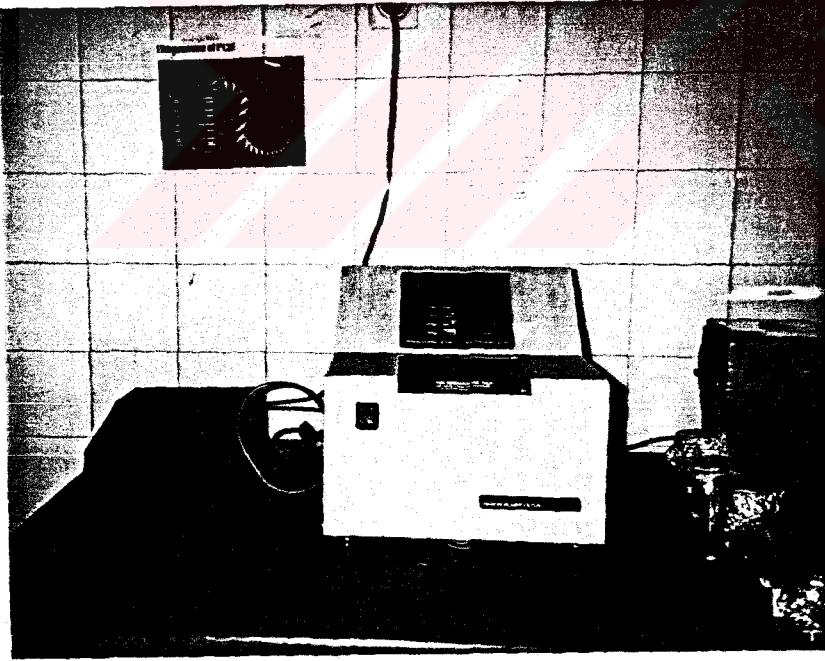
Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)	Perkin Elmer Gene Amp PCR Instrumentsystem DNA Termal Cycller 480
Jel elektroforez tankı	Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200 Pharmacia
Sıcak su banyosu	Nüve ST 400
Mor Ötesi Spektrofotometre	U.V.-1208 SHIMADZU
Transilluminator	2011 MACROVUE LKB
PCR için otomatik pipet (0,5-25 µl, 20-200 µl)	Finnpipette, Labsystems (4027230, 4027220)
Otomatik pipet (1-10 µl, 10-50 µl, 20-100 µl, 50-250 µl, 250-1000 µl)	Brand W Germany
Eppendorf Santrifüjü	Biofuge 15 Heraeus sepatech
Otoklav	Nejat Coşkuner
Elektronik tartı aleti	Libror EB-330H Scimadzu
Manyetik karıştırıcı	Sartorius 16992 type
Buzdolabı	Arçelik
pH metre	pH Meter CG 840 SCHOTT
Etüv	Nüve FN 400
Derin dondurucu	Bosch
Yatay sallayıcı döngü aleti	APELAB - 01.1196
Pens	
Termometre	
Güç Kaynağı	Biometra
Vorteks	Nejat Coşkuner

4. BULGULAR

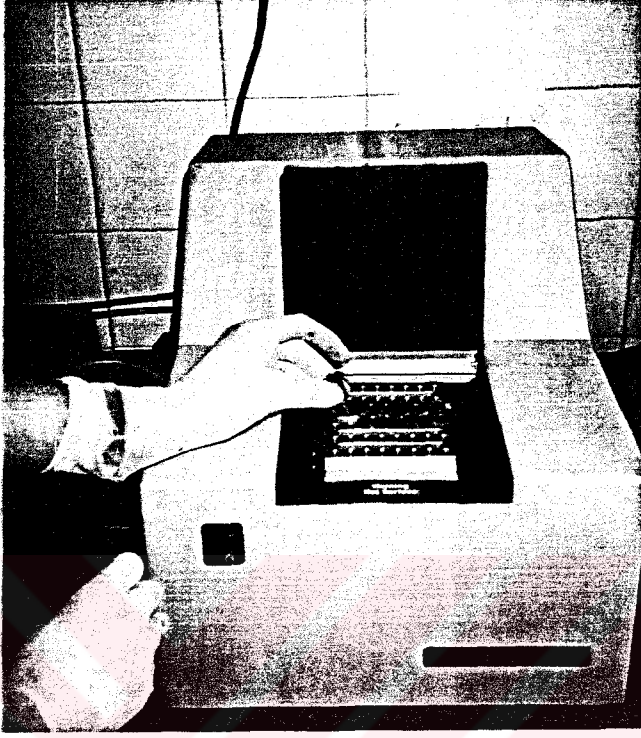
Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli yörelerinden gelen, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, her iki cinsten, 18-65 yaşları arasında 158 kişide HLA DQA1 tiplemesi gerçekleştirildi.

Tiplemeye ters nokta emdirimi (ASO) ve dizine özgü primer (SSP) teknikleriyle başlandı, iki teknik kıyaslandı ve araştırmanın devamı için ters nokta emdirim tekniği tercih edildi.

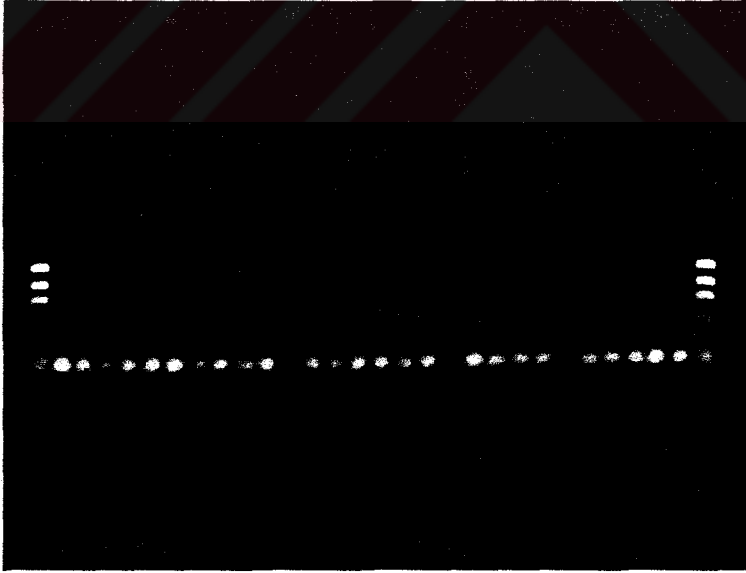
Her iki teknikte de Perkin Elmer'in ısı döngü aleti kullanıldı (Resim 1, 2) ve PCR ürünlerinin kalitesi su altı elektroforezi ile değerlendirildi (Resim 3).



Resim 1. PCR döngü aleti.



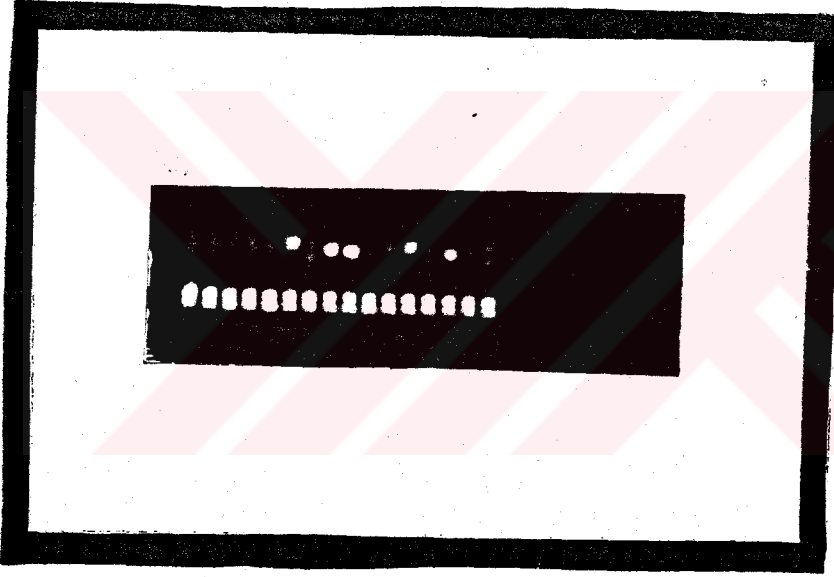
Resim 2.



Resim 3. PCR ürünlerinin sualtı jel elektroforezi ile değerlendirilmesi.

Ters nokta emdirimi yöntemi ile, fenotipler 1.2 aleli dışında doğrudan gözlemlenebilmektedir. Çalışmamızda Perkin Elmer şirketinin kit halinde sunduğu ve ters nokta emdirimine dayalı teknikle 6 alel ve 21 fenotip gözlemlendi.

Dizine özgü primer (SSP) yöntemiyle her fenotip için birden fazla pozitif PCR ürünü elde edildi. Aranılan fenotip kıyaslamalar ve eliminasyonla belirlendi. Aşağıda bu teknikle elde edilmiş bir elektroforegram görülmektedir (Resim 4).



Resim 4. 3, 5 fenotipi gösteren bir kan örneğinin elektroforegramı.

Adli amaçlı kullanımda daha geçerli olduğu düşünülen ASO yöntemi ile elde edilmiş bulgulardan sistemin gen frekansları, Hardy-Weinberg dengesine uyum, beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlendirildi.

Tablo 5. ASO tekniği ile tiplenen HLA DQA1 lokusunun gen sayıları ve yüzdeleri.

HLA DQA1 Genleri	Gözlenen Sayı	Yüzde (%)
1.1	23	14.5
1.2	21	13.3
1.3	17	10.8
2	14	8.90
3	25	15.8
4	58	36.7

Tablo 6. HLA DQA1 sisteminin gen frekansları.

HLA DQA1 Genleri	Gen Frekansları
1.1	0.145
1.2	0.133
1.3	0.108
2	0.089
3	0.158
4	0.367

Tablo 7. HLA DQA1 sisteminin Hardy-Weinberg dengesine uyumu.

Fenotipler	Gözlenen Değer	Beklenen Değer
1.1/1.1	-	3.321
1.1/1.2	4	6.094
1.1/1.3	1	4.948
1.1/2	4	4.077
1.1/3	5	7.239
1.1/4	9	16.815
1.2/1.2	1	2.794
1.2/1.3	5	4.539
1.2/2	1	3.740
1.2/3	-	6.640
1.2/4	9	15.424
1.3/1.3	-	1.842
1.3/2	1	3.037
1.3/3	1	5.392
1.3/4	9	12.524
2/2	2	1.251
2/3	-	4.443
2/4	4	10.321
3/3	3	3.944
3/4	13	18.323
4/4	7	21.280
HLA DQA1 için Toplam $\chi^2 = 22.14725$ SD = 15		
p < 0.1		

Tablo 8. HLA DQA1 sisteminde beklenen ve gözlenen heterozigotluk.

Sistem	Beklenen Heterozigotluk %	Gözlenen Heterozigotluk %
HLA DQA1	78.70	83.54

Bu çalışmada kan, kan lekesi, kıl ve idrarda HLA DQA1 tiplerini başarıyla gerçekleştirildi. Resim 5'te bu tiplerin görülmektedir.



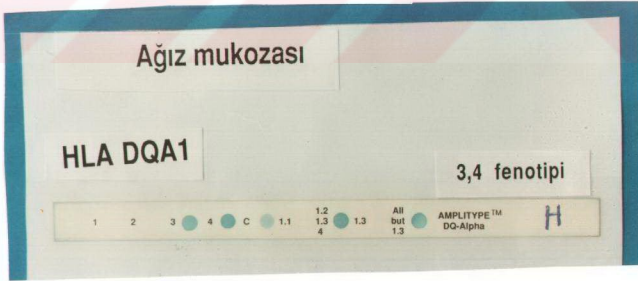
Resim 5. Aynı kişiye ait kan, kan lekesi, kıl ve idrarda HLA DQA1 tiplerini.

ASO tekniği ile yumuşak doku ve kemik dokusunda da tiplere olanak sağladı. Resim 6'da yumuşak dokudan ve sperminden chelex çözümlenmesiyle elde edilen DNA'nın ve kemik dokusundan farklı bir yöntemle, (fenol-kloroform) çözümlenen DNA'nın HLA DQA1 lokusunun tiplerini göstermektedir.



Resim 6. Yumuşak doku, kemik dokusu ve sperminden elde edilmiş HLA DQA1 sonuçları.

Aşağıdaki çalışmada (Resim 7) ağız mukozasından alınan örnekten çekitlenen DNA ile HLA DQA1 tiplemesi görülmektedir.



Resim 7. Ağız mukozasından alınan HLA DQA1 sonuçları.

ASO tekniği ile tiplerde DNA çekitleme yöntemleri arasında verim açısından fark araştırıldı. Resim 8'de, sırasıyla Chelex, NaCl (salting out) ve trimetil bromür tuzlarıyla çekitlenen DNA'ların HLA DQA1 tipleri görülmektedir.



Resim 8. Chelex NaCl ve Trimetil bromür tuzları ile çekitlenen HLA DQA1 tipleri.

5. TARTIŞMA

HLA DQA1 adli bilimlerde gerek kişi idantifikasyonunda gerekse babalık tayini amacı ile rutin olarak kullanılmaya başlanan ve PCR tekniğine dayanan ilk DNA lokusudur (Budowle, B. ve ark., 1995). Sistemin polimorfizminin kullanılrlılığını arttırması ve istatistiksel değerdendirmelere katılabilmesi için birçok popülasyonlarda frekans saptanması yapılmıştır. Türkiye popülasyonu için veriler kısıtlıdır (Atasoy, S. ve ark., 1995), (Atasoy, S. ve ark., 1996), (Filoğlu, G. ve ark., 1996), (Özkan, Ü. ve ark., 1996), (Yükseloğlu, H. ve ark., 1996).

Çalışmamızda aralarında akrabalık ilişkileri bulunmayan 158 kişide yapılan tiplleme sonucunda gen frekansları hesaplandı ve sistemin adli bilimler alanında geçerliliği saptandı.

Elde edilen sonuçlar değerdendirildiğinde sistemde HLA DQA1*4 alelinin en yüksek sıklıkta görüldüğü HLA DQA1*2 alelinin ise en düşük sıklıkta rastlandığı saptanmıştır (Tablo 4).

Bu veriler olanaklar ölçüsünde yapılan literatür taramasından dünya popülasyonları ile kıyaslandığında, Avrupa'ya yakın sıklıkla gözlenmiştir. Ancak DNA düzeyinde çalışmalar bu alanda kısıtlıdır ve kıyaslanabilecek popülasyon sayısı azdır. Dolayısıyla bir genelleme yapmanın sakıncalı olabileceği kanısındayız.

Elde edilen frekanslar yardımıyla hesaplanan parametrelerden sistemin yüksek bir heterozigotluk ve Hardy Weinberg dengesine uyum gösterdiği gözlenmiştir. Çalışılan çoğu popülasyonlarda benzer sonuçlar elde edilmiş olduğundan sistem çoğu adli bilimler laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Castillo, M. ve ark., 1995).

Çeşitli popülasyonlarda yapılmış çalışmaların ortalamalarına göre diskriminasyon yüzdesi 0.93 olarak belirlenmiştir

(Helmuth, R. ve ark., 1990) (Ampli Type User Guide 1993). Sistem dışlama sağlamadığı durumlarda olgu değerlendirmesinde çok güçlü değildir (Hochmeister, M.N., 1995).

Bir HLA DQA1 tipinin görölmesi sıklığı 7'de 1'dir (Comey, C.T. ve ark., 1993).

Bu nedenle babalık tayini dahil olmak üzere tüm akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ayrıca herhangi bir olguyu açıklığa kavuşturmak üzere kişi idantifikasyonuna gidildiğinde sistemin tek başına kullanılmaması gerekir (Budowle, B., 1995).

DQA1 tiplene sonuçları değerlendirmesinde dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi de dahil etme durumlarında istatistiksel ağırlığının ne olduğudur. Dahil etmenin istatistiksel ağırlığı araştırıldığında, sorulan soru "suçlanan kişi dışında, başka birinin bu biyolojik örneği bırakmış olma ihtimali nedir sorusudur (Piazza, A., 1993).

DQA1 tipinin görölme sıklığı tüm ilgili olası datayı inceledikten sonra belirlenmelidir. Başka bir deyişle kişinin dahil olduğu düşünölen olası popölasyonlara dayanarak ortalama bir olasılık çıkarılmalı, ona dayanarak hesap yapılmalıdır (Comey, C.T. ve ark., 1993).

Güvenilirliği ve polimorfik açıdan oldukça ayrıca bir sistem olması dolayısıyla çeşitli şekillerde tiplenmesinin standardizasyonuna gidilmiştir. Çalışmamızın bir bölümünde, farklı tiplemelerden birini laboratuvarımızda standardize etme yoluna gittik. Polimorfizmini belirlemek amacıyla kullanılan tekniklerden biri ters nokta emdirimi görünürleştirme tekniğidir. Bu teknikle HLA DQA1 lokusunun 6 aleli; 1.1, 1.2, 1.3, 2.3 ve 4 tiplenebilmektedir.

Lokusun tiplenmesi çoğaltılmış PCR ürünlerinin, naylon membran şeritlerine immobilize edilmiş DNA oligonökleotid problemleri ile hibridizasyonuna dayanır.

Hibridizasyonu gerçekleşmiş DNA renksiz bir substratın

enzimatik yöntemle, mavi renkli çökelek haline dönüşmesi ile görünürleştirilir ve 0.5-5 ng'lık genomik DNA'dan sonuç elde edilebilir.

Farklı prensibe dayanan diğer bir teknik Dizine Özgü Primer (SSP) tekniğidir. Bu teknik de PCR'a dayalı olmakla beraber, görünürleştirme, etidyum bromürlü agaroz jel üzerinde, mor ötesi ışın altında HLA DQA1 PCR ürünlerinin tiplenmesine dayanmaktadır. Bu sistemde 12 DQA1 aleli tiplenebilmekte ve ayırım gücü diğer tekniğe göre daha fazla görünmektedir. Bununla beraber her iki tekniğin de birçok avantajı ve dezavantajı vardır.

Ters nokta emdirimi tekniği ile tiplenen DQA1 sonuçlarının değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar vardır. Membran prob şeritleri okunmaya başlanırken ilk olarak "c" kontrol noktasına bakılır; bu noktanın diğer noktalara göre daha az yoğunlukta boyanması beklenir. Eğer "c" noktası hiç boyanmıyorsa tiplene yapılamaz. Diğer prob noktaları "c" noktasına eş ya da biraz daha açık renkte boyanıyorsa, yorumlama çok büyük bir titizlikle yapılmalıdır. Yorumlama yapılırken karşılaşılan sorunlardan biri, naylon membran üzerinde 1 (alelinin) noktasından sinyal alınamamasına rağmen 1-1 (alelinin) noktasından zayıf bir hibridizasyon sinyali alınabilmesidir. Bu 1-1 noktasından alınan zayıf sinyalin nedeninin HLA kompleksinde DXA1 olarak bilinen diğer bir genin, özgün olmayan ve düşük düzeyde bir çoğaltmanın ürünü olduğu bildirilmektedir. DXA1 pseudogene, yalancı gen olarak bilinmektedir ve sözü edilen genlerin fonksiyonu olmayan kopyalarıdır. Son zamanlarda fonksiyonlarını evrimin oluşumuyla kaybettiklerini fakat hala genomda var oldukları bilinmektedir (Auffray, C. ve ark., 1987).

DQA1 primer dizinleri DXA1 dizinleri ile karşılaştırıldığında birçok bölgede yüksek benzerlik görüldüğü ve sadece 5' primerde tek bir baz çifti ve 3' primerde de 2 baz çifti farklılığı bulunduğu bildirilmektedir. Yani HLA DXA1 DNA dizini, HLA DQA1 dizinleriyle çok yakından ilgilidir. DQA1 lokusunun PCR işlemi boyunca DQXA1 genetik dizinin çoğaltıldığı ve bu yüzden 1.1 noktasının zayıf bir sinyal

verebileceği bildirilmiştir (Bugawan, T.L. ve ark., 1988). Membran şeridi üzerindeki 1.1 alelinin zayıf sinyali genellikle "c" kontrol noktasından daha zayıftır, nadiren de "c" noktasına eşittir. Bu yüzden değerlendirme yaparken bu kıstasın göz önüne alınması gerekmektedir (Crouse, C.A. ve ark., 1994b).

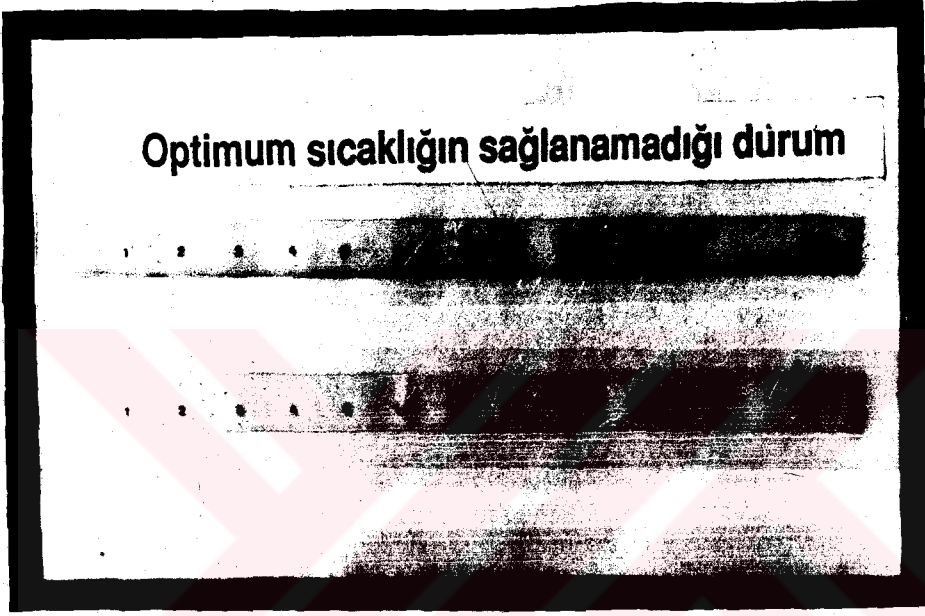
Bu sistemde karşılaşılan diğer bir sorun ise alelik (droup-out) düşme olayıdır. Bu olay heterozigot örnekteki bir alelin çoğaltıldığı zaman homozigot tipte sonuç vermesidir.

Alelik drop-out sorunu, Adli Bilimlerin birçok çalışmalarında karşılaştıkları kritik problemlerinden biridir ve sonuçta yanlış yorumlamalara neden olabilir. Bu olay özellikle DQA1*1 alelinde görülmektedir ve bunun olası açıklaması da 1 alelinin 2, 3 ve 4 alellere göre çok yüksek miktarda GC içermesi ve bundan dolayı da PCR aşaması boyunca tam olarak denatüre olmamasıdır. Bu olay özellikle örnekler ısı döngüsü aletinin ön kuyucuklarına (ilk iki sıra) yerleştirilmiş ise sıklıkla meydana gelmektedir; çünkü örneklerde yapılmış olan ölçümler ısı döngüsü aletinin ön sıradaki kuyucukların diğer kuyucuklar kadar çabuk ısınmadığını göstermiştir. Bu yüzden PCR aşamasında ısı döngüsü aletinin en öndeki iki sıranın kullanılmaması denatürasyon açısından ve sorunun çözümünde iyi olmaktadır (Comey, C.T. ve ark., 1991), (Wilson, R.B. ve ark., 1994).

Yukarıdaki sorunlarla tez çalışmamız boyunca biz de karşılaştık ve PCR aletinin orta kısmındaki kuyucukları kullanarak bu sorunu çözdük.

Diğer bir sorun da hibridizasyon ve yıkama aşamalarında optimum sıcaklığın kesin olarak sağlanmasıdır. Termometre yardımıyla sıcaklığın tam 55°C'ye ayarlanması gerekmektedir. Bu sıcaklığın bir derece altı ve üstü bile yanlış sonuçlar doğurmaktadır. 54°C'ye inildiğinde zayıf sinyaller alınmakta 56°C'ye çıkıldığında ise aleller arasında karşı transferler görülebilmektedir. Bu da sonuçları tiplerede çok fazla sakıncaları beraberinde getirir (Comey, C.T. ve ark., 1993), (Khalil, I. ve ark., 1990).

Resim 9'da sonuç alınamayan bir örnek görülmektedir.

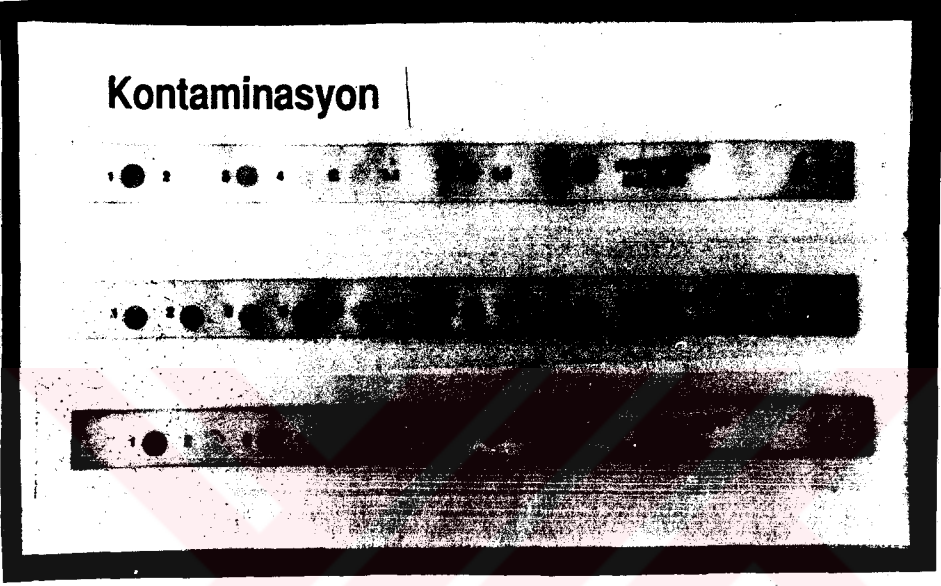


Resim 9. Optimum sıcaklığın sağlanamadığı tipler.

Yanlış bir sonuçtan kaçınmak için önemli diğer bir parametre ise, kontaminasyonu kontrol altına almaktır. Özellikle DNA çekitme ve çoğaltma aşamalarında pipetlemenin çok dikkatlice yapılması, pipet uçlarının her bir örnekte değiştirilmesi ve steril bir ortamda çalışmaya özen gösterilmesiyle bu sorun da ortadan kalkacaktır.

Resim 10'da kontaminasyona maruz kalmış bir örnek görülmektedir.

Kontaminasyon



Resim 10. Kontaminasyon dolayısıyla ikiden fazla alelin görüldüğü tiplene.

Ayrıca bu tekniğin oldukça pahalı olması ve DQA1 lokusunun sadece 6 allelinin tiplenmesine olanak tanınması da diğer sakıncalardan birisidir. Çünkü kişi bu alellerden farklı olarak başka bir alel taşıyabilir ve biz de bunu göremiyeceğimizden sonuçta yanlış tiplemelere gidebiliriz.

Bütün bu dezavantajlarına karşın yine de PCR'a bağlı ilk teknik olmasından ve gerekli titiz çalışmayla, gösterilecek özenle bu dezavantajların üstesinden gelinebildiğinden, biyolojik kanıtların uygulanmasında başarıyla kullanılabilir.

Pahalı olmasına karşın, standardize olduğundan oldukça güvenilirdir (Westwod, S.A. ve ark., 1990), (Walsh, P.S. ve ark., 1991a).

Diğer bir avantajı ise bozulmuş ve parçalanmış DNA'dan bile sonuç alınabilmesi ve her türlü DNA çekitleme yöntemiyle sonuç verebilmesidir. Ayrıca radyoaktif prob kullanılmaması, bunun yerine biotin kullanılması araştırmacı sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Biz bu çalışmada HLA DQA1 lokusunu kanla çalışmanın yanı sıra bir fikir sahibi olabilmek ve karşılaştırma yapabilmek için saç kılı, kan lekesi, idrar, sperm, ağız mukozası, yumuşak doku ve kemikten de DQA1 lokusunu başarıyla tiplerdik (Resim 5, 6, 7).

Bu çalışmada HLA DQA1 lokusu için ASO problemlerinin kullanımıyla yapılan ters nokta emdirim tekniğinin kullanılabilirliğini ve avantajlarını karşılaştırmak amacı ile farklı bir teknik olan SSP (dizine özgü primer) tekniğide yapıldı.

Bu tekniğin en büyük avantajı, 6 yerine 12 HLA DQA1 alelini tiplayebilme şansına sahip olunması idi. Ama diğer taraftan verilen kitle sadece primerlerin bulunması, diğer gerekenlerin dışarıdan alınması, PCR reaksiyon tamponu, MgCl₂ Taq polimeraz gibi, daha pahalıya çıkmaktadır.

Ayrıca burada karşılaşılan en önemli problem kullanılan DNA'nın çok saf olması gerekliliğidir. Çünkü bu yöntem Chelex'le çekitlemede başarısız kalmaktadır. Oysa Adli Bilimlerde yapılan çalışmalarda olay yerinden alınan örnek tamamıyla değrade olmuş, parçalanmış, bozulmuş ya da çok az miktarda da olabilir. Oysa bu yöntem bizde fazla miktarda örnek istemekte ve çıkan DNA'nın çok saf olması koşulunu gerektirmektedir. Durum böyle olunca bunun Adli Bilimlerde kullanılabilirliği tartışmalarında beraberinde getirmektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen ve birbirleriyle akrabalığı olmayan 158 kişiye ait kan örneğinde HLA DQA1 lokusu çalışılmış ve gen frekansı hesaplanmıştır.

Gen frekansı saptanmasında, HLA DQA1 lokusunun tiplenmesi için PCR'a bağlı ters nokta emdirimi ve dizine özgü primer yöntemi uygulanmış ve bu iki yöntem kıyaslanmıştır. Ters nokta emdirimi yöntemi standardize oluşu her türlü DNA çekilmesi ile sonuç alınabilmesi, kit kullanıldığı için pratik ve kolay oluşu ve çok az miktarda örnekle sonuç verebilmesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Çalışmada HLA DQA1 lokusunun sadece kan örneklerinde değil, kurumuş kan lekelerinde, idrar, sperm gibi çeşitli vücut sıvılarında ve saç kılı, ağız mukozası, yumuşak doku, kemik dokusu gibi farklı doku örneklerinde HLA DQA1 fenotiplerinin tiplenmesinde ASO ile ters nokta emdiriminde başarılı sonuçlar alınmıştır.

7. SUMMARY

In this study the gene frequencies of HLA DQA1 loci 158 unrelated Turkish people living in different places in Turkey were estimated.

PCR based reverse dot blot and PCR-based sequence specific primer methods were used for this purpose. As a result of the comparison of these two methods, PCR-based reverse dot blot method was chosen due being standardized, being used by several of DNA extraction method, being practical and easy and also requiring small amount of sample.

HLA DQA1 polymorphism was also typed in dried blood samples, various tissues such as hair, buccal swab, bones, soft tissue and body fluids such as, urine, sperm by using reverse dot blot method.

8. KAYNAKLAR

Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakamura, H., Hasegawa, M. ve Kagawa, M. (1995) Purification of Forensic Specimens for the Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 38: 3, 691-701.

Allen, M., Saldeen, T., Pettersson, U., Gyllensten, U. (1993) Genetic Typing of HLA Class II Genes in Swedish Populations: Application to Forensic Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 38, 3, 554-570.

AmpliType User Guide (Version 2) The Perkin-Elmer Corporation, 1993.

Atasoy, S., Abacı-Kalfoğlu, E., Yükseloğlu, H., Dökmen, H. (1995) Babalık Belirtiminde HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC Lokusları ile 16 Konvasyonel Genetik İşaret Sisteminin Karşılaştırılması. 8. Ulusal Adli Tıp Günleri, 16-20 Ekim 1995, Antalya, 323.

Atasoy, S., Abacı-Kalfoğlu, E., Şişman-Yükseloğlu, H. (1996) HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc allele and Genotype Frequencies in Turkey and Their Use in Civil and Criminal Paternity Investigations. 1996 American Academy of Forensic Sciences Annual Meeting Nashville, Tennessee, February 19-24, 1996, p 25.

Auffray, C., Lillie, J.W., Korman, A.J., Boss, J.M. (1987) Structure and expression of HLA-DQA1 and DXA1 genes: Interalelic alternate, splicing of the HLA-DQA1 gene and functional splicing of the HLA-DXA1 gene using a retroviral vector. *Immunogenetics*, 26: 63-73.

Benoist, C. ve Mathis, D. (1990) Regulation of Major Histocompatibility Complex Class-II Genes: X, Y and Other Letters of the Alphabet. *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 681-715.

Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich, H.A. (1994) Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens*: 44: 1-18.

Brown, J.H., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J., Wiley, D.C. (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of Class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332, 845-850.

Budowle, B., Lindsey, J.A., DeCou, J.A., Koons, B.W., Giusti, A.M., Comey, C.T. (1995) Validation and Population Studies of The Loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, and Gc (PM loci) and HLA DQ α Using a Multiplex Amplification and Typing Procedure. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 40: 1, 45-54.

Bugawan, T.L., Horn, G.T., Long, M.C., Mickelson, E., Hansen, J.A., Ferrara, G.B., Angelini, G., Erlich, H.A. (1988) Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA Amplification of DP-a and DP-b Loci. *The Journal of Immunology*, 141: 12, 4024-4030.

Caenazzo, L., Crestani, C., Ponzano, E., Bonan, G., Cortivo, P. (1993) HLA-DQ α Typing by DNA Amplification of Single Human Hair. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993.

Casarino, L., De Stefano, F., Mannucci, A. ve Canale, M. (1995) HLA-DQA1 and Amelogenin Coamplification: A Handy Tool for Identification. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 3, 456-458.

Castillo, M., Paredes, M., Penuela, C., Bustos, I., Jimenez, M., Galindo, A. (1995) Determination of the allele and genotype frequencies of Loci HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc in Bogoto-Colombia. 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics, 193, Spain, September 12-16.

Cavalli-Sforza, L.L. (1994) *The History and Geography of human genes*. 3-9 Princeton University Press 41, William Street, Princeton, New Jersey, 08540.

Cerna, M., Fernandez-Vina, M., Ivaskova, E., Stastny, P. (1992) Comparison of HLA class II alleles in Gypsy and Czech Populations by DNA typing with Oligonucleotide probes. *Tissue Antigens*, 39, 111-116.

Comey, C.T., Budowle, B. (1991) Validation Studies on the Analysis of the HLA DQA Locus using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Forensic Sciences*, 36: 6, 1633-1648.

Comey, C.T., Budowle, B., Adams, D.E., Baumstark, A.L., Lindsey, J.A., Presley, L.A. (1993) PCR Amplification and Typing of the HLA DQ α Gene in Forensic Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 38, 2, 139-249.

Crespillo, M., Luque, J.A., Garcia, P., Ramirez, E., Fernandez, R.M. ve Valverde, J.L. (1995) Population study for the HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and Gc Loc i in North-East of Spain. 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics 197, Spain, September 12-16 1995.

Crouse, C.A., Fever, W.J., Nippes, D.C., Hutto, S.C., Barnes, K.S., Coffman, D., Livingston, S.H., Ginsberg, L. ve Glidewell, D.E. (1994a) Analysis of HLA-DQ α Allele and Genotype Frequencies in populations from Florida. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 3, 731-742.

Crouse, C.A., Vincek, V., Caraballo, B.S. (1994b) Analysis and Interpretation of the HLA DQ α '1.1 Weak-Signal' Observed During the PCR-Based Typing Method. *Journal of Forensic Sciences*, 39: 1, 41-51.

Del Pozzo, G., Guardiola, J. (1990) A SINE insertion provides information on the divergence of the HLA-DQA1 and HLA-DQA2 genes. *Immunogenetics*, 31: 229-232.

Del Pozzo, G., Perfetto, C., Ombra, M.N., Ding, G.Z., Guardiola, J. ve Maffei, A. (1992) DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the HLA-DQA1 gene. *Immunogenetics*, 35, 176-182.

Doherty, D.G., Vaughan, R.W., Donaldsan, P.T., Mowat, A.P. (1992) HLA DQA, DQB, and DRB Genotyping by Oligonucleotide Analysis: Distribution of Aleles and Haplotypes in British Caucasoids. *Human Immunology*: 34, 53-63.

Dynal SSP (Sequence-Specific-Primers) sets for DNA typing of HLA Class II alleles. *General Protocol*, 1995.

Erlich, H.A., Bugawan, T.L. (1990) HLA DNA Typing In: PCR Protocol s: A Guide to methods and Applications. pp: 261-271 by Academic Press.

Filoğlu, G., Altuncul, H., Yükseloğlu, H., Abacı-Kalfoğlu, E., Atasoy, S. (1996) Küretaj Materyalinden Babalık Belirtimi. II. Adli Bilimler Kongresi, 13-16 Mayıs 1996, Bursa, 91.

Fogdell, A. ve Olerup, O. (1994) The DQA1 *0104 allele is carried by DRB1* 1001-and DRB1* 1401-possitive haplotypes in Caucasians, Africans and Orientals. *Tissue Antigens*, 44, 19-24.

Garcia-Pacheco, J.M., Herbut, B., Cutbush, S., Hitman, G.A., Zhanglin, W., Magzoub, M., Bottazzo, G.F. (1992) *Tissue Antigens*: 40, 145-149.

Graul, A.I. (1989) *Polimerase chain Reaction. Technology*, 95-98.

Gustincich, S., Manfioletti, G., Giannino, S. ve Schneider, C. (1991) A Fast Method for High-Quality Genomic DNA

Extraction from Whole Human Blood. *Bio Techniques*, 11, 3, 298-301.

Gyllensten, U.B., Erlich, A.H. (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7652-7656.

Gyllensten, U.B., Erlich, A.H. (1990) Evolution of HLA Class-II Polymorphism in Primates: The DQA Locus. *Immunol. Res.*, 9: 223-233.

Gyllensten, U.B., Josefsson, A., Schemschat, K., Saldeen, T., Petterson, U. (1992) DNA Typing of forensic material with Mixed Genotypes Using Allele-Specific Enzymatic Amplification (Polymerase Chain Reaction). *Forensic Science International*, 52, 149-160.

Harrington, C.S., Dunaiski, V., Williams, K.E., Fowler, C. (1991) HLA-DQA Typing of Forensic Specimens By Amplification Restriction Fragment Polymorphism (ARFPW) Analysis. *Forensic Science International*, 51, 147-157.

Hashimoto, M., Kinoshita, T., Yamasaki, M. Tanaka, H., Imanishi, T., Ihara, H., Ichikawa, Y. ve Fukunishi, T. (1994) Gene Frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese Individuals. *Tissue Antigens*, 44, 166-173.

Hayes, J.M., Budowle, B. ve Freund, M. (1995) Arab population Data on the PCR-Based Loci: HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8, Gc, and D1S80. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 5, 888-892.

Helmuth, R., Fildes, N., Blake, E., Luce, M.C., Chimera, J., Madej, R., Gorodezky, C., Stoneking, M., Schmill, N., Klitz, W., Higuchi, R., Erlich, H.A. (1990) HLA-DQ α Allele and Genotype Frequencies in Various Human Populations, Determined by

Using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes.
Am. J. Hum. Genet., 47: 515-523.

Higuchi, R., Beroldingen, Von.C.H., Sensabaugh, F.G. ve Erlich, A.H. (1988) DNA typing from single hairs. *Nature*, 332, 543-546.

HLA-DQ α Forensic DNA Amplification and Typing Kit Package Insert, Perkin Elmer Corporation, 1993.

Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V. ve Dirnhofer, R. (1995) A Method for the purification and Recovery of Genomic DNA from an HLA DQA1 Amplification Product and its subsequent Amplification and Typing with thhe Ampli Type PM PCR amplification and Typing kit". *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, 40: 4, 649-653.

Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Dirnhofer, R. (1994) Swiss population data on the loci HLA DQ α , LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, Gc and D1S80. *Forensic Science International* 67, 175-184.

Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Rudin, O., Bohnert, M. ve Dirnhofer, R. (1995) Confirmation of the Identity of Human Skeletal Remains Using Multiplex PCR Amplification and Typing Kits. *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, 40: 4, 701-705.

Holland, M.M., Fisher, D.L., Mitchell, L.G., Rodriques, W.C., Canik, J.J., Merril, C.R. ve Weedn, V.W. (1993) Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from The Vietnam war. *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, 38: 3, 542-553.

Hopkinson, D.A. (1993) Molecular analysis of classical red cell markers. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993 : 15.

Huang, N.E. and Budowle, B. (1995) Chinese Population Data on the pCR Based Loci HLA-DQ Alpha, Low-Density Lipoprotein Receptor, Glycophorin α , Hemoglobin γ G, D7S8, and Group-Specific Component. *Hum. Heredity*, 45, 34-40.

Huckenbeck, W., Scheil, H.G., Cremer, U., Makuch, D., Eiermann, T.H., Kuntze, K., Bonte, W. (1995) German data on the loci low-Density Lipoprotein Receptor, Glycophorin A, Hemoglobin γ G, D7S8, Group-Specific Component and HLA DQ α . 16th. Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics Spain, September 12-16.

Jin, K., Ha, H.N., Speed, P.T., Gill, T.J. (1995) Reproductive Failure and the Major Histocompatibility Complex. *Am. J. Hum. Genet.*, 56: 1456-1467.

Jung, J.M., Comey, C.T., Baer, D.B. ve Budowle, B. (1991) Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ α gene. *International Journal of Legal Medicine*, 104: 145-148.

Kappes, D., Strominger, J.L. (1988) Human Class II Major Histocompatibility Complex Genes and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 57: 991-1028.

Khalil, I., d'Auriol, L., Morin, L., Gobet, M., Lepage, V., Galibert, F., Degos, L. ve Hors, J. (1990) Typing for DQ using Oligonucleotidic Probes. *Neuv. Rev. Fr Hematol.*, 32, 109-112.

Klein, J., Takahata, N., Ayala, F.J. (1993) MHC polymorphism and Human Origins. *Scientific American*, 78-83.

Klitz, W., Aldrich, C.L., Fildes, N., Horning, S.J. ve Begovich, A.B. (1994) Localization of Predisposition to Hodgkin Disease in the HLA Class II Region. *Am. J. Hum. Genet.*, 54: 497-505.

Koh, T.L., Benjamin, D.G. (1994) HLA-DQ α Genotype and Allele Frequencies in Malays, Chinese, and Indians in the Malaysian Population. *Human Heredity*, 44, 150-155.

Kurth, J.H., Bowcock, A.M., Erlich, H.A., Cavallisforza, L.L. (1992) HLA-DQ α allelic frequencies detected with PCR in a variety of human populations. *Gene Geography*, 6, 175-183.

Maeda, M., Murayama, N., Ishii, H., Uryu, N., Ota, M., Tsuji, K., Inoko, H. (1989) A simple and rapid method for HLA DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*: 34, 290-298.

Mayr, W.R. (1993) The Molecular Genetics of HLA. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993 : 16.

Medintz, I., Chiriboga, L., McCurdy, L. ve Kobilinsky, L. (1994) Restriction Fragment Length Polymorphism and Polymerase Chain Reaction-HLA DQ α Analysis of Casework Urine Specimens. *Journal of Forensic Sciences*, 39: 6, 1372-1380.

Miller, S.A., Dykes, D.D. ve Polesky, H.F. (1988) A Simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 3, 1215.

Morzycka, E., Harwood, J.I., Smith, J.R. ve Kagnoff, M.F. (1993) Structure and evolution of the promoter regions of the DQA genes. *Immunogenetics*, 37, 364-372.

Möller, A., Brinkmann, B. (1993) Extraction and PCR amplification of DNA from hair shafts. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993.

Olerup, O., Aldener, A. ve Fogdell, A. (1993) HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with requence-specific

primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 41, 119-134.

Olerup, O., Hillert, J. (1991) HLA-D Region associated genetic susceptibility to multiple Sclerosis: A critical evaluation. *Tissue Antigens*, 38: 1-15.

Olerup, O. (1990) HLA Class II typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases will fail to unequivocally identify the genotypes of many homozygous and heterozygous individuals. *Tissue Antigens*, 36, 83-87.

Özkan, Ü., Yükseloğlu, H., Altunçul, H., Filoğlu, G., Abacı-Kalfoğlu, E., Atasoy, S. (1996) Ağz İçi Materyalden DNA Eldesi ve Adli Amaçla Kullanımı. II. Adli Bilimler Kongresi, 13-16 Mayıs 1996, Bursa, 88.

Ota, M., Seki, T., Namura, N., Sugimura, K., Mizuki, N., Fukushima, H., Tsuji, K., Inoko, H. (1991) Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and DQA1 genotyping. *Tissue Antijens*, 38: 60-70.

Pai, C.Y., Chou, S.L., Yang, C.H. ve Tang, T.K. (1995) Flow Chart HLA-DQA1 Genotyping and its Application to a Forensic Case. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 2, 228-235.

Piazza, A. (1993) History and geography of human genes. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993 : 3-12.

Pizzamiglio, M., Virgili, A., Vespi, G., D'Errico, G., Vecchio, C., Garofano, L. (1993) DNA typing on single hair recent possibilities based on new extraction method. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993.

Presley, L.A., Baumstark, A.L. ve Dixon, A. (1993) The effects of Specific Latent Fingerprint and Questioned Document Examinations on the Amplification and Typing of the HLA DQ

alpha Gene Region in Forensic Case work. *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, 38: 5, 1028-1036.

Previdere, C., Peloso, G. (1993) Application of PCR technique for the characterization of Human bones. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics, 292, Venezia 13-15 October 1993.

Roy, R. ve Reynolds, R. (1995) Ampli Type[®] PM and HLA DQ α Typing from pap Samear, Semen Smear, and postcoital Slides. *Journal of Forensic Sciences*, 40: 2, 266-269.

Ross, W.D. (1990) Polymerase Chain Reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114, 627.

Saiki, K.R., Bugawan, L.T., Horn, T., Mullis, B.K., Erlich, A.H. (1986a) Analysis of enzymatically amplified beta globin and HLA DQA1 DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324, 163-166.

Saiki, K.R., Walsh, S.P., Levenson, C.H., Erlich, A.H. (1986b) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6230-6234.

Sajantila, A., Strom, M., Budowle, B., Karhunen, P.J. ve Peltonen, L. (1991) The Polymerase Chain Reaction and Post-Mortem Forensic Identity Testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQA1 LOC₁ to the Identification of Fire Victims. *Forensic Science International*, 51: 23-34.

Sajantila, A., Ström, M., Budowle, B., Tienari, P.J., Ehnholm, C. ve Peltonen, L. (1991) The distribution of the HLA-DQ α alleles and genotypes in the Finnish population determined by the use of DNA amplification and allele specific oligonucleotides. *Int. J. Leg. Med.*, 104, 181-184.

Salazar, M., Deulofeut, R., Yunis, J.J., Bing, D.H., Yunis, E.J. (1993) A fast PCR-SSP method for HLA DQ genetic typing Tissue Antigens, 41, 102-106.

Salazar, M., Williamson, Bing, D.H. (1994) Genetic Typing of the DQA1*4 Alleles by Restriction Enzyme Digestion of the PCR Product obtained with the DQ Alpha Amplitype Kit. Journal of Forensic Sciences, 39: 2, 518-525.

Sambrook, J., Fritsch, F.F., Maniatis, T. (1989) Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA Appendix E: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning In: Molecular Cloning: 3 A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santos, S.M., Sinoes, F., Arnada, A., Clemente, A., Correia, M.C. (1995) HLA-DQA1 polymorphism in two portuguese population samples from Lisbon and the South of Portugal. 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics, 235, Spain, September, 12-16, 1995.

Sanz, P., Prieto, V. (1993) Use of PCR for forensic analysis of DNA in Cigarette ends. 15th. Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics. 195, Venezia, 13-15 October 1993.

Schwartz, B.D. (1992) The Major Histocompatibility Complex and Disease Susceptibility In: Cecil Textbook of Medicine. 19th edition, edited by Wyngaarden, J.B., Jr., Smith, L.H., Bennett, J.C., Volume 2, 1470-1479.

So, A.K.L., Fielder, A.H.L., Warner, C.A., Isenberg, D.A., Batchelar, J.R., Walport, M.J. (1990) DNA Polymorphism of major histocompatibility complex class II and class III genes in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens: 35, 144-147.

Stringer, P., Triggs, C.M., Baldwin, L.C., Melia, L.M., Savill, M.G. (1995) Distribution of HLA-DQA1 alleles in New Zealand Caucasian, Maori and Pacific Islander populations. Int. J.

Legal Med., 108, 2-7.

Tagliabracci, A., Giorgetti, R., Agostini, A., Buscemi, L., Cingolani, M. ve Ferrara, S.D. (1992) Frequency of HLA-DQA1 alleles in an Italian population. *Int. J. Leg. Med.*, 105, 161-164.

Tahir, M.A. ve Watson, N. (1995) Typing of DNA HLA-DQ α Alleles Extracted from Human Nail Material Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 40: 4, 634-636.

Taylor, G.R. (1992) Polymerase chain reaction: Basic principles and automation In: *PCR A practical Approach* Edited by Mcpherson, M.J., Quirke, P., Taylor 1-3 Oxford University Press.

Thompson, M.W., Mcinnes, R.R., Willard, H.F. (1991) The polymerase Chain Reaction pp. 111, In: *Genetics in Medicine, Fifth Edition*.

Tie, J., Oshida, S., Chiba, S., Tsukamoto, S., Sebetan, I.M. (1995) Frequency of D1S80 and HLA-DQa alleles in a Chinese population. *Int. J. Legal Medicine*, 108, 170-171.

Titus, E.A., Rickards, O., De Stefano, G.F., Erlich, H.A. (1994) Analysis of HLA Class II Haplotypes in the Cayapa Indians of Ecuador: A Norel DRBI Allele Reveals Evidence for Convergent Evolution and Balancing Selection at Position 86. *Am. J. Hum. Genet.*, pp. 55, 160-167.

Uryu, N., Maeda, M., Ota, M., Tsuji, K., Inoko, H. (1990) A simple and rapid method for HLA-DRB and DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*, 35, 20-31.

Walsh, P.S., Fildes, N., Louie, A.S. ve Higuchi, R. (1991a) Report of the Blint Trial of the Cetus Ampli Type HLA DQ α Forensic Deoxyribonucleic Acid (DNA) Amplification and

Typing Kit. *Journal of Forensic Sciences*, 36: 5, 1551-1556.

Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991b) Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*, 10, 4, 506-513.

Weichhold, G.M., Keil, W., Bayer, B. (1993) HLD DQ α PCR SYSTEM: Frequencies of an south Bavarian Population and Forensic Application. 15th. Congress of the International Society of Forensic Haemogenetics Venezia 13-15 October 1993: 599.

Westwood, S.A. ve Werrett, J.D. (1990) An evaluation of the polymerase chain reaction method for forensic applications. *Forensic Science International*, 45, 201-215.

Wilson, R.B., Ferrara, J.L., Baum, H.J., Shaler, R.C. (1994) Guidelines for internal validation of the HLA-DQ α DNA typing system. *Forensic Science International*, 66: 9-22.

Woo, K.M. and Budowle, B. (1995) Korean Population Data on the PCR-Based Loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, HLA-DQA1, and D1S80. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 4, 645-648.

Yükseloğlu, H., Altunçul, H., Filoğlu, G., Abacı-Kalfoğlu, E., Atasoy, S. (1996) DNA-HLA DQA1 Polimorfizminin "PCR-DOT BLOT" ve "PCR-SSP" ile saptanması. II. Adli Bilimler Kongresi, 13-16 Mayıs 1996, Bursa, 90.

1.0. YITIRILMIŞTIR
KURUMUNUN İZİNİ ALINILMADAN
KOPYA YAPILMAMALIDIR