

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Gönül Filoğlu

DNA KİMLİKLENDİRMESİ AMACIYLA 18 LOKUSLU STR (D8S1179, D21S11,
D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA,
TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D14S1434) KİTİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG HÜSEYİN KARADAYI

İSTANBUL, 2019

TEŞEKKÜR

“DNA kimliklendirmesi amacı ile kullanılmak üzere 18 lokuslu kit geliştirilmesi” adlı tezimin hazırlanmasında her türlü yardım ve ilgiyi eksik etmeyen, tecrübeleriyle çalışmamı destekleyen sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Gönül FİLOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine, bilgi birikimiyle araştırmama destek veren, tezimin ortaya çıkmasındaki katkılarından dolayı sayın Dr. Öğretim Üyesi Özlem BÜLBÜL’e teşekkür ederim.

Her türlü teknik çalışmamda kesintisiz destek veren ve tezimin hayat bulmasında ısrarcı destek sağlayan çalışma arkadaşım sayın Biyomühendis Hande ERTÜRK’e de teşekkür etmeyi bir borç olarak görüyorum.

Uzun tez sürecinde sürekli moral ve motivasyon desteği sunan sevgili eşim Rukiye KARADAYI’ya ve bu süreçte zaman zaman ihmal etme gafletine düştüğüm biricik çocuklarım Nurşen, Begüm, Merve ve Ömer Salih KARADAYI’ya da sonsuz sevgilerimi sunarım.

Hüseyin KARADAYI

TABLolar DİZİNİ

Tablo I. STR lokuslarında görülebilen farklı nükleotid tekrarları (www.promega.com/strs).....	18
Tablo II. STR sistemlerinin ve kitlerinin yıllar içindeki gelişimi	26
Tablo III. Applied Biosystem, Promega ve Qiagen firmalarının yıllar içinde ürettiği STR kitleri.....	28
Tablo IV. 17 STR lokusu ve Amelogenin GenBank verilerine göre karakterizasyonu	39
Tablo V. TH01 STR lokusunun alel numaraları ve her bir alleldeki tekrar dizilerinin yapısı ve sayısı	40
Tablo VI. STR lokuslarında kullanılan boyalar ve her bir lokusun sıralaması	41
Tablo VII. Tek pleks PCR Çalışma Protokolü.....	42
Tablo VIII. Tek pleks çalışmanın PCR bileşen miktarları.....	43
Tablo IX. İki ayrı multipleks çalışmanın PCR bileşen miktarları.....	44
Tablo X. İki ayrı multipleks çalışmanın PCR bileşen miktarları	44
Tablo XI. PCR Ürünlerinin Kapiler Elektforeze Hazırlanması	45
Tablo XII. 3130xl Genetik Analizörün Yürütme Modülleri ve Koşulları	46
Tablo XIII. 18 lokuslu multipleks STR panelde kullanılan primerlerin son konsantrasyonları	49
Tablo XIV. Multipleks PCR Çalışma Protokolü.....	50
Tablo XV. Araştırmaya Rıza Gösteren 15 Kişiyeye Ait 18pleks Çalışma Sonuçları ...	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. RFLP Tekniği (52).....	15
Şekil 2. RAPD Tekniği (11).....	16
Şekil 3. Örnek STR Lokusu (16)	18
Şekil 4. CODIS’de yer alan STR lokusları (28)	20
Şekil 5. 16 bölgesen oluşan Ampflstr™ Identifiler™ Direct PCR Amplification Kit (21).....	22
Şekil 6. Olay yerinden elde edilen delillerin NGS teknolojisi ile çalışılmasıyla çok sayıda farklı bilgi aynı anda elde edilerek geniş kapsamlı bilgilere ulaşılabilir (25) 23	
Şekil 7. Promega firmasının 16 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (29).....	24
Şekil 8. Thermo firmasının 16 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (21)	24
Şekil 9. Promega firmasının 24 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (30).....	25
Şekil 10. Thermo firmasının 24 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (31)	25
Şekil 11. Kapiller elektroforez ve STR teknolojisinin gelişimi (35)	27
Şekil 12. Kapiller elektroforez şematik gösterim (40).....	30
Şekil 13. ABI 3500 Kapiller Elektroforez Genetik Analizörü (42).....	32
Şekil 14. Kapiller Elektroforez sisteminde floresan işaretli PZR ürünlerinin ayırımı (25)	33
Şekil 15. STR Primerlerinin işaretlenmesinde kullanılan floresan boyalar ve emisyon spektrumları (43).....	33
Şekil 16. ROX™ 500 Size Standard (44)	34
Şekil 17. LIZ™ 500 Size Standard (45)	34
Şekil 18. ILS600 Size Standard (46)	34
Şekil 19. Beş floresan boyanın emisyon spektrumları (21)	47
Şekil 20. LIZ 500 Size Standard görüntüsü	48
Şekil 21. Tek pleks çalışılan CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358, D10S1248 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri	52
Şekil 22. Tek pleks çalışılmış Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179, D19S433 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri	53
Şekil 23. Tek çalışılmış D5S818, D2S11, THO1, D14S34 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri	54

Şekil 24. Tek çalışılmış D18S51, D13S317, D16S539, vWA lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri	55
Şekil 25. Miks 1 (D18S51, D13S317, FGA, D5S818, D16S539, D8S1179, vWa, D10S1248, D14S1434) elektroforegram görüntüsü.	56
Şekil 26. Miks 2 (Amelogenin, CSF1PO, D7S820, TPOX, D2S1338, D21S11, D3S1358, THO1, D19S433) elektroforegram görüntüsü.	56
Şekil 27. 18 lokusluk multipleks setin tek reaksiyondaki elektroforegram görüntüsü.	57
Şekil 28. Optimize edilmiş 18 lokuslu DNA profili	57
Şekil 29. Optimize STR lokuslu multipleks Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü	58
Şekil 30. 18 lokuslu multipleks STR paneline ait 9947A kontrol DNA'sına ait DNA profili.....	59
Şekil 31. PET boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2ng/µl, 3 ng/µl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri.....	60
Şekil 32. 6-FAM boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2ng/µl, 3 ng/µl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri	61
Şekil 33. NED boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2ng/µl, 3 ng/µl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri.....	62
Şekil 34. VIC boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2ng/µl, 3 ng/µl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri.....	63
Şekil 35. Tüm boyaların birlikte (17 STR lokusu ve Amelogenin) 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2ng/µl, 3 ng/µl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri	63

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems, Inc
bç	Baz çifti
C	Cytosine (Sitozin)
CODIS	Combined DNA Index System (Birleşik DNA İndeks Sistem)
°C	Santigrat Derece
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Ethylenediamine tetra-acetic acid)
G	Guanin
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
µl	Microliter (Mikrolitre)
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rpm	Rounds Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
STR	Short Tandem Repeats (Kısa Ardarda Tekrar Dizileri)
LIZ®	Turuncu Floresan Boya
6-FAM™	Mavi Floresan Boya
VIC®	Yeşil Floresan Boya
NED™	Sarı Floresan Boya
PET®	Kırmızı Floresan Boya

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	1
TABLOLAR DİZİNİ	2
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	3
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	5
İÇİNDEKİLER	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	9
1.1. Tezin Amacı	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. DNA Parmak İzi.....	11
2.2. DNA Kimliklendirmesinde Kullanılan Metotlar	14
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	14
2.2.2. RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)	14
2.2.3. RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA/ Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA).....	15
2.2.4. AmpFLP (Amplified fragment length polymorphism /Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi).....	16
2.2.5. Mitokondrial DNA Analizi	17
2.3. Mikrosatellitler – Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (Short Tandem Repeats)..	17
2.4. STR Sistemleri ve Veri Tabanları	19
2.5. Multipleks STR Sistemleri	21
2.6. STR Kitlerin Gelişimi	26
2.7. Kapiller Elektroforez.....	29
2.7.1. Kapiller elektroforezde sonuçların değerlendirilmesi.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	35
3.3. Çalışma Planı	36
3.4. Örnek Toplama.....	36
3.5. DNA İzolasyonu.....	37

3.6. DNA Miktarı ve Kalite Tayini	38
3.7. STR Lokus Seçimi ve Karakterizasyonu	38
3.8. STR Lokuslarının Primer Dizaynı	39
3.9. DNA Amplifikasyonu	42
3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bileşenlerinin hazırlanması	42
3.9.2. Tek pleks PCR çalışması.....	43
3.9.3. Multipleks PCR çalışması.....	43
3.9.3.1. 9 Lokuslu Multipleks STR Panel Çalışması	43
3.9.3.2. 18 Lokuslu Multipleks STR Panel Çalışması	44
3.10. Kapiler Elektroforez.....	45
3.10.1. PCR ürünlerinin kapiler elektroforeze hazırlanması.....	45
3.11. Genotip Veri Analizi	46
3.12. 18 Lokuslu Multipleks STR Panelin Optimizasyonu.....	48
3.13. 18 Lokuslu Multipleks STR Panelin Optimum DNA Miktarı/Hassasiyeti	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Tek pleks (tek lokus) PCR Çalışmaları.....	51
4.2. Multipleks STR Panel Çalışmaları.....	56
4.2.1. 9 Lokuslu multipleks STR panel çalışması.....	56
4.2.2. 17 STR lokusu ve Amelogenin içeren multipleks setin optimizasyonu	57
4.3. Doğruluk ve Hassasiyet.....	60
5. TARTIŞMA	65
5.1. Primer Dizaynı, Kitin Floresan Boyalar İle Multipleks İçeriğinin Oluşturulması	66
5.2. Tek pleks (Tek Lokus) PCR Çalışmaları	67
5.3. Multipleks STR Panel Çalışmaları.....	68
5.3.1. Dokuz lokuslu multipleks STR panel çalışması	68
5.3.2. 18pleks multipleks setin optimizasyonu	68
5.4. Hassasiyet.....	69
6. SONUÇ	70
7. ÖZET.....	71
8. ABSTRACT.....	73

9. KAYNAKLAR	75
EK-1 ETİK KURUL KARARI.....	80
EK-1 ETİK KURUL KARARI (DEVAMI)	81
ÖZGEÇMİŞ	82



1. Giriş ve Amaç

1.1. Tezin Amacı

İnsan genomunda 2-6 tekrardan oluşan ve kısa tekrar bölgeleri olarak adlandırılan STR'ler (Short Tandem Repeats), adli kimliklendirme ve nesep tayini amacıyla dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yıllar içerisinde DNA teknolojilerinin ilerlemesi ve farklı tekniklerin geliştirilmesiyle aynı anda 16-24 farklı STR bölgesi tek bir PCR tüpü içerisinde multipleks olarak çoğaltılabilmekte ve "barkod" niteliğinde DNA profilleri elde edilmektedir.

Ayırım gücü oldukça yüksek olan bu genetik işaretler sayesinde adli olgular; diğer polimorfik sistemlere gerek kalmadan çözülebilmektedir. Hâlihazırda Dünya'da ve ülkemizde en çok kullanılan STR markırları AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems®-Life Technologies) D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır (1). Bu 16 bölgeli sistem, bir Amerikan firması tarafından multipleks olarak tek reaksiyonda çalışacak şekilde optimize edilerek kit haline getirilmiş, ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tez çalışması ile amaçlanan; mevcut STR kitlerinden daha geniş analiz kabiliyetine sahip yeni bir STR (*Short Tandem Repeats*) multipleks sistemi geliştirmektir. Dünyada ve ülkemizde sıklıkla kullanılan 16 STR lokusuna ek olarak 2 mini-STR lokusu (D14S1434, D10S1248) daha ilave edilerek multiplekstekki STR sayısı 18'e yükseltilecektir. Eklenecek olan 2 mini-STR ile kitin ayırım gücünün artırılması ve degrade olmuş örneklerde daha başarılı DNA profili elde edilmesi beklenmektedir. Biyolojik örneklerin maruz kaldığı çevresel koşullara bağlı olarak başarılı profilleme yapmak bazen imkânsız olabilmektedir. Ayrıca, mevcut sistemde kullanılan büyük ampikonlu lokuslar,

moleküler yapısı bozulmuş DNA örneklerinde çoğaltılamamaktadır. Düşük konsantrasyona sahip DNA örneklerinde dahi, 18 STR multipleks sistemin, tek reaksiyonda başarılı amplifikasyonu ile doğru DNA profili elde edilmesi amaçlanmaktadır.



2. Genel Bilgiler

2.1. DNA Parmak İzi

DNA teknolojisinin hızla gelişmesi, daha az miktarda materyallerle çalışılabilmesi, daha doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi, otomatize sistemlerin geliştirilmesi, tek kullanımlık kitlerin üretilmesiyle teknolojinin ucuzlaması adli tıp alanında da bu teknolojinin kullanımını arttırmıştır. DNA kimliklendirmesine dayalı çalışmalarda, olay yerinin araştırılması, adli olayla ilişkili kişilerin kıyafetleri ve vücutlarından elde edilen delillerin suçlanan kişilerin DNAlarıyla karşılaştırılması; kriminal nedenli ölümler, doğal nedenlerle gerçekleşen ölümler ve afetler nedeniyle ölen kimliği bilinmeyen şahıslara ait cesetler, vücutlarına ait parçalar ve insan kaynaklı biyolojik materyalin kimliklendirilmesi ve ölüm nedeninin tespit edilmesinde büyük önem kazanmıştır. Zaman geçtikçe DNA, suçlamaların, aklanmaların hatta yargılamanın sonuçlarını etkileyen temel unsurlardan biri haline gelmektedir. Adli Tıp'da; kimliklendirme (identifikasyon) işlemi, bir kişinin kimlik özellikleri kullanılarak sistematik olarak tanımlanmasına ve diğer insanlardan ayırt edilebilmesine olanak sağlarken, kişiselleştirme (individualizasyon) ise olay yerinde bulunan bir biyolojik materyalin kime ait olduğunu tespit etme işlemidir (2). Adli bilimler çeşitli olayların incelenmesinde, suçun ve suçlunun ortaya çıkarılması, suç araçlarının araştırılması, suçlunun kimliğinin belirlenmesi, şüpheli ile olay yerinden gelen DNA örneklerinin aynı kaynaktan gelip gelmediğinin tespiti, miras babalık davaları ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde genetik kimliklendirme yapabilmektedir.

Geçmişte kimliklendirmede kullanılan eritrosit antijenleri, protein ve enzimlere dayalı çeşitli yöntemlerle yüksek güvenilirlikte sonuçlara ulaşmak mümkün değilken 1985 yılında Alec Jeffreys'in DNA molekülündeki minisatellit olarak adlandırılan

polimorfizmi keşfetmesinden sonra adli bilimlerde daha güvenilir, ayırım gücü yüksek ve hassas DNA sistemlerinin kullanımına geçilmiştir (3). İdentifikasyon tarihindeki ilk kullanışlı sistem 1900'lü yıllarda keşfedilen ABO kan grupları sistemidir. Daha sonra MN gruplarının keşfedilmesi ile birlikte 1960'larda tamamı kullanışlı olmamakla birlikte bilinen 17 kan grubu sistemi tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda serum proteinleri, hemoglobin ve lökosit antijenleri düzeyinde ifade edilen genetik işaretlerden yararlanılmış ancak ayırım güçlerinin düşük ve sınırlı olması, az miktardaki materyal için hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilememesi gibi sorunlar nedeniyle gelişen teknoloji ile birlikte yeni arayışlar söz konusu olmuştur. 1985 yılında DNA'nın polimorfik özelliğinin keşfini takiben çeşitli sayıda tekrarlardan oluşan ve mendel kalıtımına uygun olarak aktarılan VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) denilen diziler adli çalışmalarda öncelikli olarak kullanılmaya başlanmıştır (4). Genomda 9–100 bç arasında değişen bu ardışık dizi tekrarları minisatellit markırlar olarak da tanımlanmaktadır (5), (6).

Gelişen teknolojiler ile zamanla VNTR'ler yerini daha kısa tekrar dizilerinden oluşan STR (Short Tandem Repeats)'lere bırakmıştır. 1994 yılında ilk STR kitinin üretilmesinden sonra 1997 de 13 STR bölgesi tanımlanmış, 1999 da ise çeşitli laboratuarlarda multipleks STR kitlerinin validasyonları yapılmaya başlanmıştır. 2000 yılında FBI ve diğer laboratuvarlar RFLP tekniğinden vazgeçmiş ve ticari STR kitlerini kullanmaya başlamıştır (7).

Son yirmi beş senedir adli kimliklendirmede kısa tekrar dizinleri (short tandem repeat (STR)) lokusları kullanılmasına rağmen bozulmuş ve beklemiş eski biyolojik örneklerin tiplendirilmesinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle STR lokuslarına alternatif yeni polimorfik bölgeler keşfedilmektedir. Eski ve bozulmuş örneklerde son zamanlarda tek

nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism (SNP)) lokusları tercih edilmektedir (7).

DNA analiz tekniklerinin temeli genetik polimorfizme dayanmaktadır. İnsan genomunda herbiri farklı lokuslarda yer alan 50.000-100.000 geni kodlayan yaklaşık 3 milyar baz çifti bulunmaktadır. Bazı genler “alel” adı verilen birden fazla formda bulunabilir. Her bir birey biri anne diğeri babadan olmak üzere iki farklı alel taşıyabilirken bir populasyonda aynı gen için çok sayıda alel olabilir.

DNA markırları, bir tür içerisindeki farklı bireylerde dizi polimorfizmi gösteren DNA bölgeleridir ve varyasyonun belirlenmesinde günümüzde en sık kullanılan yöntemdir (8). Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) keşfinden sonra genetik çalışmalarda PZR temelli markırlar daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Karry Mullis tarafından 1985 yılında ilk kez ortaya konulan bu teknoloji sayesinde genomun özgün bölgelerinin in vitro şartlarda çoğaltılabilmesi ve elektroforez teknikleri ile görüntülenmesi mümkün hale gelmiştir. DNA teknolojisi ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeye paralel olarak daha ekonomik, kolay ve polimorfik olmalarından dolayı özellikle PZR temelli DNA markır sistemleri (RAPD- Randomly Amplified Polimorphic DNA/Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA, EST-Expressed Sequence Tags/ İfade Edilen Sıra Etiketleri, STS-Sequence Tagged Sites/Dizi Etiketli Bölgeler, SSCP- Single Strand Conformation Polymorphism/ Tek zincirli Yapı Polimorfizmi, AFLP- Amplified Fragment Length Polymorphism/ Çoğaltılmış Fragman Uzunluk Polimorfizmi, STR-Short Tandem Repeats/Kısa Ardışık Tekrar Dizileri ve SNP-Single Nucleotide Polimorphisms/Tek Nükleotid Polimorfizmleri) genetik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

2.2. DNA Kimliklendirmesinde Kullanılan Metotlar

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

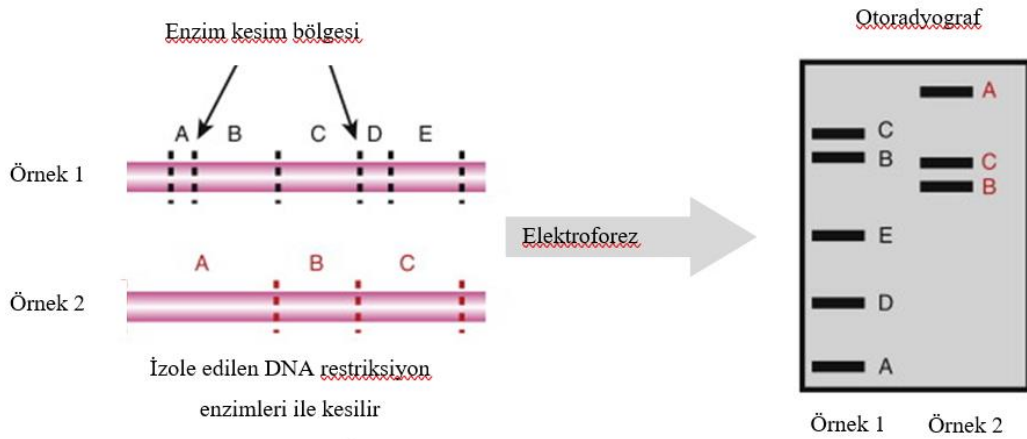
PZR analizi, tek bir DNA örneğinden milyonlarca kopya DNA oluşumunu sağlayan bir tekniktir. Kalıtımın doğrulanması amacıyla araştırma laboratuvarlarında kullanılmak üzere Karry Mullis tarafından geliştirilmiştir. DNA üzerindeki hedef bölgelerin çoğaltılarak analiz edilmesini amaçlamaktadır. PZR tekniği kullanılarak gerçekleştirilen DNA amplifikasyonu, adli bilimlerde sadece birkaç hücreden DNA analizi mümkün olabilmektedir (9).

2.2.2. RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

RFLP, günümüzde yaygın olarak kullanılmasa da adli bilimlerde DNA analizi için kullanılan ilk tekniklerden biridir. DNA'nın Restriksiyon endonükleaz (RE) enzim kesimleri ile birbirinden farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması ve oluşan DNA parça uzunlukları, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (RFLP "Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi") olarak adlandırılmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA dizisinde spesifik dizileri tanır ve belli bir noktadan keserek DNA'yı ikiye ayırır. Her bir restriksiyon endonükleaz enziminin kendisine özgü kesim bölgeleri bulunmaktadır. RFLP teknolojisi ile DNA dizisinde bulunan dizi farklılıkları kolayca tespit edilebilmektedir. RFLP analizinde, DNA öncelikle bir veya birden fazla RE enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde yürütülür. DNA dizi farklılıklarına göre genom bölgesinde farklı RE kesim alanları ve dolayısıyla bireyler arasında farklı DNA fragman profilleri oluşur. Alkali jelde denatüre olmuş DNA fragmanları Southern blot yöntemi ile nitroselüloz kâğıdına alınır. Radyoaktif işaretli bir DNA probu kullanılarak özgün DNA fragmanları ve profili tespit

edilebilir (Şekil 1). Polimorfizm oranı çok yüksek olmasından dolayı aile ağacı ve haritalama analizlerinde tercih edilmiştir (10).

RFLP markırlarının dezavantajları ise; analizin yapılabilmesi için yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA'ya ihtiyaç duyulması ve teknolojik olarak uzun ve yorucu bir yöntem olmasıdır.

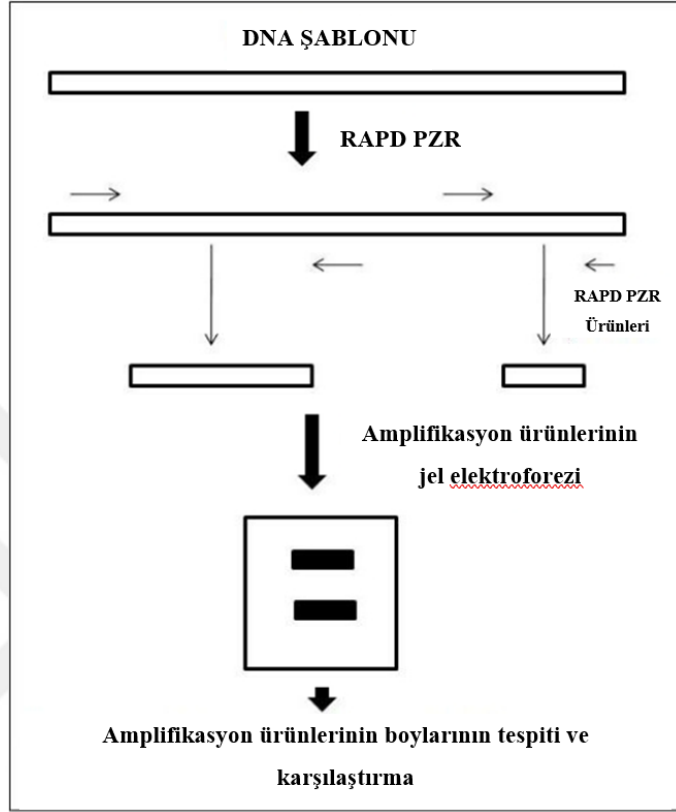


Şekil 1. RFLP Tekniği (52)

2.2.3. RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA/ Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA)

RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA- Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA), rastgele seçilmiş ortalama 10 bp uzunluğunda primerler kullanılarak DNA'nın PZR ile çoğaltılması ve elde edilen ampliconların örnekler arasında polimorfik farklılıklarına dayanan karşılaştırma tekniğidir. Elde edilen amplicon büyüklükleri 100 bp ile 2 kb arasında değişebilmektedir. Bu teknikte klonlamaya gerek duyulmaz, dizilemeye ihtiyaç duyulmaz, aynı anda birçok lokus tespit edilebilir, yüksek ayırım gücü ve tür içi çeşitliliğin gözlemlenebilmesi nedeniyle özellikle filogenetik çalışmalarda sıklıkla

kullanılır. Kısa primerlerin bağlanma koşullarından kolayca etkilenmesi nedeniyle tekrarlanabilirliği yoktur (Şekil 2) (11).



Şekil 2. RAPD Tekniği (11)

2.2.4. AmpFLP (Amplified fragment length polymorphism /Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP-Amplified fragment length polymorphism) tekniği, Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarının seçici PZR ile çoğaltılması temeline dayanmaktadır. AFLP tekniği genomik DNA'nın enzimler ile kesilmesi ve kesilen parçaların uçlarına oligonükleotid adaptörlerin bağlanması ile başlar. Kesilen bölgelerin amplifikasyonu ve amplifiye edilen bölgenin poliakrilamid jelde analiz edilmesi temeline dayanır. RE ile kesilen bölgelerin nükleotid dizisi bilinmeden jel elektroforez ile görüntülenebilmektedir. AFLP sistemi, RFLP'ye

benzer özelliklere sahip olmakla birlikte RFLP'ye göre analizi daha kolaydır ve daha az miktarda DNA'ya ihtiyaç duymaktadır (12).

2.2.5. Mitokondrial DNA Analizi

Mitokondrial DNA (mtDNA) maternal kalıtım göstermekte olup, çift zincirli ve halkasal yapıdadır. mtDNA'nın insandaki genetik materyalin yaklaşık olarak %0.3'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Somatik bir hücrede 500-1000 mitokondri bulunmaktadır. mtDNA'da gözlenen mutasyon oranı nükleer DNA'ya (nDNA) göre 10–20 kat daha fazla fazladır. Bunun nedeni, mtDNA'nın tamir mekanizmasının bulunmaması olduğu gösterilmektedir. Bunun sonucu olarak nDNA'nın baz dizisinde çok sayıda varyasyon ortaya çıkmaktadır. mtDNA, canlıların orjinleri, göç haritalarının çıkarılması, dejeneratif hastalıkların nedeninin araştırılmasında ve kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. mtDNA'nın kodlanan bölgesindeki varyasyonun iyi anlaşılması popülasyonların filogenetik geçmişinin belirlenmesinde yararlıdır. Adli bilimlerde eskimiş ve bozunmaya uğramış örneklerde nükleer DNA'nın analiz edilemediği durumlarda başarılı mitokondriyal DNA analizi yapılabilmektedir. Özellikle toplu felaketlerde ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (13).

2.3. Mikrosatellitler – Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (Short Tandem Repeats)

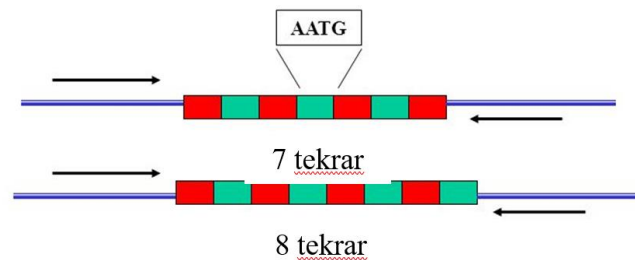
STR'ler (Short Tandem Repeat) DNA üzerinde protein kodlamayan bölgelerde bulunmaktadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte mendel kalıtımına uygun olarak nesilden nesile aktarıldığı için kişi identifikasyonunda kullanılabilen, 2-7 bazdan oluşan küçük tekrar dizileridir. STR'lerin 1–6 bç tekrarlarından oluşmuş mikrosatellit markırlar veya basit dizi tekrarları (SSR-“Simple Sequence Repeat”) olarak isimlendirilmektedir. STR'ler genellikle 350 baz çiftinden daha küçüktür. Kısa tekrarlarından oluştuklarından dolayı özellikle olay yerinden elde edilen az miktardaki ya

da çeşitli koşullara maruz kalmış ve bozunmuş örneklerin analizine olanak vermektedir (14). Mikrosatellitler hem prokaryot hem de ökaryot genomda bulunabilmektedirler. Prokaryotlarda çok sayıda biyolojik fonksiyona sahip oldukları bilinmektedir fakat ökaryot hücrelerdeki rolleri net olarak bilinmemektedir. Mikrosateller, yaygın olarak 2 nükleotidli tekrarlardan ((CA)_n) oluşmakla birlikte farklı formlarda da bulunabilmektedir (Tablo 1) (10).

Tablo I. STR lokuslarında görülebilen farklı nükleotid tekrarları (www.promega.com/strs)

Dinükleotid Tekrarları	CACACACACACA
Trinükleotid Tekrarları	AATAATAATAATAAT
Tetranükleotid Tekrarları	AGATAGATAGATAGAT
Pentanükleotid Tekrarları	AATGTAATGTAATGTAATGT

STR'ler, İlk defa 1990'lı yılların başlarında adli kimliklendirmede kullanılmaya başlanmıştır. Mikrosatellitlerde tekrar üniteleri bir türün bireylerinde aynı olmasına rağmen, tekrar eden dizi sayıları, bireyler hatta bireyin homolog kromozomları arasında dahi farklılık gösterebilmektedir (Şekil 3) (15).



Bir kişi her bir ebeveyninden STR lokusunun bir kopyasını (alle) alır

Homozygote = Her iki allelin de boyu aynıdır

Heterozygote = Alel boyları farklıdır ve birbirinden ayırt edilebilir

Şekil 3. Örnek STR Lokusu (16)

Mikrosatellitler, genomda yaygın olarak bulunmaları, polimorfizm oranının yüksek olması ve analizinin kolay olması nedeniyle bir çok alanda çalışılmaktadır. Genomda çok sayıda STR lokusu bulunmaktadır. Adli genetikte kullanılabilen birçok STR lokusu tanımlanmıştır. Ayırım gücü oldukça yüksek olan bu genetik işaretler sayesinde adli olgular; diğer polimorfik markırlara gerek kalmadan çalışılabilmektedir (17).

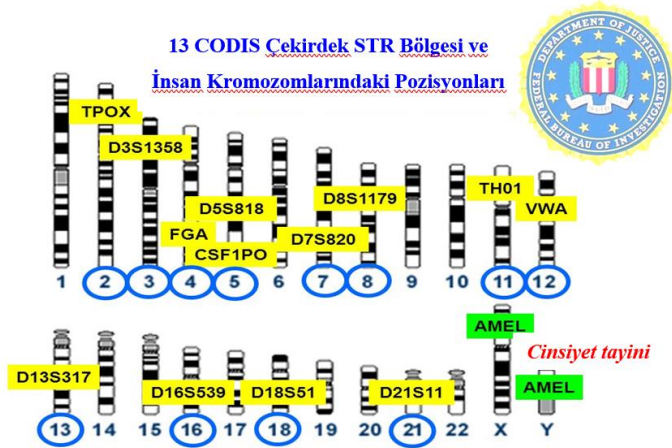
2.4. STR Sistemleri ve Veri Tabanları

STR lokusları ile ilgili yapılan kapsamlı çalışmalar sonucu hem adli hem de genel popülasyon genetiği ile ilgili büyük veritabanları oluşturulmuştur. Bu veritabanlarının en önemlilerinden biri de 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde FBI tarafından kurulan CODIS (Combined DNA Index System/ Kombine DNA İndeks Sistemi) veri bankasıdır (26). Bu sistem olay yerinden alınan örneklerden elde edilen DNA profilinin sistemde kayıtlı profiller ile karşılaştırılarak şüpheliye ulaşmaya yardımcı olmaktadır. CODIS içinde FBI tarafından belirlenen 13 STR (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11) lokusu yer almaktadır (23). Diğer bir önemli veritabanı ise; 1995'te İngiltere'de (Ulusal Veri Tabanı - The U.K. National 16 DNA Database-NDNAD) geliştirilen 10 STR lokusu ve amelogenin içeren SGM (Second Generation Multiplex) Plus sistemin kullanıldığı veri tabanıdır (26).

Multipleks PZR ile güvenilir sonuç veren yeni STR lokuslarının tanımlanması klasik STR analizleri için tamamlayıcı ekstra bilgiler sağlaması açısından önemlidir. Bu nedenle CODIS (Combined DNA Index Systems)'de yer almayan polimorfik markırlara olan ilgi artmakta, yeni lokusların rutin uygulamasına yönelik bilimsel çalışmalara ve veritabanı uygulamalarına devam edilmektedir. Daha fazla lokusun çalışılması ulusal veri tabanındaki eşleşmelerin önlenmesine de yardımcı olmaktadır. Örneğin İngiltere'deki

ulusal veri tabanı başlangıçta 6 STR lokusu iken daha sonra bu sayı 10'a çıkarılmıştır (27). Günümüzde 16 STR bölgesi rutin olarak çalışılmakta iken, tek bir multiplekste çalışılan STR sayısı giderek artmış ve 24 bölgenin aynı anda çalışılabildiği kitler üretilmiştir. Dünya'da ve ülkemizde (Adli Tıp Kurumu, Emniyet Kriminal Laboratuvarları, Jandarma Kriminal Laboratuvarları, Adli Tıp Enstitüsü ve çeşitli özel laboratuvarlar) en çok kullanılan STR lokusları D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır (3). Amerika Birleşik Devletleri Federal Bürosu CODIS için 1997 de on üç STR bölgesini belirlemiştir (Şekil 4).

Bu bölgeler dörtlü tekrarlar olup çok sayıda alelleri bulunmaktadır. Bu da FBI için kullanılan standart DNA profil sistemi haline gelmiştir ve tek reaksiyonda çalışacak şekilde optimize edilerek kit haline getirilmiş ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır. Kitler Applied Biosystem tarafından AmpFISTR Profiler® adı altında üretilmiştir. Bu kit, CODIS'in 13 STR lokusuna ek olarak D19S433 ve D2S1338 STR lokuslarını da ekleyerek sayı 16 ya çıkarılmıştır (29). Toplumda yaygın olarak kullanılan diğer bir kit de Promega Corporation tarafından üretilen PowerPlex® tir. Bu kitte de 13 STR'ye ek olarak PENTA E ve PENTA D STR lokusları kullanılmaktadır (Şekil 7 ve Şekil 8).



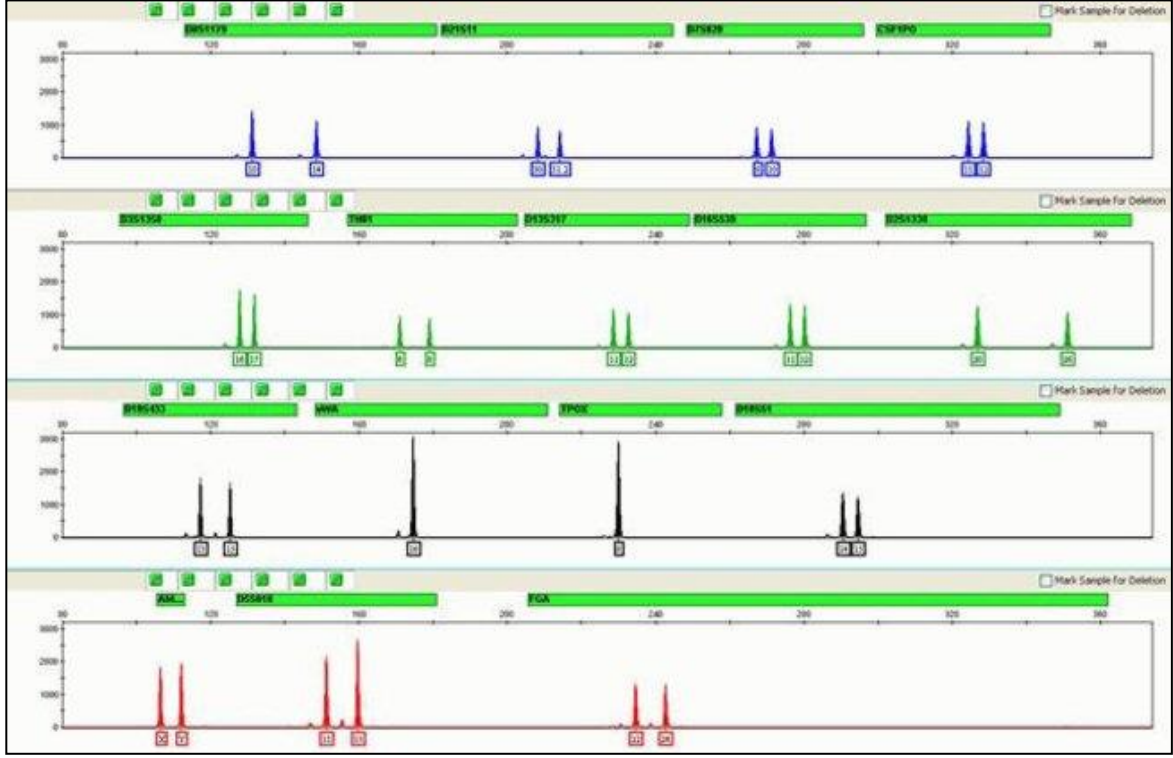
Şekil 4. CODIS'de yer alan STR lokusları (28)

2.5. Multipleks STR Sistemleri

STR'ler ilk kez 1991 yılında Edwards ve arkadaşları tarafından tanımlandıktan kısa bir süre sonra çok sayıda STR lokusu daha tanımlanmış ve geniş kullanım alanı bulmuştur. VNTR lokuslarına göre ayırım güçlerinin düşük olması bir dezavantaj gibi görünüyorsa da genomda sayılarının fazla oluşu, yüksek oranda polimorfizm göstermeleri, analiz kolaylığı, düşük mutasyon oranı ve çok sayıda STR lokusunun multipleks olarak tek tüp içerisinde PZR ile kolayca çoğaltılabilmesi, floresans dedeksiyonuna dayalı olarak kapiler elektroforezde genotip tayini yapılabilmesi yani otomasyona uygunluğu, STR'lerin adli bilimlerde yaygın olarak kullanımını sağlamıştır. STR lokuslarının yeni kullanılmaya başlandığı yıllarda, her lokus tek tek çalışılmaktaydı. Bu yöntem analiz maliyetini artırdığı ve uzun zaman aldığı için birden fazla lokusun aynı anda analizini sağlayacak kitler oluşturulmaya başlandı (Şekil 5) (18).

Multipleks STR sisteminde, polimerizasyon ve çapraz reaksiyonlar gibi zorluklar yaşandığından PZR'nin özgüllüğünün azalmasına sebep olmaktadır (19). Bağlanma sıcaklığının optimizasyonu ile, amplifikasyon verimini artırılabilir (20). STR bölgelerinin standardizasyonunu sağlamak için bir çok çalışma yapılmış ve ticari standart STR kitleri üretilmiştir. İlk ticari STR kiti 1994 yılında Promega tarafından geliştirildi. Bu kit; CSF1PO, TPOX ve TH01 lokuslarını içermekteydi. CTT tripleks olarak adlandırılan bu bölgelerin aralarında akrabalık ilişkisi olmayan iki bireyde aynı genotipe rastlama olasılığı 1/500'di. Daha sonra FSS-The Forensic Science Service tarafından geliştirilen dört lokusa (TH01, VWA, FES/FPS ve F13A1) sahip ilk nesil multipleks (Quadruplex) ile karşılaşma olasılığı yaklaşık olarak 1/10.000'dir. 1994 yılında üretilen ilk STR kitini 1997'de 13 STR bölgesinin tanımlanması takip etmiş, 1999 yılına gelindiğinde ise çeşitli laboratuvarlarda multipleks STR kitlerinin validasyon çalışmaları

yapılmaya başlanmıştır. 2000 yılına gelindiğinde FBI'in yanı sıra diğer laboratuvarlar da RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism) tekniğinden tamamen vazgeçerek ticari STR kitlerini kullanmaya başlamışlardır.



Şekil 5. 16 bölgesen oluşan Ampflstr™ Identifiler™ Direct PCR Amplification Kit (21)

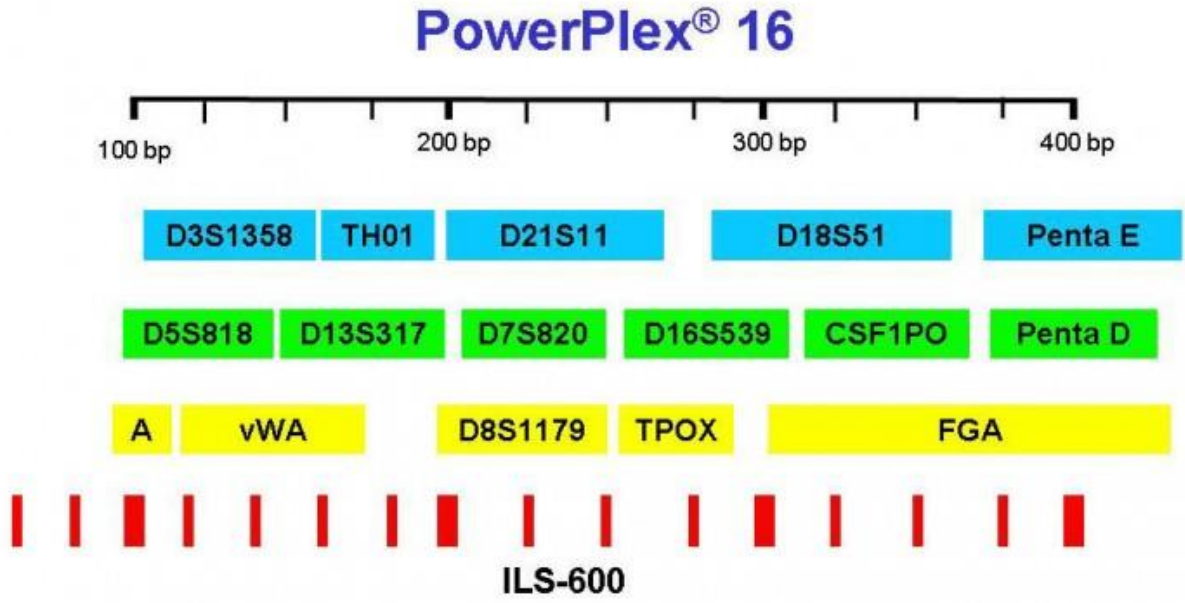
FBI, 1997 yılında ilk defa kullanmaya başladığı CODIS Sistemindeki 13 ana STR lokusuna ilave STR'ler ekleyerek genişlettiğini ve 1 Ocak 2017'den itibaren CODIS Temel Lokus Çalışma Grubu tarafından 13 STR bölgesine yedi yeni STR lokusunun eklendiğini duyurmuştur (22). CODIS tarafından oluşturulan bu 20 STR bölgesi kimliklendirme çalışmalarında çok daha güçlü bir ayırım gücü sağlamakta olup aynı zamanda kayıp kişilerin araştırılması için başvuru alan akrabalık analizlerini de geliştirmektedir. Bu STR bölgelerinin birçoğu tüm dünyada veri tabanlarına ilave edildiği için, genişletilmiş 20 ana bölge STR seti uluslararası çapta kolluk kuvvetleri ve terörle mücadele çalışmalarında çok büyük kolaylıklar sağlamaktadır. 20 STR lokusu (D3S1358,

D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 ve D22S1045) GlobalFiler® (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) ve PowerPlex® Fusion™ (Promega Corporation, Madison, WI) multipleks DNA kimliklendirme kitleri içermektedir. GlobalFiler® kiti (Şekil 10) 20 STR bölgesine ilaveten Amelogenin, SE33, DYS391 ve Y indel lokuslarını, PowerPlex® Fusion™ kiti (Şekil 9) ise 20 bölgeye ilaveten Amelogenin, Penta D, Penta E ve DYS391 bölgelerini de çalışarak multipleks içerisindeki toplam bölge sayısını 24'e çıkarmışlardır (23).

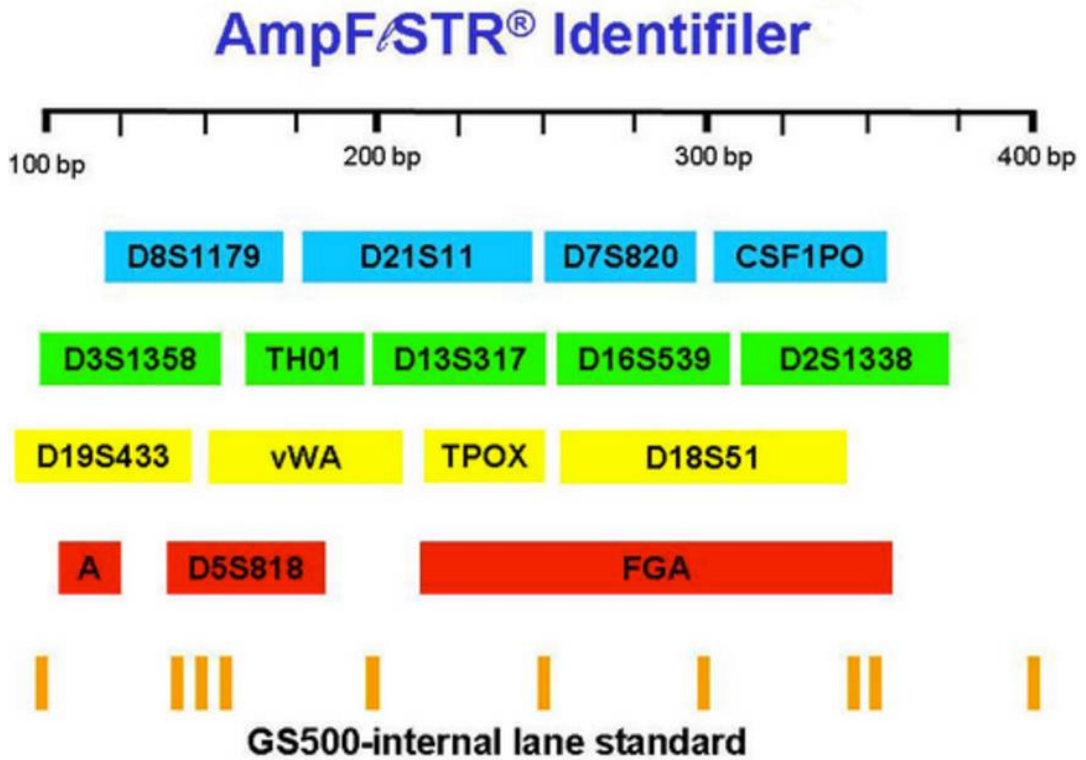
Son dönemlerde yeni nesil teknolojiler kullanarak STR, SNP, mitokondrial DNA, X ve Y kromozom polimorfizmlerini de tek bir iş akışında çalışılabilir. NGS teknolojisi sayesinde suç mahallerinden toplanan biyolojik kanıt örnekleri çalışılarak aynı anda çok çeşitli bilgiler edinilebilir. NGS teknolojisinin uygulanmasıyla, STR'ler, SNP'ler, cinsiyet kromozomları, mitokondrial DNA gibi epigenetik bilgilerin yanı sıra, olay yerinden toplanan biyolojik örneklerden eş zamanlı olarak birden fazla sonuç elde edilebilir. Tüm bilgileri birleştirerek, kanıt örneklerin fiziksel, psikolojik ve coğrafi özelliklerinin çıkarılması için de kullanılabilir (Şekil 6) (24).



Şekil 6. Olay yerinden elde edilen delillerin NGS teknolojisi ile çalışılmasıyla çok sayıda farklı bilgi aynı anda elde edilerek geniş kapsamlı bilgilere ulaşılabilir (25)



Şekil 7. Promega firmasının 16 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (29)



Şekil 8. Thermo firmasının 16 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (21)

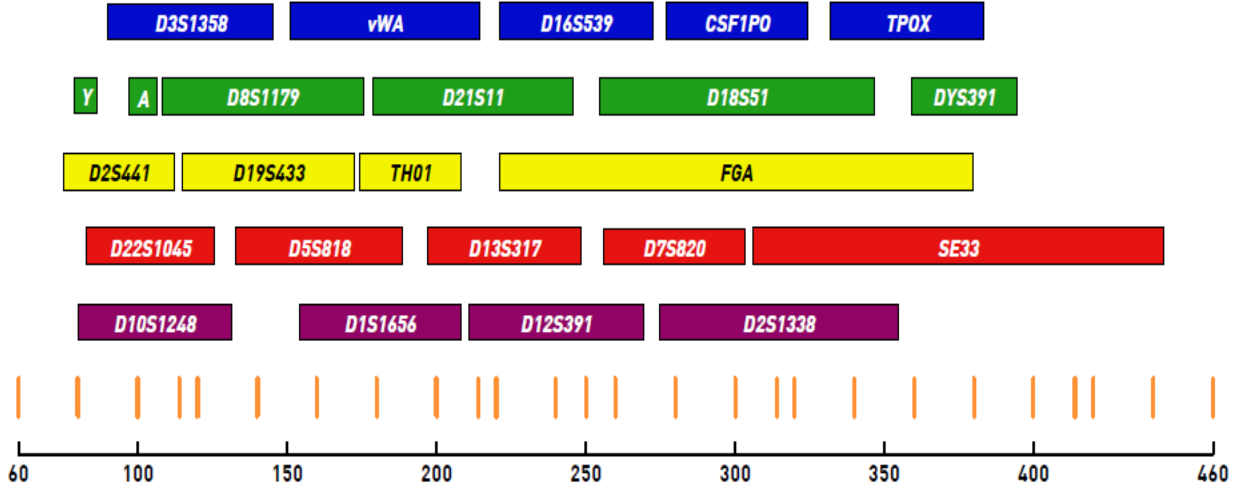
PowerPlex® Fusion System



*Amelogenin

Şekil 9. Promega firmasının 24 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (30)

Globalfiler / Globalfiler Express



Şekil 10. Thermo firmasının 24 lokuslu DNA Kimliklendirme Kiti (31)

2.6. STR Kitlerin Gelişimi

1990 yılında ilk STR lokusunun keşfinden sonra ilerleyen yıllarda yeni STR lokuslarının keşfi yapılmış ve bu lokusların adli ya da adli olmayan amaçlı DNA kimliklendirmesine yönelik ticari STR kitleri geliştirilmiştir (Tablo 2).

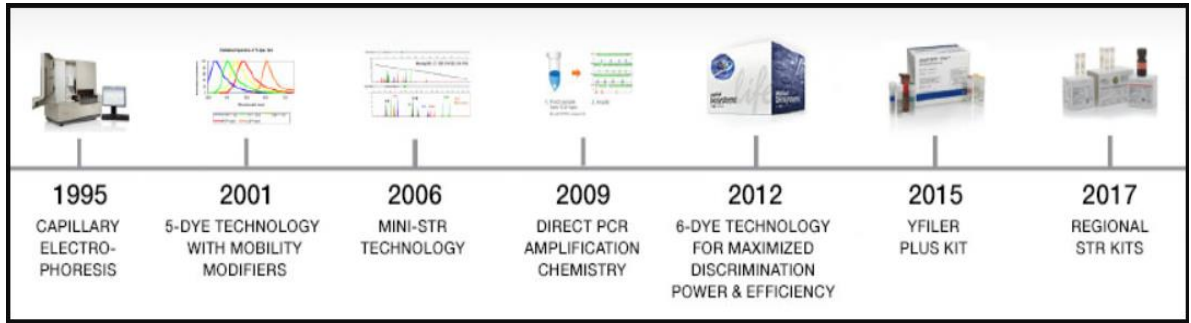
Tablo II. STR sistemlerinin ve kitlerinin yıllar içindeki gelişimi

İlk STR lokusunun keşfi	1990
STR lokuslarının kapiller elektroforez ile analizi	1992
STR ile ilgili ilk DNA bankası (İngiltere)	1995
Florasana işaretli ilk multipleks sistemin geliştirilmesi	1996
CODIS (Combined DNA Index System- Birleşik DNA İndeks Sistemi)	1998
16'lı multipleks Y-STR, X-STR lokuslarının geliştirilmesi	2000-2006
Mini-STRlerin geliştirilmesi ve 20-25 multiplex kitlerin üretilmesi	2007-Günümüz

1990'ların ortalarında Promega firması gümüş boyama tekniği ile çalışan 3 lokuslu ilk STR kitini geliştirmiştir (51). Teknolojinin gelişmesi ve kapiller elektroforezin (Şekil 11) genetik laboratuvarlarında kullanılmaya başlamasıyla aynı anda 16 STR lokusunun birlikte çalışılabildiği multipleks sistemler üretilmeye başlandı (Promega, Applied Biosystems). Bu sistemler STR lokuslarının ayrımını ampikon boyutuna ve 4 ayrı floresan boyanın benzer boydaki ampikonları ayırabilme kabiliyetine göre çalışmaktadır (Şekil 9, 10).

Multipleks STR kitlerinin yüksek ayırım gücü sayesinde diğer polimorfik bölgelere gerek kalmadan babalık tayini ve DNA kimliklendirme testleri yaygın olarak yapılabilir hale gelmiştir. Multipleks STR kitlerindeki en büyük sıkıntı bozulmuş örneklerden DNA tiplenişi yapılırken büyük ampikonlardan yetersiz ya da hiç sonuç alınamamasıydı. Olay yerinden gelen beklenmiş, az miktarda ve bozulmuş örneklerde DNA kalitesinin zayıflamasıyla birlikte başarılı DNA profili elde edilememektedir. DNA degradasyonu,

TaqDNA polimerazın etkinliğini ve primerlerin bağlanma kabiliyetini azaltarak PZR amplifikasyon verimliliğini de etkilemektedir. Bu sorunlar daha çok uzun ampliconlara sahip bazı STR lokuslarında (CSF1PO, D18S51, FGA ve D2S1138) ortaya çıkmaktadır (61). Bu sorunların çözümü için alternatif genetik işaretler geliştirilmiştir (32). Bugüne kadar PZR verimliliğini iyileştirmeye yönelik en iyi yaklaşım, primerleri STR bölgesine mümkün olduğunca yakın bir şekilde yeniden konumlandırarak daha kısa ampliconlar üretmektir. Bu primerler, mini-STR olarak adlandırılan daha kısa ampliconlar oluşturarak amplifikasyon veriminin artırılmasını sağlayan, potansiyeli yüksek kalıp molekülleri oluşturur (17). Thermo Fisher, Promega ve Qiagen gibi bu alanda kitler üreten firmalar mevcut kitlere mini-STR lokuslarını da ekleyerek aynı multiplekste çalışılan STR sayısını 24'e kadar çıkardılar. Bu şekilde hem kitlerin ayırım gücünü arttırdılar hem de bozunmuş örneklerde DNA tiplemesini daha başarılı bir şekilde yapılabilir hale getirdiler (Şekil 9, 10). 1996'dan günümüze kadar 45-50 civarında multipleks STR kiti üretilmiştir (Tablo 3) (33) (34).



Şekil 11. Kapiller elektroforez ve STR teknolojisinin gelişimi (35)

Tablo III. Applied Biosystem, Promega ve Qiagen firmalarının yıllar içinde ürettiği STR kitleri

Applied Biosystems (18)	Promega Corporation (17)	Qiagen (10)
AmpFISTR Blue (1996)	PowerPlex 1.1 (1997)	ESSplex
AmpFISTR Green I (1997)	PowerPlex 1.2 (1998)	ESSplex SE
Profiler (1997)	PowerPlex 2.1 (1999)	Decaplex SE
Profiler Plus (1997)	PowerPlex 16 (2000)	IDplex
COfiler (1998)	PowerPlex ES (2002)	Nonaplex ESS
SGM Plus (1999)	PowerPlex Y (2003)	Hexaplex ESS
Identifiler (2001)	PowerPlex S5 (2007)	HDplex
Profiler Plus ID (2001)	PowerPlex 16 HS (2009)	Triplex AFS QS
SEfiler (2002)	PowerPlex ESX 16 (2009)	Triplex DSF
Yfiler (2004)	PowerPlex ESX 17 (2009)	Argus X-12
MiniFiler (2007)	PowerPlex ESI 16 (2009)	
SEfiler Plus (2007)	PowerPlex ESI 17 (2009)	
Sinofiler (2008) – Sadece Çin	PowerPlex CS7 (2009)	
Identifiler Direct (2009)	PowerPlex 18D (2011)	
NGM (2009)	PowerPlex Y23 (2012)	
Identifiler Plus (2010)	PowerPlex 21 (2012)	
NGM SElect (2010)	Promega Corporation (17)	
GlobalFiler (2012)	PowerPlex 1.1 (1997)	
	PowerPlex 1.2 (1998)	

Günümüze gelindiğinde, kapiller elektroforez sistemine ciddi alternatif olarak gözüken ve NGS (Next Generation Sequencing/Yeni Nesil Dizileme) teknolojisi kullanılarak üretilen DNA kimliklendirme kiti karşımıza çıkmaktadır. Bu kit STR ve SNP lokuslarını aynı anda çalışabilmektedir. Kit 29 otozomal STR lokusunu, 24 Y-STR lokusunu ve 9 X-STR

lokusunu, 86 kimliklendirme SNP lokusunu, 22 fenotip belirleyen SNP lokusunu ve 56 biyocoğrafik soya ait SNP lokusunu bir arada çalışabilmektedir (ForenSeq DNA Signature Prep Kit) (36).

2.7. Kapiller Elektroforez

Kapiller elektroforez (CE), iletken bir çözelti içindeki parçacıkların veya moleküllerin; elektroforetik hareket kabiliyeti, moleküler boyut farklılığı ve faz ayırımına bağlı olarak göç etmesine dayalı bir ayırma tekniğidir (Şekil 12). Kapiller elektroforezde ayırma işlemi, iç çapı 50-100 mm olan bir kapiller içerisinde gerçekleşir. Kapiller elektroforez sistemi çok yönlü bir teknik olup adli toksikoloji, kişisel kimliklendirme, silah atış artıkları ve patlayıcı kalıntılarının analizi, mürekkep analizi vb. adli uygulamalar ile DNA analizinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

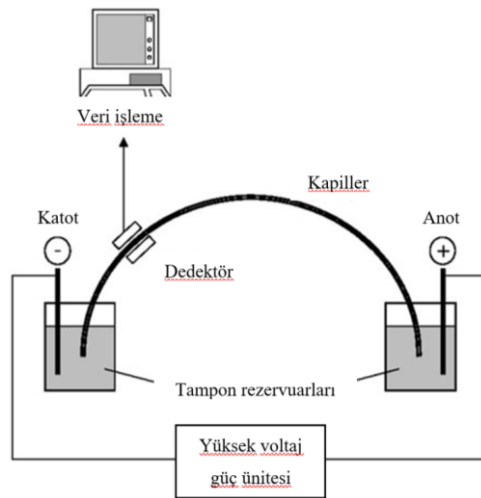
Kapiller elektroforez sisteminde DNA'nın ayırımını etkileyen faktörler; örneğin enjeksiyonu, kullanılan polimerler, elektroforez tamponu çözeltisi ve uygulanan alan şiddetidir.

Kapiller elektroforezde, DNA örneğinin kapillere alınması elektrokinetik enjeksiyonla yapılmaktadır. DNA negatif yüklü olduğundan, DNA moleküllerini kapiller içerisine almak için pozitif bir voltaj uygulanır (37).

Biyolojik moleküller için ayırma matrisi düşük bir viskoziteye sahip, kolay değiştirilebilen, klasik jeller ile aynı ayırma özelliklerine sahip optimize bir polimerdir. Bu polimerlerden POP-4, STR tiplmesi dahil olmak üzere DNA fragman analizi için kullanılırken, daha yüksek bir konsantrasyonda olan ve daha çok DNA sekanslamasında kullanılan POP-6 polimeri tercih edilmektedir. Ayırıcı ortam olarak kullanılan vizkoz polimerde, jel elektroforezinde olduğu gibi negatif yüklü DNA molekülleri pozitif elektroda doğru hareket ederler. Büyük olan DNA molekülleri daha yavaş hareket

ederken daha küçük DNA fragmanları ise hızlı hareket ederler. Sonuçta boyut farklılıklarına dayalı ayırım gerçekleştirilir. Kapiler elektroforezde kullanılan tampon çözeltisi, DNA'yı stabilize eder ve polimerin çözünmesini sağlar. Aynı zamanda elektroforetik akım için yük taşıyıcıları sağladığı ve enjeksiyonu iyileştirdiği için de oldukça önemlidir. Eğer tampon çözeltisinin konsantrasyonu ve beraberinde süregelen iletkenlik çok yüksek olursa, kapiler aşırı ısınacak ve çözünürlük kaybı yaşanacaktır. Tampon iyonlarının göçü ve elektrolizi nedeniyle anod ve katod tampon çözeltileri değişikliğe uğrayabilir bu yüzden kullanılan tampon periyodik olarak değiştirilmelidir. (38).

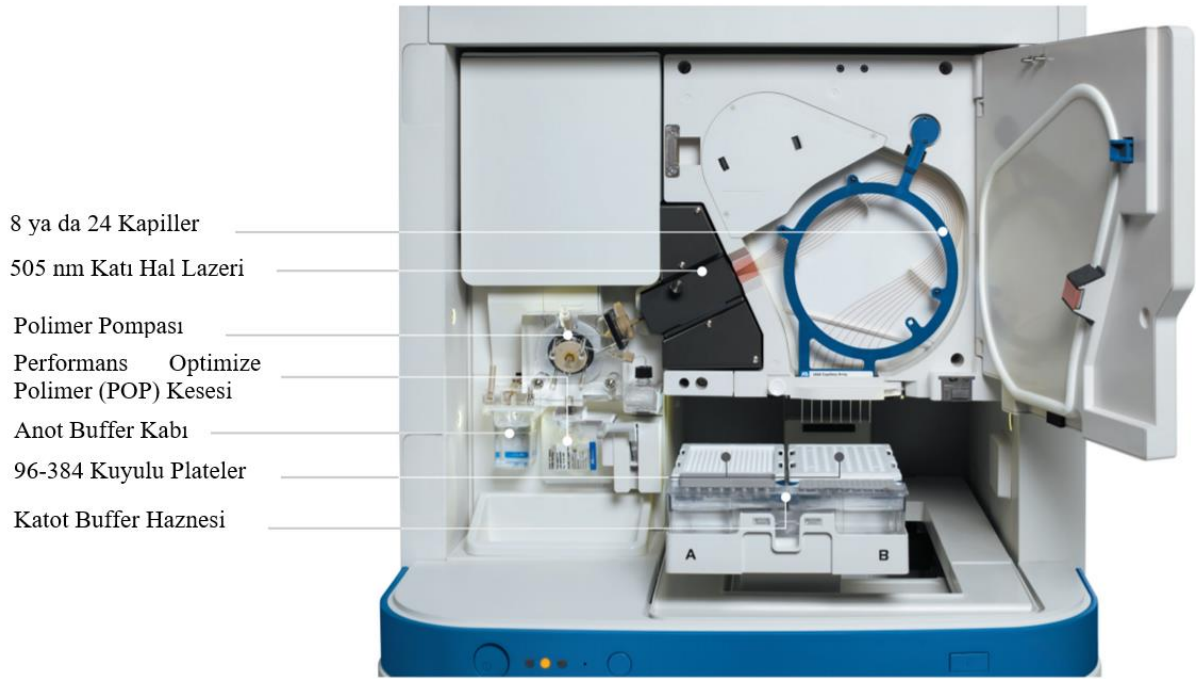
Adli tıp uygulamalarında kapiler elektroforez özellikle DNA dizi ve fragman analizlerinde kullanılmaktadır. STR/PCR ürünleri floresana duyarlı lazer dedektör tarafından taranarak işaretli oldukları floresan boyanın dalga boyuna ve STR büyüklüklerine göre analiz edillirler (5) Amplifiye PCR ürünleri bir lazer ışını ile uyarılırlar. Geliştirilmiş veri toplama yazılımları sayesinde hızlı şekilde görüntülerin aktarımı yapılır, veriler analiz edilir, sonuçlar dijital ortamda toplanır Bunun için özel tasarlanmış yazılımlar kullanılarak değerlendirme yapılır (39).



Şekil 12. Kapiler elektroforez şematik gösterim (40)

Kapiller elektroforezin jel elektroforezine göre hem avantajları hem de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Kapiller elektroforezin en önemli avantajı enjeksiyon, ayırma, görüntüleme adımlarının tamamen otomatize bir şekilde yapılmasıdır. Bu sayede çoklu örneklerin kolaylıkla çalışılmasını mümkün hale getirmektedir. Başka bir avantajı ise, enjeksiyon için çok az miktarda örneğin kullanılması yeterli olduğundan örneklerin tekrar çalışılması gerektiğinde geride bol miktarda tekrar örneğinin kalmasıdır. Diğer bir avantajı ise, kapiller elektroforezde uygulanan gerilim jel elektroforezindekinden 10 ila 100 kat daha güçlü olduğundan daha kısa sürede sonuç elde edilir ve ayırım çok kısa bir süre içinde gerçekleştirilebilir. Yine bir başka avantajı ise, cihazdan elde edilen sayısal ve görsel verilerin elektronik formatta arşivlenecek şekilde tasarlanmış olmasıdır. Jel elektroforezinde olduğu gibi tarama veya fotoğraflama gibi ilave adımlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Son olarak, çalışılan örnekler kapillerin içinde yürüdüğünden diğer örneklerden çapraz kontaminasyon riski bulunmamaktadır.

Kapiller elektroforez sisteminin en önemli dezavantajı çoklu numunelerin belirli sürede yürütülme zorunluluğudur. Tek kapillerli sistemlerde, aynı anda sadece bir örnek çalışılıp bir sonraki örneğin ancak ilk çalışma bittikten sonra çalışılabileceğinden, tek seferde birçok örneğin çalışabildiği jel sistemlerine nispeten yetersiz kalabilmektedir. Fakat teknolojinin gelilmesiyle birlikte çok kapillerli cihazlar üretilmiş ve bu sorun ortadan kalkmıştır. Kapiller sistemlerin en önemli dezavantajı ise kurulum ve işletme maliyetlerinin oldukça yüksek olmasıdır. Fakat bilgisayarla kontrol edilebilen otomatize ve pratik bir sistem oluşu nedeniyle neredeyse tüm adli laboratuvarlarda kapiller elektroforez sistemleri tercih edilmektedir (Şekil 13) (41).



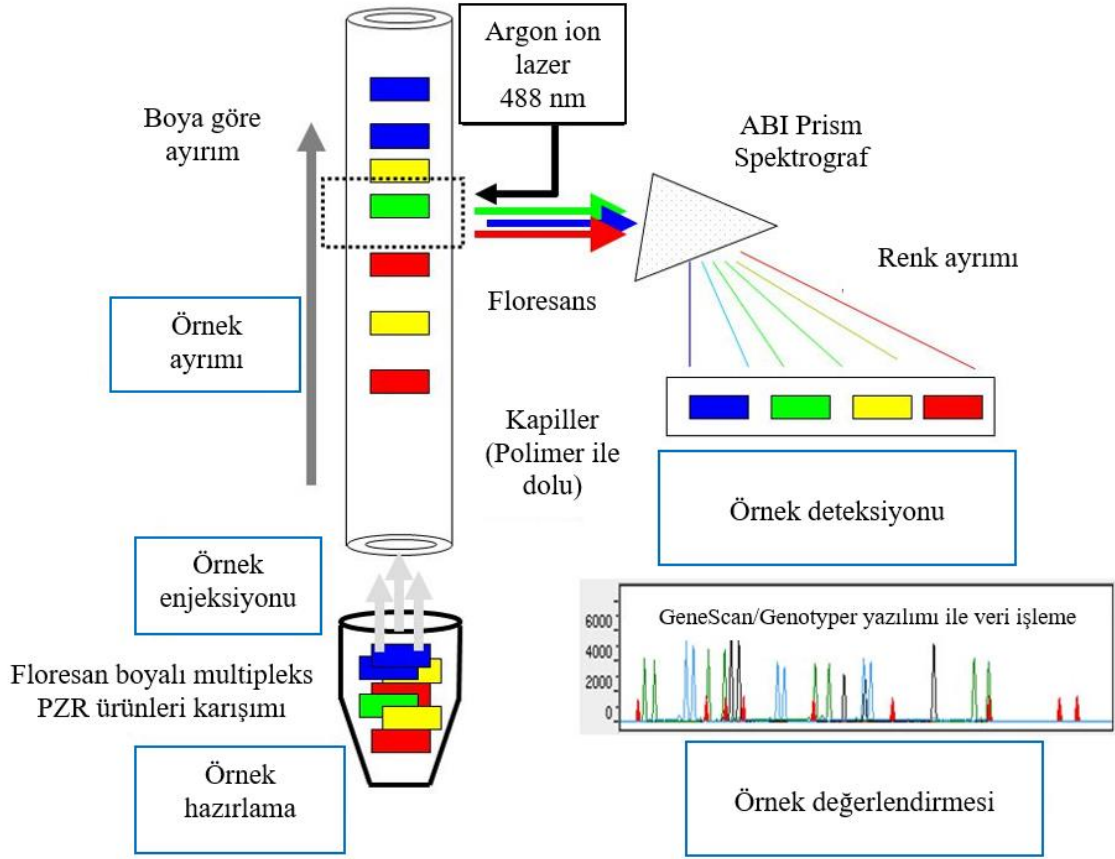
Şekil 13. ABI 3500 Kapiller Elektroforez Genetik Analizörü (42)

2.7.1. Kapiller elektroforezde sonuçların değerlendirilmesi

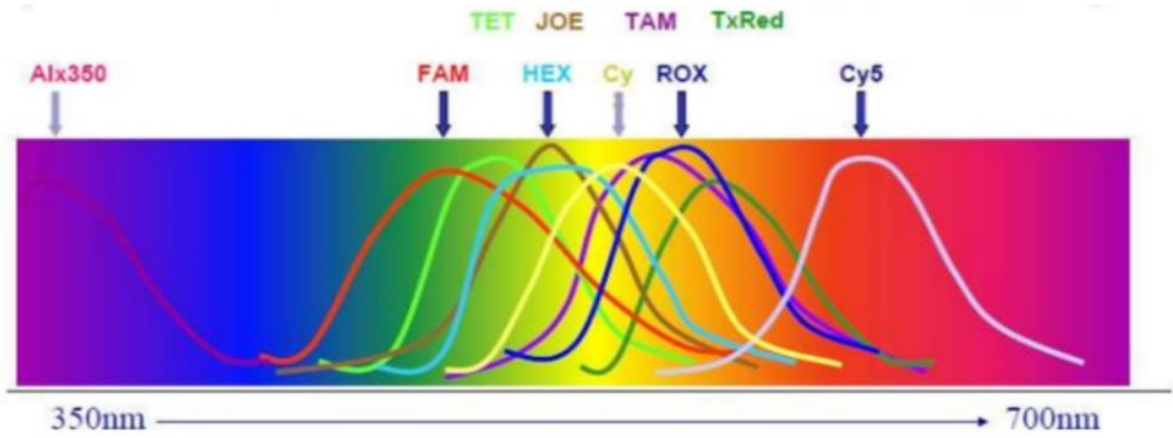
Elektroforez sırasında, floresan boyayla işaretli DNA, lazer ışığının bulunduğu pencereden geçerken uyarılır (39). Uyarılan floresan boya kendine özgü karakteristik dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık detektör tarafından algılanır ve kaydedilir (53). Kaydedilen bu veriler özel olarak dizayn edilen yazılımlar (GeneScan™ ve GeneMapper®) kullanılarak değerlendirilir ve elektroforez görüntüsü olarak bilgisayar ekranına aktarılır (Şekil 14) (38).

Floresan boyaların maksimum ışımaya yaptığı farklı dalga boyları vardır. Işıma yapan floresan boya CCD kamerasından geçer ve her renk kendi dalga boyuna göre ayrılır. Her bir STR lokusuna ait primer 4-5 renkte farklı dalga boyuna sahip floresan boya ile işaretlenir. Böylece benzer büyüklükteki STR lokuslarına ait sinyalleri birbirleri üzerine

çakışmalar bile farklı renkleri sayesinde rahatlıkla ayırt edilmeleri ve analiz edilmeleri mümkün hale gelir (Şekil 15) (37).

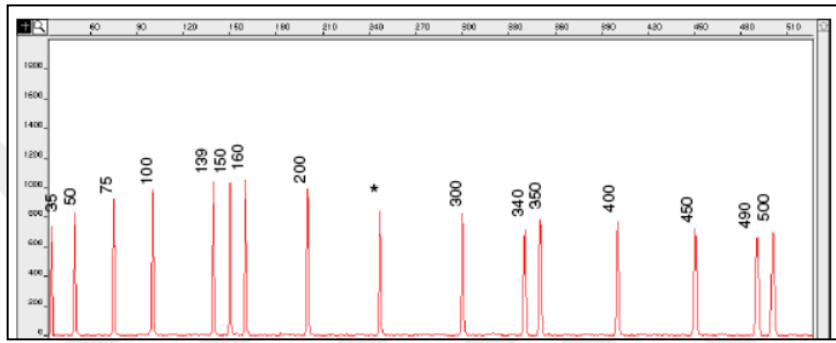


Şekil 14. Kapiller Elektroforez sisteminde floresan işaretli PZR ürünlerinin ayrımı (25)

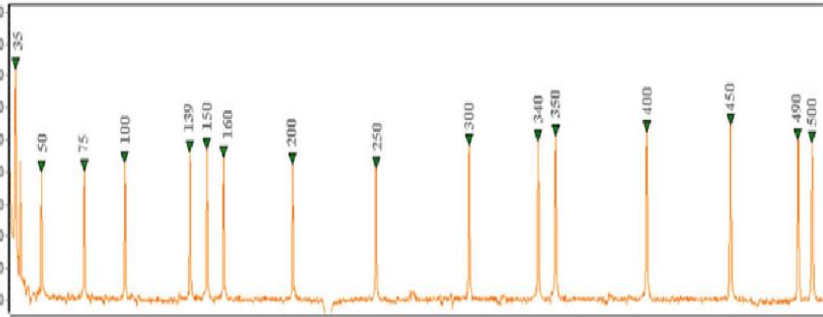


Şekil 15. STR Primerlerinin işaretlenmesinde kullanılan floresan boyalar ve emisyon spektrumları (43)

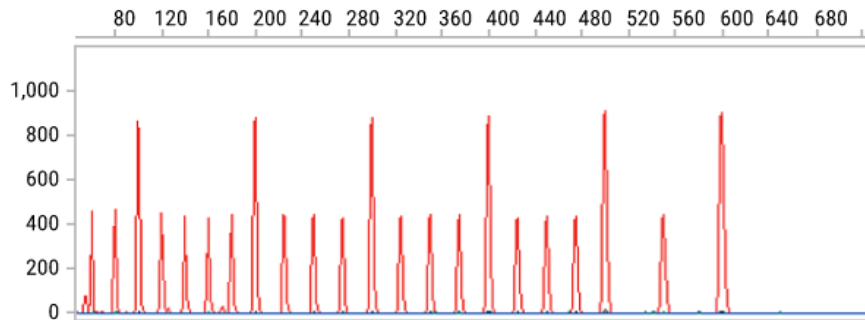
Elektroforez tamamlandıktan sonra STR sinyallerinin değerlendirilmesi, GeneScan®, GeneMapper™ ID veya GenoTyper® gibi yazılımlar kullanılarak yapılır. PCR ürünlerinin bç (baz çifti) cinsinden boyları internal size standart kullanılarak tespit edilir. Bu standart, belli boylardaki floresanla işaretlenmiş sentetik DNA parçacıklarıdır. Örnek internal size standartları Thermo Fisher Scientific firmasının ROX™, LIZ™ ve GeneScan™ 500 standardı ve Promega'nın ILS600 standardıdır (Şekil 16, 17,18).



Şekil 16. ROX™ 500 Size Standard (44)



Şekil 17. LIZ™ 500 Size Standard (45)



Şekil 18. ILS600 Size Standard (46)

3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışmasında adli bilimlerde, akarabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve kimliklendirmede ülkemizde ve dünyada yaygın bir şekilde kullanılan 17 STR lokusu (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, D10S1248, D14S1434) ve Amelogenin primer dizaynı yapılarak bir multiplekste (tek reaksiyonda) 18pleks olarak çoğaltıldı ve optimizasyon çalışmaları yapıldı. Multipleks sistemin optimizasyon çalışmalarında 9947A kontrol DNA'sı kullanıldı (AmpFISTR® Control DNA). Çalışma Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Derin Dondurucu (Vestel FT-145)
- Buzdolabı (Uğur USD372DTKSD)
- Otomatik Pipet (2,5 µl) (20 µl) (100 µl) (1000µl) (Eppendorf)
- Vorteks (Lab Dancer so40)
- Santrifüj (Quick spin QS7000)
- Isı Döngü Cihazı (Bio-Rad 621BR24387)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 3130 (ABI PRISM®3130) (Life Technologies)

3.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- POP-7 TM polimer (ThermoFisher Scientific)

- Hi-Di TM Formamide
- TBE Buffer (Tris-borate-EDTA) (10X)
- 10x Running Buffer
- Taq DNA Polimeraz
- 500 LIZ Size Standard
- dNTP Set
- MgCl₂
- 10x Taq Buffer + (NH₄)₂SO₄

3.3. Çalışma Planı

Laboratuvar çalışmaları 6 aşamalı olarak planlanmıştır.

- Örnek Toplama
- DNA İzolasyonu
- DNA Miktarı ve Kalite Tayini
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
- PCR ürünlerinin kapiler elektroforez cihazına yüklenmesi
- Elektroforez sonrası elde edilen verilerin genetik analizi

3.4. Örnek Toplama

Çalışma için araştırmaya rıza gösteren 15 kişiye ait periferik akan örnekleri 2ml EDTA'lı tüplere alındı ve Moleküler Genetik Laboratuvarları'nda EDTA'lı tüplerde kontamine olmayacak koşullarda -20 derecede saklandı.

3.5. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, 10.01.2014 tarihli ve 83045809/879 sayılı etik kurul kararı doğrultusunda araştırmaya rıza gösteren 15 kişinin periferik kan örneklerinden yapılmıştır. İzolasyon silika temelli QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) ticari kiti kullanılarak yapıldı. İzolasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.

1. 200 µl'lik EDTA'lı kan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 10 µl Proteinaz K ve 200 µl ATL tamponundan eklenerek 15 saniye karıştırıldı.
3. 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. 200 µl %96-100'lük etanol eklendi ve 20 saniye vortekslendi. Vorteksdan sonra QIAamp® mini spin kolonu 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 5. adımda elde edilen karışım, 2 ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mini kolona aktarıldı ve tüpün kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
5. QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW1 eklendi ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
6. QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
7. QIAamp® mini spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 50 µl elüsyon tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Elde edilen DNA özütleri kısa süreli kullanım için +4°C'ye, uzun süreli saklamak için -20°C'ye kaldırıldı.

3.6. DNA Miktarı ve Kalite Tayini

İzolasyonu yapılmış örneklerin DNA miktarları NanoDrop 2000/2000c 1.3.1 spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. DNA örneklerinin 260nm, 280nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi ile birlikte 260nm/280nm ve 260nm/230nm oranları elde edilerek kalite tayini yapıldı.

1. NanoDrop yazılımı açıldıktan sonra ölçüm için nükleik asit programı seçildi.
2. DNA ölçümü yapılmadan önce 1,5 µl referans çözelti pedestal üstüne eklenerek spektrofotometrenin ölçeği sıfırlandı.
3. 1,5 µl DNA örneğini pedestal üzerine ekledikten sonra cihazın kolu kapatıldı ve örnek numarası sisteme girildi.
4. Absorbans değerleri, DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı
5. Cihazda görülen grafikler kontrol edildi ve DNA miktarları not edildi.
6. Miktar ölçümü yapılan örnekler PCR için distile su ile 2.5 ng/µl DNA konsantrasyon aralığında olacak şekilde sulandırıldı.

3.7. STR Lokus Seçimi ve Karakterizasyonu

17 STR bölgesi ve cinsiyet lokusu olan Amelogenin ile beraber toplamda 18 bölgeden oluşan STR sistemi, literatür araştırması, mevcut ticari kitlerin içerikleri ve CODIS STR bilgisi kullanılarak oluşturuldu (Tablo 4). Sistemin ayırım gücü ile beraber bozunmuş örneklerde çalışma kabiliyetini de arttırmak ve diğer STR sistemlerinden farklılaştırmak amacıyla 2 adet mini-STR lokusu (D10S1248, D14S1434) dahil edilmiştir. Bu mini-STR

lokus bölgelerinin heterozigotluklarının yüksek olması, ayırım güçlerinin yüksek olması ve farklı popülasyonlarda da çalışılmış olduğundan bu tez çalışmasındaki multipleks STR sistemine eklenmiştir.

Tablo IV. 17 STR lokusu ve Amelogenin GenBank verilerine göre karakterizasyonu

Lokus	Kromozom Bölgesi	Fiziksel Konum (Mb)	Tekrar Motifi	Floresan Boya	CODIS
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	Kromozom X:11.316 Kromozom Y:6.736	-	6-FAM	+
CSF1PO	5q33.1	Kromozom5:149.455	(AGAT)	NED	+
D7S820	7q21.11	Kromozom7:83.789	(GATA)	NED	+
TPOX	2p25.3	Kromozom2:1.493	(AATG)	6-FAM	+
D18S51	18q21.33	Kromozom18:60.949	(AGAA)	VIC	+
D2S1338	2q35	Kromozom2:218.879	(TGCC)/(TTCC)	NED	-
D13S317	13q31.1	Kromozom13:82.722	(TATC)	VIC	+
FGA	4q28	Kromozom4:155.509	(TTTC)/(CTTT)/(TTCC)	6-FAM	+
D5S818	5q23.2	Kromozom5:123.1111	(AGAT)	PET	+
D21S11	21q21.1	Kromozom21:20.554	(TCTA)/(TCTG)	PET	+
D16S539	16q24.1	Kromozom16:86.386	(GATA)	VIC	+
D8S1179	8q24.13	Kromozom 8:125.976	(TCTA)/(TCTG)	6-FAM	+
vWA	12p13.31	Kromozom12:5.963	(TCTA)/(TCTG)	VIC	+
D3S1358	3p21.31	Kromozom3:45.557	(TCTA)/(TCTG)	NED	+
TH01	11p15.5	Kromozom11:2.149	(AATG)	PET	+
D10S1248	10q26.3	Kromozom10:130.566	(GGAA)	NED	-
D14S1434	14q32.13	Kromozom14:93.298	(CTGT) _n (CTAT) _n	PET	-
D19S433	19q12-13.1	Kromozom19:35.109	(AAGG)/(AAAG)/(TAGG)	6-FAM	-

3.8. STR Lokuslarının Primer Dizaynı

18 lokuslu STR kitinde çalışılacak lokusların amplifikasyonu için primer dizaynı yapılırken, 4 farklı boya (6-FAM, VIC, PET, NED) kullanılması ve küçükten büyüğe farklı boylarda ampikonlar elde edilmesi ve bu lokusların üst üste aynı boyada

çakışmaması düşüncesinden hareketle dizaynlar yapıldı. STR bölgelerine ait dizilerin elde edilmesi için GRCh38.p12 primary assembly ve ENSEMBL genom tarayıcısından yararlanıldı. Her bir lokusun muhtemel ampikon boy aralığı hesaplanırken https://strbase.nist.gov/str_fact.htm'de yer alan her bir alleldeki tekrar dizilerini ve tekrar sayısını gösteren tablodan yararlanıldı (Tablo 5).

Tablo V. TH01 STR lokusunun alel numaraları ve her bir alleldeki tekrar dizilerinin yapısı ve sayısı

Allel (tekrar numarası)	Tekrar yapısı
3	(AATG) ₃
4	(AATG) ₄
5	(AATG) ₅
6	(AATG) ₆
6.3	(AATG) ₃ ATG(AATG) ₃
7	(AATG) ₇
8	(AATG) ₈
8.3	(AATG) ₅ ATG(AATG) ₃
9	(AATG) ₉
9.3	(AATG) ₆ ATG(AATG) ₃
10	(AATG) ₁₀
10.3	(AATG) ₆ ATG(AATG) ₄
11	(AATG) ₁₁
12	(AATG) ₁₂
13.3	(AATG)(AACT)(AATG) ₈ ATG(AATG) ₃

Buna göre, her bir STR lokusu için tabloda verilen bir alel seçildi ve bu aleldeki tekrar dizisi ENSEMBL'dan elde edilen diziye yerleştirildi. Bu sayede, dizayn sonrasında ilgili STR lokusunun minimum ve maximum alleldeki tekrar dizilerinin sayısı ve boyu gözönünde bulundurularak STR lokusunun en kısa ve en uzun boyları (baz çifti) tespit edilmiş oldu. Böylelikle her bir floresan boya için en küçükten en büyüğe STR lokus sıralaması yapıldı (Tablo 6).

Primerlerin dizaynı için PrimerExpress 2.0 programından yararlanıldı. Forward ve Revers primerler seçilirken ortalama 18-25 bp aralığında olmalarına, primer erime sıcaklıklarının

(Tm) birbirinden en fazla 3°C az ya da fazla olmasına, primer GC (Guanin, Sitozin) içeriğinin %40-%60 aralığında olmasına, her bir primerin mümkün olduğu kadar C (Sitozin) ya da G (Guanin) bazı ile bitmesine, primer dizisi içerisinde hatalı bağlanmalara neden olabileceğinden dörtten fazla baz tekrarı ya da dinükleotid tekrarı olmamasına, primer dizisi içerisinde, primerin düğüm yapmasına neden olan üçten fazla birbirine komplementer baz dizisi olmamasına dikkat edildi. Primerlerin genomda istenilen spesifik bölgeye bağlanıp bağlanmadığının ve başka bölgelere özgün olmayan bağlanma yapıp yapmadığının kontrolü için GeneTools SNPCheck v3'den yararlanıldı.

Tablo VI. STR lokuslarında kullanılan boyalar ve her bir lokusun sıralaması

STR/Lokus No	STR/Lokus Adı	Kullanılan Floresan Boya	Amplikon boyuna göre ilgili boyadaki sırası
1	AMELOGENIN	6-FAM	1
2	D19S433	6-FAM	2
3	D8S1179	6-FAM	3
4	TPOX	6-FAM	4
5	FGA	6-FAM	5
6	D10S1248	NED	1
7	D3S1358	NED	2
8	D2S1338	NED	3
9	D7S820	NED	4
10	CSF1PO	NED	5
11	vWA	VIC	1
12	D13S317	VIC	2
13	D16S539	VIC	3
14	D18S51	VIC	4
15	D14S1434	PET	1
16	D5S818	PET	2
17	TH01	PET	3
18	D21S11	PET	4

3.9. DNA Amplifikasyonu

3.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bileşenlerinin hazırlanması

DNA örneklerinin amplifikasyonu için QIAGEN® Multiplex PCR Kiti kullanıldı. Kit içerisinde Multipleks PCR Master Mix ve RNase-Free Water bulunmaktadır. Multipleks PCR Master Mix ; HotStarTaq® DNA Polimeraz, Multipleks PCR Buffer, dNTP Miks içeriğinden oluşmaktadır.

Amplifikasyon öncesinde DNA örnekleri 0.1-2 ng aralığında olacak şekilde distile su ile seyreltildi. 2x QIAGEN Multipleks PCR Master Miks, -20 °C'den çıkartıldı ve PCR karışımı hazırlanana kadar buz kütlesi içinde bekletildi. Amplifikasyon bileşenleri her çalışmaya ait farklı oranlarda hazırlandı ve ependorf tüpünde baloncuk olmamasına özen gösterildi.

18 bölgenin amplifikasyonu, Bio-Rad T200 thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. PCR cihazının sıcaklık, döngü sayısı ve süreleri Tablo 7'de belirtilen şekilde ayarlandı. 24 saat içinde elektroforeze yüklenecek örnekler +4°C'ye, 24 saatten daha uzun süre sonra yüklenecek örnekler -20 °C'ye kaldırıldı.

Tablo VII. Tek pleks PCR Çalışma Protokolü

1.Aşama	2. Aşama - 28 Döngü			3.Aşama- Final Hold	
Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Final Uzaması	Bekleme
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4°C
11 dk	1 dk	1 dk	1 dk	60 dk	∞

3.9.2. Tek pleks PCR çalışması

İlk aşamada PCR reaksiyonu, 18 ayrı primer setinin (forward ve reverse) tek pleks olarak çalışılması ile tamamlandı. Tablo 7’de belirtilen PCR çalışma protokolü uygulandı. Tek pleks çalışması için önceden hazırlanan 10x Taq Buffer, MgCl₂, dNTP hazır set karışımından oluşan PCR Master Miks kullanıldı (Qiagen) (Tablo 8).

Tablo VIII. Tek pleks çalışmanın PCR bileşen miktarları

PCR Bileşenleri	Miktar
ddH ₂ O	19,4 µl
PCR Master Miks (dNTP MIX, 10x PCR Buffer, MgCl ₂)	4.2 µl
Primer	0.7 µl
Taq Polimeraz	0.2 µl
Kalıp DNA	0.5 µl
Toplam hacim	25 µl

3.9.3. Multipleks PCR çalışması

3.9.3.1. 9 Lokuslu Multipleks STR Panel Çalışması

Primerlerin fragman boyutları ve floresan boyları göz önünde bulundurularak 2 ayrı gruba bölündü. 9 primer setinin (forward/reverse) bir miks içerisinde bulunacağı şekilde primer miksi hazırlanarak, 2 ayrı multipleks PCR yapıldı. Miks 1 multipleks reaksiyonu içerisinde D18S51, D13S317, FGA, D5S818, D16S539, D8S1179, vWa, D10S1248, D14S1434 primerleri yer alırken; Miks 2 multipleks reaksiyonu içerisinde Amelogenin, CSF1PO, D7S820, TPOX, D2S1338, D21S11, D3S1358, THO1, D19S433 primerleri yer almaktadır. Multipleks çalışma için 2x QIAGEN Multipleks PCR Master Miks kullanıldı

ve son hacim 50 µl olarak PCR yapıldı. Tüm primer setleri (forward/reverse) için 0.7 µl kullanıldı (Tablo 9).

Tablo IX. İki ayrı multipleks çalışmanın PCR bileşen miktarları

PCR Bileşenleri	Miktar (Miks 1)	Miktar (Miks 2)
2xQIAGEN Multipleks PCR Master Miks	25 µl	25 µl
Primer Miks	6.3 µl	6.3 µl
Nuclease-free water	16,2 µl	16.2 µl
Kalıp DNA	2.5µl (0.1-2 ng/µl)	2.5µl(0.1-2ng/µl)
Toplam hacim	50 µl	50 µl

3.9.3.2. 18 Lokuslu Multipleks STR Panel Çalışması

9 lokuslu multipleks panel çalışmasından sonra tüm primerler tek bir PCR tüpü içerisinde aynı miktarda eklenerek 18 lokuslu multipleks olarak amplifiye edildi. Multipleks çalışma için 2x QIAGEN Multipleks PCR Master Miks kullanıldı ve son hacim 25 µl olacak şekilde PCR yapıldı. Tüm primer setleri (forward/reverse) 0.7 µl kullanıldı (Tablo 10).

Tablo X. İki ayrı multipleks çalışmanın PCR bileşen miktarları

PCR Bileşenleri	Multipleks
2xQIAGEN Multipleks PCR Master Miks	9.15 µl
Primer Miks	12,6 µl
Nuclease-free water	2 µl
Kalıp DNA	1,25 µl (0.1-2ng)
Toplam hacim	25 µl

3.10. Kapiler Elektroforez

Kapiler elektroforez aşamasında ABI PRISM® 3130xl Genetik Analizör analizör (16 kapiler) cihazı kullanıldı. Her bir DNA'nın amplifiye ürünü cihaza yüklenerek 18 lokusun genotipi elde edildi.

3.10.1. PCR ürünlerinin kapiler elektroforeze hazırlanması

1. PCR ürünleri, 3130xl genetik analizör cihazında Tablo 12'de belirtildiği şekilde üreticinin belirttiği (Applied Biosystems) koşullar baz alınarak yürütüldü.
2. Her bir örnek için GeneScan™ 500 LIZ® Size Standardı ve Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)'den oluşan karışım Tablo 11'de verilen hesaplamalara uygun şekilde hazırlandı. Her bir örnek için 8.7 µl Hi-Di formamid içine 0,3 µl 500 LIZ® Size Standard eklenerek karışım hazırlandı. Karışım kısa bir süre vortekslendikten sonra santrifüj edildi.

Tablo XI. PCR Ürünlerinin Kapiler Elektroforeze Hazırlanması

İçerik	Hacim(1 örnek için)
Hi-DI Formamide	8.7 µl
GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard	0,3 µl
Toplam	9 µl

3. MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate içindeki her bir kuyucuğa hazırlanan karışım 9 µl olacak şekilde dağıtıldı ve plate kuyucuğuna 1 µl PCR ürünü eklendi.
4. MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate uygun septa (koruyucu kapak) ile kapatıldı ve ürünlerin kuyucukların aşağıya inmesi için kısa bir süre santrifüj edildi.

5. Daha sonra PCR ürünlerinin denatüre olması için, Bio-rad T200 termal ısı döngü cihazına (PCR) yerleştirildi ve 95°C'de 5 dakikada bekletildi.
6. Bu işlemin ardından plate 5 dakika +4°C' de bekletildi.
7. Plate kapiler elektroforez cihazına yüklenmeden önce kısa süre spin edildi.
8. Hazırlanan örnekler ABI PRISM® 3130xl Genetik Analizör cihazına yüklendi ve elektroforez başlatıldı.

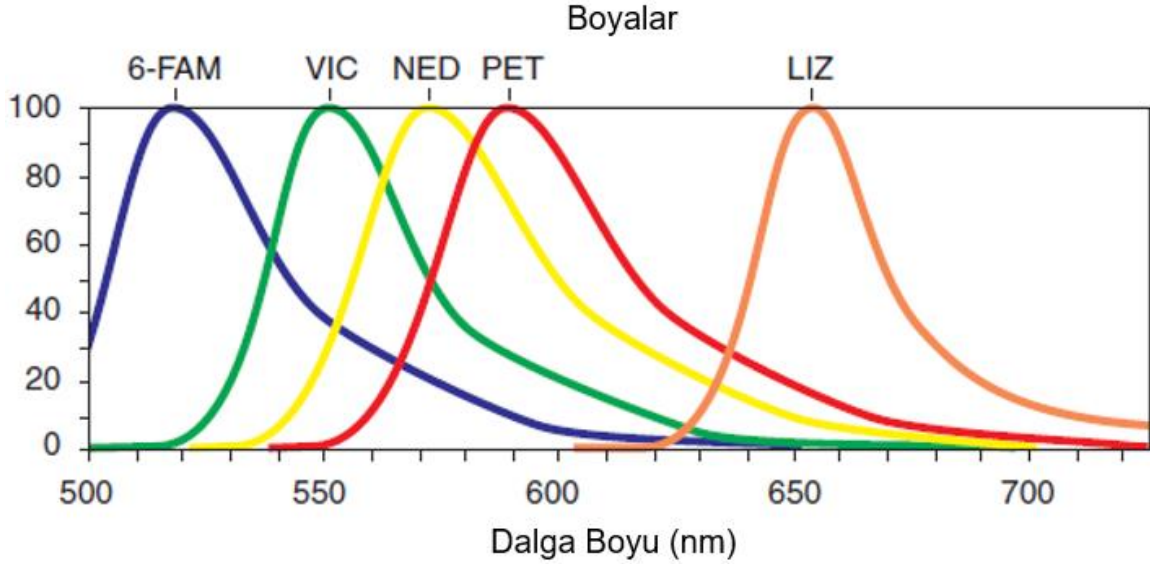
Tablo XII. 3130xl Genetik Analizörün Yürütme Modülleri ve Koşulları

Cihaz	3130xl
Sistem İşleyişi	Windows® xp
Veri Analiz Yazılımı	V3.0
Run modülü	HIDFragmentAnalysis36_POP4_1
İnjesiyon Şartı	3 kV/10 sn.
Matriks	Dye Set G5
Yürütme Zamanı	20 dk.
Yürütme Sıcaklığı	60°C

3.11. Genotip Veri Analizi

PCR ürünlerinin kapiler elektroforez cihazında analiz edebilebilmesi için Dye Set G5 (Thermo Fisher Scientific) adı verilen matriks standart kiti kullanıldı. Matriks standart kiti içerisinde beş floresan boya (6-FAM™, VIC®, NED™, PET®, and LIZ®) bulunmaktadır Şekil 19). Bu floresan boyaların her biri farklı dalga boylarında maksimum ışımaya yapmaktadır. 6-FAM™ boya en kısa dalga boyunda ışımaya yapar ve

mavi olarak görüntülenir, ardından VIC® boyası (yeşil), NED™ boyası (sarı) ve PET® boyası (kırmızı) görüntülenir. Turuncu renk veren LIZ® boyası ise internal size (boy/uzunluk) kontroldür.

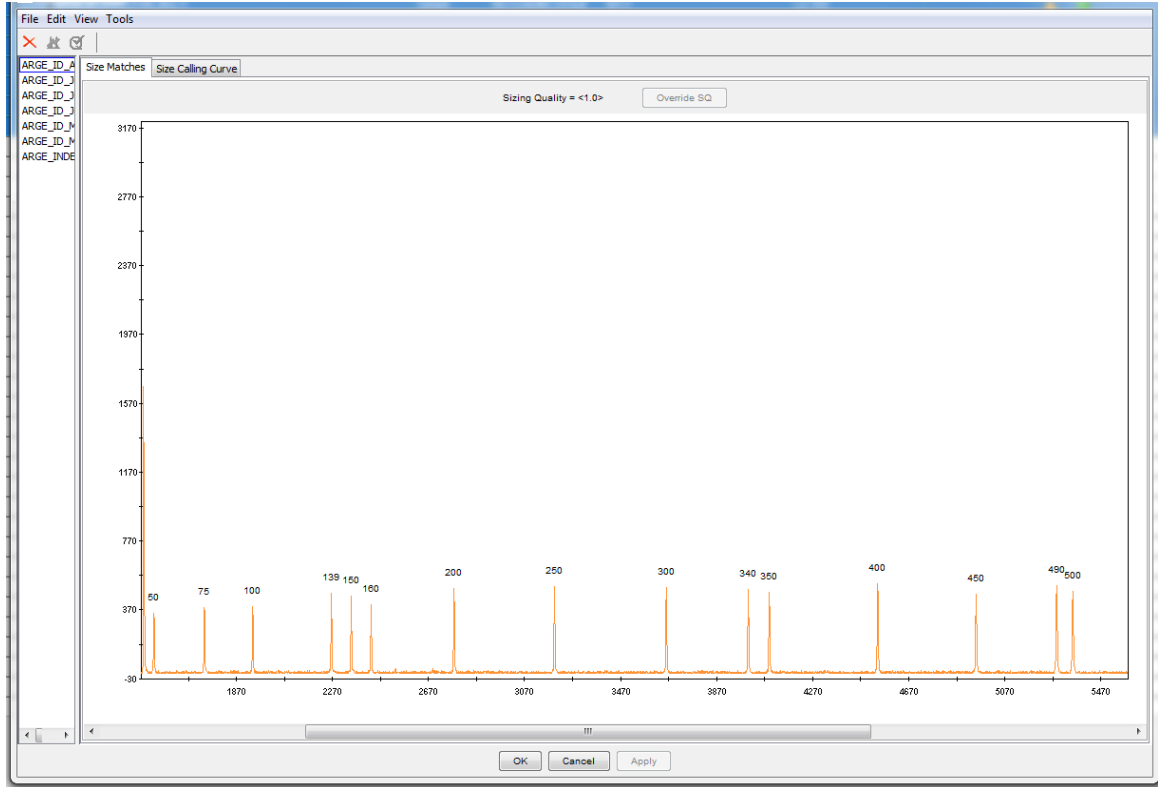


Şekil 19. Beş floresan boyanın emisyon spektrumları (21)

Mavi renk veren 6-FAM™ floresan boya; Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179, D19S433 STR lokuslarını, yeşil renk veren VIC® floresan boya; D18S51, D13S317, D16S539, vWa STR lokuslarını, sarı renk veren NED™ floresan boya; CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358, D10S1248 STR lokuslarını; kırmızı renk veren PET® boyası ise D14S1434, THO1, D5S818, D21S11 STR lokuslarının analiz görüntüleri için kullanıldı.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, her örnek bilgisi veri toplama yazılımı aracılığıyla fsa dosyası şeklinde saklandı. fsa dosyaları, sonuçların analizi ve yorumlanması için GeneMapper® ID Software v3.0'e aktarıldı. 3130xl genetik analizördeki örneklerin yürütmelerine ait ham veriler, GeneMapper programına yeni bir proje oluşturularak eklendi.

Çalışmamızda 18 lokus tespiti için turuncu renk veren GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard kullanıldı. 500 LIZ Size Standardın uzunlukları 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 and 500 baz uzunluğundadır. Bu standardın DNA parçalarının büyüklükleri Şekil 20’de gösterilmektedir. Her örneğin analizi 500 LIZ Standard boyutları kontrol edildikten sonra yapıldı.



Şekil 20. LIZ 500 Size Standard görüntüsü

Kapiller elektroforezde yürütülen PCR ürünlerinin, elektroforegramdaki farklı renklere ve lokuslara ait pikler, fragman boyları göz önüne alınarak 18 lokusun noktası belirlendi.

3.12. 18 Lokuslu Multipleks STR Panelin Optimizasyonu

İlk olarak her lokusun multipleks performansını kontrol etmek için eşit konsantrasyonundaki primer setleri (forward/reverse) ile multipleks primer miksi hazırlandı. Daha sonra zayıf lokusların miktarları artırılıp, güçlü lokusların miktarları

azaltılarak pik optimizasyonu yapıldı. Tablo 13’de belirtildiği gibi 0,1 - 0,65 μM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda son primer karışımı hazırlandı.

Tablo XIII. 18 lokuslu multipleks STR panelde kullanılan primerlerin son konsantrasyonları

Lokus	Forward ve Reverse primer konsantrasyonları (μM)
Amelogenin	0,10
CSF1PO	0,35
D7S820	0,25
TPOX	0,25
D18S51	0,41
D2S1338	0,28
D13S317	0,10
FGA	0,50
D5S818	0,13
D21S11	0,25
D16S539	0,25
D8S1179	0,25
vWa	0,10
D3S1358	0,15
THO1	0,16
D10S1248	0,30
D14S1434	0,10
D19S433	0,65

Primerler dizayn edilirken erime sıcaklıklarının (T_m) 60°C ve bağlanma sıcaklıklarının 55°C ’ye yakın olmasına özen gösterildi. Multipleks bir çalışma olduğu için primer erime sıcaklıklarının (T_m) birbirinden en fazla 3°C az ya da fazla olması göz önüne alındı. PCR

döngüsü koşulları Tablo 14'teki gibi ayarlandı. Bu çalışmada da tüm lokuslardan sinyal alınmakla beraber, farklı sinyal etkinliği gözlemlendi. Son olarak tüm lokuslar 18pleks olarak çalışıldı

Tablo XIV. Multipleks PCR Çalışma Protokolü

1.Aşama	2. Aşama - 28 Döngü		3.Aşama- Final Hold	
Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon	Bağlanma/Uzama	Final Uzaması	Bekleme
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
11 dk	20 sn	3 dk	10 dk	∞

3.13. 18 Lokuslu Multipleks STR Panelin Optimum DNA Miktarı/Hassasiyeti

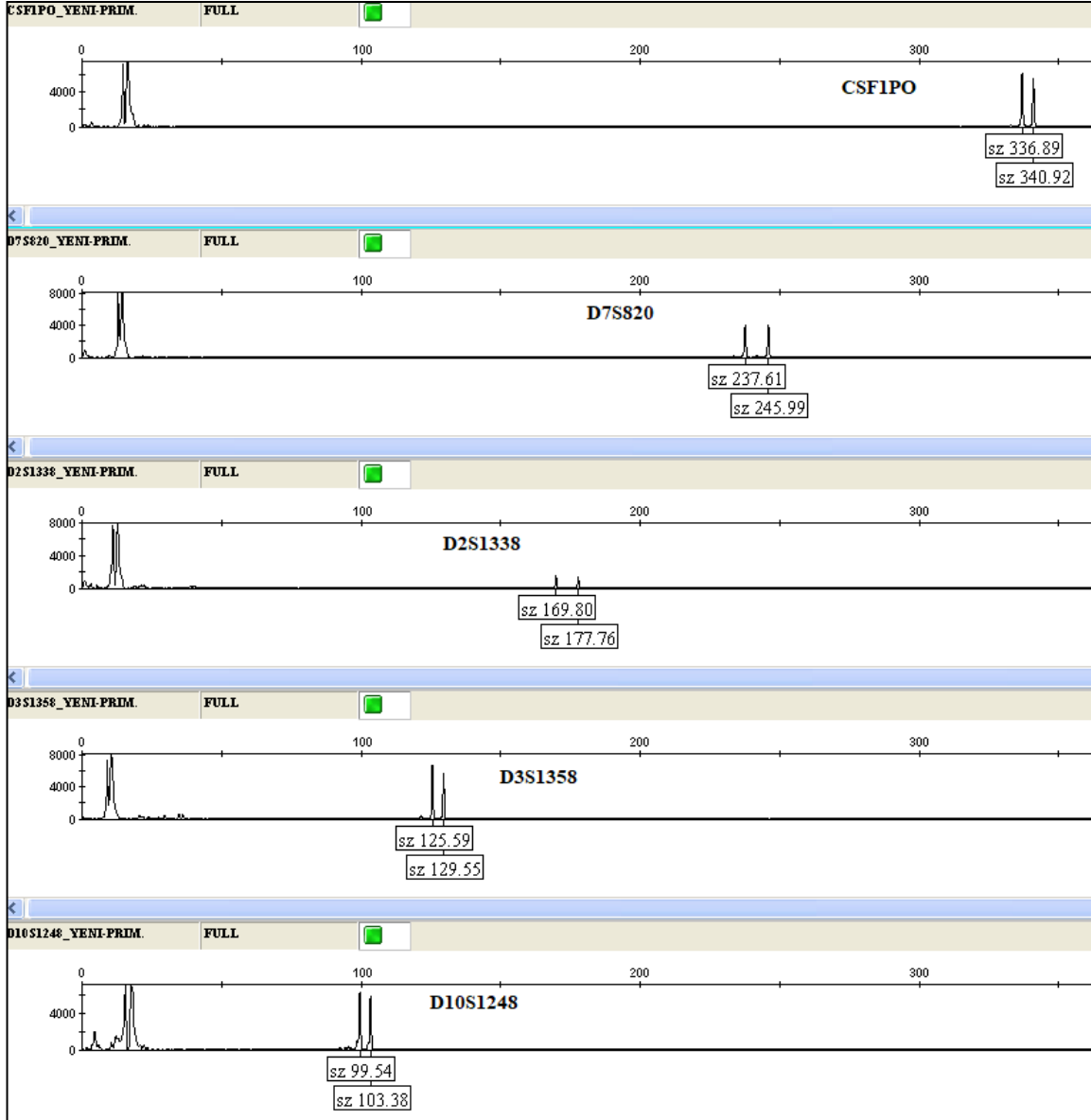
QIAamp®DNA Mini Kit ile izole edilen DNA örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu için çeşitli miktarlardaki DNA konsantrasyonlarında (0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2 ng/μl, 3 ng/μl) 18 lokusa ait genotipleme yapıldı. 0.5ng/μl ile 1 ng/μl aralığında elde edilen fragman boyutlarının değerlendirilebilir olduğu görüldü.

4. Bulgular

Bu çalışmada 17 farklı STR bölgesi (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, D10S1248 ve D14S1434) ve cinsiyeti belirleyen Amelogenin lokusu tek bir reaksiyonda multipleks olarak dizayn edildi ve optimizasyon yapıldı. Her bir primerin çalışıp çalışmadığını görmek amacıyla ilk önce tek pleks çalışma yapıldı. Tüm bölgelerin çalıştığının görülmesi üzerine 2 ayrı 9pleks çalışma yapıldı. Son olarak tüm lokuslar 18pleks reaksiyonda birleştirildi ve aşama aşama primer konsantrasyonları değiştirilerek optimize oranlar tespit edildi.

4.1. Tek pleks (tek lokus) PCR Çalışmaları

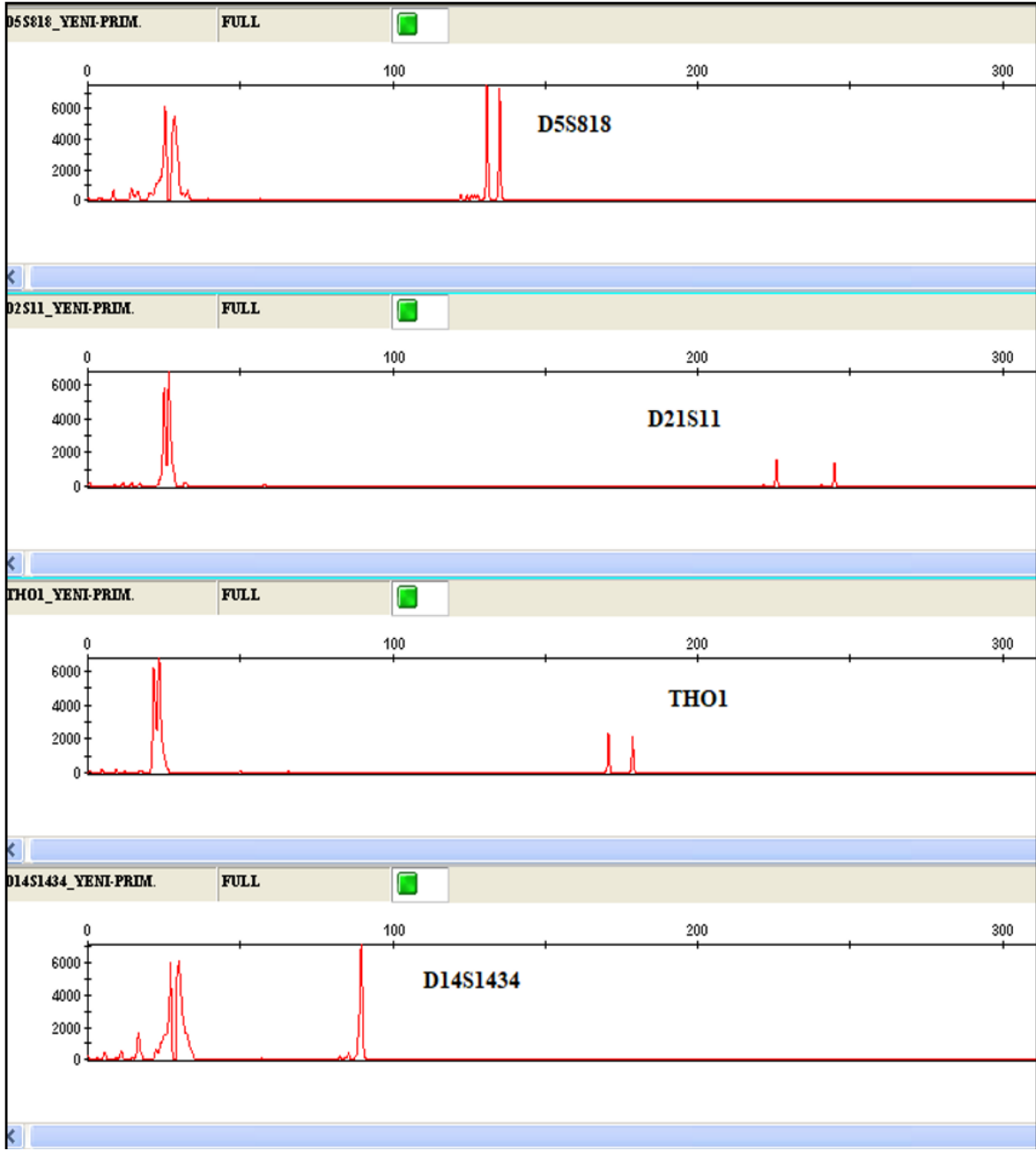
18 lokusa ait dizayn edilip sentezletirilen primerlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek ve her bir lokusun elektroforegramdaki noktasını/yerini (boy) belirlemek için, her bir lokus tek PCR'de amplifiye edildi. Bunun için 9947A kontrol DNA kullanıldı. Tek lokus olarak çalışılan primer setlerinin (Forward-Reverse) amplifikasyonları kontrol edildi. Şekil 21, 22, 23, 24'te optimize edilen tüm lokusların elektroforegramları görülmektedir. Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179, D19S433 primer setleri mavi (6-FAM) renkte pik görüntüsü oluştururken CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358, D10S1248 primer setleri siyah (NED) pik; D18S51, D13S317, D16S539, vWA primer setlerinin elektroforegram görüntüsü ise yeşil (VIC) pik; D14S1434, TH01, D5S818 ve D21S11 primer setlerinin elektroforegram görüntüsü ise kırmızı pik (PET) görüntüsü vermektedir.



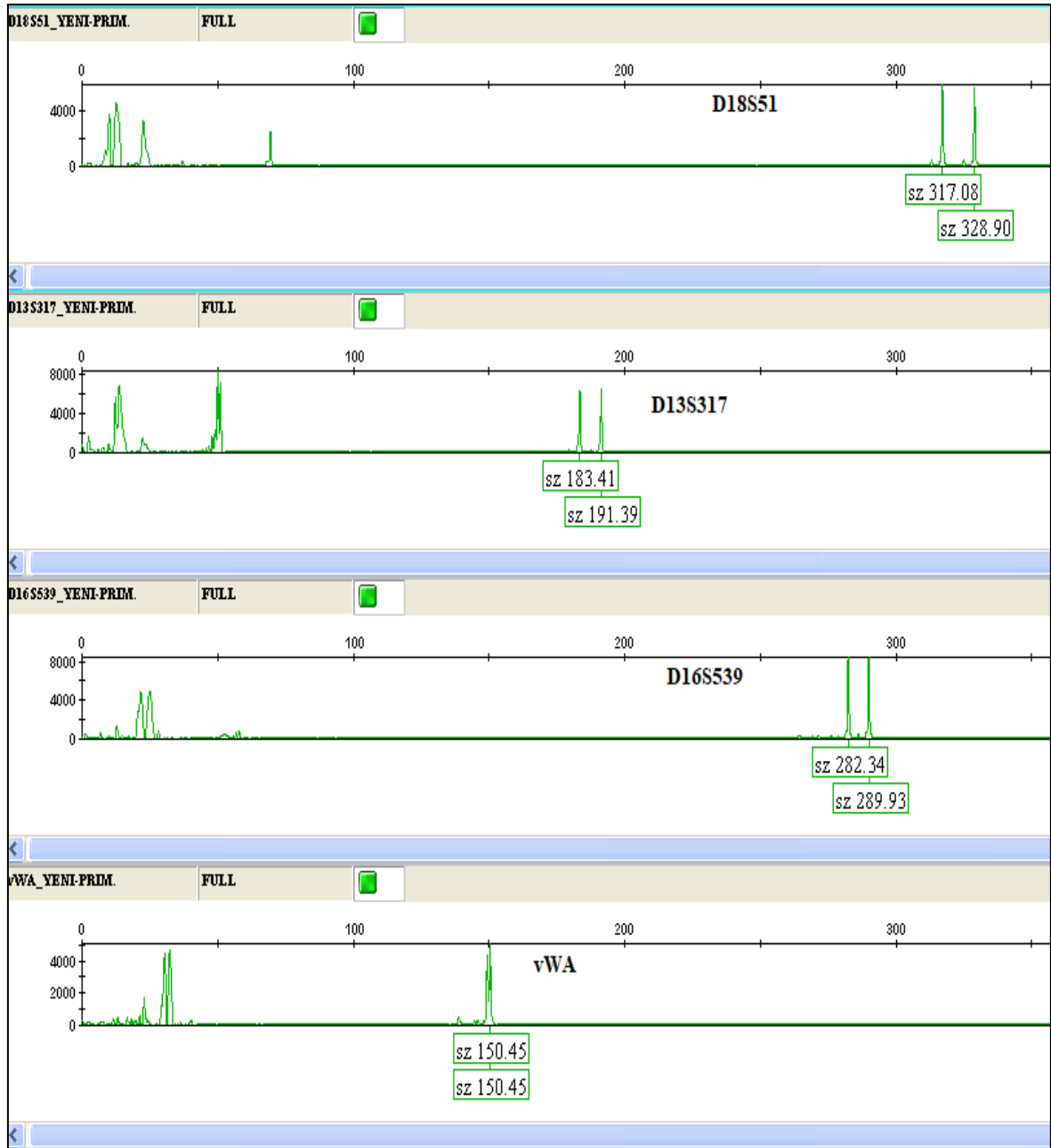
Şekil 21. Tek pleks çalışılan CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358, D10S1248 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri



Şekil 22. Tek pleks çalışılmış Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179, D19S433 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri



Şekil 23. Tek çalışılmış D5S818, D21S11, TH01, D14S34 lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri

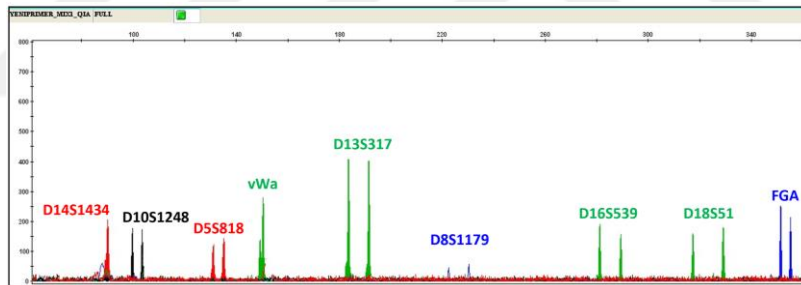


Şekil 24. Tek çalışılmış D18S51, D13S317, D16S539, vWA lokuslarına ait elektroforegram görüntüleri

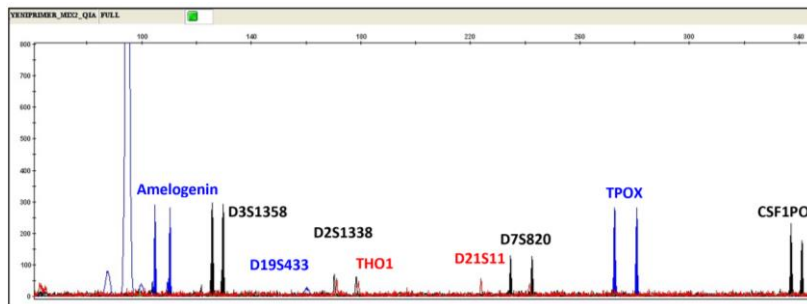
4.2. Multipleks STR Panel Çalışmaları

4.2.1. 9 Lokuslu multipleks STR panel çalışması

Lokusların fragman boyutları ve floresan boya renkleri göz önünde bulundurularak 2 ayrı gruba bölündü. 9 primer setinin bir miks içerisinde bulunacak şekilde primer miksi hazırlanarak 2 ayrı multipleks PCR yapıldı. Miks 1 multipleks reaksiyonu içerisinde D18S51, D13S317, FGA, D5S818, D16S539, D8S1179, vWa, D10S1248, D14S1434 primerleri yer alırken; Miks 2 multipleks reaksiyonu içerisinde Amelogenin, CSF1PO, D7S820, TPOX, D2S1338, D21S11, D3S1358, THO1, D19S433 primerleri yer almaktadır. STR lokuslarının tekrar aralıkları ve işaretlendikleri boya renkleri göz önünde tutularak 2 farklı miks hazırlanarak 2 multipleks yapıldı. Primerlerin iki multipleskte amplifiye edilebildiği gözlemlendi. Şekil 25-26'da Miks 1-2'ye ait elektroforegramlar görülmektedir.



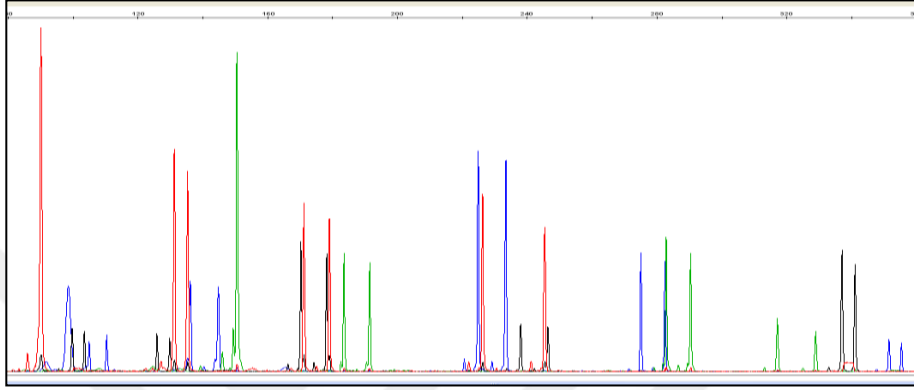
Şekil 25. Miks 1 (D18S51, D13S317, FGA, D5S818, D16S539, D8S1179, vWa, D10S1248, D14S1434) elektroforegram görüntüsü.



Şekil 26. Miks 2 (Amelogenin, CSF1PO, D7S820, TPOX, D2S1338, D21S11, D3S1358, THO1, D19S433) elektroforegram görüntüsü.

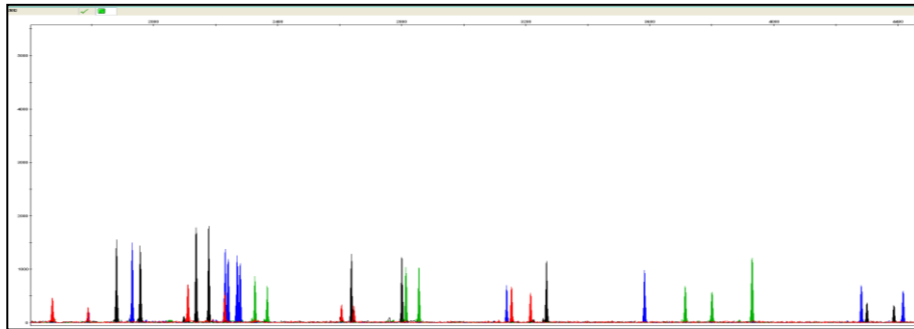
4.2.2. 17 STR lokusu ve Amelogenin içeren multipleks setin optimizasyonu

Miks 1 ve miks 2 yapıldıktan sonra her iki miks bir araya getirilerek 18 lokuslu multipleks oluşturuldu. Şekil 27’de geliştirilen STR Multipleks ile 18 lokusluk bölgenin tek reaksiyonda amplifikasyonuna ait elektroforegram görüntüsünü gösterilmektedir.



Şekil 27. 18 lokusluk multipleks setin tek reaksiyondaki elektroforegram görüntüsü.

Oluşturulan multipleksin PCR koşulları denatürasyon, bağlanma ve uzama sıcaklıkları zamana göre senkronize edildi. Bağlanma sıcaklığının artırılmasıyla, lokusların amplifikasyon veriminin arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, spesifik olmayan ürünlerin azaldığı görüldü. Elde edilen elektroforegram görüntülerinden yararlanarak, her primerin hazırlanan primer seti içerisindeki kullanım miktarı defalarca hazırlanarak tekrarlandı. Daha sonra 18 lokusa ait primerler multipleksteki optimum miktarları belirlendi (Tablo 13). Optimize edilmiş 18 lokuslu DNA profili Şekil 28’de gösterilmektedir.



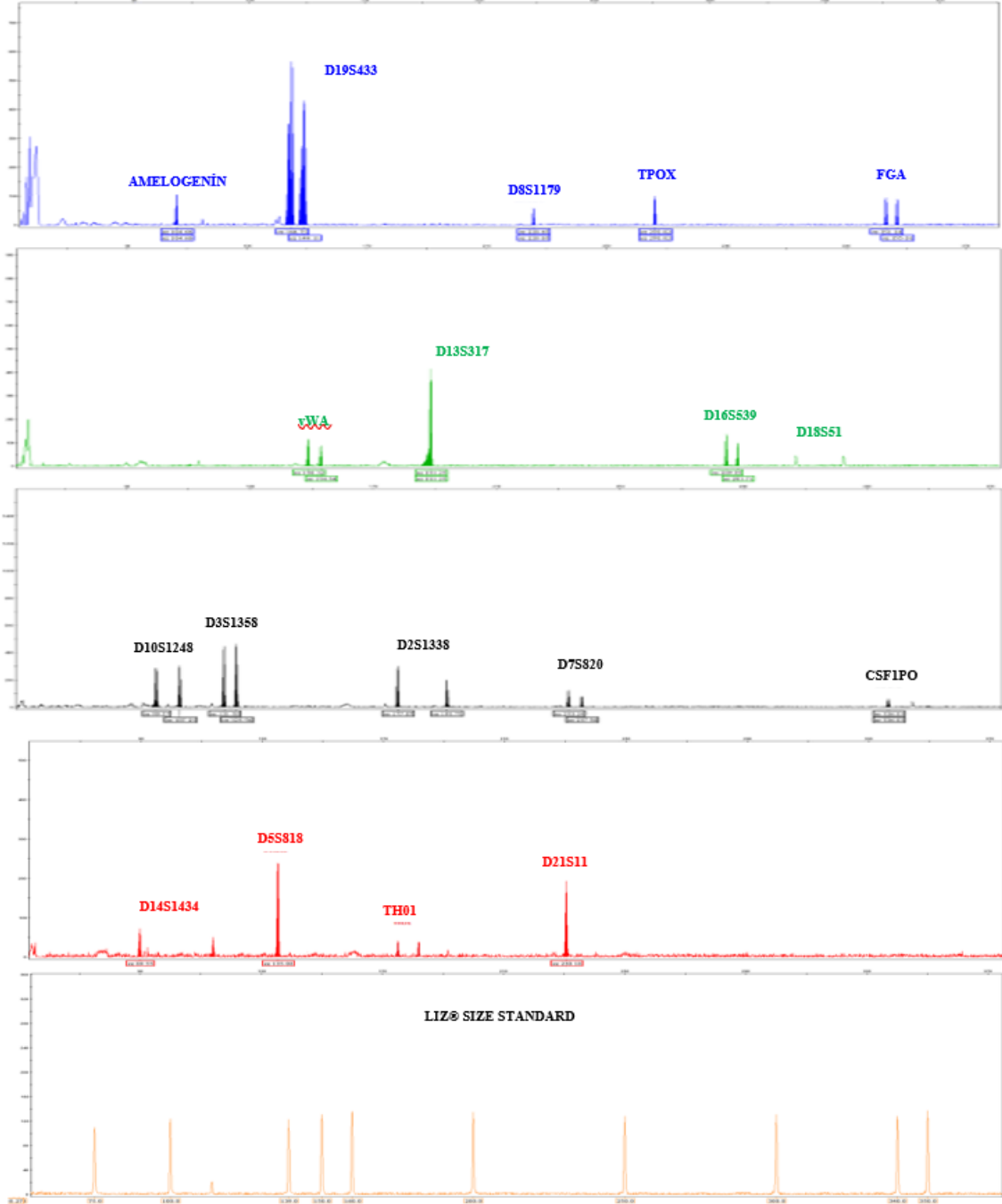
Şekil 28. Optimize edilmiş 18 lokuslu DNA profili

Optimizasyonun tüm aşamalarında kontaminasyon olup olmadığını saptamak için negatif kontrol kullanıldı. Kullanılan negatif kontrollerde, herhangi bir amplifikasyon gözlemlenmedi. Negatif kontrole ait elektroforegram görüntüsü Şekil 29'da gösterilmektedir.



Şekil 29. Optimize STR lokusu multipleks Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü

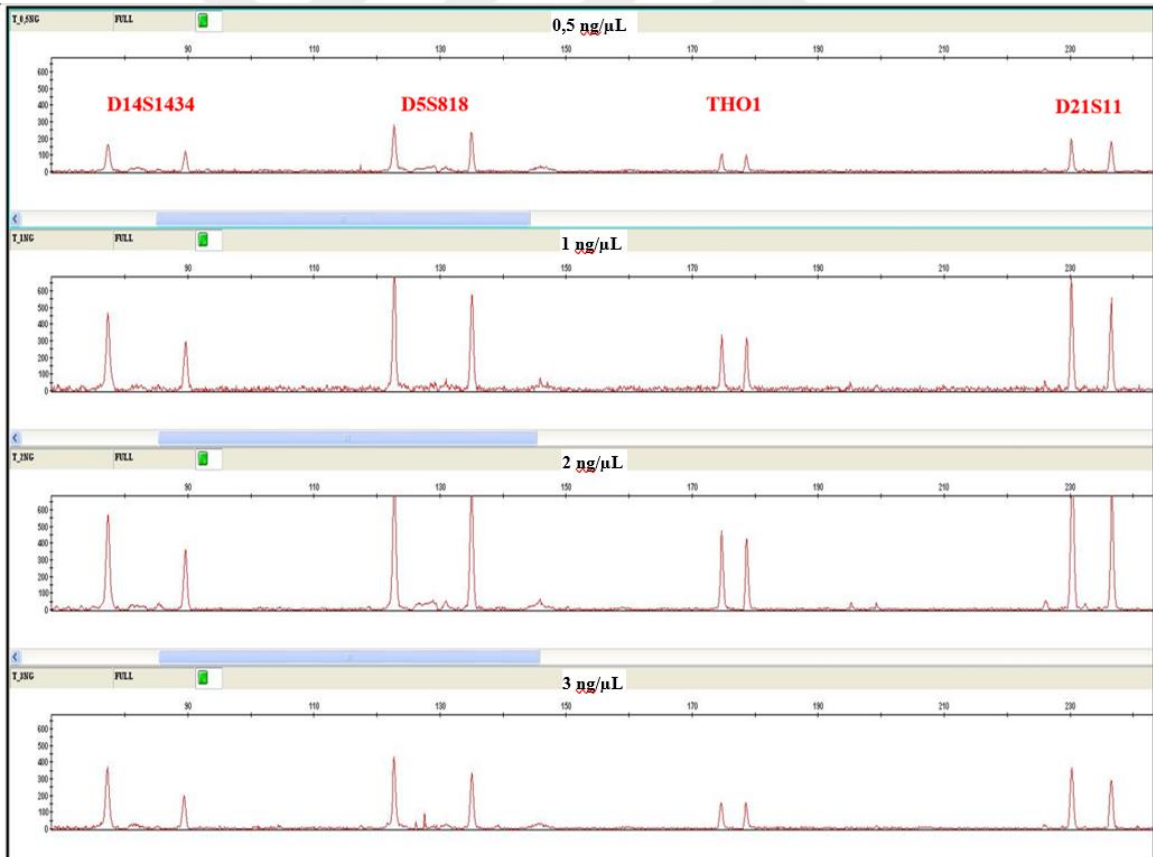
Optimizasyon sırasında STR profil bilgisi bilinen 9947A kontrol DNA'sı standart olarak kullanıldı. Optimize edilen multiplekse ait 9947A kontrol DNA'sının genotip profili Şekil 30'da görülmektedir.



Şekil 30. 18 lokuslu multipleks STR paneline ait 9947A kontrol DNA'sına ait DNA profili

4.3. Doğruluk ve Hassasiyet

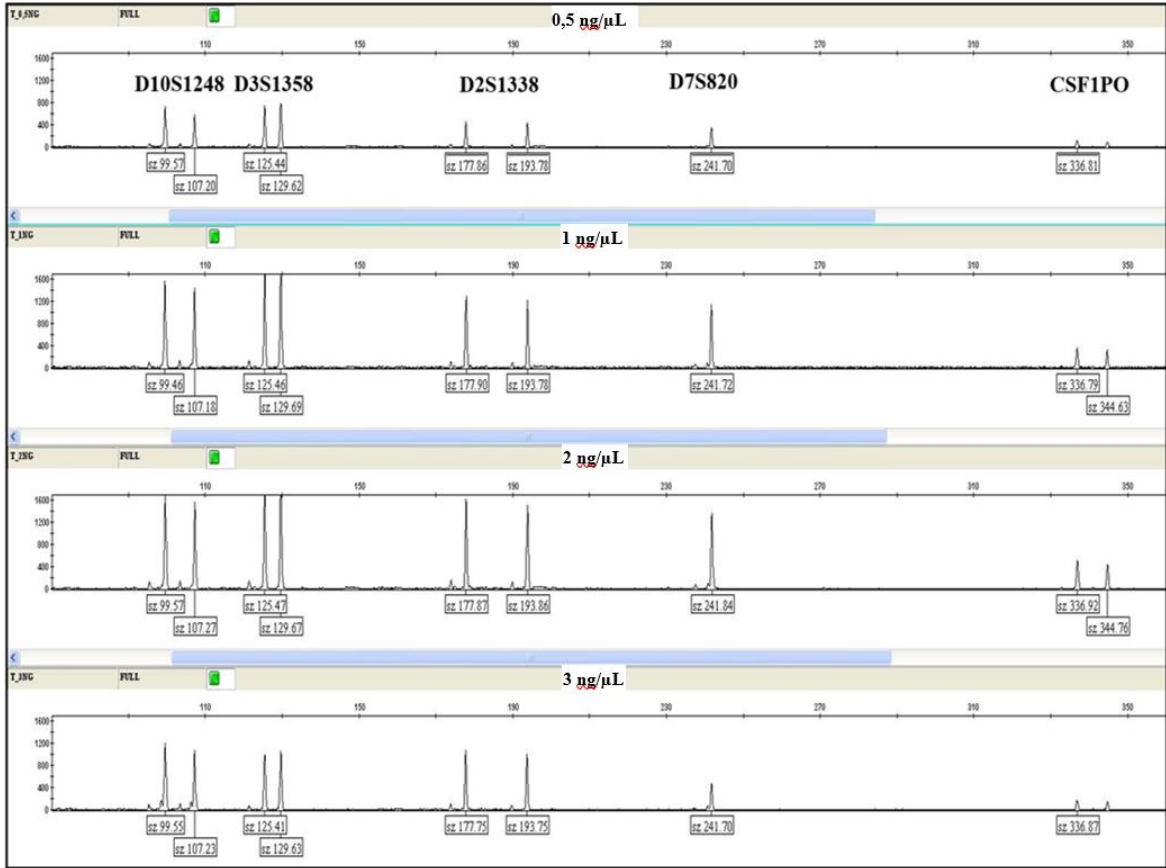
Optimize edilen 18 STR lokuslu multipleks setinin verimli amplifikasyonu için optimal ihtiyaç duyulan DNA miktarını ve çalışma aralığını belirlemek üzere hassasiyet çalışması yapıldı. Bunun için DNA örneği, 0.1 ng/μl ile 3ng/μl aralığındaki farklı konsantrasyonlarda amplifiye edilerek performans değerlendirmesi yapıldı. Şekil 31, 32, 33, 34, 35'te aynı DNA örneğine ait 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarında 18 lokuslu STR multipleksin elektroforegram görüntüsü verilmiştir. 0.5 ng/μl konsantrasyona sahip DNA örneğinde bazı lokuslarda çok düşük pik değerleri elde edilmiştir Şekil 31, 32, 33, 34, 35. Her lokus için en uygun 1 ng DNA konsantrasyonunda optimum ve spesifik PCR ürünleri elde edilmiştir Şekil 31, 32, 33, 34.



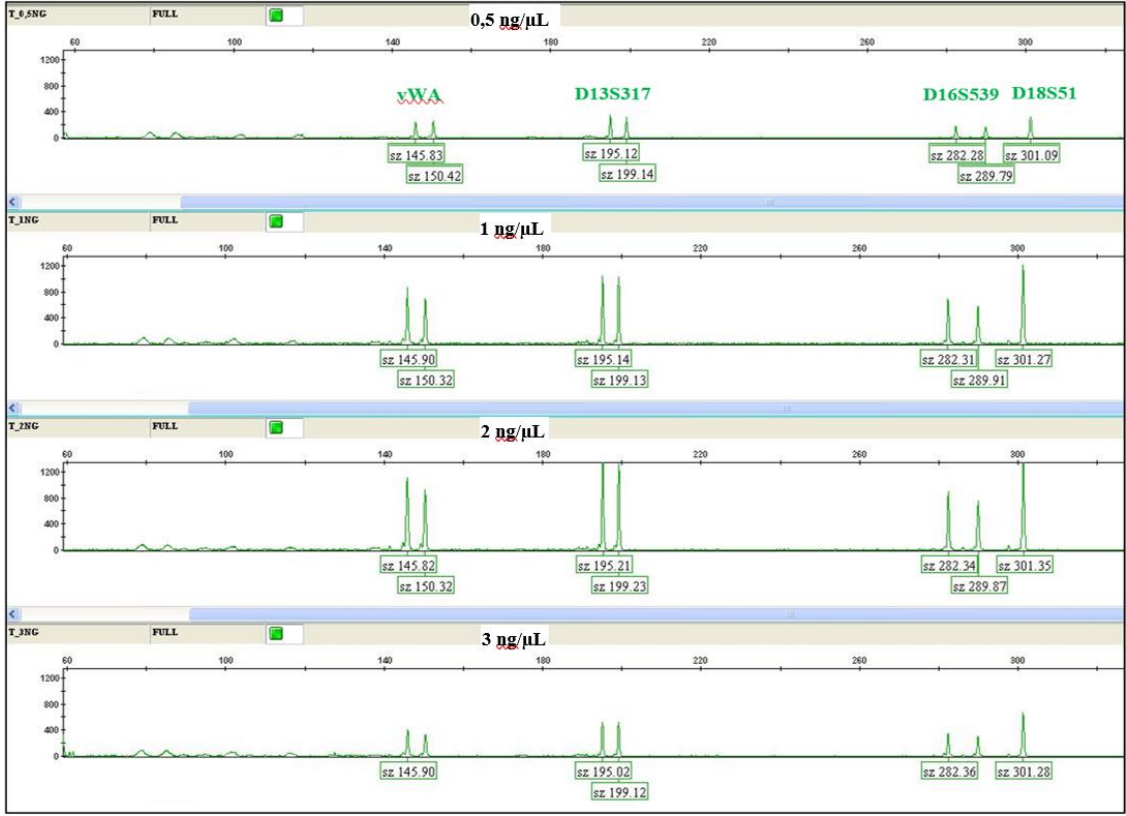
Şekil 31. PET boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarındaki elektroforegram görüntüleri



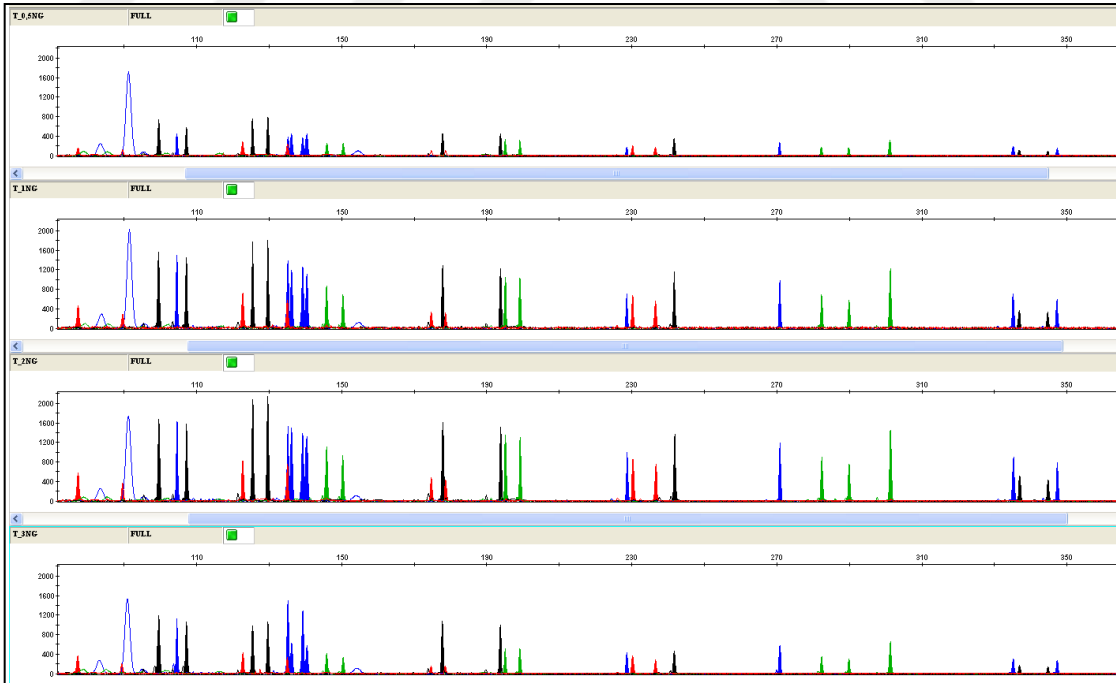
Şekil 32. 6-FAM boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarındaki elektroforam görüntüleri



Şekil 33. NED boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarındaki elektroforam görüntüleri



Şekil 34. VIC boyası ile işaretli STR bölgelerinin 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarındaki elektroforam görüntüleri



Şekil 35. Tüm boyaların birlikte (17 STR lokusu ve Amelogenin) 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2ng/μl, 3 ng/μl konsantrasyonlarındaki elektroforam görüntüleri

Tablo XV. Araştırmaya Rıza Gösteren 15 Kişiye Ait 18pleks Çalışma Sonuçları

	DNA-1		DNA-2		DNA-3		DNA-4		DNA-5		DNA-6		DNA-7		DNA-8		DNA-9		DNA-10		DNA-11		DNA-12		DNA-13		DNA-14		DNA-15			
AMELOGENİN	104,59	104,59	104,65	104,65	104,64	110,12	104,75	110,11	104,60	110,06	104,66	110,18	104,64	110,14	104,97	104,97	104,40	109,91	104,41	104,41	104,54	109,95	104,52	109,91	104,42	104,42	104,42	109,83	104,45	109,86		
CSFIPO	340,11	344,06	340,12	344,04	340,00	344,04	331,81	355,83	340,12	344,04	343,99	347,96	340,00	344,04	344,78	344,78	336,12	344,20	335,93	344,04	336,11	340,23	340,23	348,15	336,13	340,23	344,15	344,15	339,88	343,97		
D13S317	186,95	194,97	187,11	195,01	190,89	203,06	190,89	194,93	179,05	187,04	186,99	195,01	194,89	198,84	191,52	195,64	179,00	190,83	178,93	178,93	194,79	194,79	183,02	183,02	190,87	190,87	178,89	190,72	178,85	178,85		
D16S539	281,86	297,12	293,32	293,32	289,59	289,59	289,49	293,35	289,54	297,17	285,64	297,00	300,94	300,94	286,26	293,92	289,64	289,64	281,61	293,03	281,91	289,52	289,53	300,96	281,98	289,50	289,47	293,31	285,54	293,15		
D18S51	303,38	334,48	303,40	314,90	307,23	330,51	307,23	311,10	307,26	330,53	314,93	314,93	303,40	303,40	319,94	319,94	299,89	311,45	318,76	318,76	303,63	303,63	307,59	323,16	311,53	315,41	307,59	307,59	303,41	314,98		
D19S433	139,95	159,06	140,09	144,40	139,95	151,00	144,40	144,40	140,08	144,53	140,21	155,13	151,11	155,13	140,83	140,83	144,47	148,90	139,96	152,99	139,97	144,39	135,82	144,47	139,97	144,39	144,40	144,40	140,09	146,68		
D21S11	225,16	229,33	221,07	225,17	229,37	229,37	225,28	229,37	239,65	239,65	229,44	233,62	225,28	225,28	221,70	229,99	225,29	243,98	224,92	229,39	229,39	235,59	221,13	235,64	239,79	253,90	221,00	239,83	220,79	231,19		
D2S1338	169,99	190,04	166,02	198,15	174,06	194,01	170,09	202,21	181,99	198,02	169,96	202,33	169,96	177,90	178,50	194,67	169,88	193,93	177,73	193,92	166,90	177,74	181,94	202,15	169,92	185,99	169,77	181,88	173,80	181,79		
D3S1358	133,63	138,02	117,48	129,59	138,02	138,02	121,45	129,61	133,68	133,68	125,64	125,64	133,84	133,84	125,89	130,05	129,29	129,29	129,17	133,32	129,32	129,32	121,11	121,11	125,23	129,45	133,70	142,33	125,41	137,89		
D5S818	135,09	144,00	131,05	139,27	126,85	143,86	139,27	143,86	135,03	135,03	126,96	135,21	139,27	143,87	135,66	139,85	118,65	134,94	130,87	139,14	126,46	135,21	122,71	134,94	122,63	139,14	134,96	143,71	135,05	135,05		
D7S820	232,42	236,56	232,50	232,50	232,37	232,37	240,73	240,73	240,61	240,61	224,28	236,60	232,25	244,66	232,99	232,99	232,50	240,78	240,21	240,21	219,79	224,04	236,62	244,86	229,39	236,58	236,63	236,63	228,05	232,15		
D8S1179	227,90	232,18	227,94	232,14	227,93	227,93	219,73	228,05	232,14	236,26	228,00	228,00	227,93	240,38	228,48	236,73	232,12	236,33	227,58	231,80	232,12	236,21	236,26	236,26	215,27	215,27	223,75	223,75	231,79	240,08		
FGA	343,05	351,19	334,53	338,81	343,00	343,00	343,00	355,17	347,14	355,11	359,01	359,01	351,10	355,06	347,63	355,73	355,16	355,16	342,77	350,89	334,53	343,04	338,79	338,79	347,02	347,02	338,79	342,89	342,68	344,78		
TH01	170,92	178,77	174,83	181,74	178,83	181,74	166,93	181,74	166,89	182,70	166,92	170,78	166,80	181,63	167,49	171,41	166,87	166,87	170,65	174,66	167,14	167,14	174,73	178,70	166,90	174,85	166,88	174,69	166,73	181,55		
TPOX	270,34	270,34	270,34	270,34	270,37	281,76	270,37	270,37	274,17	285,51	270,31	277,92	270,34	281,67	270,93	270,93	281,81	281,81	273,88	277,69	270,42	281,69	270,42	281,69	270,35	270,35	270,45	274,19	270,08	270,08		
vWa	150,12	158,47	145,60	154,21	136,92	154,34	141,17	150,13	141,30	154,26	150,12	162,35	141,31	158,35	154,88	154,88	150,13	150,13	154,22	158,21	150,00	154,24	136,71	150,13	136,85	145,49	141,08	162,29	150,00	154,21		
D10S1248	83,12	87,45	83,54	83,61	91,12	95,33	87,65	91,38	87,55	87,59	99,11	103,03	87,88	99,25	87,64	91,12	95,45	99,46	91,87	91,43	99,54	99,13	99,87	103,33	91,58	95,54	95,88	95,70	97,12	101,22		
D14S1434	92,13	96,22	92,55	92,88	92,33	92,14	92,54	96,45	96,88	100,01	96,34	96,25	92,14	96,28	96,45	96,51	92,64	92,69	96,41	96,57	92,21	92,35	92,38	96,66	96,71	100,05	96,32	96,58	92,55	96,34		
AMPLİKON BOYU (bp)																																

5. Tartışma

Adli kimliklendirme ve nesep tayini amacıyla dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan ve kısa tekrar bölgeleri olarak adlandırılan STR'ler, DNA teknolojilerinin ilerlemesiyle aynı anda 24-25'i birden tek bir PCR tüpü içerisinde multipleks olarak çoğaltılabilir hale gelmiştir. Multiplekstekteki STR lokus sayısının artırılması ve bozunmuş örneklerin çalışılmasını kolaylaştıran mini STRlerin multiplekse eklenmesiyle sistemin ayırım gücü epeyce artırılmış ve diğer polimorfik sistemlere gerek kalmadan adli olguların çözümü sağlanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında 18pleks STR lokusundan oluşan bir kimliklendirme paneli yapılması amaçlanmıştır. Bu panel 4 ayrı floresan boya (6-FAM, VIC, PET, NED) ile işaretlenerek çeşitli optimizasyon aşamalarından geçirilen 15 STR lokusu (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA), 2 mini-STR lokusu (D10S1248 ve D14S1434) ve 1 cinsiyet ayırım lokusundan (Amelogenin) oluşmaktadır. 16 bölgeden oluşan Applied Biosystems®-Life Technologies firmasına ait DNA Kimliklendirme kiti (AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit) ile yine 16 bölgeden oluşan Pomega Corporation firmasına ait PowerPlex® kiti birleştirilerek, her iki kitten de daha fazla STR bölgesini kapsayan ve her iki kitte de olmayan 2 mini-STR lokusunun (D10S1248, D14S1434) ilave edilmesiyle bozunmuş DNA örneklerinde çalışma potansiyeli artırılmış yerli malı bir DNA Kimliklendirme kiti oluşturulmak istenmiştir. PowerPlex® kitindeki, ampikon boyları 400 baz çiftini geçen ve bozunmuş DNA örneklerinde amplifikasyon problemi yaratabilen (47) Penta D ve Penta E STR lokusları çıkartılarak bu lokusların yerine D10S1248 ve D14S1434 mini-STR lokusları kullanılmıştır. Bu iki mini-STR bölgesinin ampikon boyu 90-110 baz çifti olacak şekilde primer dizaynları yapılmıştır.

5.1. Primer Dizaynı, Kitin Floresan Boyalar İle Multipleks İçeriğinin Oluşturulması

17 STR ve Amelogenin olmak üzere 18 lokusun 4 farklı boyaya dağıtılması; Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179, D19S433 primer setleri mavi (6-FAM), CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358, D10S1248 primer setleri siyah (NED), D18S51, D13S317, D16S539, vWa primer setleri yeşil (VIC), D14S1434, THO1, D5S818 ve D21S11 primer setleri kırmızı (PET) olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 6). Her bir floresan boyadaki STR bölgelerinin kompozisyonu, patent sorunu yaratmaması açısından PowerPlex® ve AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kitinden farklı olacak şekilde tasarlanmıştır. Örneğin, AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kitinde D8S1179, D21S11, D7S820 ve CSF1PO STR lokusları 6-FAM ile boyalıken (AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit User Guide), tasarımını yaptığımız 18 lokuslu STR kitinde 6-FAM boyasında Amelogenin, TPOX, FGA, D8S1179 ve D19S433 lokuslarına yer verilmiştir. Yine Powerplex® kitinde Amelogenin, vWA, D8S1179, TPOX ve FGA lokusları için siyah boya kullanılırken (PowerPlex® 16 System Technical Manual) tezdeki 18pleks DNA Kimliklendirme kitinde bu boya (NED) CSF1PO, D7S820, D2S1338, D3S1358 ve D10S1248 lokuslarının boyanması için kullanılmıştır. 18pleks DNA Kimliklendirme Kitinde kullanılan tüm lokusların hem floresan boyları hem de baz çifti olarak ampikon boyları Powerplex® ve AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kitinden farklı olacak şekilde tasarlanmıştır. Tezde kullanılan lokuslar için primer dizaynı yapılırken, ticari kitlerdeki gibi primer bağlantı noktalarına denk gelebilecek muhtemel varyasyonlar dikkate alınmamıştır. Söz konusu ticari kitlerde de başlangıçta bu varyasyonlar dikkate alınmamış, zamanla farklı farklı merkezlerde de çok sayıda örneğin çalışılmasıyla ADO (Allel Drop Out-Bir Allelin Çalışmaması) şikayetlerinin gelmesiyle primer dizaynları, bu varyasyonları ekarte edecek şekilde yeniden yapılmıştır. Varyasyonun etkisini ortadan kaldırmak amacıyla etkilenen lokusa ait primer ya bir kaç baz ötelenmiş ya da dejenere baz kullanılmıştır (48).

5.2. Tek pleks (Tek Lokus) PCR Çalışmaları

Primer tasarımı yapılan 18 lokusun tek başına çalışıp çalışmadığının, dolayısıyla primer dizaynında bir problem olup olmadığının anlaşılması amacıyla her primer setinin öncelikle aynı konsantrasyonlarda primerler kullanılarak ve 2,5 ng/μl DNA ile tek tek PZR amplifikasyonları yapılarak ABI 3130XL Kapiller Elektforez cihazında yürütülmüştür. Kapiller elektforez sonrasında lokusların tamamının amplifiye olduğu ancak amplifikasyon etkinliklerinde farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Şekil 21, 22, 23, 24). Bu farkın primer dizaynı sırasında her bir lokusa ait ileri ve geri yönlü primerin baz içeriğinden, dizilim karakteristiğinden, bu baz kompozisyonunun genomda ilgili bölgeye ne kadar spesifik olarak bağlanabildiğinden, kullanılan her bir floresan boyanın ışımaya etkinliklerindeki farklılıklardan (49) kaynaklandığı düşünülmektedir. Tek pleks çalışmada, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, D10S1248, D14S1434 ve Amelogenin lokusları 2.000-8.000 rfu arası sinyal verirken D8S1179, D19S433 ve D2S1338 lokusları 300-1800 rfu arası sinyal vermiştir (Şekil 21, 22, 23, 24). D8S1179 ve D19S433 STR lokusları haricindeki tüm lokusların non spesifik özgün olmayan) sinyal vermeden çalıştığı gözlenirken, bu iki STR lokusunda non spesifik sinyaller gözlemlenmiştir. D8S1179 STR lokusunda her bir alelden 1 baz uzaklıkta ekstra sinyal alınmıştır (Şekil 22). Ayrıca 90 bp civarında da yaklaşık 250 rfu yüksekliğinde non spesifik bir sinyal daha gözlenmiştir (Şekil 22). D19S433 STR lokusunda ise hangisinin alel olduğu ayırt edilemeyen 125-140 baz çifti aralığında 6 ayrı sinyal elde edilmiştir (Şekil 22). Yine bu STR lokusu için 90 bp civarında da yaklaşık 1.000 rfu yüksekliğinde non spesifik bir sinyal daha gözlenmiştir (Şekil 22). Çalışmanın bu aşamasında, primerlerin çalışıp çalışmadığı, non spesifik amplifikasyon olup olmadığı gözlemlenmek istendiğinden, primer konsantrasyonlarının artırılarak ya da azaltılarak amplifikasyon etkinliklerinin düzenlenmesine gidilmemiştir.

5.3. Multipleks STR Panel Çalışmaları

5.3.1. Dokuz lokuslu multipleks STR panel çalışması

Optimizasyon çalışmasının bu aşamasında lokusların fragman boyutları ve floresan boya ları göz önünde bulundurularak 9'arlı 2 ayrı mik s oluşturuldu ve eşit konsantrasyonda (10 pmol) primerler kullanılarak amplifikasyon yapıldı (Şekil 25, 26). Çalışmada 2,5 ng/µl DNA kullanıldı. Bu aşamada, farklı sinyal kuvvetlerinde olmakla birlikte, 2. miksteki D19S433 STR lokusu haricinde primerlerin tamamının çalıştığı gözlendi (Şekil 25, 26). D19S433 lokusunda sonuç alınamaması, bu primerin etkinliğinin diğer primerlere göre çok daha düşük olduğu ve multiplekslemenin her bir primeri farklı oranlarda etkilemekle birlikte D19S433 primerini daha fazla etkilediği sonucuna varılmıştır (47). Her lokusun farklı sinyal etkinliğinde sonuç vermesi ise yine multipleksin primer etkinliklerini değişen oranlarda etkilediğini göstermektedir (47). Bu aşama, nihai hedef olan tek multiplekste 18 lokusu çalışmanın ön çalışması olduğundan ve primer konsantrasyonlarındaki ayarlamaların tek multipleks çalışmasında yapılacağından, primer konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır.

5.3.2. 18pleks multipleks setin optimizasyonu

2 ayrı 9pleks çalışmasında düşük sinyal veren primerler ile hiç sinyal alınamayan D19S433 primerinin miktarları sinyal etkinliğine göre 1-4 kat arasında arttırılarak 18pleks PZR yapıldı ve ilk sonuçlar alındı (Şekil 27). Bu aşamada, her bölgenin amplifiye olduğu görülmekle birlikte farklı sinyal etkinlikleri olduğu gözlendi. Sonraki aşamalarda sinyal etkinliği düşük olan primerlerin miktarı 1-3 kat arasında arttırılırken, Amelogenin gibi çok yüksek sinyal veren primerlerde ise 2-3 kat arasında azaltılarak çok sayıda farklı çalışma yapıldı. En iyi sonuçların (Şekil 28) alındığı primer konsantrasyonları ve PZR koşulları Tablo 13 ve 14'te gösterilmiştir. En az konsantrasyonda kullanılan primerler Amelogenin, D13S317, vWA ve

D14S1434 STR lokuslarına ait primerler olmuştur. Bu lokuslara ait primerlerden 18pleks mikste sadece 0,1 μ M primer kullanılmıştır. 18pleks içinde en yüksek konsantrasyonda kullanılan primer ise D19S433 STR lokusuna ait primerler olup 0,65 μ M konsantrasyonda primer kullanılmıştır. Singlepleks çalışmada 90 bp civarında gözlenen nonspesifik sinyal multipleks çalışmada da gözlenmiştir (Şekil 22, 26, 27). Bu sinyal bu bölgedeki lokuslardan hiçbirine denk gelmediğinden değerlendirme dışı bırakılmıştır.

5.4. Hassasiyet

18pleksin çalışması için gerekli en uygun primer konsantrasyonlarının belirlenmesinden sonra, bu karışımın en verimli amplifikasyonu için gerekli optimum DNA miktarını ve sonuç elde edilebilecek en az DNA miktarını belirlemek amacıyla hassasiyet çalışması yapılmıştır. AmpF1STR® kontrol DNA'sı (9947 A) kullanılarak yapılan çalışmada 0.1 ng/ μ l ile 3ng/ μ l konsantrasyon aralığında DNA amplifiye edilerek performans değerlendirmesi yapıldı. 0.5 ng/ μ l konsantrasyona sahip DNA örneğinde FGA ve CSF1PO lokuslarında, diğer lokuslara ait sinyallere nispeten daha düşük sinyal değerleri elde edilmekle birlikte değerlendirilebilir düzeyde sinyaller alınmıştır (Şekil 31, 32, 33, 34). Her lokusun optimum düzeyde çalıştığı DNA konsantrasyonu ise 1ng/ μ l olarak tespit edilmiştir. 1ng/ μ l DNA konsantrasyonunda her lokus için minimum 500 rfu düzeyinde sinyal alınmıştır.

Araştırmaya rıza gösteren 15 kişiden alınan kan örnekleriyle 18pleks çalışılarak başarıyla tiplendirme yapılmıştır (Tablo 15).

6. Sonuç

18pleks kitinin 16pleks Powepleks® kitine göre; hem daha fazla lokus içermesi, hem 2 adet mini STR içermesi (D14S1434, D10S1248) hem de 400 baz çiftini aşan amplifikasyonlar veren Penta D ve Penta E lokusları (Şekil 7) yerine maksimum 350 baz çifti ampliconlar üretecek STR lokuslarının kullanılması avantajlıdır (Şekil 21, 22, 23, 24). 18pleks kitin AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kitine göre avantajları ise yine daha fazla STR lokusu içermesi ve 2 adet mini-STR içermesidir.

Tezin konusu olan 18pleks kiti için Türkiye popülasyonu çalışması yapılmamıştır. Bu çalışma, kitin ileride geliştirilerek daha geniş multipleksli bir hale getirilmesi aşamasında validasyon çalışmalarıyla beraber yapılması düşünülmüştür. Yine kit içerisindeki lokusların allel isimlendirmelerinin yapılması için gerekli olan Allelic Ladder da (50) bu çalışmada üretilmemiştir. Allelic Ladder oluşturulması çalışmadaki 18pleksin, ileride geliştirilmesi aşamasında yapılacaktır.

Geliştirilen bu pleksin en önemli özelliği DNA kimliklendirmesi amacıyla ülkemizde üretilecek yerli bir kitin alt yapısını oluşturacak olmasıdır. Günümüzde 24 lokuslu kitler (Şekil 9, 10) farklı firmalar tarafından üretilmekle birlikte 16pleks kitler de halihazırda yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. 18pleks olarak dizayn edilen kit, 16pleks kitlere göre daha fazla bölgeyi içermesi ve 2 adet mini STR lokusunu içermesi sayesinde ayırım gücü nispeten daha fazla olup, ileride yapılacak iyileştirmeler ve geliştirmelerle bu kitlere daha iyi bir alternatif olabilecektir.

7. Özet

Günümüzde mahkemelerde en güvenilir delillerden biri olarak kabul edilen DNA'ya dayalı kimliklendirme, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Adli laboratuvarlarda kimliklendirmede ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde son 25 senedir DNA üzerindeki kodlanmayan bölgelerde bulunan kısa ardışık tekrar bölgeleri (*Short Tandem Repeats veya STR*) analiz edilmektedir. STR bölgeleri insan genomunun çok küçük bir bölgesi hakkında bilgi verse de biyolojik örneklerin ayırt edilmesi ve karşılaştırılması için yeterlidir. Piyasadaki kit üreticileri adli ya da adli olmayan laboratuvarlarda kullanılmak üzere birçok STR lokusunu tek bir iş akışında analizini ve değerlendirmesini mümkün kılan multipleks STR sistemlerini geliştirmişlerdir.

DNA kimliklendirme sistemleri genellikle 16 bölge STR lokuslarından oluşmaktadır. Hazır ticari kitler tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kitler, Adli Tıp Kurumu, Adli Tıp Enstitüleri, Jandarma Kriminal Araştırma Laboratuvarı ve Kriminal Polis Laboratuvarı gibi adli amaçla çalışan laboratuvarlar ve prenatal tanıda kontaminasyon tespiti, kemik iliği transplantasyonu sonrası kimerizm testi çalışan genetik tanı merkezlerinde de çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hâlihazırda Dünya'da ve ülkemizde en çok kullanılan STR markırları D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır. Bu STR markırları bir Amerikan firması tarafından tek reaksiyonda amplifiye olacak şekilde optimize edilerek kit haline getirilmiş olup ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak çalışılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, ticari kitlerde yaygın olarak bulunan 16 bölgeye 2 mini-STR markırı (D14S1434, D10S1248) daha ilave edilerek multipleks sistemdeki STR sayısı 18'e yükseltildi 18 STR bölgesini tek bir reaksiyonda başarılı amplifikasyon yapılabilmesi için

uygun parametreler belirlendi ve optimizasyon çalışmaları yapıldı. Kimliklendirme amacıyla kullanılmak üzere moleküler tabanlı panel optimizasyonu yapıldı. Bu panelin ileriki zamanlarda geliştirilebilecek daha geniş içerikli multipleks STR kitinin temelini oluşturması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (STR), Multipleks Reaksiyon Sistemi, Adli Genetik, DNA Kimliklendirme



8. Abstract

Nowadays, the identity of DNA, which is considered to be one of the most reliable proofs in the courts, is widely available in our country as well as the rest of the world. In the forensic laboratories, short successive repeat regions (Short Tandem Repeats or STR) in the non-coded regions of DNA have been analyzed for the last 25 years in identification and determination of kinship relations. Although STR regions provide information on a very small region of the human genome, it is sufficient to distinguish and compare biological samples. Kit manufacturers in the market have developed multiplex STR systems that enable analysis and evaluation of many STR loci in a single workflow for use in forensic or non-forensic laboratories.

DNA identification systems generally consist of 16-region STR loci. Ready-to-use commercial kits are in high demand in our country as well as all over the world. In addition to Forensic Medicine Foundation, Forensic Medicine Institute, Gendarmerie Criminal Research Laboratory and Criminal Police Laboratory, the kits are also widely used in genetic diagnosis centers doing contamination check in prenatal diagnosis, chimerism testing after bone marrow transplantation. Currently, the most commonly used STR markers in the world and in our country are D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 and FGA. This STR multiplex system has been optimized by an American company to be amplified in a single reaction, and this kit is widely used in our country and all over the world.

In this thesis, 2 mini-STR markers (D14S1434, D10S1248) were added to the 16 regions in the commercial kit and the number of STR in the multiplex system was increased to 18. It is expected to be more efficient on decayed samples with 2 mini-STRs added to the kit design.

In order to obtain successful amplification of 18 STR regions in a single reaction, appropriate parameters were determined and optimization studies were performed. Molecular based kit/panel optimization was performed for identification purposes. This panel is intended to form the basis of a larger content multiplex STR kit that can be developed in the future.

Key Words: Short Tandem Repeats (STR), Multiplex Reaction System, Forensic Genetic, Identification



9. Kaynaklar

- (1) M. A. Jobling and P. Gill (2004). "Encoded evidence: DNA in forensic analysis," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 5, no. 10, pp. 739–751.
- (2) D. Y. Wang, C. W. Chang, R. E. Lagacé, N. J. Oldroyd, and L. K. Hennessy (2011). "Development and validation of the AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$ Direct PCR Amplification Kit: A multiplex assay for the direct amplification of single-source samples," *J. Forensic Sci.*, vol. 56, no. 4, pp. 835–845.
- (3) S. L. T. Alec J. Jeffreys, Victoria Wilson (1985). "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA," *Nat. vol.*, vol. 314.
- (4) J. S. Wayne and R. M. Fourney (1990). "Identification of complex DNA polymorphisms based on variable number of tandem repeats (VNTR) and restriction site polymorphism," *Hum. Genet.*, vol. 84, no. 3, pp. 223–227.
- (5) Y. Nakamura, K. Koyama, and M. Matsushima (1998). "VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators," *J. Hum. Genet.*, vol. 43, no. 3, pp. 149–15.
- (6) S. Hempling (2006). "Forensic DNA Typing. Biology, Technology and Genetics of STR Markers," *J. Clin. Forensic Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 100–101.
- (7) A. J. Brookes (1999). "The essence of SNPs," *Gene*, vol. 234, no. 2, pp. 177–186.
- (8) A. E. Alain VIGNAL, Denis MILAN, Magali SANCRISTOBAL (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics," *Genet. Sel. Evol.*, vol. 35, pp. 275–305.
- (9) D. D. E. Büken (2009). *Adli Tıpta Genetik Araştırmalar*, vol. 22.
- (10) J. M. Butler (2012). "Short Tandem Repeat Markers," *Fundam. Forensic DNA Typing*, pp. 147–173.

- (11)I. A. Arif et al. (2010). "A brief review of molecular techniques to assess plant diversity.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 5, pp. 2079–96.
- (12)A. SERİN, H. CANAN, and B. ALPER (2013). "Adli Amaçlı Kimliklendirmede Mitokondriyal DNA," vol. 10, no. 2.
- (13)C. Ün, K. Wimmers, and K. Schellander (2000). "Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları," vol. 14, pp. 9–14.
- (14)T. H. E. Short, T. Repeat, L. In, and F. DNA (1980). "Kısa Ardarda Tekrar Eden DNA Dizilerinin Adli Amaçlı DNA Çalışmalarındaki Yeri,"
- (15)T. J. Pemberton, C. I. Sandefur, M. Jakobsson, and N. A. Rosenberg (2009). "Sequence determinants of human microsatellite variability," *BMC Genomics*, vol. 10, pp. 31–36.
- (16)MCB, "<http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb41/lecture19.pdf>."
- (17)X. Lin, J. Wu, H. Li, Z. Wang, and J. M. Lin (2013). "Determination of mini-short tandem repeat (miniSTR) loci by using the combination of polymerase chain reaction (PCR) and microchip electrophoresis," *Talanta*, vol. 114, pp. 131–137.
- (18)T. R. Moretti, A. L. Baumstark, D. A. Defenbaugh, K. M. Keys, J. B. Smerick, and B. Budowle (2015). "Validation of Short Tandem Repeats (STRs) for Forensic Usage: Performance Testing of Fluorescent Multiplex STR Systems and Analysis of Authentic and Simulated Forensic Samples," *J. Forensic Sci.*, vol. 46, no. 3, p. 15018.
- (19)O. Henegariu, N. A. Heerema, S. E. Floughy, G. H. Vance, and P. H. Vogt (1997). "Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol," *Biotechniques*, vol. 23, no. September, pp. 504–511.
- (20)W. Rychlik, W. J. Spencer, and R. E. Rhoads (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA.pdf," vol. 18, no. 21, pp. 6409–6412.

- (21) Life Technologies Corporation (2015). "AmpFISTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit User Guide," Appl. Biosyst. Life Technol., vol. F, no. 4440211, pp. 1–148.
- (22) D. R. Hares (2015). "Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States," Forensic Sci. Int. Genet., vol. 17, pp. 33–34.
- (23) G. Filoglu et al. (2017). "Application of next generation sequencing in forensic science (Yeni nesil dizilemenin adli bilimlerde kullanimi)," Med. Sci. | Int. Med. J., vol. 6, no. 1, p. 1.
- (24) Z. Wen, C. Baowen, and X. Bingying (2017). "Application of next-generation sequencing technology in forensic science," Chinese J. Forensic Med., vol. 32, no. 1, pp. 40–43.
- (25) J. M. Butler (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.
- (26) K. Staley (2005). "The Police National DNA Database," GeneWatch, p. 58.
- (27) J. M. Butler, Fundamentals of Forensic DNA Typing. 2009.
- (28) "<https://strbase.nist.gov/fbcore.htm>."
- (29) C. Promega, PowerPlex® 16 System.
- (30) Promega Corporation, PowerPlex® Fusion System Technical Manual.
- (31) Applied Biosystems™ (2016). "GlobalFiler™ PCR Amplification Kit User Guide - User Guide," vol. 4476135, no. 4477604, pp. 1–166.
- (32) V. C. Tucker et al. (2011). "Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16 and PowerPlex® ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard," Forensic Sci. Int. Genet., vol. 5, no. 5, pp. 436–448.
- (33) D. Y. Wang, C. W. Chang, R. E. Lagacé, L. M. Calandro, and L. K. Hennessy (2012). "Developmental Validation of the AmpFISTR® Identifier® Plus PCR

Amplification Kit: An Established Multiplex Assay with Improved Performance,” J. Forensic Sci., vol. 57, no. 2, pp. 453–465.

(34) C. R. Hill et al. (2007). “Concordance study between the AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ MiniFiler TM PCR amplification kit and conventional STR typing kits,” J. Forensic Sci., vol. 52, no. 4, pp. 870–873.

(35) “<http://www.interlabservice.ru/solutions/criminalistics/nabory-reagentov-dlya-amplifikatsii-str-lokusov.php>.”

(36) U. Verogen, San Diego (2015). ForenSeq TM DNA Signature Prep Guide.

(37) F. Aşıcıoğlu, S. T. Koluvaçık, Ü. Çetinkaya, and F. Akyüz (2002). “Kapiller Elektroferez Teknolojisinin Klinik ve Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanımı: Geleneksel jel elektroferez yöntemi ile karşılaştırma,” Adli Tıp Derg., vol. 16, no. 1–4, pp. 88–93.

(38) J. M. Butler, E. Buel, F. Crivellente, and B. R. McCord (2004). “Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis,” Electrophoresis, vol. 25, no. 1011, pp. 1397–1412.

(39) E. Buel, M. LaFountain, and M. Schwartz (2015). “Using Resolution Calculations to Assess Changes in Capillary Electrophoresis Run Parameters,” J. Forensic Sci., vol. 48, no. 1, p. 200.

(40) “<http://www.princetechnologies.eu/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/>.”

(41) G. Tatlıcı, A. Kibaroğlu (2006). “Adli Bilimlerde Kapiler Elektroferez Uygulamalarında Son Gelişmeler,” Türkiye Klinikleri J Foren Med. s.65-71

(42) C. J. Chang et al. (2011). “Applied Biosystems 3500 / 3500xL Genetic Analyzer User Guide User Guide.,” vol. 156, no. August, pp. 1–10.

(43) “<https://slideplayer.com/slide/10594128/>.”

- (44) “<https://www.griffith.edu.au/griffith-sciences/dna-sequencing-facility/services/fragment-analysis-service>.”.
- (45) “<https://www.semanticscholar.org/paper/Scoring-microsatellite-loci.-Flores-Rentería-Krohn/2be7a15e2a0ffaf148fa50a3f2c9f806d22e47d4/figure/1>.”.
- (46) “<https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/genetic-identity-workflow/str-amplification/internal-lane-standard-600/?catNum=DG1071>.”.
- (47) John M. Butler (2003). “The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA” *J. Forensic Sci.*, vol. 48, no. 5.
- (48) “https://strbase.nist.gov/pub_pres/KlineAAFS2005.pdf.”.
- (49) Travis C. Glenn (2006). “Directly tagging PCR primers with fluorescent dyes, Travis C. Glenn, Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design”.
- (50) N. Zhang (1996). “Genetic Typing by Capillary Electrophoresis with the Allelic Ladder as an Absolute Standard”., *Anal. Chem.*
- (51) T. Moretti (2001). “Validation of Short Tandem Repeats (STRs) for Forensic Usage: Performance Testing of Fluorescent Multiplex STR Systems and Analysis of Authentic and Simulated Forensic Samples”., *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 46, No. 3.
- (52) “<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/visualizing-and-characterizing-dna-rna-and-protein/>”
- (53) F. Tagliaro (1996). “Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis”., *Forensic Science International*, Vol. 77, Issue 3.

EK-1 Etik Kurul Kararı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

İstanbul/...../.....

Sayı : 83045809/ 879
Konu:


10 Ocak 2014

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü
Müdürlüğüne

İLGİ: 19.12.2013 tarihli, 2024 sayılı yazımıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Yard.Doç.Dr Gönül FİLOĞLU'nun danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr. Hüseyin KARADAYI'nın sorumluluğunda yürütülecek olan " DNA Kimliklendirmesi Amacıyla Kullanılmak Üzere 18 Lokuslu (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D14S1434) Kit Geliştirilmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında adı geçen enstitü Müdürlüğünden alınan 19.12.2013 tarihli, 2024 sayılı yazı ve eklerinin ilgi yazımız ve ekleri 07 Ocak 2014 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

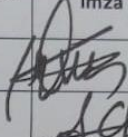
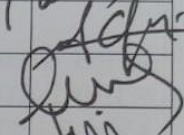
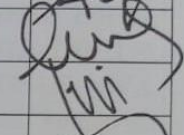
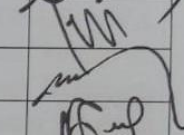
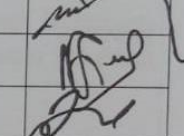
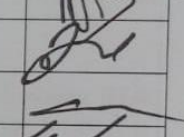
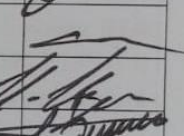
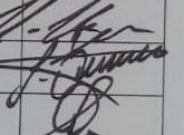
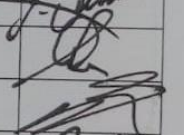
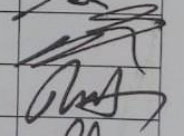
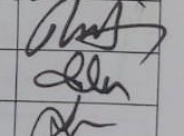
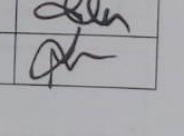
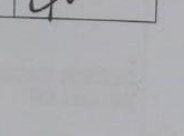
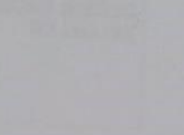
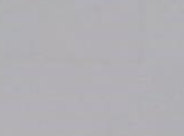

 Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
 Klinik Araştırmalar
 Etik Kurulu Başkanı

Eki
1 dosya

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Adli Tıp Enstitüsü
GELEN EVRAK
Sayı : 2014/109
Tarih : 21.1.2014
Jenna H.

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:etfetik@istanbul.edu.tr.

EK-1 Etik Kurul Kararı (Devamı)

	Karar No: A-28	Tarih:07 Ocak 2014				
KARAR BİLGİLERİ	Yard.doç.Dr. Gönül FİLOĞLU'nun danışmanlığında Mol.Biyolog Hüseyin KARADAYI'nın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.					
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Muhlis Çem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sebahattin SAIP	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nuran Şenel BEŞE	Radyasyon Onkolojisi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sibel Özmen ÖZYAZGAN	Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusuf TUNALI	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Mutlu NİYZAZOĞLU	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Zümrüt GAMLİ	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
* :Araştırma ile ilişki		** :Toplantıda Bulunma				

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Hüseyin	Soyadı	Karadayı
Doğ.Yeri	Boyabat	Doğum Tarihi	16.06.1974
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	66157141034
Email	hukaradayı@yahoo.com	Tel.	0535 472 6597

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	1999
Lise	Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Görevi	Süre
1.	Genetiks Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi	ArGe Müdürü	2018-2019
2.	Heliks ArGe ve Biyoteknoloji Sanayi Tic. A.Ş.	Genel Müdür	2011-2019
3.	İstanbul Genetik Grubu	Lab. Sorumlusu	2009-2011
4.	İstanbul Memorial Hastanesi	PGT Sorumlusu	2000-2007

Yabancı Dilleri

	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi
Almanca	Başlangıç Düzeyi	Başlangıç Düzeyi	Başlangıç Düzeyi

Katıldığı Kongreler:

- § X. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. 20-23 Aralık 2012, Bursa
- § IX. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi,2010, İstanbul
- § VIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,2008, Çanakkale
- 6th European Cytogenetics Conference,2007, İstanbul
- VII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,2006, Kayseri
- World IVF Congress,2005, İstanbul
- 6th International Symposium on Preimplantation Genetics, 2005, London
- 60th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2004
- TSRM 1'nci Uluslararası Üreme Tıbbi Kongresi,2004, İstanbul
- VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2004, Antalya
- Preimplantation HLA Typing & Stem-Cell Transplantation. 2004, Limassol, Cyprus
- 5th International Symposium on Preimplantation Genetics, 2003, Antalya