

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

**Danışman: Yard.Doç.Dr.Havva Altunçul**

**SNaPshot MİNİSEKANSLAMA TEKNİĞİ  
KULLANILARAK  
MİTOKONDRIYAL DNA'DA  
SNP LOKUSLARININ ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Doruk Argaç  
Moleküler Biyolog**

**İstanbul-2009**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin gerçekleştirilmesinde katkısı bulunan İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Müdürü sayın Prof.Dr. İmdat ELMAS ve İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr.Salih CENGİZ'e, tezimin hazırlanması süresince değerli katkı ve yardımlarından dolayı danışman hocam sayın Yard.Doç.Dr. Havva ALTUNÇUL'a, tez çalışmamın yürütülmesinde benimle paylaştıkları bilgilerinden dolayı Araş.Gör.Selda MERCAN ve Gülten RAYİMOĞLU'na, bu çalışmada bana sağladıkları her türlü destek ve moral için çok değerli arkadaşlarım Araş.Gör. Özlem BÜLBÜL ve M. Saqib SHAHZAD'a ayrıca bana her zaman destek olup sabır ve sevgilerini hiç esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Doruk ARGAÇ

Bu tez çalışması T-1738 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar

Şekil Listesi

Tablo Listesi

<b>I. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>II. GENEL BİLGİ</b>	2
2.1. Mitokondriyal DNA'nın Adli Bilimler Açısından Önemi	4
2.2. Mitokondriyal DNA Analizinde Kullanılan Yöntemler	9
2.1.1. Mitokondriyal DNA Dizin Analizi	9
2.2.2. SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi)	11
2.2.3. Adli Bilimlerde SNP'lerin Kullanımı	12
2.2.4. SNP Analizinde Kullanılan Yöntemler	13
A. Alel Spesifik Hibridizasyon (ASH)	14
A.1. FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) Yöntemiyle Hibridizasyon	15
A.2. Dizi Hibridizasyonu ve Floresan Deteksiyon	17
B. Primer Uzaması Reaksiyonu	18
B.1. Minisekanslama Reaksiyonu	19
B.2. Pirosekanslama (Pyrosequencing)	22
B.3. Alel Spesifik Uzama Reaksiyonu	23
C. Alel Spesifik Oligonükleotid Bağlama	23
D. İnvazif Kesilme	24
2.3. Mitokondriyal DNA Analizinde Multipleks PCR	26
2.3.1. PCR Optimizasyonu	26
2.3.2. PCR'da Karşılaşılan Kontaminasyon	28
<b>III. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	31
3.1. DNA Çekilmesi	32
3.2. DNA Miktar Tayini	32

3.3. PCR Yöntemi ile DNA'nın Çoğaltılması	32
3.3.1. PCR Hazırlık Aşamaları-Birinci ve İkinci PCR Primer Karışımlarının Hazırlanması	33
3.3.2. Birinci PCR Aşaması	37
3.4. Birinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	38
3.5. İkinci PCR Aşaması (Uzama Reaksiyonu)	39
3.6. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	40
3.7. İkinci PCR Ürünlerinin Elektroforezi	40
3.7.1. Elektroforez Parametrelerinin Ayarlanması	40
3.7.2. PCR Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması	41
3.8. Verilerin Analizi	41
<b>IV. BULGULAR</b>	42
<b>V. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	53
<b>VI. ÖZET</b>	59
<b>VII. SUMMARY</b>	60
<b>VIII. KAYNAKLAR</b>	61
<b>EKLER</b>	70
<b>Ek 1. Modifiye Fenol-Kloroform-İzoamil alkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu</b>	70
Kurumuş Kan Lekesinden DNA İzolasyonu	
<b>Ek 2. DNA Miktarının Belirlenmesinde Spektrofotometrik Ölçümün Yapılması</b>	72
<b>Ek 3. Birinci PCR Primerlerinin Seçimi</b>	73
İkinci PCR Primerlerinin Seçimi	
<b>Ek 4. SNaPshot Multipleks Kit İçeriği</b>	74
<b>Ek 5. SNaPshot Multipleks Kit İçeriğinde Yer Almayan Materyaller</b>	75
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	76

## KISALTMALAR

A	Adenin
ASO	Alel spesifik oligonükleotid hibridizasyon
ATP	Adenozin tri fosfat
bç	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumin (bovine serum albumin)
C	Sitozin
CCD	Yük bindirilmiş düzenek (charged coupled device)
CO	Sitokrom c oksidaz
Cytb	Sitokrom b
DNA	Deoksiribonükleik asit
D-loop	Displacement loop
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleotid trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDNAP	European DNA Profiling Group
Ekzo I	Ekzonükleaz I
FP	Floresan polarizasyon
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
G	Guanin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-performance liquid chromatography)

HVI/HVII	İleri değişken bölge I/II (Hypervariable region I/II)
LC	Light Cycler
M	Molarite
MALDI-TOF	Matriks destekli lazer ayrılma/uçuşun iyonizasyon zamanı (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight)
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MS	Kütle spektrofotometresi (mass spectrofotometry)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADH	Nikotinamit adenin dinükleotit indirgenmiş formu
nDNA	Nüklear DNA
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (polimerase chain reaction)
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphisms)
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
rRNA	Ribozomal RNA
SAP	Shrimp (karides) alkalin fosfataz
SBE	Tek baz uzaması (single base extension)
SDS	Sodyum dodesil sülfat (Sodyum lauril sülfat)
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism)
STR	Kısa Tekrar Dizileri (Short tandem repeats)
T	Timin
Tm	Primer bağlanma sıcaklığı
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultraviyole
V	Hacim

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MtDNA'nın yapısı	4
Şekil 2. MtDNA'da heteroplazmi	7
Şekil 3. DNA dizin analizi	10
Şekil 4. Otomatik DNA dizinlemesine örnek	10
Şekil 5. Alel spesifik hibridizasyon	15
Şekil 6. Light Cycler, Taqman ve moleküler işaretçi yöntemleri	18
Şekil 7. Minisekanslama tekniğinin şematik olarak gösterimi	20
Şekil 8. Pirosekanslama yönteminin şematik olarak gösterimi	23
Şekil 9. Oligonükleotid bağlama reaksiyon şeması	24
Şekil 10. İnvazif kesilme reaksiyon şeması	25
Şekil 11. SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucu elde edilen elektroforegram	42
Şekil 12a. Eşit uzama primer konsantrasyonlarında elde edilen elektroforegram	45
Şekil 12b. Dengelenmiş uzama primer konsantrasyonlarında elde edilen elektroforegram	45
Şekil 13a. SAP inkübasyon süresi 40 dakika iken elde edilen elektroforegram	46
Şekil 13b. SAP inkübasyon süresi 70 dakika iken elde edilen elektroforegram	46
Şekil 13c. SAP inkübasyon süresi 90 dakika iken elde edilen elektroforegram	47
Şekil 14a. SNaPshot reaksiyon karışımı (5 µL) kullanıldığında elde edilen elektroforegram	47
Şekil 14b. SNaPshot reaksiyon karışımı (2.5 µL) kullanıldığında elde edilen elektroforegram	48
Şekil 15. Tüm parametreler optimize edildiğinde 10 SNP noktasının görünümü	48
Şekil 16. Kontrol DNA'ların karşılaştırılması sonucu her bir bazın görünümü	49

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> SNP'lerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin sınıflandırılması	14
<b>Tablo 2.</b> Floresan işaretli ddNTP'lerin analiz edildiği renkler	21
<b>Tablo 3.</b> Birinci PCR primer ana stok (100 µM) hazırlama tablosu	33
<b>Tablo 4.</b> İkinci PCR uzama primer ana stok (100 µM) hazırlama tablosu	34
<b>Tablo 5.</b> Birinci PCR primerleri	35
<b>Tablo 6.</b> İkinci PCR primerleri (uzama primerleri)	36
<b>Tablo 7.</b> Uzama primer karışımındaki her bir primerin dengelenmiş konsantrasyonu	36
<b>Tablo 8.</b> Birinci PCR karışım tablosu	37
<b>Tablo 9.</b> Birinci PCR parametreleri	38
<b>Tablo 10.</b> İkinci PCR karışım tablosu	39
<b>Tablo 11.</b> İkinci PCR parametreleri	40
<b>Tablo 12.</b> GeneScan E5 modül parametreleri	41
<b>Tablo 13.</b> SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen son ürün özellikleri	43
<b>Tablo 14.</b> SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol bilinen son ürün uzunluğu ile PCR sonrası gözlenen son ürün uzunluğu karşılaştırması ve standart sapması	44
<b>Tablo 15.</b> 10 SNP noktasında beklenen polimorfizmler, son ürün uzunlukları ile çalışılan pozitif kontrol ve örneklerin son ürün uzunluklarının karşılaştırması	50
<b>Tablo 16.</b> Bağlantısız 20 bireyin 10 SNP noktasına göre genotipleri	51
<b>Tablo 17.</b> Aile genotipleri	52



## I. GİRİŞ ve AMAÇ

Adli bilimler olay yerinden başlayıp mahkemelerde sonuçlanan sürecin bir parçasını oluşturmaktadır. Multidisipliner bir alan olan adli bilimlerde adli moleküler biyoloji ve genetik bilimi, teknolojinin de gelişmesiyle hızlı bir şekilde ilerleme kaydetmektedir (Walsh S.J. 2007). Adli biyoloji, adli bilimler için oldukça önemlidir. Olay yerinden elde edilen biyolojik delillerin (kan, tükürük, semen, kemik, diş, saç, mukus, tırnak, idrar, dışkı vb.) analiz edilip olayın aydınlatılmasında (suçlu ve/veya mağdura ulaşılması) rol oynamaktadır. Adli bilimlerde kimliklendirme ve nesep tayini amacı ile ilk kullanılan sistemler kan grupları, lökosit antijenleri, polimorfik eritrosit enzimleri ve serum proteinleridir. Günümüzde ise yaygın olarak nükleer DNA (nDNA) kullanılmaktadır. Ancak bazı olgularda elde edilen biyolojik materyallerde nDNA'nın tamamen yok olduğu veya analiz için uygun olmadığı belirlenmektedir. Bu durumda olayın çözümlenmesinde hücrede yüzlerce kopyası bulunan, maternal kalıtımı olan ve nDNA'ya göre 10-17 kat daha fazla mutasyon gösteren mtDNA'dan faydalanılmaktadır (Carrecado A. ve ark. 2000, Kline ve ark. 2005, Daştan K. 2006). Ayrıca evrim çalışmaları, göç yollarının belirlenmesi, doğal afetlerde kimliklendirilme yapılması, medikal alanda hastalıkların araştırılması gibi birçok alanda da mtDNA'dan önemli bilgiler elde edilmektedir (Butler J.M. 1998, Quintana's B. ve ark. 2004).

Bu çalışmanın amacı, 10 SNP noktasının (477, 3010, 4580, 4793, 5004, 7028, 7202, 10211, 12858 ve 14470) Türk toplumuna ait çalışmalarda kullanılabilmesi için uygunluğunun belirlenmesidir. Ayrıca, kimliklendirme yapılmasında mtDNA'da yer alan SNP'lerin (single nucleotide polymorphism-tek nükleotid polimorfizmi) kullanılmasına olanak sağlayacak, aynı zamanda adli bilimler laboratuvarlarında uygulanabilecek şekilde ucuz, hızlı, duyarlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve pratik bir yöntem olan SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyon çalışmasının yapılmasıdır.

## II. GENEL BİLGİ

Mitokondri, hücrenin enerji mekanizmasında ve hücre solunumunda (oksidatif fosforilasyon-OXPHOS) görev alan bir organeldir. Mitokondrilerin hücredeki yeri ve sayısı enerji ihtiyacına göre değişir. Birçok hücrede sayıları 200-400 arasında bulunurken bazı hücrelerde ise binlerce olabilir. Örnek olarak, daha fazla enerji gerektiren kas hücrelerinde sayıları daha fazladır (Karol S. ve ark. 2000, Kobilinsky L. 2005).

Mitokondrinin diğer bir önemli özelliği ise kendi DNA'sının bulunmasıdır. İnsanlarda mtDNA yaklaşık 16,569 baz çifti içeren, çift iplikli ve kapalı, halkasal bir moleküldür (Butler J.M. 2001, Morovvati S. ve ark. 2007). Çift sarmal yapısı, sarmalın iç kısmında yer alan ve moleküler ağırlığı düşük olan sitozince zengin hafif zincir (L) ile sarmalın dışında yer alan ve moleküler ağırlığı fazla olan guanince zengin olan ağır iplikten (H) oluşur (Şekil 1) (Passarge E. 1994).

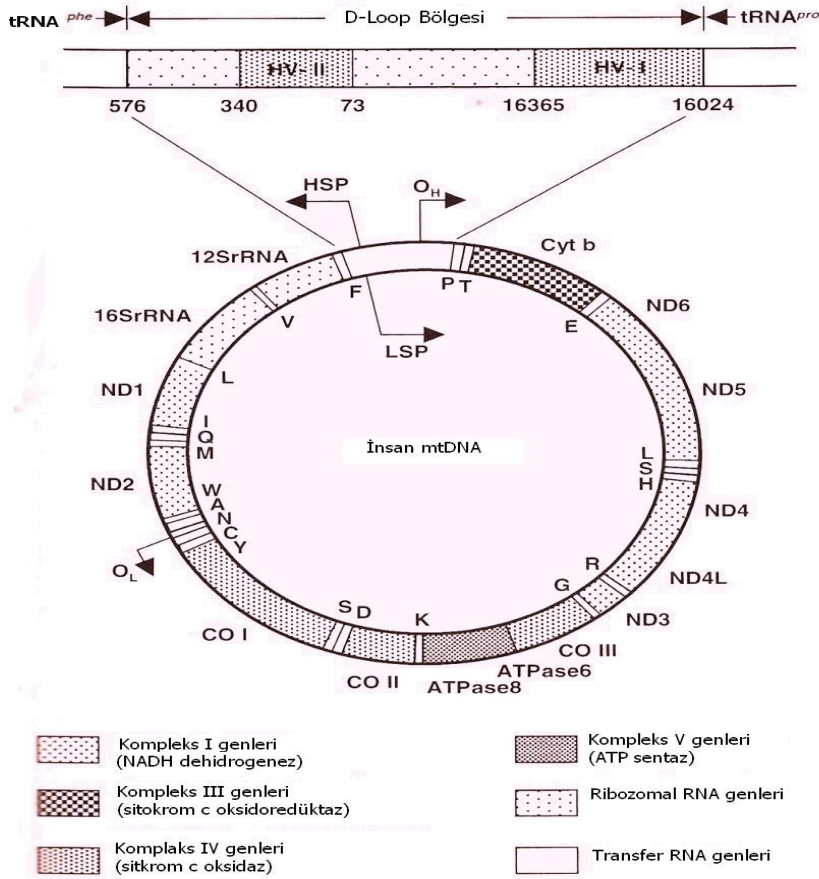
MtDNA kendini yarı korunumlu (semikonservatif) olarak eşler ve hücrenin bir organeli olmasına rağmen yarı otomatik bir genetik sistemi vardır (Klug W.S. ve ark. 2003). Mitokondrinin kendi replikasyonunu gerçekleştirecek DNA polimerazı (mtDNA polimeraz) bulunmaktadır. MtDNA'da genel olarak rekombinasyon görülmez. Bu nedenle tek bir lokus gibi (haploid) kabul edilir ve mutasyonla değişimlerin oluşması dışında jenerasyonlar boyunca değişmeden kalır (Carrecado A. ve ark. 2000, Daştan K. 2006, Rudin N. ve ark. 2002, Vallone P.M. ve ark. 2004). Bu özelliği nedeniyle antropolojik çalışmalarda, evrim ile ilgili araştırmalarda, göç yollarının belirlenmesinde önemli bir avantaja sahiptir.

Mitokondrinin gerçekleştirdiği OXPHOS, karbonhidrat ve yağlarda bulunan hidrojenlerin okside edilmesiyle ATP ve O<sub>2</sub> elde edilmesi işlemidir. Bu reaksiyonda kullanılan enzim komplekslerinin genlerinin bir kısmı mtDNA'da yer alırken büyük bir kısmı nDNA tarafından kodlanır ve daha sonra kodlanan proteinler mitokondriye geçer (Wallace D.C. 1994). MtDNA protein kodlayan 13 bölgeye sahiptir ve OXPHOS için gerekli olan 37 gen içermektedir (Butler J.M. 2001, Morovvati S. ve ark. 2007). Bu genlerden 3 tanesi sitokrom c oksidaz kompleksini (COI, COII, COIII), 1 tanesi sitokrom b (Cytb), 2 tanesi ATPaz kompleksinin alt ünitelerini (ATPase6, ATPase8), 7 tanesi NADH dehidrojenazın alt ünitelerini (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6), 22 tanesi tRNA ve 2 tanesi de rRNA (12S ve 16S rRNA) kodlamaktadır (MITOMAP, Passarge E. 1994). MtDNA nDNA'da olduğu gibi intron içermez, yani genler arasında kodlamayan bölgeler yoktur. Bir genin son bazını hemen diğer genin ilk bazı takip eder. Hatta bazı durumlarda bir baz için genler çakışabilir ve bir genin son bazı başka bir genin ilk bazı

olabilir. Genler genelde saat yönünde okunur ve birçok kodlama yapan gen ağır zincirde yer almaktadır (Lewin B.1997, Kobilinsky L. ve ark. 2005).

MtDNA'da kodlama yapan bölge dışında kodlama yapmayan ve D-Loop (displacement loop) adı verilen kontrol bölgesi bulunmaktadır. D-loop üçlü sarmal yapıdadır. Burada, ağır ipliği transkribe eden PH1 ve hafif ipliği transkribe eden PL promotorları yer alır (Chang D.D. ve ark. 1986). Kontrol bölgesi içinde iki segment vardır. Bu iki bölge insan popülasyonunda yüksek değişken özelliktedir ve bunlar 'İleri Değişken Bölge I' (Hypervariable Region I-HVI) ve 'İleri Değişken Bölge II' (Hypervariable Region II-HVII) olarak isimlendirilmektedir (Saferstein R. 2001, Rudin N. ve ark. 2002) (Şekil 1). Kodlama yapmayan ve yüksek değişkenlik gösteren HVI ve HVII bölgeleri adli bilimler için önem taşımaktadır. Bu bölgeler bireyler arasında farklılık gösterir ve bu nedenle kimliklendirmede faydalanılmaktadır (Butler J.M. 2001). Ancak bu bölgenin bireyler arasında dışlama yapabilme kapasitesi sınırlıdır (kodlama yapmayan kontrol bölgesinin HVI/HVII kısmını içeren ~610 baz çiftlik bölümünü kapsar) (Vallone P.M. ve ark. 2004). Aynı şekilde evrim çalışmalarında da sınırlı bilgi sağlar. MtDNA'nın tamamı incelendiğinde ayırım gücünün artacağı bilinen bir gerçektir. Ancak mtDNA'nın tamamının dizinlenmesi de pratik olmadığından ve uzun zaman aldığından dolayı tercih edilmemektedir. Günümüzde adli bilimler alanında mtDNA'nın ayırım gücünü arttırmak amacıyla kodlayan ve kodlama yapmayan bölgelerde tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) inceleyen yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (Quinta'ns B. ve ark. 2004, Nilsson M. ve ark. 2008).

Nüklear DNA analizinin yapılamadığı bazı durumlarda; yüksek oranda bozulmuş olan örneklerde, dökülmüş saçlarda veya anne tarafından akrabalarda yapılan karşılaştırmalar için adli bilimlerde mtDNA'nın kullanımı artmaktadır (Vallone P.M. ve ark. 2004). MtDNA analizi pek çok davanın ve tarihi öneme sahip vakaların (Rus Çarı II.Nicholas'ın kimliklendirilmesi vb.) aydınlatılmasında kullanılmıştır. MtDNA analizi A.B.D. mahkemelerinde ilk olarak Tennessee eyaletinde 1996 yılının Ağustos ayında kullanılmıştır. Paul Ware adlı 27 yaşındaki biri, 4 yaşındaki bir kız çocuğuna tecavüz etmek ve onu öldürmek ile suçlanmıştır. Zanlının üzerinde kurbanı ait kan ve kurban üzerinde de zanlıya ait sperm bulunamamıştır. Otopside kurbanın boğazında kırmızı renkli bir kila rastlanmıştır. Olay yerindeki yatakta buna benzer başka kıllarda elde edilmiştir. MtDNA testleri bu kılların birbiriyle eşleştiğini ve sanıkla da uyduğunu kanıtlamış ve böylece suçlu belirlenmiştir (Kobilinsky L. ve ark. 2005). Günümüzde ise mtDNA'nın tamamının dizinlenmesi yerine veya bazı durumlarda HV1/HV2 bölgelerinin analizi



Şekil 1. MtDNA'nın yapısı (Matsuda H. ve ark. 2007).

yanında mtDNA'da bulunan çeşitli SNP setleri de çalışılarak ayırım gücü artırılmakta ve böylece vakaların aydınlatılması sağlanmaktadır.

Adli bilimlerde olayların çözümünde mtDNA'nın farklı şekillerde kullanımı ile ilgili çalışmalarda mevcuttur. Örnek olarak, böceklerin mtDNA'sı üzerinde yapılan bazı çalışmalar sonucunda türleri belirlenebilmektedir. Böylece türlerin beslenme ve yaşam döngüleri göz önüne alınarak kan emen veya cesetlerle beslenen eklembacaklıların (kurtçuk veya böcek) midelerinde bulunan insan kaynaklı kan veya doku artıklarından kişinin kimliklendirilmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Wells J. D. ve ark. 2001). Bu şekilde şüpheli ile kurban ve olay yeri arasındaki bağlantılar kurulabilir.

## 2.1. Mitokondriyal DNA'nın Adli Bilimler Açısından Önemi

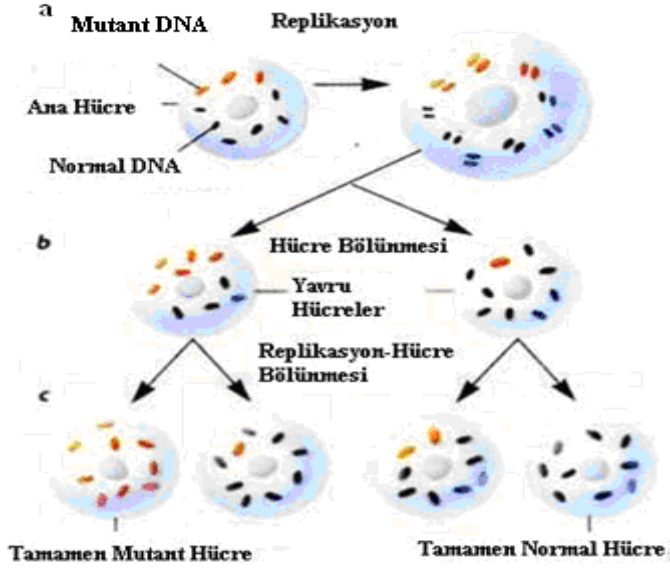
MtDNA'nın sahip olduğu bazı özellikler adli bilimler alanında onu önemli bir araştırma konusu haline getirmiştir. Bunlar;

- Sadece iki kopya taşıyan otozomal kromozomlarla karşılaştırıldığında, mtDNA hücre içinde çok sayıda kopya sayısına sahiptir (her hücrede yaklaşık  $10^3$ - $10^4$  kopya bulunmaktadır). Bu sayede olay yerinden elde edilen ve yüksek oranda bozulmuş olması nedeniyle nDNA analizi yapılamayan biyolojik örneklerde veya saç, diş, kemik gibi DNA miktarının az olduğu örneklerde mtDNA analizi ile kimliklendirme yapılabilmektedir (Pfeiffer H. ve ark. 1998, Quintana B ve ark. 2004).
- MtDNA, maternal kalıtım (anne tarafından aktarılma) gösterir. Spermin sitoplazma içermemesi ve mitokondrilerinin fertilizasyona katılmayan kuyruk kısmında toplanması nedeniyle zigotdaki mitokondriler sadece ovuma aittir. Anne tüm çocuklarına mtDNA'sını aktarırken, sadece kız çocuklar bunu ikinci kuşağa aktarabilir ([www.genbilim.com/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=39](http://www.genbilim.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=39)). Yani annenin mtDNA'sında var olan polimorfizm çocuklarına aynen aktarılır. MtDNA'nın bu özelliği sayesinde maternal örnek ile şüpheli örneğin karşılaştırılması sonucunda dışlama veya kimliklendirme yapılabilir (Carrecado A. ve ark. 2000). Bu durum özellikle deprem, sel gibi doğal afetlerde veya uçak kazası, yangın gibi olaylarda bireylerin kimliklendirmesinde büyük önem taşır. Çünkü bu tür vakalarda olay yerinde bulunan cesetler tanınmayacak durumda olabilir veya nDNA ile yapılan analizler sonuç vermeyebilir. Bu nedenle, o kişinin anne tarafındaki yakınlarından alınan referans örnek ile yapılan karşılaştırma sonucu kimliklendirme yapılabilir. Bunun nedeni, aynı maternal soydan gelen kişilerin aynı mtDNA profiline sahip olmasının beklenmesidir. Ancak, son yıllarda mtDNA kalıtımında paternal bir etkininde olabileceği yönünde çeşitli araştırma ve görüşler de bulunmaktadır (Gyllensten U. ve ark. 1991, Schwartz M. ve ark. 2002, Bandelt H.J ve ark 2005). Sadece maternal kalıtım göstermesi sebebiyle mtDNA hemizigot, haploid veya monoklonal özellik gösterir. Bu özellik evrim çalışmaları, göç yollarının belirlenmesi, çeşitli antropolojik çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Ayrıca mutasyonlarla yeni değişimler oluşmasına rağmen insanlarda mtDNA'da genelde rekombinasyon görülmez. Hem maternal kalıtım göstermesi hem de rekombinasyon görülmemesi nedeniyle mtDNA nesiller boyunca değişmeden aktarılır ve bu özelliğinden faydalanılarak kimliklendirme yapılabilir (Rudin N. ve ark. 2002, Kobilinsky L.ve ark. 2005).
- MtDNA'nın mutasyon hızı nDNA'ya göre daha fazladır. Özellikle yüksek değişken bölgeler olan HV1/HV2 bölgeleri nDNA'ya göre 10 kat fazla mutasyon oranı gösterir.

Mutasyon hızının bu kadar yüksek olmasının nedeni mtDNA'da histon proteinleri bulunmadığından dolayı kimyasal etmenlerden çok daha fazla etkilenmesi, mtDNA'nın aerobik metabolizması esnasında oluşan süperoksit, hidroksi radikaller, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitlerinin mtDNA'da hasara neden olup mutajenik etki göstermesi ve mtDNA'nın nDNA gibi etkin bir tamir sistemine sahip olmamasıdır (Cıtak E.Ç. 2000). Ancak mtDNA'nın sahip olduğu yüksek mutasyon oranı kişilerin kimliklendirilmesi için oldukça kullanışlıdır.

- MtDNA'nın diğer bir önemli özelliği ise heteroplazmi göstermesidir. Maternal kalıtım özelliğine göre mtDNA'nın tüm kopyaları maternal akrabaları ile aynı olmalıdır. Ancak yüksek mutasyon oranı sebebiyle bazen aynı mitokondride, hücrede, dokuda veya bireyde iki veya daha fazla mtDNA tipi görülebilir. Buna heteroplazmi denir (Brandstätter A., Walther P. 2003). Eğer tüm mtDNA'lar aynı ise bu duruma da homoplazmi adı verilir. Şekil 2'de heteroplazmik (hem mutant hem normal mtDNA içeren hücre) bir hücrede bulunan mtDNA'ların kalıtımı gösterilmektedir. Mitokondri bölünme aşamasına geldiğinde ilk önce hücrede bulunan mutant ve normal mtDNA'lar replikasyona uğrar (a) ve daha sonra hücre bölünmesi gerçekleşir. Bu esnada normal ve mutant mtDNA'lar mitokondrilere rastgele olarak dağılır. Aynı şekilde bu mitokondri de hücrelere rastgele dağılır. Oluşan heteroplazmik hücrelerdeki mtDNA'lar tekrar replikasyona uğrar ve sonrasında bölünme gerçekleşir (b). Sonuçta tamamen mutant ve normal mtDNA (homoplazmik) taşıyan hücrelerin yanı sıra heteroplazmik hücrelerde oluşur (c). Ancak homoplazminin oluşabilmesi için mitotik bölünmelerde belli bir sürenin geçmesi gereklidir (Hancock D.K. ve ark. 2005).

Mutasyonlar bireyin hayatı boyu oluşur. Bu nedenle heteroplazmi tüm bireylerde mevcuttur ancak çok düşük seviyelerde olduğunda belirlenemeyebilir. Heteroplazminin bulunması adli açıdan mtDNA analizlerinde önem taşır. Eğer şüpheli örnek ile referans örnek tüm mtDNA pozisyonlarında uyuşup ayrıca aynı noktada heteroplazmi gösteriyorlarsa bu durum mtDNA kanıtını güçlendirir. Ancak, eğer her iki örnekte homoplazmik olarak yorumlanırsa ve dizinde çok küçük bir farklılık varsa (genelde sadece tek bir pozisyonda) sonuç tatmin edici değildir ve daha başka analizler gerektirir (Carrecado A. ve ark, 2000).



**Şekil 2.** MtDNA’da heteroplazmi

([www.carolguze.com/text/44210nontraditional\\_inheritance.html](http://www.carolguze.com/text/44210nontraditional_inheritance.html))

İki çeşit heteroplazmi vardır. İlki, nokta heteroplazmisi (dizin heteroplazmisi)’dir. İki farklı mtDNA topluluğunda bir nükleotid pozisyonunda görülen farklılıktır. Çok yaygın değildir ve kanıtların yorumlanmasında önem taşır. İkinci tip heteroplazmi ise uzunluk heteroplazmisidir. Özellikle HV1 ve HV2’de görülür. MtDNA’da bulunan polisitozin (C-stretch-uzaması) uzamalarının farklı uzunluklarda görülmesidir (Stewart E. ve ark. 2001).

Heteroplazminin derecesi doku türlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Örnek olarak, saç kana göre daha fazla heteroplazmiktir (Paneto G.G. ve ark. 2007). Bu nedenle, saçta mtDNA analizi ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (Salas A. ve ark. 2001, Brandstätter A., Walther P. 2003). Bazı adli olaylar saçta mtDNA analizi ile çözülmektedir. Örnek olarak, 1995 yılında 7 yaşındaki bir kıza tecavüz olayında zanlının belirlenmesinde pubik kılda STR analizi yeterli sonuç vermeyince mtDNA analizi yapılarak suçlu belirlenmiştir (Sizbor R. ve ark. 2006).

Rekombinasyon olmaması nedeniyle mtDNA nesep tayini için populasyonların birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesinde, evrim ile ilgili çalışmalarda, insan türünün nerede ve ne zaman ortaya çıktığı gibi konuların aydınlatılması amacıyla kullanılmaktadır. Başlangıçta söz konusu konuların araştırılmasında Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphisms) analizi yapılırken daha sonraları mtDNA’nın kontrol bölgesinde yer alan HV1 bölümü kullanılarak bilgi edinilmiştir. Son zamanlarda ise mtDNA’nın tamamının dizinlenmesi dünyada tarih öncesi göç yolları hakkında aydınlatıcı

bilgiler sağlamaktadır. Yapılan arařtırmalar, modern insanın 150.000-200.000 yıl önce Afrika'da dođduđunu ve daha sonra dűnyanın deđiřik bűlgelerine farklı zamanlarda gűç ettiđini gűstermiřtir. Diđer önemli bir bulgu ise mtDNA çeřitliliđini en fazla koruyanın Afrika populasyonu olduđunun belirlenmesidir. Bu durum, insanođlunun ilk olarak Afrika'da dođup buradan dűnyaya yayıldıđı teorisini (out-of-Africa) dűřündürmektedir (Wilson M.R. ve ark. 2004). Farklı mtDNA nesilleri genellikle haplogruplar řeklinde sınıflandırılmıřtır. Haplogruplar spesifik genetik varyantlardır. Sıklıkla cođrafik olarak iliřkilidirler. Tűrkiye'de (Anadolu) D-loop bűlgesinin dizinlenmesiyle yapılan bir arařtırmaya gűre Avrupa topluluklarında en sıklıkla gűrűlen haplogruplar űlkemizde de yaygın olarak bulunmaktadır (Mergen H. ve ark. 2004).

MtDNA ile ilgili bazı veritabanları oluřturulmuřtur. MtDNA dizinlemede yaygın bir adli standart ve yűksek kalitede online mtDNA populasyon veri tabanı oluřturmak amacıyla 1999 yılında EDNAP (European DNA Profiling Group) mitokondriyal DNA populasyon veritabanı projesini (EMPOP) bařlatmıřtır ([www.empop.org](http://www.empop.org)). MITOMAP ise insan mitokondriyal genom veritabanıdır ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Tűm insan mtDNA genomunun yanısıra kontrol ve kodlayan bűlgedeki polimorfizmlere, somatik mutasyonlara ait bilgiler yer almaktadır. Bunların dıřında online olarak mtDNA ile ilgili veritabanlarına ulařmak műmkűndűr.

MtDNA medikal alanda da hastalıkların molekűler mekanizmasının belirlenmesi, teşhisi gibi konularda araştırılmaktadır. MtDNA'nın işlevini yerine getirebilmesi için gerekli olan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar birçok kalıtımsal hastalığa neden olmaktadır. Bu nedenle, geçmiş yıllarda mitokondri genetiğinin anlaşılması ve oluşan mutasyonlar ile bunların neden olduğu hastalıkların fenotipleri, kanser ve yaşlanma ile ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır (Wallace D.C. 1995). Özellikle OXPHOS işleminde meydana gelen bir bozukluk yetersiz ATP űretimine neden olabilir. Bundan dolayı, bireye zarar veren semptomlar çoğunlukla fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyan kas ve sinir sistemini etkilemektedir. MtDNA mutasyonları ile ilgili hastalıklarda genellikle heteroplazmi gűzlenir. Mutant DNA'nın dokudaki oranı hastalıkların klinik belirtilerinin şiddetinin farklı olmasına neden olmaktadır. Mitokondriyal genomdaki mutasyonlara ek olarak, burada hastalıklara neden olan bazı nűkleer mutasyonlarda bulunmaktadır. Bunun nedeni, OXPHOS için gerekli olan proteinlerin bűyűk kısmının nDNA tarafından kodlanmasıdır (Nilsson M. 2007).



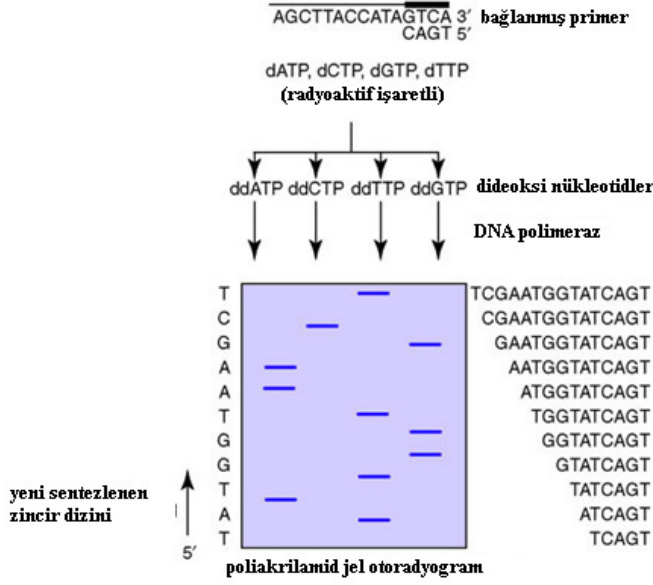
## 2.2. Mitokondriyal DNA Analizinde Kullanılan Yöntemler

MtDNA ilk kez 1981 yılında dizinlenip numaralandırılmıştır (Anderson S. ve ark. 1981). Daha sonra, 1999 yılında tekrar revize edilmiştir (Andrews R.M. ve ark. 1999). <http://www.mitomap.org/mitoseq.html> internet adresinden her iki dizinlemeye de ulaşılabilmektedir.

### 2.2.1. Mitokondriyal DNA Dizin Analizi

DNA dizinlemede farklı teknikler kullanılsa da sıklıkla kullanılan yöntem zincir sonlandırma yöntemidir. Zincir sonlandırma prensibine dayalı olan ve en fazla tercih edilen teknik ise Sanger dideoksi yöntemidir. Bu yöntem 1970'li yıllarda İngiliz bilim adamı Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir. Sanger yönteminde, DNA çeşitli yöntemler ile örnekten çekitlenir, PCR ile çoğaltılır ve elektroforetik aşamada ayırım gerçekleştirilerek genotip tayinine gidilir. Dizin analizinde, PCR ile zincir uzama reaksiyonu için kalıp olarak tek iplikli DNA, primer, DNA polimeraz, floresan veya radyoaktif işaretli dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), PCR tamponu ve değiştirilmiş dNTP'ler olan ddNTP kullanılmaktadır. Zincir uzaması sırasında eğer uzayan zincire dNTP yerine ddNTP bağlanırsa sentez durur. Bunun nedeni, ddNTP'lerin 3' uçlarında -OH grubu olmaması sebebiyle uzayan zincire bir sonraki nükleotid eklenemez ve böylece sentez sonlanır. Bu olay dört nükleotid için farklı tüplerde gerçekleştirilir (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ve her tüpün içinde farklı uzunluklarda aynı ddNTP ile sonlanan zincirler meydana gelir (ddATP, ddCTP, ddGTP veya ddTTP ile sonlanan zincirler). Çoğaltma işlemi bittikten sonra elektroforetik ayırma yapılır. Her bir tüpte yer alan ve farklı ddNTP'ler ile sonlanmış olan zincir grupları, hazırlanmış olan jelde farklı kuyucuklara yüklenir ve elektroforez yapılır. En küçük olan DNA parçası en uzağa giderken, en büyük olan ise jelde en az yürüyendir. Buna göre, jelde aşağıdan yani en küçük DNA parçası ilk olarak okunmaya başlanarak hemen sonrasında gelen bant okunur ve işleme bu şekilde tüm bantlar okununcaya kadar devam edilir. Bu metotta belirleme otoradyografi ile olur (Şekil 3).

Günümüzde otomatik DNA dizinlemesi daha çok tercih edilmektedir. Otomatik dizinlemede dedektör ve bilgisayar programı kullanıldığından insanlardan kaynaklanan hatalar en az düzeye inmektedir. Otomatik dizin analizinde genelde kapiler elektroforez cihazları ve floresan boyalarla işaretli ddNTP'ler kullanılır. ddNTP'ler (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boyalarla işaretleterek sentez tek tüpte gerçekleştirilip, elektroforez tek kuyuda

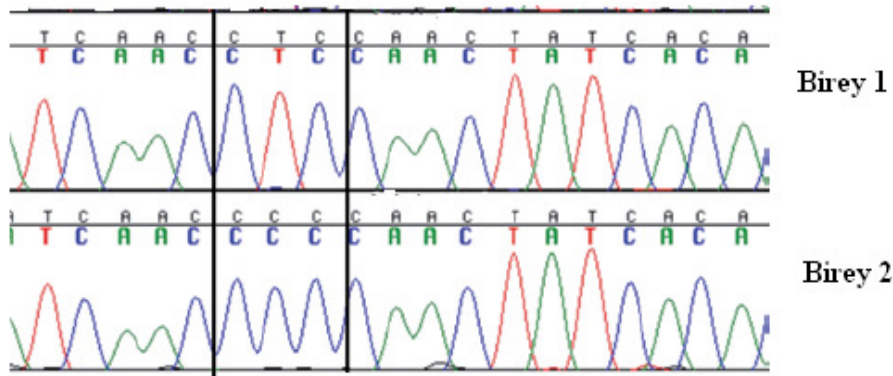


**Şekil 3.** DNA dizin analizi

([www.blackwellpublishing.com/korfgenetics/figure.asp?chap=04&fig=Fig4-20](http://www.blackwellpublishing.com/korfgenetics/figure.asp?chap=04&fig=Fig4-20))

yapılabilir. Farklı renklerdeki floresan boyalar farklı dalga boylarında ışığa yayar. Floresan boylarla işaretli ddNTP'ler ile sonlanan DNA parçaları dedektör tarafından belirlenir ve böylece dizinleme yapılır. Tek reaksiyonda dizinleme yapılması hem zaman kaybını önler hem de daha pratiktir. Günümüzde otomatik dizin analizi yapabilmek için çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protokolü, 2002).

Şekil 4'te Sanger dideoksi yöntemi temel alınarak yapılan bir otomatik dizin analizi elektroforegramı görülmektedir. 10. yüzyıldan kalma mezarlardan elde edilen iki farklı bireye ait kemiklerin mtDNA analizi ile HV1 bölgelerinin dizinlenmesi sonucu aralarındaki fark görülmektedir.



**Şekil 4.** Otomatik DNA dizinlemesine örnek (Nilsson M. 2007).

MtDNA'nın dizinlenmesi oldukça etkili bir yöntemdir. Özellikle adli bilimlerde kimliklendirme için genel olarak mtDNA'nın yüksek değişkenlik gösteren HV1/HV2 bölgeleri dizinlenmektedir. Ancak, dizinleme işleminin zaman alıcı olması, analizinin ve değerlendirme prosedürünün pahalı olması ve yeterli populasyon-genetik verilerinin olmaması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, bu bölgeler adli ve antropolojik açıdan sınırlı ayırım gücüne sahiptir (Wittig H. ve ark. 2000, Vallone P.M. ve ark. 2004, Alvarez-Iglesias V. ve ark. 2006). Dolayısıyla günümüzde, mtDNA'nın dizinlenmesinin yanı sıra mtDNA'da yer alan SNP'lerin belirlenip analiz edilmesi yöntemi de kullanılmaktadır. Adli bilimler açısından mtDNA'nın kodlama yapmayan bölgelerindeki SNP'lerin yanında ayırım gücünü arttırmak amacıyla mtDNA'nın kodlama yapan bölgelerindeki SNP'leri içeren çeşitli setler de oluşturulup çalışılmaktadır (Brandsta'tter A. ve ark. 2003, Vallone P. ve ark. 2004, Quinta'ns B. ve ark. 2004, Brandsta'tter A. ve ark. 2006).

### **2.2.2. SNP (single nucleotide polymorphism-tek nükleotid polimorfizmi)**

SNP'ler nokta mutasyonlarıdır ve tek nükleotid değişimi olarak isimlendirilir. Kısaca, bir baz çiftinin başka bir baz çiftiyle yer değiştirmesi olayıdır. Birçok SNP bialeliktir. Çünkü genomdaki belli bir baz çifti pozisyonunda mutasyon oranı oldukça düşüktür (100 milyon jenerasyonda ortalama 1 mutasyon) ve aynı pozisyonda iki nokta mutasyonunun olması olasılığı çok azdır (Børsting C. ve ark. 2007).

SNP'ler genelde transisyon sonucu oluşurlar (G/A veya C/T). Ancak transversiyonlar sonucu da oluşabilir. Bunlar C/A, G/T, C/G ve T/A değişimleridir. Tek baz insersiyonları ve delesyonları da SNP'lerde görülebilir (Budowle B., Dickinson D.).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) insan genomunda oldukça fazla miktarda bulunur (Brandsta'tter A. ve ark. 2003). İnsan genomu yaklaşık 3.000 milyon baz çifti içerir ve 300 baz çiftinde 1 SNP olmak üzere yaklaşık 10 milyon SNP vardır (Lai E. 2006). İnsanlardaki varyasyonların %85'i SNP nedeniyle oluşmaktadır (Wang D.G. ve ark. 1998, Venter J.C. ve ark. 2001). Ancak, her tek baz değişimi SNP olarak kabul edilmez. Geniş ve herhangi bir populasyonda tek baz değişiminin frekansı %1'den büyükse bu değişim SNP, %1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır. Küçük seçilmiş populasyonlarda (örnek olarak aile vs.) bazı özel aleller SNP olarak değilde mutasyon olarak değerlendirilir (Børsting C. ve ark. 2007).

SNP'lerin büyük çoğunluğu tekrar bölgelerinde bulunmaktadır. İnsan genomu 30.000-35.000 gen içermektedir, fakat bu genlerin kodlayan bölgeleri tüm genomun yaklaşık %1.1-

1.5'luk kısmını kapsar. Kodlayan bölge dışında bulunan SNP'ler eğer düzenleyici bölgelerde yer alıyorsa gen ekspresyonunu etkileyebilirler (Wang, X. ve ark. 2005). Eğer SNP gen bölgesinde yer alıyorsa genler tarafından kodlanan proteinlerin hücresel fonksiyonlarını etkileyebilir, proteinleri oluşturan aminoasitlerin kodonlarında değişikliğe neden olarak farklı proteinlerin oluşmasına sebep olabilir (Børsting C. ve ark. 2007). Kodlayan bölgede yer alan SNP'ler sessiz mutasyonlara neden olursa sentezlenecek proteinin fonksiyonunu değiştirmedikinden fenotipik bir etki oluşmaz.

SNP'lerin kullanım alanları oldukça geniştir. Son yıllarda özellikle medikal genetikte kompleks hastalıklardaki genlerin belirlenmesinde, farmakoloji alanında ilaçların değişik cevaplarının analizinde, biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Jenkins S. ve ark. 2002, Quintáns B. ve ark. 2004, Sobrino B. ve ark. 2005). Bunun yanı sıra SNP'ler insan ve evrim genetiğinde ve adli bilimlerde de önem kazanmıştır. Mutasyonlar bir jenerasyondan diğerine kalıtıldığı için evrim çalışmalarında 'genetik parmak izi' olarak kullanılabilir (Underhill P. ve ark. 2001, Salas A. ve ark. 2002).

### **2.2.3. Adli Bilimlerde SNP'lerin Kullanımı**

SNP'lerin bazı özellikleri onların adli bilimlerde kullanımını sağlamaktadır. Adli vakalarda olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerin bozulmuş olma ihtimali oldukça yüksektir. Yüksek sıcaklık veya nem gibi ortam koşulları nedeniyle olay yerindeki biyolojik örneklerden elde edilen DNA parçaları 150 baz çiftinden (bç) küçük olabilir. Böyle durumlarda STR analizi yapılamayabilir çünkü STR analizlerinde PCR ürününün uzunluğu en az 200 bç veya üzerindedir. Bu nedenle, özellikle yüksek oranda bozulmuş biyolojik örneklerde STR analizi yapılamadığı koşullarda rahatlıkla SNP analizi ile kimliklendirme yapılabilir (Børsting C. ve ark. 2007). SNP'lerin mutasyon oranı STR'lara göre daha düşüktür. Bu durum babalık testlerinde önemli avantaj sağlar (Sobrino B. ve ark. 2005). Ayrıca SNP'lerin kolay multipleks yapılmaya uygun olması, kolay çoğaltılabilmesi, stutter ürünler veya mikrovaryantların olmaması nedeniyle verilerin yorumlanmasının STR'a göre daha kolay olması, yüksek verimli teknolojiler kullanılmaya ve bu nedenle otomasyona uygun olması gibi nedenlerle adli bilimlerde kullanılmaya başlanmıştır (Butler J.M. ve ark. 2007). SNP analizlerinde kullanılan yüksek verimli teknolojiler, adli vakalarda çekirdek genomunun (otozomal) yanısıra özellikle Y kromozom ve mtDNA tiplenmesinde doğru sonuca ulaşmak için gerekli olan alel frekanslarının hesaplanmasını ve geniş popülasyon çalışmalarının yapılabilmesini kolaylaştırmaktadır. Buna ek

olarak, bazı özel adli alanlarda SNP'lerin kullanılmasının oldukça önemli yararları bulunmaktadır. Bu durumlar;

- Özellikle kemik, saç, diş gibi örneklerin analizinde kullanılan mtDNA,
- Karışım örneklerinde erkek bireyin analizi,
- Örneğin coğrafik orijinlerinin belirlenmesinde kullanılan Y kromozomu,
- İleride araştırma amaçlı kullanılabilecek bazı fiziksel özelliklerin (saç ve göz rengi) belirlenmesi olarak sıralanabilir (Sobrinho B., Carracedo A. 2005).

Ancak SNP'lerin bazı dezavantajları da mevcuttur. SNP'ler genelde bialelik yani iki alele sahiptir buna karşılık STR lokusu 8-15 alel içerir. Ortalama beş SNP bir STR lokusuna karşılık gelmektedir. Dolayısıyla, kimliklendirmede kullanılan 13 STR lokusunun ayırım gücüne erişebilmek için yaklaşık 50-75 arası SNP çalışılmalıdır (Chakraborty R. ve ark. 1999, Gill P. 2001, Nilsson M. 2007). Ayrıca, her SNP lokusunun genelde bialelik olması karışım örneklerinin yorumlanmasında zorluk yaratabilir (Butler J.M. 2007).

SNP'ler çekirdek genomunun yanısıra Y kromozomunun rekombinant olmayan bölümlerinde ve mtDNA'da da bulunur. Y kromozomu babadan sadece erkek çocuklara ve mtDNA'da anneden çocuklarına kalıtıldığı için yani tek geçişli kalıtım göstermelerinden ve genelde rekombinasyon olmaması nedeniyle burada bulunan SNP'ler önem taşımaktadır. Bu yapılarda bulunan SNP'ler haplotip blokları halinde kalıtılırlar. Bu sebeple özellikle göç yolları ve bunlar arasındaki bağlantıların belirlenmesinde, insan genetiği çalışmalarında ve antropolojik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Quinta'ns B. ve ark. 2004). Ayrıca, mtDNA'da bulunan SNP'ler kayıp olan kişilerden veya doğal felaketlerde oluşabilecek toplu ölümlerdeki cesetlerden elde edilen bozulmuş veya çok küçük miktardaki biyolojik örneklerden tiplendirilmesinde, bir örneğin coğrafik orijininin belirlenmesinde ve nesep çalışmaları gibi vakalarda önem taşımaktadır (Budowle B. ve ark. 2004, Gill P. ve ark. 2004).

#### **2.2.4. SNP Analizinde Kullanılan Yöntemler**

MtDNA'da yer alan SNP'ler dizinlenmeyle çalışılabildiği gibi farklı SNP analiz yöntemleri de kullanılmaktadır ve bunların seçimi oldukça önemlidir. Adli amaçlar için kullanılacak SNP analiz yöntemlerinin seçiminde; yöntemin duyarlı olması, tekrarlanabilmesi, doğruluğu, karışım ve heteroplazminin belirlenebilmesi, bozulmuş vaka örnekleri için yüksek performans göstermesi, multipleks yapabilme kapasitesi, analiz için gerekli madde miktarı, harcanan zaman, yöntemin maliyeti ve analiz için gerekli olan cihazlar gibi konular dikkate

alınmalıdır (Morley J.M. ve ark. 1999, Norton N. ve ark. 2002, Coble M.D. ve ark. 2004). SNP'lerin genotiplenmesinde bunları belirleyen yöntemlerin yanı sıra sonuçta oluşan ürünlerin analizinde kullanılan tespit (deteksiyon) sistemleri de önem taşımaktadır. SNP'lerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler genel olarak dört grupta incelenebilir (Tablo 1).

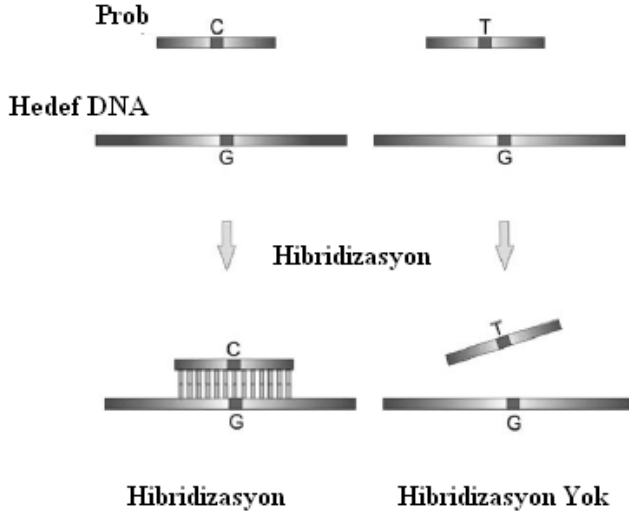
**Tablo 1.** SNP'lerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin sınıflandırılması

<b>Alelik Ayrım Reaksiyonu</b>	<b>Tespit Yöntemi</b>
<b>Hibridizasyon</b>	<b>FRET</b> (Fluoresans Rezonans Enerji Transferi) <b>FP</b> (Fluoresans Polarizasyon) <b>Mikroarray (Fluoresans)</b>
<b>Primer Uzama</b>	<b>Elektroforez</b> <b>Mass Spektrometri (MS)</b> <b>Mikroarray (Fluoresans)</b> <b>FRET</b> <b>FP</b>
<b>Ligasyon (Bağlama)</b>	<b>Elektroforez</b> <b>FRET</b>
<b>İnvasif Kesilme</b>	<b>Mass Spektrometri (MS)</b> <b>FRET</b> <b>FP</b>

(Sobrinio B., Carracedo A. 2005'ten alınmıştır.)

#### **A. Alel Spesifik Hibridizasyon (ASH)**

Alel spesifik oligonükleotid hibridizasyon (ASO) olarak da isimlendirilir. Bu tekniğin temeli, hibridizasyon ile iki DNA arasında tek nükleotid pozisyonundaki farklılığın belirlenmesine dayanır. Alelik ayırım, prob-spesifik boyalarla işaretlenmiş iki alel spesifik prob kullanılarak gerçekleştirilir. Prob dizininin merkezinde bulunan polimorfik baz ile hedef DNA dizisi arasında mükemmel bir eşleşme olduğunda stabil hibritler (prob-hedef kompleksi) oluşurken, eğer ikisi arasında eşleşme olmazsa hibridizasyon olmaz (Şekil 5). Bu yöntem sonucu elde edilen ürünler yüksek doğruluk, duyarlılık gösteren tespit sistemleri ile analiz edilmelidir (Jenkins S. ve ark. 2002, Sobrinio B. ve ark. 2005).



**Şekil 5.** Alel spesifik hibridizasyon (Sobrinio B. ve ark. 2005).

Alel spesifik hibridizasyon reaksiyonu temel alınarak yüksek verim potansiyeline sahip TaqMan yöntemi (Applied Biosystems), moleküler işaretçiler ve Light Cycler (Roche) gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin tespitinde ise Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET), Floresan Polarizasyon (FP) gibi farklı teknikler kullanılmaktadır.

#### **A.1. FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) Yöntemiyle Hibridizasyon**

FRET tespit yönteminde floresan boyalarla işaretli iki oligonükleotid dizayn edilir. Bu dizinler DNA hedefi üzerine birbirine komşu olacak şekilde bağlanır. Oligonükleotidler hibridize olduğunda iki floresan boya birbirine çok yakın şekilde bağlanır. İlk boyanın uyarılması sonucu yaydığı enerji ikinci boyayı uyarır ve floresan ışık yaymasını sağlar (Sobrinio B. ve ark. 2005). Kısacası FRET, iki floresan boya birbirine çok yakın olduğunda ve bir floroforun uyarma spektrumu diğer floroforun yayma spektrumuyla çakıştığında meydana gelir (Clegg R.M. 1992). Bu yöntemin kullanıldığı teknikler; Light Cycler (Roche), Taqman yöntemi ve Moleküler işaretçiler'dir.

Light Cycler (Roche), PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı, oldukça hızlı (30 döngü yaklaşık 20 dakikada tamamlanır) bir PCR cihazıdır (Lareu M.V. ve ark. 2005, Günel T. 2007). Bununla gerçekleştirilen yöntemde, biri 3' ucunda diğeri ise 5' ucunda floresan boya içeren DNA dizinine spesifik iki prob kullanılır. Birbirine yakın bağlanan işaretli oligonükleotidteki boyalardan ilki yeşil ışığı uyarır ve yayar, yayılan enerji bitişikte

bulunan (5' uç) LC Red boyasını uyarır ve kırmızı floresan ışık yaymasını sağlar. LC Red sadece her iki probda hibridize olduğunda ışık yayar. Boyalar arası mesafe 1-5 nükleotid olduğu zaman yeterli verimlilikte enerji transferi gerçekleşebilmektedir. LC Red boyasının yaydığı ışınlar, filtre edilerek Light Cycler cihazının optik sensörleri tarafından ölçülür (Şekil 6). Ölçülen floresan miktarı, PCR esnasında oluşan DNA miktarı ile doğru orantılıdır. LC Red boyası sadece her iki oligonükleotid DNA zincirine bağlıken ve diğer floresan boyaya yakın pozisyondayken ışımaya yaptığından dolayı floresan ölçümleri bağlanma basamağından sonra gerçekleşir (Sobrinio B. ve ark. 2005).

Taqman yöntemi ise hedef DNA'ya hibridize olup floresan sinyal üreten oligonükleotid probu kesen ve yerinden çıkaran Taq polimeraz enziminin 5' nükleaz aktivitesine dayanır (Holland P.M. ve ark. 1991, Livak K.J. ve ark. 1995). Kullanılan iki prob istenilen polimorfik bölgede farklılık gösterir. Problemlerden biri yabancı tip alele komplementer iken diğer prob ise varyant alele komplementerdir. Bu problemler 5' uçlarında farklı floresan boya ile işaretlenmiştir ve 3' uçlarında bu boyanın ışımamasını engelleyen bir baskılayıcı (quencher) bulunur (Livak K.J. 1999). Problemler bütünlüklerini korudukları sürece baskılayıcı boya FRET ile floresan boya ile ışımalarını baskılar. TaqMan yönteminde PCR bağlanma basamağı boyunca problemler hedef DNA'ya hibridize olur. Uzama basamağına ise primerler yeni zincir oluşturur ve probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde 5' uçta bulunan floresan boya Taq polimeraz enziminin aktivitesiyle kesilir, böylece 3' uçtaki baskılayıcı boyadan uzaklaşması ile 5' ucundaki boyanın floresansının artması tetiklenir. Hedefe bağlanamayan problemler ise floresan sinyal oluşturmaz. Örneğin genotipi ise iki farklı boyanın sinyal şiddetinin ölçülmesiyle belirlenir (Şekil 6) (Sobrinio B. ve ark. 2005, Günel T. 2007). TaqMan yönteminde (5' nükleaz tekniği) FRET dışında FP'de tespit sistemi olarak kullanılabilir. Bu yöntemde polarize ışık ile uyarılan boya bağlı oldukları moleküllerin kütleleri sabit olduğu sürece polarize kalmaya devam ederler. Ancak, molekül kütlelerinde oluşacak bir değişiklik sonucu polarize ışık kaynağı ile floresan boya arasındaki açılar değişecek ve boya ile ışımama şiddetleri de değişecektir. FP, reaksiyonlar sonucu ürün kütlelerinde artış ya da azalış oluşturan her türlü genotipleme yönteminde deteksiyon tekniği olarak kullanılabilir. FP yönteminde genotipleme için kullanılan prob bir floresan boya ile işaretlenir. Sentezlenen probun, reaksiyon başında çok daha yüksek bir moleküler ağırlığı varken reaksiyon ile bazı enzimlerce kesilmesi sonucu probun moleküler ağırlığı azalmakta ve FP'de değişiklikler oluşmaktadır (Timur S. 2006).

Moleküler işaretçiler, her iki uçta birbirine komplementer diziler olan ve merkezinde

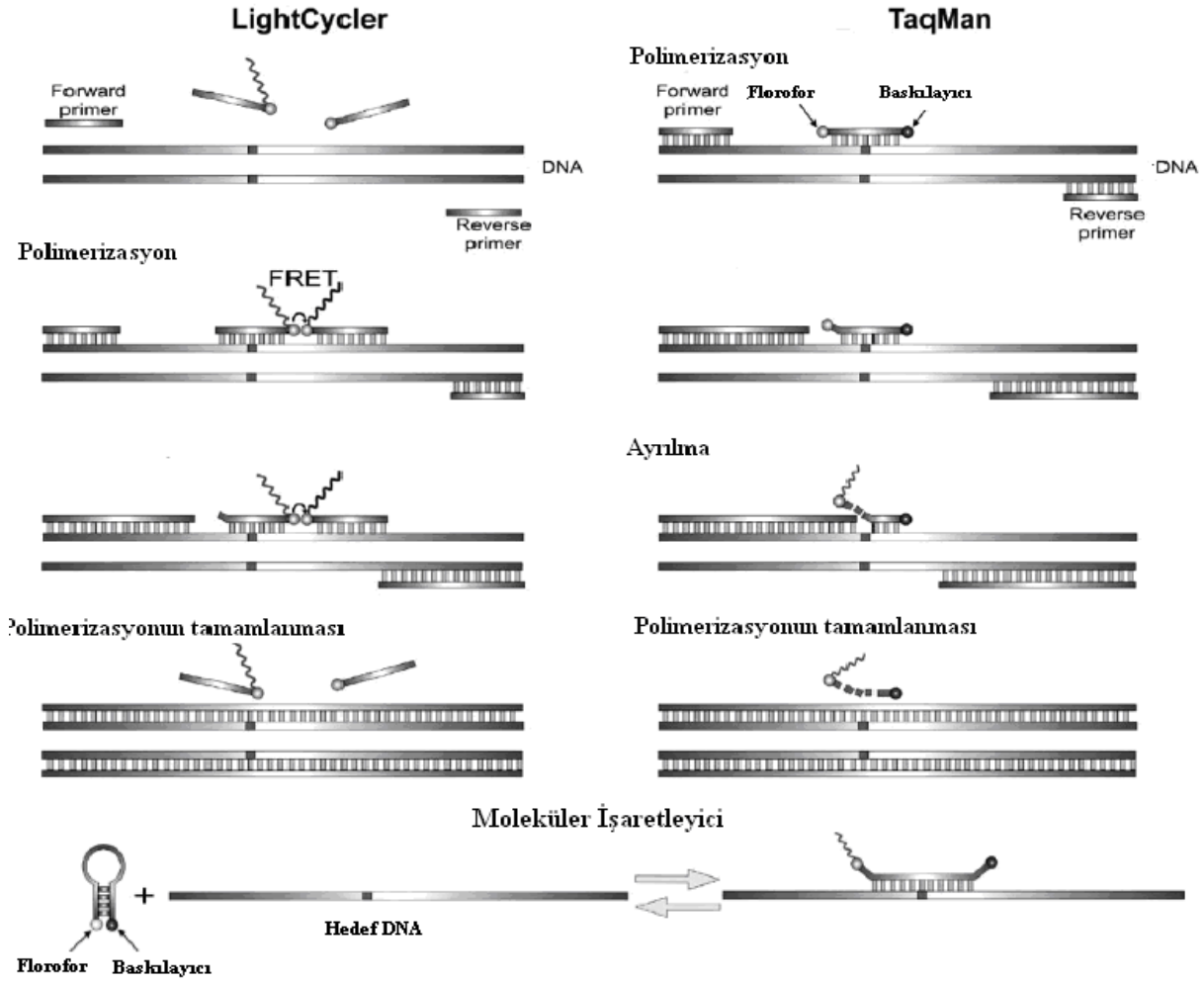


hedef DNA'ya spesifik dizilim gösteren oligonükleotid problardır. 5' uçlarında florofor, 3' uçlarında ise baskılayıcı bir boya bulunur. Problar, iki uçtaki komplementer diziler sebebiyle uçları birleşik şekilde bulunurlar ve hedef DNA'ya bağlanmadığında saç tokası yapısı gösterirler. Ayrıca, 5' uçtaki floroforun ışımaya yapması 3' uçtaki baskılayıcı boya tarafından engellenir ve floresan yayılımı olmaz. Moleküler işaretçi mükemmel bir şekilde hedefe bağlandığında şekli değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Böylece florofor ve engelleyici ayrılır ve sonuçta floresan ışımaya görülür (Tyagi S. ve ark. 1996, Günel T. 2007) (Şekil 6). SNP tiplemesi için iki moleküler işaretçi kullanılır. Bunlardan birisi yabancı tip alele, diğeri ise mutant olan alele spesifiktir. Her biri tek bir PCR reaksiyonunda alelik ayrımı sağlayacak farklı floroforlar ile işaretlenmiştir. Farklı hedefler aynı reaksiyonda belirlenebilir. Bu durum her hedef için farklı moleküler işaretçilerin kullanılması ve her birinde farklı renkteki floroforların tercih edilmesi ile sağlanır (Kostrikis L.G. ve ark. 1998, Tyagi S. ve ark. 1998). Ancak, aynı reaksiyonda yer alan floroforların sayısı bu reaksiyon için kullanılacak cihazın kapasitesine de bağlı olarak değişebilmektedir. Buna bağlı olarak, SNP tiplemesinde multipleks yapabilme kapasitesi artırılabilir. Bu yöntemde prob dizaynı oldukça önemlidir. Optimal şartlar sağlanmadığı durumlarda özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmez, dolayısıyla ortamda hedef DNA dizisi bulunsan bile floresan ışımaya elde edilemeyebilir (Günel T. 2007).

Genel olarak bakıldığında bu yöntemlerle yapılan deteksiyonlarda yüksek duyarlılık vardır (Lareu M. ve ark. 2001). Ayrıca, PCR sonrasında bir aşamaya gerek olmamaktadır. PCR ve deteksiyon aynı reaksiyon içinde gerçekleşmektedir. Böylece, zamandan kazanç sağlanır. Kriminal veri tabanı yaratmaya uygundur. Ancak, birçok örnekte birkaç SNP'nin tiplenmesinde avantaj sağlamakla birlikte multipleks yapabilme kapasitesi oldukça sınırlı olmaktadır (Sobrinho B. ve ark. 2005).

## ***A.2. Dizi Hibridizasyonu ve Floresan Deteksiyon***

Bu teknikte mikroarray yaratmak için kısa oligonükleotidler katı bir destekleyiciye bağlanır ve SNP dizinini içeren floresan işaretli PCR ürünleri ile hibridize olur. Böylece birçok SNP paralel olarak analiz edilebilir. Hibridizasyonun etkinliği ve hibritlerin stabilitesi sadece polimorfik bölgeye değil SNP'nin yanındaki dizinlerde bağlıdır. Bu nedenle çok sayıdaki



**Şekil 6.** Light Cyler, Taqman ve moleküler işaretçi yöntemleri (FRET kullanımı) (Sobrinio B. ve ark. 2005).

SNP'nin eş zamanlı olarak analizini yapabilmek için gerekli optimum şartları sağlamak oldukça zordur. Bu durumu ortadan kaldırmak için bazı sistemler oluşturulmuştur. GeneChip (Affmetrix) sisteminde her SNP için onlarca ASO prob kullanılmaktadır. Bu proplar polimorfik bölgedeki tüm muhtemel dizinleri ve SNP'nin yanında bulunan bazı nükleotidleri içerir. Bu metot ile çok sayıdaki SNP tiplenebilir ancak özel ekipmana ihtiyaç vardır (Sobrinio B. ve ark. 2005).

### **B. Primer Uzaması Reaksiyonu**

Bu reaksiyonun temeli kalıp DNA dizinine komplementer olan spesifik deoksiribonükleotidlerin (dNTP) DNA polimeraz enzimi ile bağlanmasına dayanır. Primer uzama reaksiyonları; minisekanslama veya tek baz uzama reaksiyonu (SBE-single base

extension), pirosekanslama (pyrosequencing) ve alel-spesifik uzama reaksiyonu olmak üzere üç grupta incelenebilir. Minisekanslama reaksiyonunda DNA polimeraz tarafından polimorfik baza komplementer olan ddNTP'lerin eklenmesi ile SNP noktası belirlenir. Alel spesifik uzama reaksiyonunda eğer primer, kalıp DNA ile mükemmel şekilde eşleşirse DNA polimeraz çoğaltma işlemini yapar. Pirosekanslama yöntemi ise bir enzim kaskat sistemi kullanılarak sentez tekniğiyle yapılan bir dizinleme işlemidir ve DNA polimeraz reaksiyonuna dayanır (Kwok P. 2001). Primer uzama reaksiyonu temel alınarak gerçekleştirilen bu yöntemler ileriki bölümlerde daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

### ***B.1. Minisekanslama Reaksiyonu***

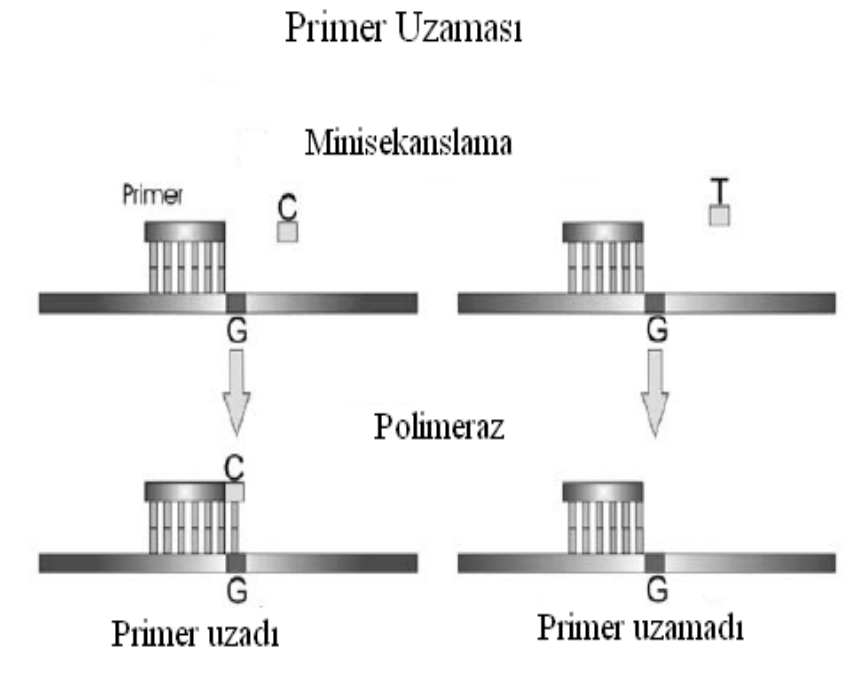
Minisekanslamada, primer istenilen SNP noktasına komşu olacak şekilde hedef DNA'ya bağlanır. Polimorfik bölgeye komplementer olan tek bir bazın eklenmesi sonucu DNA polimeraz aktivitesiyle uzama olur (Sokolov B.P. 1990, Jenkins S. 2002). Bu yöntemde en önemli nokta eklenen nükleotidin SNP noktasına olan komplementerliğidir. Özellikle insan genomundaki ve büyük genomlardaki SNP'lerin belirlenmesinde istenilen bölgenin yan taraflarında bulunan bölgelerin PCR ile çoğaltılması gerekmektedir. Bu durum SNP tiplemesi için kullanılan tekniklerin büyük çoğunluğunda uygulanmaktadır. Minisekanslama reaksiyonuna geçmeden evvel, daha önce yapılan PCR'da bağlanmamış olan dNTP'lerin ve primerlerin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla PCR ürününe saflaştırma işlemi uygulanır. Primer uzama ürününün analiz edilme aşamasında kullanılacak bazı metotlar bulunmaktadır. Bunlar; işaretlenmiş veya işaretlenmemiş nükleotidlerin kullanımı, dNTP ile birleşen ddNTP'lerin veya sadece ddNTP kullanımı olarak sıralanabilir. Minisekanslama ürünlerinin analizinde kullanılan çeşitli tespit yöntemleri vardır. Bunların en sık kullanılanları; elektroforez ve floresan deteksiyon, MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) MS ve mikroarraylerdir.

### ***Elektroforez ve Floresan Deteksiyon***

ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems), minisekanslama ürünlerinin analizinde sık kullanılan bir teknolojidir. Bu kit, tek baz uzaması reaksiyonu (SBE) temeline dayanarak SNP noktalarının multiplex olarak belirlenmesini sağlar (Vallone P.M. ve ark. 2004). Bu reaksiyonda, işaretli primer SNP'ye komşu olan nükleotide bağlanır ve DNA polimeraz ile floresan işaretli ddNTP'ler kullanılarak uzama sağlanır (Şekil 7). Her bir ddNTP farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir (Tablo 2). Minisekanslama sonrasında uzama ürünleri

saflaştırılır. Böylece ddNTP'lerin 5' fosforil grupları uzaklaştırılarak bağlanmayan ddNTP'lerin uzama primerleriyle geç edip istenmeyen sinyaller oluşturması engellenir (Quinta'ns B. 2004). Daha sonra floresan işaretli uzama ürünleri elektroforez ile görüntülenir, böylece farklı SNP'ler renklerine ve boyutlarına göre ayrılır (Brandsta'tter A. ve ark. 2003, Sobrino B. ve ark. 2005). Uzama ürünlerinin belirlenmesi C/T, A/G, A/T polimorfizmlerini belirlemek için farklı renklerin kullanılması yani renk uyumlarına ve uzama primerlerinin boyutlarına bağlıdır. Primerlerin boyutları 5' uçlarına çeşitli kuyruklar (poli T, poli C vs.) eklenerek değiştirilir. Böylece elektroforezde ayırım daha iyi şekilde sağlanır (Quinta'ns B. ve ark. 2004)..

SNaPshot kitin sahip olduğu bazı avantajlar onun adli bilimler laboratuvarlarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunlar; çok sayıda SNP lokusunun düşük maliyet ve yüksek verimlilik ile tiplendirilmesi, yöntemin duyarlılığının dizinlemeye göre daha yüksek olması, yöntemin birçok adli bilimler laboratuvarında bulunan PCR ve kapiler elektroforez gibi cihazlarla analiz edilebilmesi, multipleks yapabilme kapasitesi açısından geliştirilebilir bir teknik olması şeklinde sıralanabilir (Crespillo M. ve ark. 2006, Ivarez-Iglesias V.A ve ark. 2007). Ancak, her SNP için hem PCR hem de minisekanslama reaksiyonlarında kullanılacak primerlerin dizayn ve konsantrasyonlarında optimizasyon yapılması gerekmektedir.



**Şekil 7.** Minisekanslama tekniğinin şematik olarak gösterimi (Sobrino B. ve ark. 2005).

**Tablo 2.** Floresan işaretli ddNTP'lerin analiz edildiği renkler

<b>ddNTP</b>	<b>Boya</b>	<b>Sinyal Rengi</b>
A	dR6G	Yeşil
C	dTAMRA™	Siyah
G	dR110	Mavi
T (U)	dROX™	Kırmızı

(ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alınmıştır.)

### ***MALDI-TOF MS***

Bu yöntem ile minisekanslamada oluşan ürünlerin moleküler ağırlıkları ölçülür. Diğer yöntemlere göre daha direk sonuç veren bir metottur çünkü işaretli moleküller tarafından yayılan floresan ölçülerek ürünler belirlenir. Minisekanslama ürünleri bir çip veya bir taban üzerindeki matrikse birleştirilir. Matriks ve DNA ürünleri bir lazer ışını tarafından vurulur. Lazer ışınındaki enerji matrikse transfer olur ve örneği buharlaştırır. Böylece moleküler iyonlar oluşur. Bu iyonlar güçlü bir elektrik alan tarafından hızlandırılır ve dedektöre yönlendirilir. Elektriksel akımın gelmesi ve ürünün dedektöre çarpması arasındaki zaman uçuş zamanıdır. Bu esnada DNA ürününün moleküler ağırlığı ölçülür. Hafif moleküller ağır olanlara göre daha hızlı uçup dedektöre daha çabuk çarpar. Özel programlar kullanılarak uçuş zamanları kesin moleküler ağırlıklara dönüştürülebilir. Bu yöntemde örnek hazırlama, verilerin toplanması ve analizi yapılmalıdır (Vallone P.M. 2002, Sobrino B. ve ark. 2005). Ayrıca, en küçük ağırlık farkına sahip olan ddA ile ddT arasındaki fark (~9 Da) ölçülebilir (Fei Z. ve ark. 1998). Ancak, MALDI-TOF analizi için örneğin saflığı iyi olmalıdır ve bu yöntemde multipleks yapabilme kapasitesi sınırlıdır.

### ***Mikroarray ve Floresan Deteksiyon***

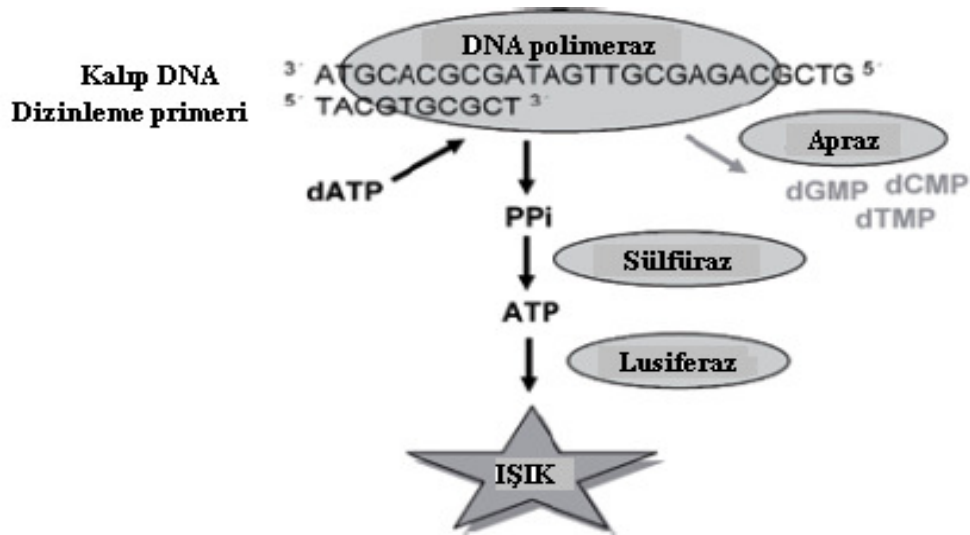
Reaksiyon bir çip yüzeyinde veya solüsyon içinde gerçekleşir. İlk durumda, primerler bir çip üzerine sabitlenir. Primerler işaretli ddNTP'ler ile birlikte DNA polimeraz tarafından uzar. Mikroarray, floresanı ölçmek için taranır. İkinci durumda ise reaksiyon array dışında solüsyon içinde gerçekleştirilir. SNP'ler 5' uçlarına özel diziler eklenmiş minisekanslama primerleri kullanılarak tek baz uzaması reaksiyonu ile tiplenir. Her SNP ayrı bir belirleme etiketine sahiptir. Minisekanslama ürünü çip üzerindeki etiketlere komplementer olan dizilere solüsyon içinde hibridize olur (Sobrino B. ve ark. 2005).

### ***Floresan Polarizasyon (FP)***

FP, ilk ve son moleküllerin farklı boyutlarda olduğu alelik ayırım ürünlerinin belirlenmesinde kullanılır. Minisekanslama reaksiyonunda işaretli tek bir ddNTP ile uzatılan primerin florofor moleküler ağırlığı artmaktadır. Bu yöntem sadece tek bir bölgenin çoğaltıldığı (singlepleks) reaksiyonlarda kullanılabilir (Sobrin B. ve ark. 2005, Timur S. 2006).

### ***B.2. Pirosekanslama (Pyrosequencing)***

Sentez tekniğiyle yapılan bir dizinleme işlemidir ve enzim kaskat sistemi kullanılmaktadır. Kalıp DNA zincirine komplementer bir nükleotid varlığında ışık üreten dört enzim ve bunlara spesifik olan substratlardan oluşur (Ronaghi M. ve ark. 1996, Ronaghi M. ve ark. 1998). Reaksiyon karışımı; primer bağlanmış tek zincirli DNA, DNA polimeraz, ATP sülfüraz, lusiferaz ve apraz enzimlerinden oluşur. Karışıma eklenen dört nükleotid belirli bir düzende koyulur (CGAT vs.). Eklenen nükleotid kalıp DNA'ya komplementer ise DNA polimeraz enzimi nükleotidi bağlar ve fosfat (PPi) serbest kalır. Salınan fosfat ATP sülfüraz tarafından ATP'ye çevrilir. Daha sonra lusiferaz enzimi ATP'yi belirlenebilen bir ışığa çevirir (Şekil 8). Işığın şiddeti bağlanan nükleotidlerin sayısına göre değişir. Son enzim olan apraz ise fazla olan nükleotidleri ve ATP'yi yeni bir sentez başlamadan önce parçalar. Üretilen ışık bir CCD kamera tarafından belirlenir ve pikler halinde görüntülenir. Eğer eklenen nükleotid kalıp DNA ile komplementer bir baz çifti oluşturmazsa apraz enzimi bu nükleotidi ışık üretimi olmadan parçalar (Sobrin B. ve ark. 2005, Nilsson M. 2007). Salınan ışığın miktarıyla bağlanan nükleotid sayısı arasında var olan doğrusal ilişki sayesinde Sanger metoduna göre daha doğru ölçüm verir (Andreasson H. ve ark. 2006). Ayrıca bu yöntemle her alelin katkısı belirlenebilir, bu nedenle karışım halindeki örnekler için idealdir. Ancak, PCR ürünleri tek zincirli hale getirilip bir dizinleme primeri bağlanması gerektiği için kalıp DNA'nın hazırlanması gerekir dolayısıyla otomasyonu zordur. Multipleks kapasitesi de sınırlıdır (Sobrin B. ve ark. 2005).



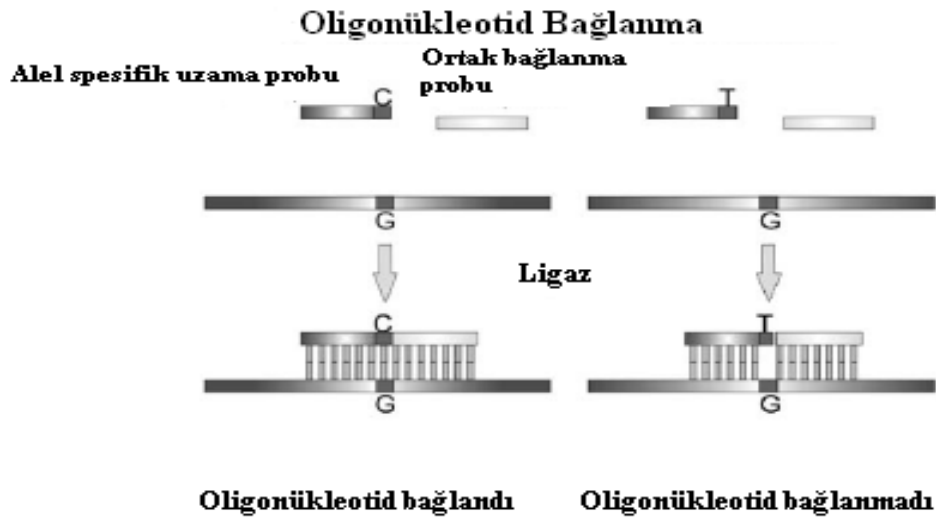
**Şekil 8.** Pirosekanslama yönteminin şematik olarak gösterimi (Nilsson M. 2007)

### **B.3. Alel Spesifik Uzama Reaksiyonu**

Bu yöntemde hedef DNA üzerinde istenilen bölgelere spesifik olan ve her iki alele ait iki primer kullanılır. Yöntemin temeli primerlerin 3' uçlarının eşleşip eşleşmemesi sonucu DNA polimerazın uzama etkinliğinin farklı olmasına dayanır. DNA polimeraz sadece primerin 3' ucu ile kalıp DNA tam olarak eşleştiğinde uzatma reaksiyonunu gerçekleştirir. Hangi primerin ürün oluşturduğu belirlenerek örneğin tiplmesi yapılır (Pastinen T. ve ark. 2000).

### **C. Alel Spesifik Oligonükleotid Bağlama**

Bu teknik DNA'nın yapısında bulunan fosfodiester bağlarını tamir eden DNA ligaz enziminin SNP tiplmesinde kullanılmasıyla meydana gelir. Üç adet prob dizayn edilir. Bir tanesi ortak bir prob iken diğer iki tanesi ise alel spesifik problemlerdir. Ortak olan prob hedef DNA'daki SNP'nin ilerisine (3' ucuna doğru) bağlanır. Alel spesifik problemlerden biri bir alele spesifik iken diğeri ise diğeri alele spesifiktir. Bunlardan SNP'ye komplementer nükleotid taşıyan allel spesifik prob 3' ucuyla genel probun hemen yanına bağlanır. Böylece alelik bölgede bir kesiğin olduğu çift zincirli bir bölge oluşur. Sadece alelik prob hedef DNA'ya mükemmel bir şekilde komplementer olduğunda DNA ligaz aktivitesiyle diğer proba kadar tamir gerçekleşir ve aradaki bölgede fosfodiester bağı oluşturur. SNP ile tam bağlanma olmadığı durumda ligaz enzimi iki probu birleştiremez (Şekil 9).



**Şekil 9.** Oligonükleotid bağlama reaksiyon şeması (Sobrinio B. ve ark. 2005).

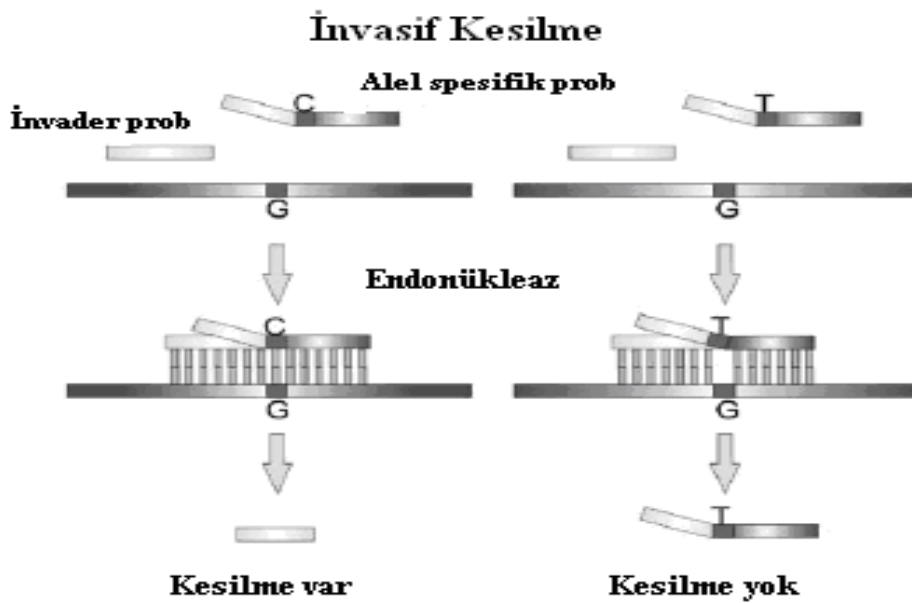
Elde edilen ürünlerin tespitinde çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Örnek olarak, biotin ile işaretlenmiş ortak prob ve alel spesifik problara eklenen haberci grup, ürünlerin yakalanıp belirlenmesini sağlar (Landergrén U. ve ark. 1988). Başka bir tespit yönteminde ise biotin yerine hareketli belirciler kullanılırken, alel spesifik problemler ise farklı renklerdeki floresan boya ile işaretlenmiştir. Böylece ürünlerin ayrımı renk ve boyutlarına göre yapılmaktadır. Hareketli belircilerin ve floresan boya kullanımıyla multipleks alel spesifik bağlama reaksiyonu yapıp, elektroforetik ayırım ve floresan belirleme işlemi gerçekleştirilebilir. Hareketli belircilerin farklı uzunluklardaki oligonükleotid dizileri ile ligasyon ürünleri elektroforez sırasında hedeflenen hızlarda hareket eder ve farklı floresan boya kullanılması ile çok sayıda SNP analizi yapılabilir. Bu deteksiyon yöntemleri dışında FRET kullanılarak alel spesifik bağlama ürünleri belirlenebilir (Sobrinio B. ve ark. 2005).

#### ***D. İnvazif Kesilme***

Flap endonükleaz enziminin tanıma ve kesme aktivitesine dayalı bir yöntemdir (The Invader Assay-Third Wave Technology). Invader prob ve alel spesifik prob olmak üzere iki prob kullanılır. Bu problemler hedef DNA'ya kusursuz bağlandıklarında tek bir nükleotid üzerinde çakışma gösterirler. İnvazif nükleotid SNP'nin 3' ucundaki diziyeye komplementerdir. Prob ise çakışan bölgede alelik baz olacak şekilde dizayn edilmiştir ve iki bölge içerir. İlki, SNP aleline komplementerdir ve polimorfik bölgenin 5' ucunda yer alır. Diğer bölge ise komplement



olmayan 5' koludur. Alelik baz probtaki baza komplementer olduğunda prob, invader oligonükleotidin 3' ucu ile çakışır. Böylece Flap endonükleaz tarafından tanınan bir yapı oluşur ve komplementer olmayan 5' kolu endonükleaz ile kesilir. Eğer alelik baz probtaki baza komplementer değil ise Flap endonükleaz tarafından tanınacak bir yapı oluşmadığından kesim olayı meydana gelmez (Şekil 10). Kesilme işleminden sonra problemlerin hızlı bir şekilde denatürasyonunu sağlamak için sıcaklık artırılır. Böylece endonükleazın hedef DNA molekülü başına çok sayıda kesilmiş prob üretmesi sağlanır. Sonuç olarak sinyal artar. Bu nedenle ilk PCR aşamasına gerek duyulmaz. Doğrudan genomik DNA'dan analiz yapılır ancak yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır. Duyarlılığın artırılması için reaksiyondan önce bir PCR işlemi yapılabilir. Bu yöntemle oluşmuş ürünlerin tespitinde FRET, MS ve FP kullanılabilir (Kwok P. 2001, Jenkins S. 2002, Sobrino B. ve ark. 2005). FRET yönteminde invader probun 5' ucunda floresan boya, komplementer bölgeye ise baskılayıcı bağlanır. Reaksiyon sonrası serbestleşen floresan boyalı prob parçası baskılayıcı etkisinden kurtularak floresan yaymaya başlar. FP'de, probun 5' ucu florofor ile işaretlenir. Reaksiyon sonrası işaretli prob parçası ayrılır ve floroforun moleküler ağırlığındaki düşüğe bağlı olarak floresan ışımada da azalma tespit edilir. MS yönteminde ise problemler farklı sayıda nükleotid içerecek şekilde tasarlanır (Timur S. 2006).



**Şekil 10.** İnvasif kesilme reaksiyon şeması (Sobrino B. ve ark. 2005).

## 2.3. Mitokondriyal DNA Analizinde Multipleks PCR

SNaPshot minisekanslama tekniği kullanılarak mtDNA'da SNP analizi yapılırken sırasıyla DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez aşamaları gerçekleştirilmektedir. Bu aşamalar esnasında optimizasyonun tam olarak yapılamaması veya kontaminasyon gibi nedenlerle karşılaşılan problemler sonuç alınamamasına veya yorumlama esnasında bazı sorunlara neden olabilmektedir.

### 2.3.1. PCR Optimizasyonu

PCR, belirli bir DNA bölgesinin çok sayıda kopyasını üretmek için gerçekleştirilen enzimatik bir reaksiyondur. DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon-annaling), zincir uzaması (polimerizasyon-çift iplikçikli DNA'ların sentezi-uzama) aşamalarından oluşur ve bu döngü çok sayıda tekrarlanarak istenilen bölge çoğaltılır. Multipleks PCR'da ise reaksiyon karışımına birden fazla primer seti eklenerek çok sayıda bölgenin eş zamanlı olarak çoğaltılması sağlanır. Ancak multipleks PCR'ın optimizasyonunun iyi yapılması gereklidir. İyi dengelenmiş ampliconların elde edilmesi ve optimizasyonun yapılabilmesi zaman alıcı bir süreçtir. Kapiler elektroforez gibi PCR ürünlerinin analizinde hızlı bir ayırım ve miktar belirleyen bir teknik kullanılması da multipleks PCR optimizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Butler J.M., Ruitberg C.M ve ark. 2001). Optimizasyonda PCR'da kullanılan primer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Taq polimeraz enzimi, kalıp DNA gibi bileşenlerin uygun şekilde hazırlanması ve miktarlarının ayarlanması gereklidir. Multipleks PCR'da kullanılacak olan primerlerin dizaynında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Primer çiftlerinin birbiriyle uyumlu olması gereklidir çünkü PCR'a eklenen her yeni primer olası primer etkileşimlerini artırır. Örnek olarak, primerlerin kalıp DNA'dan bağımsız çoğalmasını engellemek amacıyla özellikle 3' uçları kendi içinde veya birbirleriyle komplementer olmamalıdır. Aksi halde primer-dimer yapıları oluşur. Primer dizaynındaki diğer önemli bir nokta çoğalmanın en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için primerlerin bağlanma sıcaklıklarının (T<sub>m</sub>) birbirine yakın olmasıdır. Ayrıca, her primer ortalama 15-30 baz uzunluğunda olmalıdır. Eğer yüksek oranda bozulmuş örneklerle çalışılacaksa amplicon uzunluğu da 150 baz çifti veya daha az olacak şekilde ayarlanmalıdır. Bu nedenle genelde primer dizayn edilirken bağlanma sıcaklıkları, kendileriyle veya diğer primerlerle oluşabilecek etkileşimleri tahmin edebilen çeşitli primer dizayn programları (Primer 3, Gene Runner, Primer Express vs.) kullanılmaktadır. Primerler belirlendikten sonra elde edilen

sonuçlara göre PCR'da kullanılan primer miktarları veya konsantrasyonları değiştirilebilir. Eğer yeterli çoğalma olmamışsa primer miktarı arttırılıp, spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasını engellemek için ise miktarı azaltılabilir.

Bunun yanı sıra PCR'da kullanılan  $MgCl_2$  optimizasyonu da oldukça önemlidir. Fazla Mg, enzimin spesifikliğini azaltır ve hedef olmayan bölgelerin çoğalmasına neden olabilir. Az olması halinde ise enzimin inaktif olmasına yol açar ve çoğaltma işleminin (amplifikasyon) etkinliğini azaltabilir (Sanchez J.J. ve ark. 2003).

DNA sentezi için dNTP'ler kullanılmaktadır Ancak uygun konsantrasyonun belirlenmesi gereklidir. Optimal dNTP konsantrasyonu  $MgCl_2$  konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir. Az olması durumunda etkin bir çoğalma gerçekleşemez, fazla miktarda kullanıldığında ise Taq polimeraz enziminin aktivitesini baskılayabilir.

PCR işleminin en önemli bileşenlerinden biri olan Taq polimeraz enzimi, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimidir. Bu enzim kendi optimal sıcaklığı olan  $72^{\circ}C$ 'nin altında aktivite gösterebilir. Bu durumda primer, kalıp DNA'ya spesifik olmayan bir şekilde bağlanır ve oluşan bu ürünler PCR döngüleri boyunca çoğalır. Böylece hedef DNA bölgesi ile yarışan bu istenmeyen ürünler nedeniyle esas çoğaltılmak istenen bölgeler yeterince çoğalamaz ve diğer aşamalara geçmek için yeterli DNA elde edilemeyebilir. Bu sebeple günümüzde Taq polimeraz enzimin modifiye edilmiş hali olan 'hot start' özellikte olan Taq polimeraz enzimleri kullanılmaya başlanmıştır. PCR'da enzimin aktif hale gelebilmesi için  $95^{\circ}C$ 'de 1-10 dakika ısıtılması gerekir. Böylece yanlış bağlanmalar sonucu spesifik olmayan ürün oluşumu en aza indirgenir. Taq polimeraz enzimi uygun miktarlarda kullanılmalıdır. Sadece enzim miktarının arttırılması oluşan PCR ürününü arttırmaz ancak artefaktların oluşumu artır.

PCR için optimize edilebilecek diğer bir bileşen kalıp DNA miktarıdır. Adli vakalarda elde edilen DNA miktarı genellikle azdır. Bu nedenle analiz için istenilen bölge yeterli miktarda çoğaltılmalıdır. Ancak, mtDNA ile çalışılırken DNA miktarının eklenenden daha fazla olacağı göz önüne alınmalıdır. Çünkü hücrelerde çok sayıda mitokondri bulunduğu, dolayısıyla buradan elde edilecek mtDNA miktarının nDNA'dan fazla olacağı düşünülmelidir. PCR yapılmadan önce çalışılacak izolatın DNA miktarı belirlenip ona göre gerekli dilüsyon yapılmalıdır. Fazla miktarda kalıp DNA eklenmesi de PCR'da ve sonraki analiz aşamalarında problem yaratabilir.

PCR bileşenlerinin optimal konsantrasyonları belirlendikten sonra PCR döngü koşulları

da düzenlenmelidir. Gerekli olduğu durumlarda bağlanma/uzama sıcaklığı veya zamanı, döngü sayısı gibi koşullar değiştirilebilir (Temizkan G. ve ark. 2004, AmpliTaq Gold® DNA Polimeraz Protokol 2007).

### 2.3.2 PCR’da Karşılaşılan Kontaminasyon

PCR aşamasının öncesinde veya PCR sırasında meydana gelen kontaminasyon bu reaksiyonun doğru bir şekilde gerçekleşmesini engeller.

Olay yerinden elde edilen biyolojik örnekler genelde bulunduğu çevre şartlarına ve bulunduğu yere bağlı olarak kontamine haldedir. Örnek olarak, kan vücuttan ayrıldığı andan itibaren kontaminasyonla karşı karşıyadır. Kanın bulunduğu yerin özelliği de (toprak, cam, saç, sentetik veya doğal lifler vb.) kimliklendirme yapabilmek için gerekli olan genetik bilginin elde edilmesini olumsuz olarak etkileyebilir (McNally L. ve ark. 1989a, McNally L. ve ark. 1989b). Biyolojik örneğin bulunduğu yerin şartları da oldukça önemlidir. DNA uzun ve ince polimerik bir moleküldür. Bu nedenle kırılmalı bir yapısı vardır ve kolayca parçalara ayrılabilir. Ortamda bulunan yüksek nem, ısı gibi faktörler DNA’nın yapısını bozabilir. Örnek olarak, U.V. ışınlarına maruz kalması sonucunda DNA’da timidin dimerleri (T-T) oluşur ve buna bağlı olarak DNA’nın genotiplenmesinde kullanılan PCR sırasında DNA polimeraz işlevini tam olarak yerine getiremez dolayısıyla kimliklendirme yapılamaz.

Diğer bir kontaminasyon kaynağı ise biyolojik örneklerin bakteri veya mantar gibi mikroorganizmalarla etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Uygun çevre şartlarında bu mikroorganizmalar hızlı bir şekilde çoğalır ve nükleik asitleri parçalayan enzimleriyle DNA’yı parçalarlar. Böylece kısa nükleik asit parçaları oluşur. Bu durum özellikle STR veya dizin analizinde problem yaratır. SNP analizi bu durumdaki örnekler için oldukça kullanışlıdır çünkü parçalar ne kadar küçük olursa olsun tek nokta mutasyonları belirlenebilmektedir. Bakteri ve mantar DNA’ları PCR ile çoğalmaz çünkü kullanılan primerler sadece insan DNA’sına özgüdür (Kobilinsky L. ve ark. 2005).

Kontaminasyonun oluşmasında olay yerinden delilleri toplayan kişilerin de etkisi olabilir. Biyolojik örneklerin toplanması sırasında delil toplama kurallarına uyulması çok önemlidir. Eldiven, galoş, maske gibi koruyucu kıyafetler giyilmesi ve delillerin uygun şekilde toplanıp taşıma zinciri kurallarına göre laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir.

Kontaminasyon sadece olay yerinden kaynaklı olarak meydana gelmez. Laboratuvar şartlarına bağlı olarak oluşabilir. Laboratuvarda yer alan kurallara dikkat edilmesi DNA’daki

kontaminasyon riskini en aza indirir. Laboratuvarda izolasyon, PCR ve elektroforez yapılan bölümler birbirinden ayrı olmalıdır. PCR boyunca; PCR karışımının hazırlanışı, ürünlerin eldesi, havalandırma ve DNA'nın saklanması aşamalarında kontaminasyon riski bulunmaktadır. Bu nedenle gerçekleştirilen aşamalar laminar kabinlerde, tek kullanımlık pipet uçları ve ependorf tüpler kullanılarak yapılmalıdır. Kullanılan çözeltiler ve tüpler sterilize edilmelidir. Çalışan kişilerin önlük, maske, bone gibi koruyucu kıyafetler giymesi kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Çapraz kontaminasyondan kaçınmak için farklı örnekler aynı anda çalışılmamalıdır. PCR reaktifleri ve tüplerin kontaminasyonunu test etmek için negatif kontrol kullanılır. Eğer bu durumda herhangi bir PCR ürünü belirlenirse daha ileriki aşamalara geçmeden kontaminasyon kaynağı belirlenebilir. Ayrıca, laboratuvar personelinin genotipi belirlenip saklanmalıdır. Bu şekilde kontaminasyon durumunda karşılaştırma yapılabilir. PCR işlemini engelleyen bazı maddeler olabilir. Hematin (hemoglobinin parçalanmasıyla elde edilen bir ürün), toprak-gübre, kalsiyum ve kimyasal bazı bileşenler polimerazın aktivitesini düşürerek kalıp DNA'nın çoğalmasını engelleyebilir. Bu tür inhibitörler çeşitli yöntemler kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılırlar (Butler J.M. 2001, Kobilinsky L. ve ark. 2005).

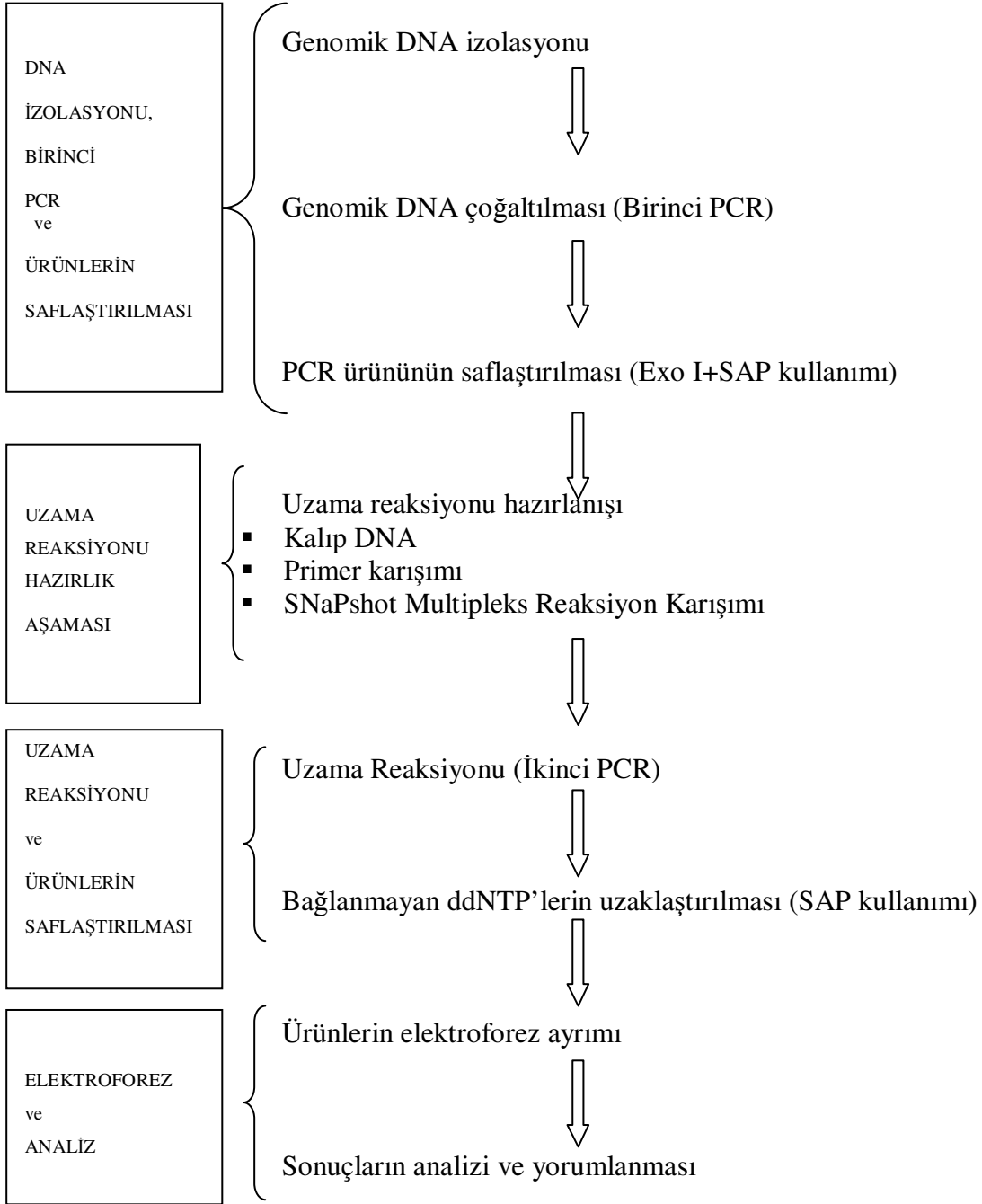
Bu tür inhibitörlerin uzaklaştırılmasında veya etkilerinin azaltılmasında uygulanabilecek yöntemlerden bazıları şunlardır;

- Genomik DNA dilüe edilir, böylece PCR inhibitörleri de dilüe olur ve az inhibitör varlığında tekrar PCR yapılır.
- DNA polimeraz enzimi eklenebilir. Bazı Taq polimeraz fraksiyonları inhibitör moleküllerine bağlanır ve onları reaksiyondan uzaklaştırır ve daha sonra kalıp DNA çoğaltılır.
- Sığır serum albumin (BSA-bovine serum albumin) eklenerek inhibitörler azaltılabilir (Comey C. T. ve ark. 1994).
- İnhibitörlerin aktivitesini inaktif hale getirmek veya engellemek amacıyla DNA, yüksek sıcaklık veya yüksek PH etkisi ile denatüre edilip yıkama işlemi yapılabilir (Altunçul H. 2001).
- DNA'nın sodyum hidroksit ile muamele edilmesiyle Taq polimeraz inhibitörleri nötralize olur (Bourke T.M. ve ark. 1999).
- Çeşitli saflaştırma yöntemleriyle (Centricon-100, Microcon-100 filtreler vb.) ekstrakte olan DNA ile inhibitörler birbirinden ayrılır (Comey C. T. ve ark. 1994).

Adli bilimler laboratuvarlarında PCR sonrasında ürünlerin analiz edilmesinde genellikle kapiler elektroforez kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılmış olan örnekler protokolüne uygun şekilde hazırlanıp kapiler elektroforeze yüklendikten sonra yine kullanılan kitte ve çalışma prosedüründe belirtilen koşullar ayarlanıp analiz gerçekleştirilir. Eğer gerekli görülürse injeksiyon zamanı, yürütme zamanı, elektroforez voltajı gibi elektroforetik yürütmeyi etkileyen bazı parametreler değiştirilerek daha iyi sonuçlar elde edilebilir.

### III. GEREÇ ve YÖNTEM

#### Çalışmanın Genel Akış Şeması



Bu tez çalışmasında kullanılan SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyonunun yapılabilmesi için miktarı belli olan (0.10 ng/ $\mu$ L) AmpF $\ell$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Identifiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  PCR kitin 9947A kodlu pozitif kontrolü çalışıldı. Daha ileriki bölümlerde bu kontrol 9947A olarak tanımlanacaktır. Optimizasyon sonrasında İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'na başvuran ve aydınlatılmış onam formu vererek kanında adli bilimler alanında bilimsel çalışmalar yapılmasına izin veren 30 kişiden alınan kanlardan ve iki adet ağız içi sürüntüsü (buccal swab) örneğinden SNaPshot minisekanslama tekniği kullanılarak mtDNA'da 477, 3010, 4580, 4793, 5004, 7028, 7202, 10211, 12858 ve 14470 pozisyonlarında bulunan 10 SNP lokusunda genotip tayini yapıldı. Laboratuvar çalışması biyolojik örneklerden DNA'nın çekitlenmesi (izolasyon), DNA miktar tayini, PCR, PCR ürünlerinin saflaştırılması, elektroforez ve sonuçların analizi aşamalarını içermektedir.

### **3.1. DNA Çekitlemesi**

DNA çekitlemesinde iki farklı yöntem kullanıldı. Ağız içi sürüntü örnekleri fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi modifiye edilerek (Signer E. ve ark. 1988), kurumuş kan lekeleri ise QIAamp $\text{\textcircled{R}}$  DNA Mini Kit ile çekitlendi (QIAamp $\text{\textcircled{R}}$  DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2007). DNA çekitlemesine ait prosedürler Ek 1'de verilmiştir.

### **3.2. DNA Miktar Tayini**

DNA miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. 260 nm dalga boyunda U.V. ışığının absorpsiyon değeri nükleik asitlerin miktarlarının, 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerin oranı ise DNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanıldı. DNA miktarı ve saflığının belirlenmesinde kullanılan prosedür Ek 2 'de verilmiştir.

### **3.3. PCR Yöntemi ile DNA'nın Çoğaltılması**

DNA'nın çoğaltılması aşamasında iki ayrı PCR uygulandı. İlk PCR'da hedef bölgeler için dizayn edilen, işaretlenmemiş ve her SNP noktası için ayrı olan forward (F) ve reverse (R) primerler seçildi ve multipleks şekilde kullanılarak istenilen DNA bölgeleri çoğaltıldı. İkinci PCR'da ise her SNP noktası için işaretlenmemiş primerler ve SNaPshot Multipleks Kit (Applied Biosystems) içerisinde yer alan floresan işaretli ddNTP'ler kullanıldı. Böylece tek baz uzaması reaksiyonu temelinde dayalı olarak istenilen SNP noktaları belirlendi.



### 3.3.1. PCR Hazırlık Aşamaları-Birinci ve İkinci PCR Primer Karışımlarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında Bölüm 3.3'te açıklandığı gibi iki aşamalı PCR yapıldı. Her iki PCR aşamasının da gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan birinci ve ikinci PCR primerlerinin seçimi ile ilgili bilgiler Ek 3'te verilmiştir. Birinci ve ikinci PCR'da kullanılacak primer stokları aşağıda anlatılan şekilde hazırlandı.

Liyofilize halde ve HPLC ile saflaştırılmış şekilde gelen birinci ve ikinci PCR primerlerinin üzerine üretici firmanın (Bio Basic Inc.) protokolüne uygun olarak Tablo 3 ve Tablo 4'te belirtilen miktarlarda ultra distile saf su eklendi ve 100  $\mu$ M'luk stok çözeltiler hazırlandı. Çözeltiler -20°C'ye kaldırıldı.

**Tablo 3.** Birinci PCR primer ana stok (100  $\mu$ M) hazırlama tablosu

PCR primer	Eklenen H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L) Miktarı
477-F	450
477-R	442
3010-F	390
3010-R	355
4580-F	443
4580-R	428
4793-F	430
4793-R	432
5004-F	412
5004-R	373
7028-F	429
7028-R	393
7202-F	414
7202-R	426
10211-F	399
10211-R	343
12858-F	434
12858-R	412
14470-F	431
14470-R	395

**Tablo 4.** İkinci PCR uzama primer ana stok (100 µM) hazırlama tablosu

İkinci PCR uzama primeri	Eklenen H <sub>2</sub> O (µL)
3010-F	443
4793-R	351
10211-R	267
5004-F	254
7028-F	119
7202-F	114
12858-F	91
4580-R	80
477-F	86
14470-R	19

Deney aşamasında oluşabilecek kontaminasyon riskini azaltmak için yukarıdaki şekilde hazırlanan PCR primer stok çözeltilerinden birinci PCR primerleri 50 µM'lık ara stoklar halinde ve ikinci PCR primer çözeltileri 20 µM'lık ara stoklar halinde hazırlandı. Bu işlem için  $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$  formülü (M=Molarite, V=Hacim) kullanıldı.

Birinci PCR primerleri için hazırlanan ara stoklardan da multipleks reaksiyon yapabilmek amacıyla 4.5 µM'lık primer karışımı oluşturuldu. Bu karışım hazırlanırken,  $M_1 \times V_1 + M_2 \times V_2 + M_3 \times V_3 + \dots + M_{20} \times V_{20} = M_{son} \times V_{son}$  formülü kullanıldı. Bu hesaba göre, 50 µM'lık her bir primerden 4.5 µL alınıp bir ependorf tüp içine konuldu ve üzerine 910 µL ultra saf su eklendi. Sonuç olarak, 4.5 µM'lık ve 1000 µL'lik bir primer karışımı elde edildi. Oluşturulan bu karışım ependorf tüplere bölünerek kontaminasyon riski azaltıldı. Primer stokları -20°C'ye kaldırıldı. Birinci PCR primerlerinin uzunlukları, bağlanma sıcaklıkları ve amplicon boyutları Tablo 5'te gösterilmiştir.

İkinci PCR primerleri için de yukarıdaki formül kullanılarak 10.25 µM'lık bir primer karışımı oluşturuldu. Bu hesaba göre, 20 µM'lık her bir primerden son konsantrasyonlarına uygun miktarlarda alınıp üzeri ultra saf su ile tamamlanarak 10.25 µM ve 20 µL'lik uzama primer karışımı hazırlandı. Oluşturulan bu karışım ependorf tüplere bölündü ve böylece kontaminasyon riski azaltılmış oldu. Primer stokları -20 °C'ye kaldırıldı. İkinci PCR primerleri ve eklenen poli-T kuyruk uzunlukları Tablo 6'da belirtilmiştir. PCR primer karışımında her bir uzama primerinin dengelenmiş konsantrasyonu Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Birinci PCR primerleri

Lokus	PCR Primer Dizini	Uzunluk	T <sub>m</sub> (°C)	Amplikon boyutu (bp)
<b>477-F</b>	CTTTTGGCGGTATGCACTTT	20	60.1	122
<b>477-R</b>	GGTGTGTGTGTGCTGGGTA	19	58.9	
<b>3010-F</b>	GCGCAATCCTATTCTAGAGTCC	22	59.4	124
<b>3010-R</b>	TCACGTAGGACTTTAATCGTTGA	23	58.8	
<b>4580-F</b>	TCTTTGCAGGCACACTCATC	20	60.0	130
<b>4580-R</b>	GCAGCTTCTGTGGAACGAG	19	59.7	
<b>4793-F</b>	CAACCGCATCCATAATCCTT	20	59.8	186
<b>4793-R</b>	ATGTCAGAGGGGTGCCTTG	19	61.1	
<b>5004-F</b>	TCCATCATAGCAGGCAGTTG	20	59.8	124
<b>5004-R</b>	TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	22	58.8	
<b>7028-F</b>	GGCCTGACTGGCATTGTATT	20	60.0	125
<b>7028-R</b>	AAGCCTCCTATGATGGCAA	20	59.7	
<b>7202-F</b>	ACGCCAAAATCCATTTCACT	20	59.4	126
<b>7202-R</b>	TTCATGTGGTGTATGCATCG	20	58.9	
<b>10211-F</b>	ACCACAACCTCAACGGCTACA	20	59.2	143
<b>10211-R</b>	GGAGGGCAATTTCTAGATCAA	22	59.6	
<b>12858-F</b>	ATGATACGCCCCGAGCAGA	18	60.3	126
<b>12858-R</b>	TGTGGGTCTCATGAGTTGGA	20	60.1	
<b>14470-F</b>	CAAGACCTCAACCCCTGACC	20	61.9	129
<b>14470-R</b>	GGGGGAGGTTATATGGGTTT	20	58.9	

(Vallone P.M.ve ark. 2004'ten alınmıştır.)

**Tablo 6.** İkinci PCR primerleri (uzama primerleri)

Lokus	Primer Dizini	Uzunluk	T-kuyruk dahil toplam primer uzunluğu	T <sub>m</sub> (°C)
<b>3010-F</b>	TGTTGGATCAGGACATCCC	19	19	59.3
<b>4793-R</b>	(T) <sub>4</sub> -TCAGAAGTGAAAGGGGGC	18	22	59.7
<b>10211-R</b>	(T) <sub>10</sub> -ACTAAGAAGAATTTTATGGA	20	30	49.2
<b>5004-F</b>	(T) <sub>14</sub> -AGACCCAGCTACGCAAATC	20	34	60.8
<b>7028-F</b>	(T) <sub>18</sub> -GACACGTACTACGTTGTAGC	20	38	58.5
<b>7202-F</b>	(T) <sub>22</sub> -CCACAACACTTTCTCGGCCT	20	42	62.8
<b>12858-F</b>	(T) <sub>27</sub> -GCAGCCATTCAAGCAATCCTATA	23	50	60.8
<b>4580-R</b>	(T) <sub>29</sub> -TGGTTAGAACTGGAATAAAAGCTAG	25	54	58.2
<b>477-F</b>	(T) <sub>38</sub> -CCCTCCCCTCCACTCCATACTAC	20	58	60.9
<b>14470-R</b>	(T) <sub>41</sub> -GGGAATGATGGTTGTCTTTGG	21	62	59.4

(Vallone P.M. ve ark. 2004'ten alınmıştır.)

**Tablo 7.** Uzama primeri karışımındaki her bir primerin dengelenmiş konsantrasyonu

İkinci PCR uzama primeri	Primer karışımındaki son konsantrasyon
3010-F	0.5 µM
4793-R	1 µM
10211-R	1 µM
5004-F	1 µM
7028-F	1 µM
7202-F	0.5 µM
12858-F	1 µM
4580-R	1.25 µM
477-F	1.5 µM
14470-R	1.5 µM

### 3.3.2. Birinci PCR Aşaması

Birinci PCR'ı gerçekleştirmek üzere önce Sığır Serum Albumin (BSA) ve dNTP karışımı aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı. Daha sonra Tablo 8'de gösterilen PCR bileşenlerinin bir reaksiyon için belirtilen miktarları kullanılarak PCR karışımı hazırlandı. Genomik DNA 0.5-1 ng olacak şekilde sulandırıldı ve 1 µL alınarak PCR karışımına ilave edildi. PCR, GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) PCR cihazında ve Tablo 9'da görülen koşullarda yapıldı. Kısa süre içinde kullanılacak olan örnekler +4°C'de saklanırken, uzun süreli saklama için örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

#### *Sığır Serum Albumin (BSA)*

Toz halindeki BSA'dan 0.8 gr alınıp üzerine 250 ml distile su ilave edildi ve BSA eriyinceye kadar iyice karıştırılarak 3.2 mg/ml BSA çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti ependorf tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

#### *dNTP Karışımı Hazırlanışı*

Her biri 100 mM'lık ayrı tüplerde bulunan dATP, dGTP, dTTP, dCTP solüsyonlarının her birinden 10 µL alınıp bir ependorf içine koyuldu ve saf su ile 400 µL'ye tamamlandı. Oluşan 10 mM'lık dNTP karışımı ependof tüplere bölünüp -20°C'de saklandı.

**Tablo 8.** Birinci PCR karışım tablosu

PCR bileşenleri	Hacim/ reaksiyon (µL)
10X PCR tamponu (MgCl <sub>2</sub> içermeyen) (Bio Basic Inc.)	1.5
BSA (3.2 mg/ml) (Bio Basic Inc.)	0.75
MgCl <sub>2</sub> (25mM) (Bio Basic Inc.)	1.2
Taq Polimeraz (5U/µL) (Takara Bio Inc.)	0.3
dNTP karışımı(10 mM) (Bio Basic Inc.)	0.375
Primer karışımı	1.2
Ultra saf su	7.675
DNA (0.5-1 ng)	2
<b>TOPLAM</b>	<b>15µL</b>

**Tablo 9.** Birinci PCR parametreleri

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95°C	10 dak.	
95°C	30 sn.	3
50°C	55 sn.	
72°C	30 sn.	
95°C	30 sn.	19*
*50°C+0.2°C	55 sn.	
72°C	30 sn.	
95°C	30 sn.	11
50°C	55 sn.	
72°C	30 sn.	
72°C	7 dak.	
+4	∞	

(Peter M. Vallone ve ark. 2004'ten alınmıştır.)

\*19 döngü boyunca, bağlanma sıcaklığı olan 50°C'nin her döngüde 0.2 °C artacak şekilde programlama yapıldı. Böylece yüksek primer bağlanma sıcaklıklarında amplicon üretimi kolaylaşmaktadır.

İkinci PCR aşamasına geçilmeden önce aşağıda belirtilen şekilde saflaştırma işlemi uygulandı.

### 3.4. Birinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

İlk PCR sonrasında bağlanmayan primerlerin uzaklaştırılması için tek zincirli DNA'yı hidrolize eden Ekzonükleaz I (Ekzo I) ve bağlanmayan dNTP'leri uzaklaştırmak için Shrimp (Karides) alkalın fosfataz (SAP) enzimi kullanılarak birinci PCR ürünleri saflaştırıldı. Bu işlem için Ekzo-SAP aşağıda anlatılan şekilde hazırlandı.

#### *Ekzo-SAP Karışımının Hazırlanması*

Konsantrasyonu 20 U/μL olan Ekzo I enziminden 5 U/μL elde edebilmek için sıvı haldeki Ekzo I'den 12.5 μL alınıp üzerine 37.5 μL tampon eklendi. İstenilen konsantrasyonda elde edilen

Ekzo I ependorf tüplere bölünüp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması işleminde,  $15\ \mu\text{L}$  PCR ürünü üzerine  $1.4\ \mu\text{L}$  Ekzo I ( $5\text{U}/\mu\text{L}$ ) ve  $2.6\ \mu\text{L}$  SAP ( $1\text{U}/\mu\text{L}$ ) (Takara Bio Inc.) eklendi, kısa süre santrifüjlendi. Elde edilen karışım PCR primerlerinin uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 90 dakika daha sonra da kullanılan enzimlerin inaktivasyonunu sağlamak için  $80^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika inkübe edildi.

### 3.5. İkinci PCR Aşaması (Uzama Reaksiyonu)

Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması işleminden sonra SNP'lerin belirlenmesi için ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit kullanıldı. Kit içeriği Ek 4'te yer almaktadır. Ayrıca kit içeriğinde yer almayan ve temin edilmesi gereken malzemeler de Ek 5'te gösterilmiştir.

#### *İkinci PCR Karışımının Hazırlanması*

İkinci PCR karışımı için gerekli bileşenler buz üzerine alındı. Örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol Tablo 10'da belirtilen miktarlar kullanılarak hazırlandı. Kısa bir süre vorteks ve santrifüj yapıldı. Önceden  $25\ ^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiş GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) cihazına yerleştirildi. Bu işlemin 20 dakikayı aşmayacak şekilde yapılmasına dikkat edildi. Tablo 11'de görülen PCR koşullarında reaksiyon gerçekleştirildi.

**Tablo 10.** İkinci PCR karışım tablosu

SNaPshot R. bileşenleri	Örnek V/R ( $\mu\text{L}$ )	Pozitif kontrol V/R ( $\mu\text{L}$ )	Negatif Kontrol V/R ( $\mu\text{L}$ )
SNaPshot R. karışımı	2.5	5	5
SNaPshot uzama primer karışımı	1	-----	-----
SNaPshot Kontrol Primer Karışımı	-----	1	1
PCR ürünü (Ekzo-SAP ile muamele edilmiş)	3	-----	-----
SNaPshot Kontrol DNA	-----	2	-----
10X PCR Tamponu	0.5	0.5	0.5
Ultra Saf Su	3	1.5	3.5
<b>Toplam</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

V: hacim

R: reaksiyon

**Tablo 11.** İkinci PCR parametreleri

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95 °C	2 dak.	
96°C	10 sn.	25
50°C	5 sn.	
60°C	30sn.	
+4	∞	

(Vallone P.M. ve ark. 2004'ten alınmıştır.)

### 3.6. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot reaksiyonu sonrasında floresan işaretli ddNTP'lerin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla SNaPshot ürünlerinin üzerine 1.5 µL SAP (1U/µL) eklendi ve bileşenlerin tam olarak karışmasını sağlamak için kısa süre vortekslendi.

Karışım 37°C'de 90 dakika, 85°C'de 15 dakika inkübe edildildi. Hemen kullanılmayacak örnekler elektroforez öncesinde 24 saate kadar 4°C'de bekletildi. Eğer 24 saatten fazla saklanacaksa -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.7. İkinci PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Floresan işaretli ddNTP'ler ile tek baz uzaması gerçekleştirilmiş olan PCR ürünlerinin ABI PRISM 310 Genetik Analizör (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak kapiler elektroforezi yapıldı.

#### 3.7.1. Elektroforez Parametrelerinin Ayarlanması

Her yürütme öncesinde Data Collection (Applied Biosystems) programı kullanılarak örnek listeleri hazırlanıp, GeneScan E5 modül parametreleri ayarlandı. Matriks Standart Set DS-02 (Applied Biosystems) yüklenerek yürütmeler bu standart ile yapıldı. Analiz yapmak için Tablo 12'de görülen GS POP-4 (1mL) E5 modül parametreleri seçildi. 36 cm kapiler, POP 4 polimer (Applied Biosystems) ve GeneScan-120 LIZ İç Boyut Standardı (Internal Size Standard) (Applied Biosystems) kullanıldı.



**Tablo 12.** GeneScan E5 modül parametreleri

<b>Parametre</b>	GS POP-4 (1ml) E5 modül
<b>Matriks</b>	DS02
<b>İnjesiyon zamanı</b>	5 sn.
<b>Elektroforez voltajı</b>	15 kV
<b>Yürütme zamanı</b>	24 dak.
<b>Yürütme sıcaklığı</b>	60°C
<b>Şırınga pompalama süresi</b>	150 sn.

(ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alındı.)

### 3.7.2. PCR Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması

PCR ürünleri ABI PRISM 310 Genetik Analizör cihazına yüklenmeden önce elektroforez işlemi için hazırlandı.

Elektroforez öncesi örnek hazırlama aşamasında; her reaksiyon için 14.5 µL Hi-Di Formamid, 0.4 µL GeneScan-120 LIZ İç Boyut Standardı üzerine SAP ile muamele edilmiş 1 µL ikinci PCR ürünü eklendi. Elde edilen karışım kısa bir süre vortekslendi ve santrifüjlendi. Daha sonra karışım 95°C’de 5 dakika ve buzdaki 5 dakika bekletildi. Tablo 12’de belirtilen koşullarda ABI PRISM 310 Genetik Analizör cihazına yüklendi.

### 3.8. Verilerin Analizi

Verilerin analizi GeneScan Analysis 3.7 programı (Applied Biosystems) kullanılarak yapıldı. Bilinen alel boyutları ve SNP noktalarındaki değişimleri gösteren farklı renklerdeki floresan boyalar dikkate alınarak elektroforegramdaki pikler değerlendirildi ve SNP noktaları belirlendi. Optimum koşullar sağlandıktan sonra Excel programı kullanılarak her nokta için ortalama son ürün uzunlukları (size) ve aşağıdaki formüle dayalı olarak standart sapmaları hesaplandı.

#### *Standart Sapma Formülü*

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

$\sigma$ : Standart sapma

$X_i$  : sahip olunan veriler  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$

$n$  : sahip olunan veri sayısı

$\bar{x}$  : sahip olunan verilerin aritmetik ortalaması

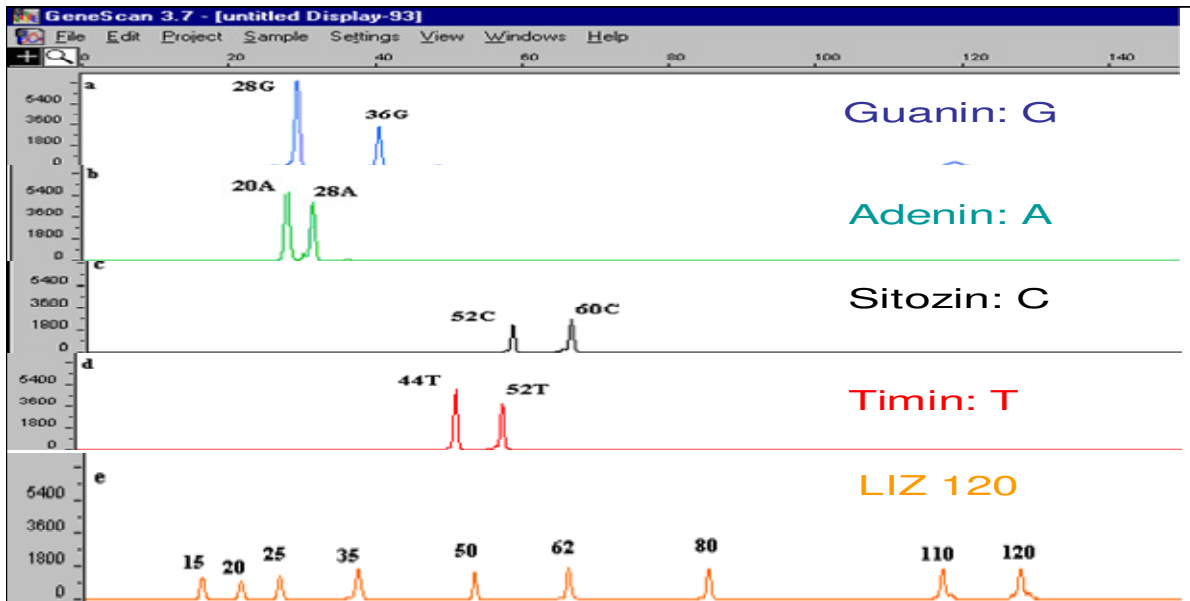
## IV. BULGULAR

İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Labotaruvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışma, onam formu bulunan gönüllü 30 sağlıklı bireyden alınan kan ve 2 adet ağız içi sürüntü örneğinden elde edilen DNA izolatları ile miktarı bilinen (0.10 ng/μL) 9947A pozitif kontrolün analiz edilmesiyle gerçekleştirildi.

Çalışmanın aşamaları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- Genomik DNA'nın çoğaltılması (Birinci PCR)
- Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- SNaPshot reaksiyonu (İkinci PCR, uzama reaksiyonu)
- İkinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- Elektroferez ayrımı ve sonuçların analizi

Çalışmanın ilk aşamasında ve daha sonrada belli aralıklarla SNaPshot Multipleks Kitin doğru çalıştığının kanıtlanması için kitin içeriğinde yer alan pozitif kontrol DNA'sı ve multipleks kontrol primer karışımı kullanılarak kontrol reaksiyonu yapılmıştır. Şekil 11 a, b, c, d bölümlerinde SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucunda ABI PRISM 310 Genetik Analizör cihazında Genescan 3.7 programı kullanılarak elde edilen piklerin renkleri ve son ürün uzunlukları (size) görülürken, Şekil 11 e'de ise GeneScan 120 LIZ İç Boyut Standardı piklerinin son ürün uzunlukları (size) görülmektedir. Mavi pikler guanini (G), yeşil pikler adenini (A), siyah pikler sitozini (C), kırmızı pikler timini (T) ve turuncu pikler LIZ 120 İç Boyut Standardı içerisinde yer alan boyutları tanımlanmış DNA parçacıklarını temsil etmektedir.



Şekil 11. SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucu elde edilen elektrofogram

SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol DNA'sı ve primer karışımı kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda elde edilmesi gereken heterozigotluk durumu, sinyal rengi ve son ürün uzunlukları (size) Tablo 13'te görülmektedir.

**Tablo 13.** SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen son ürün özellikleri

<b>Multipleks Kontrol Primer Karışımı</b>	<b>Son Ürün Uzunluğu (size)</b>	<b>Sinyal Rengi</b>	<b>Heterozigotluk</b>
<b>20A primer</b>	21	Yeşil	Homozigot
<b>28G primer</b>	29	Mavi	Heterozigot
<b>28A primer</b>		Yeşil	
<b>36G primer</b>	37	Mavi	Homozigot
<b>44T primer</b>	45	Kırmızı	Homozigot
<b>52C primer</b>	53	Siyah	Heterozigot
<b>52T primer</b>		Kırmızı	
<b>60C primer</b>	61	Siyah	Homozigot

SNaPshot Multipleks Kitin pozitif kontrol çalışmasında elde edilmesi gereken ürün uzunluğu (size) ile bu çalışmada ABI PRISM 310 Analizör cihazında farklı zamanlarda 11 kez tekrarlanan kitin pozitif kontrol reaksiyonu sonucunda elde edilen son ürün uzunluklarının (size) ortalamasının karşılaştırılması ve çalışılan pozitif kontrol son ürün uzunluklarının (size) kendi içlerindeki standart sapmaları Tablo 14'te görülmektedir.

**Tablo 14.** SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol bilinen son ürün uzunluğu-PCR sonrası gözlenen son ürün uzunluğu karşılaştırması ve standart sapması

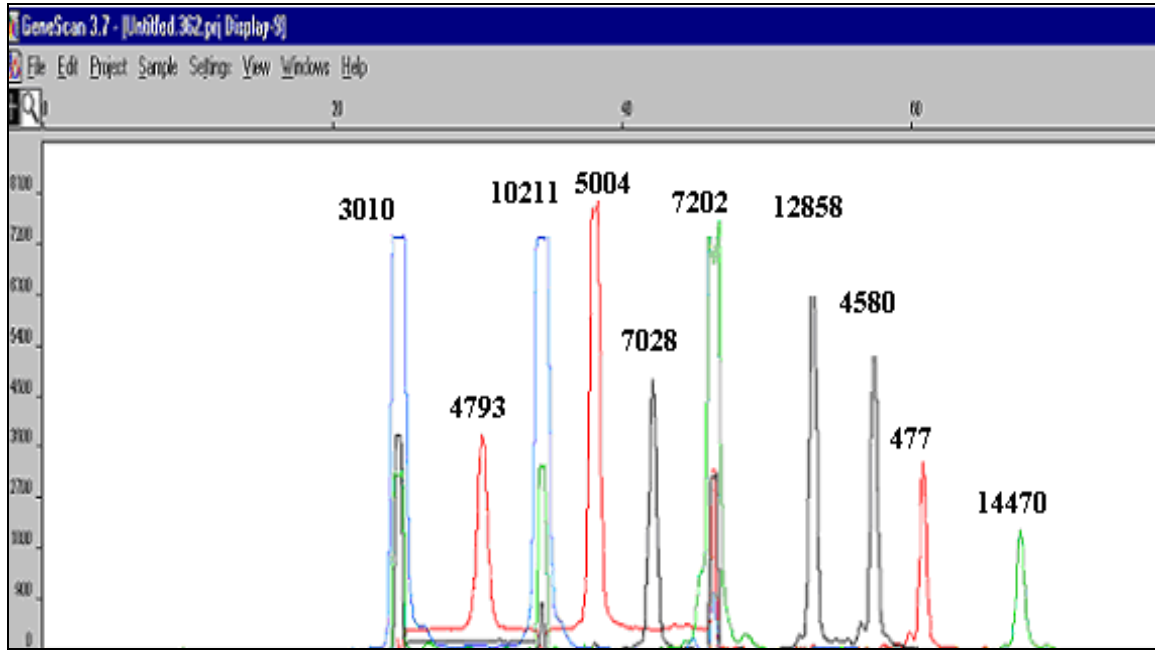
Son Ürün Uzunluğu (size)	Gözlenen ürün uzunluklarının (size) ortalaması (n*=11)	Gözlenen ürün uzunluklarının standart sapması** (n=11)
21	27.18	0.35
29	29.11	0.34
	30.55	0.31
37	40.46	0.22
45	49.65	0.35
53	55.14	0.23
	55.87	0.24
61	62.78	0.43

\*n=çalışılan örnek sayısı.

\*\*Çalışılan örneklerin kendi arasındaki standart sapması.

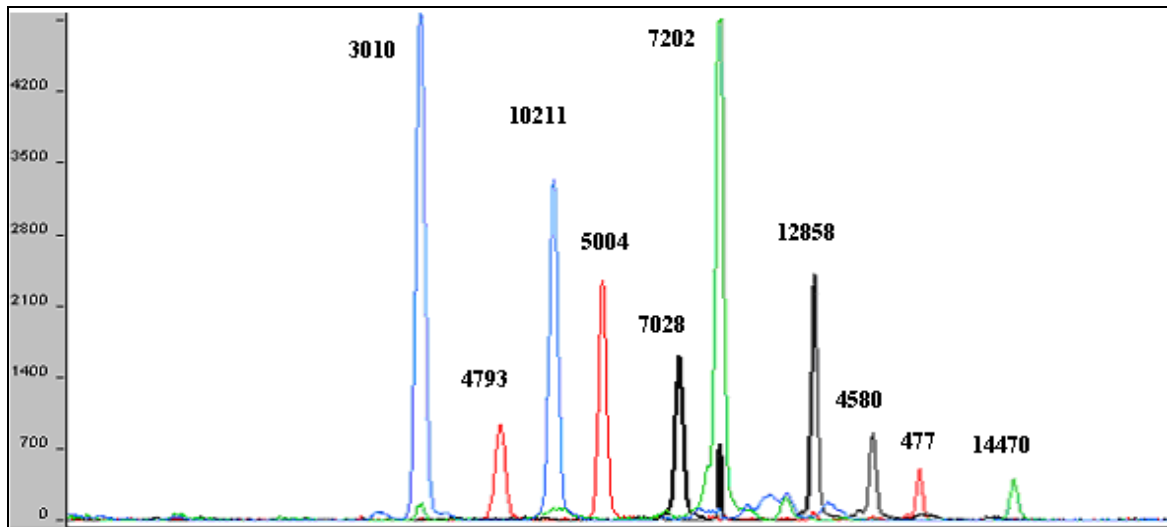
Yöntemin optimizasyonu sırasında miktarı belli olan (0.10 ng/μL) 9947A pozitif kontrol DNA'sı çeşitli parametreler değiştirilerek birçok kez çalışılmış ve optimum koşullar belirlendikten sonra farklı zamanlarda tekrar edilerek yöntemin tekrarlanabilirliği tespit edilmiştir. Çalışma esnasında DNA miktarı protokolde belirtildiği gibi (Vallone P.M. ve ark. 2004) 0.5-1 ng/μL aralığında olacak şekilde kullanılmıştır. Bu çalışmada sonuçların değerlendirilmesi aşamasında karşılaşılan en önemli problem artefakt piklerdir. Artefakt pik oluşumuna iyi ayarlanmamış primer miktarı ve saflaştırmanın etkin şekilde yapılamamasının neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle yöntemin laboratuvar şartlarına uygun olarak optimize edilmesinde; kullanılan primer miktarları, bağlanmayan ddNTP'leri uzaklaştırmada kullanılan shrimp (karides) alkalın fosfataz (SAP) enziminin aktivasyon süresi ve reaksiyonda kullanılan SNaPshot kit reaksiyon karışım miktarında değişiklik yapılmıştır.

Araştırmada kullanılan tüm uzama primerleri eşit hacimde kullanıldığında elde edilen elektroforegramda (Şekil 12a) iç içe farklı renklerde pikler oluşmuştur. Artefakt pikleri yok etmek için uzama primer karışımındaki her bir primer konsantrasyonu materyal metot bölümü Tablo 7'de belirtildiği miktarlarda kullanılmıştır. Bu çalışma sonunda artefakt pikler büyük oranda yok edilmiştir (Şekil 12b).



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

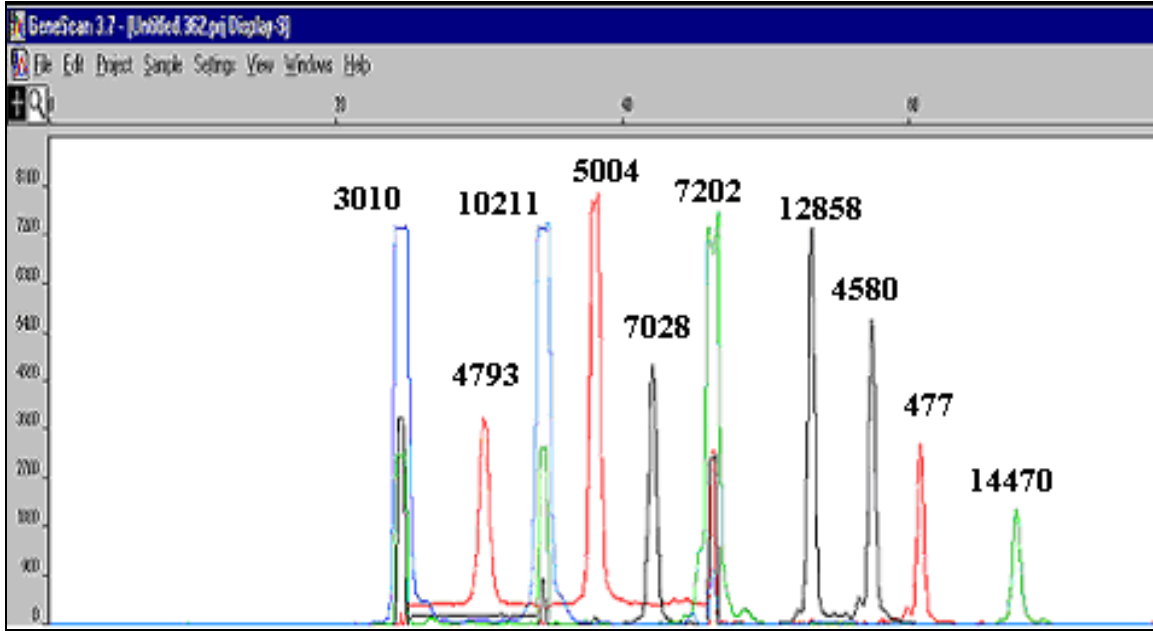
**Şekil 12a.** Eşit uzama primer konsantrasyonlarında elde edilen elektroforegram



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

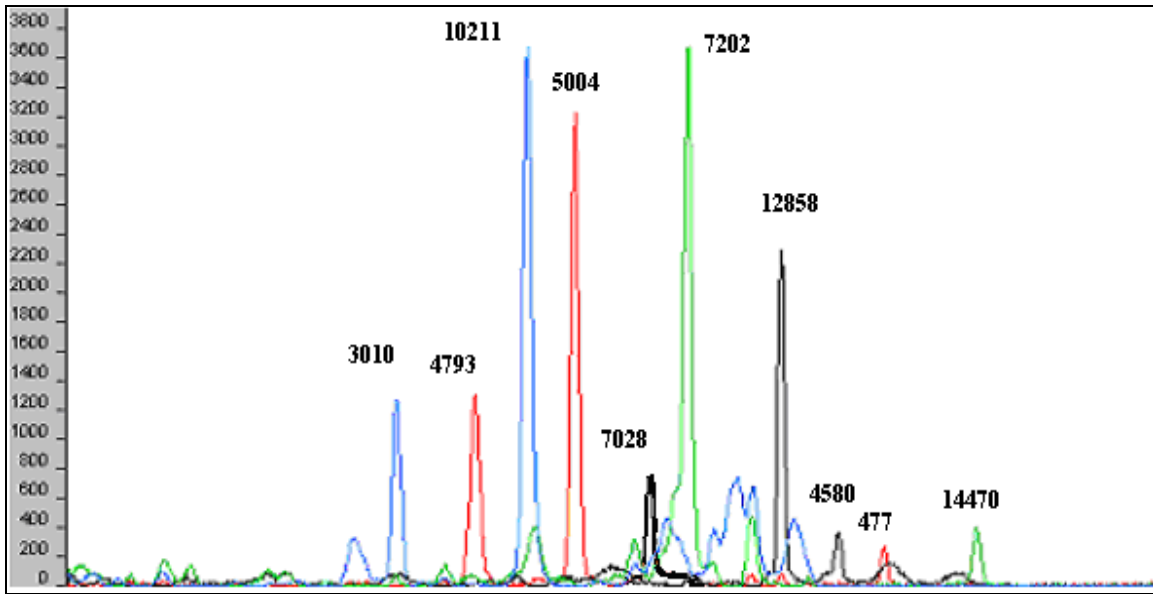
**Şekil 12b.** Dengelenmiş uzama primer konsantrasyonlarında elde edilen elektroforegram

Artefakt piklerin giderilmesinde etkili diğer parametre saflaştırma yönteminin etkinliğidir. Bu çalışmada ikinci PCR sonrası saflaştırma esnasında bağlanmayan ddNTP'lerin yeterince uzaklaştırılmadığı anlaşılmıştır. Bu durumu gidermek için SAP enziminin aktivasyonunu artırmak üzere 37°C'de 40 dakika olan inkübasyon süresi (Şekil 13a) önce 70 dakikaya (Şekil 13b) daha sonra ise 90 dakikaya (Şekil 13c) çıkarılmıştır. Bu çalışmaya ait elektroforegram sonuçları aşağıda görülmektedir.



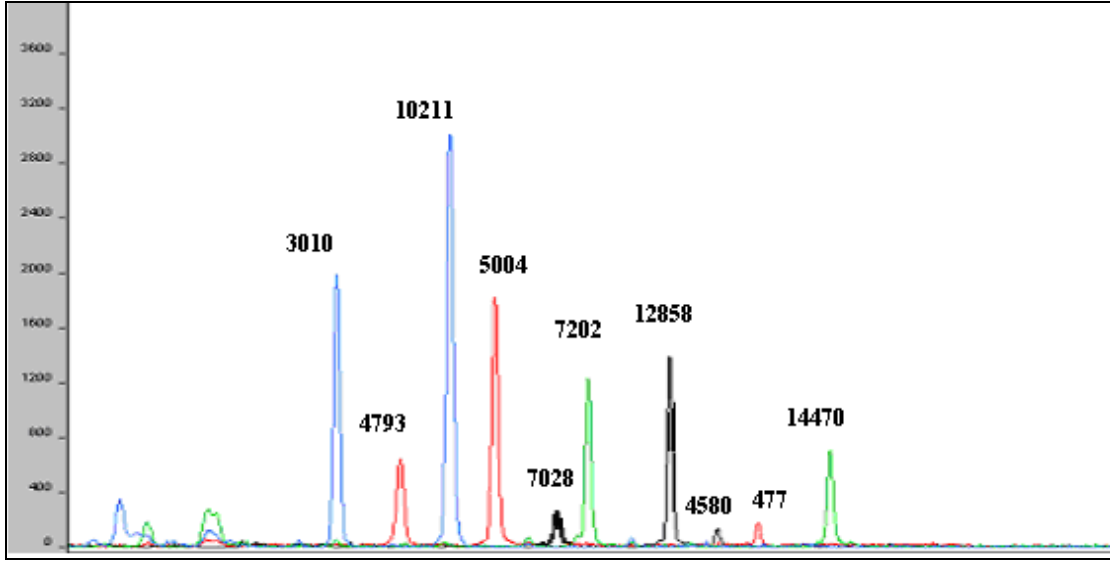
Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

**Şekil 13a.** SAP inkübasyon süresi 40 dakika iken elde edilen elektroforegram



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

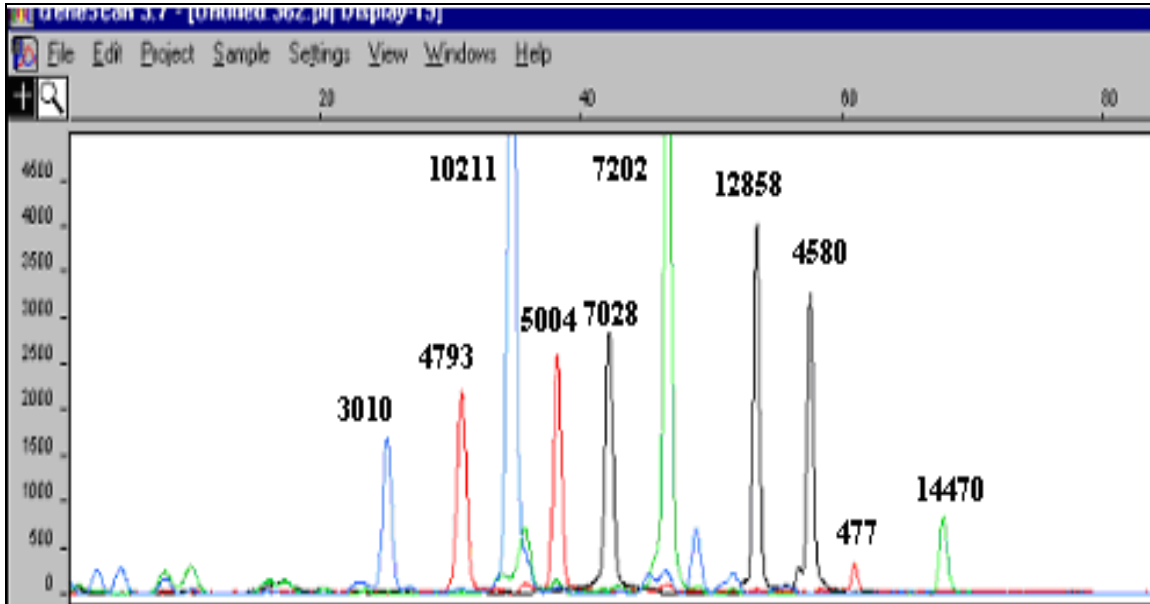
**Şekil 13b.** SAP inkübasyon süresi 70 dakika iken elde edilen elektroforegram



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

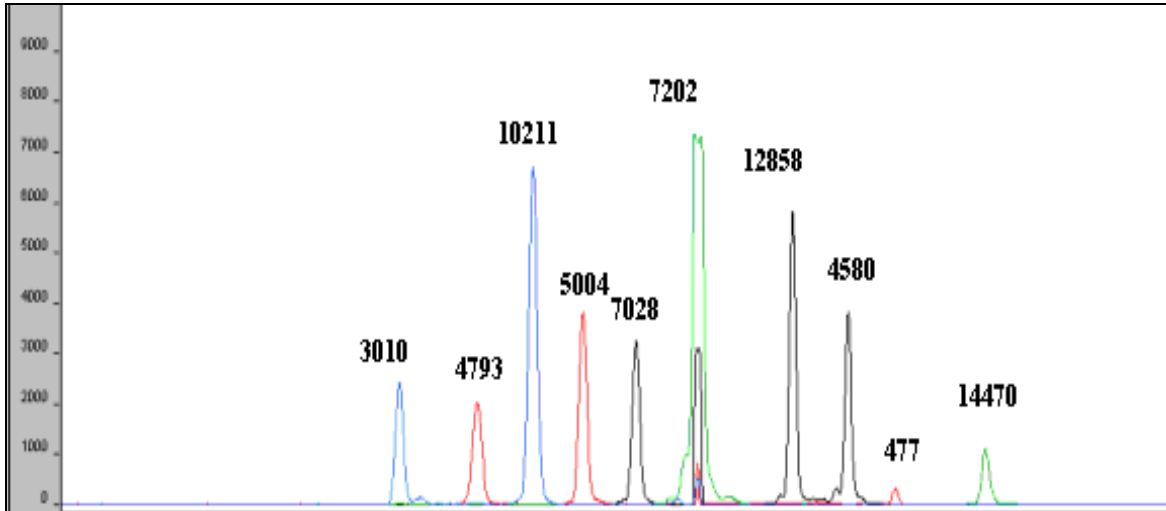
**Şekil 13c.** SAP inkübasyon süresi 90 dakika iken elde edilen elektroforegram

Primer uzama reaksiyonu için kullanılan SNaPshot Multipleks Kit reaksiyon karışımının, üreticisinin protokolünde belirtildiği şekilde 5  $\mu$ L ve toplam ikinci PCR hacmi 10  $\mu$ L kalmak koşuluyla kitin reaksiyon karışımının miktarı yarıya indirilerek (2,5  $\mu$ L) kullanılması sonucu gerçekleştirilen reaksiyonlar Şekil 14a ve 14b'de görülmektedir.



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

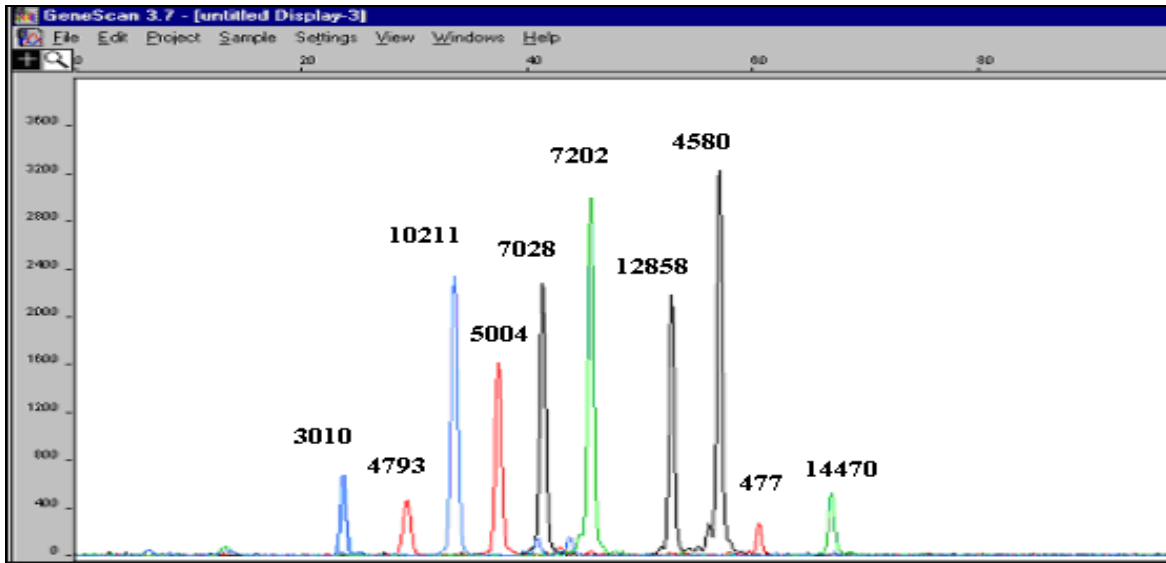
**Şekil 14a.** SNaPshot reaksiyon karışımı (5  $\mu$ L) kullanıldığında elde edilen elektroforegram



Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

**Şekil 14b.** SNaPshot reaksiyon karışımı (2.5 µL) kullanıldığında elde edilen elektroforegram

Şekil 15'te yukarıda açıklanan çalışma koşulları optimize edildikten sonra elde edilen ve tekrarlandığında aynı sonuçları veren mtDNA'daki 10 SNP noktası görülmektedir.

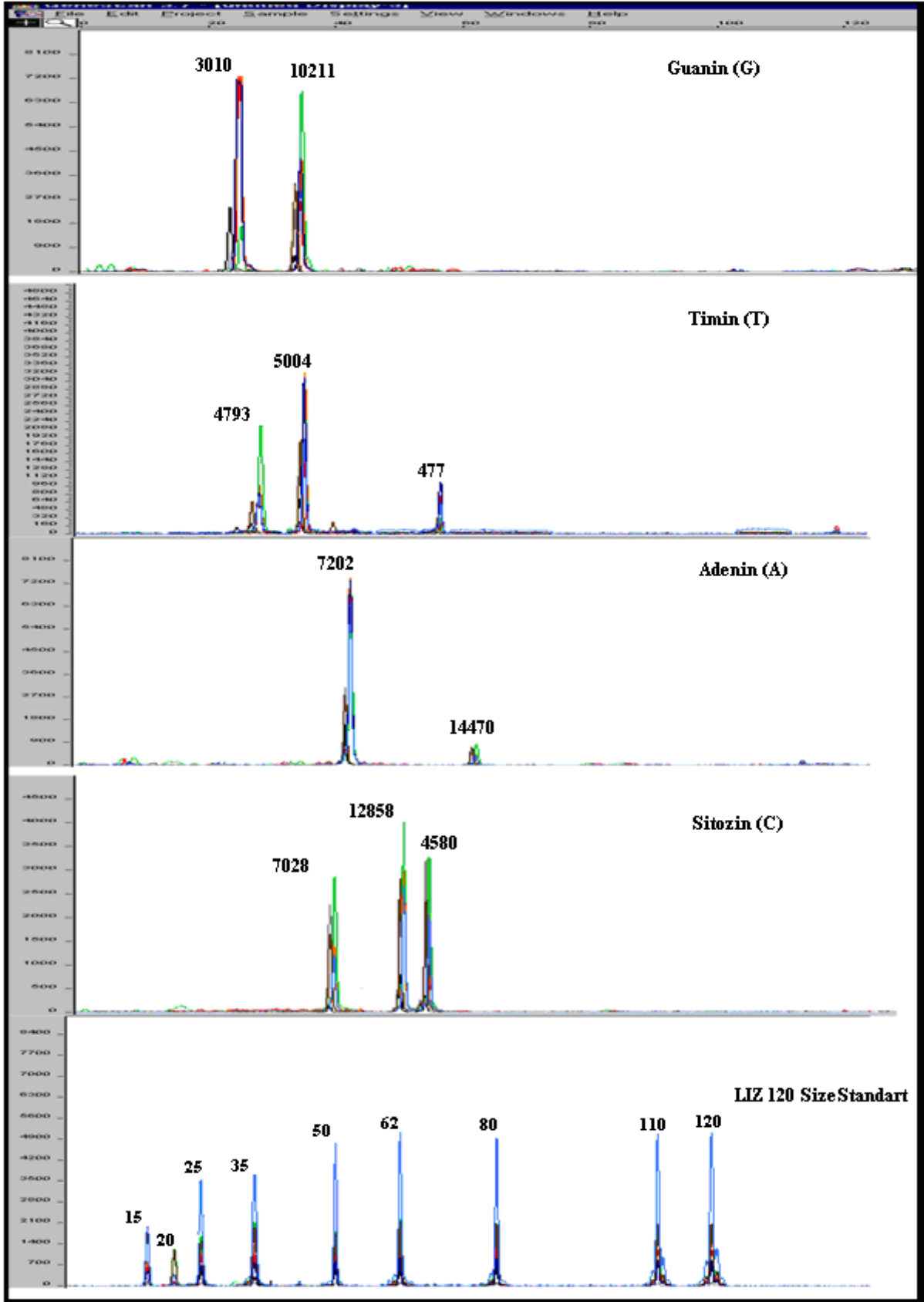


Mavi: Guanin (G), Yeşil: Adenin (A), Siyah: Sitozin (C), Kırmızı: Timin (T)

**Şekil 15.** Tüm parametreler optimize edildiğinde 10 SNP noktasının görünümü

Optimizasyon çalışması tamamlandıktan sonra optimal koşullarda, farklı zamanlarda 8 kere 9947A pozitif kontrol DNA'sı çalışıldı. Elde edilen elektroforegramlar Şekil 16'da görüldüğü gibi üst üste çakıştırıldığında 8 farklı çalışmadan elde edilen piklerin hepsinin beklenen SNP noktasında oldukları tespit edildi. Bu sonuç, optimizasyon çalışmasının yeniden üretilebilirlik parametresinin gerçekleştirildiğini göstermesi açısından önemlidir.





Not: Her bir çalışma farklı renkte gösterilmiştir.

Şekil 16. Kontrol DNA'ların karşılaştırılması sonucu her bir bazın görünümü

Literatürde (Vallone P.M. ve ark. 2004) bu çalışmanın konusu olan mtDNA'daki 10 SNP noktasında beklenen polimorfizmler, son ürün boyutları (size), beklenen renkler ile birlikte yapılan çalışma sonucunda analiz edilen 16 pozitif kontrol DNA'sı (9947A) ve 32 örnek olmak üzere toplam 48 çalışmada gözlenen son ürün uzunluklarına (size) ait hesaplanan ortalamalar ve bunların standart sapmaları Tablo 15'te görülmektedir.

**Tablo 15.** 10 SNP noktasında beklenen polimorfizmler-son ürün uzunlukları (Vallone P.M. ve ark. 2004) ile çalışılan pozitif kontrol ve örneklerin son ürün uzunluklarının karşılaştırması

	<b>3010</b>	<b>4793</b>	<b>10211</b>	<b>5004</b>	<b>7028</b>	<b>7202</b>	<b>12858</b>	<b>4580</b>	<b>477</b>	<b>14470</b>
	(G/A)	(A/G)	(C/T)	(T/C)	(C/T)	(A/G)	(C/T)	(G/A)	(T/C)	(T/A)
<b>Beklenen Son Ürün Uzunluğu (size)</b>	20	23	31	35	39	43	51	55	59	63
<b>9947A Pozitif Kontrol Son Ürün Uzunluğu (size) Ortalaması (n=16)</b>	25.14	30.89	34.67	38.26	42.72	46.57	53.46	57.51	60.75	67.69
<b>Örneklerin Son Ürün Uzunluğu (size) Ortalaması (n=32)</b>	24.77	29.97	34.10	37.82	41.92	46.47	53.00	57.43	60.89	67.30
<b>Standart Sapma (n=48)*</b>	±0.760	±0.652	±0.448	±0.641	±0.628	±0.472	±1.155	±0.490	±0.264	±0.328

\*Pozitif kontrol (n=16) ve örneklerin (n=32) toplam standart sapması (n=48)

MtDNA’da çalışılan 10 SNP noktasının bağlantısız 20 bireyden elde edilen genotip sonuçları Tablo 16’da gösterilmiştir. Buna göre, 3010 ve 7028 noktalarında Türkiye toplumu için polimorfizm belirlenmiştir.

**Tablo 16.** Bağlantısız 20 bireyin 10 SNP noktasına göre genotipleri

Örnek No	SNP Noktası									
	3010	4793	10211	5004	7028	7202	12858	4580	477	14470
1	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
2	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
3	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
4	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
5	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
6	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
7	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
8	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
9	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
10	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
11	A	A	G	T	T	A	C	G	T	T
12	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
13	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
14	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
15	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
16	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
17	G	A	G	T	T	A	C	G	T	T
18	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
19	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T
20	G	A	G	T	C	A	C	G	T	T

Tablo 17’de ise çalışılan 7 aileye ait genotipler verilmiştir. İki ailede (3. ve 4. aile) incelenen 10 SNP noktası açısından anne ile çocuk aynı genotipe sahipken, baba-çocuk arasında 7028 noktasında farklılık gözlemlendi. Bir ailede ise (7.aile) annenin genotipi belirlenemedi. Ancak baba ile çocuk 3010 ve 7028 noktalarında farklılık gösterdi.

**Tablo 17.** Aile genotipleri

AİLE GENOTİPLERİ											
		3010	4793	10211	5004	7028	7202	12858	4580	477	14470
1.aile	Anne	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
2.aile	Anne	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
3.aile	Anne	G	T	G	T	C	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	C	A	C	C	T	A
4.aile	Anne	G	T	G	T	C	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	C	A	C	C	T	A
5.aile	Anne	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
6.aile	Anne	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Baba	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	T	A	C	C	T	A
7.aile	Baba	A	T	G	T	T	A	C	C	T	A
	Çocuk	G	T	G	T	C	A	C	C	T	A

## V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Adli bilimlerde mtDNA analizinde kullanılan en yaygın yöntem HV1/HV2 bölgelerinin dizinlenmesidir. HV1/HV2 denilen bölgeler mtDNA'nın kodlama yapmayan ve bireyler arasında yüksek oranda değişkenlik gösteren kontrol bölgesi içinde yer alan kısımlardır. Bu bölgenin büyüklüğü yaklaşık 610 baz çifti kadardır. Analizinde genelde Sanger dizinleme metodu kullanılmaktadır. Ancak dizinleme metodunun zaman alıcı, analizinin ve değerlendirme prosedürünün pahalı olması ve yalnız HV1/HV2 bölgelerinin kullanılması durumunda ayırım gücünün sınırlı olması nedeniyle günümüzde mtDNA'da yer alan SNP'ler de kullanılmaktadır. SNP'ler tek nükleotid değişimi sonucunda oluşan polimorfizmlerdir. İnsan genomunda oldukça fazla miktarda bulunurlar. SNP'ler son yıllarda adli bilimler alanında da kullanılmaya başlanmıştır (Kwok P. 2001, Jenkins S. ve ark. 2002, Butler J.M. 2007). Bu çalışmanın amacı, seçilen 10 SNP noktasının (477, 3010, 4580, 4793, 5004, 7028, 7202, 10211, 12858 ve 14470) Türk toplumuna ait çalışmalarda kullanılabilmesi için uygunluğunun belirlenmesi ve SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyon çalışmasının yapılmasıdır.

MtDNA ile kimliklendirme yapılırken genellikle HV1/HV2 bölgelerinin dizin analizi yapılmaktadır. Ancak bu çalışma ile kişiler arasında ayırım yapılamadığında mtDNA'nın kodlayan bölgesinde yer alan SNP noktaları taranarak ayırım gücünün artırılması yoluna gidilmektedir (Brandsta'tter A. ve ark. 2003, Quinta'ns B. ve ark. 2004, Brandsta'tter A. ve ark. 2006, lvarez-Iglesias V.A. ve ark. 2007). Protein kodlaması yapan gen bölgesinde bulunan SNP noktalarının seçiminde etik kaygılar nedeniyle potansiyel fenotipik etki yapmayacak, protein yapısını değiştirmeyecek olanlar tercih edilmelidir. Örneğin, kayıp bir insan vakasında ailenin referans dizininde Alzheimer hastalığı ile bağlantılı bir polimorfizmin belirlenmesi durumunda aileyle bu bilginin paylaşılıp paylaşılmaması, bu bilginin başkalarının eline geçmemesi kısacası ne yapılması gerektiğiyle ilgili bazı etik sorunlar ortaya çıkabilir (Coble M.D. ve ark. 2004). Bu çalışmada SNP noktalarının seçiminde etik kurallara dikkat edilmiştir. Bu duruma aykırılık gösteren tek nokta oldukça polimorfik olan ve 16S rRNA kodlayan 3010 noktasıdır. Ancak burada meydana gelen mutasyonlar sonucu bilinen herhangi bir hastalık oluşmamaktadır (Parsons T.J. 2006). Bu SNP noktasının seçilmesinin nedeni yaygın ve yüksek oranda mutasyon göstermesidir. 10 SNP bölgesi çoğunlukla tüm toplumlarda bialelik değişimler göstermektedir. Ancak 14470 noktasında bazı Afrika mtDNA'larında 'C' alelinde bulunması nedeniyle üç varyant gözlemlenmiştir (Vallone P.M. ve ark 2004). Bu çalışmaya konu olan SNP noktaların seçilmesinin diğer bir sebebi ise Roostalu U. ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları

makalede, 90 Türk ve daha birçok toplum için yaptıkları çalışma sonucunda H1 haplogrubunun oldukça yaygın olarak görüldüğünü belirlemiş olmalarıdır (Roostalu U. ve ark. 2007). Dolayısıyla, bu tez çalışmasında özellikle mtDNA'nın H1 haplogrubunun ayırım gücünü arttırmaya yönelik olan bir SNP seti seçilmiştir.

SNP'lerin belirlenmesinde genel bilgiler bölümünde de anlatıldığı gibi birçok metot mevcuttur. Adli amaçlar için kullanılacak SNP analiz yönteminin seçiminde dikkate alınması gereken başlıca konular; yöntemin duyarlı olması, tekrarlanabilmesi, karışım ve heteroplazminin belirlenebilmesi, bozulmuş olgu örnekleri için yüksek performans göstermesi, multipleks yapabilme kapasitesi, düşük DNA miktarlarında analiz yapılabilmesidir. Buna ek olarak harcanan zaman, yöntemin maliyeti ve analiz için gerekli olan cihazlar gibi konularda önem taşımaktadır (Coble M.D. ve ark. 2004, Sobrino B. ve ark. 2005). Bu çalışmada tek baz uzama reaksiyonu temeline dayanan ve ürünlerin belirlenmesinde floresan deteksiyon yöntemi kullanılan SNaPshot Multipleks Kit tercih edilmiştir. Bunun en önemli nedeni yöntemin duyarlılığının yüksek olması yani özellikle bozulmuş olan ve az miktarda DNA içeren örneklerle çalışılabilmesi (en az 1 pg), karışım örnekleri ve farklı dokularda %10'dan az mutant genom içerdiğinde bile mtDNA nokta heteroplazmalarının belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı ve hassas bir yöntem olması, multipleks yapabilme kapasitesinin yüksek olması, diğer yöntemlere göre maliyetinin daha düşük olması gibi avantajlarıdır (Brandsta'tter A. ve ark. 2003, Vallone P.M. ve ark. 2004, Cassandrini D. ve ark. 2006). Ayrıca herhangi bir özel ekipmana ihtiyaç duymadan, PCR ve kapiler elektroforez gibi birçok adli bilimler laboratuvarında bulunan ekipmanla çalışma imkanı tanıdığı için seçilmiştir (Parson W. ve ark. 2008).

DNA ile çalışılırken dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan biri kontaminasyondur. MtDNA hücre içinde çok sayıda bulunduğu için kontaminasyona daha açıktır. Dolayısıyla, bu çalışma yapılırken tüm laboratuvar çalışma şartlarına uyuldu. Önlük, eldiven, maske ve bone giyildi, tek kullanımlık pipet uçları ve ependorf tüpler kullanıldı. Sanchez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dNTP'lerin çok sayıda dondurulma ve çözülmeye karşı hassas oldukları ve bu nedenle multipleks PCR'ın başarısız olabileceği belirtilmiştir (Sanchez, J.J. ve ark. 2003). Bu durum dikkate alınarak kullanılan kimyasal maddeler kontaminasyondan ve bozulmadan kaçınmak amacıyla birkaç tüpe bölünerek uygun şartlarda saklandı ve kullanıldı. Laboratuvar temizlik şartlarına uyuldu. Ayrıca mazlemelerde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını anlayabilmek amacıyla belirli aralıklarla negatif kontrol reaksiyonu yapıldı.

Bu çalışmada SNaPshot minisekanslama tekniği ile 10 SNP noktası için optimizasyon gerçekleştirildi. Çalışmanın ilk aşamasında SNaPshot Multikleks Kit içeriğinde yer alan pozitif kontrol kullanılarak bu araştırmanın gerçekleştirildiği laboratuvar koşullarında elde edilen piklerin beklenen son ürün uzunluğunun (size) kit protokolünde verilen son ürün uzunlukları ile uyumlu olup olmadığı kontrol edildi. Kit protokolünde ön görülen son ürün uzunluğu, sinyal renkleri ve heterozigotluk durumu ile ilgili bilgiler Tablo 13'te görülmektedir. Deney sonucunda elde edilen elektroforegram Şekil 11'de yer almaktadır. Söz konusu elektroforegramda kitte öngörülen son ürün uzunluğu ile gözlenenler arasında farklılık olduğu belirlendi. Ancak bu durumun kullanılan boyaların yapısına, yürütme koşullarına bağlı olarak değişebileceği kit protokolünde ve literatürde belirtilmektedir (ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokol 2000, Salas A.ve ark. 2005). Kitin pozitif kontrolü daha sonra belirli aralıklarla toplam 11 kez çalışıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde son ürün uzunluğunun (size) ortalama değeri ve standart sapması hesaplandı (Tablo 14). Araştırmanın ikinci basamağında hem optimizasyonu kolaylaştırmak hem de yöntemin tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için miktarı belli olan 9947A pozitif kontrol kullanıldı. Bir sonraki aşamada ise aydınlatılmış onam formu alınan 30 bireyin kan örnekleri ile 2 bireyin ağız içi sürüntü örnekleri çalışıldı.

Optimizasyon yapılırken birinci ve ikinci PCR ile PCR ürünlerinin saflaştırma aşamasında bazı modifikasyonlar gerçekleştirildi. Özellikle multipleks PCR'da çok sayıda nokta eş zamanlı olarak çoğaltılacağı ve bu nedenle çok sayıda primer kullanılacağı için bu aşamanın optimizasyonu önemlidir. Buna rağmen multipleks PCR'ın daha kısa sürede çok sayıda bölgeyi aynı anda çoğaltması, her bölgenin ayrı olarak çoğaltılmasına göre maliyetinin daha düşük olması, kullanılan malzeme ve gerekli olan kalıp DNA miktarının daha az olması gibi avantajları bulunmaktadır (Butler J.M., Ruitberg C.M ve ark. 2001). Multipleks PCR'da her bölge için kullanılacak primerlerin dizaynı oldukça önemlidir. Özellikle primer-dimer etkileşimleri, bağlanma sıcaklıkları ve uzama reaksiyonundaki primerlerin elektroforetik olarak ayrımının tam olarak sağlanması için primerlere poli-T kuyruklarının eklenmesi gibi birçok parametre önem taşımaktadır. Uzama primerlerine poli-T kuyruğunun eklenmesi uzama ürünlerinin birbirlerinden daha iyi ayrılmasını böylece her lokustaki ürünlerin kolay ve tam olarak identifikasyonunu sağlamaktadır. Primer dizaynında uzama primerlerinin uzunluğu da dikkat edilmesi gereken noktalardan biridir. Eğer uzama primerleri en az 28-30 baz uzunluğunda olursa piklerin yorumlanması daha doğru olarak yapılabilir (Onofri ve ark. 2006). Bu çalışmada kullanılan primerlerin dizaynı ile ilgili daha kapsamlı bilgi Ek 3'te verilmiştir. Yapılan çalışmanın birinci

PCR aşamasında kit kullanılmadığından PCR için gerekli tüm bileşenler tek tek PCR karışımına eklendi. Yapılan ilk çalışmalarda 3010, 10211 ve 7202 noktalarında çok yüksek, çatallı, iç içe pikler görüldü. Çalışmanın genelinde kirlilik saptandı. Bunun nedeni söz konusu SNP noktaları için kullanılan primer miktarlarının fazla olmasıdır (Butler J.M., Ruitberg C.M ve ark. 2001). Çalışmada önce yalnız birinci PCR aşamasında kullanılan primer karışımının miktarı azaltıldı. Elde edilen elektroforegramlarda sonucun ilkinden farklı olmadığı saptandı. Peter Vallone ve ark. (2004) yaptığı bir çalışmada üretilen PCR ürün miktarı ile uzama reaksiyonunda verimlilik veya sinyal şiddeti arasında her zaman doğrusal bir bağlantı olmadığını belirtmişlerdir. Bunun üzerine, ikinci PCR'da her bir uzama primerinin eşit konsantrasyonda kullanıldığı (1µM) primer karışımı yerine dengelenmiş bir uzama primer karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu yeni primer karışımında elde edilen SNP noktalarının sinyal şiddetleri göz önüne alınarak genelde fazla sinyal veren 3010 ve 7202 noktalarının uzama primer karışımındaki konsantrasyonları azaltılırken, sinyal şiddeti az olan 4580, 477 ve 14470 noktalarının konsantrasyonu artırıldı, diğer noktalarinki ise değiştirilmedi (Tablo 7). Söz konusu değişimler sonucunda tüm noktalar belirlenebilir ve analiz edilebilir yüksekliklerde elde edildi (Şekil 12a-b). Ancak, kullanılan primer karışımlarının dengelenmesine rağmen minisekanslama reaksiyonunda kullanılan boyalara bağlı olarak bazı fragmentler elektroforegramda daha güçlü sinyal verirler. Bu nedenle, aynı SNP noktası uzama reaksiyonundaki ddNTP'lerin eklenmesine bağlı olarak farklı pik yükseklikleri gösterebilir. Genel olarak, dR100 ile işaretli olan guanin diğer ddNTP'lere göre daha yüksek sinyal verir. Elektroforegramın değerlendirilmesi pik yüksekliğine değil son ürün uzunluğuna (size) göre yapıldığı için bu durum değerlendirmeyi çok fazla etkilemez (Quinta'ns B. ve ark. 2004, Vallone P.M. ve ark. 2004).

Sonuçların analizinde elde edilen elektroforegramlarda düşük sinyal veren piklerle zeminden kaynaklanan artefakt piklerin karıştırılmaması gereklidir. SNaPshot Multipleks Kit bu açıdan dizinlemeye göre avantajlıdır. Dizinlemede farklı baz varyantlarından kaynaklanan floresan sinyaller, heteroplazmi ve karışım örneklerinin belirlenmesinde problem yaratabilir. SNaPshot kitte ise uzama reaksiyonunda bağlanan floresan işaretli ddNTP'lerin elektroforezdeki küçük hareket farklılıklarına bağlı olarak iki alel varyantı bir diğerinden az bir uzaklıkta yer alır. Bu şekilde heteroplazmi veya karışım örnekleri rahatlıkla belirlenebilir (Vallone P.M. ve ark. 2004). Her ne kadar bu çalışmada herhangi bir heteroplazmiye rastlanmasada heteroplazmi olduğu durumlarda dikkatli olunmalıdır.

Sonuçların doğru yorumlanmasında PCR ürünlerinin saflaştırılması önem taşımaktadır



(Onofri ve ark. 2006). Bu nedenle birinci ve ikinci PCR sonrasında saflaştırma işlemi yapıldı. Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılmasında Ekzonükleaz I ve Shrimp alkalın fosfataz (SAP) kullanıldı. Tek zincirli DNA'yı hidrolize eden Ekzonükleaz I bağlanmayan primerleri uzaklaştırılmak için kullanılırken Shrimp alkalın fosfataz (SAP) enzimi ise bağlanmayan dNTP'leri uzaklaştırmak için kullanıldı. İkinci bir saflaştırma aşaması da uzama reaksiyonu (ikinci PCR) sonrasında sadece SAP kullanılarak uygulandı. Bunun amacı, bağlanmayan floresan işaretli ddNTP'lerin 5' fosforil gruplarının fosfataz etkisiyle uzaklaştırılarak istenmeyen sinyallerin oluşumunu en aza indirmektir (ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokol 2000). Eğer ikinci saflaştırma etkili bir şekilde yapılamazsa bağlanmayan ddNTP'ler uzaklaştırılamadığı için SNaPshot ürünlerinin elektroforegramında küçük boyutlarda artefakt pikler görülebilir (Brión M. 2005). Yapılan deneylerde elektroforegramda tabana yakın (baseline) artefakt pikler görüldü. Bunları azaltmak amacıyla başka literatürlerdeki prosedürler göz önüne alınarak uzama reaksiyonu sonrasında SAP aktivasyonunu sağlayan 37°C'deki inkübasyon süresi 40 dakikadan 70 dakikaya çıkarıldı (Quinta'ns B. ve ark. 2004). Ancak istenen sonuç alınamadı ve bu süre 90 dakikaya uzatıldı (Sanchez J.J. ve ark. 2006). Bu işlem sonucunda oldukça temiz bir elektroforegram görüntüsü elde edildi. Bu durum SAP ile saflaştırma işleminin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Saflaştırma ile ilgili elektroforegramlar Şekil 13a-13b-13c'de görülmektedir.

SNaPshot multipleks kit kullanım protokolünde her reaksiyon için 5 µL reaksiyon karışımı kullanılması öngörülmüştür. Ancak literatür bilgisine dayanarak (Brandsta'tter A. ve ark. 2003, Vallone P.M. ve ark. 2004, Sanchez J.J. ve ark. 2006) malzemenin tasarruflu kullanımı için reaksiyon karışım miktarı yarıya (2.5 µL) indirilerek kullanıldı. Her iki miktar sonuçları karşılaştırıldığında sonuçların doğru ve güvenilir olduğu saptandı (Şekil 14a-14b).

Yukarıda anlatılan değişiklikler yapılarak optimal çalışma koşulları belirlendi. Şekil 15'te görüldüğü gibi son derece temiz ve sonuçların rahat, doğru ve güvenilir bir şekilde değerlendirildiği elektroforegram görüntüsü elde edildi. Optimizasyon aşaması tamamlandıktan sonra yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla belirli aralıklarla aynı koşullarda 9947A pozitif kontrol DNA'sı farklı zamanlarda 8 kez çalışıldı. Yapılan tüm deney sonuçları üst üste karşılaştırıldı. Şekil 16'da buna ait elektroforegram yer almaktadır. Burada her çalışma ayrı bir renkle gösterildi. Şekilde görüldüğü gibi 10 SNP noktası ve LIZ 120 İç Boyut Standardı'nın da her çalışmada aynı yerde görülmesi yani her tekrar sonucunun aynı olması yöntemin tekrarlanabilir olduğunu ispatladı.

İkinci PCR sonrası elektroforezde iyi bir ayırım yapılabilmesi için ampliconlar arasında en az dört baz uzunluk farkı olması önerilmektedir (Salas A. ve ark. 2005). Bu çalışmada elde edilen son ürün uzunlukları arasında da önerilen baz uzunluk farkları bulunmaktadır. Bu nedenle ayırmada herhangi bir problemle karşılaşılmadı. Daha öncede belirtildiği gibi son ürün uzunluklarının elektroforezdeki yerlerinin saptanması için kitin kendi pozitif kontrolü ile yapılan çalışmada beklenen son ürün uzunlukları ile gözlenen arasında 1-6 bazlık kayma olduğu saptandı. Aynı durum 9947A pozitif kontrol ve genotip tayini yapılan örneklerde de gözlemlendi. Ancak çalışmanın tamamı kendi içinde değerlendirildiğinde bir uyum olduğu, 10 SNP noktasının her çalışmada elektroforetik yürütme sonunda aynı noktada olduğu belirlendi. Saptanan kayma elektroforetik hareketlilikteki farklılıklardan, ampliconun uzunluğu, dizini ve ampliconu işaretlemek için kullanılan boyalardan kaynaklanabilmektedir. Bu farklılıklar çeşitli çalışmalarda da gözlenmiştir (Salas A. ve ark. 2005). Bunun sebeplerinin kapiler elektroforezde uzama fragmentlerinin ikincil yapıları ve floresan maddelerin farklı ağırlıklarının kısa DNA moleküllerinin hareketine olan etkisi olduğu belirtilmiş ve bu nedenle kısa uzama ürünlerinde ortalama 4-5 nükleotidlik kaymalar görülebildiği, bu farkın uzama primerlerinin uzunluğu 40-50 nükleotide çıkarıldığında azaldığı saptanmıştır (Onofri ve ark. 2006).

Tüm örneklerin analizinden sonra bunlar kendi aralarında gruplandırılarak elde edilen genotipler incelendi. İlk olarak, bağlantısız 20 bireyin 10 SNP noktasına göre genotipleri değerlendirildi. Yalnız 20 bireyden bir kişide 3010 ve on bir kişide de 7028 noktasında polimorfizm gözlemlendi. Daha sonra 7 aile üzerinde annelik belirlenmesi yapıldı. Bunlardan 4 tanesinde herhangi bir polimorfizm gözlenmedi. İki ailede ise anne ve çocuk aynı genotipe sahipken babada 7028 noktasında farklılık belirlendi, bir ailede ise anneden sonuç alınmadı, baba ve çocukta 3010 ve 7028 noktalarında farklılık görüldü. Bu sonuçlar söz konusu SNP noktalarına dayanarak kişilerin birbirinden ayırımının kısıtlı bir şekilde yapılabildiğini göstermiştir. Ancak, ayırım gücünü arttırmak için Türk toplumunda polimorfik olan SNP noktalarının belirlenerek topluma özgü SNP panelleri oluşturmak ve SNP noktalarının sayısını arttırmak gerekmektedir. Bu çalışma sonucunda analiz edilen 10 SNP noktasından yalnız 3010 ve 7028'in Türk toplumu için polimorfik olduğu belirlendi. Fakat çalışılan SNP noktalarının polimorfizmleri ile ilgili kesin bir kanaate varabilmek ve söz konusu noktaları adli bilimlerde kullanabilmek için toplum çalışmalarının yapılması zorunludur.

## VI. ÖZET

Adli olaylarda kimliklendirme yapılmasında yaygın olarak nükleer DNA kullanılmaktadır. Ancak biyolojik materyallerde nükleer DNA'nın tamamen yok olduğu veya analiz için uygun olmadığı durumlarda olayın çözümlenmesinde hücrede çok sayıda kopyası bulunan, maternal kalıtımı olan ve yüksek oranda mutasyon gösteren mtDNA'dan faydalanılmaktadır. MtDNA'nın bireyler arasında oldukça değişkenlik gösteren HV1/HV2 bölgeleriyle yeterli ayırım sağlanamadığı durumlarda ayırım gücünü arttırmak amacıyla SNP'ler çalışılmaktadır. SNP, insan genomunda çok miktarda bulunan tek nokta polimorfizmleridir. SNP'ler mutasyon oranlarının düşük olması, kolay multipleks yapılabilmesi, kolay çoğaltılabilmesi, bozulmuş örneklerde iyi sonuç vermesi nedeniyle adli bilimlerde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, seçilen 10 SNP noktasının (477, 3010, 4580, 4793, 5004, 7028, 7202, 10211, 12858 ve 14470) Türk toplumuna ait çalışmalarda kullanılabilmesi için uygunluğunun belirlenmesi ve kullanılan SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyon çalışmasının yapılmasıdır. Bu çalışma sonucunda çeşitli parametreler değiştirilerek yöntemin optimizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, onam formu alınan 32 bireyin kan ve ağız içi sürüntü örneklerinden genotip tayini yapılmış ve analiz edilen 10 SNP noktasından 3010 ve 7028 SNP noktalarında Türk toplumu için polimorfizm belirlenmiştir. Buna rağmen, çalışılan SNP noktalarının polimorfizmleri ile ilgili kesin bir kanaate varabilmek ve söz konusu noktaları adli bilimlerde kullanabilmek için toplum çalışmalarının yapılması zorunludur. Bu SNP noktalarına dayanarak kişilerin birbirinden ayırımı kısıtlı bir şekilde yapılabilmektedir. Tam bir ayırım gücü elde edebilmek için Türk toplumunda polimorfik olan SNP noktalarının belirlenerek topluma özgü SNP panelleri oluşturulması ve SNP noktalarının sayısının artırılması gerekmektedir.

## VII. SUMMARY

Nuclear DNA is usually used in forensic cases for identification. But sometimes nuclear DNA is degraded and it can't be analysed. So analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) is a useful tool in forensic cases when sample contains too little or degraded nuclear DNA. MtDNA has some advantages as high number of copies per cell, maternal inheritance and high mutation rate. Therefore, it is preferred in forensic science. MtDNA has hyper variable regions (HV1/HV2) which are variable among individuals. The typing of SNPs located though the whole mitochondrial genome can help resolve individuals with an identical HV1/HV2 sequence. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) represent the most abundant class of human polymorphisms. SNPs have low mutation rate, they can be multiplexed and amplified easily, they give good and reliable results from degraded samples. Because of this reasons, SNPs are used in forensic cases for individuals identification. The aim of this thesis is determined the concordance of selected 10 SNPs (477, 3010, 4580, 4793, 5004, 7028, 7202, 10211, 12858 ve 14470) to provide using in studies about Turkish population and the other aim is optimization of SNaPshot minisequencing technique. At the end of this study the optimization of minisequencing technique was done by changing some assay parameters. Also blood and buccal swab samples obtained from 32 individuals were genotyped and as a result two polymorphisms (3010 and 7028 SNP) were determined for Turkish population. But to arrive at a clear conclusion and to use such SNPs for forensic identification, population studies must be done. According to these SNPs limited identification between individuals can be done. To provide exact discrimination power, SNPs that are polymorphic for Turkish population must be determined, SNP panels must be developed and the analysed SNP numbers should be increased.

## VIII. KAYNAKLAR

ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit Protocol, Copyright 2000, Applied Biosystems.

Altunçul H. (2001), Kemik Dokudan DNA Çekitleme ve tipleme Yöntemleri, Doktora tezi, İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Alvarez-Iglesias V., Salas A., Cerezo M., Ramos-Luis E., Jaime J.C., Lareu M.V., Carrecedo A. (2006), Genotyping coding region mtDNA SNPs for Asian and Native American haplogroup assignation, International Congress Series 1288, 4-6.

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD Hot Start, Strong Finish™, Applied Biosystems, Copyright 2007, Applied Biosystems.

Anderson S., Bankier A.T., Borel B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R. & Young I.G. (April 1981), Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature Vol. 290.

Andreasson H., Nilsson M., Budowle B., et al. (2006), Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing. Int J Legal Med; 120(6):383-90.

Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. (Oct. 1999), Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, Nat Genet. 23(2):147.

Bandelt H.J., Kong Q.P, Parson W., Salas A. (2005), More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA? Journal of Medical Genetics, 42:957-960.

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, 2002, Applied Biosystems.

Bourke T.M., Scherczinger A.C., Ladd C., Lee C.H. (1999), NaOH Treatment to Neutralize Inhibitors of Taq Polymerase. J Forensic Sci 44:1046-1050.

Børsting C., Sanchez J.J., Morling N. (2007), Mitochondrial analysis in forensic science, From: Molecular forensics (Rapley R. Whitehouse D., Eds.), John Wiley and Sons Ltd.

Brandstätter A., Parsons T.J., Parson W. (2003), Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups, Int. J. Legal Med. 117, 291–298.

Brandstätter A., Walther P. (2003), Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts — a matter of the amplification strategy?, Int J Legal Med, 117 : 180–184 DOI 10.1007/s00414-002-0350-7.

Brandstätter A., Salas A., Niederstätter H., Gassner C., Carracedo A., Parson W. (2006), Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs, Electrophoresis 27, 2541–2550.

Brión M. (2005), Y Chromosome SNP Analysis Using the Single-Base Extension A Hierarchical Multiplex Design, From: *Methods in Molecular Biology*, (Carracedo A., Eds) vol. 297, Humana Press Inc.

Budowle B., Dickinson D., Mitochondrial DNA SNP Detection: Design Issues and Use of the Mass Spectrometer as an Analysis Platform, FBI Laboratory, 2501 Investigation Parkway; Quantico, VA 22135.

Budowle B., Planz J., Campbell R., Eisenberg A. (2004), SNPs and microarray technology in forensic genetics: development and application to mitochondrial DNA. *Forens Sci Rev*, 16:22-36.

Butler J.M, Levin B.C. (April 1998), Forensic applications of mitochondrial DNA, *Focus*, Vol 16.

Butler J.M. (2001), *Forensic DNA Typing-Biology & Technology Behind STR Markers*, Academic Press.

Butler J.M., Ruitberg C.M., Vallone P.M. (2001), Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions, *Fresenius J Anal Chem* 369:200–205.

Butler J.M., Coble M.D., Vallone P.M. (2007), STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing, *Forensic Sci Med Pathol*, 3:200–205.

Carrecado A., Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morlingf N., Olaisen B., Schneider B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M. (2000), DNA Comission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Science International* 110 79-85.

Cassandrini D., Calevo M.G., Tessa A., Manfredi G., Fattori F., Meschini M.C., Carrozzo R., Tonoli E., Pedemonte M., Minetti C., Zara F., Santorelli F.M., Bruno C. (2006), A new method for analysis of mitochondrial DNA point mutations and assess levels of heteroplasmy, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 387–393.

Chakraborty R., Stivers D. N., Su B. Zhong Y., Budowle B. (1999), The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems, *Electrophoresis* 20, 1682–1696.

Chang D.D., Hixson J.E., Clayton D.A. (1986), Minor transcription initiation events indicate that both human mitochondrial promoters function bidirectionally, *Molecular and Cellular Biology* 6(1):294-301.

Çitak E.Ç. (2000), Mitokondrial Hastalıklar, *T Klin Pediatri*, 9:32-42.

Clegg R.M., Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids, *Methods Enzymol*, 221 (1992) 353–388.

Coble M.D., Just R.S., O'Callaghan J.E., Letmanyi I.H., Peterson C.T., Irwin J.A., Parsons T.J. (2004), Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians, *Int J Legal Med*, 118 : 137–146.

Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S. (1994), DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis, *Journal of Forensic Sciences* 39:1254–1269.

Crespillo M., Paredes M.R., Prieto L., Montesino M., Salas A., Albarra'n C., ´lvarez-Iglesias V.A., Amorin A., Berniell-Lee, Brehm A., Carril J.C, Corach D., Cuevas N., Di Lonardo A.M., Doutremepuich C.G., Espinheira R.M., Espinoza M., Go'mez F., Gonza'lez A., Herna'ndez A., Hidalgo M., Jimenez M., Leite F.P., Lo'pez A.M., Lo'pez-Soto M., Lorente J.A, Pagano S., Palacio A.M., Pestano J.J., Pinheiro M.F, Raimondi E., Ramo'n M.M., Tovar F., Vidal-Rioja L., Vide M.C., Whittle M.R., Yunis J.J., Garc'a-Hirschfel J. (2006), Results of the 2003–2004 GEP-ISFG collaborative study on mitochondrial DNA: focus on the mtDNA profile of a mixed semen-saliva stain, *Forensic Sci. Int.* 160, 157–167.

Daştan K. (2006), Mitokondriyal DNA Genomu Tek Nklotid Polimorfizminin Real Time PCR Cihazı ile İdentifikasyonunu ve Starndardizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.. Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Fei Z., Ono T., Smith L.M. (1998), MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphisms with mass-tagged ddNTPs, *Nucleic Acids Res.* 26, 2827–2828.

Gill, P. (2001), An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* 114, 204–210.

Gill P., Werrett D.J., Budowle B., Guerrieri R. (2004), An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases—joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), *Science & Justice*, 44(1):51-53.

Gnel T. (2007), Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:763-767.

Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson AC. (1991 Jul), Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice, *18;352(6332):255-7.*

Hancock D.K., Tully L.A., Levin B.C. (2005), A Standard Reference Material determine the sensivity of techniques for detecting low-frequency mutation SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA, *Genomics*.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991), Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7276–7280.

- Ivarez-Iglesias V.A., Jaime J.C., Carracedo A., Salas A. (2007), Coding region mitochondrial DNA SNPs: Targeting East Asian and Native American haplogroups, *Forensic Science International: Genetics* 1, 44–55.
- Jenkins S., Gibson N. (2002), High-throughput SNP genotyping, *Comp Funct Genom*, 3: 57–66.
- Karol S., Ayvalı C., Suludere Z. (2000), *Hücre Biyolojisi* 4.baskı, S:238.
- Kline M.C., Vallone P.M., Redman J.W., Duewer D.L., Calloway C.D., Butler J.M. (2005), Mitochondrial DNA Typing Screens with Control Region and Coding Region SNPS, *J Forensic Sci*, Mar. 2005, Vol. 50, No. 2.
- Klug W.S., Cummings M.R. (2003), *Genetik kavramlar*, 2.baskı, Palme Yayıncılık, S:534.
- Kobilinsky L., Liotti T.F., Oeser-Sweat J. (2005), *DNA: Forensic and Legal Applications*, John Wiley & Sons, Inc.
- Kostrikis L.G., Tyagi S., Mhlanga M.M., Ho D.D., Kramer F.R. (1998), Spectral genotyping of human alleles, *Science* 279, 1228–1229.
- Kwok P. (2001), Methods For Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:235–58.
- Lai E. (2006), Application of SNP technologies in medicine: Lessons learned and future challenges. *Genome Res.* 11: 927-929.
- Landergrén U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. (1988), A ligase-mediated gene detection technique, *Science* 241 1077–1080.
- Lareu M., Puente J., Sobrino B., Quintans B., Brion M., Carracedo A. (2001), The use of the LightCycler for the detection of Y chromosome SNPs, *Forensic Sci. Int.* 118 163–168.
- Lareu M.V., Ruiz-Ponte C. (2005), Genotyping SNPs With the LightCycler, From: *Methods in Molecular Biology: Forensic DNA Typing Protocols* (Carracedo A., Eds) vol. 297, Humana Press Inc.
- Lewin B.(1997), *Organelle Genomes in:* 714-718.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995), Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Appl.* 4, 357–362.
- Livak K.J. (1999), Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 50 nuclease assay, *Genetic Anal. Biomol. Eng.* 14, 143–149.
- Matsuda H., Yukawa N. (2007), Mitochondrial analysis in forensic science, From: *Molecular forensics* (Rapley R. Whitehouse D., Eds.), John Wiley and Sons Ltd.



McNally L., Shaler R. C., Baird M., Balazs I., DeForest P.R., Kobilinsky L. (1989a), Evaluation of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Isolated from Human Bloodstains Exposed to Ultraviolet Light, Heat, Humidity, and Soil Contamination. *J. Forensic Sci.*, 34(5), 1059–1069.

McNally L., Shaler R.C., Shaler M., Baird M., Balazs I., Kobilinsky L., DeForest P.R. (1989b), The Effects of Environment and Substrata on Deoxyribonucleic Acid (DNA): The Use of Casework Samples from New York City. *J. Forensic Sci.* 34(5), 1070–1077.

Mergen H., Öner R. and Öner C. (2004), Mitochondrial DNA sequence variation in the Anatolian Peninsula (Turkey). *J. Genet.* 83,39–47.

Morley J.M., Bark J.E., Evans C.E., Perry J.G., Hewitt C.A., Tully G. (1999), Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 112:241–248.

Morovvati S., Modarresi M., Habibi G., Kiarudi Y., Karami A., Peyvandi A.A. (2007), Sequence Analysis of Mitochondrial DNA Hypervariable Regions: An Approach to Personal Identification, *Archives of Medical Research* 38.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, <http://www.mitomap.org/>

Nilsson M. (2007), *Mitochondrial DNA in Sensitive Forensic Analysis*, ISSN 1651-6206 ISBN 978-91-554-6785-2, urn:nbn:se:uu:diva-7458//55, Uppsala Universitet, Sweden.

Nilsson M., Andreasson H., Ingman M., Allen M. (2008), Evaluation of mitochondrial DNA coding region assays for increase discrimination in forensic analysis, *Forensic Science International: Genetics* 2, 1-8.

Norton N., Williams N.M., Williams H.J. et al. (2002), Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. *Hum Genet* 110:471–478.

Onofri V., Alessandrini F., Turchi C., Pesaresi M., Buscemi L., Adriano Tagliabrac A. (2006), Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs, *Forensic Science International* 157, 23–35.

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, November 2007, Second Edition, Qiagen.

Quintaíns B., Ivarez-Iglesias V.A., Salas A., Phillips C., Lareu M.V., Carracedo A. (2004), Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing, *Forensic Science International* 140, 251–257.

Paneto G.G., Martins J.A., Longo L.V.G., Pereira G.A., Freschi A., Alvarenga V.L.S., Chen B., Oliveira R.N., Hirata M.H., Cicarelli R.M.B. (2007), Heteroplasmy in hair: Differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate, *Forensic Science International* 173, 117–121.

Parsons T.J. (March 2006), Mitochondrial DNA Genome Sequencing and SNP Assay Development for Increased Power of Discrimination, Final Report.

Parson W., Fendt L., Ballard D., Børsting C., Brinkmann B., Carracedo A., Carvalho M., Coble M.D., Real F.C., Desmyter S., Dupuy B.M., Harrison C., Hohoff C., Just R.S., Krämer T., Morling N., Salas A., Schmitter H., Scheider P.M., Sonntag M.L., Vallone P.M., Brandstätter A. (2008), Identification of West Eurasian mitochondrial haplogroups by mtDNA SNP screening: Results of the 2006-2007 EDNAP collaborative exercise, *Forensic Science International: Genetics* 2, 61-68.

Passarge E. (1994), *Renkli Genetik Atlası*, Nobel Tıp Kitabevi.

Pastinen T., Raitio M., Lindroos K., Tainola P., Peltonen L., Syvanen A.C. (2000), A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays, *Genome Res.* 10 1031–1042.

Pfeiffer H., Steighner R., Fisher R., Mørnstad H., Yoon CL., Holland MM. (1998) Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Legal Med*, 111:309e313.

Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren P. (1996), Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Anal. Biochem.* 242 84–89.

Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. (1998), A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science* 281 363–365.

Roostalu U., Kutuev I., Loogva li E.L., Metspalu E., Tambets K., Reidla M., Khusnutdinova E. K., Usanga E., Kivisild T., Villems R. (2007), Origin and Expansion of Haplogroup H, the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage in West Eurasia: The Near Eastern and Caucasian Perspective, *Mol. Biol. Evol.* 24(2):436–448.

Rudin N., Inman K. (2002), *An Introduction to Forensic DNA Analysis*, 2nd. Edition, CRC Press, S.79-83, 114-127.

Salas A., Lareu M.V., Carracedo A. (2001), Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report, *Int J Legal Med*, 114 :186–190.

Salas A., Richards M., T. De la Fe´, Lareu M.V., Sobrino B., Sa´nchez-Diz P., Macaulay V., Carracedo A. (2002), The making of the African mtDNA landscape, *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1082–1111.

Salas A., Quintáns B., Álvarez-Iglesias V. (2005), SNaPshot Typing of Mitochondrial DNA Coding Region Variants, *From: Methods in Molecular Biology: Forensic DNA Typing Protocols* (Carracedo A., Eds) vol. 297, Humana Press Inc.

Saferstein R. (2001), *Criminalistics An Introduction to Forensic Science*, 7th edition, S:375.

Sanchez, J.J., Børsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernandez A., Morling N. (2003), Multiplex PCR and minisequencing of SNPs— a model with 35 Y chromosome SNPs, , Forensic Science International 137 74–84.

Sanchez J.J., Børsting C., Morling N. (2005), Typing of Y Chromosome SNPs With Multiplex PCR Methods, From: Methods in Molecular Biology: Forensic DNA Typing Protocols (Carracedo A., Eds) vol. 297, Humana Press Inc.

Sanchez J.J., Phillips C., Børsting C., Balogh K., Bogus M., Fondevila M., Harrison C.D., Musgrave-Brown E., Salas A., Syndercombe-Court D., Schneider P.M., Carracedo A., Morling N. (2006), A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification, , Electrophoresis, 27, 1713–1724.

Schwartz M.,Ph.D., Vissing J., M.D.,Ph.D. (August 22, 2002), Paternal Inheritance Of Mitochondrial DNA, N Engl J Med,Vol.347,N.8 , www.nejm.org.

Signer E., Kuenzle C.C., Thomann P.E., Hubscher U. (1988), DNA Fingerprinting: Improved DNA Extraction From Small Blood Samples, Nucleic Acids Research, 16:7738.

Sobrinho B., Brio'n M., Carracedo A. (2005), SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, Forensic Science International 154, 181–194.

Sobrinho B., Carracedo A. (2005), SNP Typing in Forensic Genetics A Review, From: Methods in Molecular Biology: Forensic DNA Typing Protocols (Carracedo A., Eds) vol. 297, Humana Press Inc.

Sokolov B.P.(1990), Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA, Nucleic Acids Res. 18, 3671.

Stewart E., Fisher C.L., Aagaard P.J., Wilson M.R., Isenberg A.R., Polansky D., Pokorak E., Dizinno J.A., Budowle B. (2001), Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region, J. Forensic Sci. 46, 862–870.

Szibor R., Plate I., Schmitter H., Wittig H., Krause D. (2006), Forensic mass screening using mtDNA, Int J Legal Med DOI 10.1007/s00414-006-0085-y.

Temizkan G., Yilmazer S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Sarıkaya A., Arda N. (2004), Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), Yayın no:2, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Timur S. (2006), Antalya'da SNP Analizi, Uzmanlık Tezi, T.C. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı ,Antalya.

Tyagi S., Kramer F.R. (1996), Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, Nat. Biotechnol. 14, 303–308.

- Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. (1998), Multicolour molecular beacons for allele discrimination, *Nat. Biotechnol.* 16, 49–53.
- Underhill P., Passarino G., Lin A.A., Shen P., Mirazon Lahr M., Foley R.A., Oefner P.J., Cavalli-Sforza L.L. (2001), The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations, *Ann. Hum. Genet.* 65, 43–62.
- Vallone P.M. (2002), Analyzing Single Nucleotide Polymorphisms, NIST Biotechnology Division, [www.cstl.gov/strbase/NISTpub.htm](http://www.cstl.gov/strbase/NISTpub.htm).
- Vallone P.M., Just R.S., Coble M.D., Butler J.M., Parsons T.J. (2004), A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome, *Int J Legal Med*, 118 : 147–157.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., et al. (2001), The sequence of the human genome. *Science*; 291:1304- 1351.
- Wallace D.C. (1994), Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism, *Journal of Bioenergenics and Biomembranes*, Vol 26, No.3.
- Wallace D.C. (1995), Mitochondrial DNA Variation in Human Evolution, *Degenerative Disease, and Aging*, *Am. J. Hum. Genet.* 57:201-223.
- Walsh S.J. (2007), Current and future trends in forensic molecular biology, From: *Molecular forensics* (Rapley R. Whitehouse D., Eds.), John Wiley and Sons Ltd.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolshy R., Chandon G., Perkins N., et al. (1998), Large scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*; 280:1077-1082.
- Wang X., Tomso D.J., Liu X., Bell D.A. (2005), Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207:S84-S90.
- Wells J. D., Introna F., G. Di Vella, Capobasso C.P., Hayes J., Sperling F.A.H. (2001), Human Maggot and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots, *J. Forensic Sci.*, 46(3), 685–687.
- Wilson M.R., Allard M.W. (2004), Phylogenetics and Mitochondrial DNA, *Forensic Sci Rev* 16:37.
- Wittig H., Augustin C., Baasner A., Bulnheim U., Dimo-Simonin N., Edelmann J., Hering S., Jung S., Lutz S., Michael M., Parson W., Poetsch M., Schneider P.M., Weichhold G., Krause D. (2000), Mitochondrial DNA in the central european population Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-Loop-Base Database, *Forensic Science International* 113, 113–118.

[www.blackwellpublishing.com/korfgenetics/figure.asp?chap=04&fig=Fig4-20](http://www.blackwellpublishing.com/korfgenetics/figure.asp?chap=04&fig=Fig4-20), Stanley NG Kwang Loong, Combinatorial methods in bioinformatics 2004/2005 Semester 1.

[www.carolguze.com/text/442-10\\_nontraditional\\_inheritance.html](http://www.carolguze.com/text/442-10_nontraditional_inheritance.html)

[www.genbilim.com/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=39](http://www.genbilim.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=39)

## EKLER

### EK 1.

#### Modifiye Fenol-Klorform-İzoamil alkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu

1. Her örnek üzerine 10 ml ultra saf su eklendi.
2. 1 dakika el ile çalkalandı.
3. Birkaç saniye vortekslendi.
4. 56 °C'de 2 saat inkübe edildi.
5. Her örnek üzerine örnek miktarı kadar SSC eklendi ve 1-2 saniye vortekslendi.
6. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Üst kısımlar (süpernatant) döküldü.
8. Her örneğe 375 µL sodyum asetat (0.2M pH 5.2) eklendi.
9. 50 µL %10'luk SDS eklendi.
10. 10 µL proteinaz K eklendi.
11. 1 gece boyunca 56 °C'de inkübe edildi.
12. 5000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. 1.5 µL'lik ependorflar içine örnekler boşaltıldı.
14. Her örneğe 120 µL fenol eklendi.
15. 30 saniye el ile tüpler çalkalandı.
16. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
17. Süpernatant alınıp başka tüpe aktarıldı.
18. Her örneğe fenol-kloroform-izoamil alkol konuldu ve yaklaşık 30 saniye elle karıştırıldı.
19. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
20. Üst faz alınıp başka tüpe aktarıldı.
21. 1000 µL %95'lik soğutulmuş etanol eklendi ve elle 10 dakika çalkalandı.
22. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
23. Üst faz döküldü.
24. Pellet üzerine 1ml %70'lik etanol eklendi.
25. 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
26. Üst faz döküldü.
27. Birkaç dakika tüplerin ağzı açık olarak dışarıda bekletildi.
28. 150 µL AE Buffer eklendi ve santrifüj edildi.
29. 56 °C'de 10 dakika bekletildi.

30. Örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'ye, uzun süreli saklama için -20°C'ye kaldırıldı.

### **Kurumuş Kan Lekesinden DNA İzolasyonu**

1. Delgeç ile 4 parça kurumuş kan lekesinden (filtre kağıdı) alınarak 1.5 µL'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 180 µL ATL tamponu eklendi.
3. 10 dakika 85 °C'de inkübe edildi.
4. 20 µL proteinaz K eklendi ve vortekslendi.
5. 56 °C'de 1 saat inkübe edildi.
6. 200 µL AL tamponu eklendi ve vortekslendi.
7. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. 200 µL % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve vortekslendi.
9. Elde edilen karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. 500 µL AW1 tamponu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. 500 µL AW2 tamponu eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. QIAamp® mini spin kolon steril 1.5 µL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 150 µL AE tamponu eklendi ve oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'ye, uzun süreli saklama için -20°C'ye kaldırıldı.

## EK 2.

### **DNA Miktarının Belirlenmesinde Spektrofotometrik Ölçümün Yapılması**

1. DNA stok solüsyonu 1:100 oranında ultra saf su ile seyreltildi.
2. Spektrofotometrenin ölçüm değerinin daha hassas olmasını sağlamak amacıyla ilk önce su referans örnek olarak kullanıldı ve spektrofotometrenin ölçeği sıfırlandı.
3. Spektrofotometrenin kuvetine seyreltilmiş DNA solüsyonu koyuldu ve 260 nm ve 280 nm'de ölçümleri yapıldı.
4. DNA miktarı hesabında aşağıdaki formülden yararlandı.

$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) \text{ miktarı} = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{sulandırma oranı} \times \text{katsayı (50)}$

$\text{Sulandırma oranı} = \frac{\text{Dilüsyonun toplam hacmi}}{\text{Dilüsyondaki stok DNA solüsyonunun hacmi}}$

5. DNA'nın saflığının kontrolü için A260/A280 oranı hesaplandı.



### EK 3.

#### **Birinci PCR Primerlerinin Seçimi**

Birinci PCR'da her SNP bölgesi için kullanılacak primer çiftleri, primer seçme programı olan Primer 3 kullanılarak seçilmiştir. Her bir ampikonun boyutu özellikle bozulmuş örneklerle çalışılırken bunların analizindeki başarıyı arttırmak amacıyla 200 bp'nin altında olacak şekilde ayarlanmıştır. 10 ampikonun 9 tanesinin uzunluğu 150 bp'nin altındadır. 20 primerin erime sıcaklığı yaklaşık  $59.8 \pm 0.9^\circ\text{C}$ 'dir. Her bir primer çifti bağımsız olarak seçilmiştir (singlepleks primer dizaynı). Tüm primerlerin son hali primer-dimer ve saç tokası etkileşimleri gibi potansiyel sekonder yapılar için görüntülenmiştir. Çünkü primerin 3' ucunun DNA kalıbına iyi şekilde bağlanması, primer uzaması ve PCR amplifikasyonu için oldukça önemlidir (Vallone P.M. ve ark. 2004).

#### **İkinci PCR Primerlerinin (Uzama Primerleri) Seçimi**

10 tane uzama primeri dizayn edilirken özellikle uygun uzunlukta olmasına ve  $T_m$  değerlerine dikkat edilmiştir.  $T_m$  değeri yaklaşık  $60^\circ\text{C}$  olan uzama primerleri seçilmiştir. Spesifik reaksiyonlar bağlanma sıcaklığının  $50-60^\circ\text{C}$  aralığında olacak şekilde ayarlanabilir.  $50^\circ\text{C}$ 'nin altında olan bağlanma sıcaklıkları spesifik olmayan reaksiyonlara neden olabilir (Sanchez J.J. ve ark. 2005). Uzama primerleri de multipleks yapılan birinci PCR primerleri seçiminde belirtildiği gibi primer-dimer ve saç tokası etkileşimleri açısından görüntülenmiştir. Farklı uzunluklardaki poli-timidin (poli-T) kuyrukları SNaPshot Multipleks Kit protokolünde istenildiği üzere 10 adet uzama primerinin 5' uçlarına eklenmiştir. Bunun nedeni, hem ikincil yapıların oluşumunu azaltmak hem de uzama primerlerinin daha iyi şekilde elektroforetik ayrımını sağlamaktır. Genel olarak kuyruğun türü sinyalleri etkilemez (ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokol 2000). Her bir uzama primerinin bağlanma için olan  $T_m$  değeri yaklaşık  $58.9 \pm 3.5^\circ\text{C}$ 'dir (t kuyruğu dahil değil) (Vallone P.M. ve ark. 2004). Ayrıca tüm uzama primerleri HPLC ile saflaştırıldı, böylece tamamlanmamış primer sentez ürünlerinin oluşumu engellendi (Quinta'ns B. ve ark. 2004).

## EK 4.

**SNaPshot Multipleks Kit İçeriği**

<b>Kit İçeriği</b>	<b>İçerik</b>
SNaPshot Multipleks Hazır Reaksiyon Karışımı	AmpliTaq DNA Polimeraz, FS
	Floresan işaretli ddNTP'ler
	Reaksiyon tamponu
SNaPshot Multipleks Kontrol Primer Karışımı (toplam 30 µL)	20A primer (0.05 pmol/µL)
	28G/A primer (0.10 pmol/µL)
	36G primer (0.05 pmol/µL)
	44T primer (0.30 pmol/µL)
	52C/T primer (0.30 pmol/µL)
	60C primer (0.30 pmol/µL)
SNaPshot Multipleks Kontrol DNA (toplam 60 µL)	CEPH DNA amplicon
Protokol	P/N 4323357
Hızlı Referans Kartı	P/N 4323975

(ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alındı.)

## EK 5.

**SNaPshot Multipleks Kit İçeriğinde Yer Almayan Materyaller**

<b>Materyal</b>	<b>Kaynak</b>
ABI PRISM 310 Genetik Analizör	Applied Biosystem
GeneAmp 9700 PCR cihazı	
GeneScan yazılım 3.1 ve üstü	
Matriks Standart Set DS-02 [dR110, dRGG, dTAMRA™, dROX™, LIZ™]	Applied Biosystem
GeneScan-120 LIZ İ Boyut Standardı (Internal Size Standard)	
Hi-Di Formamid, 25 ml	
Uzama Primerleri	
1X TE, pH 7.0	
Santrifüj	
Deiyonize su	
Shrimp alkalın fosfataz (SAP)	
Ekzonükleaz I	

(ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alındı.)

## ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Doruk Argaç

Doğum Tarihi: 17.10.1984

Doğum Yeri: İstanbul

### Eğitim Bilgileri:

1995-2002 Kırklareli Anadolu Lisesi, Kırklareli

2002-2006 Haliç Üniversitesi, İstanbul  
Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (YÖK Burslu)  
2002-2006

2006- 2009 İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü  
Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Yüksek lisans

### Sertifika:

Moleküler Tıp Kongresi, 16-19 Nisan 2005, İstanbul

Kök Hücre Kursu

Proteomiks Kursu

İstanbul Üniversitesi Genetik Kış Okulu, İstanbul

III.Ulusal NBC Sempozyumu, 13-14 Haziran 2007, GATA/Ankara

6.Anadolu Adli Bilimler Kongresi, 6-9 Eylül 2007, Manisa

14.Adli Tıp Günleri, 17-21 Ekim 2007, Antalya

Wall Street Institute İngilizce Dil Sertifikası

## Burslar:

Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, YÖK Bursu

TÜBİTAK Son Sınıf Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü Bursu

### **Uluslararası bilimsel toplantılara (kongre, sempozyum, v.b) sözel sunumu ile katılım**

1. Crime Differences in Two Neighboring Cities in Northwest Turkey, S.Sebnem Ozcan MS 2, Rehat FAİKOĞLU MD 1, Gavril Petridis MS 2, E.Hulya Yukseloglu PhD 2, Seyma Uysal MS 2, Doruk Argac BS 2, Fulya Ozsoy BS 2, Ersi Abaci Kalfoğlu PhD 2, Sevil Atasoy PhD 2; 60th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences / Washington, D.C, February 18-23 2008.
2. Optimization And Comparison Of Different Methods Of DNA Extraction From Minute Amounts Of Biological Materials, Bulbul Ozlem, Shahzad M.Saqib, Argac Doruk, Filoglu Gonul, Altuncul Havva, Cengiz Mujgan; 1st International Eurasian Forensic Science Congress, Istanbul, Turkey on 8-11th October 2008.

## **ARAŞTIRMA PROJELERİ**

### **Yüksek Lisans Tez Projesi**

SNaPshot Minisekanslama Tekniği Kullanılarak Mitokondriyal DNA'da SNP Lokuslarının Analizi, İ.Ü.Adli Tıp Enstitüsü.

Destekleyen kuruluş: T.C İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği, 2007, Proje No: 1738.