



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANTİK İNSAN KEMİKLERİNDEN DNA
İZOLASYON PROTOKOLLERİ GELİŞTİRİLMESİ**

Elif ÖZDEMİR KAYNAK

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.00
Sunuş Tarihi : 12.06.2014**

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2014

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ANTİK İNSAN KEMİKLERİNDEN DNA İZOLASYON
PROTOKOLLERİ GELİŞTİRİLMESİ**

Elif ÖZDEMİR KAYNAK

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 12.06.2014

Bornova-İZMİR

2014

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antik İnsan Kemiklerinden DNA İzolasyon Protokolleri Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 / 06 / 2014


İmzası

Elif Özdemir Kaynak

Elif ÖZDEMİR KAYNAK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Antik İnsan Kemiklerinden DNA İzolasyon Protokolleri Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.06.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

İmza

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN


.....

Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL


.....

ÖZET**ANTİK İNSAN KEMİKLERİNDEN DNA İZOLASYON
PROTOKOLLERİ GELİŞTİRİLMESİ**

ÖZDEMİR-KAYNAK, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL-ÇELİKTAŞ

Haziran 2014, 59 sayfa

Adli uygulamalarda, paleontolojik, arkeolojik ve evrimsel çalışmalarda yapılacak incelemelerde en önemli aşamalardan birisi antik dokulardan DNA'nın izolasyonu ve analiz edilmesidir. Kimliklendirme için çeşitli biyolojik kaynaklar kullanılabilir. Ancak çoğu zaman erişilebilir tek kaynak kemik numuneleri olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, adli uygulamalarda kullanılacak hızlı, alternatif bir DNA izolasyon protokolü geliştirmektir. Kemik tozu ya da dilimleri şeklindeki örnekler, farklı tampon çözeltiler, ön işlemler ve izolasyon prosedürleri uygulanarak antik insan kemiklerinden en iyi koşullarda yüksek verimde DNA eldesi sağlanmaktadır. Çalışma kapsamında yapılan analizlerde PZR inhibitörleri tarafından meydana gelebilecek kontaminasyonlar da değerlendirilmiştir. Ön işlemler, çalkalamalı inkübatörde karıştırma ve mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulanarak yapılmıştır. Buna ek olarak ise izolasyon klasik fenol-kloroform-izoamil alkol ve silika destekli spin kolonlar yardımıyla yapılmış ve birbiriyle kıyaslanmıştır. Dekalsifikasyon tamponunun toplam demineralizasyon yapması açısından lizis tamponundan daha iyi sonuç verdiği ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun 2 dakikalık süre ile çalkalamalı inkübatörde 24 saat karıştırarak bekletme süresinden çok daha hızlı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak DNA izolasyonunun mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemini takiben silika destekli spin kolon uygulanarak yapılmasıyla 19.40 ng/µl konsantrasyonda DNA elde edilmiştir. Organik ekstraksiyon yöntemine göre çevre dostu, hızlı ve ucuz bir yöntem olmasıyla adli çalışmalarda kullanılacak alternatif teknik geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: DNA, izolasyon, antik kemik, mikrodalga destekli ekstraksiyon, silika destekli spin kolon, inhibisyon

ABSTRACT**IMPROVING METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM
ANCIENT HUMAN SKELETAL MATERIAL**

OZDEMIR-KAYNAK, Elif

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ozlem YESIL-CELIKTAS

June 2014, 59 pages

One of the most important stage in forensic, paleontological, archeological and evolutionary studies is the analysis and isolation of DNA from ancient tissue residues. There are lots of biological tissues for the identification but sometimes bones are the only accessible source of DNA. The main objective of this study was to develop a rapid and alternative protocol for DNA extraction to be utilized in forensic genetics. Sample form as powder or slice, different buffer, pretreatment and extraction methodologies were compared in order to investigate the best conditions yielding the highest concentration of DNA from ancient bones. In this study, the degree of extract contamination by polymerase chain reaction (PCR) inhibitors was analysed. Pretreatment was carried out using agitation at an incubator shaker and microwave digestion. Subsequently, DNA from ancient bones was isolated by the classical organic phenol-chloroform extraction and silica based spin columns and compared as well. Decalcification buffer for total demineralization was better than the lysis buffer, whereas microwave assisted digestion proved to be very rapid with an incubation time of 2 min instead of 24 h at an incubator shaker. Consequently, DNA digestion followed by silica column application yielded a high purity DNA with a concentration of 19.40 ng/ μ l and proved to be a superior alternative to the organic extraction method, presenting an environmentally friendly, cheap and a rapid technique for forensic genetic analysis.

Keywords: DNA, isolation, ancient bone, microwave assisted extraction, silica based spin column, inhibition.

TEŞEKKÜR

Kendisini tanıdığım lisans günlerimden bu yana çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, eleştirileriyle ufku genişleten, karamsarlığa düştüğüm anda hep daha iyisini yapmam için beni motive eden değerli danışmanım ve sevgili hocam Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmam sırasında bilgi ve deneyimlerine başvurduğum yardımlarını benden esirgemeyen eleştiri ve katkılarıyla fikir veren Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ ve Yrd. Doç. Dr. Ergün ŞAKALAR'a teşekkür ederim. Araştırmada kullanılan kemik numunelerinin temin edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a teşekkür ederim.

Her türlü problemimde yanımda olan ve benden yardımlarını esirgemeyen Şeref AKAY'a, Hilal Betül KAYA'ya, Selda KARAMİL'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca benden destek ve yardımlarını esirgemeyen "Öncül Akışkan Teknolojileri ve Uygulamaları Laboratuvarı", "Moleküler Genetik Laboratuvarı" ve "Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı" çalışanlarına ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Başarılı olmamın yolunun çalışmaktan geçtiğini bana öğreten, daha başarılı işler yapmam için beni destekleyen, sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili annem Nurten ÖZDEMİR'e ve babam Ramazan ÖZDEMİR'e, ablalarım ve yeğenlerime sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tüm sabır ve anlayışıyla bana katkıda bulunan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sevgi ve desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Ahmet KAYNAK'a sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Elif ÖZDEMİR KAYNAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Kemiğin Yapısı ve Genel Özellikleri	5
2.1.1 Kemik matriksi ve hücresel elemanlar	5
2.1.2 Kortikal (kompakt) kemik dokusu ve yapısı	7
2.1.3 Süngerimsi kemik dokusu (trabeküllü kemik).....	7
2.1.4 Kemik zarları	8
2.1.5 Kemiklerin sınıflandırılması.....	8
2.2 Antik Kemikler ve Materyal Seçimi.....	9
2.2.1 DNA eldesinin başarısını etkileyen faktörler	11
2.3 Antik DNA İzolasyon Yöntemleri.....	15
2.3.1 Konvansiyonel izolasyon yöntemleri	16
2.3.2 Ticari DNA izolasyon kitleri	19
2.4 Mikrodalga Ekstraksiyon Yöntemi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulama alanları	22
2.5 Karakterizasyonda Kullanılan Yöntemler	22
2.5.1 DNA'nın saflık ve miktar tayini	22
2.5.2 Agaroz jel elektroforezi	23
2.5.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	24
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1 Kemik Numuneleri	27
3.2 Numunelerin Hazırlığı ve Sterilizasyon	27
3.2.1 Fiziksel temizlik	27
3.2.2 Kimyasal temizlik	27
3.2.3 Pulverizasyon	28
3.3 Tampon Solüsyonların Hazırlanması	29
3.3.1 Tris-HCl (1M) hazırlanması	29
3.3.2 1M NaCl hazırlanması	29
3.3.3 0,5 M EDTA-Na ₂ hazırlanması	29
3.3.4 0,5M DTT hazırlanması	29
3.3.5 DNA lizis tamponu hazırlanması	29
3.3.6 Dekalsifikasyon tamponu hazırlanması	30
3.4 İzolasyon Öncesi Ön İşlemler	30
3.4.1 Çalkalamalı inkübatörde bekletme	30
3.4.2 Mikrodalga destekli ekstraksiyon	30
3.5 Fenol: Kloroform: İzamilalkol İzolasyonu	31
3.6 Silika Destekli Spin Kolon İzolasyonu	32
3.7 Karakterizasyon ve aDNA Analizi	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7.1 Nanodrop spektrofotometre ile ölçüm.....	33
3.7.2 Qubit™ florimetre cihazı ile ölçüm.....	34
3.7.3 Agaroz jel elektroforezi	34
3.7.4 PZR analizi	35
4. BULGULAR.....	37
4.1 Ön İşlemlerin Etkisi.....	37
4.1.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu	38
4.2 İzolasyon Protokolü.....	42
4.3 Agaroz Jel Elektroforezi	42
4.4 PZR Sonuçları.....	44
5. TARTIŞMA	45
5.1 Ön İşlemlerin Etkisi.....	45
5.1.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu	45
5.2 İzolasyon Protokolü.....	46
5.3 Agaroz Jel Elektroforezi	47
5.4 PZR Sonuçları.....	47
6. SONUÇ	48
KAYNAKLAR DİZİNİ	50
ÖZGEÇMİŞ	59
EKLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Londra hayvanat bahçesinde canlı bir quagga kısağı, 1980	1
1.2. Antik DNA çalışmaları	2
2.1. Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünümü.....	7
2.2. Kemik örnekleri. Şekilde kısa ve yassı kemik örnekleri görülmektedir. Kırılmış olan uzun kemikte ise diafiz ve epifiz kısımları görülmektedir.....	9
2.3. Ölüm sonrası DNA hasarının potansiyel hedefleri	13
2.4. Kemiklerde bozunmaya neden olan bakteriler	14
2.5. Konvansiyonel izolasyon yöntemleri.....	18
2.6. Doğal ürünlerin mikrodalga ve konvansiyonel ekstraksiyondaki temel ısı ve kütle transfer mekanizmaları	20
2.7. Ekstraksiyon işlemlerinde zamana karşı verimin şematik olarak gösterilmesi	21
2.8. Agaroz jele yüklenmiş DNA örneklerinin elektroforez sonucundaki ayrılmasının temsili görüntüsü.....	24
3.1. Çalışmalarda kullanılan bir femur örneği	27
3.2. Kemiklerin kimyasal temizlik prosedürü	28
3.3. Kazıma işlemi ile elde edilen kemik dilimleri (a) ve matkapla delme işlemi ile elde edilen kemik tozu (b).....	28
3.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5. Silika destekli spin kolon izolasyonunda pipetleme işlemi (a), QIA Quick kolonlar (b) ve mikrosantrifüj cihazı.....	33
3.6. Agaroz jel elektroforez yönteminde kullanılan jel tepsisi (a), elektroforez tankı (b) ve karıştırıcı üzerinde jelin EtBr ile boyanması (c)	35
4.1. Nanodrop konsantrasyonuna optimum sabit sürede (2 dakika) sıcaklık ve gücün etkilerini gösteren kontur (a) ve 3 boyutlu (b) grafikler	40
4.2. Nanodrop konsantrasyonuna optimum sıcaklıkta (35°C) süre ve gücün etkisini gösteren kontur (a) ve 3 boyutlu grafikler (b)	41
4.3. Nanodrop konsantrasyonuna, optimum güçte (300 W) süre ve sıcaklığın etkisini gösteren kontur (a) ve 3 boyutlu (b) grafikler.....	42
4.4. İlk aşamada izole edilen aDNA'lara ait agaroz jel görüntüsü.....	43
4.5. Box Behnken tasarımındaki optimizasyonda kullanılmak üzere mikrodalga destekli ekstraksiyonla izole edilen aDNA'ların agaroz jel görüntüleri	44
4.6. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

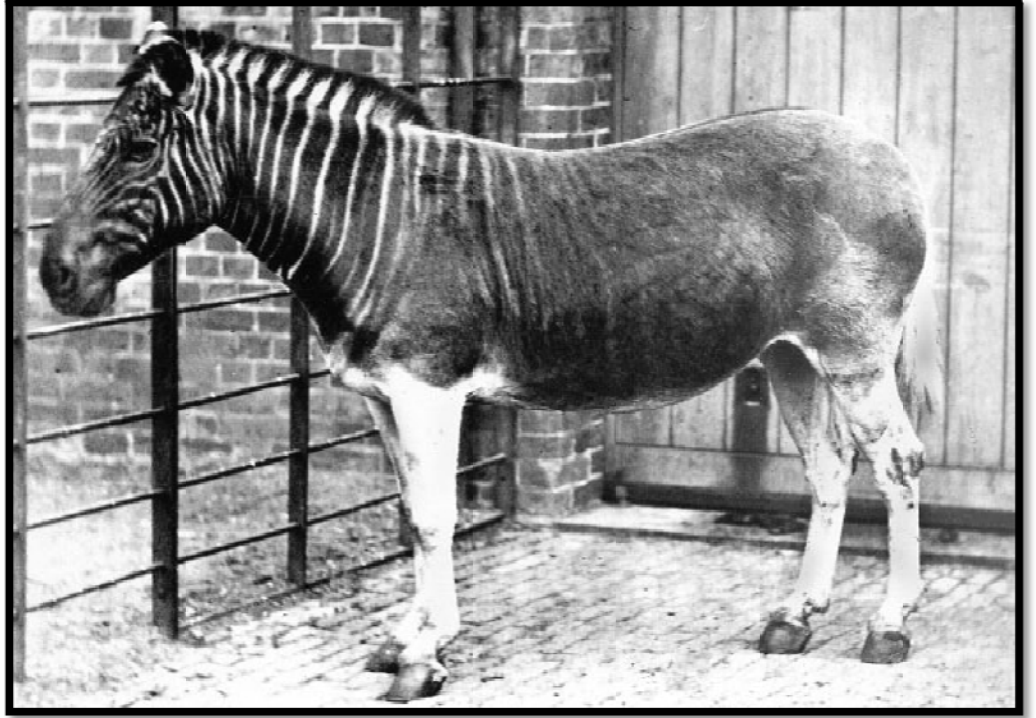
<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kemik dokusu özet tablosu.....	6
2.2. Geçmiş dönemlere ait DNA'ların antropolojik uygulama alanları.....	10
3.1. DNA lizis tamponu içerikleri.....	29
3.2. Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan özgül primer dizileri	35
4.1. Uygulanan ön işlem ve izolasyon protokollerinin nanodrop konsantrasyonları, Qubit konsantrasyonları ve 260/280 oranları	37
4.2. Mikrodalga destekli aDNA izolasyonunun optimizasyonu için deneysel tasarım.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ANOVA	: Varyans analizi
ATP	: adenzin trifostfat
DEAE	: dietil amino etil
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTPs	: dinükleotid trifosfatlar
MAE	: Mikrodalga-destekli ekstraksiyon
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: sodyum dodesil sülfat
SLS	: sodyum lauryl sülfat

1. GİRİŞ

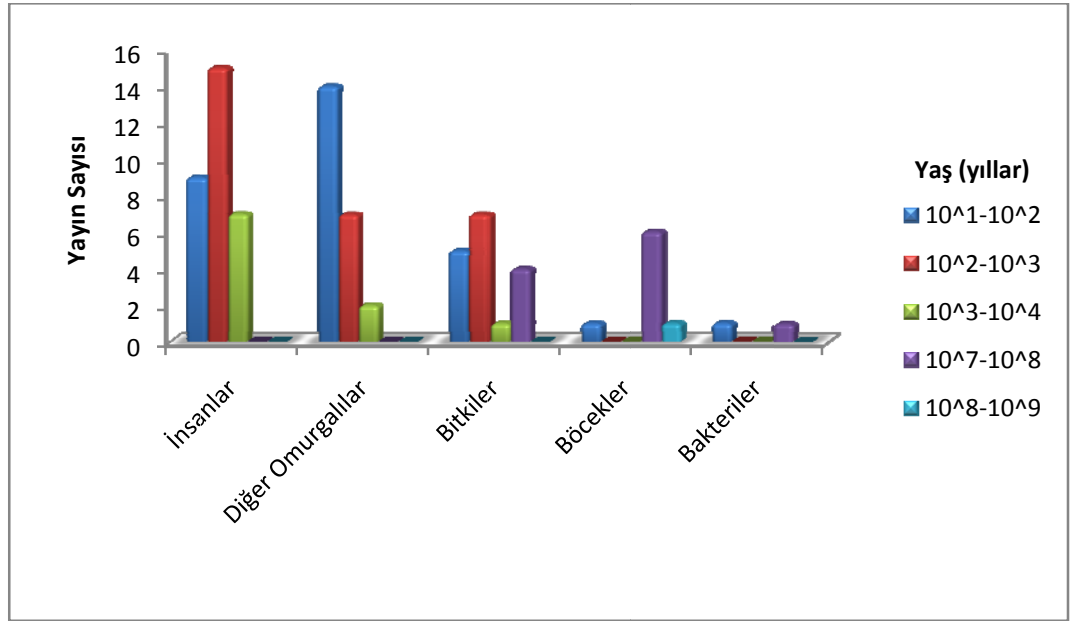
Antik doku kalıntılarında DNA'nın eldesi ve analizleri, paleontolojik ve arkeolojik çalışmaları da içeren birçok çalışmaya ışık tutması açısından muazzam bir potansiyel içermektedir. Antik DNA, moleküler evrim çalışmaları, insanlığın kökeni ve davranışları hakkında bilgi edinmek, popülasyonlardaki modern ve geçmişe ait organizmaların ilişkisini incelemek, cinsiyet belirlemek için zengin bir bilgi kaynağıdır (Lister 1994; Hofreiter et al., 2001; Poinar, et al., 1998; Beraud-Colomb, et al., 1995; Caputo et al., 2013). İlk antik DNA (aDNA) çalışması, 1984 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından, Şekil 1.1'de görülen 140 yıllık nesli tükenmiş bir at/zebra ailesinin bir üyesi olan quagga (*Equus quagga quagga*) derisinden kısa bir mtDNA fragmenti izole edilmesiyle yapılmıştır. Bir yıl sonrasında ise Paabo insanlar üzerindeki ilk çalışmayı binlerce yıllık mumyalanmış bir örnekten yapmıştır (Paabo, 1985).



Şekil 1.1. Londra Hayvanat Bahçesi'nde canlı bir quagga kısırağı, 1980 (Huber W'den 1994).

Antik DNA ile yapılmış birçok güzel çalışma DeSalle ve arkadaşları tarafından tablo haline getirilmiştir (DeSalle et al., 1994). Bu tablonun uyarlanmış hali Çizelge 1.1'de görülmektedir. 1980'lerin sonunda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), aDNA çalışmalarına geniş bir algılamayla potansiyel kazandırmıştır (Jones M., 2003). Bunu takiben çeşitli insan dokuları veya delil

malzemelerinden DNA izolasyonu, yumuşak dokulardan DNA izolasyonu (Paabo 1985, 1989; Doran et al., 1986; Paabo et al., 1988, Thomas et al., 1989,1990; Golenberg et al., 1990; Lawlor et al., 1991; DeSalle et al., 1992; Höss et al., 1994), mtDNA izolasyonu (Hagelberg et al., 1989, 1994; Horai et al., 1989; Hanni et al., 1990; Hagelberg ve Clegg, 1991) ve çekirdek DNA'sı izolasyonu (Hummel ve Herman 1991; Kurosaki et al., 1993; Gill et al., 1994) gibi birçok prosedür geliştirilmiştir (Caputo et al. 2013). Ancak kazılarak çıkartılmış kemik örneklerinden DNA eldesi ve genotipleme için henüz etkili protokoller elde edilememiştir.



Şekil 1.2. Antik DNA çalışmaları (DeSalle et al. 1994'ten uyarlanmıştır.).

Biyolojik materyallerden DNA analizi adli bilimler açısından da kişinin kesin tanılamasını yaparken cinsiyet, fiziksel karakter ve etnik köken hakkında detaylı bilgiler vermektedir bu nedenle DNA analizleri bugüne kadar yapılmış en önemli gelişmelerden birisi olarak kabul edilmektedir. İleri derecede hasar görmüş cesetlerde kimliklendirme dış örnekleri veya iskelet dokusundan sağlanmaktadır (İmamoğlu vd., 2011). Mikroorganizmalar, mevcut nükleazlar, bakteriyel enzimler, nem ve ısı gibi etkilerle değişime uğrayan veya parçalanan biyolojik örneklerin analizinde çoğu zaman yeterli miktarda DNA elde edilemeyebilmektedir. Bunun gibi durumlarda DNA'nın en iyi korunmuş olduğu ve kontaminasyonun en az olduğu doku kemik dokusudur (Campos et al., 2012).

Kemik numunesinden DNA izolasyonu için önemli miktarda kemik başlangıç materyali, tek kullanımlık malzeme ve reaksiyon maddesi ve yeterli

zaman gerekmektedir. PZR için çoğalma etkinliğini azaltan bazı inhibitörler de DNA ile birlikte izole edilebilmektedir. Bu da PZR sonuçlarının inhibe olmasına neden olmaktadır (Techer et al 2010, Hofreiter et al. 2001, Yang et al 1998). Yumuşak dokulardan DNA izolasyonu ve saflaştırılması protokolleri, kemikten DNA izolasyon protokollerine göre daha yüksek DNA verimlerinde sonuç vermektedir. Bu da kemik mineral matriks yapısındaki kompleks agregatlardan, çevresel faktörlerden ve bozulmaya olan meylinde kaynaklanmaktadır. Birçok senaryoda sadece kemiklerin potansiyel bir kaynak olduğu göz önüne alındığında DNA izolasyonu için sağlam protokoller gerekmektedir (Caputo et al., 2013, Hofreiter et al. 2001). Günümüzde oldukça etkili bir takım protokoller mevcuttur ancak antik kemiklerden DNA izolasyonu için standart olarak tercih edilen tek bir metot bulunmamaktadır ve mevcut ekstraksiyon yöntemleri de tutarlı olarak tatmin edici olmamaktadır. Özellikle fenol/kloroform ekstraksiyonuna daha fazla alternatifler aranmaktadır ki bu sebeple yeni yöntemler sürekli geliştirilmektedir.

DNA'nın silika partiküllerine bağlanabilirliği kaotrofik ajanların varlığında çok yüksek kapasitede olmaktadır. PZR inhibitörleri olmadan DNA izolasyonunu başarılı bir şekilde yapılması nedeniyle şelatlama yöntemleri birçok laboratuarda rutin olarak kullanılmaktadır (Boom et al 1990., Cattaneo et al. 1995, Yang et al 1998, Dukes et al 2012). Ayrıca silikanın düşük toksisite, biyouyumluluk, düşük maliyet, çabuk ve kolay ölçeklenebilir ve PZR inhibitörlerini gidermede etkili olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Rohland et al., 2007a., Hou et al., 2013).

Mikrodalga-destekli ekstraksiyon (MAE), elektromanyetik dalgalarla geleneksel solvent ekstraksiyonunu birleştiren bir ekstraksiyon çeşitidir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre kısa sürede, daha az solvent kullanarak, yüksek ekstraksiyon oranı ve düşük maliyetle daha iyi ürün sunmaktadır (Hao et al 2002, Lee et al., 2011, Ma et al 2013, Zheng et al., 2013). Literatürde DNA izolasyonunun mikrodalga ekstraksiyonu kullanılarak gerçekleştirildiği çevresel örnekler, aktinomisetler ve arpa taneleri gibi numuneler bulunmaktadır (Orsini et al., 2001, Ping et al., 2003, Saini et al., 1999).

Bu noktadan hareketle, tezimizin amacı arkeolojik ve paleontolojik insan kemiği kalıntılarında zor olan DNA izolasyonu için basit ve hızlı bir metot geliştirmek ve antik DNA çalışmalarına katkıda bulunmaktır. Ayrıca izolasyon sonuçlarının doğruluğunu tespit etmek amacıyla insan kromozom 17 (lokus D17Z1)'ye spesifik çok tekrarlı α -satellite hedef gen bölgesinin varlığı açısından

taranması planlanmıştır. Kemik numunelerinin adli çalışmalarda delil niteliği taşımasının yanında tarihi öneme sahip antropolojik çalışmalar için de önemli delil kaynaklarıdır (İmamoğlu vd., 2011). Tez kapsamında farklı DNA izolasyon protokollerinin karşılaştırılması ve metotların avantaj ve dezavantajları açısından önemi hakkında değerlendirilmeye yer verilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kemiğin Yapısı ve Genel Özellikleri

Birçok omurgalının vücut destek yapısı olan iskelet, mineralleşmiş bağ dokusu olan kemikten oluşmaktadır. Kemik yapıcı hücreler olarak bilinen osteoblastlar kollajen yapısında matriks oluştururken, kalsiyum, magnezyum ve fosfat iyonları matriks içinde birleşip sertleşerek hidroksiapatit mineralini oluşturur. Kemiğin kırıldaktan daha sert fakat kırılğan olmayan bir yapıda olmasının sebebi sert mineral ve esnek kolajen yapının bir arada olmasından kaynaklanmaktadır. Kemiğin sert yapısı vücuda destek vermekte, ayrıca beyni, omuriliği, akciğerleri ve kalbi çevreleyerek korumaktadır. (Ortner and Turner-Walker, 2003; Hochmeister, 1991). Çizelge 2.1’de kemik dokunun yapısı ile ilgili özet tablo görülmektedir.

2.1.1 Kemik matriksi ve hücresel elemanlar

Organik Bölüm, kolajen lifler (tip I), proteoglikanlar, glikoproteinler, büyüme faktörleri, sitokinler, fosfolipidler ve fosfolipoproteinlerden oluşan temel maddeden (amorfl madde) yapılmıştır. Gelişmiş bir kemik dokusunda lifler paralel ve belirli aralıklarla bulunmaktadır. Aralarında porlar bırakacak şekilde yerleşmiş olup içlerinde hidroksiapatit kristalleri yer almaktadır. (Campbell and Reece, 2006)

İnorganik Bölüm, kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfattan oluşur. Kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kolajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. Kemiğin yapısal bütünlüğünü sağlayan matriksin üretilmesi ve yenilenmesi kemiğin hücresel elemanları tarafından sağlanır (Currey, 2002).

Kemik dokusunda 4 tip hücre bulunmaktadır: osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar, mezenkimal osteoprogenitör hücreler. Bunların haricinde kemik iliği hücreleri ve kemiğin büyüme ile gelişimini düzenleyen bağışıklık sistemi hücreleri de bulunmaktadır.

Osteoprogenitör hücreler, mezenkimal kök hücre kaynaklı ana hücrelerdir. Periostun derin tabakasında ve Havers kanallarında bulunurlar. Mitozla olgun

kemik hücrelerine farklılaşabilme özellikleriyle kemik yapımı için önemli hücrelerdir. Kemik büyümesi, zedelenmesi ve kırık iyileşmesinde aktif hale gelerek osteoblast hücrelerine farklılaşırlar.

Osteoblastlar, kemik dokusunda Tip I kollajen ve matriksin yapımından sorumlu matur hücrelerdir. Golgi ve endoplazmik retikulumlarının iyi gelişmiş olduğu görülmektedir. Sinyal proteinlerini salgılayarak kemik gelişimini hormonal olarak yönlendirirler (SEER Training Modules, 2014).

Osteositler, lakünalar içinde matrikste yer alan olgun kemik hücreleridir. Gelişimlerini tamamladıkları için sentez yapamazlar. Kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun (homeostatik mekanizma) kemikler ve kan arasında düzenlemesi gibi önemli metabolik rolleri de vardır (Guyton and Hall, 2003).

Osteoklastlar, kemik yıkımı, şekillenmesi ve kemik rezorbsiyonunu gerçekleştiren, monosit öncülerinden oluşan, çok çekirdekli dev hücrelerdir. Kollajenaz, asit fosfataz ve diğer proteolitik enzimleri içermeleri sebebiyle makrofaj türü hücre olarak da kabul edilebilirler. Kemik yüzeyine bu enzimleri salgılayarak kemiğin erimesini sağlarlar. Bu bölgelerde oluşan çukurluklara Howship lakünleri denir (Steen and Montagu, 1901).

Çizelge 2.1. Kemik dokusu özet tablosu

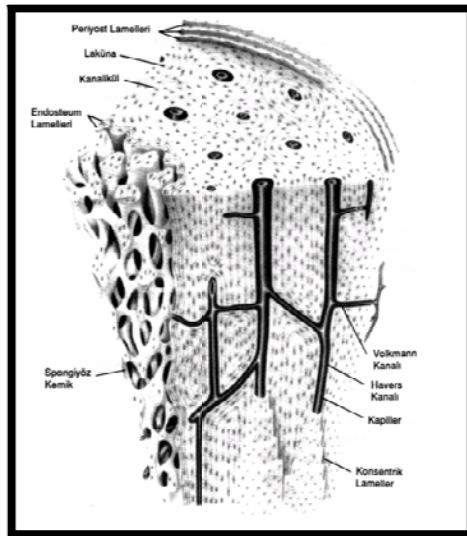
Hücre Tipi	Özelliği	Liflerin Özelliği	Matriks Özelliği
Osteoprogenitör	Yassı şekilli, soluk, boyanmış nukleuslu hücrelerdir, mitoz yaparlar.		
Osteoblast	Kübik veya piramidal şekilli, uzantılı hücrelerdir. Kemik yapımında rol oynarlar. Sitoplazma koyu bazofilik ve granüllüdür.		Sert ve yoğun bir matriks vardır. Yapıya kalsiyum çökmüştür. Kanal sistemi çok iyi gelişmiş olup, burada damarlar yerleşiktir (Havers ve Volkmann).
Osteosit	Oval şekilli, lipit, glikojen ve pigment içeren hücrelerdir. Mitoz yapmazlar, uzantılı hücrelerdir.	Tip I kolajenlerdir. Lifler belirli aralıklarla düzgün bir tertiplenme gösterirler. Bu aralıklara hidroksiapatit kristalleri çökmüştür.	Hücrelerin metabolizması kanalikül sistemiyle gerçekleşir. Kemik dokunun kompakt ve süngerimsi olmak üzere iki formu bulunur.
Osteoklast	Kemik yıkımını(rezorbsiyon) sağlayan hücrelerdir. Çok sayıda nükleus içerirler. Sitoplazmada bol lizozom bulunur. Yıkım için kullanılan kolajenaz ve hidrolitik enzimleri salgırlarlar.		

2.1.2 Kortikal (kompakt) kemik dokusu ve yapısı

İskeletin %80'ini oluşturan kompakt bir kemik incelendiğinde iyi bir şekilde organize olmuş Havers kanalları etrafında lamellerden (osteon), hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu gözlenir. Şekil 2-1'de kemiğin şematik görünümü bulunmaktadır. Havers sistemi, arteriol, venül, kapiller, sinir ve lenfatik kanalı içerir. Havers kanalları Volkmann kanalları denilen yan dallar aracılığıyla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar (Currey, 2002). Havers sistemlerinin bir parçası olan dairesel kemik kanalları arasında lakünalar bulunur ve bu lakünalar ışınal tarzda her yönde seyreden kanaliküller içerir. Tüm bu bağlantılar kemik hücresinin beslenmesi için şarttır. Kortikal kemikteki hücre döngüsü yavaştır ve osteoblast ve osteoklastların aktif olduğu osteonun uç kısmında meydana gelir (Ortner and Turner-Walker, 2003).

2.1.3 Süngerimsi kemik dokusu (trabeküllü kemik)

Kompakt kemiğe göre yoğunluğu daha az olan bu kemik trabeküller lamelden yoksundur ancak daha yüksek remodelizasyon hızına sahiptir. Trabeküller arasında bulunan boşluklarda kemik iliği bulunur. Trabeküller kemik plaklar halinde birbiri ile bağlantılı olduğundan, yüksek metabolik aktivite göstermesi yanında, kemiğe yansıyan çeşitli basınç yüklerine karşı kemiğin dayanma gücünü artırması nedeniyle önemlidir (Currey, 2002; Ortner and Turner-Walker, 2003). Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunur (Hochmeister et al., 1991).



İnsan kemiği iki tip kemikten oluşmaktadır: Kompakt ve süngerimsi kemik. Kompakt (kortikal) kemik serttir ve kemiğin dışında bulunur. Kemiğin iç kısmında bulunan süngerimsi kemik trabeküller kemik olarak da adlandırılır ve kemik spiküllerinin düzenlenmesiyle oluşur. Kortikal kemik, kan damarları ve sinirlerden oluşan Havers kanallarını içermektedir. Havers kanalları, Havers sistemlerine dik uzanan Volkmann kanalları ile birbirine bağlanır (Li R.C., 2009).

Şekil 2.1. Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünümü.

2.1.4 Kemik zarları

Kemik dış ve iç yüzeylerini örten periosteum ve endosteum adlı zarlarla çevrilidir (Guyton and Hall, 2003).

Periosteum, vasküler konnektif bağ dokusundan yapılmış olan bu tabaka eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği sarar. Kemiğe desteklik sağlamada, beslenmede, tamirinde, gelişiminde büyük önemi vardır. Yapısında kolajen ve elastik lifler bulunur ve ligament, tendon ve eklem kapsüllerinin yapışmasına olanak verir. Kanlanması iyi iki tabakalı bir zardır. Dış tabaka, daha çok sıkı bağ dokusu yapısındadır ve fibröz tabaka da denir. Metabolizma için gerekli olan damarları ve lenfatikleri içerir. Buradan uzanan kolajen fibriller periosteumu kemiğe bağlar ve bu fibrillere Sharpey fibrilleri denir. İç tabaka ise, gevşek bağ dokusunda olup hücreden zengindir ve osteojenik tabaka olarak bilinir. Bu hücreler pluripotent hücre özelliğinde olup kırık iyileşmesinde ve kemiğin enine büyümesinde önemlidir.

Endosteum, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini kaplayan, tek katlı osteojenik hücreden oluşan ince bir retiküler bağ dokusudur ve periosteumdan incedir. Osteojenik özelliği olmasının yanında hematopoetik hücre yapabilme özelliği de vardır. Kemiği saran bu zarlar kemiğin beslenmesi, büyümesi ve onarımı için gerekli olan osteoblast yapımında görevlidir.

2.1.5 Kemiklerin sınıflandırılması

Kemikler dış görünüş ve formlarına göre incelenirler (Ortner and Turner-Walker, 2003):

Uzun kemikler, femur, tibia ve humerusta olduğu gibi kalın duvarlı tübüler yapıda olan diafiz ve diafiz her iki tarafında bulunan geniş yapıda metafiz ve epifizden oluşur. Diafiz kalın kortikal duvarı metafize doğru incelik ve genişler. Bu kemiklerin gövdelerinin içinde bir boşluk vardır. Boşluk içinde ise kemik iliği bulunur. Kemik iliğinin rengi çocuklarda kırmızı, yaşlılarda ise kahverengi görünümündedir.

Kısa kemikler, özellikle el ve ayak iskeleti içerisinde bulunurlar ve yaklaşık olarak aynı boylara sahiptirler (Şekil 2.2). Sıkı yapıda ince kompakt bir tabaka ile sarılmış, büyük bölümü oluşturan süngerimsi kısımdan meydana

gelmişlerdir. Diafiz ve epifiz kısımları ayırt edilemez ve küp veya prizmatik şekillerde bulunurlar.

Yassı kemikler, yassı ve geniş bir oluşum gösteren bu kemikler diğerlerinden daha kısa olup tek boyuta sahiptirler. Kürek kemiği (scapula), kafa tası kemikleri ve leğen (pelvis) kemikleri, bu grup için örnek olarak verilebilir. Yassılaştırmış durumda ve sıkı yapıda iki tabaka ile, bu iki tabaka arasında süngerimsi bir bölümden oluşur. İki dış tabaka sağlam ve kompakt bir yapıdadır.



Şekil 2.2. Kemik örnekleri. Şekilde kısa ve yassı kemik örnekleri görülmektedir. Kırılmış olan uzun kemikte ise diafiz ve epifiz kısımları görülmektedir.

2.2 Antik Kemikler ve Materyal Seçimi

Kemikler arkeolojik kayıtların en temel bileşenidir ve antik DNA kaynağı olarak yaygın kullanımı vardır. Kaestle and Horsburgh (2002) arkeolojik kazı alanlarından elde edilen DNA'ların kullanım alanlarını özetlemişlerdir (Çizelge 2.2). Genellikle büyük felaketlerden sonra ve uzun süreden beri ölü olan bireylerin tanımlanmasında sadece iskelet kalıntıları kurtarılmaktadır. Özellikle dişler ve kemikler kaçınılmaz suretle DNA analizi için kalan materyallerdir. Bu dokular çevrenin ve zamanın hasar etkisine karşı etkin bir direnç gösterebilirler (Hagelberg and Clegg, 1993). Kemiğin yaklaşık %70'i kadarının hidroksiapatitten oluşmasının, kemiğe fiziksel bir bariyer ve DNA'nın osteositler içinde korunmasını sağlaması açısından fayda sağladığına inanılır (Colson et al. 1997). Ayrıca kemik matriksinin yoğun kristal agregatları ya da DNA'nın

hidroksiapatit/kollajen'e adsorpsiyonunun, stabilizasyon sağladığı ve dışarıdan gelecek DNA'lara karşı ekstra koruma sağladığı kabul edilmiştir (Poinar et al., 1996). Kemiklerin korunma durumu zamanla içeriğinin stabilitesine göre değişmektedir. Mikrobiyal parçalanma, gözenekliliğin değişmesi, kolajen korunumu, kemik mineral kristalinitesindeki değişiklikler gibi faktörler kemiğin yeni oluşumunu etkilemektedir (Collins et al., 1999). Kemik dokusunun histolojik yapısının dışarıdan gelecek DNA'lara karşı koruma sağlamasına rağmen, kemik dokusundan DNA verimi genellikle düşüktür. Bunun nedeni mineralize matriks içinde kısmen en düşük yoğunlukta osteositlerin olması olabilir (Weiner et al., 1980). Bu kompleks yapı arkeolojik kemiklerden DNA ekstraksiyonunu oldukça zorlamaktadır. Antik DNA'nın korunması için kullanışlı ve pratik olan birçok yaklaşım zaman içerisinde denenmiştir (Weiner and Wagner, 1992).

Çizelge 2.2. Geçmiş dönemlere ait DNA'ların antropolojik uygulama alanları (Kaestle and Horsburgh, 2002).

Uygulama	İçerik	Gösterge
Genetik cinsiyet	Evlilik ve gömme desenlerini belirleme, cinsiyetler arasında ölüm düzeyini saptama; cinsiyetler arasındaki hastalık, beslenme, konum ve mal edinme özellikleri	Cinsiyet kromozomları işaretleyicileri
İnsan olmayan DNA'lar	Avlanma ve beslenme desenlerini saptama; hayvan ve bitkilerin evcilleştirilme sürecinin anlaşılması; çevre tanımlama; insanlara yakın yaşayan hayvanların saptanması; tarih öncesi ve tarihsel hastalıkların izlenmesi.	Mitokondriyal, kloroplast ve otosomal* DNA
Ana ve babaya ait akrabalık	Sosyal yapının, konumun, evlenme desenlerinin, ölü gömme törelerinin ve göçlerin saptanması	Mitokondriyal ve cinsiyet kromozom DNA'ları
Nüfus devamlılığı ve yer değişimi	Tarih öncesi nüfus hareketleri, gruplar arasında ata-torun ilişkileri, eski kavimler arasında ata-torun ilişkileri, eski kavimler arasında benzer/farklı morfolojik veya kültürel kalıntılarla ilişkilerin saptanması	Mitokondriyal, cinsiyet kromozom, otosomal DNA
Evrimsel sürecin canlandırılması	Türlerin evrim desenleri ve günümüz insanın kökenleri	Mitokondriyal, cinsiyet kromozom ve otosomal DNA'lar

*Cinsiyet fark etmeksizin her iki cinste de yer alan kromozomlar. İnsanlarda 22 adet otosomal kromozom vardır. Bunlara ek olarak X ve Y olarak tanımlanan cinsiyet kromozomları yer alır.

İskelet kalıntılarındaki DNA'nın korunma düzeyi değişken olabilir ve tam bir DNA profili eldesindeki başarı analiz için mevcut kemik tipine göre büyük ölçüde değişmektedir. Yoğun femoral bölgeler ve bozulmamış dişler optimum kaynaklardır. Buna rağmen kafatası ve omur kemikleri daha düşük oranlarda verim göstermektedirler. Ağırılık taşıyan bacak kemiklerinin yoğun kompakt kemikleri (%87 femur), kolların uzun kemiklerine (%46 humerus, %25 radius, %23 ulna) kıyasla DNA ekstraksiyonunda daha yüksek verimde başarı göstermektedir. DNA profillemeye başarı oranları iskelet kalıntılarının seçimine göre değişmektedir (Milos et al., 2007).

Kemik dokusu, DNA ekstraksiyonu için en ilgi çekici, zaman alıcı ve iş gücü yüksek olan biyolojik materyaldir. Bu tamamen DNA ekstraksiyonundan önce örneğin hazırlanması ve PZR inhibitörlerinin varlığı ile ilgilidir (Alonso et al., 2001).

2.2.1 DNA eldesinin başarısını etkileyen faktörler

2.2.1.1 Çevresel hasarlar

Biyolojik ayrışmanın derecesi temel olarak iki faktöre bağlıdır: süre ve çevresel koşullar. Adli örnekler genellikle numunenin korunma derecesini etkileyen sert çevre koşullarına maruz kalmaktadır. Hücrenin ölümünden sonra DNA ayrışmaya başlar. Sıcaklık, nem ve pH gibi çevresel koşullar bozulma oranını ve ayrışmanın sertliğini modifiye ederken, ayrışma işlemi zamanla birikir. Yangın, suda kalma, toprağa gömülme ve mikrobiyal istila, DNA'nın ayrışmasını ve kalıntılarının dekompozisyonunu etkileyen unsurlardır. Çevresel koşullar DNA'nın gerçek yaşından çok DNA'nın kalitesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle DNA çalışmalarının güvenilirliği DNA taşıyan dokunun korunma özelliği ile birlikte artmaktadır. Sıcaklık ve nemde meydana gelen artış mikrobiyal sayının büyümesine ve DNaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. DNA hasarı bu faktörlerden birinden ziyade kombinasyonunun bir sonucudur (Burger et al., 1999).

2.2.1.2 DNA hasarı

Yapısal modifikasyonun bazı formları ve DNA hasarı, belirli bir kaynağa maruz kaldığı için hasar görenlerin haricinde genellikle doğaldır. Kaynağı ne olursa olsun DNA hasarı önemli ölçüde PZR amplifikasyonunu kötü

etkilemektedir. DNA hasarının oksidasyon, hidroliz, primidin dimerleri, sitozin deaminasyonu, DNA-DNA ve DNA-Protein çapraz bağlanması gibi formları bulunmaktadır. Bu çeşitli formlardan, oksidasyon, hidroliz ve primidin dimerleri adli örneklerde ortak olarak bulunmaktadır.

Oksidasyon

Serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidatif hasar bazların modifiye olmasına neden olur. DNA bazlarındaki oksidatif saldırının en önemli yeri parçalanmaya yol açan hem primidinler hem de purinlerin imidazol halkalarındaki karbon-karbon çift bağlarıdır. Hasar, şeker kalıntılarındaki modifikasyonu, sitozin ve timinin hidantoinlere dönüşümünü, bazların ve çapraz bağların çıkarılmasını içerir. Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, iyonlaştırıcı radyasyon ya da ölüm sonrası dokuda kolonize olmuş anaerobik bakterilerin mikrobiyal metabolizması tarafından oluşturulur. Oksidatif baz ürünleri PZR sırasında standart Taq DNA polimeraz, lezyonları atlayamayarak replikasyonu engeller (Alaeddini et al., 2010).

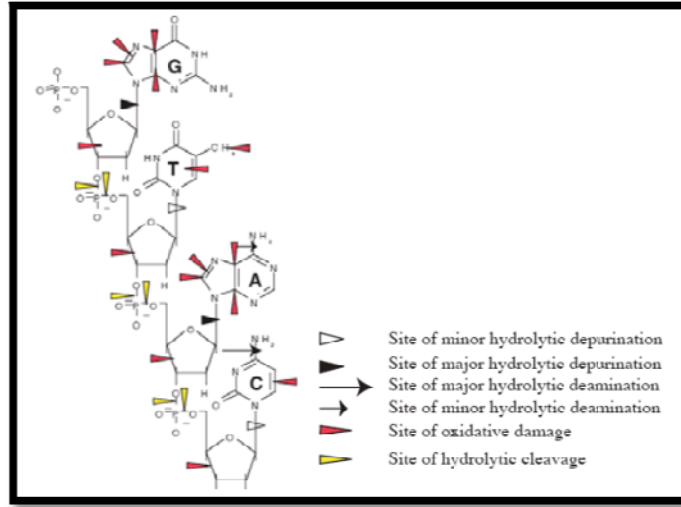
Hidroliz

DNA hasarındaki en hassas bağ, deoksiriboz omurgasına baz bağlayan N-glikozil bağıdır. Bu bağı hidrolizi, bazın, sonunda bir çentik oluşturan apürinik/aprimidinik (AP) bölgeyi bırakması kaybıyla sonuçlanır. Reaktif türlerin H₂O olması nedeniyle, nemli çevre koşullarına maruz kalan adli örneklerin büyük çoğunluğunda birçok AP bölgesi birikir. Hidroloitik ayrılma ve oksidasyon ısı ve nem ile birlikte artar. Bu tür durumlara genellikle selden, tsunamiden ve tropik iklimlerde suya gömülü bölgelerdeki kurbanların kurtarılması gibi doğal ve kitlesel afet durumlarında rastlanır (Bruskov et al., 2002).

Tipik PZR polimerazlarının AP bölgelerinde oyalanmaları sonraki replikasyonu engeller. AP bölgeleri tek zincirde kırılmalar oluşturarak çentikleri bozar. Eğer bu tek zincirdeki kırılma 10-20 baz çifti bir mesafede iki zincirde de meydana gelirse, ne bazlar arasındaki hidrojen bağları, ne de kromatin yapısı bağları bir arada tutmaya yetecek kadar güçlü değildir ve çift zincirin kırılması ile sonuçlanır. Çoğalmanın kısmi ya da tam bozulmasına neden olabilir. Sulu ortamın pH'sı da, asitle katalize depürinasyon oranının zincirin kırılmasını başlatmasının pH'ya bağımlı olmasıyla, DNA hasarının derecesini etkiler (Lindahl et al., 1972).

Dehidrasyon DNA'yı hasara karşı korumanın ölçülmesini sağlar. Bunun DNA'nın konformasyonel durumundaki değişim, normal hücresel kimyasının azalması ve mikrobiyal büyümeden kaynaklı hasar nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür (Ballantyne, 2006).

Hidroliz ve oksidasyon, zincir kırılması, bazsız bölgeler, kodlanmayan bölümler ve çapraz bağlanmaları içeren kemiğin yeni oluşumunda en fazla öne çıkan biyokimyasal proseslerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ölüm sonrası DNA hasarının potansiyel hedefleri (Salamon M., 2005).

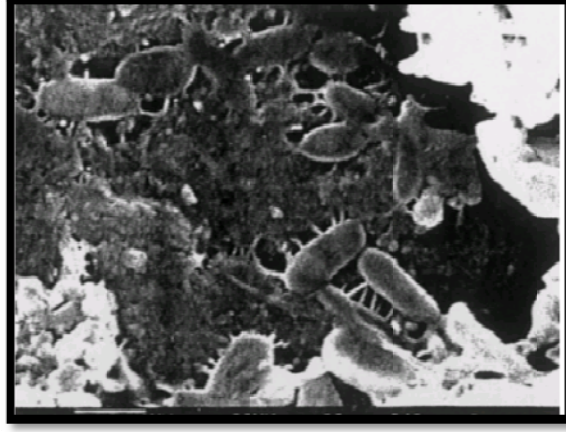
Ultraviyole ışın maruziyeti

Primidin dimerleri, DNA ultraviyole ışığa maruz kaldığında çapraz bağlanan birleşik timin (T) ve sitozin (C) bazlarının bir çiftidir. Fotokimyasala maruz kalma, PZR sırasındaki replikasyonu tutuklayan ve DNA polimerazı oyalayan C=C ya da T=T çift bağlarındaki lokalize reaksiyon tarafından kovalent bağların oluşumunu uyarır. Pürin ve pirimidin oksidasyon ürünleri gibi diğer ışın-zararları UV maruziyetinde oluşur (Chandrasekhar, et al., 2000).

Mikrobiyal parçalama

Mikrobiyal fauna ve flora (mantar, küf ve alg dahil) kolonizasyonu bir suç mahalli ya da kitlesel afetten kalan iskelet materyalindeki ortak kontaminantlardır. Mikrobiyal büyümenin DNA hasarına belirgin bir şekilde neden olduğu gösterilmiştir. Jackes ve ark (2001), tarama elektron mikroskopuyla (SEM) yaptıkları çalışmalarda gömülü kemiklerdeki bakteriyel bozulmaları

saptamışlardır (Şekil 2.4). Araştırmacılar, bu bozunumların en iyi SEM çalışmalarıyla tanımlanacağını kimyasal analizlerin su ve toprak katkıları nedeniyle aykırılıklar göstereceğini ileri sürmüşlerdir. Mikroorganizmalar, reaktif oksijen türleriyle çift zinciri kıran DNA hasarını başlatan parçalayıcı enzimler salgırlar. Mikrobiyal metabolizma ürünlerinin DNA zincirini 25 kat daha arttıran bir oranda kırdığı gösterilmiştir (Lindahl et al., 1972). Isı ve nem mikrobiyal büyümeyi tetikler ve böylece çevresel faktörlerin örneğin ve özellikle DNA'nın korunumunda önemli bir rol oynadığı söylenebilir.



Şekil 2.4. Kemiklerde bozunmaya neden olan bakteriler (Jackes et al., 2001)

2.1.1.3 DNA bozulması

DNA bozulma mekanizmaları farklı olabilirken, sonuç her zaman daha küçük ve küçük parçalara bozularak çift sarmalın parçalanmasıdır. Bu DNA çoğaltmasını zorlaştırır ve sonuç olarak kısmi ya da hiçbir DNA profili elde edilemez. DNA çeşitli biçimlerde hasara maruz kalabilir ancak tek ve çift zincir kırılmasıyla oluşan hasarın bozulmuş örneklerdeki kısmi DNA eldesinin en büyük nedeni olduğu düşünülmektedir. DNA fragment uzunluğunun ortalama 300 baz çiftinin altına düşer ve çoğaltma için uygun bir DNA kalıbının olmayışı nedeniyle genetik bilgide önemli bir kayıp meydana gelir (Bender et al., 2004).

Ölümden sonra, oksijen ve besin içeren kan dokulara perfüze olmaz ve hücrel adenozin trifostfat (ATP) üretiminde bir düşüşe yol açar. Hücre içindeki ATP seviyesi, bir hücrenin ölümden sonra maruz kalacağı iki süreci belirler: apoptoz veya nekroz. Apoptoz enerji bağımlı, plazma membranının kaybı ve sitoplazmanın yoğunlaşmasıyla karakterize edilen programlanmış hücre ölümüdür ve endojen endonükleazların aktivasyonu ile DNA'nın yaklaşık 180 baz çifti

oligomerine yoğun bir şekilde parçalanmasını sağlar (Jennings et al., 1975). Nekroz, artmış hücre hacmi, şişmiş organeller ve kromatin yoğunlaşmasını içeren pasif bir metabolik çökmedir. Membranların parçalanması ve organellerin bozulmasını takiben salgılanan lizozim enzimleri, rastgele bir DNA bozulma modeli oluşturur. Hücre ölümü çeşidi ne olursa olsun, endojen enzimler tarafından küçük uzunluklara parçalanarak, genetik analizler için saflaştırmada çok yüksek oranda bozulmuş DNA numuneleri oluşturur. Bu bozulma işlemi, sıcaklık, oksijen seviyesi ve mikrobiyal aktivite gibi faktörlerden etkilenir (Alaeddini, 2012).

2.2.1.4 PZR inhibitörleri

Bir örnekte engelleyici ajanların bulunması, PZR çoğalması için bir zorluk oluşturabilir. Yeterli miktarda DNA olduğunda çoğalmanın olmamasının en büyük nedeni PZR inhibisyonudur (Boom et al., 1990). Örnekten gelen PZR inhibitörleri (tekstil boyaları, topraktan humik asit, mikrobiyal DNA) hedef DNA ile birlikte ekstrakte edilebilir ya da halihazırda örneğin kendisinde var olabilir (kemikteki yağ asitleri, kandaki hem, saçtaki melanin). Fenolik bileşikler ve hümik/fulvik asit anyonik karakteri DNA ile benzer olan ve nükleik asit saflaştırması sırasında birlikte çöken ya da nükleik asit ya da proteinlere kovalent olarak bağlanabilen kompleks organik moleküllerdir (Techer et al., 2010). Bütün antik DNA'lar bu moleküler hasar ve kontaminantlara maruz kalmaktadır. İnhibitörler primerleri, ekstraksiyon sırasında hücre lizisini negatif olarak etkileyebilir ya da polimeraz aktivitesini azaltabilir. Bu yüzden kontaminasyon/inhibisyonu azaltan ve engelleyen stratejiler geliştirilmek zorundadır. PZR inhibisyon etkisinin üstesinden gelmek için geliştirilen stratejiler, ekstraktın seyreltilmesi, daha fazla Taq DNA polimeraz eklenmesi, numunenin temizlenmesini (spin kolonlar aracılığıyla) sağlamadır (Yang et al., 1998).

2.2 Antik DNA İzolasyon Yöntemleri

Deoksiribonükleik asit (DNA), tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik bilgileri taşıyan bir nükleik asittir. Adli bilimciler DNA'yı olay yerinde bulunmuş kan, kan lekesi, semen, saç kökleri, kemikler, tükürük, deri epitelyum hücresi gibi birçok çeşit örnekten izole edebilirler. Genel olarak genomik DNA ekstraksiyon protokolü, hücre membranının parçalanması ile başlar, ardından hücrenin lizisi, protein denatürasyonu ve DNA'nın denatüre deoksiribonükleo proteinlerden ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılması ile sonuçlanır. DNA izolasyonunda temel amaç;

ortamdaki inhibitörlerin ve nükleazların giderilmesi, maksimum miktarda ve kalitede DNA elde edilmesidir (Saiki et al., 1985).

Antik kemik numunesinden DNA izolasyonu için önce kontaminasyonu minimize etmek için kemik örneklerinin hazırlanması en önemli adımdır. Örneği sodyum hipoklorit, etanol, dH_2O_2 ve/veya DNaz ile yıkama, UV ışınlama, kemik yüzeyinin fiziksel olarak uzaklaştırılması, bütün kemik parçasının toz haline getirilmesi gibi birçok method aDNA araştırmacıları tarafından kullanılmaktadır. Ne yazık ki kontaminasyonu engellemek için yapılan bu girişimlerden bazıları modern DNA kontaminasyonuna neden olarak onu “antik” gibi gösterebilir (Poinar H.N., 2003).

DNA izolasyonu için birçok uygulanabilir metot bulunmaktadır. Hangi metotun kullanılacağına seçimi örnek tipi ve miktarı gibi faktörlere bağlıdır.

2.2.1 Konvansiyonel izolasyon yöntemleri

2.2.1.1 Fenol-kloroform yöntemi (organik ekstraksiyon)

Fenol-kloroform yöntemi moleküler biyolojide geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu yöntemde seri bir şekilde kimyasalların eklenmesiyle protein komponentleri uzaklaştırılarak nükleik asitler saflaştırılır. Temel olarak fenol kloroform ekstraksiyon yönteminde; fenol proteini bağlar ve etkili bir şekilde denatüre eder. Kloroform ise fenölü bağlar. Daha fazla proteini ortamdan uzaklaştırmak için, organik çözeltileri kullanmadan önce sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K kullanılarak hücre duvarının kırılması ve proteinlerin bozulması sağlanır. Fenol, proteinleri etkili bir şekilde denatüre edebilir ancak RNazların aktivitesini tamamen engelleyemez. Bu nedenle fenol/kloroform/izoamil alkol karışımının kullanılması önerilmektedir (Green and Sambrook, 2012).

DNA, sulu-organik karışımın sulu kısmında daha çözünebilir haldedir (Şekil 2.3.1) Santrifüjlendiği zaman istenmeyen proteinler ve hücre atıklar sulu fazdan uzaklaştırılır ve çift zincirli DNA molekülleri analiz için temiz bir şekilde transfer edilebilir. Fenol/kloroform yönteminde farklı materyaller için denenmiş, değişik protokoller vardır. Temiz bir DNA izole etme başarısına karşın bu metodun birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bu yöntemle protein dışı kontaminantlardan uzaklaştırma sağlanamamaktadır. Fenol benzen halkasına OH

molekülünün bağlanmasıyla oluşan bir kimyasaldır. İyi bilinen bir kanserojen olmasının yanı sıra son derece aşındırıcıdır ve ciddi yanıklara neden olabilir. Kimyasal adı triklorometan olan kloroform ise yağları çözen ve toksik etkisi yüksek bir maddedir. Karaciğere verebileceği hasarlarla bilinmektedir. Bu nedenle fenol ve kloroform hem DNA'nın bozulmasına neden olabilir hem de kullanıcıya zarar verebilir. Ayrıca fenol kloroform ekstraksiyonunun çok basamaklı bir metod olması dolayısıyla DNA miktarının azalmasına neden olurken kontaminasyon oluşma riskini de artırması açısından uygulaması zor bir yöntemdir (Cattaneo et al., 2000).

2.2.1.2 İnorganik metot

İnorganik izolasyon ortamdaki sodyum klorür, lityum klorür gibi tuzların atımıyla proteinlerin parçalanması esasına dayanmaktadır. Bu yönüyle organik ekstraksiyona benzerlik göstermektedir. Genelde kandan ve sitolojik örneklerden yapılacak olan analizler için kullanılmaktadır. Fenol/kloroform tekniğine göre daha basit, hızlı, ucuz ve toksik olmayan bir yöntemdir. Ancak PZR inhibitörlerini uzaklaştıramadığı gibi proteinlerin büyük çoğunluğu da izolatın içinde kalabilmektedir (Rohland and Hofreiter, 2007b).

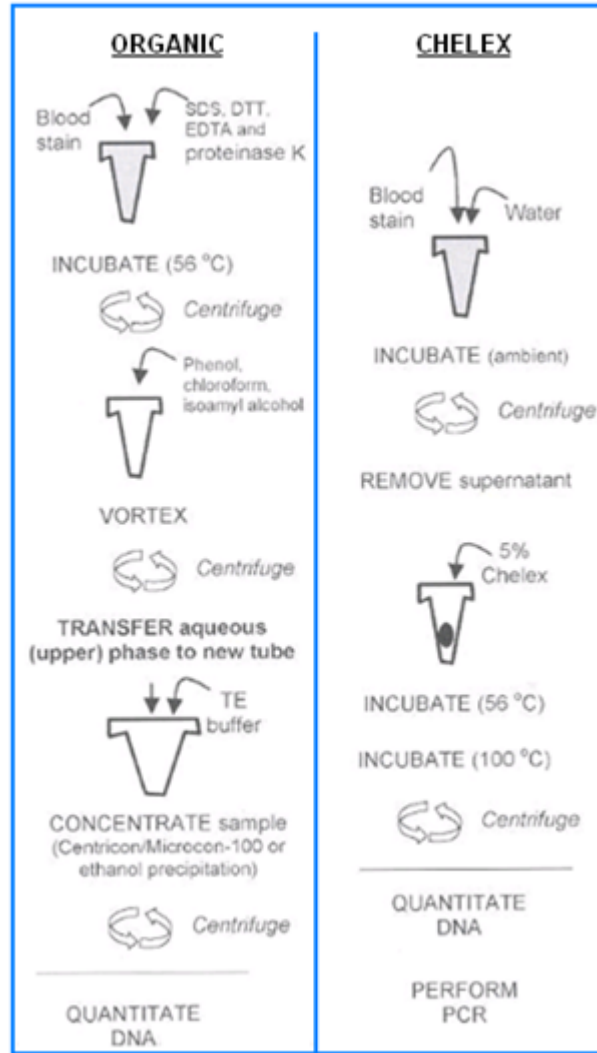
2.2.1.3 Chelex® izolasyonu

Chelex® 100 metodu adli topluluk tarafından benimsenmiş ilk izolasyon tekniklerindenidir. Bu yöntem aktif reaktifin inorganik substrata bağlanması ve PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması temeline dayanır. Chelex iminodiasetat iyon çifti içeren kopolimerle beraber sitrindivinil benzenden oluşan bir reçinedir. Bu reçinenin Mg⁺² gibi polivalent metal iyonlarına çok yüksek afinitesi vardır ve bu iyonları çöktürerek çözeltiden etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlar. Şelatlaştırıcı gruplar divalent iyonlar için çok seçicidirler ve sıradan iyon değiş tokuşları için uygun değildir.

İzolasyon prosedürü basittir (Şekil 2-5). Birçok protokolda kan gibi biyolojik örnekler %5 Chelex® 100 süspansiyonu ile 56°C'de 30 dakika karıştırılır. Proteinaz K sıklıkla bu aşamada eklenir. Hücrelerin kırılıp DNA'nın dışarı salınması için 100°C'de 8-10 dakika kaynatılır. Kaynama işlemi süresince chelex'in varlığında, iyonik kuvveti düşük olan çözeltilerde yüksek sıcaklıkta, şelatlaştırıcı metal iyonlarının katalizörlüğünde DNA'nın kırılması ve bozulması önlenir. Daha sonra Chelex® 100 reçinesi pellet haline getirmek için santrifüjlenir

ve denatüre olmuş proteinler tüpün dibinde kalır izole edilen DNA ise sulu kısımda bulunmaktadır.

Chelex[®] 100, saç, seminal leke, tükürük ve post-koital örneklerden DNA izolasyonu için kullanılır. Yöntemin en büyük avantajı fenol/kloroform ile karşılaştırıldığı zaman hızlı, basit, maliyeti düşük, zararsız ve tüp transferi içermeyen bir yöntemdir. Chelex reçinesi kontaminantı uzaklaştırır, alkali pH hücre zarını parçalar ve sonuçta DNA serbest kalır (Walsh et al., 2013).



Şekil 2.5. Konvansiyonel izolasyon yöntemleri

2.2.1.4 Silika yöntemi

Silika jel yöntemi olarak bilinen bu yöntemde guanidium izotiyosiyanatın pozitif yüklü amin grupları içeren ucuna DNA, diğer ucuna da silika parçacığının

bağlanması esaslı bulunmaktadır. Guanidium izotiyosiyanat hücre parçalayıcı olarak kullanılmaktadır, ayrıca hücrelerin parçalanması ile açığa çıkan RNA'nın degradasyonunu engelleyen bir yapıdadır. DNA'nın silikaya bağlanması sonrasında birkaç defa yıkanarak protein ve istenmeyen komponentler uzaklaştırılır. PZR inhibitörleri de ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu sayede DNA ortamdan uygun miktar ve kalitede elde edilebilir. Kontaminasyonun çok yüksek olduğu durumlarda ve/veya farklı iyon değişimleri varsa DNA'nın silikaya bağlanması engellenebilir ya da DNA aşırı derecede parçalanmış olduğundan (100 baz çiftinden az) pozitif sonuç alınamayabilir. Yüksek molekül ağırlıklı DNA'yı geri almak için tercih edilen en uygun yöntemlerden birisidir (Rohland and Hofreiter, 2007b).

2.3.2 Ticari DNA izolasyon kitleri

Doğrudan DNA etkileşim yöntemini temel alan ticari kitlerin kullanımı giderek artmaktadır. Bu kitlerde çok az miktarda materyal kullanılmasıyla sonuca ulaşılabildiğinden adli bilimler için kullanılması uygun ve güvenilirdir. Kullanılan protokollerle ilgili ayrıntılı bilgiler kit kutularının içinde yer almaktadır.

2.3.2.1 QIAamp® izolasyonu

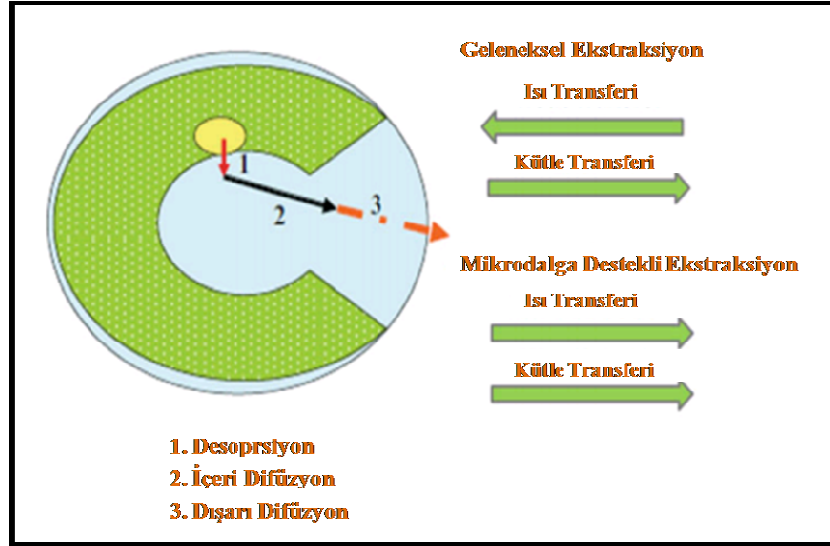
QIAamp® (QIAGEN, CA, ABD) DNA izolasyon kitleri, adli örneklerde çok geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. QIAamp® membranı, DNA'nın negatif yüklü fosfatı ile etkileşime giren DEAE (diethyl amino etil) reçineli silika kolon bazlı bir membran olup hücreler parçalandıktan sonra DNA'yı diğer hücresel içeriklerden ayırır. Safsızlıklar orta iyonik kuvvetteki buffer yardımıyla kolondan yıkanır. DNA kalıntısı yüksek tuzlu buffer ile elüe edilene kadar bağlı kalmaktadır. Daha sonra temiz DNA tüpün dibinden elde edilebilmektedir (Sinclair and McKechnie, 2000) .

2.3.2.2 DNA IQ™ sistemi

Ticari olarak mevcut olan DNA IQ™ izolasyon sistemi (Promega Corporation) ile ölçüm için yeni bir yaklaşım kullanılmaktadır. Bu metot tuzla çöktürme ve silikaya bağlanma temelini kullanır: çok belirgin miktarda silika kaplı boncuklar ekstraksiyone eklenir ve bu bağlanma DNA'nın maksimum miktarıdır. Ekstraksiyon ve ölçüm işlemini kombine etme avantajına sahip olan bu yöntem, insana spesifik olmaması dezavantajına sahiptir (Goodwin et al., 2007).

2.4 Mikrodalga Ekstraksiyon Yöntemi

1970'lerin sonunda analitik laboratuvarlarında kullanılmaya başlayan mikrodalgalar, yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (0.3-300 GHz). Doğal ürünlerde 2.5-75 GHz'de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga ekstraksiyonunun temel olarak diğer konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinden farklıdır. Çünkü hücre yapısında elektromanyetik dalgalarla değişiklik oluşturması sonucu ekstraksiyon meydana gelmektedir. Mikrodalga ekstraksiyonda işlem iki transport olayının sinerjistik bir kombinasyonu sonucu hızlı ve iyi verimlerde sonuçlanmaktadır: ısı ve kütle farklılıkları aynı yönde çalışmaktadır (Perino-Issartier et al., 2011). Halbuki geleneksel ekstraksiyonlarda kütle transferi içeriden dışarıya doğru olurken, ısı transferi içeriden dış yüzeye doğru meydana gelmektedir (Şekil 2.6).



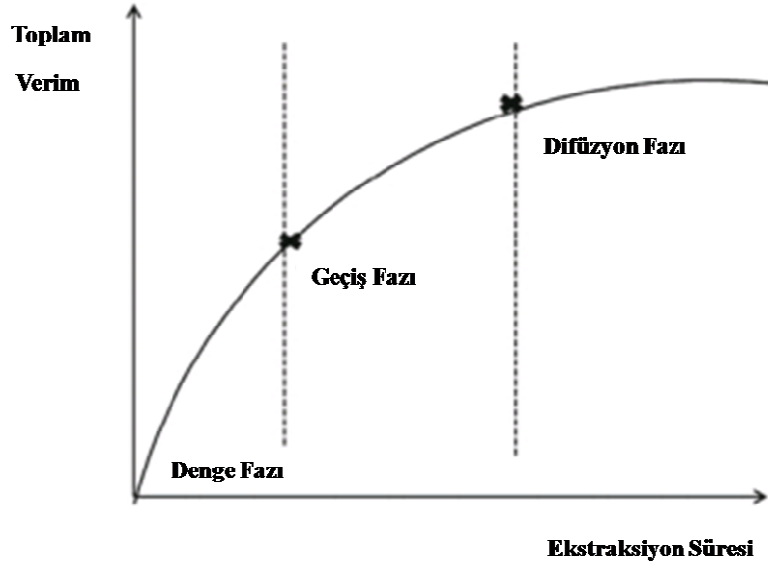
Şekil 2.6 Doğal ürünlerin mikrodalga ve konvansiyonel ekstraksiyondaki temel ısı ve kütle transfer mekanizmaları (Perino-Issartier et al., 2011).

Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, materyale ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olarak değişmektedir. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir.

Ekstraksiyon işlemi boyunca, ekstraktın geri kazanım hızı doğrusal değil zamanın bir fonksiyonudur: katı dağılım içindeki erimiş madde konsantrasyonu durağan olmayan ya da kararsız duruma neden olmaktadır. Etkileşim süresi boyunca katı içerikli madde ile ayırma gerçekleştiren çözücü arasında bir seri

olgusal adımlar meydana gelmelidir. Bunlar; (1) solventin katı matriks içerisine penetrasyonu, (2) çözünürleştirme ve/veya bileşenlerin parçalanması, (3) katı matristen çözünenin taşınımı, (4) bulk çözelti içine cismin dış yüzeyinden gelen çözünmüş maddenin göçü, (5) katı ile ilişkili olarak ekstraktın hareketi, (6) katı ve ekstraktın seperasyonu ve boşaltılması.

Bu nedenle, solvent, difüzyonla (etkin) katı madde içerisine penetre olur ve çözünen, katı maddenin özellikleri tarafından sınırlandırılmış konsantrasyona ulaşınca kadar çözünür. Çözünmüş maddeyi içeren çözelti, etkin difüzyon ile yüzeye yayılır. Son olarak, doğal veya güçlendirilmiş konveksiyonla, çözelti yüzeyden bulk çözeltiye transfer olur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ekstraksiyon işlemlerinde zamana karşı verimin şematik olarak gösterilmesi (Raynie, 2000).

Ekstraksiyon işlemi üç farklı aşamada gerçekleşir: çözüldürme ve parçalanma olaylarını içeren bir denge fazı, arada bir difüzyona geçiş fazı ve son olarak difüzyon fazı. Geçiş fazında sıvı-katı ara yüzeyinde kütle transferine olan direncin başladığı görülmektedir. Son aşamada ise çözünen bu etkileşimlerin üstesinden gelerek matrikse bağlanır ve çözücü solvent içerisine difüze olur. Ekstraksiyon oranı bu aşamada düşüktür ve difüzyon mekanizması tarafından ekstraktın atılımıyla belirlenir. Bu nokta ekstraksiyon işlemi için geri dönüştürülemez bir adımdır ve genellikle sınırlayıcı aşama olarak bilinmektedir (Papadakis et al. 2006).

Ekstraksiyon süresi boyunca fizikokimyasal etkileşimler ve ilişkileri (dispersiyon kuvvetleri, interstisyel difüzyon, itici güçler ve kimyasal etkileşimler) gibi birçok kuvvet ve çözücünün özellikleriyle sıkı ilişkili olarak bu olayların dayanıklılık ve mukavemeti (çözündürme gücü, su içinde çözünürlük, saflık, polarite vb.) bulunmaktadır (Routray and Orsat, 2011).

2.4.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulama alanları

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre kısa süre, daha az solvent, yüksek ekstraksiyon oranı ve düşük maliyetle daha verimli bir ürün sunması nedeniyle çok çeşitli kullanım alanları bulabilmektedir. Sıvı örnekler için de uygun olabilmesine rağmen çoğunlukla katı numuneler kullanılmaktadır. Genellikle çevre analizlerinde kullanılmaktadır. Tortu ve topraklardan, hidrokarbonlar, polikloro bifeniller ve organoklorlu pestisitlerin ekstraksiyonları çalışılmıştır (Thompson et al., 2002). Zaman, sıcaklık, basınç ve nem içeriği gibi değişkenlerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon gıda analizlerinde de kullanılmıştır. Portakal kabuğundan atrazin ve organofosforlu pestisitlerin tayini (Bouaid et al., 2000), susam tohumlarından insektisit ekstraksiyonu (Papadakis, 2006) gibi işlemler literatürde bulunmaktadır. İlaç ekstraksiyonu için de mikrodalga ekstraksiyonu kullanılmıştır (Franke et al., 1996). Birkaç adli vakada kemik dokusundan pen-tobarbital, ketamin, diazepam gibi ilaçların tayinine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Desrosiers et al 2009). Terpenler, alkoloitler, keratinoidler gibi doğal ürünlerin ekstraksiyonu için de bu yöntem kullanılabilenmektedir (Kiss, et al., 2000). Nükleik asit ekstraksiyonuna yönelik ise literatürde mikrodalga ekstraksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen çevresel örnekler, aktinomisetler ve arpa taneleri gibi numuneler bulunmaktadır (Orsini et al., 2001, Ping et al., 2003, Saini et al., 1999).

2.5 Karakterizasyonda Kullanılan Yöntemler

2.5.1 DNA'nın saflık ve miktar tayini

DNA, RNA, oligonükleotidler ve hatta mononükleotidler sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığın altında sahip oldukları absorpsiyon A (optik yoğunluk, OD) üzerinden doğrudan ölçülebilir. Örnek saf olduğunda (protein, fenol gibi kontaminantları çok düşük miktarlarda olduğunda), nükleotid bazları tarafından absorbe olan ultraviyole radyasyonun miktarı spektrofotometrik olarak basit ve doğru biçimde ölçülebilir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt

edilebilir. Nükleik asitlerin maksimum absorbands verdiği dalga boyu A260'dır. Proteinlerin maksimum absorbands verdiği dalga boyu A280'dir. Karbonhidratlar, peptitler, fenoller veya aromatik bileşikler gibi maddelerin maksimum absorbands verdiği dalga boyu ise A230'dur (Green and Sambrook, 2012).

Elde edilen aDNA'ların saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için Nanodrop ND-1000 spektrofotometresi kullanılarak ölçüm yapılabilmektedir. DNA'nın saflığı değerlendirilirken, A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. Bu oran saf bir DNA için 1.7-2 arasında olmalıdır (Boom et al, 1990).

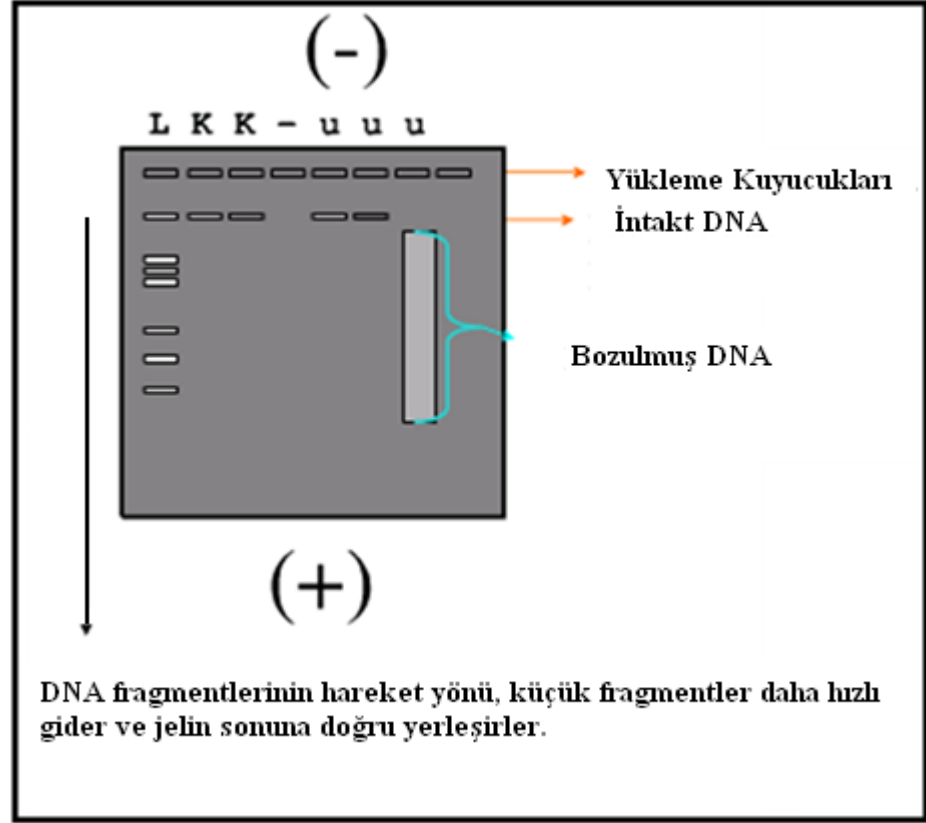
DNA miktarlarının ölçüldüğü bir diğer florometre cihazı ise Invitrogen tarafından üretilmiş olan Qubit™ Florometre'dir. Qubit™ dsDNA BR Assay yardımı sonucunda sadece çift zincirli kırılmamış DNA'nın konsantrasyonuna ulaşılabilmektedir.

2.5.2 Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında sıvı bir ortamda yüklü partiküllerin göçüdür. Farklı tipte elektroforez yöntemler olmasına karşın nükleik asitler için iyi sonuç veren ve 200-50.000 bp boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem agaroz elektroforezidir (Sambrook and Russel, 2001).

Agaroz jel elektroforezi ile özellikle değişik kaynaklardan izole edilen DNA'ların veya enzim kesim ürünlerinin molekül ağırlıkları ve miktarları belirlenebilir. Aynı zamanda proteinlerin yüklerine göre ayrılmasında da kullanılmaktadır.

Nükleik asitlerin ayırımı için en etkin agaroz konsantrasyonları %0.3-2.0'dir. Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şekliyle etkilenir. Jel uygun şekilde hazırlanırken ya da örnekler yüklenip elektriksel olarak ayrıldıktan sonra boyanır ve örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilir. Bütünüyle elde edilmemiş bozulmamış DNA intakt DNA olarak adlandırılır ve düz bir çizgi halinde gözlemlenir. Kırılmış yapıdaki DNA'lar ise yayılmış (smear) şekilde bir görüntünün oluşmasına neden olur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Agaroz jele yüklenmiş DNA örneklerinin elektroforez sonucundaki ayrılmasının temsili görüntüsü.

Agaroz jel oldukça hızlı ve kullanışlı bir teknik olması ve az miktardaki protein ya da nükleik asit karışımlarını (ayrıca nükleoprotein ve polisakkarit karışımlarını) saflaştırmakta ve analiz yapmakta yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından orak hücreli anemi hastalığının teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmış, insan genomik DNA'sının spesifik bir parçasının enzimatik amplifikasyonu olarak tanımlanmıştır. PZR'ın keşfi Kary B. Mullis'e 1993 yılında nobel ödülü kazandırmıştır (Shampo and Kyle, 2002). Uygun laboratuvar koşullarında nükleik asitlerin özel dizilerinin çoğaltılması sayılabileceğinden bir çeşit in vitro klonlamadır.

PZR'ın gerçekleşebilmesi için; kalıp olarak kullanılacak DNA örneği, çoğaltılacak bölgeye uygun şekilde tasarlanmış ve bölgeyi 5' ucundan 3' ucuna çevreleyen yaklaşık 18-20 baz uzunluğunda bir çift primer dizisi, dinükleotid

trifosfatlar (dNTPs), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon derişimini (Mg²⁺) sağlayacak tampon çözelti gerekmektedir. Çoğaltma işlemi thermocycler'da yapılır (Arı, 2004).

Sırası ile denatürasyon, primer bağlanması ve yeni DNA'nın sentezi şeklinde üç aşamada gerçekleşir.

1- Denatürasyon: Çoğaltılacak DNA'nın denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesidir. Denatürasyon aşamasında çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale gelmesi 94-98°C ısı aralığında yaklaşık 5 dakikada gerçekleşir. Sonuçta DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır ve kalıp olarak kullanılacak hale gelir.

2- Primer bağlanması: Sıcaklığın 37-65°C aralığına düşürülmesi ile tek iplikli DNA'ya primerlerin bağlanması sağlanır. Amplimer olarak da adlandırılan bu primerler yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanırlar. Primerlerin görevi kalıp DNA sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapmaktır. Primer bağlanması aşamasında sıcaklık derecesi (T_m) primerlerin baz içeriğine ve uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. T_m/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle başarılı bir PZR için T_m/bağlanma sıcaklığının doğru olarak saptanması gerekmektedir.

3-DNA'nın sentezi: Polimeraz enziminin ortamdaki nükleotitleri, kalıp DNA zincirinin 5' ucundan 3' ucuna doğru eklemesi ile primerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın kopyasını oluşturur. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların, polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72°C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte eğer uzun ampikonlar (PZR ile çoğaltılan DNA parçası) çoğaltılıyorsa süre artırılır. Toplam döngü sayısı 25-35 arasındadır. Döngü sayısının artırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde bir artış olmamaktadır.

Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. PZR işleminin teorik olarak verimliliğini değerlendirecek olursak;

n =ısı döngüsü sayısı, y =başlangıçtaki kopya sayısı kabul edildiğinde sonuçta $2^n \times y$ kadar DNA elde edilebilir.

Hızla gelişen PZR teknolojisi pek çok alanda olduğu gibi moleküler biyoloji ve genetik alanının temel taşı sayılmaktadır. PZR tekniği, klonlamaya gerek duymadan çok az miktardaki DNA ile çalışmayı mümkün kılmaktadır. Teorik olarak tek bir nükleuslu hücrenin varlığı bile PZR'nin uygulanabilirliği için yeterlidir. Kısa sürede başarılı sonuç elde edilmesi sayesinde laboratuvar çalışmaları büyük hız kazanmıştır. Yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırmalarda kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların teşhisi, klonlama çalışmaları ve geçmiş DNA'ların incelenip evrimsel süreçlerinin aydınlatılması gibi geniş ve değişik konularda kullanılmaktadır. Adli çalışmalarda DNA'nın izole edildiği, kemik, kan hücreleri, ölü dokular, vey saç teli gibi numuneler düşük konsantrasyonda DNA vermektedir ve insana ait olmayan DNA ile kontamine olabilmektedir. Adli bilimlerde; genetik parmak izlerinin tanımlanması, ölüm sebebinin ve zamanının araştırılması, genetik bozuklukların belirlenmesi, babalık testi ve diğer akrabalık ilişkilerinin saptanması gibi spesifik konularda PZR teknolojisi kullanılmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kemik Numuneleri

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere anonim kaynaklı antik insan iskelet kemiklerinin femurları kullanılmıştır (Şekil 3.1). Çalışma için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin belgesi alınmıştır (Bkz. Ek 1).



Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan bir femur örneği

3.2 Numunelerin Hazırlığı ve Sterilizasyon

DNA'nın antik çalışmalarda maksimum korunabildiği doku olan kemik doku ile çalışmak kontaminasyon gibi bazı zorlukları beraberinde getirdiğinden bunun minimuma indirilmesi için çalışmanın bütün basamaklarında eldiven, maske ve önlük kullanıldı. Kemikler için kullanılacak bütün malzemeler önce saf su daha sonra etanolde yıkanmak suretiyle steril edildi. Kemik örneklerinin fiziksel ve kimyasal temizliği yapılarak toz haline getirme işlemi için hazırlandı.

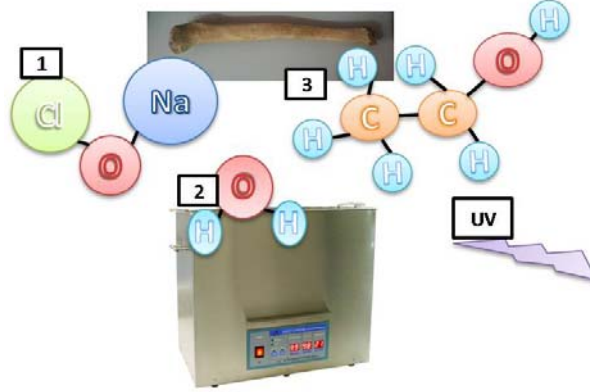
3.2.1 Fiziksel temizlik

Araştırmada kullanılan kemik örneklerinin dış yüzeyi toprak ve diğer kontaminantlardan arınması için Whattman kağıdı üzerinde bisturi ile temizlendi.

3.2.2 Kimyasal temizlik

Fiziksel olarak temizlenen kemik örnekleri, %5 sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 7 dakika ultrasonifikasyonda tutuldu. Daha sonra 5 dakika ultrasaf suda ultrasonifikasyon yapıldı. Son aşama olarak da saf etanol içerisinde 5 dakika

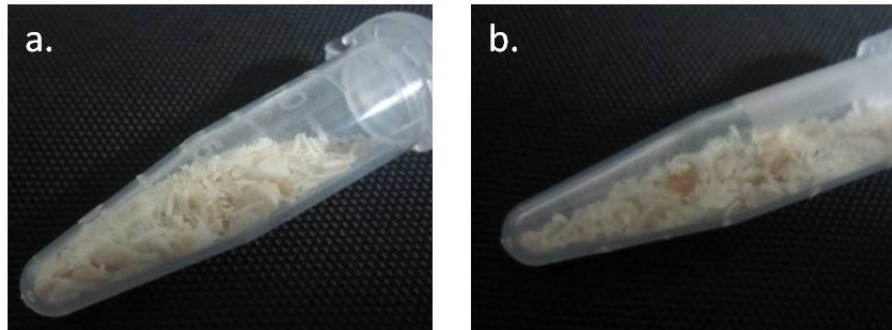
ultrasonifikasyonda tutulan örnekler çeker ocak altında 2 gün kurumaya bırakıldı. Sterilizasyon amacıyla 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kemiklerin kimyasal temizlik prosedürü

3.2.3 Pulverizasyon

Kemikten DNA ekstraksiyonu için kullanılan metotlarda numunenin sert yapısından dolayı toz haline getirme işleminin yapılması gerekmektedir. Fiziksel ve kimyasal temizliği yapılmış olan femur, Caputo ve arkadaşlarının (Caputo et al., 2013) uygulamış olduğu iki farklı toz haline getirme işlemiyle pulvarize edilmiştir. Kısaca bu teknikler Şekil 3.3'te de görüldüğü gibi, (i) kemik dilimleri elde etmek için kazıma ve (ii) kemik tozu elde etmek için matkapla delme işlemlerinden oluşmaktadır. Bu iki teknik DNA'nın antik kemikten izolasyonundaki verimi karşılaştırmak için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan net miktar, çalışılan tampon solüsyonu ve etkili DNA verimine göre 500 mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Kazıma işlemi ile elde edilen kemik dilimleri (a) ve matkapla delme işlemi ile elde edilen kemik tozu (b).

3.3 Tampon Solüsyonların Hazırlanması

3.3.1 Tris-HCl (1M) hazırlanması

5 ml distile su üzerine 1.817 g Trizma Base eklendi, 1 M HCl ile pH 8.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra toplam hacim 15 ml'ye tamamlandı.

3.3.2 1M NaCl hazırlanması

0.876g NaCl 15 ml distile suda çözdürüldü.

3.3.3 0,5 M EDTA-Na₂ hazırlanması

5.584 g EDTA-Na₂ 25 ml su üzerine eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 30 ml'ye tamamlandı.

3.3.4 0,5M DTT hazırlanması

1.156 g DTT 15 ml distile su içerisine çözdürüldü.

3.3.5 DNA lizis tamponu hazırlanması

Lizis tamponu Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi hazırlandı

Çizelge 3.1. DNA lizis tamponu içerikleri

Stok solüsyonlar		Final konsantrasyon	Miktar (ml)
Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	10mM	0.5
NaCl	1M	10mM	0.5
DTT	0.5M	39mM	3.9
EDTA-Na ₂ (pH 8.0)	0.5M	10mM	0.1
Distile su			40

Tamponun %2'lik sodyum lauryl sülfat (SDS) içermesi gerekmektedir. Bu yüzden 50 ml'lik tampon çözeltisine 1 gram SDS eklendi. Hazırlanan lizis tamponu kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.3.6 Dekalsifikasyon tamponu hazırlanması

Dekalsifikasyon tamponu 0.5 M EDTA-Na₂'den oluşmaktadır.

3.4 İzolasyon Öncesi Ön İşlemler

3.4.1 Çalkalamalı inkübatörde bekletme

İki farklı şekilde pulverize edilmiş olan kemik örnekleri, izolasyondan önce iki farklı tamponda bekletilmiştir.

DNA Lizis Tamponu Ön İşlemi:

-0.5 g kemik tozu/dilimleri ependorf tüp içerisine koyuldu ve üzerine 2 ml DNA lizis tamponu eklendi.

-100 µg/ml olacak şekilde 200 µg proteinaz K eklenerek 37°C'de bir gece boyunca bekletildi.

Dekalsifikasyon Tamponu Ön İşlemi:

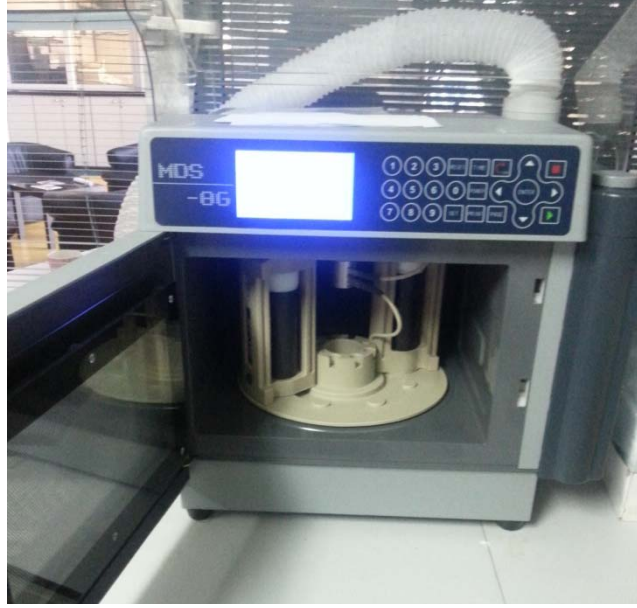
-0.5 g kemik tozu/dilimleri ependorf tüp içerisine koyuldu ve üzerine 2 ml dekalsifikasyon tamponu eklendi.

-100 µg/ml olacak şekilde 200 µg proteinaz K eklenerek 56°C'de 250 rpm karıştırma ile bir gece boyunca bekletildi.

- Bir gece boyunca yapılan inkübasyondan sonra örnekler 10 dakika boyunca su banyosunda kaynatıldı.

3.4.2 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Kemik numunelerinin maruz kaldığı tamponda bekletme ön işlemleri mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazında yapıldı (Şekil 3.4). Bunun için 0.5 g kemik tozu mikrodalga kabı içerisine yerleştirildi ve üzerine izolasyon tamponu (DNA lizis tamponu/Dekalsifikasyon tamponu) eklendi. İlk deneme olarak 65°C, 500W, 2 dakika ayarlandı.



Şekil 3.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı

Bunun haricinde optimizasyon amacıyla en yüksek konsantrasyonda DNA veren koşulları bulmak için Box-Behnken tasarımı kullanılarak bağımsız değişkenler olan farklı sıcaklık (35°C - 65°C), güç (300W-800W) ve süre (2dak.-8 dak.) uygulandı. Bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini belirlemek için üç seviyeli tasarım uygulandı. Yanıtlar, nanodrop konsantrasyonları ve 260/230 oranları, Design Expert 7.0 programı ile analiz edildi. DNA izolasyonu mikrodalga ön işleminden sonra silika kolon destekli spin kolon ile gerçekleştirildi.

3.5 Fenol: Kloroform: İzoamilalkol İzolasyonu

Fenol:kloroform:izoamilalkol karışımının hazırlanması için öncelikle sıvı fenolden saturasyon işleminin gerçekleştirilmesi gerekti. Bunun için çeker ocakta çalışıldı.

Sıvı fenolün saturasyonu:

- Fenol ısıtıldı. Fenol ile aynı miktarda 50 mM Tris-HCl (pH: 8.0) eklendi.
- Manyetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı. Çift faz elde edildi.
- Üst faz atıldı. Daha sonra aynı işlem 2 kez tekrarlandı.
- Üst faz atıldı ve pH: 8.0'e ayarlandı.

- Fenolün yarısı kadar Tris-HCl eklendi. +4°C’de alüminyum folyo ile sarılarak saklandı.

Fenol:kloroform:izoamilalkol(25:24:1) hazırlığı:

- Çeker ocakta eşit hacimde hazırlanan fenol ve kloroform:izoamilalkol (24:1) karıştırıldı.

Fenol:kloroform:izoamilalkol izolasyonu:

- Tamponda bekleyen örneklerin her birine eşit hacimde fenol:kloroform:isoamilalkol eklendi ve altüst yaparak karıştırıldı.
- 5100xg’de 15 dakika santrifüjlendi.
- İki faz oluştu, alt faz atıldı, üst fazın rengi çok koyu olduğu için üst fazın eşit hacminde kloroform:isoamilalkol (24:1) karışımından eklendi ve altüst yaparak karıştırıldı.
- 5100xg’de 20 dakika santrifüjlendi.
- Alt faz uzaklaştırıldı. Üst fazın üzerine hacminin 2.5 katı soğuk etanol (%99.9, -20°C) eklendi ve altüst yaparak karıştırıldı.
- 5100xg’de 3 dakika santrifüjlendi.
- Üst faz uzaklaştırıldı. Soğuk %70’lik etanolden 1 ml eklendi ve 5100xg’de 3 dakika santrifüjlendi.
- Dipte pellet kalacak şekilde tüpteki alkol uzaklaştırıldı ve pellet halinde kalan DNA’nın tamamen kuru olmasına dikkat edildi.
- Kuruduktan sonra 100 µl ultrasafsu içerisinde çözüldü.
- DNA örneği -20°C’de saklandı.

3.6 Silika Destekli Spin Kolon İzolasyonu

Silika destekli spin kolon izolasyonu ile aDNA izolasyonu Yang et al., 1998 tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi (Şekil 3.5).

- Tamponda bekleyen örnekler 2000xg’de 5 dakika santrifüjlendi.

- Süpernatant 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 12800xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant 10ml'lik tüplere aktarıldı ve 1,5 ml PB tampon eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
- Oluşan son karışımdan 750 µl QIA Quick kolona aktarıldı ve 13000xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Akan kısım uzaklaştırıldı ve bütün solüsyon bitene kadar aynı işlem tekrar edildi.
- Silika membran üzerinde kalan DNA'nın 750 µl PE Tampon ile yıkanması için 13000xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Kolondan geçen kısım uzaklaştırıldı.
- Kolon yeni bir steril ependorf tüpüne yerleştirildi ve 100 µl ultrasafsuda çözünmesi için 13000xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Kullanılincaya kadar DNA örneği -20°C'de saklandı.



Şekil 3.5. Silika destekli spin kolon izolasyonunda pipetleme işlemi (a), QIA Quick kolonlar (b) ve mikrosantrifüj cihazı.

3.7 Karakterizasyon ve aDNA Analizi

3.7.1 Nanodrop spektrofotometre ile ölçüm

Elde edilen izolat aDNA'ların saflığı ve miktarı NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermoscientific, Massachusetts, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.7.2 Qubit™ florimetre cihazı ile ölçüm

İzolasyonu yapılan aDNA'ların konsantrasyonu Qubit™ florimetre cihazı (Life Technologies, PN Q32857, ABD) kullanılarak da belirlenebilmektedir. Konsantrasyonun belirlenmesi için Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen Q32850, ABD) kullanılmaktadır. Bu aşamada yine dikkat edilmesi gereken nokta, DNA örneğinin degrade olmamış olması ve yüksek kalitede olmasıdır.

3.7.3 Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen aDNA'ların görüntülenebilmesi için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı (Şekil 3-6). Bu yöntem amplifikasyondan sonra ürünlerin görüntülenmesinde de kullanıldı. Elektroforez için %2'lik jel hazırlandı.

- 0,8 g agaroz tartıldı ve 40 ml TAE jel tamponu ile karıştırıldı.
- Orta ısıda mikrodalga fırın içerisinde partikülleri tamamen eriyinceye kadar kaynatılarak çözüldü.
- Tarakları önceden yerleştirilmiş düz bir zemindeki jel tepsisine döküldü ve katılaşması için oda ısısına bırakıldı.
- Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldı, tepsi ile birlikte elektroforez tankının içerisine yerleştirildi.
- Üzerini kapatacak şekilde TAE tamponu döküldü.
- DNA'yı ağırlaştırarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA'nın yaklaşık konumunu belirlemek için yükleme tamponu (5X loading buffer) kullanıldı.
- 5 µl aDNA, 3 µl yükleme tamponuna karıştırılarak pipet yardımıyla kuyucuklara aktarıldı.
- aDNA'nın büyüklüğünü belirleyebilmek amacıyla 3 µl DNA büyüklük belirleyici (1kb DNA ladder) boş bir kuyucuğa yüklendi.
- Örnekler 80 voltta 1 saat yürütüldü.
- Yürütme tamamlandıktan sonra jel distile su bulunan bir kap içerisine konuldu ve üzerine 3 µl EtBr eklendi.

- Karıştırıcının üzerine yerleştirildi ve 10 dakika boyunca boyanması beklendi.
- Boyanan jel, jel görüntüleme cihazına alındı. UV ışığı altında oluşan bantlar gözlemlendi ve jel görüntüleme cihazının bilgisayar programı ve fotoğraf makinesi yardımıyla fotoğrafları çekilip veriler kaydedildi.



Şekil 3.6. Agaroz jel elektroforez yönteminde kullanılan jel tepsisi (a), elektroforez tankı (b) ve karıştırıcı üzerinde jelin EtBr ile boyanması (c).

3.7.4 PZR analizi

İzole edilen insan aDNA örneğinin spesifik gen bölgelerini polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltmak için Çizelge 3.2’de dizisi verilen insan kromozom 17’ye spesifik yüksek tekrarlı a-satelit sekansı (Lokus D17Z1) ve en sık kullanılan referans gen olan GAPDH primerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan özgül primer dizileri

Primer Adı	Dizisi	Büyükülüğü (bp)
Lokus D17Z1	5'-CAA ATC CCC GAG TTG AAC TT-3' 5'-AAA ACT GCG CTC TCA AAA GG-3'	211
GAPDH	5' GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT 3' 5' TCG CTG TTG AAG TCA GAG GA 3'	147

Amplifikasyon prosedürleri, DNA izolasyon ve çoğaltma süreçlerinin değerlendirilebilmesi için negatif (kalıpsız) ve pozitif kontrol (LNCap) sulandırılmaları ile optimize edilmeye çalışıldı.

- 200 µl'lik PZR tüplerinde, 2X PZR master mix'ten 10 µl, 10 pmol/µl'lik primerlerden 1 µl, kalıp aDNA'dan 8 µl alınarak 20 µl son hacmine tamamlandı.
- Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.
- PZR protokolü olarak, 94°C'de 2 dakika denatürasyon, ardından 32 döngüde; 94°C 40 saniye, 58°C 20 saniye, 72°C 1 dakika ve 72°C uzama uygulandı.
- PZR ürünlerinin 6 µl'si %2'lik agaroz jelde 1 kb ve 100bp'lik DNA büyüklük belirleyici kullanılarak yürütüldü.

4. BULGULAR

4.1 Ön İşlemlerin Etkisi

Birkaç değişik ön işlem aDNA izolasyonundan önce uygulanmıştır. Çizelge 4-1’de uygulanan ön işlemler ve izolasyon protokollerinin karşılaştırmalı sonuçları yer almaktadır. Sonuçlar nanodrop spektrofotometre ve Qubit sonuçlarına göre değerlendirilmektedir. Qubit sonuçları çift sarmal ve bozulmamış DNA konsantrasyonunu belirlediği için aDNA konsantrasyonlarının belirlenmesinde daha güvenilir sonuç vermektedir. Kemik tozu ve dilimleri birbiriyle kıyaslandığında belirgin bir farklı sonuç vermemiştir. Dekalsifikasyon tamponu ve lizis tamponu karşılaştırıldığında ise dekalsifikasyon tamponunun daha yüksek konsantrasyonda aDNA verdiğini söylemek mümkündür.

Çizelge 4.1. Uygulanan ön işlem ve izolasyon protokollerinin nanodrop konsantrasyonları, Qubit konsantrasyonları ve 260/280 oranları

Kod	Kemik Örneği	Tampon Tipi	İzolasyon Protokolü	NanoDrop ND-1000 (ng/µl)	260/280 (nm/nm) oranı	Qubit™ Florometre (µg/ml)
FLT	0.5 g T	L	F	16.9	1.22	-
FDT	0.5 g T	De	F	86.9	1.33	0.0496
SLT	0.5 g T	L	S	14.8	1.32	0.0231
SDT	0.5 g T	De	S	10.2	1.57	0.205
FLDe	0.5 g D	L	F	15.1	1.04	-
FDDe	0.5 g D	De	F	89.2	1.36	0.0271
SLDe	0.5 g D	L	S	9.3	1.73	0.0240
SDDe	0.5 g D	De	S	13.7	1.55	0.208
MSLT	0.5 g T	L	M-S	1.8	1.37	-
MSDeT	0.5 g T	De	M-S	7.4	1.17	0.108

T: Kemik tozu, **D:** Kemik dilimleri, **L:** Lizis tamponu, **De:** Dekalsifikasyon tamponu, **F:** Fenol-kloroform-izoamil alkol, **S:** Silika destekli spin kolon, **M:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon.

Dilim ve toz halindeki kemiklere dekalsifikasyon ve lizis tamponları uygulanarak, aDNA izolasyonları hem geleneksel hem de silika destekli spin

kolon kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilere göre başarılı izolasyonların yapıldığı sonucuna varılmıştır.

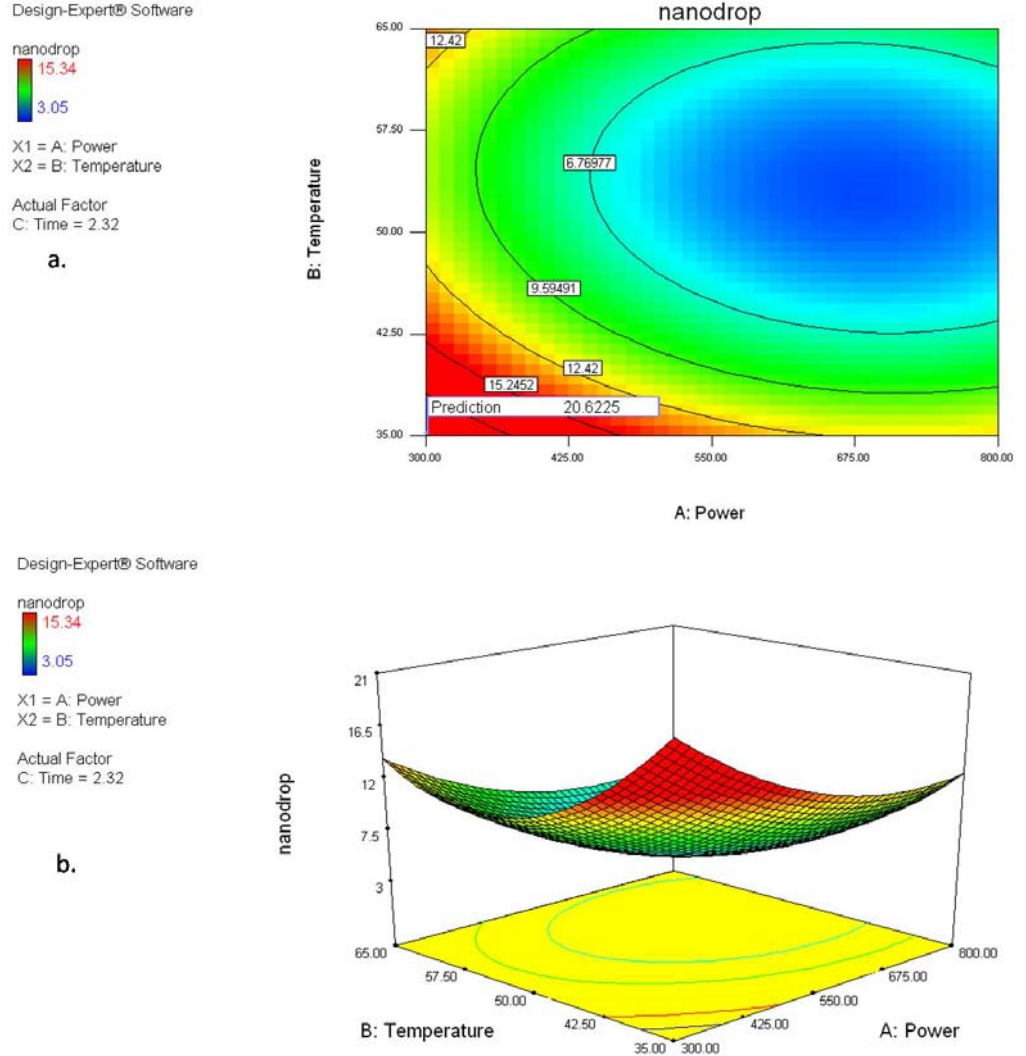
4.1.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile yapılan ön işlemlerde yüksek DNA verimleri tespit edildiği Çizelge 4.1’de görülmektedir. Uygulanan mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminin olumlu sonuç verdiği belirlendikten sonra bu yöntemin optimizasyonu amacıyla, 3 tane bağımsız değişken, sıcaklık (35°C-65°C), güç (300W-800W) ve süre (2dak.-8 dak.) Box-Behnken tasarımı kullanılarak en yüksek konsantrasyondaki aDNA’yı bulmak için uygulandı.

Çizelge 4.2. Mikrodalga destekli aDNA izolasyonunun optimizasyonu için deneysel tasarım

Kod	A: Güç (Watt)	B: Sıcaklık (°C)	C: Süre (min)	Qubit™ Florometre (ng/µl)	NanoDrop ND-1000 (ng/µl)	260/280	260/230
1	500	35	8	1.74	11.37	1.62	0.37
2	500	65	8	0.3	13.9	1.37	0.46
3	300	50	8	2.28	10.26	1.54	0.45
4	800	50	8	1.86	7.53	1.97	0.44
5	300	65	5	0.958	5.11	1.74	0.44
6	800	65	5	1.03	6.2	1.74	0.28
7	500	65	2	2.54	9.95	1.71	0.34
8	500	50	5	0	9.74	1.69	0.18
9	500	50	5	0.48	6.18	1.62	0.24
10	500	50	5	0	3.05	5.07	0.22
11	300	35	5	1.67	12.62	1.7	0.44
12	500	35	2	1.41	13.04	1.72	0.45
13	800	35	5	1.46	10.77	1.62	0.52
14	800	50	2	0	4.91	1.85	0.41
15	300	50	2	2.36	15.34	1.68	0.44

Yanıt olarak saflık ve konsantrasyon ölçümleri, Qubit ve nanodrop sonuçları, 260/280 ve 260/230 oranları belirlendi (Çizelge 4.2). Genel bir değerlendirmeye göre 260/280 oranlarının hemen hemen bütün örneklerde aynı olması yönüyle, nanodrop konsantrasyonu ve 260/230 oranı optimizasyonda yanıt olarak analiz edildi.



Şekil 4.1. Nanodrop konsantrasyonuna optimum sabit sürede (2 dakika) sıcaklık ve gücün etkilerini gösteren kontur(a) ve 3 boyutlu (b) grafikler.

Güç, sıcaklık ve sürenin nanodrop konsantrasyonuna etkisinin yanı sıra bunların etkileşimleri incelenmiştir. Güç ve sıcaklığın farklı kombinasyonlarının süre 2 dakika olarak sabit tutulduğuna nanodrop konsantrasyonu üzerindeki etkisi Şekil 4-1’de gösterilmektedir. Bu grafiklere göre kırmızı ile gösterilen bölgeler hedeflediğimiz yüksek konsantrasyondaki aDNA’yı veren bölgelerdir. Maksimum

nanodrop konsantrasyonu 2 dakika sürede sıcaklığı 35°C ve gücü 300W'a ayarlandığında elde edilmektedir.

Design-Expert® Software

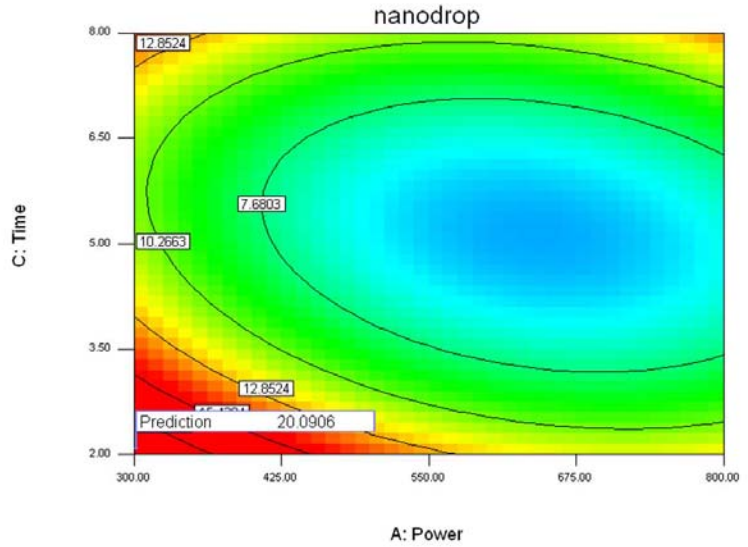
nanodrop



X1 = A: Power
X2 = C: Time

Actual Factor
B: Temperature = 37.03

a.



Design-Expert® Software

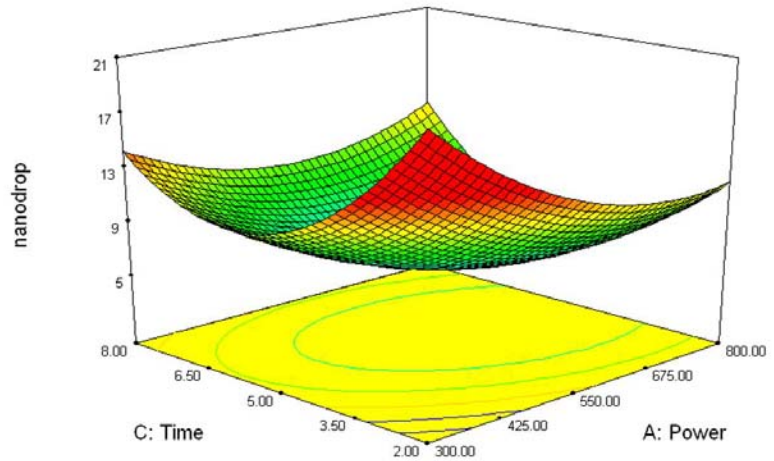
nanodrop



X1 = A: Power
X2 = C: Time

Actual Factor
B: Temperature = 37.03

b.

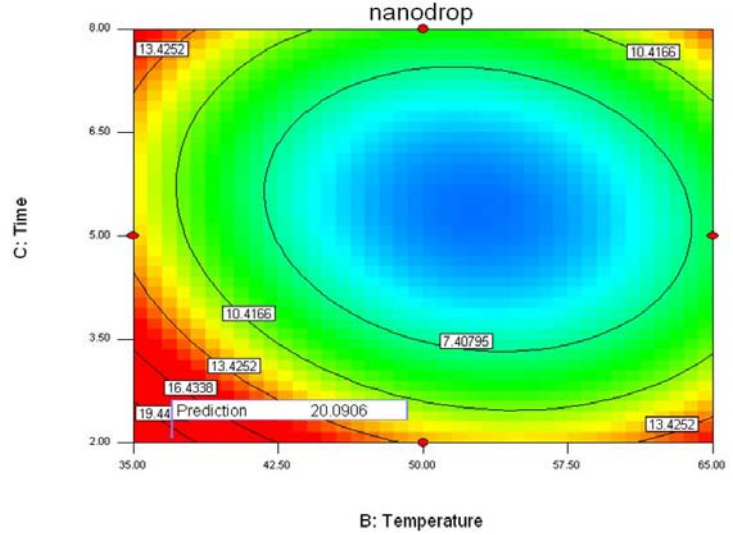


Şekil 4.2. Nanodrop konsantrasyonuna optimum sıcaklıkta (35°C) süre ve gücün etkisini gösteren kontur (a) ve 3 boyutlu grafikler (b).

Gücün süre ile olan ilişkisi Şekil 4-2'de gösterilmektedir. Bu grafiklere göre kırmızı ile gösterilen bölgeler hedeflediğimiz yüksek konsantrasyondaki aDNA'yı veren bölgelerdir. 35°C sıcaklık sabit tutulduğu zaman 2-3.5 dakika arasında 300-400W arasında değişen güç uygulandığında maksimum konsantrasyon elde edildiği görülmektedir.

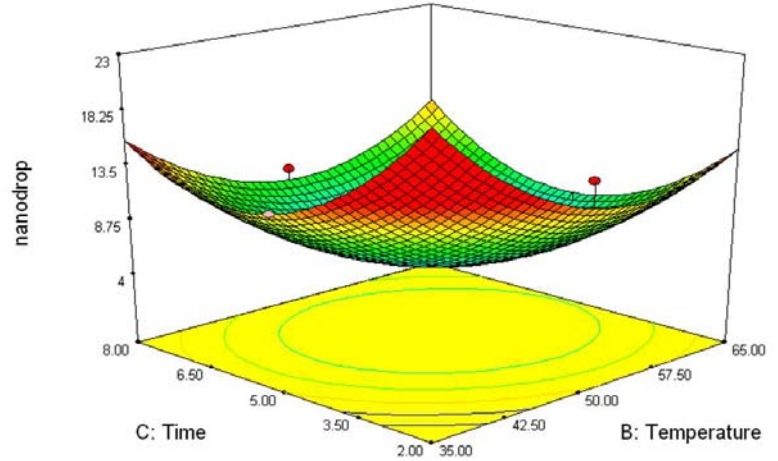
Design-Expert® Software
 nanodrop
 ● Design Points
 15.34
 3.05
 X1 = B: Temperature
 X2 = C: Time
 Actual Factor
 A: Power = 301.94

a.



Design-Expert® Software
 nanodrop
 15.34
 3.05
 X1 = B: Temperature
 X2 = C: Time
 Actual Factor
 A: Power = 301.94

b.



Şekil 4.3. Nanodrop konsantrasyonuna, optimum güçte (300 W) süre ve sıcaklığın etkisini gösteren kontur (a) ve 3 boyutlu (b) grafikler.

Sabit güçte (300W) süre ve sıcaklığın ilişkisinin incelenmesi Şekil 4.3'te görülmektedir. Bu grafiklere göre yine kırmızı ile gösterilen bölgeler hedeflediğimiz yüksek konsantrasyondaki aDNA'yı veren bölgelerdir. Süre ve sıcaklığın etkisine bakıldığında ise 2 dakikada 35°C ile 40°C arasında değişen sıcaklıklarda yine maksimum konsantrasyonda aDNA elde edilebilmektedir (Şekil 4-3). Grafikler incelendiğinde kırmızı bölgelerin 65 °C civarında da olduğu görülmektedir. Ancak bu sıcaklıkta 2 dakikadan fazla kaldığında konsantrasyon miktarı düşmektedir.

Bulgulara göre, A, B ve C olarak kodlanmış, güç, sıcaklık ve süre bağımsız değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ikinci dereceden polinom denklemi, aDNA konsantrasyonları (ng/μl) ve 260/230 oranlarını ifade etmek için kullanılmıştır.

$$\text{Nanodrop konsantrasyonu} = -1.74A - 1.58B - 0.023C + 0.73AB + 1.93AC + 1.41BC + 3.06A^2 + 5.62B^2 + 6.45C^2$$

$$\text{260/230 oranı} = 0.21 - 0.015A - 0.033B + 1.000E-002C - 0.6AB + 5.000E-003AC + 0.5BC + 0.12A^2 + 0.088B^2 + 0.1C^2$$

Varyans analizi (ANOVA), uygun modellerin en iyi deneysel verileri sunan korelasyon katsayılarını 0.8790 and 0.9451 olarak göstermektedir. Prob > F değeri 0,0500 den daha küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiğinden, model denkleminin değişkenlerin herhangi bir kombinasyonunda nanodrop konsantrasyonlarını tahmin etmek için yeterli olduğu görülmektedir.

Dolayısıyla bütün sonuçları değerlendirdiğimizde bu çalışmada optimum proses parametreleri, en yüksek konsantrasyonu (19.40 ng/μl) veren 300W, 35 °C ve 2 dakika belirlenmiştir.

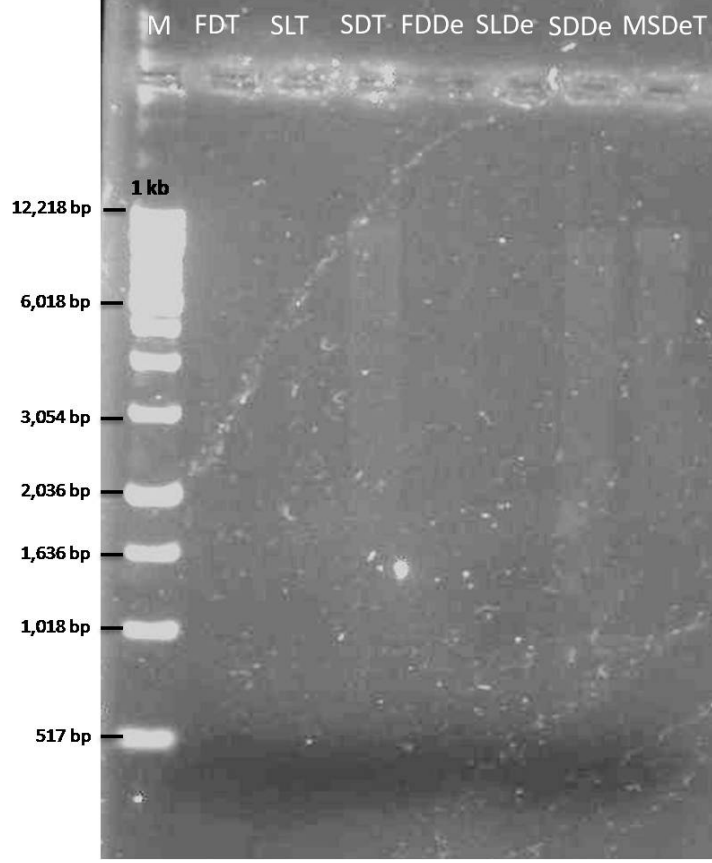
4.2 İzolasyon Protokolü

Tüm örneklerden metodolojide özetlendiği şekilde izole edilen DNA'nın miktarı spektrofotometrik ve florimetrik analizlerle değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1'de izolasyon protokollerinin nanodrop spektrofotometre, Qubit™ florimetre ve 260/280 oranları sonuçları gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre silika destekli spin kolon izolasyonu metodunun fenol-kloroform-izoamil alkol izolasyon metoduna göre daha iyi bir yöntem olduğunu söylemek mümkündür.

4.3 Agaroz Jel Elektroforezi

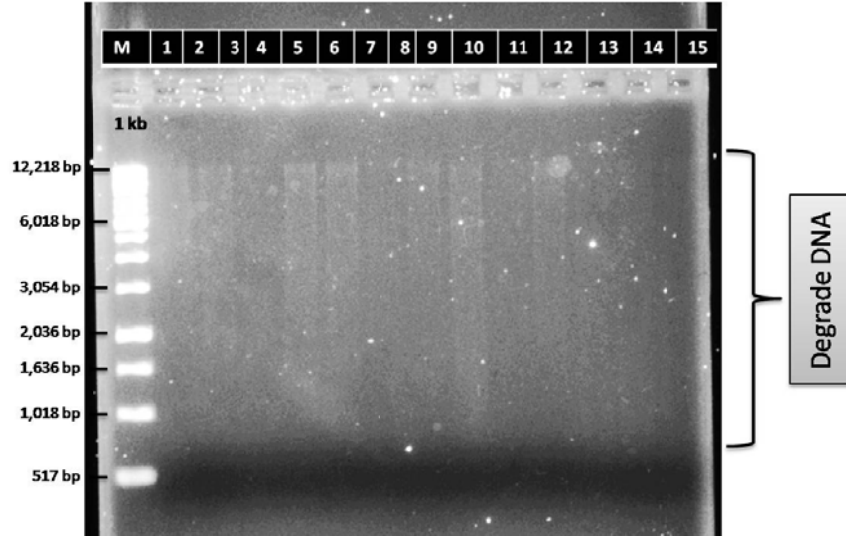
Toplam izole edilmiş aDNA'yı ölçmek için örnekler agaroz jelde elektroforez yardımıyla yürütülmüştür. aDNA fragmentlerinin hareketi DNA'nın negatif yükünden dolayı eksiden artıya doğru olmaktadır. Küçük fragmentler daha hızlı hareket ettiklerinden jelin alt kısımlarında görülmektedir. Agaroz jel elektroforezi sonucunda genomik aDNA'nın kalitesini belirleyebilmek ve intakt olduğunu anlayabilmek için jelde tek bir bant gözlenmesi gerekmektedir. Ancak

eski zamandan kalma insan kemiklerinden elde edilen DNA, degrade olduğundan tek bant izlemek mümkün olmamaktadır. Çizelge 4.1’de kodlanan izole edilmiş aDNA’lara ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4’de gösterilmektedir.



Şekil 4.4. İlk aşamada izole edilen aDNA’lara ait agaroz jel görüntüsü

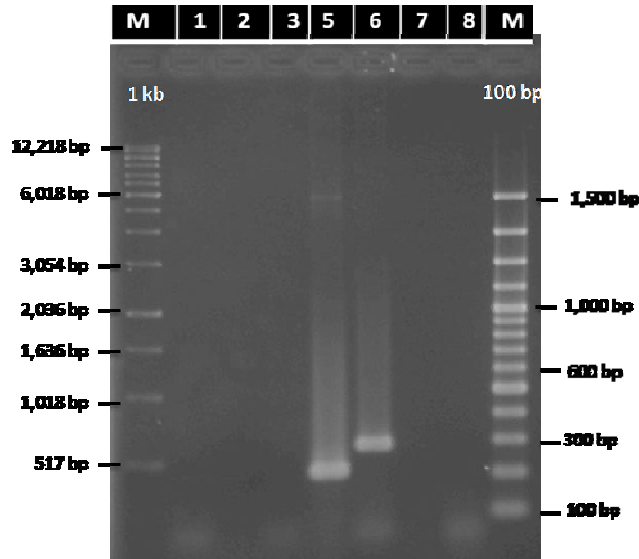
Mikrodalga destekli ekstraksiyonla yapılan aDNA izolasyonlarının deneysel tasarımın kapsamında analiz edilen 15 örneğin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.5’de görülmektedir.



Şekil 4.5. Box Behnken tasarımındaki optimizasyonda kullanılmak üzere mikrodalga destekli ekstraksiyonla izole edilen aDNA'ların agaroz jel görüntüleri

4.4 PZR Sonuçları

Pozitif kontrollerde primerler tek bant halinde görünürken, aDNA izolasyonları yapılan örnekler GAPDH ve D17Z1 primerleriyle eksprese olmamışlardır. Bu da analiz edilen örneklerin herhangi bir miktarda eksprese olmadıklarını ortaya koymuştur (Şekil 4.6). Muhtemel nedenler arasında PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılmaması ve DNA'nın çok yüksek miktarda degrade olması bulunmaktadır.



Şekil 4.6. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (1: 1+ D17Z1, 2: FDT+ D17Z1, 3: 11 + D17Z1, 5: LNCaP+D17Z1, 6: LNCaP+GAPDH, 7: FDT + GAPDH, 8: FDT +D17Z1)

5. TARTIŞMA

5.1 Ön İşlemlerin Etkisi

Uygulanan değişik ön işlemler sonuçları Çizelge 4-1’de yer almaktadır. Literatürde yeterli miktarda verimli aDNA tespitinde 0.5 g kemiğin başlangıç materyali olarak kullanılması, bizim çalışmamız için de uygun miktar olarak belirlenmiştir (Yang et al 1998, Caputo et al 2013). Pulverizasyon işlemi için kullanılan iki farklı metotun sonuçları birbirine çok yakın değerde bulunmuştur. Kemik tozu hazırlama işlemi ısınmayı önlemek adına düşük hızda matkap aracılığıyla yapıldığında çok daha pratik olmaktadır.

Kemik örneğinin fiziksel ön işleminin yanı sıra uygun izolasyon tamponu seçimi de aDNA izolasyonunda çok önemli olmaktadır. aDNA izolasyonunda en yaygın görülen problemler çevresel etmenler ve buna bağlı bazı inhibitörlerin varlığıdır. İnhibitörden arı aDNA örneğinin izolasyonunu sağlayan evrensel bir metot ne yazık ki hala geliştirilememiştir (Jakubowska et al. 2012). PZR inhibitörlerinin intakt aDNA ile birlikte izole edilmesinin üstesinden gelmek için 2 tane kıyaslayabileceğimiz izolasyon tamponu kullanılmıştır. Bunlardan birisi standart protokol olan lizis tamponu, diğeri ise demineralizasyon işlemi yapan dekalsifikasyon tamponudur. Demineralizasyonun aDNA ekstraksiyonunda bir çok durumda etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Jakubowska et al 2012, Loreille et al 2007, Caputo et al. 2013). Tampon uygulamasına, inhibitör bileşenleri denature etmek adına 10 dakikalık ekstra bir kaynatma işlemi eklenmektedir. Demineralizasyon işlemi standart lizis tamponuna göre çok daha yüksek verimde aDNA miktarı sunmaktadır.

5.1.1 Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu

Bir başka ön işlem olan mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ardından silika destekli spin kolon kullanılarak izole edilen aDNA'lara bakıldığında 24 saatlik tamponda bekleme süresini 2 dakika gibi bir süreye kısaltması göz önünde bulundurulduğunda üstün bir alternatif yöntem olduğunu söylemek mümkündür. Bu şekilde antik kemiklerden aDNA izolasyonu için hızlı bir yöntem sağlanmış olmaktadır.

5.2 İzolasyon Protokolü

Organik izolasyon adli izolasyon prosedürlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ancak çok zahmetli olduğu ve çok düşük miktarlarında bile Taq polimeraz enzim aktivitesini olumsuz etkileyen fenol gibi toksik reaktifleri içerdiği bilinmektedir. Ayrıca laboratuarda özel güvenlik önlemlerinin alınmasını ve yoğun bir şekilde manuel işlemleri gerektirmektedir. Silika destekli spin kolon izolasyonu ise aDNA izolasyonunun tek bir aşamada yapılmasına imkan sağlamaktadır. Organik ekstraksiyona göre oldukça basit, güvenilir ve hızlı yapılmaktadır. Bu nedenle mikrodalga destekli ekstraksiyon önışleminden sonra silika destekli spin kolon izolasyonu uygulanmıştır.

Buna ek olarak silika bazlı DNA bağlama prosedürleri, humik asit, demir, kobalt, tanin ve diğerleri gibi PZR inhibitörlerin uzaklaştırılmasında etkili yöntemler olarak bilinmektedir (Caputo et al. 2013 Boom et al. 1990., Cattaneo et al. 1995, Yang et al 1998, Dukes et al. 2012, Rohland et al. 2007a., Hou et al. 2013). Bununla birlikte oldukça degrade olmuş kalıntılarda elde edilebilir DNA miktarı da çok düşük olmaktadır. Bunun için iskelet kalıntılarında izole edilecek aDNA veriminde artış sağlayan alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Genelde, 260/280 oranının 1.7'den büyük olduğu durumlarda izole edilen aDNA'nın yüksek saflıkta olduğuna işaret etmektedir. Bu oranın belirgin olarak düşük olduğu durumlar ise protein, fenol gibi 280nm yakınlarında kuvvetli şekilde absorbe olmuş kontaminantların varlığından söz edilemektedir. 260/230 oranı da aDNA saflığını belirlemek için kullanılan bir diğer kriterdir. Bu değer ise genellikle 2.0-2.2 aralığında olması gerekmektedir. Yine bu değer düşük olması 230 nm civarında absorbe olan fenolik bileşikler gibi kontaminantların varlığına işaret etmektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun ön işlem süresinde ciddi bir şekilde azaltma meydana getirmesinin yanında kabul edilebilir kalite ve konsantrasyonda sonuçlar verdiği görülmektedir.

Nanodrop spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyonlardan Qubit florometre ile ölçülen konsantrasyonların daha düşük çıkması normal görünmektedir. Çünkü Qubit florimetre cihazı ile yapılan ölçümlerde sadece çift zincirli kırılmamış aDNA'ların ölçümleri yapılabilmektedir.

5.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Çizelge 4.1’de ölçümleri yapılan örneklerin agaroz jele doğrudan yüklenmesiyle elde edilen sonuçlarda (Şekil 4.4) izole edilen aDNA’ların oldukça degrade hale geldikleri smir şeklinde bant vermelerinden anlaşılmaktadır. Mikrodalgada yapılan optimizasyon için belirlenen 15 örneğin agaroz jele doğrudan yüklenmesi ile elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5’de görülmektedir. Buna göre bakıldığında bu örnekler de degrade olmuş yapıdadırlar.

5.4 PZR Sonuçları

PZR sonuçlarına göre pozitif kontroller oldukça eksprese olurken izole edilen aDNA’ların eksprese olamamaları aDNA’nın bozulmuş yapısı ve PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılmamasıyla alakalıdır. Bunu önlemek için, demineralizasyon tamponu ve silika bazlı yöntemler kullanılmış olmasına rağmen hala genel geçer bir metodun oluşturulamaması deneyin bu şekilde sonuçlanmasına neden olmaktadır.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, mikrodalga destekli ekstraksiyonu takiben uygulanan silika destekli silika kolon izolasyonunun aDNA'ların izole edilmesinde süreyi oldukça kısaltan ve organik fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemine göre iyi bir alternatif olduğunu söylemek mümkündür. Zararlı reaktifleri kullanmanın önlenmesinin yanı sıra eşdeğer nitelikte moleküler sonuçlar vererek güvenilirliği yüksek, maliyeti düşüren ve hızlı bir yöntem olması, adli tıp çalışmalarında kullanılabilir iş gücünü azaltan potansiyel bir uygulama olduğunu kanıtlamaktadır. PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılabildiği yöntemler geliştirilmeye devam ederken sürecin hızlanmasına ışık tutacak bir çalışma olmaktadır. Ön işlemlerin süresini düşüren bu yeni uygulamayla hem maliyeti düşürerek hem de süreden tasarruf sağlayarak çok daha hızlı protokoller geliştirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alaeddini, R.**, 2012, Forensic implications of PCR inhibition-A review. *Forensic Science International. Genetics*, 6(3): 297-305pp.
- Alaeddini, R., Walsh S.J. and Abbas A.**, 2010, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review. *Forensic Science International. Genetics*, 4(3): 148-57pp.
- Alonso, A., Andelinović S., Martín, P., Sutlović D., Erceg, I., Huffine E., de Simón, L.F., Albarrán, C., Definis-Gojanović, M., Fernández-Rodriguez, A., García, P., Drmić, I., Rezić, B., Kuret, S., Sancho, M. and Primorac, D.**, 2001, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Medical Journal*, 42(3): 260-6pp.
- Arı Ş.**, 2004, DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması, In Temizkan G, Arda N, eds. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 101-120ss.
- Ballantyne, J.**, 2006 *Assessment and In Vitro repair of Damaged DNA Templates*, National Institute of Justice, US Department of Justice.
- Bender, K., Farfan M.J. and Schneider, P.M.**, 2004, Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Science International*, 139(2-3): 135-40pp.
- Béraud-Colomb, E., Roubin R., Martin J., Maroc N., Gardeisen A., Trabuchet G. and Goosséns M.**, 1995, Human beta-globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12,000 years old, *Am J Hum Genet.*, 57(6): 1267–1274pp.
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M. and van der Noordaa J.**, 1990, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.*, 28(3):495p.
- Bouaid, A., Martin-Esteban, A., Fernandez, P. and Camara, C.**, 2000, Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367(3), 291p.
- Bruskov, V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K. and Chernikov, A.V.**, 2002, Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA, *Nucleic Acids Res*, 30(6): 1354-63pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burger, J., Hummel, S., Hermann B. and Henke, W.,** 1999, DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*, 20, 8, 1722-8pp.
- Campbell N.A. and Reece J.B.,** 2006, *Biyoloji*, (Çev. E. Gündüz, A. Demirsoy, İ. Türkan), Palme Yayıncılık, 1247p.
- Campos P.F., Craig O.E., Turner-Walker G., Peacock E., Willerslev E. and Gilbert, M.T.,** 2012, DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it?, *Ann Anat.*, 20;194(1):7-16pp.
- Caputo M., Irissari M., Alechine E. and Corach, D.,** 2013, A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping, *Forensic Science International: Genetics*, 7, 488–49pp.
- Cattaneo C., Gelsthorpe, K. and Sokol, R.J.,** 2000, DNA Extraction Methods in Forensic Analysis, In Myers RA, editor, *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, 92-103pp.
- Cattaneo C., Smillie D.M., Gelsthorpe K., Piccinini A., Gelsthorpe A.R. and Sokol R.J.,** 1995, A simple method for extracting DNA from old skeletal material, *Forensic Sci Int.*, 28;74(3):167-74pp.
- Chandrasekhar, D. and Van Houten B.,** 2000, In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in *Escherichia coli*, *Mutation Research*, 450(1-2): 19-40pp.
- Collins M., Waite E. and van Duin, A.,** 1999, Predicting Protein Decomposition: The Case of Aspartic-acid Racemization Kinetics, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B.*, 354, 51-64pp.
- Colson I.B., Bailey J.F., Vercauteren M., Sykes B.C. and Hedges R.E.M.,** 1997, The preservation of ancient DNA and bone diagenesis, *Ancient Biomol.*, 1, 109-117pp.
- Currey, J.D.,** 2002, *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton University Press, Princeton.
- DeSalle, R. and Grimaldi D.,** 1994, Very old DNA, *Current Opinion in Genetics and Development*, 4:810-815pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- DeSalle, R., Wheeler W., Grimaldi, D. and Gatesy J,** 1992, DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257:1860-1862pp.
- Desrosiers, N.A., Betit, C.C. and Watterson, J.H.,** 2009, Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues . *Forensic Science International*, 188(1-3), 23p.
- Doran, G.H., Dickel, D.N., Ballinger, W.E. Jr, Agee, O.F., Laipis, P.J. and Hauswirth, W.W.,** 1986, 8,000 year old human brain tissue: anatomical, cellular and molecular analysis., *Nature* 323: 803-806pp.
- Dukes, M.J., Williams, A.L., Massey, C.M. and Wojtkiewicz, P.W.,** 2012, Technical Note: Bone DNA extraction and purification using silica-coated paramagnetic beads, *American Journal of Physical Anthropology* 148:473–482pp.
- Franke, M., Winek, C.L. and Kingston, H.M.,** 1996, Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Science International*, 81(1), 51p.
- Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton C., Piercy, R., Benson, N., Tully G. and Evett, I.,** 1994, Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6:130-135pp.
- Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski G.,** 1990, Chloroplast DNA sequence from a *Miocene Magnolia* species. *Nature* 344:656-658pp.
- Goodwin, W., Linacre, A. and Hadi, S.,** 2007, *An Introduction to Forensic Genetics*, England: John Wiley & Sons, 36p.
- Green M.R. and Sambrook J.,** 2012, *Molecular cloning: A laboratory manual* (fourth edition): Three-volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2028p.
- Guyton A.C. and Hall J.E.,** 2003, *Tıbbi fizyoloji cep kitabı, (Çev. Z. Solakoğlu), Nobel Tıp Kitabevleri, 728p.*
- Hagelberg, E. and Clegg, J.B.,** 1991, Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244:45-50pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hagelberg E., and Clegg J.C.**, 1993, Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA, Proc. R. Soc. Lond. B., 252, 163-170pp.
- Hagelberg, E, Sykes, B. and Hedges, R.**, 1989, Ancient bone DNA amplified. Nature 342:485pp.
- Hagelberg, E., Thomas, M.G., Cook C.E., Jr. Sher., AV, Baryshniko, GF, Lister AM**, 1994, DNA from ancient mammoth bones. Nature 370:334pp.
- Hanni, C., Laudet, V., Sakka, M., Begue, A. and Stehelin, D.**, 1990, Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. CR Acad Sci III 310:365-370pp.
- Hao J., Han, W., Huang, S., Xue, B. and Deng, X.**, 2002, Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L, Separation and Purification Technology, 28 ,191 – 196pp.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger M., Ryder, O. and Wilson, A.C.**, 1984, DNA sequences from a quagga, an extinct member of the horse family., Nature, 312:282-284pp.
- Hochmeister M., Budowle B., Borer U., Eggman U., Comey C. and Dirnhofer R.**, 1991, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) extracted from compact bone from human remains, Journal of Forensic Science, 36, 6, 320-330pp.
- Hofreiter M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M. and Pääbo, S.**, 2001, Ancient DNA, Nature Reviews, Genetics, 2, 353p.
- Horai, S., Hayasaka, K., Murayama, K., Wate, N., Koike, H. and Nakai, N.**, 1989, DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. Proc Jpn Acad 65: 229-233pp.
- Hou Y., Han X., Chen J., Li Z., Chen X. and Gai, L.**, 2013, Isolation of PCR-ready genomic DNA from *Aspergillus niger* cells with FeO₄/SiO₂ microspheres, Separation and Purification Technology, 116, 101–106pp.
- Höss, M., Paabo, S., Vereshchagin, N.K.**, 1994, Excrement analysis by PCR. Nature 370: 333p.
- Huber, W.**, 1994, Dokumentation der fünf bekannten lebendaufnahmen vom Quagga, *Equus quagga quagga* Gmelin, 1788, Spixiana, 17, 2, 193-199pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hummel, S. and Herrman B.**, 1991, Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human DNA. *Naturwissenschaften* 78: 266-26pp.
- İmamoğlu, Ö., Karapirli P. and Akboyun, N.**, 2011, Diş örneklerinden DNA elde edilme metotlarının karşılaştırılması ve adli bilimler açısından değerlendirilmesi, *Adli Tıp Dergisi*, 26, 1, 38-49pp.
- Jackes, M., Sherburne, RT., Lubell, D., Barker, C. and Wayman, M.**, 2001, Destruction of microstructure in archaeological bone: a case study from portugal. *Int. J. Osteoarchaeol.* 11: 415–432pp.
- Jakubowska, J., Maciejewska, A. and Pawłowski, R.**, 2012, Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation, *Int. J. Legal Med.*, 126: 173– 178pp.
- Jennings, R.B., Ganote C.E. and Reimer, K.A.**, 1975, Ischemic tissue injury. *The American Journal of Pathology*, 81(1): 179-98pp.
- Jones M.**, 2003, Short survey: Ancient DNA in pre-Columbian archaeology: a review, *Journal of Archaeological Science*, 30, 629–635pp.
- Kaestle, F.A. and Horsburgh, K.A.**, 2002, Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Yearbook of Physical Anthropology* 45, 92–130pp.
- Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H. and Ramos, A.**, 2000, Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 41p.
- Kurosaki, K., Matsushita, T. and Ueda, S.**, 1993, Individual DNA identification from ancient human remains, *Am. J. Hum. Genet.*, 53:638-643pp.
- Lawlor, D.A., Dickel, C.D., Hauswirth W.W. and Parham, P.**, 1991, Ancient HLA from 7,500-year-old archaeological remains. *Nature* 349:786-788pp.
- Lee, J. and Kim, J.**, 2011, Development and optimization of a novel simultaneous microwave-assisted extraction and adsorbent treatment process for separation and recovery of paclitaxel from plant cell cultures, *Separation and Purification Technology*, 80,240–245pp.
- Li, R.C.**, 2009, Final Report: Application of proteinases for DNA isolation of bone specimens, U.S. Department of Justice, 34p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lindahl, T. and Nyberg, B.,** 1972, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, 11(19): p. 3610-8pp.
- Lister A.M.,** 1994, Ancient DNA: not quite Jurassic Park., *Trends Ecol Evol.*, 9, 3, 82-4pp.
- Loreille, O.M., Diegoli, T.M., Irwin, J.A., Coble, M.D. and Parsons, T.J.,** 2007, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Science International: Genetics*, 1:191–195pp.
- Ma F., Gu, C., Li, C., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., Li, J. and Fu, Y.,** 2013, Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of isoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves, *Separation and Purification Technology*, 115, 136–144pp.
- Milos, A., Selmanovic, A., Smajlovic, L., Huel, R.L.M., Katzmarzyk, C., Rizvic, A. and Parsons, T.J.,** 2007, Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal*, 48, 4, 486-93pp.
- Orsini, M. and Romano-Spica, V.,** 2001, A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples, *Letters in Applied Microbiology*, 33, 17-20pp.
- Ortner, D. and Turner-Walker, G.,** 2003. *The Biology of Skeletal Tissues, in Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*, Second ed. Academic Press, 479p.
- Paabo, S.,** 1989, Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci.*, 86:1939-1943pp.
- Paabo, S.,** 1985, Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA., *Nature* 314:644-645pp.
- Paabo, S., Gifford, J.A. and Wilson, A.C.,** 1988, Mitochondrial DNA sequence from a 7,000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16:9775-9787pp.
- Papadakis, E.N., Vryzas, Z. and Papadopoulou-Mourkidou, E.,** 2006, Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 6p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perino-Issartier, S., Zill-e-Huma, Y.J., Abert Vian, M. and Chemat, F.,** 2011, Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. Food Bioprocess Technol., 4, 1020-1028pp.
- Ping X., Wenjun, L., Lihua, X. and Chenglin, J.,** 2003, A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes, Wei Sheng Wu Xue Tong Bao, 30, 4, 82-84pp.
- Poinar, H.N.,** 2003, The top 10 list: Criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, International Congress Series, 1239, 575 – 579pp.
- Poinar, H., Höss, M., Bada, J. and Paabo S.,** 1996, Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA, Science, 272, 864-866pp.
- Raynie, D.E.,** 2000, Extraction. In: Wilson ID, Adlard ER, Cooke M, Poolie CF (eds) Encyclopedia of separation science. Academic Press, San Diego.
- Rohland, N. and Hofreiter, M.,** 2007a, Ancient DNA extraction from bones and teeth, Nature Protocols, 2, 7, 1756pp.
- Rohland, N. and Hofreiter, M.,** 2007b, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, BioTechniques, 42:343-352pp.
- Routray, W. and Orsat, V.,** 2011, Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review, Food Bioprocess Technol, 5(2):1–16pp.
- Saini, H.S., Shepherd, M. and Henry, R.J.,** 1999, Microwave extraction of total genomic DNA from barley grains for use in PCR, Journal of The Institute of Brewing, 105, 3, 185p.
- Saiki, RK, Scharf S, Faloona F, Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.,** 1985, Enzymatic application of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230: 1350-1354pp.
- Salamon, M.,** 2005, Development of reliable extraction and characterization procedures for ancient DNA in fossil bones, Telaviv University, Sackler School of Medicine, Department of Anatomy and Anthropology, 108p.
- Sambrook J. and Russell D.W.,** 2001, Molecular cloning: A laboratory manual 3. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2028p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- SEER Training Modules**, “Structure of Bone Tissue”, <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>, (Erişim Tarihi: 02 Mayıs 2014)
- Shampo M.A. and Kyle R.A.**, 2002, Kary B. Mullis- Nobel Laureate for procedure to replicate DNA, *Proceedings*, (Mayo Clinic), 77, 7, 606p.
- Sinclair K. and McKechnie, V.M.**, 2000, DNA Extraction from stamps and envelope flaps using QIAamp and QIAshredder, *Journal of Forensic Sciences*, 1, 229-230pp.
- Steen E.B. and Montagu A.**, 1901, *Anatomy and physiology*, New York : Barnes & Noble, 314p.
- Techer D., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennisroune A., Foucaud L. and Falla J.**, 2010, Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils, *Separation and Purification Technology*, 75, 81–86pp.
- Thomas, W.W., Paabo, S, Villablanca, F.X. and Wilson A.C.**, 1990, Spacial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *J Mol Evol* 3:101-112pp.
- Thomas, R.H., Schaffner, W, Wilson, A.C. and Paabo, S.**, 1989, DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340:465-467pp.
- Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M. and Garrigues, P.**, 2002, Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides in marine sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 196p.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. and Higuchi, R.**, 2013, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques*, 54, 3, 134–139pp.
- Weiner, S., Kustanovich, Z., Gil-Av, E. and Traub, W.**, 1980, Dead sea scroll parchments: unfolding of the collagen molecules and racemization of aspartic acid, *Nature*, 287, 820-823pp.
- Weiner, S., and Wagner, H.D.**, 1992, The material bone: structure-mechanical function relation, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28, 271-298pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C. and Saunders, S.R., 1998,** Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns, *Am. J.Phys. Anthropol.*, 105, 1998, 539–543pp.
- Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z. and Liu, H., 2013,** Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions, *Separation and Purification Technology*, 104, 17–25pp.

ÖZGEÇMİŞ

Elif ÖZDEMİR KAYNAK, 24/08/1989 tarihinde İzmir’de doğdu. Orta ve Lise öğrenimini Çanakkale’de tamamladıktan sonra 2007 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nü kazandı. 2012 yılında Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ danışmanlığında ve Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ’ın yardımlarıyla “Supercritical CO₂ processing of a chitosan-based scaffold: Can implantation of tissues be enhanced?” konulu bitirme tezi ile lisans öğrenimini tamamlayarak mezun oldu. Akabinde yüksek lisans eğitimine Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda devam etti. 2012 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesinde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı.

Yayımlar:

Elif Ozdemir, Aylin Sendemir-Urkmez, Ozlem Yesil-Celiktas, “Supercritical CO₂ processing of a chitosan-based scaffold: Can implantation of osteoblastic cells be enhanced?” J. of Supercritical Fluids 75 (2013) 120–127.

Ozdemir-Kaynak E., Yesil-Celiktas O. (2014). Development of a rapid DNA extraction protocol from ancient human bones. Forensic Science International, submitted.

Uluslararası kongrelerde tam metin olarak sunulan sözlü sunumlar:

Elif Ozdemir, Seref Akay, Ozlem Yesil Celiktas, "Economic Evaluation of a Polymeric Scaffold by Supercritical CO₂ Fabrication" 10th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications, April 29-May 06, 2013, Naples, Italy.

Elif Ozdemir-Kaynak, Seref Akay, Ozlem Yesil-Celiktas, “Improved Methods For DNA Isolation From Ancient Skeletal Material”, VI. Bioengineering Congress “Human Welfare” (BEC 2013), 12-17 November, 2013, Kuşadası, İzmir.

Uluslararası kongrelerde özet metin olarak sunulan poster sunumlar:

Elif Ozdemir, Aylin Sendemir Urkmez, Ozlem Yesil Celiktas, “Fabrication of Porous Chitosan Scaffolds with Supercritical CO₂ for Tissue Engineering Applications”, The 18th International Biomedical Science & Technology Symposium (BIOMED 2012), September 10-13, Tokat, Turkey.

Ulusal kongrelerde özet metin olarak sunulan poster sunumlar:

Elif Özdemir-Kaynak, Özlem Yeşil-Çeliktaş, Süperkritik CO₂ kurutma tekniği ile üretilmiş kitosan temelli doku iskelelerinin karakterizasyonu, hücre kültürü ve ekonomik açıdan değerlendirilmesi, Biyo&Nano Teknoloji Kongresi, Fatih Üniversitesi, İstanbul, 01-03 Ekim, 2013.

Kazandığı Ödüller:

“Poster Bildiri 2.lik ödülü”, Biyo&Nano Teknoloji Kongresi, Fatih Üniversitesi, 2013, İstanbul, Türkiye.

EKLER

Ek 1 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İzin Belgesi



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.EGE.0.20.05.00/OY/ 725 / 290
Karar Nu: 13-4.1/3

03 MAY 2013

Sayın
Doç. Dr. Özlem Yeşil ÇELİKTAŞ
Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Süperkritik Akışkan Teknolojisini Kullanarak Kemik Materyalinden DNA Ekstraksiyonu**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, bitirme tarihinin ve Sonuç Raporunun Kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar tarih ve sayısı bildirilerek (Etik Kurul Bilgilendirme Formu ekinde) yapılması gerekmektedir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Kaan KAVAKLI
Başkan

EK: İlgili Etik Kurul Kararı



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Süperkritik Akışkan Teknolojisini Kullanarak Kemik Metaryalinden DNA Ekstraksiyonu.			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Özlem Yeşil ÇELİKTAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Biyomühendislik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon <input type="checkbox"/>	Yüksek Doz Araştırması <input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLEN- DİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21.03.2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	-		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 13-4.1/3	Tarih: 30.04.2013
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Kaan KAVAKLI				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Gnsiyeti	İlişki (*)	Kablim (**)	İmza
Prof. Dr. Kaan KAVAKLI Başkan	Çocuk Sağlığı Hst. ve Çocuk Kan Hst	E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hst. AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Raportör	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI

