

TC. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu

HUMDNA TYPING (YANHUANG-PCR) KİTİNİN GÜVENİLİRLİĞİ İLE ADLİ
BİLİMLERDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE İKİ FARKLI
PCR KİTİ (IDENTIFILER PLUS & GLOBALFILER) İLE KARŞILAŞTIRILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GEN. MÜH. VE BİYOMÜH. NAZLI HÖLÜMEN

İSTANBUL, 2023

Bu tez projesi İ.Ü.-C. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 36501

Bu tez projesi dahilinde kullanılan Identifiler Plus ile GlobalFiler PCR Kitlerinin sağlanması ve örneklerin yürütüldüğü ABI 3500 kapiler elektroforez cihazının kullanılmasında T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi'nden destek alınmıştır.

ÖNSÖZ

Yıllardır hayalini kurduğum alanda uzmanlığımı almak için emek verdiğim tez çalışmamı tamamlamanın gururunu yaşıyorum.

Öncelikle tez danışmanım olarak her zaman yanımda olan, varlığını içtenlikle hissettiren ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, canım Hocam

Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu'na,

Laboratuvarda benimle birlikte omuz omuza çalışan ve tezimin tamamlamasında büyük emekleri olan

Öğretim Görevlisi Dr. Ömer Karataş ve Öğretim Görevlisi Sotiri Kalsoğlu'na,

Bana her zaman ekiplerinin bir üyesi gibi içtenlikle yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen

Prof. Dr. Ersi Kalsoğlu ve Dr. Öğretim Üyesi Gavril Petridis'e,

Bu süreçte moral ve motivasyonumu her daim yüksek tutmamı sağlayan değerli Hocam

Dr. Öğretim Üyesi Dilek Salkım İşlek'e,

Yorucu ama keyifli olan bu yolculukta desteklerini her zaman arkamda hissettiğim başta annem **Gökşen Hölümen**, babam **Hildan Hölümen**, babaannem **Türkan Hölümen** ve amcam **Atacumhur Hölümen** olmak üzere **tüm aileme,**

Bana tez çalışmam süresince her zaman destek olan canım arkadaşım **Şevval Kolsuz'a**, ekip arkadaşım **Uzm. Eda Kiriş'e** ve diğer **tüm arkadaşlarıma,**

saygı ve minnetle teşekkür ederim.

Nazlı Hölümen

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	v
ÖZET	vi
SUMMARY.....	vii
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Genetiğin Adli Bilimlerdeki Önemi	4
2.1.1. Adli Bilimler ve Genetik.....	4
2.1.2. Popülasyon Genetiğinin Adli Bilimlerdeki Önemi.....	13
2.2. Kısa Ardışık Tekrarlar (STR'ler) ve Adli Bilimlerdeki Kullanımları	14
2.3. Doğrulama (Validasyon) ve Akreditasyon	16
2.4. AmpF/STR™ Identifiler™ Plus PCR Kiti.....	17
2.5. GlobalFiler PCR Kiti.....	19
2.6. HUMDNA Typing Kit (Yan Huang).....	22
3. Gereç ve Yöntem	27
3.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar, Yararlanılan Ticari Kitler ve Kullanılan Sarf Malzemeleri	27
3.2. DNA'nın silika yöntemi ile çekitlenmesi.....	28
3.3. DNA'nın florometrik yöntemle miktar tayini.....	29

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
3.4.1. HUMDNA YanHuang PCR kiti ile PCR	30
3.4.2. GlobalFiler kiti ile PCR.....	31
3.4.3. Identifiler Plus kiti ile PCR.....	32
3.5. Kapiler Elektrophorez ile Örneklerin Yürütülmesi	34
3.5.1. Uygun İç Standart Belirlenmesi (Salmon500/LIZ500/LIZ600 Karşılaştırması)	34
3.5.2. Tez Örneklerinin Analizi.....	34
3.6. Elektrophorez verilerinin analizi	36
4. Bulgular	37
4.1. Miktar Tayini Verileri.....	37
4.2. Salmon500/LIZ500/LIZ600 Karşılaştırması.....	39
4.3. Farklı Reaksiyon Oranlarındaki Örneklerin PCR Sonuçları (HumDNA Typing Yanhuang PCR Kit)	40
4.4. GlobalFiler PCR Kiti/HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti Karşılaştırması....	47
4.5. Identifiler Plus PCR Kiti/HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti Karşılaştırması	51
5. Tartışma	55
6. Sonuç	61
7. Kaynaklar	62
EKLER.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	72

TABLO LİSTESİ

Tablo I The AmpF/STR Identifiler Plus Kitindeki STR bölgelerinin çoğaltılabilen alelleri.

Tablo II GlobalFiler PCR Kitindeki STR bölgelerinin çoğaltılabilen alelleri.

Tablo III Farklı lokus standartları ve içerdikleri STR bölgeleri.

Tablo IV Farklı PCR kitlerinin kümülatif ayırım gücü ve kombine dışlama güçleri.

Tablo V Identifiler Plus/GlobalFiler/HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti dahilinde çoğaltılabilen STR bölgeleri.

Tablo VI HUMDNA Typing YanHuang PCR kiti bileşenleri ve reaksiyon oranına göre gerekli olan miktarları.

Tablo VII HUMDNA Typing-YanHuang PCR kiti döngü parametreleri.

Tablo VIII GlobalFiler PCR kiti bileşenleri ve gerekli olan miktarları.

Tablo IX Globalfiler PCR döngü parametreleri.

Tablo X Identifiler Plus PCR kiti bileşenleri ve gerekli olan miktarları.

Tablo XI Identifiler Plus PCR döngü parametreleri.

Tablo XII Elektroforez parametreleri.

Tablo XIII Miktar tayini analizi sonuçları.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 PCR bileşenleri ve PCR basamakları (denatürasyon, bağlanma, uzama).

Şekil 2 Kapiler elektroforez sistemi.

Şekil 3 Gene Mapper ile elde edilmiş DNA profili örneği.

Şekil 4 Salmon 500 iç standartına ait elektroferogram.

Şekil 5 LIZ500 iç standartına ait elektroferogram.

Şekil 6 LIZ600 iç standartına ait elektroferogram.

Şekil 7 HumDNA Yan Huang PCR kiti ile tam reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.

Şekil 8 HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/2.5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.

Şekil 9 HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.

Şekil 10 GlobalFiler PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (24 STR bölgesi).

Şekil 11 HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi).

Şekil 12 Identifiler Plus PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (16 STR bölgesi).

Şekil 13 HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi).

KISALTMALAR

°C : Santigrat derece

μL : Mikrolitre

CDP: Cumulative Discrimination Power (Kümülatif Ayrım Gücü)

CMP: Combined Matching Probability (Birleşik Eşleşme Olasılığı)

CODIS: Combined DNA Index System (Birleşik DNA İndeks Sistemi)

CPE: Cumulative Probability of Exclusion (Kümülatif Dışlama Olasılığı)

CPI: Combined Paternity Index (Birleşik Babalık İndeksi)

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)

FBI: Federal Bureau of Investigation (Federal Soruşturma Bürosu)

HW: Hardy-Weinberg

ISO: International Standardization Organization (Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu)

Ng: Nanogram

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

QAS: Quality Assurance System (Kalite Güvence Sistemi)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

RFU: Relative Fluorescence Units (Bağıl Floresan Birimleri)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

STR: Short Tandem Repeat (Kısa Ardışık Tekrar)

VNTR: Variable Number Tandem Repeat (Değişken Sayılı Ardışık Tekrar)

ÖZET

Adli bilimler, suçun aydınlatılması için birçok farklı konuda uzmanın beraber çalıştığı multi-disipliner bir alandır. Birden fazla suç türünde suçlunun ve masum bir insanın ayırt edilmesinde yararlanılan bir disiplin olan adli genetiğin adli bilimler kapsamında yeri büyüktür. Kısa ardışık tekrar (STR) analizleri en sık yürütülen adli genetik analizlerden olup akrabalık tayinleri, ebeveynlik testleri, olay yerinden ve/veya şüphelilerden elde edilen delillerin karşılaştırılması ya da bireylerin kimliklendirilmesi gibi birçok farklı durumda kullanılmaktadır. Bu biyobelirteçlerin sayısı, analizlerde kullanılan kitlerin içeriğinde değişiklik gösterebilmektedir. Tezin amacı doğrultusunda HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler alanında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Bu tez kapsamında da alanda sıklıkla tercih edilen iki farklı kite (Identifiler Plus ve GlobalFiler) ek olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanılmış olup bu üç farklı kit karşılaştırılmıştır. İncelenen lokus sayılarının farklı olması adli bilimler açısından oldukça önemlidir. Bu karşılaştırmaya ek olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanarak çoğaltılan örneklerin yürütmesinde üç farklı iç standart (LIZ500, LIZ600 ve kit dahilindeki Salmon500) test edilmiş ve LIZ600 ile daha temiz sonuç alındığı görülmüştür. Son olarak adli bilimlerde oldukça önemli bir konu olan örnek miktarı azlığındaki sıkıntıların giderilmesi için kitin ne kadar kullanışlı olduğunu görmek adına farklı oranlarda (1, 1/2.5, 1/5) PCR karışımları hazırlanmış ve test edilmiştir. Her oranda da başarılı sonuçlar elde edilmiş ve böylelikle çok az miktarda DNA ile dahi sonuç alınabildiği görülmüştür. Sonuç olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler dahilinde yürütülen genetik çalışmalarında kullanışlı bir kit olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler:

Yanhuang PCR Kit, HumDNA Typing Kit, Identifiler Plus, GlobalFiler, Adli Bilimler, Kısa Ardışık Tekrarlar (STR'ler), Adli Genetik

SUMMARY

Forensic science is a multidisciplinary field in which many different experts work together to shed light on crime. Forensic genetics, which is a discipline that is used to distinguish the guilty and innocent person in different types of crime, has a great place within the scope of forensic sciences. Short Tandem Repeat (STR) analyzes are the most frequently conducted forensic genetic analyzes and are used in many different situations such as kinship determinations, parenting tests, comparison of evidence obtained from the crime scene and/or suspects, or identification of individuals. The number of these biomarkers may vary in the content of the kits used in the analysis. For the aim of the thesis, the usability of the HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kit in the field of forensic sciences was evaluated. In this thesis, in addition to two different kits (Identifiler Plus and GlobalFiler), which are frequently preferred in the field, the HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kit was used and these three different kits were compared. It is very important in terms of forensic sciences that the number of loci examined is different. In addition to this comparison, three different size standards (LIZ500, LIZ600 and Salmon 500 included in the kit) were tested in the electrophoresis of samples amplified using the HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kit, and it was seen that cleaner results were obtained with LIZ600. In addition, PCR mixtures at different ratios (1, 1/2.5, 1/5) were prepared and tested in order to see how useful the kit is in eliminating the problems of insufficient sample amount, which is a very important issue in forensic sciences. Successful results were obtained in every ratio, and it was seen that results could be obtained even with a very small amount of DNA. As a result, HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kit is thought to be a useful kit for genetic studies carried out within forensic sciences.

Keywords:

Yanhuang PCR Kit, HumDNA Typing Kit, Identifiler Plus, GlobalFiler, Short Tandem Repeats (STRs), Forensic Sciences, Forensic Genetics

1. Giriş ve Amaç

Adli bilimler, bünyesinde birçok bilimsel disiplini barındıran ve adalete hizmet eden multi-disipliner bir çalışma alanıdır. Adli genetik çalışmaları, adli bilimler çerçevesinde yer alan çalışma alanlarından biridir. Kişilerin kimliklendirilmesi, annelik ve babalık testleri, büyük felaketlerdeki kimlik tespit çalışmaları, antik DNA çalışmaları, olay yerinden elde edilen delillerin kurbanlar ve/veya şüpheliyle eşleştirilerek doğru kişilerin adalete teslim edilmesi adli genetik dâhilinde yürütülen çalışmalardandır. Bu analizler yürütülürken eşleşmeler, genetik belirteçler yardımıyla yapılmaktadır ve tarih boyunca çeşitli genetik belirteçler keşfedilmiştir. Adli genetik tarihinde ilk kullanılan genetik belirteçler, polimorfizmlere dayalı ayrımın yapıldığı Karl Landsteiner tarafından 1901 yılında keşfedilen ABO kan gruplarıdır. Kan gruplarına dayalı analizleri takiben çeşitli protein polimorfizmleri, protein izoform testleri kullanılmıştır. DNA'nın çift sarmal yapısının keşfi ile moleküler çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Mini uydular olarak da adlandırılan VNTR'lerin keşfi ile bu genetik belirteçler, dönemin sık tercih edilen belirteci olmuşlardır. Alec Jeffreys'in keşfettiği DNA parmak izi yöntemi ile VNTR'ler RFLP tekniği ile analiz edilmeye başlanmış ve uzunca bir süre kullanılmıştır.

VNTR'lerin oldukça degrade ve az miktartlı örneklerde sorun yaşatması nedeniyle mikro uydular olarak da adlandırılan STR'lerin keşfi, adli genetik tarihinde yeni bir sayfa açılmasını sağlamıştır. Boyut olarak VNTR'lere kıyasla daha kısa olan STR'ler degrade ve az miktartlı örneklerde VNTR'ye göre daha iyi sonuç vermektedir. Kary Mullis tarafından 1985 yılında PCR'ın keşfedilmesi ile birlikte günümüzde adli bilimler laboratuvarlarında rutin olarak en sık tercih edilen PCR temelli STR analizi oluşturulmuştur. Tekrar sayıları kişiden kişiye değişiklik gösteren STR bölgelerinin incelenmesi yoluyla gerçekleştirilen analizler sonucunda delil değeri belirlenmektedir ki bu noktada popülasyon genetiği işin içine girmektedir.

Popülasyon genetiği çalışmaları, adli genetik kapsamında analiz sonuçlarının yorumlanmasında yararlanılan önemli çalışmalardandır. Popülasyonlardaki alel dağılımlarının değişimlerini inceleyen popülasyon genetiği, analiz sonucu hazırlanan raporlarda belirtilen delil değerlerinin hesaplanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin babalık testlerinde belirtilen yüzde ifadesi popülasyon genetiği çalışmaları sonucu elde edilmiş alel frekansları baz alınarak hesaplanır. Delil değerinin doğru belirlenmesi, kişilerin uygun şekilde ceza almalarını sağlamak adına önemlidir. Ya da tam tersi bir durum söz konusu olduğunda delil değerinin olduğundan fazla hesaplanması da bir problemdir. Bahsedilen adli genetik analizlerinin doğru koşullar sağlanarak, kalifiye analistler tarafından yürütülmesi adli laboratuvarlardaki en önemli gerekliliklerdendir. Adli bilimler laboratuvarları belirli standartlara uymalıdır ve analistler belirli zaman aralıklarında denetlenmelidir. Tüm bu gereklilikler validasyon (doğrulama) çalışmaları ile yerine getirilmektedir. Kullanılan ekipmanın, yöntemin ve analizi gerçekleştiren personelin doğrulanmasını kapsayan validasyon çalışmaları hem dışarıdan hem de laboratuvarın kendi işleyişini kontrol edebilmesi adına laboratuvarın kendisi tarafından yapılabilmektedir. Adli bilimler çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvarlarda Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu ISO'nun 17025 standardı, zorunlu bir standart olmakla beraber bu standardın laboratuvar tarafından sağlanması durumunda ilgili laboratuvarın akreditasyonu sağlanmaktadır.

Tezin amacı, HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler alanında kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir. Bu tez kapsamında da alanda sıklıkla tercih edilen iki farklı kite (Identifiler Plus ve GlobalFiler) ek olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanılmış, bu üç farklı kit karşılaştırılacak olup ek olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanarak çoğaltılan örneklerin analizinde kit dahilindeki Salmon 500'ün yanı sıra iki farklı iç standart (LIZ500 ve LIZ600) daha test edilecektir.

Son olarak adli bilimlerde oldukça önemli bir konu olan örnek miktarı azlığının telafi edilmesinde kitin ne kadar kullanışlı olduğunu görmek adına farklı oranlarda (1, 1/2.5, 1/5) PCR karışımları hazırlanarak test edilecektir.

Çin menşeli olan PCR kiti, toplam 28 STR bölgesinin incelenmesine imkân tanımaktadır ve bu bölgeler; Y-INDEL, AMEL, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, SE33, D10S1248, D5S818, D21S11, TPOX, D1S1656, D6S1043, DXS6795, D19S433, D22S1045, D8S1179, Penta E, D2S441, DYS391, D12S391, D2S1338, vWA, Penta D, TH01, D18S51, CSF1PO ve FGA'dır.



2. Genel Bilgiler

2.1. Genetiğin Adli Bilimlerdeki Önemi

2.1.1. Adli Bilimler ve Genetik

Kalıtımın en temel birimi olan genlerin yapısı ile görevinin incelendiği ve nesiller arası bu genlerin aktarılma mekanizmasının araştırıldığı bilim dalı genetik (1). Genetik bilimi kendi içinde birçok farklı araştırma alanına sahiptir ve bunlardan biri de adli genetik. Suçlunun adalete teslim edilmesi, suçla ilgisi olmayanların masumiyetlerinin kanıtlanması, suçun çözüme kavuşturulması amaçlarıyla adalete hizmet eden adli genetik kapsamında birçok farklı analiz yürütülmektedir (2). Aydınlatılacak olan suç ile ilişkili delillerin bulunduğu alanların tümü olay yeri olarak adlandırılmaktadır. Adli genetik analizlerinde çalışılan biyolojik numunelerin sağlamlığını korumuş olması ve titizlikle toplanmış olduklarından emin olunması son derece önemlidir. Edmond Locard'ın 1900'lerin başında öne sürdüğü değişim prensibine şunu ifade eder: iki objenin teması sonucunda objeler arası bir materyal transferi gerçekleşmektedir (3). Bu nedenle olay yerlerinden elde edilen her bir delilin doğru değerlendirilmesinin, suçluya yaklaşımda bir adım daha öne gitmemizi sağladığı söylenebilir.

Bir suçun gerçekleşmesinin ardından o suç davasının çözüme kavuşturulması için belli aşamalardan geçilmektedir. Bu süreç, kabaca 7 basamakta ele alınmaktadır (4). Birinci adım, suçun gerçekleşmesi ve az önce bahsedilen değişim prensibi gereği materyal değişimleri sonucu olay yerine aktarımlarıdır. İkinci adım, suçun kolluk kuvvetlerine bildirilmesi ve olay yeri güvenliğinin ilgili ekiplerce sağlanmasıdır. Olay ile ilgili olmayan kişiler hem kolluk kuvvetlerinin işini zorlaştırabilmekte hem de olay yerinde kontaminasyona neden olarak delillere zarar verebilmektedirler. Güvenlik önlemlerinin alınmasını takiben olay yeri inceleme ekiplerinin çalışmalarını gerçekleştirmesi üçüncü adımı oluşturmaktadır.

Delillerin delil teslim zincirine uygun şekilde toplanmaları, paketlenmeleri ve transferleri bu sürecin en önemli gerekliliğidir. Özellikle biyolojik delillerin kontaminasyona açık örnekler olmaları bu süreçte fazladan özen gerektirmektedir. Dikkat edilmediği takdirde çok önemli biyolojik örnekler, delil değerlerini kaybedebilirler (4). Mikropların çoğalmaları ve büyümeleri için gerekli olan karbonhidrat, yağ, protein ve su gibi kaynakların biyolojik materyallerde bulunması, delilleri açık hedef haline getirmektedir. Biyolojik deliller doğru koşullarda muhafaza edilmez ise mikroplar tarafından kontaminasyona uğrayabilmektedir. Mikrobiyal bir bozunma sonucunda Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) gerekli çoğalma hiç sağlanamayabilir ya da düzgün bir çoğalma elde edilemeyebilir. Buna ek olarak mikrobiyal bozunmalar, heterozigot pik dengesizliğine sebep olabileceği gibi insan kaynaklı olmayan DNA kontaminasyonuna da yol açabilmektedir (5).

Olay yerinde farklı türde deliller bulunabilmektedir. Deliller temel olarak maddi ve beyan deliller olarak ikiye ayrılmaktadır. Şüpheli, mağdur veya tanıkların verdiği beyanlar, beyan delil iken maddi deliller temelde dört gruptur; iz deliller, fiziksel, kimyasal, biyolojik inceleme yapılan deliller (6). Olay yerlerinde karşılaşılan ve üzerinde adli genetik analizler yürütülen biyolojik delillere kan, semen, tükürük, idrar, saç, kemik, dışkı, vajinal sıvı örnek verilebilir. Dördüncü adım, olay yerinden toplanan delillerin ilgili laboratuvara teslim edildikten sonra analizlerinin yürütülmesidir. Yukarıda bahsedildiği üzere farklı türlerde deliller mevcuttur. Bu delillerin ilgili birime gönderilerek analiz edilmesi gerekmektedir. Yürütülen analizlerin ardından sonuç raporlarının hazırlanması ve ilgili makamlara iletilmesi beşinci adım; sonuç raporları, mağdur ifadeleri, şüpheli savunmasının bir bütün halinde adli makamlarca değerlendirilmesi ve davanın sonuçlandırılması ise altıncı adımdır. Son adımda bilimsel verilere dayanılarak kişilerin masumiyetlerinin kanıtlanması ve suçluların adalete teslim edilmesi gerçekleşmektedir (4).

Günümüzde moleküler düzeydeki çalışmalar ön plana çıksa da adli alandaki genetik çalışmalar 1950’li yıllara kadar serolojik yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Değişim, 1953 yılında DNA’nın sarmal yapısının keşfi ile başlamıştır (7) ve bu tarihten itibaren gelişen teknoloji ile birlikte farklı çalışmalar yürütülmektedir. Adli genetik alanındaki en önemli gelişmelerden biri de 1984 yılında Alec Jeffreys tarafından keşfedilen DNA parmak izi yöntemidir. Bu analiz ilk kullanıldığı süreçte sınırlandırılmış parçacık uzunluk polimorfizmi (Restricted Fragment Length Polymorphism, RFLP) yöntemi kullanılmıştır ve basamakları kısaca şu şekilde özetlenebilir; öncelikle analiz edilecek olan DNA örneği restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Bu işlem sonucunda elde edilen farklı uzunluktaki parçacıklar, jel elektroforezde boyutlarına göre ayrılmaktadır. Elektroforez aşamasından sonra DNA parçacıkları nitroselüloz ya da naylon membrana aktararak sabitlenmektedir. Bu teknik Southern blot olarak adlandırılmaktadır. DNA zincirleri denatüre edildikten sonra değişen sayılı ardışık tekrarlı DNA dizisine (VNTR’ler) tamamlayıcı olan radyo-etiketli DNA probları ile hibridizasyon gerçekleştirilir. Daha sonra blot, X-ray filmine maruz bırakıldığında film üzerinde farklı floresan bantlar gözlemlenmektedir. Bu bantlar, hibridizasyonun oluştuğunu göstermektedir ve sonrasında gözlemlenen bantlar, otoradyograftaki bant şekillerine göre karşılaştırılmaktadır (8).

Yöntemin en olumsuz yönleri; analizin uzun zaman alması ile bozunmuş ve kötü kalitedeki örneklerin analizinde sorun yaşanabilmesidir. Alec Jeffreys ve arkadaşlarının çalışmasında insan miyoglobin geninin intronlarından birinde bulunan mini uydular (VNTR) ortaya çıkarılmıştır. İzole edilen bölgeler, mini uyduların 3-29 tekrar birimlerinden oluştuğunu kanıtlamıştır (9). VNTR’ler, bireyler arası uzunluklarında farklılık gösterebilen genetik belirteçlerdir.

Adli genetik analizler yapılırken ilk adım DNA'nın doğru ve verimli bir şekilde izole edilmesidir. Bu adımda amaca uygun DNA izolasyon yöntemi tercih edilmelidir. Adli bilimler kapsamında tercih edilen farklı izolasyon yöntemleri mevcuttur ve bunlardan bazıları organik izolasyon (fenol-kloroform ile), Chelex ile izolasyon, katı faz izolasyonu ve tuzla çöktürmedir. Diferansiyel DNA izolasyonu ise özellikle cinsel saldırı durumlarında kullanışlı olabilen alternatif bir yöntemdir. Gelişen teknoloji ile birlikte geleneksel manuel izolasyon yöntemlerinde alternatif olarak ticari izolasyon kitleri üretilmiştir (10).

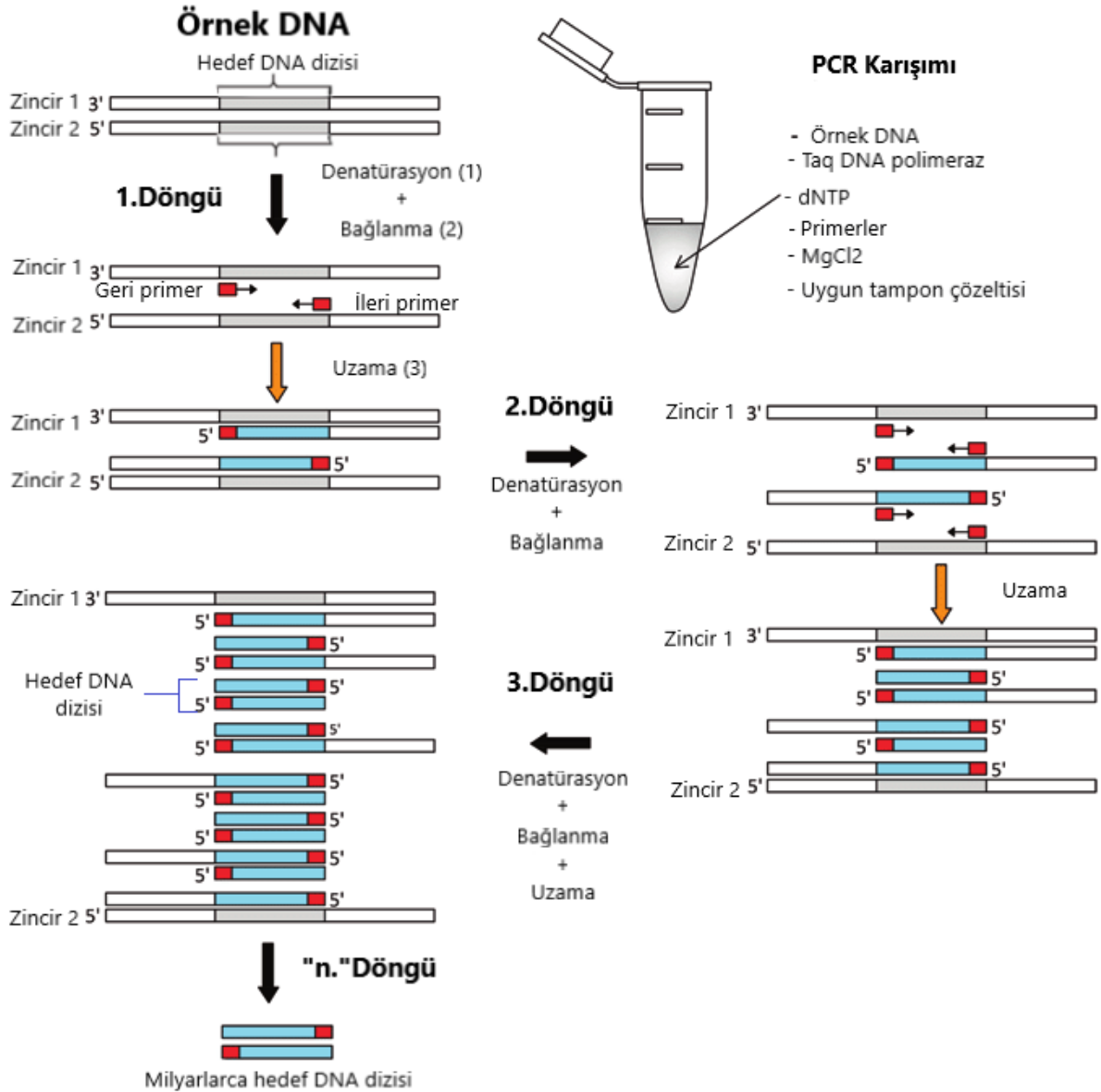
Ticari kitler ile izolasyon, günümüzde en sık tercih edilen yöntem olmakla birlikte farklı marka ve üreticilere ait kitler piyasa bulunabilmektedir. Bu kitler tercih edildiği takdirde kit üreticilerinin sağladığı yönergelere uyarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Nasıl ki manuel çekitleme yöntemlerinde amaca uygun olanın tercih edilmesi gerekiyorsa ticari kit kullanılırken de uygun kit tercihi önemlidir. Bunun için farklı parametreler değerlendirilmektedir (11). İlk olarak, DNA izolasyonu yapılacak materyalin orijini, doğru kitin seçilmesinde önemlidir çünkü adli bilimler çalışmalarında birçok farklı biyolojik materyal (örneğin kan, saç, çeşitli vücut sıvıları ve dokular gibi) ile çalışılabilmektedir. Buna ek olarak taze biyolojik materyal ya da eski örnekle çalışılacak olması da fark yaratabilecek faktörlerdendir. Analiz edilecek örneklerin olay yerlerinden toplandığı düşünüldüğünde analizi etkileyebilecek içeriklerin örnekte bulunabileceği göz ardı edilmemelidir. Örneğin gübre ve tortu gibi hümit içeriklerin bulunduğu bir olay yerinden elde edilen biyolojik örneğin bir sonraki analiz basamağını engellememesi ve temiz sonuçlar alınabilmesi için bu içerikleri elimine edebilecek özel kitlerin izolasyon aşamasında tercih edilmesi gerekebilmektedir. En önemli parametrelerden biri de adli bilimlerde sıklıkla karşılaşılan analiz edilecek biyolojik materyalin miktarının azlığıdır. Bu sorunun üstesinden gelebilecek kitlerin tercih edilmesi oldukça önemlidir. Son olarak analizde kullanılan kitin kolay uygulanabilir bir kit olması iş akışı için göz ardı edilmemesi gereken bir parametredir.

Rutin STR profillemesinin DNA izolasyonu sonrasındaki adımı, çekitlenen DNA'nın miktar tayininin gerçekleştirilmesidir. Sonrasında yapılacak olan çoğaltma işlemi için gerekli olan DNA miktarını elde etmek için bu aşamada edinilen miktar bilgisine göre örnekler seyreltilmektedir. Miktar tayini için tek bir yöntem bulunmamaktadır ve farklı yöntemler arasında karşılaştırma çalışmaları da yapılmaktadır (12). Çeşitli faktörlere bağlı olarak farklı yöntemler tercih edilebilmektedir. Bu faktörlerden bazıları; yöntemin maliyeti, analiz süresi, beklenen DNA konsantrasyonu ve analiz için gerekli ekipmandır. Bahsi geçen parametrelerden uygunluk durumuna göre tercih edilebilecek yöntemler; agaroz jel elektroforezi, spektroskopik ve florometrik yöntemler, ya da gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'dur. Bu yöntemlerden en sık tercih edilenler spektroskopik ve florometrik yöntemlerdir (13). Spektroskopik DNA miktar tayini analiz edilecek örnek, kuvars bir küvete yerleştirilmektedir. Örnekten geçirilen UV ışığı sonrasında nükleik asit konsantrasyonu Beer-Lambert denklemi ile 260nm'deki absorbans değeri ölçülerek hesaplanmaktadır. Bu dalga boyunun tercih edilme sebebi nükleik asitlerin ışığı 260nm'de absorbe etmeleridir (14). En bilinen spektroskopik miktar tayini cihazı Nanodrop'tur. Bir diğer sık tercih edilen yöntem olan florometrik yöntemle kıyasla nükleik asit saflığı spektroskopik yöntemle ölçülebilmektedir (15). Florometrik yöntem ile ise sadece konsantrasyon ölçümü yapılabilmektedir. Ayrıca, maliyet ve örnek hazırlama süresi açısından spektroskopik yöntemler daha avantajlıdır. Florometrik DNA miktar tayininde floresan boyalar kullanılmaktadır ve farklı emisyon dalga boylarına sahip bu boyalar nükleik asit olukları ile etkileşime girmektedir (13). Analiz edilen örneğin floresan emisyonu bir standartla karşılaştırılmakta ve buna bağlı olarak DNA konsantrasyonu belirlenmektedir. Yöntemde kullanılan boyaların sahip olması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Öncelikle boyanın dinamik aralığı önemli bir parametredir. Diğer bir deyişle analiz edilen örneğin beklenen konsantrasyonu ile boya uygun olmalıdır.

Buna ek olarak boyanın analiz edilen örneğe duyarlılığı ve özgüllüğü ile örnek hacmi de göz ardı edilmemesi gereken parametrelerdendir. Son olarak analizin yürütüldüğü cihaz ile ilgili olan koşullar vardır. Florometre-boya uyumu açısından cihaz filtreleri ve örnek formatı (küvet ya da tek tüpte ölçüm) analizi etkileyen parametrelere örnektir. En bilinen florometrik miktar tayini cihazı Qubit'tir. Miktar tayini kitinin yönergeleri takip edilerek hazırlanan örnek karışımının olduğu tüp cihaza yerleştirilerek okuma yapılmaktadır. Florometrinin, spektroskopik miktar tayini yöntemine kıyasla en büyük avantajı çok daha yüksek hassasiyete sahip olmasıdır. Nanodrop One/One^c cihazının küvet için alt tespit limiti 0.4ng/μl, pedestal için 2.0ng/μl iken Qubit cihazının alt tespit limiti 0,005 ng/μl'dir (Qubit4/Qubit Flex) (16). Nanodrop cihazı seyreltilmiş numunelerde daha iyi analiz imkanı sunmaktadır.

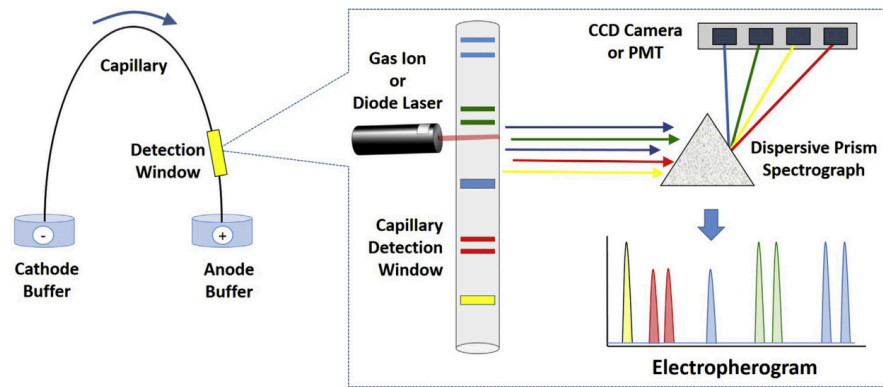
Analiz edilecek örneklerin miktar tayinleri yapıldıktan sonra bir sonraki adım olan PCR aşamasında tavsiye edilen DNA miktarına uygun şekilde seyreltilmektedir. Kary Mullis tarafından 1985 yılında icat edilen PCR yöntemi, az miktarda bulunan DNA'nın makul bir sürede çok miktarda kopyalanmasını sağlamaktadır (17). PCR yöntemi için gerekli bileşenler; çoğaltmak istenilen DNA, deoksinekleotidler, primerler, Taq polimeraz enzimi, tampon çözeltisi, Mg⁺² iyonlarıdır (18). Bu bileşenlerden DNA hariç diğerleri, kullanılan PCR kitine göre bir arada bulunabilir ya da bazıları sonradan eklenebilmektedir. Reaksiyon, PCR tüpü içerisinde ve farklı sıcaklıkları sağlayabilen termal döngüleyici cihazında gerçekleştirilmektedir (19). PCR işlemi temelde üç ana basamaktan oluşmaktadır (20) ve bunlardan ilki yüksek sıcaklıkta DNA'nın çift zincirinin birbirinden ayrılması olan 'denatürasyondur'. İkinci adım; sıcaklığın azaltılarak, reaksiyon karışımındaki primerlerin her bir zincire bağlanmalarının gerçekleştiği 'bağlanmadır'. Son adımda sıcaklık tekrar artırılmakta ve reaksiyon karışımındaki Taq polimeraz enzimi ve nükleotidler sayesinde yeni zincir sentezlenmektedir. Bu basamak 'uzama' olarak adlandırılmaktadır.

Bahsedilen üç adımın tavsiye edilen döngü sayısına göre tekrarlanması ile istenilen DNA çoğaltılmaktadır. Kary Mullis bu başarısı sayesinde 1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü almaya hak kazanmıştır (21). Bir PCR karışımının bileşenleri ve PCR basamaklarının bir temsili çizimi Şekil 1’de görülmektedir. STR tabanlı DNA profillemesinin gelişmesinde PCR yönteminin keşfi büyük önem taşımaktadır.



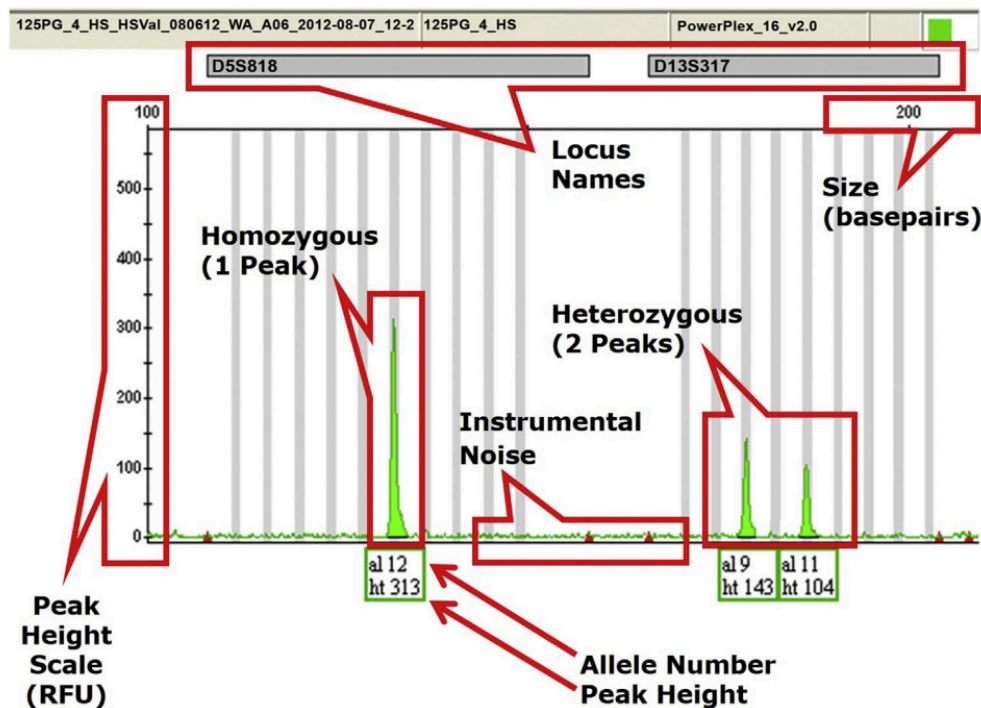
Şekil1: PCR bileşenleri ve PCR basamakları (denatürasyon, bağlanma, uzama) (22).

Rutin STR profillemesinin son adımı ise PCR sonrası kapiler elektroforez yöntemi ile analiz edilen DNA örneğinin boyutlarına göre ayrılması ve elde edilen ham verilerin yorumlanmasıdır. Kapiler elektroforez yöntemi ile STR bölgelerinin analiz edilmesi ilk kez 1992 yılında gerçekleştirilmiştir. Fakat, rutin olarak bu yöntemin kullanılması 2000’li yılların başına denk gelmektedir (23). Kapiler elektroforez yönteminde küçük DNA parçaları, büyük DNA parçalarına kıyasla kapilerde daha hızlı ilerlemektedir. Bu durum baz alınarak analiz edilen örnek, boyutlarına göre ayrılmaktadır. Yöntemin gerekli bileşenlerinden biri olan polimer çözeltisi cam kapilerin içerisinde bulunmaktadır ve her örneğin enjeksiyonunda değişmektedir. Bu polimerin görevi DNA’nın yürüdüğü ortamı sağlamaktır. Kapiler elektroforez yönteminin diğer bileşenleri tampon çözelti, elektrodlar, lazer uyarıcı ve floresan detektörüdür. Bunların haricinde enjeksiyon ve tespit kontrolü için bilgisayar gerekmektedir. Kapiler elektroforez, adli genetikte çokça kullanılmış olan agaroz jel elektroforez ile benzer bir prensipte çalışmaktadır. Fakat kapiler elektroforezin en büyük avantajı daha güçlü bir elektriksel alan uygulanması sebebiyle yürütmenin çok daha hızlı gerçekleştirilmesidir (24). PCR aşamasında farklı floresan boyalarla işaretlenen DNA örneği sisteme enjekte edildikten sonra argon iyon lazer ile uyarılmakta ve yansıyan floresanlar prizmadan geçtikten sonra renk ayrımı oluşmaktadır. CCD paneli ile kapilerin üzerindeki pencereden tespit yapılmakta ve analiz tamamlanmaktadır (10). Elde edilen ham verilerin yorumlanması uzmanlık ve tecrübe gerektirmektedir. Sistemin temsili görüntüsü Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2: Kapiler elektroforez sistemi (10).

Kapiler elektroforez ile STR bölgelerinin ayrımı gerçekleştirildikten sonra GeneMapperID yazılımı ile ham veriler analiz edilmektedir. Şekil 3'te verilen örnek incelendiğinde analiz sonucu STR bölgeleri hakkında elde edilen bilgilerin alel sayıları, pik yükseklikleri, homozigot/heterozigotluk durumu, boyutu (baz çifti) ve bağıl floresan birimi (RFU) olduğu görülmektedir (10).



Şekil 3: Gene Mapper ile elde edilmiş DNA profili örneği (10).

Rutin STR profillemesi süresi şu şekilde özetlenebilir; öncelikle olay yerinde bulunan biyolojik örnekten uygun yöntem ile DNA izolasyonu ve bu adımı takiben miktar tayini gerçekleştirilmektedir. Sonrasında PCR yöntemi ile DNA örneği çoğaltılmaktadır. Son adımda ise çoğaltılan STR bölgeleri kapiler elektroforezde boyutlarına göre ayrılarak analiz sonlandırılmaktadır. Nihayetinde, elde edilen veriler yorumlanarak sonuç raporu hazırlanmaktadır.

2.1.2. Popülasyon Genetiğinin Adli Bilimlerdeki Önemi

Adli bilimlerde laboratuvarındaki analizi takiben istatistiksel hesaplamalar yapılarak sonuç raporları hazırlanmaktadır. Suç davaları kapsamında analiz edilen delillerin ya da kimliklendirme ve ebeveynlik testlerinde alınan örneklerin her birinin değeri vakaya özgü hesaplanmaktadır. Yapılan istatistiksel hesaplamada, analiz edilen STR bölgelerinin popülasyondaki dağılımları baz alınmaktadır. Bir toplumda, kalıtsal varyasyonları analiz edebilmek ve bahsedilen dağılımları öğrenebilmek amacıyla popülasyon genetiği çalışmaları yürütülmektedir. Popülasyon genetiğinin temelini oluşturan matematiksel ifade Hardy-Weinberg (HW) dengesidir. Bu eşitlik; genetik sürüklenme, gen akışı (göç), doğal seçim, mutasyon ve rastgele olmayan çiftleşmenin gerçekleşmediği popülasyonlarda alel frekansının değişmeden sabit kaldığını ifade etmektedir. HW dengesinin gerektirdiği istatistiksel hesaplamalara göre incelenen popülasyonlar hakkında bilgi edinilmektedir. Bazı toplumlarda alt popülasyonlar görülebilmektedir. Büyük popülasyondaki gen akışının engellenmesiyle beraber alt popülasyon oluşumu gerçekleşebilir. Farklılaşmanın görüldüğü bir popülasyonda, ilgili alel frekansları göz önüne alınarak delil değeri doğru hesaplanmalıdır (25). Genetik farklılaşmanın analizi için farklı istatistiksel ifadeler kullanılabilmekle birlikte en sık tercih edilen Wright'ın fiksasyon indeksleri (F- istatistikleri)'dir (26).

F-istatistikleri sayesinde popülasyonlar arası ya da popülasyon içinde meydana gelen değişimler ölçülebilmektedir. Bu istatistiksel ifadelerden biri olan F_{st} , alt popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin popülasyonlardaki toplam çeşitliliğe oranını belirtmektedir. Bu değer 0 ile 0.05 aralığında ise alt popülasyon olmadığını, 0.05-0.15 arasında ise orta dereceli genetik farklılaşma olduğunu belirtirken 0.15 ile 0.25 arasında ise yüksek dereceli genetik farklılaşma olduğunu göstermektedir. Eğer F_{st} değeri 0.25'den büyük ise çok yüksek dereceli genetik farklılaşmanın popülasyonda görüldüğü anlaşılmaktadır (25.).

Türkiye popülasyonunda yürütülen bir çalışmada dokuz farklı bölge incelenerek F_{st} değerinin 0.05'den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Böylece, Türkiye'de alt popülasyonların delil değerinde değişiklik yaratacak kadar farklı olmadığı ifade edilmiştir (27). İncelenen bölge sayılarının artırılması ile literatüre kazandırılması adli bilimler açısından çok verimli olacaktır. Etnik grupların bulunduğu toplumlarda delil değerlendirmesini doğru yapmak için alt popülasyon varlığının tespit edilmesi çok önemlidir. Adli bilimler kapsamında buna örnek olarak Andrew J. Dayton davası verilebilir. Dayton bir etnik gruba mensuptur ve ait olduğu etnik gruba özgü bir veri tabanı ile değerlendirildiğinde, genel veritabanına göre analiz edildiği delil değerine kıyasla bir değişim görülmüştür. Yeni yapılan hesaplama göre analiz edilen delil, değerini 10.000 kat kaybetmiştir (25). Adli bilimler, adalete dolayısı ile suçsuz insanların masumiyetlerinin kanıtlanması ve suçluların gerekli cezayı almalarına hizmet etmektedir. Bu nedenle adli genetik kapsamında popülasyon genetiği çalışmaları çok önemlidir.

2.2. Kısa Ardışık Tekrarlar (STR'ler) ve Adli Bilimlerdeki Kullanımları

Kısa Ardışık Tekrarlar (STR'ler), insan genomunun yaklaşık %3'ünü oluşturan, 2-6 baz çifti uzunlukta, tekrarlı DNA dizileridir ve tekrar birimlerinin sayısı bireyler arası oldukça değişken olduğundan yüksek ayırım gücü sağlayan biyobelirteçlerdir. (28). İnsan genomunda yer alan STR bölgelerinden bazıları adli analizlerde kullanılmaktadır (29). Dörtlü tekrarlar, adli bilimlerde en sık tercih edilen STR tekrarlarıdır.

Ek olarak bazı durumlarda üçlü ya da beşli STR tekrarları da analiz edilebilmektedir. Adli bilimlerde kullanılan STR sistemlerinin sahip olduğu özellikler güçlü amplifikasyon, tekrar birimlerinin düzenli olması, yüksek heterozigotluk ve alellerin ayırt edilebilir olmasıdır. STR bölgeleri bireyler arası değişkenlik gösterebilir de kalıtsal olarak Mendel genetiğine uymaları ebeveynlik testlerinde çok kullanışlıdır (30). Bu testlere ek olarak adli bilimler kapsamında olay yerindeki delillerin kurban ya da şüpheliler ile eşleştirilmesi ya da dışlanması, bireylerin kimliklendirilmesi gibi farklı genetik analizlerde STR'lerden yararlanılmaktadır. Bu çalışmalarda ayırım gücü yüksek STR bölgeleri tercih edilmelidir. Düşük ayırım gücüne sahip STR bölgelerinin çalışmadan dışlanması ya da destekleyici STR bölgelerinin çalışmaya dahil edilmesi gerekmektedir (30).

Bir başka genetik belirteç olan tek nokta polimorfizmleri (SNP) adli bilimlerde sıklıkla kullanılan biyobelirteçlerdendir. Fakat SNP'ler, STR'ler gibi tek başına kimliklendirme için tercih edilmemektedirler. Bunun nedeni SNP'lerin STR'ler kadar polimorfik olmamalarıdır. Adli bilimlerde ayırım gücü oldukça önemli bir kavramdır ve STR'lerin sağladığı güçlü ayırım gücünü SNP'ler tek başına sağlayamamaktadır. 13-15 STR ile elde edilen ayırım gücünü SNP'lerle sağlamak için 40-60 SNP bölgesinin çalışılması gerekmektedir. Buna ek olarak SNP bölgelerinin alellerinin STR bölgelerinin alellere kıyasla kısıtlı sayıda olmaları, karşım örneklerin ayırt edilmesinde onları dezavantajlı konuma getirmektedir (31).

Adli bilimlerde kullanılan STR bölgeleri, ülkelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, NIST'in sağladığı bilgilere göre Birleşik Krallık tarafından kullanılan çekirdek (core) lokuslar (SGM Plus kit); FGA, TH01, vWA, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11 ve amelogeninden Almanya tarafından kullanılan çekirdek lokuslar; FGA, TH01, SE33, vWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 ve amelogenindir. Interpol'un kullandığı standard lokus seti FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 olmakla beraber amelogenin opsiyonel olarak incelenen bir lokustur.

Yukarıda sayılan ülkelere kıyasla, Birleşik Devletler'deki CODIS sisteminde ve Avrupa Standart Seti (ESS)'nde daha fazla çekirdek STR bölgesi incelenmektedir (32).

CODIS sisteminde 1997 yılından itibaren kullanılan CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 ve amelogenin lokuslarına 2017 yılında 7 yeni STR bölgesi (D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045) eklenerek incelenen lokus sayısı toplam 20'ye yükselmiştir. Avrupa Standart Setinde ise FGA, TH01, VWA, D1S1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11, D22S1045 lokusları tercih edilmekle beraber Avrupa'daki STR kitlerinin bir kısmının eklenmesiyle D2S1338, D16S539, D19S433, SE33, amelogenin lokusları da çalışılabilmektedir (32). Çalışılan STR bölgelerinin sayıca fazla olması kişilerin kimliklendirilmesindeki özgüllüğü artıracığından adli bilimlerde oldukça önemlidir.

2.3. Doğrulama (Validasyon) ve Akreditasyon

Bir adli laboratuvarında çalışmayı yürüten analistin iş kalitesi yeterlilik testleri ile doğrulanırken, kullanılan araç gereçlerin ve yöntemlerin doğrulanması ise validasyon aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Validasyon, laboratuvar prosedürünün kuvvetli (çoğu zaman sağlanan yüksek başarı yüzdesi), güvenilir (sonuçların kesin olması ve örneğin doğru yansıtılması) ve laboratuvarında testi yürüten personelin ellerinde tekrarlanabilir (örnek her test edildiğinde aynı ya da çok yakın sonuçların elde edilmesi) olmasının gösterilmesidir. Bahsedilen bu üç özellik adli laboratuvarlarda yürütülen hassas çalışmalarda oldukça önemlidir (24). Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) 17025 standardının 5.4.5.1. Bölümünde validasyon, özel bir kullanım amacı için belirli gerekliliklerin yerine getirildiğine dair nesnel kanıtın karşılanması ve inceleme yoluyla doğrulanması olarak tanımlanmıştır (33). Ek olarak, validasyon, FBI Kalite Güvencesi Standartları (QAS) tarafından, adli vaka analizinin güvenilirliğini ve verimliliğini belirlemek için bir prosedürün değerlendirildiği süreç olarak tanımlanmaktadır (34).

Adli bilimlar laboratuvarlarının genel validasyonuna ek olarak kitlerin ve yöntemlerin de doğrulanması oldukça önemlidir. Kullanılan kitlerin güvenilir ve güçlü olması aranılan özelliklerdendir. Bu nedenle kitler geliştirilirken validasyon çalışmalarının uygun şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. 16-lokus çoğaltma kapasiteli Identifiler Plus PCR Kiti (35) ve 24-lokus çoğaltma kapasiteli Globalfiler PCR Kiti (36)'nin gelişimsel validasyonları literatürde yer almaktadır.

PCR basamağındaki kontaminasyondan kaçınmak ve kalitenin devamlılığını sağlamak için bir takım laboratuvar kuralları bulunmaktadır. PCR analizinin gerçekleştirildiği ortamın dış etkenlere karşı korunaklı olması gerekmektedir. Ultraviyole (UV) lambaya sahip laminar akış kabini, PCR işleminin gerçekleştirilmesi için en uygun alan olmakla birlikte analizin örnek hazırlama kısmında kullanılan eldiven, mikrosantrifüj, pipet gibi gereçlerin de bu kabin içerisinde bulunması gerekmektedir. Pipet uçları ya da tüplerin tek kullanımlık tercih edilmesi de önemli bir noktadır. Ek olarak, PCR'da kullanılacak reaktiflerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin işlem öncesi yaklaşık 10 saniye santrifüjlenmesi, sıvının tüpün alt kısmına inmesini ve dolayısıyla kontaminasyondan kaçınılmasını sağlayacaktır (37).

2.4. AmpF/STR™ Identifiler™ Plus PCR Kiti

AB Identifiler Plus Kiti (The AmpF/STR Identifiler Plus Kit) AB Identifiler kiti ile aynı lokus sayısına (16-lokus multipleks) ve ayırım gücüne sahiptir. Plus kitin bir önceki kite (The AmpF/STR Identifiler Kit) kıyasla hassasiyeti ve sağlamlığı geliştirilmiştir. Yenilenmiş Plus kitin PCR döngü koşulları modifiye edilmiş, böylelikle hassasiyeti artırılmıştır. Buna ek olarak, inhibe edilmiş örneklerin performansını geliştirmek için yenilenmiş bir tampon formülasyonu kullanılmıştır. Son olarak, daha temiz bir elektroforetik arka plan elde etmek adına primerlerin DNA sentezi ve amplifikasyon primerlerinin saflaştırılması için geliştirilmiş bir işlem kullanılmıştır (38).

AmpF/STR™ Identifiler™ Plus PCR Kiti, 15 tetranükleotid tekrar bölgesi ve cinsiyet belirleyici bir biyobelirteç olan Amelogeninin tek bir PCR reaksiyonunda çoğaltılmasını sağlayan bir kittir. Bu PCR kiti dahilinde çoğaltılan lokuslar şu şekildedir; D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA. 5 floresan boya işaretli olarak geliştirilen bu PCR sistemi sisteminde kullanılan boyalar 6-FAM™ (mavi), VIC™ (yeşil), NED™ (sarı), PET™ (kırmızı)'dir. İç standardın işaretlenmesinde ise tercih edilen LIZ™ (turuncu)'dir. 6-FAM™ boyası ile işaretlenen lokuslar D8S1179, D21S11, D7S820 ve CSF1PO'dur. VIC™ boyası ile işaretlenen lokuslar D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 ve D2S1338'dir. NED™ boyası ile işaretlenen lokuslar D19S433, vWA, TPOX ve D18S51'dir. PET™ boyası ile işaretlenen lokuslar Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır. PCR kiti dahilindeki PCR Master Mix içeriğinde enzim, tuzlar, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), taşıyıcı protein ve 0.04% sodyum azid bulunmaktadır (38). Her bir lokus için hangi alellerin dahil olduğu Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: The AmpF/STR Identifiler Plus Kiti'ndeki STR bölgelerinin çoğaltılabilen alelleri (38).

Lokus	Lokus Dahilindeki Aleller
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38
D7S820	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D3S1358	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
TH01	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3

D13S317	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D2S1338	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D19S433	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2
VWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
TPOX	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
Amelogenin	X, Y
D5S818	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
FGA	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2

2.5. GlobalFiler PCR Kiti

GlobalFilerTM PCR Kiti, Thermo Fisher Scientific tarafından geliştirilmiş bir PCR kitidir. Toplamda 24 lokusu çoğaltılması için tasarlanan kit dahilindeki lokuslar şu şekildedir; D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33, DYS-391, Y-INDEL. Girdi olarak kit üreticisi tarafından tavsiye edilen DNA miktarı 0.5ng-1.5 ng insan DNA'sıdır. Fakat 0.5ng'dan az insan DNA'sı içeren örneklerin de tiplenebildiğini belirtmişlerdir (39).

6 floresan boya işaretli olarak geliştirilen bu PCR sistemi sisteminde kullanılan boyalar 6-FAMTM (mavi), VICTM (yeşil), NEDTM (sarı), TAZTM (kırmızı), ve SIDTM (mor)'dir. İç standardın işaretlenmesinde ise tercih edilen LIZTM (turuncu)'dir 6-FAMTM boyası ile işaretlenen lokuslar; D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO ve TPOX'dur. VICTM boyası ile işaretlenen lokuslar; Y indel, Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 ve DYS391'dir. NEDTM boyası ile işaretlenen lokuslar; D2S441, D19S433, TH01 ve FGA'dır. TAZTM boyası ile işaretlenen lokuslar; D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820 ve SE33'tür. SIDTM boyası ile işaretlenen lokuslar; D10S1248, D1S1656, D12S391 ve D2S1338'dir. PCR kiti dahilindeki Master Mix içeriğinde MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, sığır serum albümin, 0.05% sodyum azid ve enzim içerikli tampon ve tuz bulunmaktadır (39). Her bir lokus için hangi alellerin dahil olduğu Tablo II'de görülmektedir.

Tablo II: GlobalFiler PCR Kiti'ndeki STR bölgelerinin çoğaltılabilen alelleri (39).

Lokus	Lokus Dahilindeki Aleller
D8S1179	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38
D7S820	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D3S1358	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
TH01	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3
D13S317	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

D2S1338	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D19S433	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2
VWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
TPOX	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
Amelogenin	X, Y
D5S818	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
FGA	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2
Y-INDEL	1, 2
DYS391	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D2S441	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D22S1045	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
SE33	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37
D10S1248	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D1S1656	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3

D12S391	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
----------------	---

2.6. HUMDNA Typing Kit (Yan Huang)

Çin menşeli bir PCR kiti olan HUMDNA TYPING (Yanhuang) kiti, 28 STR lokusunun çoğaltılabilmesine imkân tanımaktadır. Kit dâhilindeki 28 STR lokusu; Y-INDEL, AMEL, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, SE33, D10S1248, D5S818, D21S11, TPOX, D1S1656, D6S1043, DXS6795, D19S433, D22S1045, D8S1179, Penta E, D2S441, DYS391, D12S391, D2S1338, vWA, Penta D, TH01, D18S51, CSF1PO ve FGA'dır. Analiz edilecek olan kit, zorlu adli örneklerde kullanılabilecek şekilde ve 6 floresan boya işaretli STR çoklu PCR sistemi olarak geliştirilmiştir. Y-INDEL, AMEL, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, SE33 lokusları kit dahilinde FAM boya türü ile mavi renkle işaretlenmiştir. D10S1248, D5S818, D21S11, TPOX, D1S1656, D6S1043 lokusları kit dahilinde HEX boya türü ile yeşil renkle işaretlenmiştir. DXS6795, D19S433, D22S1045, D8S1179, Penta E, DYS391 lokusları kit dahilinde YTAM boya türü ile sarı renkle işaretlenmiştir. D2S441, D12S391, D2S1338, vWA, Penta D lokusları kit dahilinde FSID boya türü ile kırmızı renkle işaretlenmiştir. Son olarak TH01, D18S51, CSF1PO, FGA lokusları kit dahilinde FTAZ boya türü ile mor renkle işaretlenmiştir. Üretici tarafından, mevcut kullanılan araç platformlarıyla uyum göstermekte olduğu ve 28 lokus içeren bu kitin babalık testi, bireysel kimliklendirme ve veri tabanı oluşturulmasında kullanılabileceği ifade edilmiştir (40). HUMDNA Typing Yan Huang PCR Kitinin birçok lokus standardıyla (Genişletilmiş Birleşik Devletler Çekirdek Lokusları, Avrupa Standart Seti, Birleşik Krallık Çekirdek Lokusları, Alman Çekirdek Lokusları, İnterpol Standart Lokus Setleri) yüksek uyumluluk göstermesi bu kitin önemli özelliklerindendir. Yüksek uyumluluk gösterdiği lokus standartları ve ilgili lokuslar Tablo III'de görülmektedir.

Tablo III: Farklı lokus standartları ve içerdikleri STR bölgeleri (40).

Lokus Standartı	Lokuslar
Genişletilmiş Birleşik Devletler Çekirdek Lokusları	CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045, Amelogenin
Avrupa Standart Seti	FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045, SE33, Amelogenin
Birleşik Krallık Çekirdek Lokusları	FGA, TH01, VWA, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenin
Alman Çekirdek Lokusları	FGA, TH01, SE33, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, Amelogenin
İnterpol Standart Lokus Setleri	FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, Amelogenin

Bunlara ek olarak kitin, 20 lokus içeren Halk Güvenliği Veritabanı Lokusları ile de uyumluluk gösterdiği belirtilmiştir. Yüksek uyumluluk özelliğine ek olarak tek seferde 28 lokus tespit edilebilmesi; Asya, Avrupa, Afrika dahil farklı popülasyonlara uygulanabilir olması ve evrensel popülasyonlarla uyum göstermesi; 90 dakikada tüm PCR sürecini tamamlayarak yüksek verimlilik ve doğruluk sağlaması; insan kan lekeleri, tükürük, saç folikülleri gibi çeşitli biyolojik materyallerden DNA'nın çoğaltılmasına izin verecek şekilde kolay uygulanabilir olması kitin avantajlarından. Adli bilimler dahilinde önemli parametrelerden olan ayırım gücü ve dışlama gücü hakkında bilgi edinmek için yapılan analizler sonucunda kit üreticisinin elde ettiği bilgiler Tablo IV'de görülmektedir (40). Tablo verilerine bakıldığında, diğer kitlere kıyasla HumDNA Typing Yan Huang PCR kitinin hem kümülatif ayırım gücü hem de kombine dışlama gücü parametrelerinde en önde olduğu görülmektedir. Bireylerin kimliklendirilmesinde sıklıkla kullanılan DNA profillemesi süresince yüksek ayırım gücüne sahip lokusların tercih edilmesi gerekmektedir. Buna ek olarak bir karışımda bulunan aleller göz önüne alındığında, karışıma katkıda bulunan rastgele bir adamın hariç tutulma olasılığı olarak değerlendirilen dışlama gücü de adli bilimlerdeki önemli parametrelerdendir (41).

Tablo IV: Farklı PCR kitlerinin kümülatif ayırım gücü ve kombine dışlama güçleri (40).

Kitler	CDP (Kümülatif ayırım gücü)	CPE (Kombine dışlama gücü)
HumDNA Typing Kit (Yan Huang)	$1-3.53e^{-29}$	0.9999999999
AB Huaxia Platinum	$1-2.13e^{-27}$	0.9999999999
AB Globalfiler	$1-1.96e^{-24}$	0.9999999999
Promega PowerPlex21	$1-2.77e^{-24}$	0.9999999999
AB İdentifiler	$1-6.65e^{-17}$	0.999999

Günümüzde sınırlı sayıda çalışmada kullanılmış olan bu kitin yeni ülke popülasyonlarında incelenmesi oldukça önemlidir. Böylelikle veri analizlerine dayanarak incelenen ülke popülasyonu hakkında daha fazla bilgi edinilecek ve istatistiksel programlar kullanılarak ülkeler arası popülasyon karşılaştırmaları daha detaylı yapılabilecektir. Bu karşılaştırmalar ile popülasyonlar arası genetik mesafe hesabı yapılabildiği gibi filogenetik ağaçlar oluşturularak popülasyonların coğrafi dağılımı hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabilmektedir (42). İncelediğimiz kitin içeriğinde Identifiler Plus kitinden 12, Globalfiler kitinden ise farklı 4 lokus bulunmaktadır. Bu sayede hem bireysel olarak hem de popülasyonlar arası daha fazla bilgi edinilebilmektedir. Tez kapsamında karşılaştırması yapılan üç farklı PCR kiti ile çoğaltılabilen STR lokusları Tablo V’de görülmektedir.

Tablo V: Identifiler Plus/GlobalFiler/HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti dahilinde çoğaltılabilen STR bölgeleri (38, 39, 40).

LOKUS	PCR KİTİ		
	IDENTIFILER PLUS	GLOBALFILER	HUMDNA YANHUANG
D8S1179	+	+	+
D21S11	+	+	+
D7S820	+	+	+
CSF1PO	+	+	+
D3S1358	+	+	+
TH01	+	+	+
D13S317	+	+	+
D16S539	+	+	+
D2S1338	+	+	+

D19S433	+	+	+
vWA	+	+	+
TPOX	+	+	+
D18S51	+	+	+
Amelogenin	+	+	+
D5S818	+	+	+
FGA	+	+	+
D10S1248	-	+	+
D22S1045	-	+	+
D2S441	-	+	+
D1S1656	-	+	+
D12S391	-	+	+
SE33	-	+	+
DYS391	-	+	+
Y-INDEL	-	+	+
D6S1043	-	-	+
DXS6795	-	-	+
Penta E	-	-	+
Penta D	-	-	+

Yapılan literatür taramasında bu kitin iki çalışmada kullanıldığı görülmektedir ve bunlardan ilki varsayılan ebeveynlerin olmadığı durumlardaki babalık testlerinde, STR kullanımına alternatif olarak bir SNP panelinin değerlendirildiği bir çalışmanın yakın akraba örneklerinin çoğaltılmasıdır (43). Diğer çalışma ise literatürde popülasyon geneli alel frekanslarının değerlendirildiği tek çalışma olmakla birlikte bu çalışmada Afrika'nın en küçük ülkelerinden bir olan Ruanda'da kit içeriğindeki 24 otozomal STR lokusunun analizi yapılmıştır (44).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar, Yararlanılan Ticari Kitler ve Kullanılan Sarf Malzemeleri

Cihazlar

- Genetik analizör-8 kapilerli (ABI 3500)
- Qubit Florometre (Invitrogen™)
- Termal Döngüleyici-PCR (Veriti 96 well thermal cycler)
- Isıtıcı blok (Eppendorf)
- Mini santrifüj (A&E Lab UK)
- Vorteks (A&E Lab UK)
- Otomatik Pipet Seti (Eppendorf) (0.1µl-2.5 µl, 2.5 µl-20 µl, 10 µl-100µl, 100 µl- 1000µl)

Ticari Kitler ve Sarf Malzemeleri

- DNA izolasyon kiti (Qiagen Mini QIAamp®)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™)
- HumDNA Typing Yan Huang PCR Kiti
- Identifiler Plus PCR Kiti
- GlobalFiler PCR Kiti
- Salmon 500
- GeneScan™500 LIZ®
- GeneScan™600 LIZ®
- POP-4 Polimer (ThermoFisher Scientific)
- 36 cm Kapiler (ThermoFisher Scientific)

- 96- well plate septa (ThermoFisher Scientific)
- 96-well optik reaksiyon plate (MicroAmp-ThermoFisher Scientific)
- Etanol (%96-100)
- Filtreli pipet ucu (0.1-10 µl, 1-20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Genetik analizör tampon çözeltisi (10X Buffer with EDTA- ThermoFisher Scientific)
- Hi-DiFormamid (ThermoFisher Scientific)
- Mikro-santrifüj tüpü (1.5ml, 2 ml)
- PCR tüpü (0.2 ml)
- Tek kullanımlık eldiven

3.2. DNA'nın silika yöntemi ile çekitlenmesi

Tez çalışması kapsamında DNA çekitlemesi için QiaAmp mini kit tercih edildi. Öncelikle 18 yaş üstü, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 40 gönüllüden onayları sonrası alınmış swap örneklerinin pamuklu uçları her biri 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerlerine 180µl ATL tamponu eklendi. Daha sonra örnekler 85°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 20µl proteinaz K eklenerek karışım vortekslendi ve 56°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200µl AL tamponu eklenerek vortekslendi ve 70°C' de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası % 96-100 saflıktaki etanolden 200µl eklenip vortekslendi. Elde edilen karışım, QIAamp® mini spin kolona aktarılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında AW1 tamponundan 500µl eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın bulunduğu tüp atıldı ve steril bir mikrosantrifüj tüpü kolonun altına yerleştirildi. Sonrasında AW2 tamponundan 500µl eklenerek 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın bulunduğu tüp atıldı ve 2 mL'lik steril bir mikrosantrifüj tüpü kolonun altına yerleştirildi ve 150µl AE tamponu eklendi. Örnekler oda ısısında 1-2 dakika inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Örnekler miktar tayini yapılana kadar -20°C'de saklandı.

3.3. DNA'nın florometrik yöntemle miktar tayini

Gönüllülerden onayları sonrası alınmış swap örneklerinden QiaAmp mini kit ile izole edilen DNA örneklerinin miktar tayini florometrik yöntemle değerlendirme yapan Qubit® florometre ile ölçüldü ve Quant-iT™ dsDNA Assay Kit [High Sensitivity (HS)] kullanıldı. Miktar tayini yapılacak her bir örnek için 199 µl buffer ve üzerine 1 µl kit reagent eklendi. (Buffer-reagent karışımının miktarı; 2 adet standart + örnek sayısı göz önünde tutularak hazırlandı.) Cihazı kalibre etmek adına cihaza özgü 1. tüpe tampon-reagent karışımından 190 µl konuldu ve üzerine 10 µl Standart 1 eklendi. Sonrasında cihaza özgü 2. tüpe tampon-reagent karışımından 190 µl konuldu ve üzerine 10 µl Standart 2 eklendi. Örnekler için ise tampon-reagent karışımından cihaza özgü tüpe 190 µl konuldu ve üzerine DNA izolatından 10 µl eklenerek tüpler vortekslendi. Miktar tayini yapılacak DNA izolatları çift zincirli olduklarından oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildiler. Kalibrasyon işlemi için Standart 1 ve Standart 2 sırasıyla okutuldu. Sonrasında her bir örnek tüpü cihaza yerleştirilerek DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı. Elde edilen veriler Microsoft Excel'de tablo haline getirildi (Tablo XIII).

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Gönüllü Olur Formunu dolduran 40 gönüllüden alınan örnekler sonrasında gruplandırılmıştır. Yapılacak karşılaştırma için 30 örnek, 3.4.1'deki protokole uygun şekilde HUMDNA YanHuang PCR kiti ile çoğaltılmıştır. Aynı 30 örnek sonrasında 3.4.2'deki protokole uygun şekilde GlobalFiler PCR kiti ve 3.4.3'deki protokole uygun şekilde Identifiler Plus PCR kiti ile çoğaltılmıştır. Toplamda 90 örnek için PCR analizi yapılmıştır. Kalan 10 örnek ise farklı oranlarda hazırlanan PCR karışımlarının test edilmesi amacıyla her bir karışım oranı için 10 örnek olacak şekilde 3 kez (toplam 30 örnek) çalışılmıştır. Genel toplama bakıldığında 40 farklı gönüllüden alınan örnekler farklı analizlerde 120 kez çoğaltılmıştır.

3.4.1. HUMDNA YanHuang PCR kiti ile PCR

HUMDNA Typing YanHuang PCR kiti ile çoğaltılacak her bir örneğe ait miktarlar Tablo VI'daki gibidir. Bu kitin farklı DNA miktarlarındaki performansını ölçmek istediğimiz için örnekler her dilüsyona göre ayrı ayrı hazırlanmıştır. Tam reaksiyon ve 1/2.5 reaksiyon karışımlarının miktarları kit rehberinden alınmıştır. Buna ek olarak kit performansını görmek adına 1/5 reaksiyon da test edilmiştir. Her bir karışım oranı için 10 örnek olacak şekilde 10 farklı kişiye ait örnekler 3 kez (toplam 30 örnek) çalışılmıştır. Diğer iki kit ile yapılacak karşılaştırma için örnekler tam reaksiyon oranında hazırlanmıştır.

Tablo VI: HUMDNA Typing YanHuang PCR kiti bileşenleri ve reaksiyon oranına göre gerekli olan miktarları.

	Miktar (μl) (1)	Miktar (μl) (1/2.5)	Miktar (μl) (1/5)
PCR Master Mix	12.5	5	2.5
Primer Set	5	2	1
DNA (0.1-2ng)	2.5	1	0.5
Nükleaz İçermeyen Su	5	2	1
Son Reaksiyon Hacmi	25	10	5

Farklı oranlarda analiz edilecek olan her bir örnek için uygun miktarda PCR Master Mix ve Primer Set karışımı hazırlanmıştır. Örnek sayısına göre karışım hazırlandıktan sonra kısa bir santrifüj yapılmıştır. Daha sonra elde edilen karışımdan her bir PCR tüpüne uygun miktarlarda (Tam reaksiyon örnekleri için 17.5μl, 1/2.5 reaksiyon için 7μl, 1/5 reaksiyon için 3.5μl) dağıtılmıştır. Sonrasında her bir tüpe uygun miktarda (Tam reaksiyon örnekleri için 2.5μl, 1/2.5 reaksiyon için 1μl, 1/5 reaksiyon için 0.5μl) DNA izolatu (0.05-0.125ng/μl) eklenmiştir.

Negatif kontrol için DNA yerine aynı miktarda düşük-TE tamponu eklenmiştir. Pozitif kontrol için ise DNA profili bilinen bir örnek seçilmiştir. Son reaksiyon hacmi tam reaksiyon, 1/2.5 reaksiyon, 1/5 reaksiyon için sırasıyla 25, 10 ve 5 µl olup eksik sıvı hacmi nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır (Tam reaksiyon örnekleri için 5µl, 1/2.5 reaksiyon için 2µl, 1/5 reaksiyon için 1µl). Kısa bir santrifüj işleminin ardından tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve Tablo VII'deki parametreler ayarlanarak analiz başlatılmıştır.

Tablo VII: HUMDNA Typing-YanHuang PCR kiti döngü parametreleri.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95	5 dakika	
Denatürasyon	95	10 saniye	28
Bağlanma	58	1 dakika	
Uzama	70	20 saniye	
Son Uzama	60	30 dakika	
Son Bekleme	4	∞	

3.4.2. GlobalFiler kiti ile PCR

HUMDNA Typing YanHuang PCR kiti ile Globalfiler PCR kitini karşılaştırmak için çoğaltılacak her bir örneğe ait miktarlar Tablo VIII'deki gibi olacak şekilde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo VIII: GlobalFiler PCR kiti bileşenleri ve gerekli olan miktarları.

	Miktar (µl)
Master mix	7.5
Primer Set	2.5

Örnek sayısına göre karışım hazırlandıktan sonra kısa bir santrifüj yapılmıştır. Daha sonra elde edilen karışımdan her bir PCR tüpüne 10 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve devamında her bir tüpe 15 µl DNA izolatu eklenmiştir. Negatif kontrol için DNA yerine aynı miktarda (15 µl) düşük-TE tamponu eklenmiştir. Pozitif kontrol için ise 10 µl kontrol DNA (0.1 ng/µl) ve 5 µl düşük-TE tamponu eklenmiştir.

Son reaksiyon hacmi her bir örnek için toplam 25µl'dir. Kısa bir santrifüj işleminin ardından (3000 rpm, 20 saniye) tüpler Veriti PCR cihazına yerleştirilmiş ve Tablo IX'daki parametreler ayarlanarak analiz başlatılmıştır.

Tablo IX: Globalfiler PCR döngü parametreleri.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95	1 dakika	
Denatürasyon	94	10 saniye	29
Bağlanma/Uzama	59	90 saniye	
Son Uzama	60	10 dakika	
Son Bekleme	4	24 saate kadar	

3.4.3. Identifiler Plus kiti ile PCR

HUMDNA Typing YanHuang PCR kiti ile Identifiler Plus PCR kitini karşılaştırmak için çoğaltılacak her bir örneğe ait miktarlar Tablo X'daki gibi olacak şekilde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo X: Identifiler PCR kiti bileşenleri ve gerekli olan miktarları.

	Miktar (μl)
AmpF λ STR™ Identifiler Plus Master Mix	10.0
AmpFISTR Identifiler Primer Set	5.0

Örnek sayısına göre karışım hazırlandıktan sonra 3 saniye kısa bir santrifüj yapılmıştır. Daha sonra elde edilen karışımdan her bir PCR tüpüne 15 μl olacak şekilde dağıtılmıştır ve devamında her bir tüpe 10 μl DNA izolatu (0.1ng/μl) eklenmiştir.

Negatif kontrol için DNA yerine aynı miktarda (10 μl) düşük-TE tamponu (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) eklenmiştir. Pozitif kontrol için ise 10 μl kontrol DNA (0.1 ng/μl) eklenmiştir. Son reaksiyon hacmi her bir örnek için toplam 25μl'dir. Kısa bir santrifüj (3000 rpm, 20 saniye) işleminin ardından tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve Tablo XI'deki parametreler ayarlanarak analiz başlatılmıştır.

Tablo XI: Identifiler Plus PCR döngü parametreleri.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95	11 dakika	
Denatürasyon	94	20 saniye	28
Bağlanma/Uzama	59	3 dakika	
Son Uzama	60	10 dakika	
Son Bekleme	4	24 saate kadar	

3.5. Kapiler Elektrophorez ile Örneklerin Yürütülmesi

3.5.1. Uygun İç Standart Belirlenmesi (Salmon500/LIZ500/LIZ600 Karşılaştırması)

Tüm örnekler yürütülmeden önce hangi iç standart ile daha iyi analiz yorumu yapılabildiğini görmek adına LIZ 500, LIZ 600 ve kit dahilindeki Salmon 500, karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmayı yapmak adına yürütmede kullanılan karışım, 4 farklı kişiye ait örnekler ile üç set iç standart örneği hazırlanmıştır. İlk set için karışım 9,6µl Hi-Di Formamid ve 0.4µl Salmon 500, ikinci set için 8,7µl Hi-Di Formamid ve 0.3µl LIZ 500, üçüncü set için 9,6µl Hi-Di Formamid ve 0.4µl LIZ 600 kullanılmıştır.

Toplamda 4 farklı kişi için hazırlanan 12 karışım daha sonrasında her biri 9µl olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılmıştır. Bir sonraki adımda 9µl karışımın üzerine 1µl DNA eklenerek karışımlar, PCR cihazında 95°C'de 3 dakika denatüre edilmiştir. Denatürasyonu takiben örnekler 3 dakika buzda bekletildikten sonra kapiler elektrophorez cihazına yüklenerek analiz yapılmıştır. Analiz sonucu LIZ600 ile daha iyi sonuç alındığı fark edilerek tüm tez örneklerinde LIZ600 kullanılmaya karar verilmiştir.

3.5.2. Tez Örneklerinin Analizi

GlobalFiler PCR kiti ile çoğaltılmış analiz edilecek her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol için 9,6µl Hi-Di Formamid ve 0.4µl LIZ 600 ile bir karışım hazırlanmıştır ve bu karışım her birinde 10 µl olacak şekilde tüplere eklenmiştir. Identifiler Plus PCR kiti ile çoğaltılmış analiz edilecek her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol için 8,7µl Hi-Di Formamid ve 0.3µl LIZ 500 ile bir karışım hazırlanmıştır ve bu karışım her birinde 9 µl olacak şekilde tüplere eklenmiştir. HumDNA Typing Yanhuang PCR kiti ile çoğaltılmış analiz edilecek her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol için 9,6µl Hi-Di Formamid ve 0.4µl LIZ 600 ile bir karışım hazırlanmıştır ve bu karışım her birinde 10 µl olacak şekilde tüplere eklenmiştir.

Daha sonra tüplerin her birine PCR ürününden 1 µl eklenerek homojen bir karışım elde etmek için pipetaj işlemi yapılmıştır. Örnekler, PCR cihazında 95°C’de 3 dakika denatüre edilmiştir. Denatürasyonu takiben örnekler 3 dakika buzda bekletildikten sonra karışım, örnek tepsisine plaka üzerinde uygun numaralı kuyucuğa aktarılmış ve hava kabarcığı kontrolü yapılmıştır. Son olarak plaka, genetik analizöre (ABI 3500) yerleştirilerek uygun parametreler (Tablo XII) ayarlanmış ve analiz gerçekleştirilmiştir. Örneklerin elektroforezi 36'lik kapiler ve POP4 polimer kullanılarak yapılmıştır.

8 kapilerli ABI 3500 genetik analizör cihazında elektroforez yapılarak Identifiler Plus PCR Kiti ile çoğaltılan örneklerde D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA lokusları tiplendirilmiştir. GlobalFiler PCR Kiti ile çoğaltılan örneklerde D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33, DYS-391, Y-INDEL lokusları tiplendirilmiştir.

HUMDNA TYPING (Yanhuang) PCR kiti ile çoğaltılan örneklerde Y-INDEL, AMEL, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, SE33, D10S1248, D5S818, D21S11, TPOX, D1S1656, D6S1043, DXS6795, D19S433, D22S1045, D8S1179, Penta E, D2S441, DYS391, D12S391, D2S1338, vWA, Penta D, TH01, D18S51, CSF1PO ve FGA lokusları tiplendirilmiştir. Elektroforez parametreleri Tablo XII’de görülmektedir.

Tablo XII Elektroforez parametreleri.

Enjeksiyon Süresi	15 sn
Enjeksiyon Voltajı	1.2 kV
Yürütme Süresi	1210 sn
Yürütme Sıcaklığı	60°C

Yürütme Voltajı	15kV
Matriks	G5
Boya Seti	FGI_6dye

3.6. Elektroforez verilerinin analizi

8 kapilerli yürütme sağlayan ABI 3500 genetik analizör cihazında elektroforez yapıldıktan sonra elde edilen ham verilerin görüntülenerek tiplendirilmesi GeneMapper 5 analiz programı kullanılarak tamamlanmıştır. Bu amaçla, yeni bir proje programda oluşturularak panel ve bin setleri oluşturulmuştur. Yürütme sonrası elde edilen veriler eklenerek PCR ürünleri ve alelik merdivenin karşılaştırılması sonucu tiplendirme yapılmıştır. Ek olarak, bulgular bölümünde yer alan elektroferogram görüntüleri alınarak analizler sonlandırılmıştır.

4. Bulgular

4.1. Miktar Tayini Verileri

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvarında Quant-iT™ dsDNA Assay Kit [High Sensitivity (HS)] kullanılarak gerçekleştirilen miktar tayini neticesinde 40 farklı kişiye ait örneklerden elde edilen miktar tayini sonuçları Tablo XIII’de görülmektedir.

Tablo XIII: Miktar tayini analizi sonuçları.

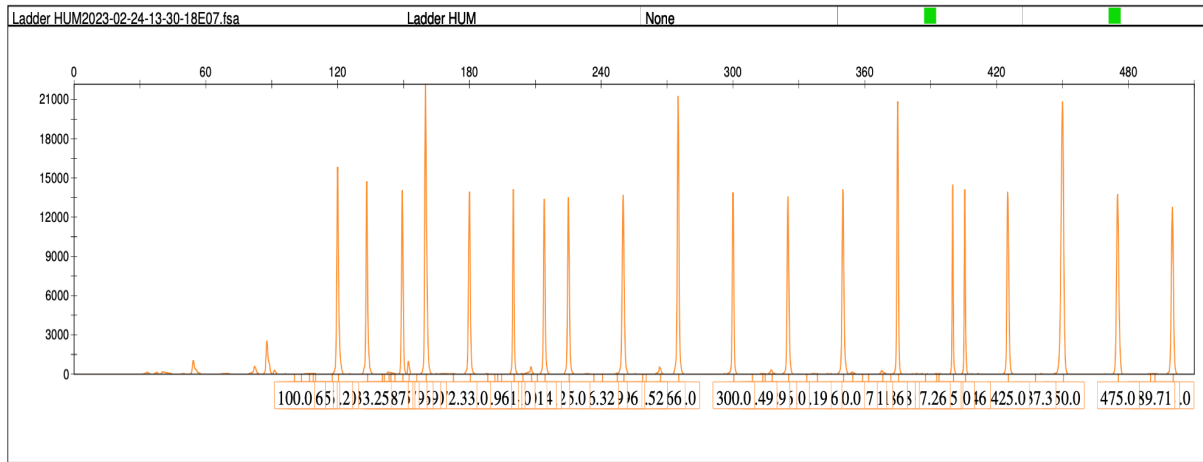
Örnek Numarası	Miktar Tayini (ng/μL)
1	2,54
2	5,1
3	7,33
4	4,47
5	6,16
6	7,68
7	10
8	7,57
9	7,63
10	7,54
11	8,86
12	7,89
13	7,82
14	8.42

15	6.19
16	2.32
17	18.8
18	10.3
19	6.62
20	46.6
21	56
22	21
23	24
24	12.7
25	15
26	23.8
27	23.6
28	23
29	28.6
30	6.47
31	3.31
32	4.41
33	6.1
34	8.82
35	11
36	7.22
37	4.52
38	3.36

39	9
40	3.1

4.2. Salmon500/LIZ500/LIZ600 Karşılaştırması

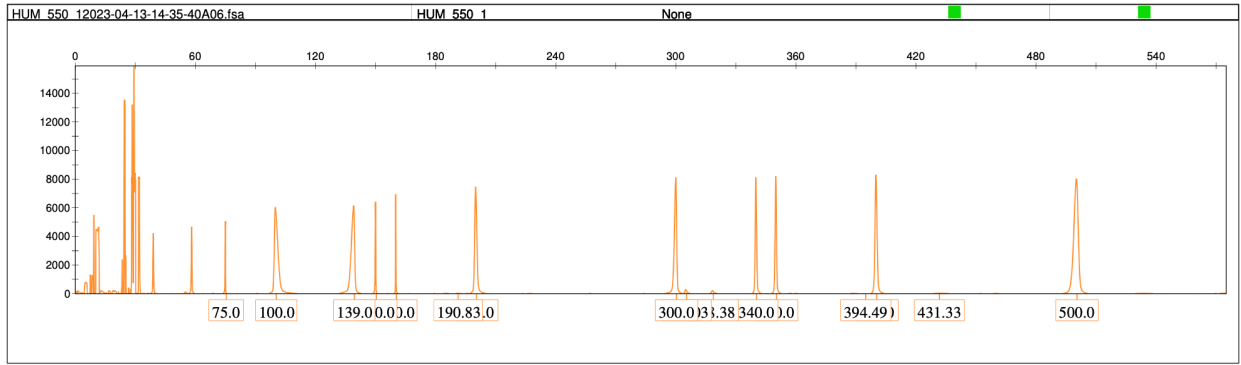
Örneklerin yürütülmesi aşamasında hangi iç standart ile daha iyi analiz yapılabildiğini görebilmek adına LIZ 500, LIZ 600 ve kit dahilindeki Salmon500 karşılaştırması yapılmıştır. Bu karşılaştırmayı yapmak adına 4 farklı kişiye ait örnekler ile her üç iç standart için toplamda 12 örnek hazırlanarak analiz yapılmıştır. Analiz sonucu LIZ600 ile daha iyi sonuç alındığı fark edilerek tez örneklerinde LIZ600 kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4, 5, 6'da örneklerden birine ait Salmon 500, LIZ500 ve LIZ600 ile yapılan yürütmelerin elektroforegramları görülmektedir.



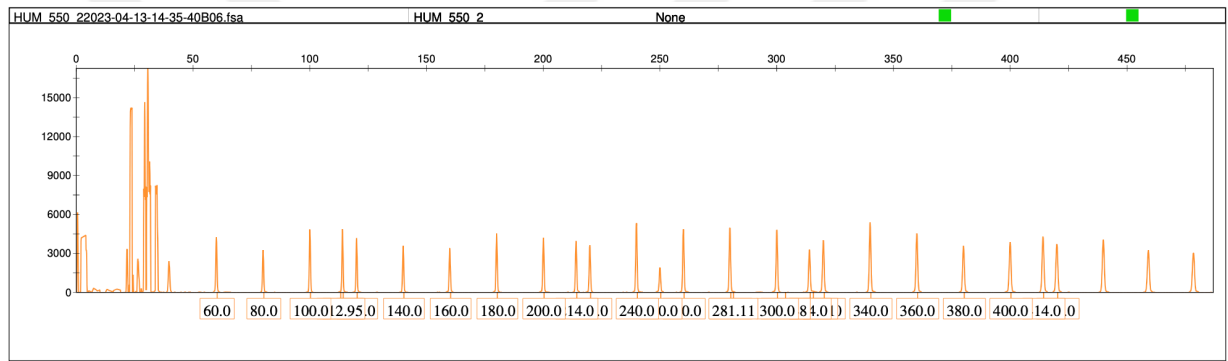
Şekil 4: Salmon 500 iç standartına ait elektroferogram.

Kalite (pik yükseklikleri) açısından Salmon 500, LIZ 500 ve 600'e kıyasla daha yüksek pik değeri verse de Salmon 500'ün bazı STR lokuslarında piklerin olması gereken noktalardan 1-2 baz kayma yaptığı görülmüştür.

GeneMapper programında gerekli parametreler girilerek doğru profile kısa sürede ulaşılsa da LIZ 600'de herhangi bir düzeltme yapmadan daha net sonuçlar alınabildiği görülmüştür.



Şekil 5: LIZ500 iç standartına ait elektroferogram.

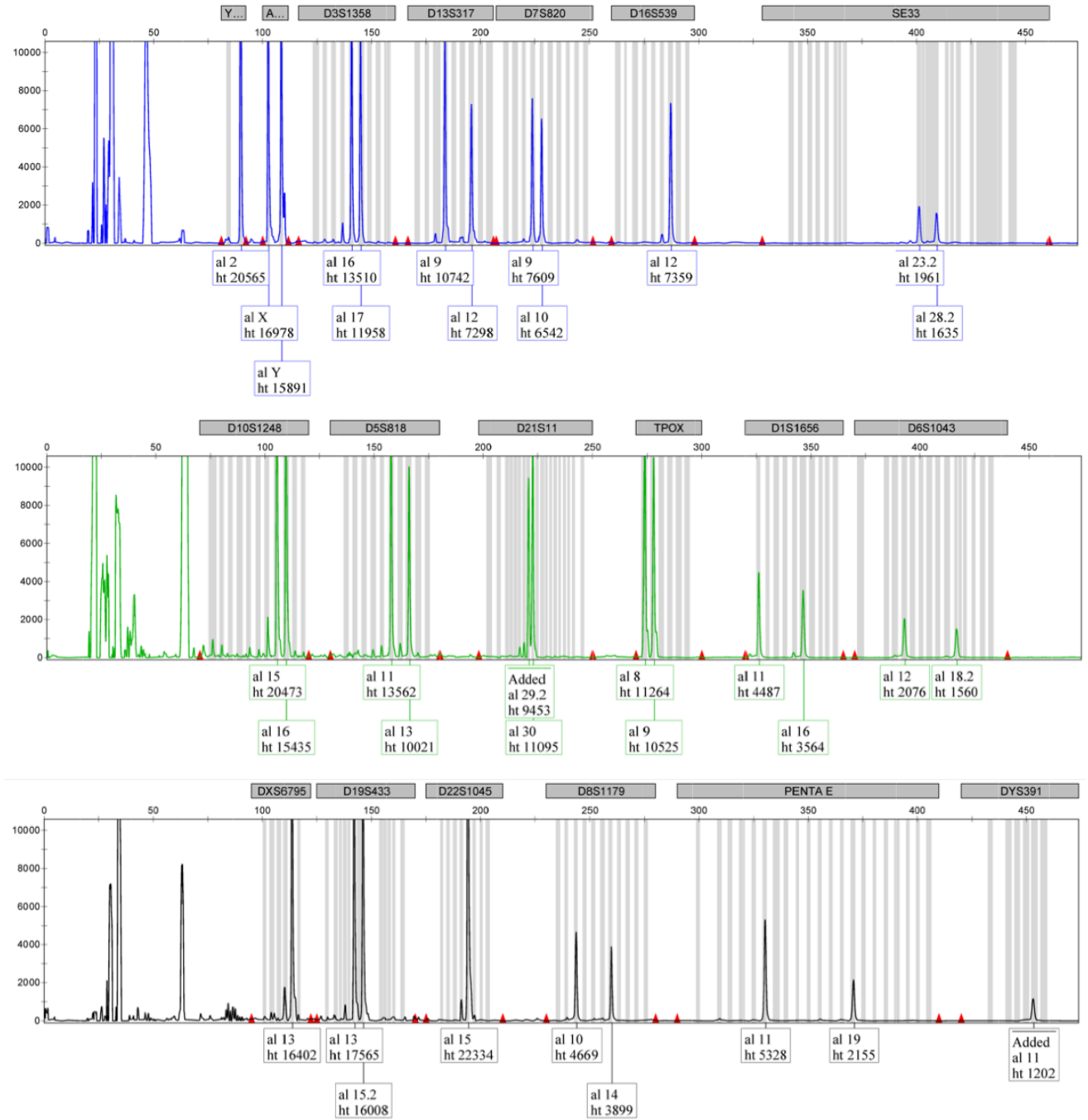


Şekil 6: LIZ600 iç standartına ait elektroferogram.

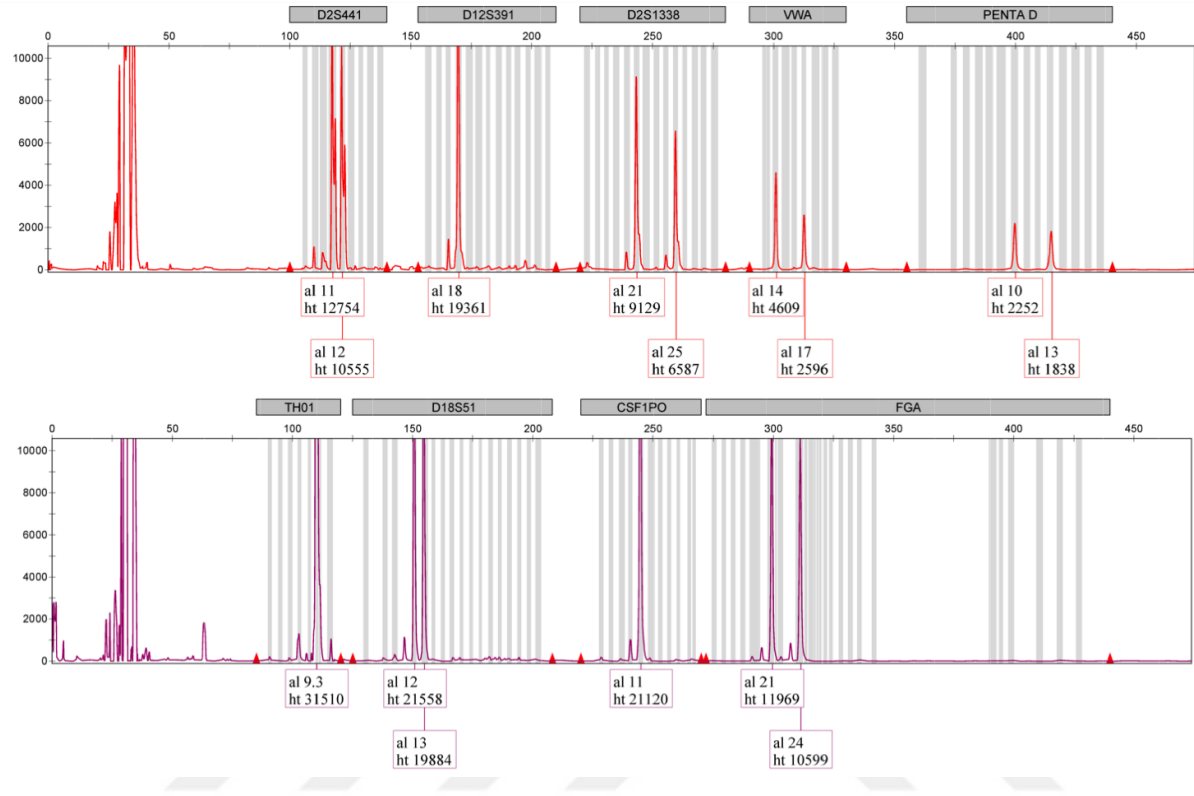
4.3. Farklı Reaksiyon Oranlarındaki Örneklerin PCR Sonuçları (HumDNA Typing Yanhuang PCR Kit)

Tez kapsamında değerlendirilen parametrelerden biri de farklı reaksiyon oranlarının PCR sonuçlarını nasıl etkilediğini gözlemlemektir. Bu amaçla HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile tam reaksiyon, 1/2.5 reaksiyon ve aynı zamanda kitin performansını değerlendirmek amacı ile 1/5 reaksiyon çalışılmıştır ve sırasıyla her bir reaksiyonda örnek başına 2.5µl, 1µl ve 0.5µl DNA izolatu eklenmiştir. Yapılan PCR ve yürütme sonucu her üç dilüsyonda da başarılı sonuçlar elde edilebildiği görülmüştür.

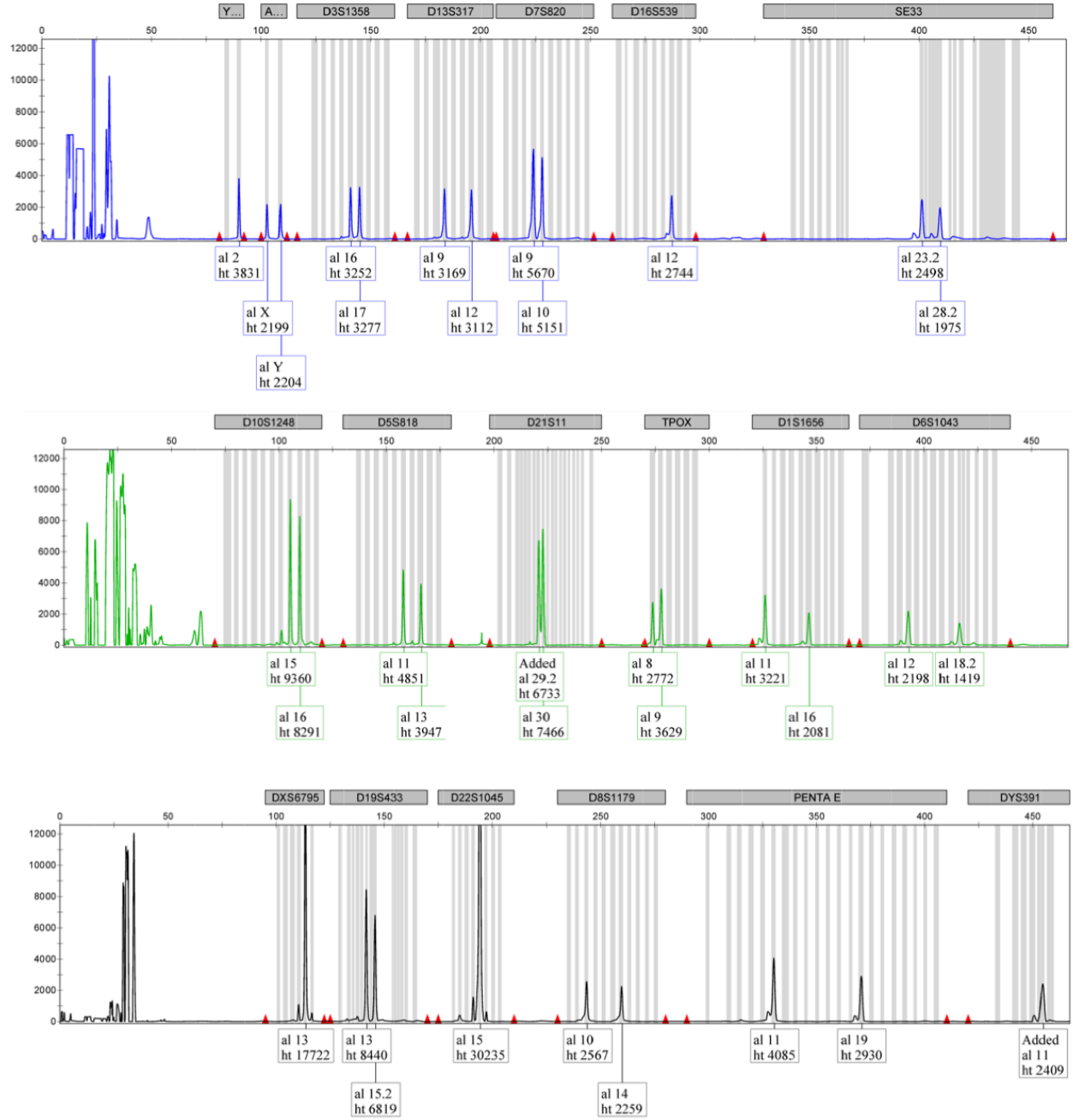
Bu amaçla çalışılan örneklerden aynı kişiye ait üç farklı dilüsyonun elektroforegramları Şekil 7 (Tam reaksiyon), Şekil 8 (1/2.5 reaksiyon) ve Şekil 9 (1/5 reaksiyon)'de görülmektedir.



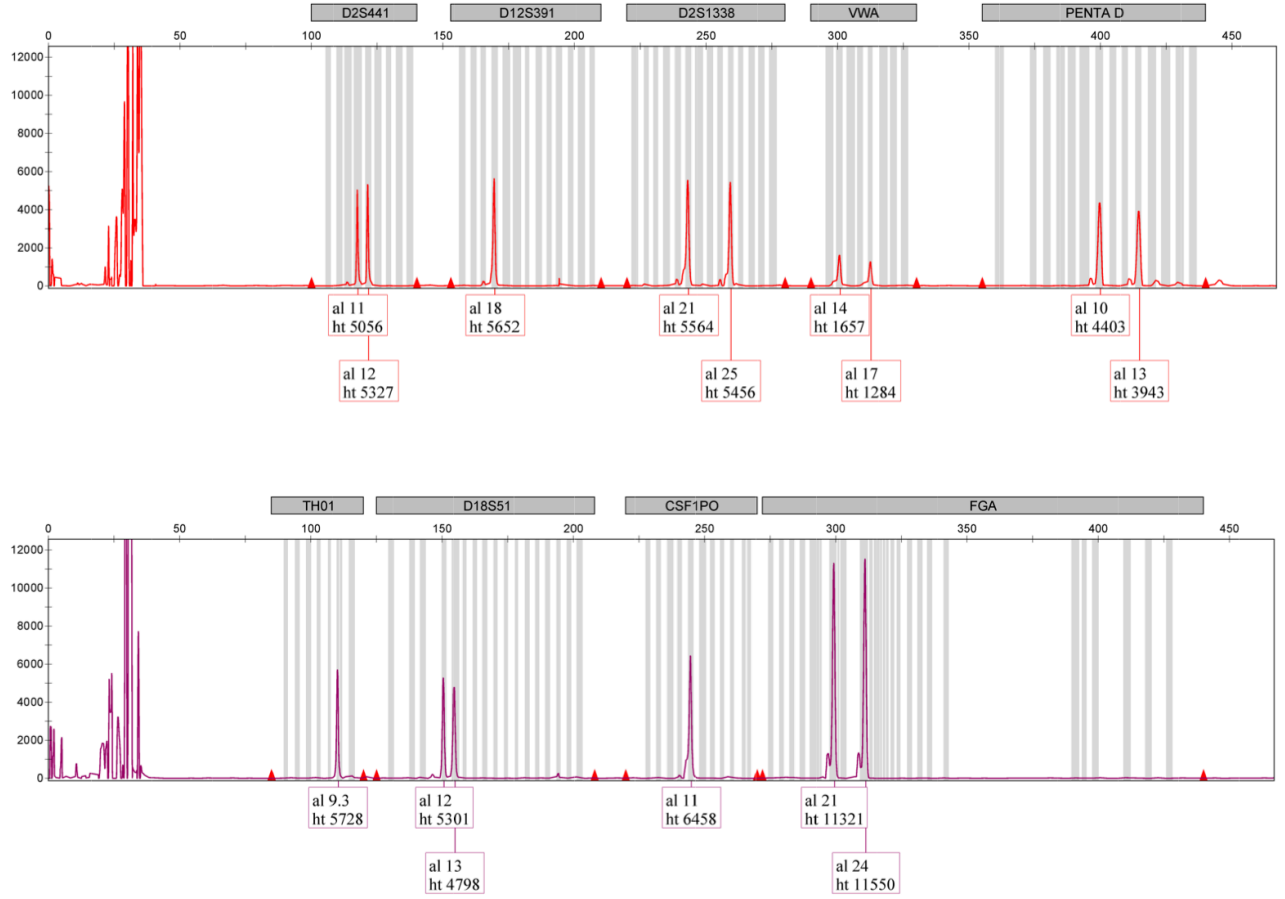
Şekil 7: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile tam reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.



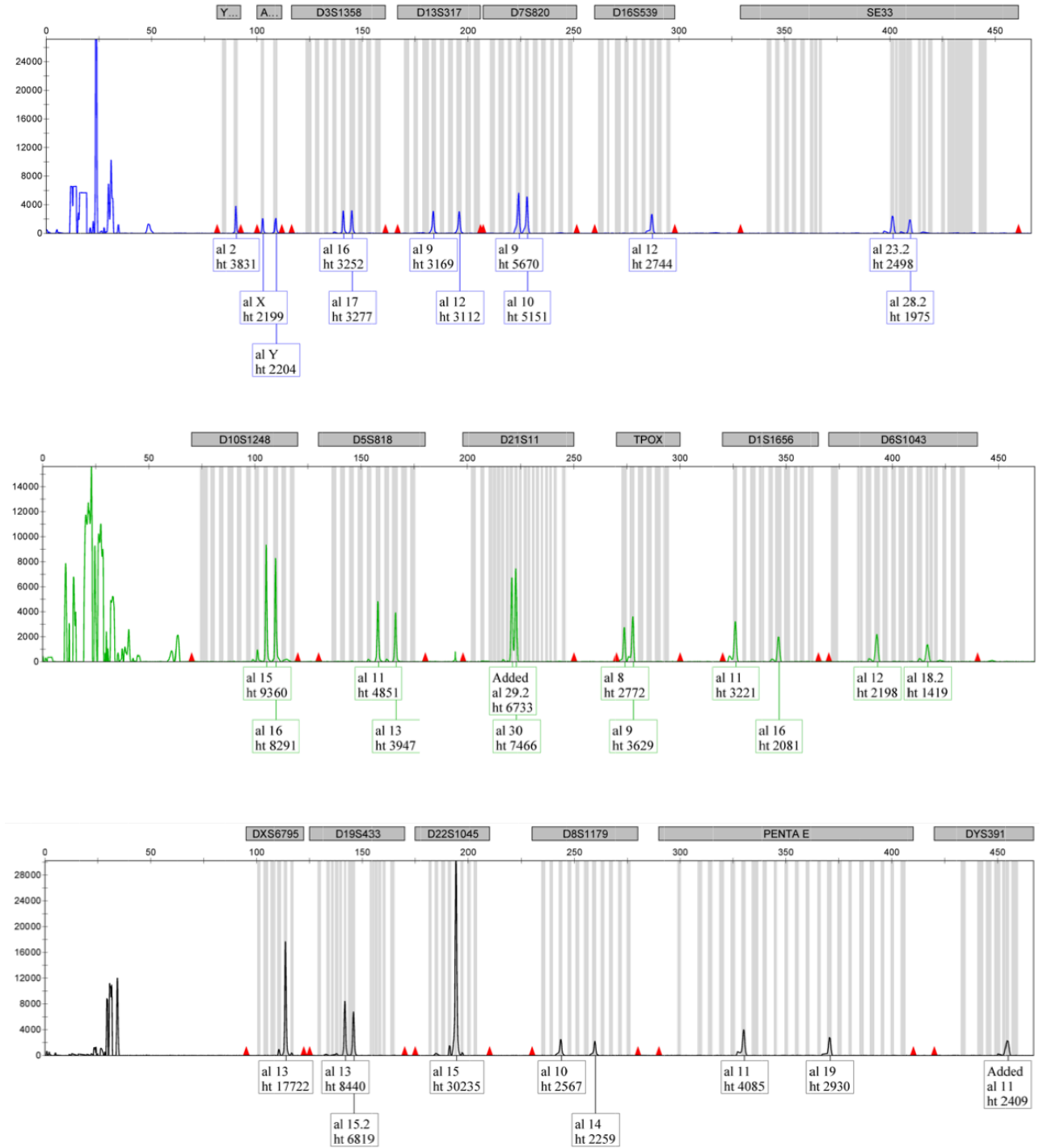
Şekil 7: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile tam reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü (devamı).



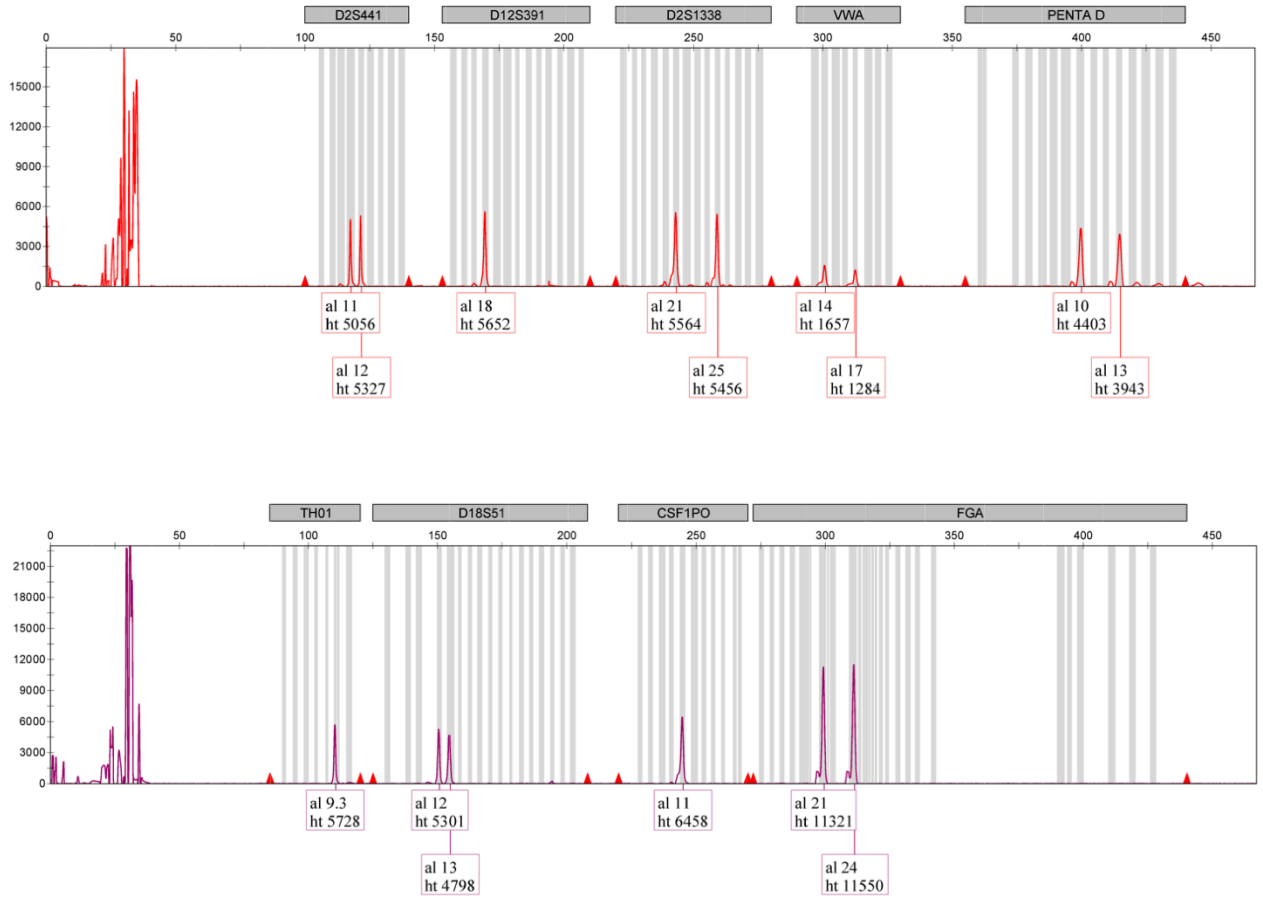
Şekil 8: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/2.5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.



Şekil 8: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/2.5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü (devamı).



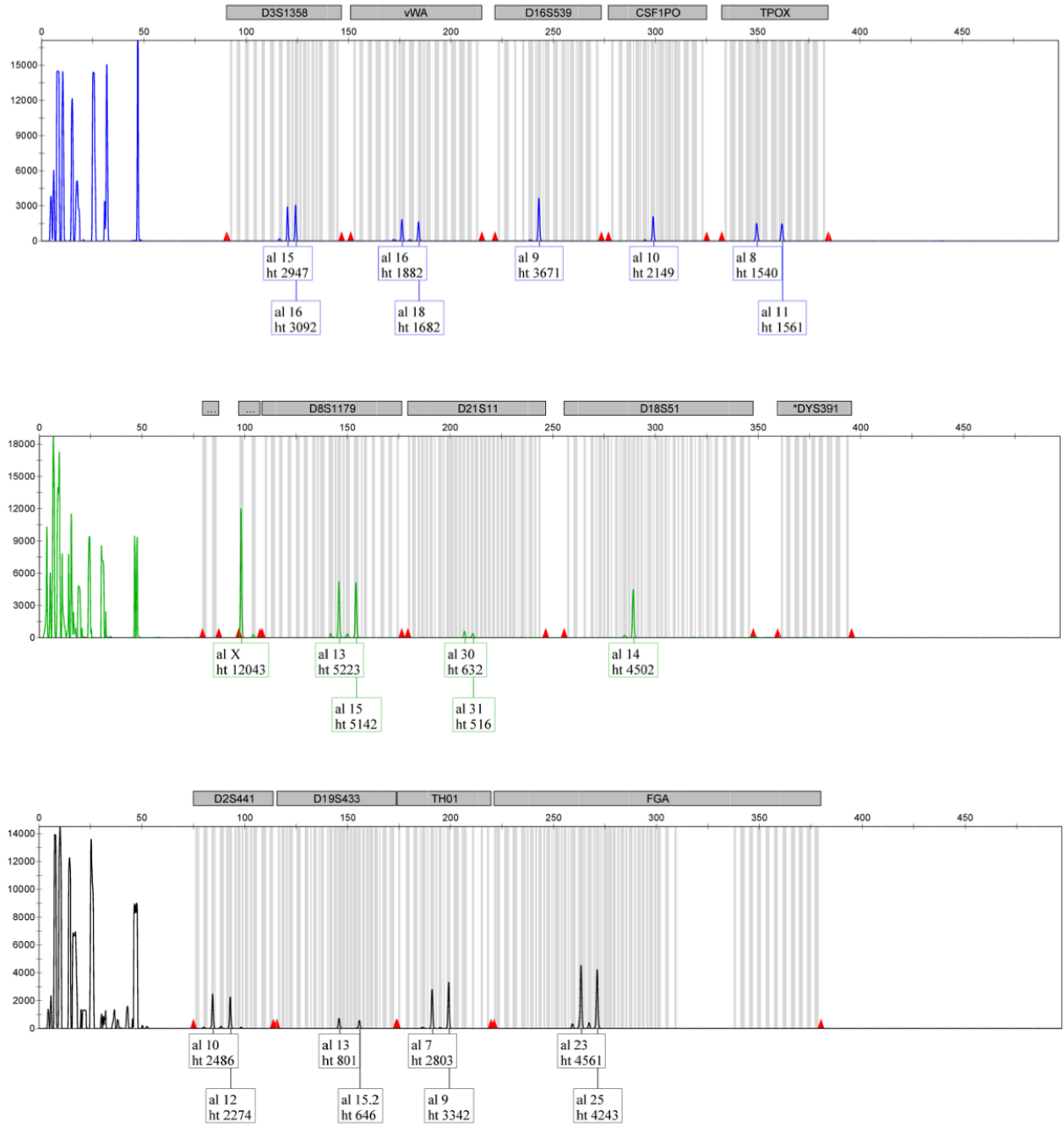
Şekil 9: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü.



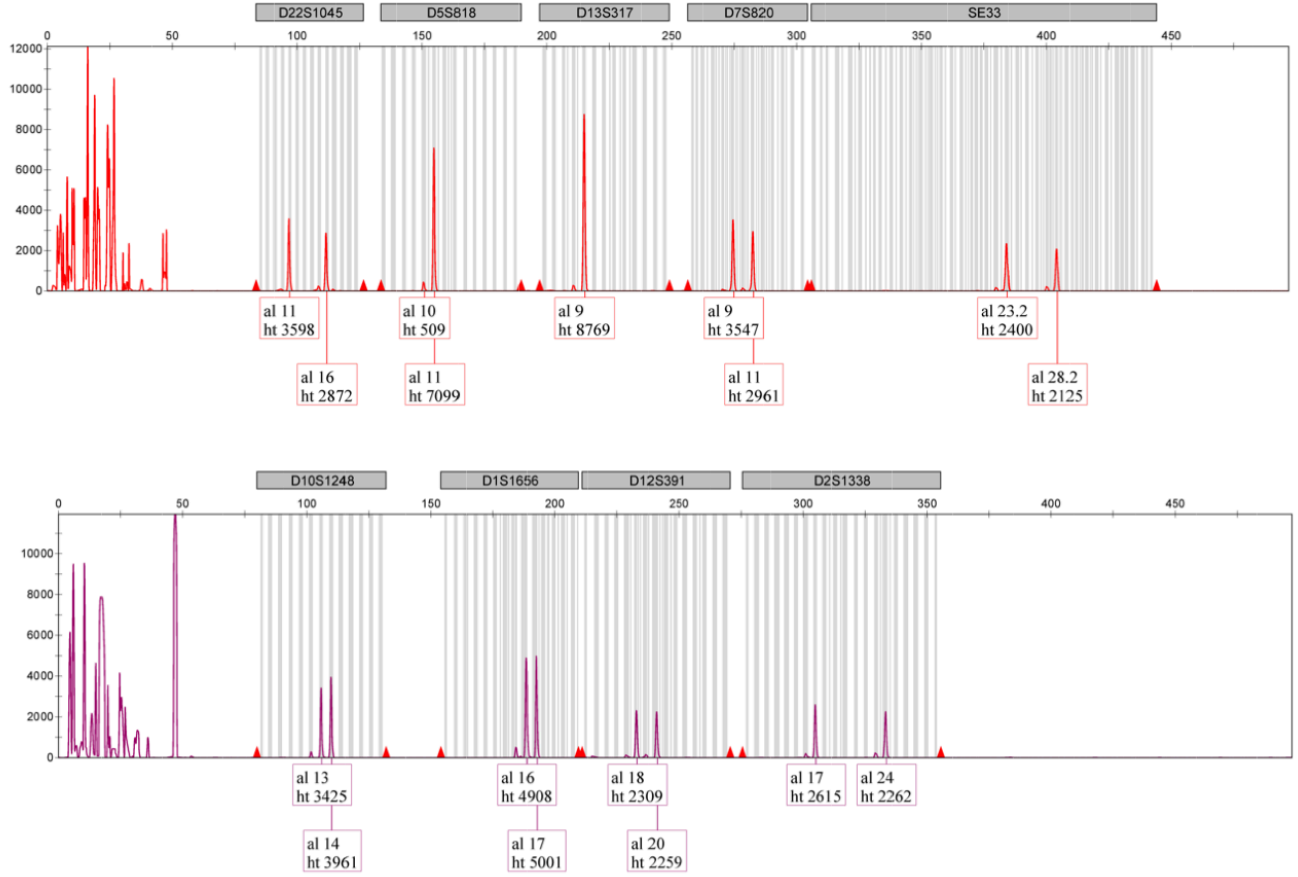
Şekil 9: HumDNA Yan Huang PCR kiti ile 1/5 reaksiyon çalışılmış örneğe ait elektroferogram görüntüsü (devamı).

4.4. GlobalFiler PCR Kiti/HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti Karşılaştırması

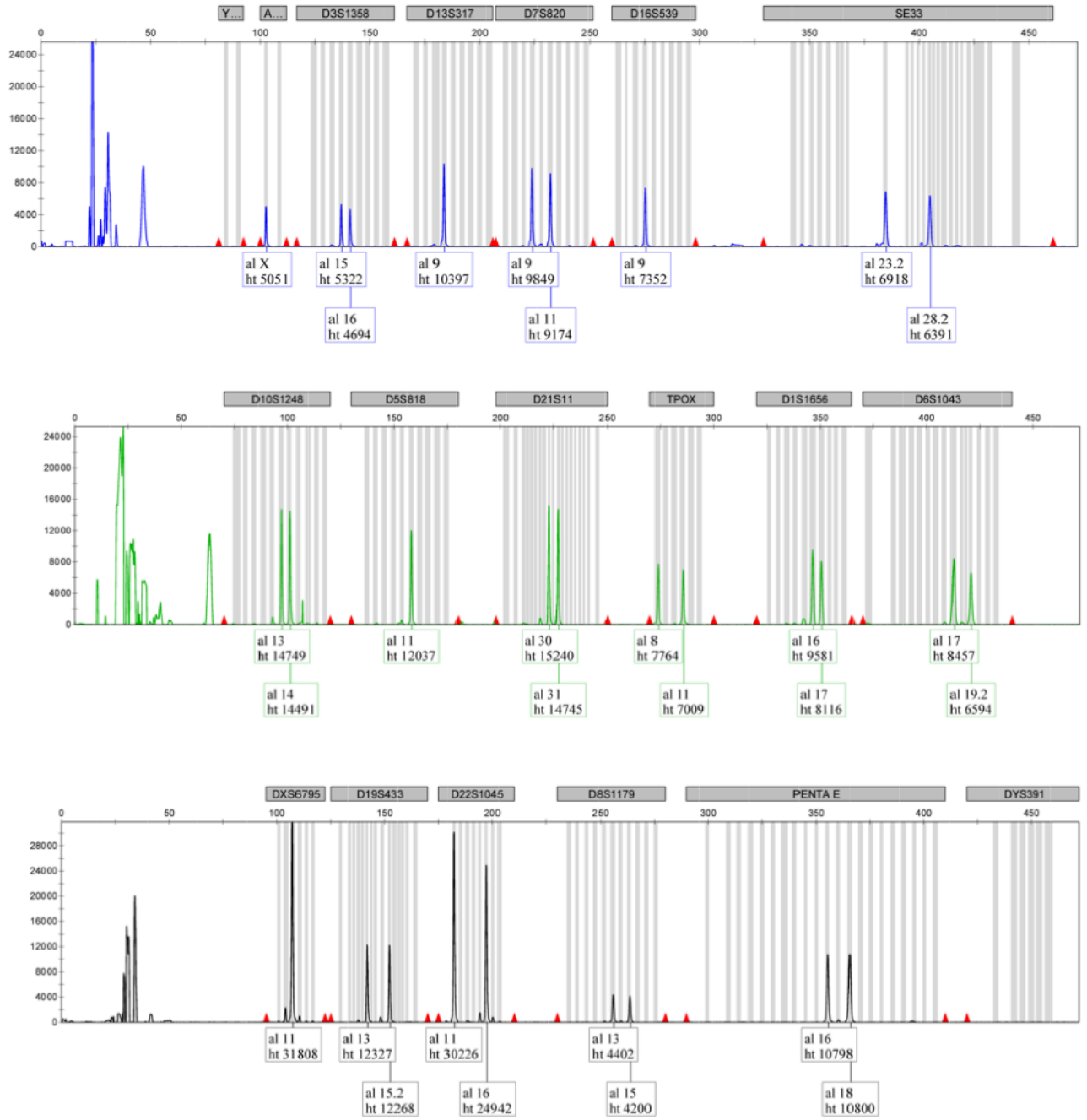
Tez kapsamında yapılan karşılaştırmalardan biri de GlobalFiler PCR Kiti ile HumDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin karşılaştırılmasıdır. GlobalFiler PCR Kiti dahilinde çoğaltılabilen 24 STR bölgesinin tümü (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33, DYS-391, Y-INDEL) HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile de çoğaltılabilmektedir. Buna ek olarak HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti dahilinde çoğaltılabilen fakat GlobalFiler PCR Kiti dahilinde bulunmayan 4 STR bölgesi (D6S1043, DXS6795, Penta E, Penta D) de çalışmamızda başarıyla çoğaltılmıştır. Karşılaştırılan örneklerden aynı kişiye ait iki elektroforegram Şekil 10 ve Şekil 11’de görülmektedir.



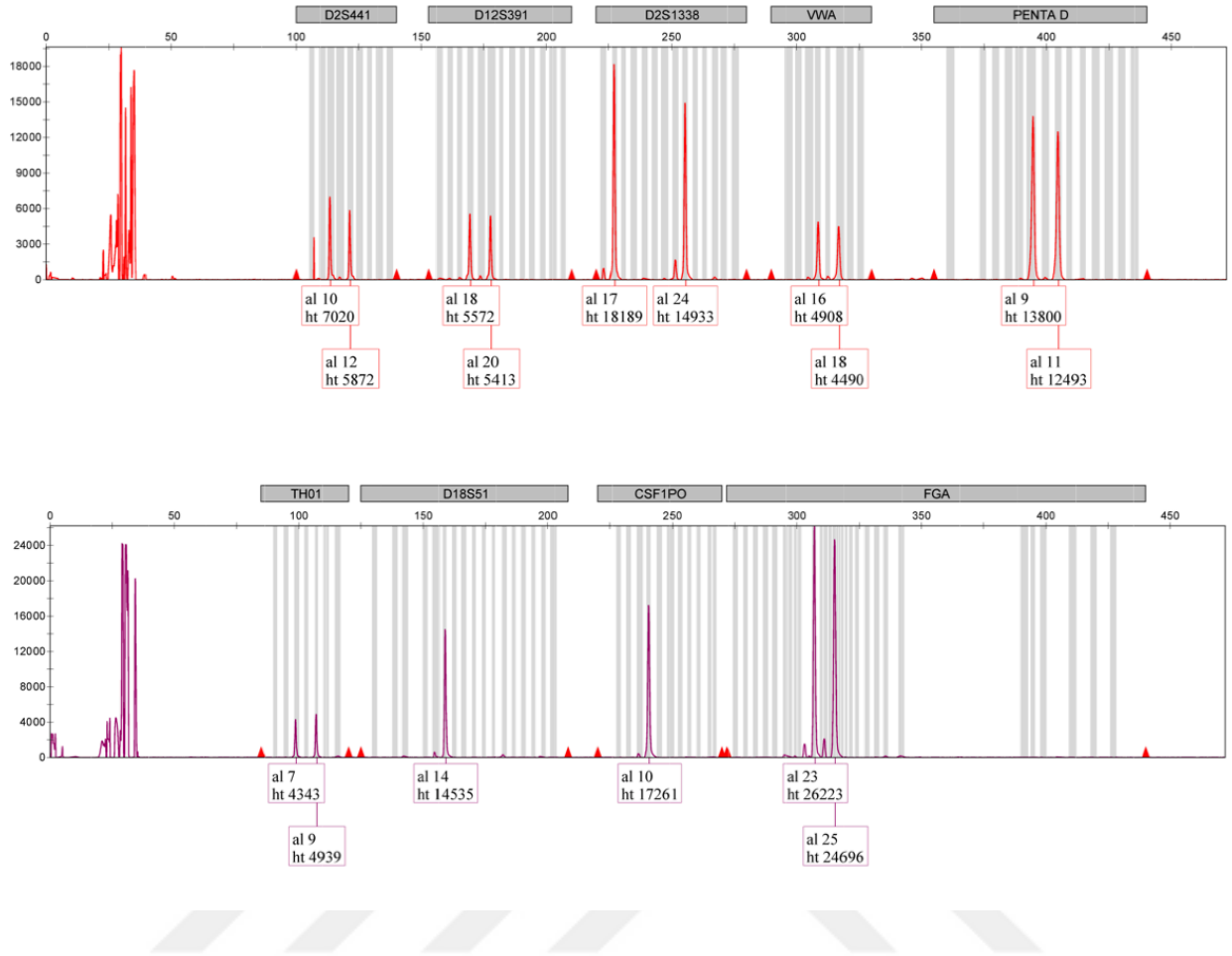
Şekil 10: GlobalFiler PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (24 STR bölgesi).



Şekil 10: GlobalFiler PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (24 STR bölgesi) (devamı).



Şekil 11: HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi).

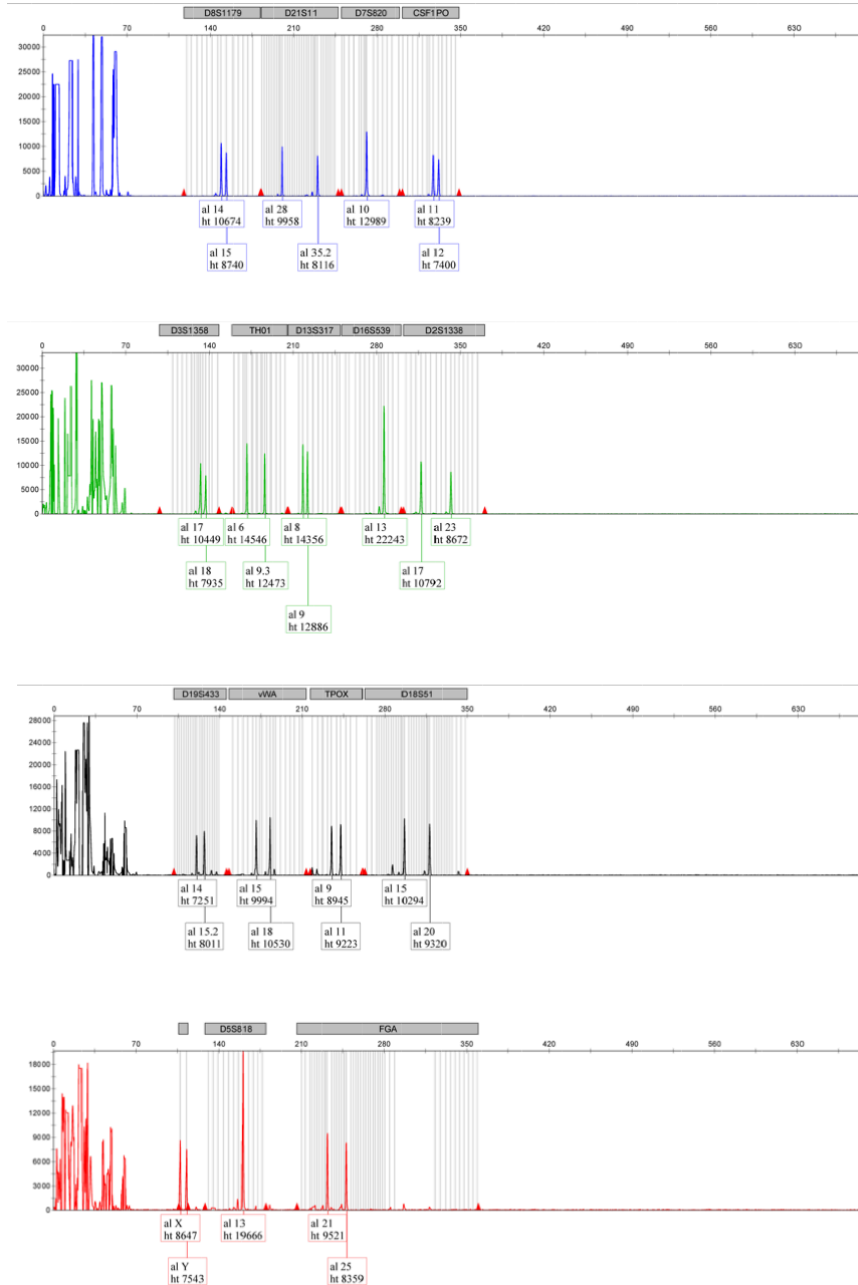


Şekil 11: HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış X kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi) (devamı).

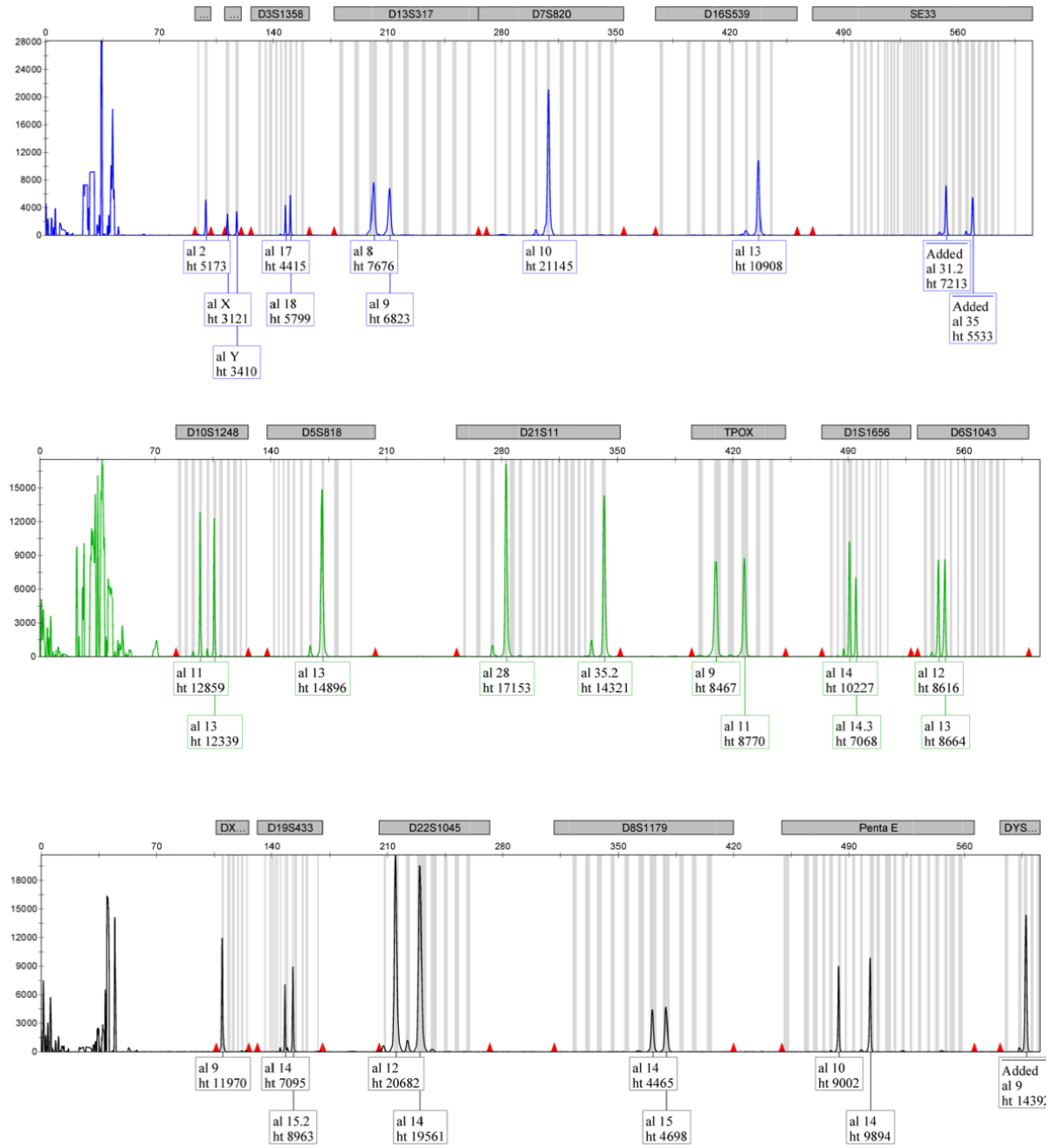
4.5. Identifiler Plus PCR Kiti/HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti Karşılaştırması

Tez kapsamında yapılan karşılaştırmalardan biri de Identifiler Plus PCR Kiti ile HumDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin karşılaştırılmasıdır. Identifiler Plus PCR Kiti dahilinde çoğaltılabilen 16 STR bölgesinin tümü (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA) HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile de çoğaltılabilmektedir.

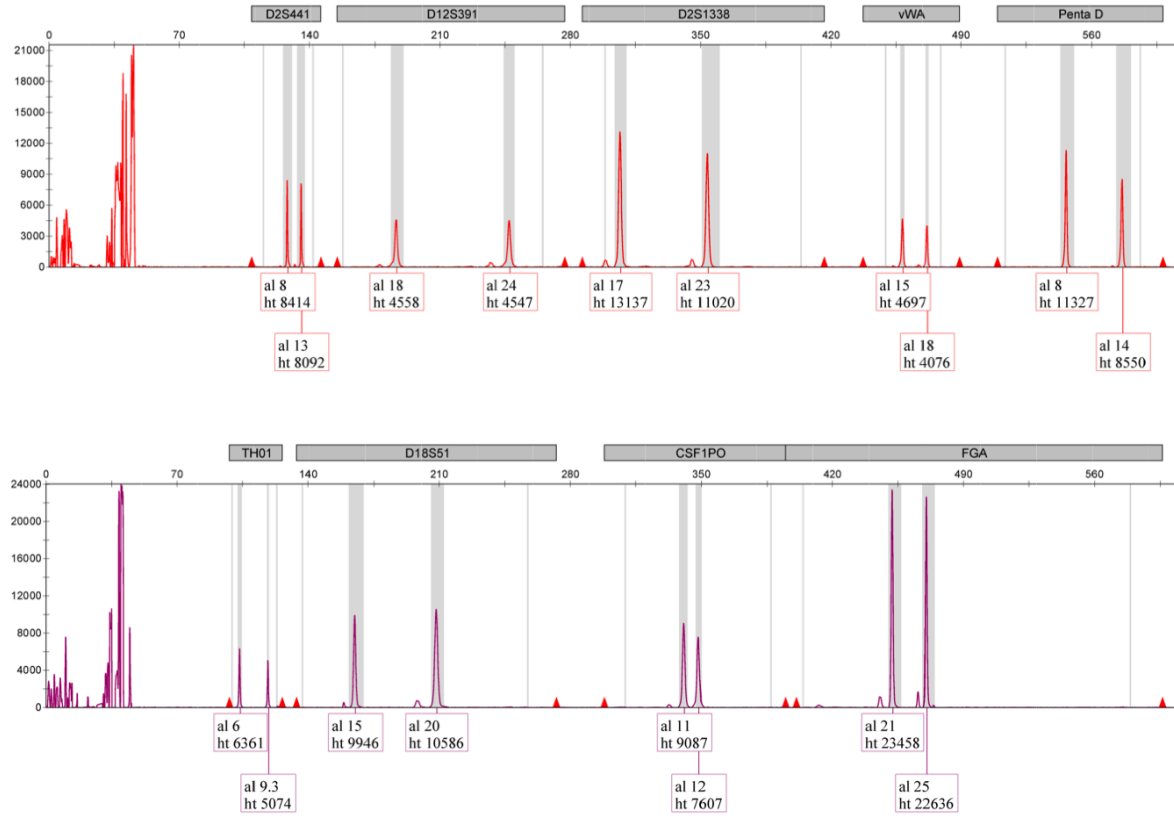
Buna ek olarak HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti dahilinde çoğaltılabilen fakat GlobalFiler PCR Kiti dahilinde bulunmayan 12 STR bölgesi (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33, DYS391, Y-INDEL, D6S1043, DXS6795, Penta E, Penta D) de çalışmamızda başarıyla çoğaltılmıştır. Karşılaştırılan örneklerden aynı kişiye ait iki elektroforegram Şekil 12 ve Şekil 13’de görülmektedir.



Şekil 12: Identifiler Plus PCR Kiti ile çoğaltılmış Y kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (16 STR bölgesi).



Şekil 13: HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış Y kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi).



Şekil 13: HumDNA Typing Yanhuang PCR Kiti ile çoğaltılmış Y kodlu kişinin DNA örneğine ait elektroferogram (28 STR bölgesi).

5. Tartışma

Adalet hizmet eden bir çalışma alanı olan adli genetik kapsamında birçok farklı analiz gerçekleştirilmektedir. Delillerin ait olduğu kişiler ile eşleştirilmesi, bireylerin kimliklendirilmesi, soy bağı ve ebeveynlik tespiti gibi analizler adli genetik uygulamalarındandır. Bu analizler esnasında çeşitli biyobelirteçlerden yararlanılmaktadır ve STR'ler en sık tercih edilen biyobelirteçlerdendir.

Olay yerlerinden elde edilen ve oldukça hassas olan biyolojik materyallerin analizi esnasında doğrulanmış yöntemlerin kullanılması çok önemlidir (30). İstenilen DNA bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR kitlerinin de doğrulanması gerekmektedir ve amaca uygun kitler tercih edilmelidir.

Tezin amacı doğrultusunda HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler alanında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir ve adli genetik laboratuvarlarında sıklıkla tercih edilen iki farklı kit (Identifiler Plus ve GlobalFiler) ile karşılaştırılmıştır. Tez kapsamında karşılaştırılan üç kitin de içeriğindeki STR bölge sayıları farklıdır ve en çok bölge inceleme imkanı veren kit, HUMDNA Typing Yanhuang PCR kitidir. İncelenen STR bölgelerinin sayısı arttıkça elde edilen sonuçların ayırım gücü dolayısıyla da güvenilirliği artmaktadır. Tek tek bakılacak olursa The AmpF/STR Identifiler Plus Kiti dahilinde 16 STR bölgesi çoğaltılabilmektedir (38) ve bu bölgeler D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır. GlobalFiler PCR kiti, Identifiler Plus PCR kitinin içerdiği tüm lokusları içermektedir. Bu lokuslara ek olarak 8 daha fazla STR bölgesi çoğaltma kapasitesine sahiptir. Toplamda 24 lokusun çoğaltılması için tasarlanan GlobalFiler PCR Kiti (39) dahilindeki STR bölgeleri D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33, DYS-391 ve Y-INDEL'dir.

Tez amacı doğrultusunda bu iki kite kıyasla kullanılabilirliği değerlendirilen HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti bu üç kit arasında en fazla STR lokusu çoğaltabilme kapasitesine sahip kittir. Toplamda 28 bölge (40) içeren kit, GlobalFiler ve Identifiler kitlerinin içerdiği tüm lokusları çoğaltabilme gücüne ek olarak GlobalFiler kitinden 4, Identifiler Plus kitinde 12 daha fazla STR bölgesi içermektedir. HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti içeriğindeki STR bölgeleri; Y-INDEL, AMEL, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, SE33, D10S1248, D5S818, D21S11, TPOX, D1S1656, D6S1043, DXS6795, D19S433, D22S1045, D8S1179, Penta E, D2S441, DYS391, D12S391, D2S1338, vWA, Penta D, TH01, D18S51, CSF1PO ve FGA'dır.

Lokus sayılarının ayırım gücü ve dışlama gücü üzerindeki önemi çok büyüktür (41). Analiz edilen lokus sayısı arttıkça bireyler arasındaki ayırım gücü de artmaktadır. Kit üreticisi tarafından sağlanan verilerde Identifiler, GlobalFiler, HumDNA Typing Kit Yan Huang PCR kitlerine ait kümülatif ayırım gücü sırasıyla $1-6.65e^{-17}$, $1-1.96e^{-24}$ ve $1-3.53e^{-29}$ 'dur (40). Identifiler, GlobalFiler, HumDNA Typing Kit Yan Huang PCR kitlerine ait kombine dışlama gücü ise sırasıyla 0.999999, 0.999999999 ve 0.99999999999'dur (40). Bu karşılaştırma Identifiler PCR kiti üzerinden yapılmıştır fakat tezde kullanılan Identifiler Plus kiti ile Identifiler PCR kiti aynı lokus sayısına ve ayırım gücüne sahiptir. Plus kitin bir önceki kite (The AmpF/STR Identifiler Kit) kıyasla hassasiyeti ve sağlamlığı geliştirilmiştir (38). Verilere bakıldığında üç kit arasında en yüksek ayırım gücü ve dışlama gücü bakımından en iyi kitin 28 lokus içeren HumDNA Typing Kit Yan Huang PCR kiti olduğu görülmektedir. Bu iki parametreye ek olarak lokus sayıları degrade (bozunmuş) örneklerde de oldukça önemli olabilmektedir. Degradasyona bağlı olarak bazı zarar gören STR bölgeleri PCR'da çoğaltılamayabilir (5). Fakat kit sayesinde çoğaltılmasına imkan verilen STR bölge sayıları fazla olursa degrade örneklerden elde edilebilecek bilgi sayısı da artırılabilir. Bu açıdan en avantajlı kit HumDNA Typing Kit Yan Huang PCR kitidir.

Kitin ayırım gücü ve dışlama gücü açısından güçlü olması kadar verimli bir zaman diliminde bu işlemi gerçekleştirebiliyor olması önemli bir parametredir. Çok hızlı analizler gerektiren durumlarda (örneğin, kitlesel felaketlerde kimliklendirme) kullanılan PCR kitinin az bir sürede verimli sonuçlar sağlaması önemli bir avantajdır. Karşılaştırılan Identifiler Plus, GlobalFiler ve HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti ile örneklerin çoğaltılması işleminde sırasıyla 28, 29 ve 28 döngü tercih edilmiştir. Bu döngü sayıları ve her kitin kendi prosedürleri baz alınarak hesaplanan yaklaşık PCR süreleri Identifiler Plus, GlobalFiler ve HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti için sırasıyla 115 dakika, 60 dakika ve 77 dakikadır. Kit prosedürleri incelendiğinde GlobalFiler ve Identifiler Plus PCR kitinin bağlanma ve uzama basamaklarının tek bir adımda gerçekleşirken HumDNA Typing Yan Huang PCR kitinde bağlanma ve uzama basamaklarının ayrı ayrı sıcaklıklarda gerçekleştiği görülmektedir. Üç kit arasında zaman bakımından en dezavantajlı kitin Identifiler Plus PCR kiti olduğu; GlobalFiler kitinin ise en avantajlı kit olduğu görülmektedir. Fakat daha fazla STR bölgesi çoğaltma kapasitesi sahip olma, ayırım gücü ve dışlama gücü hesaba katıldığında GlobalFiler ve HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti arasında zaman farklı telafi edilebilir.

Zaman parametresine ek olarak karışım örneklerinde incelen STR lokuslarının sayıca fazla olması örneklerin ayırt edilmesinde oldukça önemli olabilir. Bu nedenle HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti bu bakımdan GlobalFiler ve Identifiler Plus PCR kitlerine kıyasla daha avantajlıdır.

Kit dahilindeki bölgelerin işaretlenmesinde kullanılan boyalar kıyaslanacak olursa; Identifiler Plus PCR kiti 5-floresan boya işaretli bir kittir ve kullanılan boyalar 6-FAMTM (mavi), VICTM (yeşil), NEDTM (sarı), PETTM (kırmızı)'dir. İç standardın işaretlenmesinde ise tercih edilen LIZTM (turuncu)'dir.

GlobalFiler PCR kiti 6-floresan boya işaretli bir kittir ve kullanılan boyalar 6-FAMTM (mavi), VICTM (yeşil), NEDTM (sarı), TAZTM (kırmızı), ve SIDTM (mor)'dir. İç standardın işaretlenmesinde ise tercih edilen LIZTM (turuncu)'dir. Bu iki kit arasında kırmızı boyalar ve Identifiler Plus kitinde bulunmayan mor boya farklılık göstermektedir. 6 floresan boya işaretli STR çoklu PCR sistemi olarak geliştirilen HumDNA Typing Yan Huang PCR kitinde kullanılan boyalar FAM (mavi), HEX (yeşil), YTAM (sarı), FSID (kırmızı), FTAZ (mor)'dir. İç standardın işaretlenmesinde ise tercih edilen Salmon500 (turuncu)'dür. Diğer iki kite kıyasla ortak boya sayısı azdır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında kitin içerdiği boyalarla gayet net sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Diğer iki kitteki boyalara alternatif olarak HumDNA Typing Yan Huang PCR kitindeki boyalar kullanılabilir.

Identifiler Plus kiti dahilinde iç standart olarak LIZ500; GlobalFiler kiti dahilinde iç standart olarak LIZ600 (38, 39) bulunmaktadır. Sıklıkla kullanılan bu iki iç standarttan farklı olarak HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti içerisinde Salmon500 yer almaktadır. Hangi iç standart ile daha iyi sonuçlar elde edilebileceğini görmek adına HumDNA Typing Yan Huang PCR kiti ile çoğaltılacak örneklerden seçilerek her üç iç standart karşılaştırılmıştır. Ve sonuç olarak LIZ600 ile daha iyi okuma yapılabildiği görülmüştür. Elde edilen ham verinin değerlendirilmesi için doğru bir iç standardın tercih edilmesi oldukça önemlidir. Aradaki farklılık iç standartların formülasyon farklılığından kaynaklanabilir.

Tez kapsamında HumDNA Typing Yan Huang PCR kitinin değerlendirildiği bir başka parametre de farklı oranlardaki PCR karışımlarının örneklerin analizindeki etkisidir. Bu parametrenin değerlendirilme nedeni adli bilimlerde bazı durumlarda analiz edilecek örnek miktarı çok az olabilmektedir. Yürütülmesi gereken birden çok test olabilme ihtimali de göz önüne alındığında eldeki izolatın dikkatli ve tasarruflu kullanımı çok önemlidir. Buna bağlı olarak adli bilimlerde çalışmalarında tercih edilen bir PCR kitinin kısıtlı miktarlarda kullanımda dahi sonuç vermesi büyük bir avantajdır.

Bu amaçla farklı oranlarda (1, 1/2.5, 1/5) PCR karışımları hazırlanmış ve test edilmiştir. Tam reaksiyon ve 1/2.5 reaksiyon karışımları kit protokolünde yer alan karışımlardır. Buna ek olarak 1/5 reaksiyon karışımı da hazırlanarak kıyaslanmıştır. Bu karşılaştırma çalışmasında DNA dilüsyonu (0.1 ng/μl) sabit tutulmuştur fakat farklı hacimlerde DNA eklenerek PCR gerçekleştirilmiştir. Her karışım oranında da başarılı sonuçlar elde edilmiş ve böylelikle çok az hacimde DNA ile dahi sonuç alınabildiği görülmüştür. Elde edilen bu veri adli bilimler alanında oldukça kıymetlidir. Bu nedenle örnek miktarı azlığı sorununun üstesinden gelinmesinde test edilen kitin kullanışlı olduğu doğrulanmıştır.

Adli genetik alanında yürütülen popülasyon genetiği çalışmalarında incelenen STR lokuslarının sayısı arttıkça bireyler ve dolayısıyla popülasyon arası ayırım gücü artmaktadır. Bu nedenle popülasyon çalışmalarının yürütülmesi çok önemlidir. Tez kapsamında incelenen HumDNA Typing Yan Huang PCR kitinin kullanıldığı popülasyon çalışmaları incelendiğinde literatürde sadece bir tane araştırmaya rastlanmıştır. Ruanda Afrika'da yürütülen bu popülasyon çalışmasında kit dahilindeki 28 STR lokusundan 24 otozomal STR lokusu analiz edilerek popülasyondaki genetik çeşitlilik değerlendirilmiştir (44).

Çalışmada değerlendirilen parametrelere bakacak olursak bunlar; CDP: Cumulative Discrimination Power (Kümülatif Ayırım Gücü), CMP: Combined Matching Probability (Birleşik Eşleşme Olasılığı), CPE: Cumulative Probability of Exclusion (Kümülatif Dışlama Olasılığı) ve CPI: Combined Paternity Index (Birleşik Babalık İndeksi)'dir. Her bir STR bölgesi için bu değerler hesaplanmıştır ve analiz edilen 24 STR bölgesinin yüksek polimorfizme sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bireylerin kimliklendirilmesinde kullanılabileceği ifade edilmiştir. Burada popülasyon genetiği çalışmalarının önemi görülmektedir. Ek olarak çalışmada incelenen lokuslardan SE33'ün en yüksek; D13S317'nin ise en az polimorfizme sahip olduğu belirtilmiştir (44).

Benzer şekilde Türkiye popülasyonunda yürütülen bir çalışmada SE33 lokusunun adli kimliklendirmede güvenilirliği test edilmiş ve elde edilen verilere göre SE33 lokusunun ayırım gücünün oldukça yüksek olduğu görülmüştür (45). Türkiye popülasyonunda bu kit ile yürütülecek olası bir popülasyon çalışmasında kit dahilindeki 28 lokusun polimorfizm oranları değerlendirilebilir. Böylelikle hangi STR lokusuna sahip bireylerin popülasyonun geri kalanından daha kolay ayırt edilebileceği bilgisi edinilecektir. Bu önemli bilgi ise adli bilimlerde oldukça önemli olacaktır. Çünkü toplumun geri kalanından farklı bir polimorfik bölgeye sahip olmak bir vakanın çözümlenmesinde ya da bireylerin kimliklendirilmesinde çok kullanışlı bir biyobelirteç olacaktır. Popülasyon içinden farklı olarak diğer popülasyonlarla yapılacak olan bir çalışma neticesinde ülkemizde adli olaya karışmış yabancı uyruklu bireylere ait olma potansiyeli değerlendirilerek dışlama yolunda önemli bir ayırt edici bilgi elde edinilebilir. Bu nedenle popülasyon çalışmalarının yürütülmesi oldukça önemlidir.

Kit kullanımının en büyük dezavantajı, kit ile ilgili destek almanın diğer global kit üreticilerine kıyasla daha zor olmasıdır. Bu problem haricinde kitin genel performansı iyi bulunarak adli bilimler kapsamında kullanılabilir olduğuna kanaat getirilmiştir. Çalışma sonucunda kitin en önemli avantajlarının; kısa sürede fazla sayıda STR bölgesi çoğaltılmasına imkan tanınması ve az miktardaki örneklerle düşük reaksiyon karışımı oranlarında dahi verimli sonuçlar sağlayabilmesidir.

6. Sonuç

Bir suçun aydınlatılması için farklı alanlarda uzmanların çalışarak adalete hizmet ettiği bir disiplin olan adli bilimlerde genetik bilimi büyük önem taşımaktadır. İnsanların kimliklendirilmesi, soy bağı tespiti, ebeveynlik testleri, delillerin aidiyetlerinin belirlenmesi gibi birçok olayda faydalanılan adli genetik uygulamalarında en çok tercih edilen biyobelirteçler STR'lerdir. Analizlerde incelenen STR belirteçlerinin sayısı arttıkça elde edilen sonuçların da güvenilirliği artmaktadır. Tezin amacı doğrultusunda HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler alanında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Bu tez kapsamında da alanda sıklıkla tercih edilen iki farklı kite (Identifiler Plus ve GlobalFiler) ek olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanılmıştır. Tez kapsamında karşılaştırılan üç kitin de içeriğindeki STR bölge sayıları farklıdır ve en çok bölge inceleme imkanı veren kit, HUMDNA Typing Yanhuang PCR kitidir. Buna ek olarak, HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kiti kullanarak çoğaltılan örneklerin yürütmesinde üç farklı iç standart (Salmon500, LIZ500 ve LIZ600) test edilmiş ve LIZ600 ile daha iyi sonuç alındığı görülmüştür. Tez kapsamında değerlendirilen bir başka parametre de az örnek miktarı olması durumunda HUMDNA Yanhuang PCR kitinin kullanılabilirliği olmuştur. Bu amaçla farklı oranlarda (1, 1/2.5, 1/5) PCR karışımları hazırlanmış ve test edilmiştir. Her dilüsyonda da başarılı sonuçlar elde edilmiş ve böylelikle çok az miktarda DNA ile dahi sonuç alınabildiği görülmüştür. Elde edilen bu veri oldukça kıymetlidir. Çünkü adli bilimlerdeki analizlerde, klinik araştırmalara kıyasla çok daha az miktarda örneklerle çalışabilme ihtimali mevcuttur. Bu nedenle örnek miktarı azlığının telafi edilmesinde test edilen kitin kullanışlı olduğu doğrulanmıştır. Sonuç olarak HUMDNA Typing Yanhuang PCR Kitinin adli bilimler dahilinde yürütülen genetik çalışmalarında kullanışlı bir kit olduğu düşünülmektedir. Katılımcı sayısının artırılması ile yapılacak olan bir popülasyon genetiği çalışması ile daha detaylı sonuçlar elde edilebileceği ve literatüre kazandırılabilceği düşünülmektedir.

7. Kaynaklar

1. <https://www.thd.org.tr/thddata/books/723/genetik-terimler-sozlugu.pdf> (Son Erişim Tarihi 10 Ağustos 2022)
2. Li C. Forensic genetics. *Forensic Sci Res.* 2018;3(2):103-104.
3. Saferstein R. *Criminalistics An Introduction to Forensic Science* (11th edition). Pearson Education Limited, 2015.
4. Yükseloğlu E.H. Olay yeri incelemesinde kimyasal temelli delil toplanması ve transferi. Salkım İşlek D, Yükseloğlu EH, editörler. *Adli Kimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2022.
5. Dash HR, Das S. Microbial degradation of forensic samples of biological origin: potential threat to human DNA typing. *Molecular biotechnology* 2018; 60(2): 141-153.
6. Karakuş O. *Kriminalistik* (2. Baskı). Adalet Yayınevi, 2013.
7. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737–738.
8. Bara N, Kumawat R, Imam J. *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*, Springer, 2018.
9. Verbenko D, Limborska SA. Hypervariable human minisatellite DNA markers: D1S80 locus in population studies. *Molecular Genetics Microbiology and Virology* 2008; 23(2): 53-62.
10. McKiernan HE, Danielson PB. Chapter 21 Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. Patrinos GP, editör. *Molecular Diagnostics* (3rd edition). Academic Press, 2017.
11. Dhaliwal A. DNA extraction and purification. *Materials and Methods* 2013; 3: 191.
12. Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci Int Genet.* 2008;2(3):226-230.

13. Bruijns B, Hoekema T, Oomens L, Tiggelaar R, Gardeniers H. Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica* 2022; 3(3): 371-384.
14. Rodger, A. Concentration Determination Using Beer-Lambert Law. Roberts GCK (editörler). *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, 2013.
15. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCAD%2FProduct-Bulletins%2FTN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> (Son Erişim Tarihi 20 Eylül 2022)
16. https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html?gclid=EAIaIQobChMIo9HL4LqJ_wIVx8rVCh0A0gzqEAAYASA_AEgKIBfD_BwE&ef_id=EAIaIQobChMIo9HL4LqJ_wIVx8rVCh0A0gzqEAAYASAAEgKIBfD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!393988168758!p!!g!!dna%20detection!7851124063!80648214174&cid=bid_pca_aqb_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con (Son Erişim Tarihi 20 Eylül 2022)
17. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series* 1992; 17-17.
18. Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 32(1), 31-38.
19. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol.* 2019; 36(2):116-117.
20. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction: basic protocols. *Methods Mol. Biol.* 1993; 15:1-29.

21. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/lecture/> (Son Erişim Tarihi 3 Şubat 2023).
22. <https://blogauraxis.wordpress.com/2021/09/11/covid-19-teshisinde-pcr-kullanimi/> (Son Erişim Tarihi 12 Mart 2023)
23. Butler, J. M., Buel, E., Crivellente, F., & McCord, B. R. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 2004; 25(10-11): 1397-1412.
24. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, 2012.
25. Kara U, Yükseloğlu EH. *Temel Adli Genetik*. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2015.
26. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*. 1951;15(4):323-354.
27. Barlas Öİ. *DNA STR Lokusları ile Oluşturulan Veri Tabanının PopGene İstatistik Programı ile Analizi*. [Doktora tezi]. İstanbul Üniversitesi, 2004.
28. Wyner N, Barash M, McNevin D. Forensic autosomal short tandem repeats and their potential association with phenotype. *Frontiers in genetics* 2020; 11: 884.
29. Butler JM. Short tandem repeat typing Technologies used in human identity testing. *BioTechniques* 2018; 43(4).
30. <https://strbase-archive.nist.gov/validation.htm> (Son Erişim Tarihi 15 Nisan 2023)
31. Butler JM, Coble M, Vallone P. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science Medicine and Pathology* 2007; 3(3): 200-205.
32. <https://strbase-archive.nist.gov/coreSTRs.htm> (Son Erişim Tarihi 9 Ocak 2023)
33. <http://www.iso.org> (Son Erişim Tarihi 9 Kasım 2022)
34. http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/qas_testlabs (Son Erişim Tarihi 11 Kasım 2022)

35. Wang DY, Chang CW, Lagacé RE, Calandro LM, Hennessy LK. Developmental validation of the AmpF ℓ STR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance. *Journal of forensic sciences* 2012; 57(2): 453-465.
36. Ludeman MJ, Zhong C, Mulero JJ, Lagacé RE, Hennessy LK, Short ML ve ark. Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *International journal of legal medicine* 2018; 132: 1555-1573.
37. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2023.
38. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4440211_AmpFISTR_IdentifilerPlus_UG.pdf (Son Erişim Tarihi 3 Mart 2023)
39. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4477604.pdf> (Son Erişim Tarihi 3 Mart 2023)
40. <https://e.fgidna.com/tests?id=31> (Son Erişim Tarihi 4 Nisan 2023)
41. Fung WK & Hu Y. Statistical DNA forensics: theory, methods and computation. John Wiley & Sons, 2008.
42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232608/> (Son Erişim Tarihi: 6 Kasım 2022)
43. Chang L, Yu H, Miao X, Wen S, Zhang B, Li S. Evaluation of a Custom SNP Panel for Identifying and Rectifying of Misjudged Paternity in Deficiency Cases. *Front Genet.* 2021;12:602429.
44. Paul G, Liu J, Ma P, et al. Genetic Polymorphism of 24 Autosomal STR in the Population of Rwanda. *Biochem Genet.* 2022;60(1):80-93.

45. Degerli I, Yukseloglu EH, Korkmaz M. Evaluation of the reliability of SE33 locus in forensic DNA identification in Turkish Population. *Medicine Science International Medical Journal* 2022; 11(3): 1044-8.



EK-2 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMUNDA OLMASI GEREKEN ASGARİ BİLGİLER

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	1/3

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

"Bir araştırma çalışmasına katılmak için davet edilmiş bulunmaktasınız. Aşağıdaki bilgileri okuduktan sonra çalışmaya katılmak isterseniz, bu formu imzalayınız. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edininiz."

BGOF asgari olarak aşağıda belirtilen başlıkları, açıklamaları ve bölümleri içermelidir:

- “Adli Kimliklendirme Çalışmalarında Kullanılan HUMDNA TYPING (Yanhuang-PCR) Kitinin Doğrulaması, Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi ve Türk Toplumundaki Alel Frekans Dağılımlarının İncelenmesi”** adlı çalışmaya davet edilmiş bulunmaktasınız.
- Çalışmanın bir araştırma olduğu**
Yapılacak çalışma akademik amaçlı bir araştırmadır
- Araştırmanın amacı,**
Kimliklendirme ve akrabalık tayini analizleri adli bilimlerde en çok başvurulan analizlerdir. Bu testler yürütülürken bakılan kısa ardışık tekrarlar (STR'ler) 2-6 baz çifti uzunlukta olan ve adli genetikte oldukça tercih edilen genetik belirteçler olmakla birlikte bireyler arası farklılık göstermektedirler. Kısa ardışık tekrar bölgelerinin ayırım gücünün yüksek olması ve eşleşme olasılığının doğru hesaplanması oldukça önemlidir ve bu özelliğin belirlenebilmesi adına popülasyon çalışmaları yapılarak alel frekansları belirlenmektedir. Aleller, aynı kromozom üzerindeki bir genin değişken formları olmakla beraber alel frekansı, bu gen çeşitliliğinin bir popülasyondaki görülme sıklığıdır. Diğer bir deyişle alel frekansları genetik çeşitliliğin bir yansımasıdır. Ayırım gücü yüksek lokusların yani toplumda alel frekansı düşük olan (az bulunan) bölgelerin tercih edilmesi, masum bir insanın şüpheli konumundan çıkarılmasına veya bir akrabalık analizinde yanlış eşleşme yapılmasının önüne geçmektedir. Yeni bir kit ile çalışırken izlenecek protokolün iddia ettiği şekilde vadettiği sonuçları yerine getirip getirmediğinin kontrolünün yapılması validasyon (doğrulama) işlemleri olarak adlandırılır. Çalışmada, 28 STR bölgesi içeren HUMDNA TYPING (Yanhuang) kitinin validasyonu yapılarak Türk toplumundaki alel frekans dağılımları incelenecektir. Bu tez çalışması ile birlikte Türk toplumu için HUMDNA TYPING (Yanhuang) PCR kitinin laboratuvarında validasyonunun ağız içi sürüntü örneklerinden yapılması ve akredite durumda olan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik Laboratuvarı'nın kapsam geliştirmesine yönelik alt yapı çalışmalarının oluşturulması hedeflenmektedir.
- Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre,**
Gönüllünün kabul ettiği tükürük örneğini vermesi dışında araştırmaya devam etmesi için öngörülen bir süre yoktur.
- Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı,**
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı 200 olarak belirlenmiştir.
- Araştırmada uygulanacak tedaviler,**
Araştırmada tedavi yöntemi uygulanmayacaktır.
- Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu,**
Gönüllülere tedavi yöntemi uygulanmayacaktır.
- Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü,**
Araştırma için gönüllülerden sadece vermeyi kabul ettiği vücut sıvısı örneği/örnekleri alınacaktır. Araştırma sırasında gönüllülerden ağız içi sürüntü çubuğu yardımı ile tükürük örneği toplanacaktır.
- Araştırmanın deneysel kısımları,**
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nu imzalayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, 18 yaş üstü rastgele seçilmiş yaklaşık 200 (kadın-erkek) gönüllüden ağız içi sürüntü çubuğu yardımıyla alınan tükürük örnekleri çalışma zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edilecektir. Sonrasında, biyolojik örneklerden DNA'nın silika yöntemi ile izolasyonu, elde edilen izolatlardan DNA' nın florometrik yöntemle miktar tayini, çalışılacak STR lokuslarının PCR ile çoğaltılması, çoğaltılan STR lokuslarının kapiler elektroforez ile tiplendirilerek sonuçların görünür hale getirilmesi ve validasyon hesaplamalarının Excel programı, popülasyon genetiği dataları Arlequin 3.5 - Population Genetics programları kullanılarak hesaplanması adımları sırasıyla takip edilecektir.
- Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere),**
Gönüllülerin maruz kalacağı herhangi bir risk veya rahatsızlık öngörülmemektedir.
- Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirileceği,**
Çalışmada gönüllünün sağlayabileceği bir klinik yarar bulunmamaktadır.
- Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri,**
Gönüllüye uygulanabilecek alternatif tedavi yöntemleri bulunmamaktadır.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMUNDA OLMASI GEREKEN ASGARİ BİLGİLER

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	2/3

13. **İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler,**
Çalışmada herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.
14. **Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler,**
Gönüllülerin ulaşım, yemek gibi masraflarına ilişkin bir ödeme yapılmayacaktır.
15. **Gönüllülerin sorumlulukları,**
Gönüllülerin tükürük vermeleri dışında hiçbir sorumlulukları bulunmamaktadır.
16. **Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği,**
Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.
17. **Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı,**
Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.
18. **İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı,**
İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri olacaktır. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.
19. **Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği,**
Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceğini taahhüt ederim.
20. **Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları,**
Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler proje yürütücüsü Nazlı Hölümen, Danışman Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu'dur. 24 saat boyunca ulaşabilecekleri telefon numaraları sırası ile 05394999630, 05052213407'dir.
21. **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler,**
Gönüllülerin araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek herhangi bir durum veya neden bulunmamaktadır.
22. **Çalışma sonrası araştırma ürünlerine erişim,**
Çalışma sonrası araştırma ürünlerine yapılacak tez çalışması ile ulaşılabilir.
23. **Gönüllülerden alınacak biyolojik materyallerin ne olduğu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması),**
Gönüllülerden tükürük örneği toplanacaktır. Bu biyolojik örneğin seçilme amacı, tıbbi personel gerekmezsin daha kolay toplanabilir ve muhafaza edilebilir olmasıdır. Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nde toplanacak ve analiz edilecektir. Analizler yurtdışında yapılmayacaktır.
24. **BGOF'nin imza bölümünde;**
"Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum" ifadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.
25. **"Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum" ifadesi**
gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMUNDA OLMASI GEREKEN ASGARİ BİLGİLER

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	3/3

26. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih,

27. Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih,

28. Gerekliyse olur işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih,

29. Gerekliyse anne ve baba veya kanuni temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih,

İleride yapılacak araştırmalar için;

30. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabilceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“Adli Kimliklendirme Çalışmalarında Kullanılan HUMDNA TYPING (Yanhuang-PCR) Kitinin Doğrulanması, Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi ve Türk Toplumundaki Alel Frekans Dağılımlarının İncelenmesi” adlı araştırma kapsamında ağız içi sürüntü çubuğu yardımı ile alınan tükürük örneğinin, (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir.)

☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllünün Adı:

Yetkin Araştırmacının Adı: Genetik mühendisi ve biyomühendis Nazlı

Gönüllünün Soyadı:

Yetkin Araştırmacının Soyadı: Hölügen

Gönüllünün Cinsiyeti: Kadın ☐ Erkek ☐

Gönüllünün Yaşı:

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

Gönüllünün İmzası:

Pediyatrik çalışmalar için;

31. Bu çalışma pediyatrik popülasyonda yürütülmeyecektir.

ÖZGEÇMİŞ

Genetik Mühendisi ve Biyomühendis NAZLI HÖLÜMEN

Kişisel Bilgiler

E-posta:

Eğitim Bilgileri

Lisans, Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik, Türkiye
2014 - 2019

Yabancı Diller

İngilizce, C1 İleri Seviye

Yayınlar

Holumen N. Usage areas of microrna (miRNA) in forensic genetics. NOFOR. 2022;1(1):14-7.
DOI: 10.5455/ NOFOR.2022.06.02

Yukseloglu EH, Holumen N, Karatas O, et al. Identification methods in mass disasters.
NOFOR. 2023;2(1):. DOI: 10.5455/NOFOR.2023.03.0

Islek DS, Kula FB, Kiris E, et al. Detection of alcohol use: guidance of direct biomarker
phosphatidylethanol. NOFOR. 2023;2(1):18-20.

Karatas O, Altuncul H, Holumen N, et al. Mitochondrial DNA (8389-8865 base pairs) mutation
search in Turkish population. NOFOR. 2023;2(2):21-5. DOI: 10.5455/NOFOR.2023.03.06

Kitap Bölümü

Karataş Ö, Hölümen N. Bölüm 10: Adli Bilimlerde Lif İncelemeleri ve Kumaş Hasar Mekanizmaları. Salkım İşlek D, Yükseloğlu EH, editörler. Adli Kimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 2022.

Kongre ve Sempozyum Katılımı

3. Türk Adli Bilimler Kongresi, Panelist, Antalya, Türkiye, 2022

13th Annual Scientific Meeting Balkan Academy of Forensic Sciences, Konuşmacı, Priştine, Kosova, 2022.

Projeler

TÜBİTAK 1002-A PROJESİ (2023-2024): Kalem ve Yazıcı Mürekkeplerinin Yapısındaki Çözücülerin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) İle Yapı ve Yaş Tayini: Belge Sahteciliğinin Tespiti