



Adli Biyolojik İncelemeler ve
Molekuler Genetik Kursu

DNA TİPLEME YÖNTEMLERİ (SOMATİK STR LOKUSLARI)

Yrd. Doç. Dr. GÖNÜL FİLOĞLU
İ.Ü. ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

KRİMİNAL İDANTİFİKASYONDA DNA TİPLEMESİ

- Molekuler biyoloji alanında sağlanan aşama, genetik çeşitliliğin genomik düzeyde incelenmesine olanak vermiştir.
- Söz konusu teknolojik gelişmeden önce, kimliklendirmede, polimorfik özellik gösteren eritrosit antijenleri, protein ve enzimlere dayalı yöntemler kullanılmaktaydı.
- Ancak ısı, nem ve benzeri çevresel faktörlerden etkilenebilen bu tür sistemlerle, yüksek güvenilirlik ve olasılıkta sonuca ulaşmak mümkün değildi.

KONVANSİYONEL SİSTEMLER

- Taze kan ve kan lekelerinde etkin kullanılabiliyordu
- Tüm biyolojik materyallere uygulanamıyordu
- Tek sistem değil tüm sistemleri çalışmak gerekiyordu
- Yüksek miktarda ve kalitede başlangıç örneği gerektiriyordu

DNA TEKNOLOJİSİ

- Oysa DNA teknolojisi, konvansiyonel olarak da adlandırılan bu sistemlere göre doğrudan bilgi verici olup kötü şartlarda muhafaza edilmiş, eser miktardaki her tür biyolojik örnekten yüzde yüze yakın doğrulukta tiplleme yapmayı mümkün kılmaktadır

ADLİ DNA TİPLEME TARİHÇESİ

- 1980 - Ray White ilk polimorfik RFLP markırını tanımladı.
- 1985 - Alec Jeffreys multilokus VNTR problemlerini keşfetti.
- 1985 – PCR'a dayalı ilk makale yayınlandı.
- 1988 - FBI DNA vaka çalışmalarına başladı.
- 1991 - STR ile ilgili ilk makale yayınlandı.
- 1995 – İngiltere DNA veri bankası çalışmalarına başladı.
- 1998 – Amerika'da FBI CODIS veri tabanını kurdu.

TÜRKİYE'DE ADLİ DNA TİPLEME TARİHÇESİ

- 1993 - PCR'a dayalı ilk DNA çalışması yapıldı.
- 1996 - STR' a dayalı vaka çalışması yapıldı.
- 1998 – DNA veri bankası konuşulmaya başlandı.

DNA'NIN TEKRAR BÖLGESİ

- ⊙ DNA molekülünün tümü protein üretiminden sorumlu değildir.
- ⊙ DNA molekülünde, protein kodlayan ve kodlamayan bölgeler bulunmaktadır.
- ⊙ Protein kodlayan kısım tüm genomun % 3'ünü oluşturmaktadır.
- ⊙ Geriye kalan kısmı ise tekrarlardan oluşur.

TEKRARLANAN DNA DİZİSİNİN EVRİMİ

- ⊙ Dizinlerin tekrarlayan dizin haline gelmesinin nedeni birden fazla kopyalarının yapılmasıdır.
- ⊙ Tekrarlanan DNA dizininde rol oynayan mekanizmalar: rekombinasyon, replikasyon ve transpozisyonudur.
- ⊙ Evrim sırasında tekrar dizinlerin çoğalma oranlarının artması yada azalması tekrar ünite sayısını belirlemektedir.

TEKRARLANAN DNA DİZİSİNİN EVRİMİ

- Olağan bir asimetri yada mutasyon kutuplaşması sonucu VNTR ve STR lokusları oluşur .

- Tekrarlayan dizilerin halen biyolojik fonksiyonları ve önemi bilinmemesine rağmen adli bilimler açısından kişileri birbirinden ayırmaya yarayan son derece değerli bölgelerdir.

- Tüm insanlarda aynı diziler bulunur.

- Ancak bu dizilerin **tekrar sayıları** kişiden kişiye çeşitlilik gösterir.

Tekrar eden dizi sayısının büyüklüğüne Göre ;

Genom içerisinde farklı şekillerde tekrar eden bölgeler bulunmaktadır.

- Minisatellitler **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeat) 9-80 bç
- Mikrosatellitler **STR** (Short Tandem Repeat) 2-6 bç

VNTR'LARIN ÖZELLİKLERİ

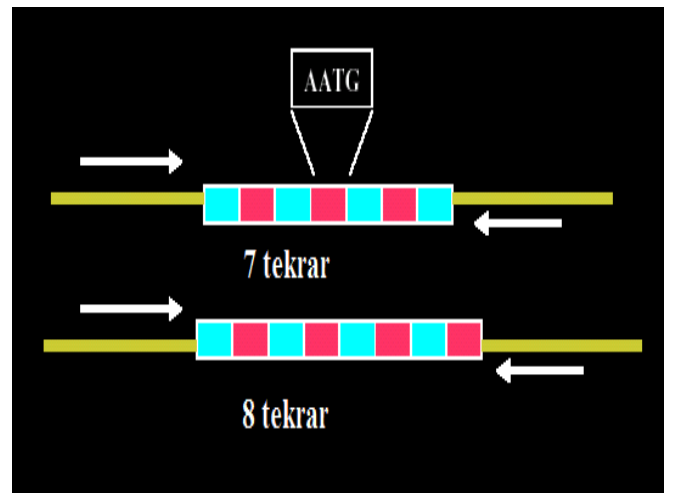
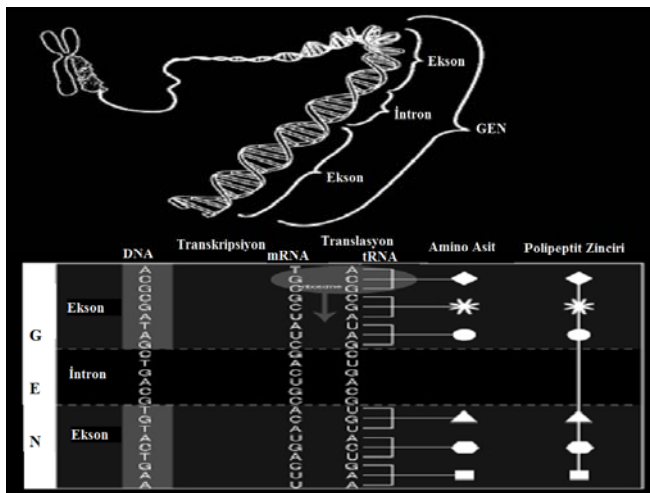
- VNTR'larda tekrar eden dizi 9-80 bç arasında olabilmektedir.
- Her lokusta çok sayıda alel olması VNTR'ların ayırım gücünü artırmakta, ancak alel boyutları büyük olduğundan çok iyi korunamamış örneklerde amplifikasyon sorunları yaşanabilmektedir.
- Bundan dolayı kullanım alanı sınırlı kalmıştır.

STR'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

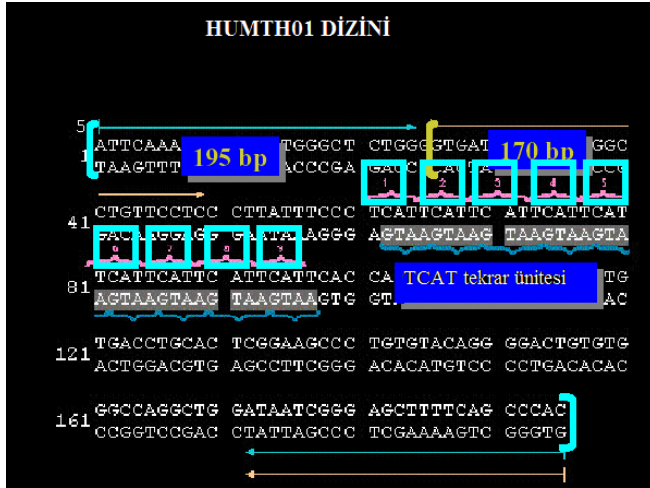
- İnsan genomunda yaklaşık 500.000 STR lokusu olduğu tahmin edilmektedir.
- Bunun 6000-10.000'i trimerik ve tetramerik tekrarlardan oluşmaktadır .
- Her 15 kb'da bir bu tür tekrarlara rastlamak mümkündür.
- Bu tekrarlar genom içinde di- tri- tetra- ve penta dizileri şeklinde ardışık olarak tekrar ederler.

TEKRAR EDEN DNA DİZİSİ

- DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerinde (intron) ardışık tekrar eden diziler bulunmaktadır.
- Bu diziler Mendel kalıtımına uyan kalıtsal karakterler olup, tekrar sayılarındaki çeşitlilikten dolayı polimorfiktirler.
- Bu dizilerin sayıları kişiden kişiye çeşitlilik gösterir. Bu çeşitlilik polimorfizme neden olur.



HUMTH01 DİZİNİ



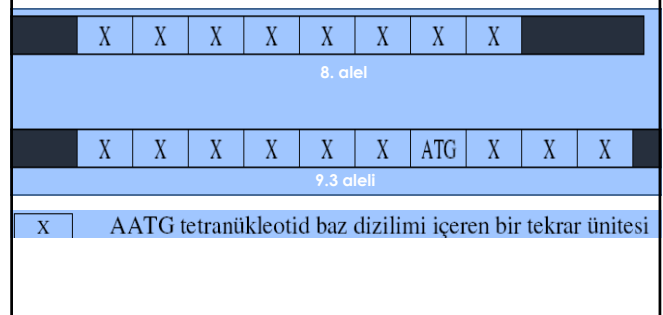
STR'ların Adlandırılması

- STR lokus alellerinin adlandırılması geçmişte hep tesadüfi olmuştur.
- Ancak adli bilimler laboratuvarları arasında verileri karşılaştırılabilmek amacıyla adlandırmada standardizasyona gidilmiştir.
- Uluslararası Adli Hemogenetik Topluluğu DNA komisyonu 1992 yılında yayınlamış olduğu önerileri doğrultusunda yapılan adlandırma; Alellerin tekrar sayısı temel alınmıştır.

STR'ların Adlandırılması

- Ara aleller için (TH01'deki 173 bç'lik 9.3 alelinde olduğu gibi) farklı adlandırma uygulandı.
- STR lokusu, protein kodlayan genlerin içinde ise protein kodlayan zincirin adı kullanılmalıdır.
- STR kokusu, proteini kodlayan genle bağlantısı yoksa D#S# şeklinde adlandırılır ve ilk tanımlandığı ve yayınlandığı şekil temel alınır.

TH01 lokusunun 9.3 aleli



STR TİPLEMESİNİN ADLİ BİLİMLER LABORATUVARLARINDA STANDARDİZASYON ÇALIŞMALARI

- Avrupa ve ABD’de STR lokuslarının adli bilimlerde kullanımı ve standardize edilmesi EDNAP(Eurupean DNA Profiling Group), TWGDAM (Technical Working Group on DNA Analysis Method) ve ASCLD (American Society of Crime Laboratory Directors) tarafından ele alınmıştır.
- EDNAP üyeleri 1992/93 yıllarında ilk olarak, Avrupa’da faaliyet gösteren adli bilimler laboratuvarlarında STR analizinin uygulanabilir olduğunun araştırılması ve standardize edilmesi ile ilgili çalışmaları başlatmıştır.

- Yapılan çalışmanın sonucunda; farklı elektroforez sistemleri ve görünürleştirme yöntemlerine rağmen tüm laboratuvarlarda söz konusu STR lokuslarının tekrarlanabilir olduğu gözlenmiştir.
- Standardizasyon çalışmaları sonucunda hata oranı en aza indirgenmiştir.

STR’LARIN TİPLEMEDE AVANTAJLARI

- Ayırtılma gücü yüksek olan bu genetik işaretler, adli olgularda diğer polimorfik sistemlere gerek kalmadan kullanılabilirler.
- Alel büyüklükleri 350 bp’den küçük olması eski ve iyi korunmamış biyolojik örneklerde kolaylıkla tipleme imkanı sağlamaktadır.
- Ayrıca; otomasyon ve çoklu analize imkan vermesi, pahalı donanım gerektirmemesi adli bilimler için ideal markırlar haline gelmiştir.

MULTİPLEKS STR SİSTEMLERİNİN AVANTAJLARI

- Adli olguların aydınlatılmasında multipleks sistemlerle çalışmak bir çok avantaj sağlamaktadır.
- Çok az DNA örneğinden aynı anda birkaç STR lokusunun amplifikasyonu yapılabilir ve elektroforezde tek yükleme ile bir çok lokus aynı anda incelenebilir.
- Her bir lokusun tek başına ayırtma gücü sınırlı iken üç ya da dört lokusun birleştirilmesi sonucunda ayırd etme gücü yüksek, tek bir sistem oluşacaktır.
- Çalışma süresi ve maliyet azalır.

Ticari kitler

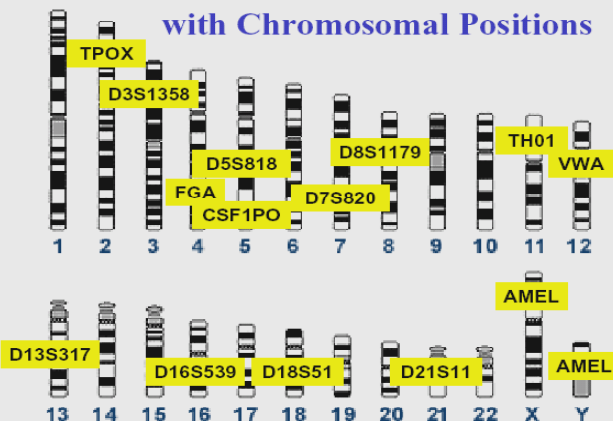
AmpF[®]STR[®] Identifier[®] PCR Amplification Kit



Adli bilimlerde yaygın olarak kullanılan STR lokusları

Locus Designation	Chromosome Location	Alleles included in Identifier [®] Allelic Ladder	Dye Label
D8S1179	8	8-19	6-FAM [®]
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25-28, 29.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38	
D7S820	7q11.21-22	6-15	
CSF1PO	5q33.3-34	6-15	
D3S1358	3p	12-19	VIC [®]
TH01	11p15.6	4, 6, 8, 10, 11, 12, 2	
D13S317	13q22-31	8-15	
D16S539	16q24-qter	5, 8-15	
D2S1338	2q35-37.1	15-28	
D19S433	19q12-13.1	9-12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED [®]
vWA	12p12-pter	11-24	
TPOX	2p23-2per	6-13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11-13, 13.2, 14, 14.2, 15-27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET [®]
D5S818	5q21-31	7-16	
FGA	4q28	17-26, 26.2, 27-30, 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	

13 CODIS Core STR Loci with Chromosomal Positions



Combined DNA Index Systems (CODIS)

- FBI tarafından kurulan DNA veri bankasıdır.
- Şüphelilerin DNA profillerini kullanarak, daha önce sistemde var olan profillerle karşılaştırmaya ve ayırt etmeye yarayan elektronik veri tabanıdır.

CODIS

- CODIS sistemi sayesinde, elektronik olarak DNA profillerinin yerel, eyalet ve federal polis laboratuvarları arasında entegrasyonunu sağlamış olması sonucunda,
- seri suçlar arasında bağlantı kurulmakta ve suçluların olay yerinde bıraktıkları delillerin DNA profillerinin mukayese edilmesiyle failer tespit edilebilmektedir-

STR TİPLEME AŞAMALARI

- Çeşitli biyolojik materyalden DNA'nın izole edilmesi
- İstenilen STR lokusun yada lokuslarının PCR yöntemiyle amplifikasyonu
- STR -PCR ürünlerinin elektroforezi
 - > Poliakrilamid jel elektroforezi
 - > Kapiler elektroforez
- Sonuçların değerlendirilmesi

PCR

Tek bir döngüde

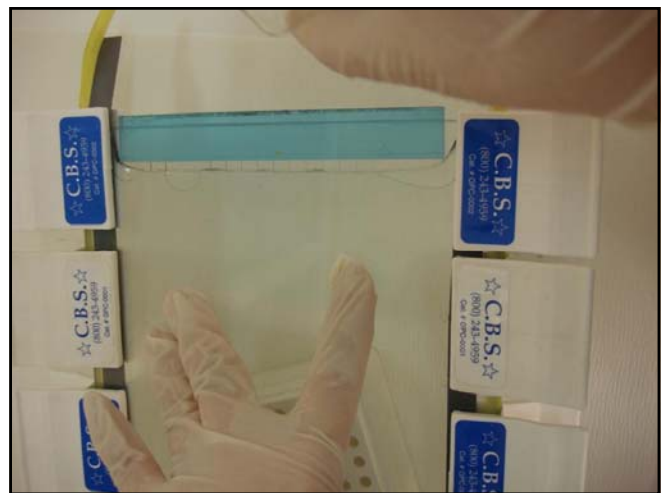
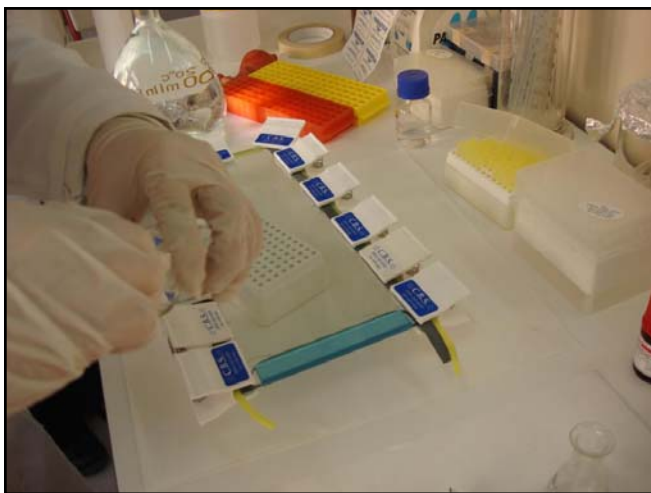
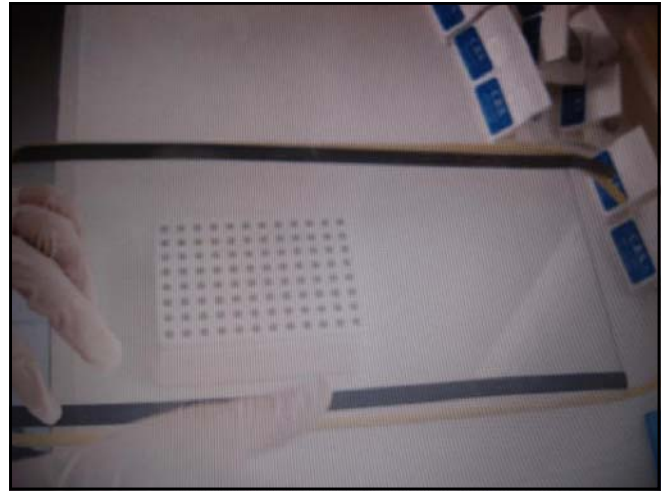
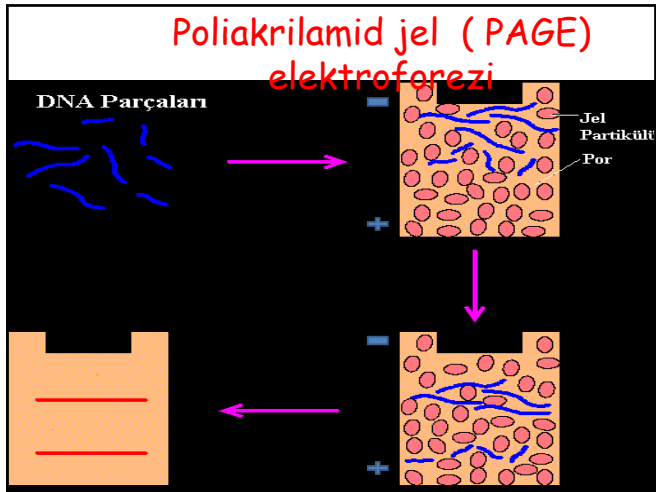
1. Denatürasyon 95-97 °C
2. Bağlanma 50-70 °C
3. Uzama 72 °C

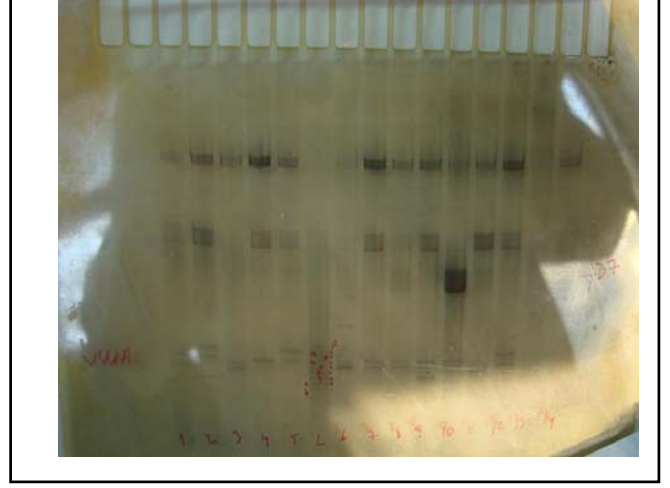
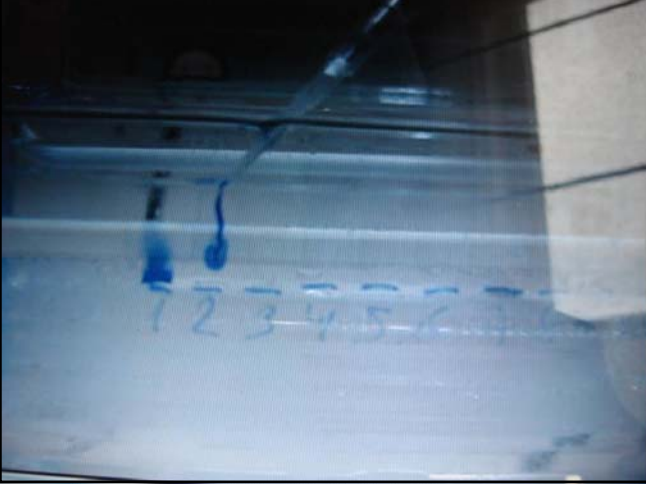
Her döngü sonunda hedef DNA parçasının her iki iplikçığının birer kopyası yapılmış olur.

30-40 döngü sonunda hedeflenen DNA parçasından milyonlarca kopyası çoğaltılır.

PCR sonrası STR- Lokuslarının görünürleştirilmesi

- Yüksek ayırma gücüne sahip denatüre Poliakrilamid jel (PAGE) elektroforezi kullanılır.
- DNA parçacıkları gümüş nitrat ile görünürleştirilir.
- Yöntem pahalı değildir.





Kapiler Elektroforez (CE)

- PCR ürünleri floresan ile işaretlenir.
- İnce kapillere (50 μ m) yüksek voltaj uygulanır.
- Jel dökme ve örnek yükleme otomatik yapılır.

Kapiler Elektroforez (CE)

- STR'lar saatler yerine dakikalar içinde tiplenir.
- İşaretli STR-PCR ürünleri kapilerde ilerledikçe detektör tarafından okuma yapılır.
- Birkaç florofor kullanarak çıkan STR lokusları aynı anda tiplenebilir.

