

HLA DQA1' İN PCR ÜRÜNLERİNİN KAPİLLER JEL ELEKTROFOREZİ*

Sevgi YILMAZ, Salih CENGİZ

Background.- HLA DQA1 loci are highly informative polymorphic loci that are gaining popularity for identity testing. HLA DQA1 system easy to work with, fast and reliable. This loci with PCR technique is a very promising tool for genetic investigations in both paternity and crime cases.

Design.- Human genomic DNA was extracted by Chelex(r) 100 procedure. The amplification of HLA DQA1 locus was performed by single locus PCR reaction in the case of HLA DQA1 locus according to the manufacturer's recommendations using the Perkin Elmer AmpliType DQA1 PCR Amplification Typing Kits. The electrophoresis of PCR products of HLA DQA1 are carried out on agarose gel.

Results.- It was shown from the obtained bands that the DNA is amplified. Hybridization is made from the PCR products by Perkin Elmer AmpliType DQA1 PCR Amplification Typing Kits and that typed as 2,3 as a result and this allele was compared with the Capillary electrophoreograms.

Conclusion.- In this study, Capillary gel electrophoresis (CGE) was performed on PCR products of HLA DQA1 due to its advantages are ultra-resolution, ultralow sample volume, extremely high efficiency, rapid separation time, easy quantitation and amenability to automation.

Yılmaz S, Cengiz S. Capillary gel electrophoresis of PCR products of HLA DQA1. Cerrahpaşa J Med 1999; 30 (3): 221-227.

Kapiller elektroforez çözelti içindeki partiküllerin elektriksel alan etkisi altında göç etmesi prensibine dayanan yeni ve güçlü bir analitik ayırma tekniğidir.^{1,2} Yüksek ayırma gücü, kolay miktar hesabı, kısa analiz süreleri, çok az hacimde örneğin kullanılması basit yöntem geliştirme imkanı ve otomatik cihaz gelişimi, yöntemin en önemli avantajlarıdır. Bu yöntemle hemen hemen her alanda araştırmalar yapılabilir (Biyolojik, tarım, ziraat, genetik, adli tıp araştırmaları).³⁻⁷ Son yıllarda analitik kimyada, özellikle protein ve DNA ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. 1960'lı yıllardan bu yana kromatografi ve bununla ilgili yöntemlerdeki gelişmeler yeni bilgilerin hızla birikimiyle birlikte ileri bir düzeye ulaşmıştır. Kromatografik yöntemler ile yapılan ayırma ve analizler oldukça doğru ve büyük olasılıkla kesin ölçümler sağlamaktadır. Ancak kapiller elektroforezin (CE) gündeme gelmesi ve özellikle kapiller elektroforezde otomasyonun uygulamaya konulması ile diğer yöntemlerde ortaya çıkan sorunların kapiller elektroforez uygulamaları sırasında ortadan kalktığı görülmüştür.⁷ İlke olarak kapiller elektroforezin çok basit bir enstrumantasyona gereksinim vardır. En basit olarak ± 30.000 voltluk bir güç kaynağı, bir kapiller tüp, iki elektrod tampon haznesi, elektrodlar ve bir dedektörden ibarettir. Kapiller tüpte elektroforez geliştikten sonra iyonik türlerin ve makromoleküllerin hızlı, etkin bir şekilde ayırımları ve analizleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların içinde en sık kullanılanları; kapiller zon elektroforezi, kapiller elektrokinetik kromatografi, kapiller jel elektroforezi ve kapiller izoelektrik odaklamadır.⁷ Bu çalışmada ise kapiller jel elektroforezi kullanılmıştır.

Kapiller Jel Elektrofrezisi (CGE)

Kapiller jel elektrofrezinde temel ayırma mekanizması; jelle doldurulmuş kapillerde gözeneklerden geçerek göç eden moleküllerin büyüklükleri arasındaki farka dayanır. Jeller diğer jel elektrofrezinde olduğu gibi moleküler elek gibi davranırlar ve zon genişlemesinin önüne geçerler. Ayrıca kapiller duvarına analizi yapılan molekül veya türlerin yapışmasını engellerler. En önemlisi elektroozmotik akışın ortadan kaldırılmasını ya da kontrol altına alınmasını sağlar. Elektroozmotik akış kaldırılırsa anyonlar anoda, katyonlar katoda yönelir. Nötral maddeler ise enjeksiyon yerinde kalır.⁷

Kapiller jel elektrofrezisi (CGE) ile; DNA karışımlarının, oligonükleotidlerin, dizi oluşturan ürünlerin, restriksiyon parçacıklarının, PCR ürünlerinin ayırımında, metil sellüloz, hidroksi propil sellüloz, hidroksi etil sellüloz gibi birçok farklı polimer çözeltilerinin ayırıcı ortam olarak kullanılarak çok yüksek ayırıcılıkla analizlenmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır.^{8,9} HLA DQA1 Lokusu HLA (İnsan Lökosit Antijeni) genleri ve onların polimorfizmleri ile ilgili özellikler serolojik olarak iyice belirlenmiştir. Bunların Mendel kalıtım şekilleri de iyice belgelenmiştir.^{10,11} HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolunda (6p 21.3) yer alır ve üç sınıfta toplanır. Sınıf-1 olarak adlandırılan HLA-A, B, C lokusları, Sınıf-2 olarak adlandırılan HLA DR, DQ ve DP lokusları, ile bir dizi suda çözünür protein kodlayan genlerden oluşan gen dizisi, topluca sınıf-3 olarak da adlandırılmaktadır.¹²⁻¹⁴ Sınıf 1 HLA A ve B molekülleri çoğu hücrelerin yüzeyinde bulunur. Kemik iliği transplantasyonundaki önemleri, otoimmün ve diğer hastalıklara karşı duyarlılığı ile olan ilişkileri yönünden sınıf 2 HLA molekülleri ve onların genetik özellikleri iyice belirlenmiştir. Sınıf 2 HLA molekülleri organizmada özellikle B hücreleri, makrofajlar ve etkin T hücrelerinde bulunurlar. Bunlar klasik doku transplantasyon antijenlerinden farklılıklar gösterirler.¹⁵ Sınıf 2 HLA molekülleri birbirleriyle non-kovalent olarak bağlantılı bulunan 2 zincir (α ve β) den oluşan heterodimerik glikoproteinlerdir.¹⁴ Günümüzde genetik yapısı aydınlatılmış ve yüksek polimorfizm gösteren lokuslardan biri olan sınıf 2 grubu antijenlerini kodlayan HLA DQA1 dir. HLA DQA1, büyük doku uygunluk kompleksinin (MHC) gen ürünlerinden biri olup, 2. sınıf HLA antijenleri grubuna dahil edilir. Antijeni kodlayan gen polimorfiktir.^{16,17} Adli Bilimler ve Tıp Bilimleri alanında kullanılabilen bir sistem olduğundan DNA düzeyinde HLA DQ tiplenmesi için bir çok teknik kullanılmıştır. Bu tekniklerin tümünün esası DNA daki hedef bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayanır.

HLA DQA1 lokusu adli bilimlerde kişi identifikasyonunda ve nesep (babalık) tayini çalışmalarında kullanılan bir DNA lokusudur. Bu polimorfik sistemin kullanılabilirliğini artırmak amacıyla bir çok popülasyonlarda frekans hesabı yapılmıştır.¹¹ Bu lokusun PCR ürünleri 239/242 bp arasında olup, bu lokusa ait 7 alel (1.1, 1.2, 1.3, 2.3, 4.1, 4.2/4.3) bulunmaktadır. Bu güne kadar bu lokusa ait alel ve genotip frekansları Amerikan ve bazı Avrupa toplumlarında hesaplanmıştır.^{18,19}

Bu çalışmanın amacı 75 mikron iç çaplı ve 45 cm uzunluğundaki kapiller kolonun laboratuvarımızda lineer poliakrilamid jel ile doldurularak TSP (Thermo Separation Products) Spectraphoresis 2000 Kapiller Elektrofrez sistemine takılması ile Barron AE. ve arkadaşlarının uyguladıkları % 0.25'lik lineer bağlı hidroksipropil sellüloz çözeltisini²⁰ kullanarak HLA DQA1'in PCR ürünlerinin ayırımını sağlayarak adli bilimler laboratuvarlarında kullanıma sunmaktır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Kapillerin Jel İle Doldurulması

- 1- İç çapı 75 µm., uzunluğu 45 cm olan silika kapiller kolon alındı. Dedeksiyon için gerekli olan optik pencere, kapilleri kaplayan polimer tabakanın (kapiller kasetin mercek bölümüne yakın tarafından 8-9 cm arası) 0.5 cm kadar alevle yakılmasıyla açıldı ve alkolle temizlendi.
- 2- Her deneyden önce yeni ve kaplı olmayan kapiller, 1 saat 1 M NaOH, 30 dakika 0.1 M NaOH ile muamele edildi.
- 3- Kapiller kolondan 5 dakika, 80µL MAPS (γ-methacryloxypropyltrimethoxysilane) ve 20 mL distile su karışımını (asetik asit ile pH:3.5'e ayarlanarak) geçirildi.
- 4- MAPS çözeltisi 1 saat oda ısısında kapiller kolonda bırakıldı.
- 5- Kapiller kolon 5 dakika distile su ile yıkandı.
- 6- %4 (w/v)'lük akrilamid çözeltisine polimerizasyonu sağlamak için mililitre başına 1 µL. TEMED ve 1 mg. Potasyumpersülfat eklenerek 30 dakika boyunca kapiller kolondan geçirildi.
- 7- 5 dakika distile suyla yıkanarak kapiller duvarına yapışmayan akrilamid artıkları dışarı atıldı.
- 8- Kapiller kolon, 35 °C'de 1 saat kurutuldu.²¹

Dökme jel elektrofrezinde tiplenen PCR ürünleri, otoklavlanmış pipet uçlarıyla ve yine otoklavlanmış mikrovial (500 µL hacimli şişe)'le konularak enjeksiyon gerçekleştirildi. Enjeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra mikrovial içindeki PCR ürünleri -20°C'de saklandı. Her enjeksiyondan önce ve sonra kapiller, çalışma tamponu ile 3 dakika yıkandı. Çalışmamızda kullanılan TBE Çözeltisi 89 mM Tris Base, 89 mM Borik asit, 5 mM EDTA, %0.25 HPC (Hidroksipropil sellüloz) dan oluşacak şekilde hazırlanarak , NaOH ile pH: 8.13 e ayarlandı. Otoklavlanarak buzdolabında saklandı.

Kapiller Elektrofrez Cihazının Koşulları

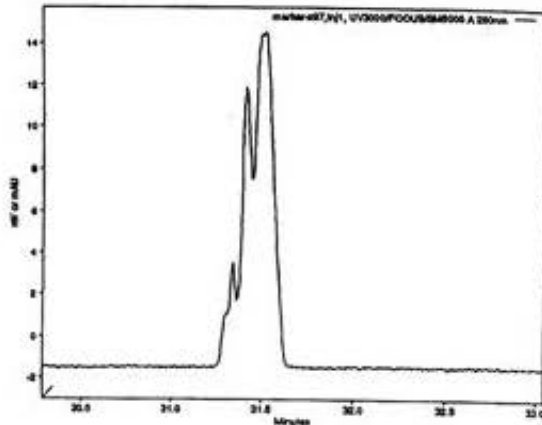
Kapiller Tipi: Poliakrilamid ile kaplı kapiller; Enjeksiyon Tipi: Elektrokinetik; Enjeksiyon Zamanı: 8s; Voltaj: -28 kV; Enjeksiyon Voltajı: 10 kV; Akım: 90 µA; Standart Sıcaklık: 30°C; pH: 8.13; % HPC: 0.25

İlk kez Hjerten'in kullandığı ve kapiller yüzeyinin silan kısmına kovalent bağlanan bir madde olan γ-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MAPS) bu çalışmada camla etkileştirilmiş ve açıkta kalan metakril grubuyla, sonradan eklenen akrilamid bağlanarak cam yüzeyine bağlı polimer oluşturulmuştur. Bu tür polimerizasyon elektroozmotik akışı engellediği gibi analitin kapiller duvarına yapışmasını en aza indirir. Metod temel olarak MAPS'in bifonksiyonel özelliğinden kaynaklanır ve birinci grup kapiller duvarıyla bağ yaparken diğer metakril grubu polimerizasyonda görev

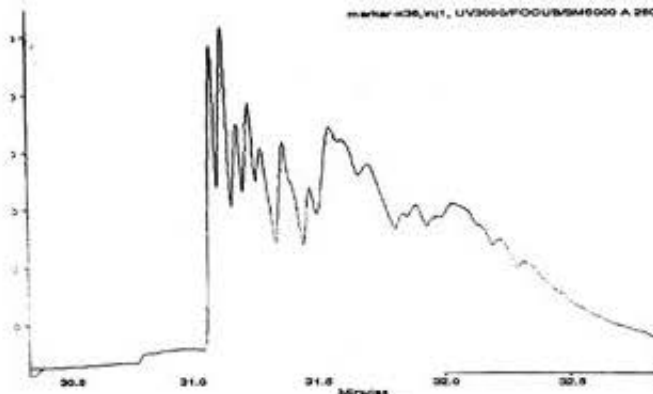
ahr.⁷ Kapiller jel ile yapılan çalışmalarda daha çok poliakrilamid ve agaroz doldurulmuş kapiller kullanılmaktadır. Bu çalışmada da kapiller, Poliakrilamid ile kaplanarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Tüm PCR ve standart ürünlerinin ilk dakikalarda çıkan eşdeğer dört dNTP pikleri iyi birer iç standart görevi görmüşlerdir. Bunlar PCR' da kullanılan dNTP'ler olan Adenin, guanin, timin, sitozin dir. Bu piklerin iç standart olarak kullanılması en önemli faydası kapiller jelin çalışma sırasında bozulmaya başladığını veya iyi sonuç vermediğini anlamaadaki belirteç işlevidir. HLA DQA1 lokusu için PCR çalışmasından sonra, izole edilen DNA'nın varlığını ve çoğaldığını tespit etmek amacıyla agaroz jel elektrofrezisi yapıldı. Çoğaldığı kesinleşen PCR ürününün Perkin Elmer'in DQA1 AmpType kitiyle tiplemesi yapıldı ve 2,3 olarak tiplendirildi. Tiplendirilen bu PCR ürününün, yapılan kapiller elektrofrezisinde 31-32 dakikalar arasında 2 pik görüldü (Şekil 1). Bu aralıklarda gelen 2 pikin gerçekten PCR'da çoğalan ürünün HLA DQA1 olduğunu doğrulamak için de DNA standardının (Boehringer Mannheim, Marker 8, 19-1114 baz çifti içermektedir) kapiller elektrofrezisi yapıldı. dNTP alkonma zamanlarına göre düzenlenmiş olarak elde edilen elektrofrezogramlarda 31-33. dakikalar arasında denk düşen bölgede 17 pikin ayrıldığı görüldü. Bu 17 pikin PCR ürün pikleri ile aynı bölgede oluşu ve bu durumun standart için 20 ve PCR ürünü için 50 kez tekrarlanabilmesi, HLA DQA1 PCR ürününün elektrofrezogramındaki baz çifti sayıları HLA DQA1 e uyum pikler olduğuna en önemli delildir (Şekil 2).



Şekil 1. HLA DQA1 PCR ürününün kapiller elektrofrezogramı.



Şekil 2. HLA DQA1 Standardının (Boehringer Mannheim, Marker 8) kapiller elektrofrezogramı.

TARTIŞMA

Kapiller jel elektrofrez (CGE) DNA ve protein ayırımında hızla gelişen yeni bir analitik tekniktir. Yüksek ayırım gücü, verimlilik, hızlı ayırım süresi, kolay miktar hesabı ve otomasyona uygunluk gibi birçok avantajı vardır. Biomedikal (rutin ilaç analizleri) sahada birçok ilginç uygulamaların ortaya çıktığı görülmüştür.^{6,22,23} Kapiller elektrofrez PCR ile ortaya çıkan nanogram altındaki miktar DNA parçalarının analizinde de kullanılmaktadır.²⁴ Bazı çalışmalarda baz dizinleri 18 nükleotitten oluşan, fakat baz içerikleri farklılık gösteren iki ayrı oligonükleotid, lineer ve çapraz bağlanmış kapillerden geçirilerek karşılaştırma yapılmış, sonuçta çapraz bağlanmış poliakrilamid jelle, ayırımın daha iyi gerçekleştiği görülmüştür.²⁵ Ancak lineer polimerlerle yürütülen CE uygulamalarının birçoğunun klasik, çapraz bağlanmış poliakrilamid jel kapiller elektrofrezine göre bazı üstünlükleri vardır. Lineer polimerler homojen elek yapıları sağlarlar. Bu nedenle yüksek elektrik alanlarda oluşan hava kabarcıklarının neden olduğu zarara daha az duyarlıdır.

Bu çalışmada kullanılan sellüloz türevleri piyasada kolay bulduklarından, suda kolay çözündüklerinden ve kapillere kolay pompalanma özelliklerinden dolayı² önemli kolaylıklar sağlamıştır. Kovalent bağlanma uygulanarak kaplanmış kapiller, akrilamid, TEMED ve Amonyumperstülfat eklenmeden Luckev ve arkadaşlarının bulgularına uygun olarak çok uzun bir süre saklanabilmektedir.²⁶ Ayrıca kapiller jel elektrofrezinin dökme jellere göre avantajları; yüksek voltaj uygulanabilme, ayırım, hız, miktar tayini, çok az miktarda örnekle çalışabilmesi, otomasyona elverişli olması ve yüksek duyarlılık gibi avantajları²⁷⁻³⁰ bu çalışmada da gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Dökme jel elektrofrezlerinde 2-5 saat arasında bir zamanda PCR ürünleri ayrılıp saptanabilirken laboratuvarımızda CGE ile yapılan çalışmalarda bu ürünleri en çok 30-50 dakika içerisinde ayırıp görme imkanı elde edilmiştir. Dolayısıyla 24 saat zaman aralığında 20-30 kapiller elektrofrez yapmak mümkün olmaktadır. Bu durum kaynak verileri ile uyum içindedir.^{20,31,32} CGE'de doğrudan kullanılan dedektörler sayesinde diğer katı jellere göre görünürleştirmede boyamaya veya radyoaktif maddelere ihtiyaç göstermeden PCR ürünleri duyarlı ve doğru olarak tespit edilir.³³ CGE ile saç, kan, semen, kemik, doku gibi materyallerden izole edilen DNA dan identifikasyona gidildiği bildirilmektedir.³⁴ Çalışmamızda bu olanağın sağlanabileceği görülmüştür.

Kapillerin çok önemli diğer bir üstünlüğü de örnek başına kullanılan çözücü sarfiyatı ve örnek başına maliyettir. Dökme jel tabakalarının her biri sadece bir deney için yüksek maliyette ve yalnızca bir kez kullanılabilir iken Örneğin enstitümüzde yapılan CGE deneylerinde 250 mL TBE %0.25 HPC çözeltisi en az 300 çalışmaya yeterli olmuştur. Dolayısıyla bir örnek için kullanılan ortam maliyeti ihmal edilebilecek düzeydedir. Ayrıca kullanılan kapiller kolonun 300. enjeksiyondan sonra sonuç vermemesine bağlı olarak, yeniden kapiller jel doldurma işleminin 3. basamağından itibaren yapılması ve çıkan sonuçların yine istenilen doğrultuda olması, bu yöntemin

vazgeçilmezliğinin birer kanıtıdır.

ÖZET

HLA DQA1 lokusu Adli bilimler araştırmaları için hızlı, kolay, güvenilir bilgi alınabilen polimorfik DNA lokusudur. Bu lokus, PCR sayesinde nesep tayini ve Adli olayların aydınlatılmasında son derece umut verici bilgiler sunar. İnsan kaynaklı genomik DNA kelatlaştırma (Chelex(r) 100) yöntemiyle izole edildi. HLA DQA1 lokusunun çoğaltılması, Perkin Elmer AmpliType DQA1 PCR amplifikasyon ve tiplendirme kitinin kullanma kılavuzuna uygun olarak yapıldı. HLA DQA1 in PCR ürünlerine agaroz jel elektrofrez uygulandı. Elde edilen elektrofrez bantlarından DNA nm çoğaldığı tespit edildi. Çoğalan PCR ürünlerinin Perkin Elmer AmpliType DQA1 PCR amplifikasyon ve tiplendirme kitiyle hibridizasyonu yapıldı ve 2,3 olarak tiplendirildi. Bu alel kapiller elektrofrezogramları ile karşılaştırdı. Bu çalışmada, kapiller jel elektrofrez (CGE)'nin az miktarda örneğe gereksinim duyması, hızlı ve çabuk ayırım süresi, yüksek ayrılcılığı, kolay miktar hesabı ile otomasyona uygunluğu gibi özelliklerinden yola çıkılarak HLA DQA1 in PCR ürünlerinin ayırımı amaçlandı.

KAYNAKLAR

1. The DNA Commission of the International Society of Forensic Haemogenetics. DNA recommendations 1994 report concerning further recommendations of the DNA commission of the ISFH regarding PCR based polymorphisms in STR (Short Tandem Repeat) systems. *Int J Leg Med* 1994; 107: 159-160.
2. Kim Y, Morris D. Separation of nucleic acids by capillary electrophoresis in cellulose solutions with mono- and bis intercalating dyes. *Analytical Chemistry*. 1994; 66: 1168- 1174.
3. Cengiz S, Cengiz M. Kapiller elektrofrez. *Biyokimya Dergisi* 1992; 17: 41-52.
4. Cengiz S. Kapiller Elektrofrez uygulamaları. *Chemist* 1995; 9: 41-50.
5. Chen JW, Cohen AS, Karger BL. Identification of DNA molecules by pre-column hybridization using capillary electrophoresis. *J Chrom* 1991; 554: 23-32.
6. Huang XC, Stuart SG, Bente PF, Brennan TM. Capillary gel electrophoresis of single-stranded DNA fragments with UV dedection. *J Chrom* 1992; 600: 289-295.
7. Li, SFY. Capillary electrophoresis principles, practice and applications. *J Chrom* 1993; 52: 1-30.
8. Barron AE, Soane DS, Blanch HW. Capillary electrophoresis of DNA in uncross-linked polymer solutions. *J Chrom A* 1993; 652: 3-16.
9. Martinez R MC, Berka J, Belenkii A, Foret F, Miller W, Karger BL. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and induced fluoresence detection. *Analytical Chemistry*. 1993; 68: 2851-2858.
10. Kılıçturgay K. İmmünolojiye Giriş: Bursa, Karar Matbaası, 991;25-27.
11. Pai CY, Chou SL, Yang CH and Tang TK. Flow Chart HLA-DQA1 genotyping and its application to forensic case. *J Forensic Sciences* 1995; 40: 228-235.
12. Kappes D, Strominger JL Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 991-1028.
13. Morzycka E, Harwood JI, Smith JR, Kagnoff MF. Structure and evolution of the promoter regions of the DQA genes. *Immunogenetics* 1993; 37: 364-372.
14. Santamaria P, Boyce JM T, Lindstrom AL, Barbosa, JJ, Faras AJ, Rich SS. HLA Class II "Typing" Direct Sequencing of DRB, DQB and DQA Genes. *Human Immunology* 1992; 33: 69-81.
15. Benoist C, Mathis D. Regulation of Major Histocompatibility Complex Class-II

- Genes: X, Y and Other Letters of the Alphabet *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 681-715.
16. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of Class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845-850.
 17. Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R, Erlich HA. HLA-DO(A) Allele and Genotype Frequencies in Various Human Populations, Determined by Using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes. *Am J Hum Genet.* 1990; 47:515-523.
 18. Budowle B, Lindsey JA, DeCou JA, Koons BW, Giusti AM, Comey T. Validation and Population Studies of The Loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc (PM loci) and Typing Procedure. *Journal of Forensic Sciences.* 1995; 40: 45-54.
 19. Gyllenstein UB, Erlich AH. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7652-7656.
 20. Capon C, Novelli G, Dallapiccola B. Application of the capillary DNA chromatography in the paternity testing using APO B amplified alleles. *Advances in Forensic Haemogenetics* 1993; 3:136-138.
 21. Hjerten S. High-performance electrophoresis elimination of electroendosmosis and adsorption. *Journal of Chromatography* 1985; 347: 191-198.
 22. Cordier Y, Roch O, Cordier P, Bischoff C. Capillary gel electrophoresis of oligonucleotides: prediction of migration times using base-specific migration coefficients. *J Chromatography A.* 1994; 680: 479-489.
 23. Srivatsa GS, Batt M, Schuette J, Carlson RH, Fitchett J, Lee C, Cole DL. Quantitative capillary gel electrophoresis assay of phosphorothioate oligonucleotides in pharmaceutical formulations. *J Chromatography A* 1994; 680: 469-477.
 24. Martin F, Vairalles D, Henrion B. Automated ribosomal DNA fingerprinting by capillary electrophoresis of PCR products. *Analytical Biochemistry* 1993; 214: 182-189.
 25. Nakatani M, Skibukawa A, Nakagawa T. Preparation and characterization of stable polyacrylamide sieving matrix-filled capillary for high performance capillary electrophoresis. *J Chromatography A.* 1994; 661: 315-321.
 26. Luckey JA, Drossman H, Smith LM. High-speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis. *Methods In Enzymology.* 1993; 218: 154-172.
 27. Demana T, Lanan M, Morris MD. Improved separation of nucleic acids with analyte velocity modulation capillary electrophoresis. *Anal Chem* 1991; 63: 2795-2797.
 28. Pariat YF, Berka J, Heiger DN, Schmitt T, Vilenchick M, Cohen AS, Foret F, Karger BL. Separation of DNA fragments by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide matrices. *J Chromatography A.* 1993; 652: 57-66.
 29. Swerdlow H. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing laser induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. *Journal of Chromatography.* 1990; 516: 61-67.
 30. Heiger DN. High performance capillary electrophoresis. *Hewlett Packard.* 1992; 1-136.
 31. Paulus A, Ohms JL. Analysis of oligonucleotides by capillary gel electrophoresis. *J Chromatography* 1990; 507: 113-123.
 32. Holland MM, Tumi LA, Del Rio S, Marino M, Lofts MRS, Fisher DL, Ross J, Schumm JW, Williams PL. Typing human DNA capillary electrophoresis: Comparison of slab gel and capillary formats. *Advances in Forensic Haemogenetics* 3. 1993; 156-159.
 33. Kuypers A, Meijerink JPP, Smetsers T, Linssen M, Mensink EJ. Quantitative analysis of DNA aberrations amplified by competitive polymerase chain reaction using capillary electrophoresis. *J Chrom* 1994; 660: 271-277.
 34. Marino MA, Tumi LA, Del Rio SA, Williams PE. Molecular size determinations of DNA restriction fragments and polymerase chain reaction products using capillary gel electrophoresis. *J Chromatography A* 1994; 676:

- **Anahtar Kelimeler:** CE, HLA DQA1; **Key Words:** CE, HLA DQA1; **Alındığı Tarih:** 10 Ağustos 1999; **Biyolog Sevgi Yılmaz Adli Tıp Kurumu, Prof. Dr. Salih Cengiz İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü; Yazışma Adresi (Address):** Dr. S. Cengiz İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü PK 10. Cerrahpaşa 34301, İstanbul Türkiye Tel: 5880880 Eposta: cengiz@istanbul.edu.tr

