

Adli Amaçlı Kullanılan DNA Polimorfizmleri ve Tiplendirme Teknikleri

Bio. Dr. Ayşe SERİN*, Prof. Dr. Behnan ALPER*, Bio. Hüsnüye DAĞ*

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Özet

Adli bilimler alanında DNA tiplendirme prosedürleri gittikçe artan öneme sahip olmuştur. Bu makalede, adli bilimlerde kullanılan insan DNA polimorfizmleri ve onların tiplendirilmesinde kullanılan prosedürlerin aktarılması amaçlanmıştır. PCR ve RFLP yöntemleri ile bu yöntemlere dayalı single lokus polimorfizm ve multilokus polimorfizm, AMP-FLP, STR, DQA1+PM, mtDNA polimorfizmleri tanımlanmış ve tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: DNA, genetik polimorfizm, VNTR, RFLP, PCR.

DNA Polymorphisms and Typing Procedures Used for Forensic Purpose

Summary

DNA typing procedures have become increasingly important in the field of forensic sciences. In this paper, human DNA polymorphisms and typing procedures used for forensic purpose are reviewed. Single-and multi-locus polymorphism, AMP-FLP, STR, DQA1+PM, mtDNA polymorphism based on PCR and RFLP methods described and discussed.

Key Words: DNA, genetic polymorphism, VNTR, RFLP, PCR.

Giriş

Türleri birbirinden ayıran genetik şifrenin (DNA) aynı tür içinde de varyasyonlar göstermesi ve bu varyasyonların moleküler tekniklerle belirlenebilmesi, adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde kullanımını günde- me getirmiştir. Başlangıçta gen ürünlerinin oluşturduğu genetik kontrollü işaretlerin serolojik ve immünolojik yöntemlerle identifikasyon ve kimliklendirilmesi yapılırken, günümüzde doğrudan DNA teknolojisinin bu amaçla kullanımı vazgeçilmez hale gelmiştir. Böylelikle adli örneklerin kimliklendirilmesi ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde daha sağlıklı ve güvenilir sonuçlar alınmasına olanak sunulmuştur (1-5). Bu çalışmada adli amaçlı kullanılan DNA polimorfizmleri ve tiplendirme tekniklerinin gözden geçirilmesi amaçlanmaktadır.

Genel Bilgiler

DNA molekülü içindeki polimorfizmler bireysel özelliklerin temelidir. 3 milyar bazdan oluşan insan DNA'sında her bin bazdan birinin bireyler arasında farklı olabileceği belirtilmektedir (1).

Adli örneklerden DNA tiplendirmesinde DNA'nın bu polimorfik özelliklerinden yararlanılmaktadır.

DNA üzerinde çeşitli mutasyonlar sonucu oluşan polimorfizmler temel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (4-7).

1. Sekans (Site) polimorfizmleri
2. Uzunluk (Length) polimorfizmleri

1- Sekans polimorfizmleri: İlk keşfedilen polimorfizmlerdir. Allelik varyasyon spesifik sekans bölgesindeki DNA moleküllerinden birinin insersiyon, delesyon veya yer değişikliği sonucu oluşmaktadır (4). Figür 1'de sekans polimorfizmini gösteren örnek bir baz dizilimi bulunmaktadır. HLA markerlarının hipervariable bölgeleri ve mito-

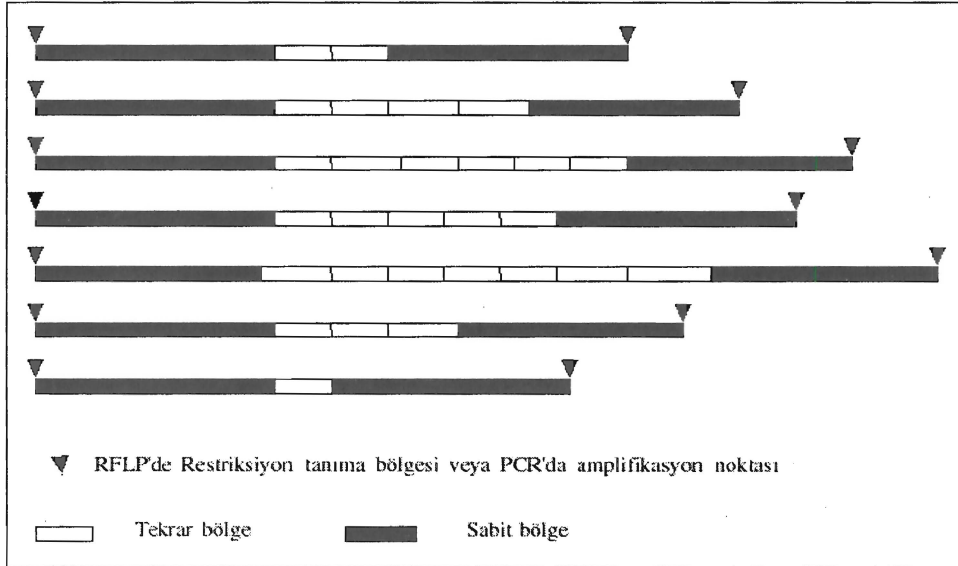
kondriyal DNA (mtDNA)'nın D-loop bölgesi adli amaçlı kullanılan sekans polimorfizmlerine örnek verilebilir (1,2,7).

A-)TTGCAGCTTAGCCCCGATTCGATCGA.....
 B-)TTGCAGCTTAGCCCCGATTCGATCGG.....
 C-)TTGCAGCTTAGCCCCGATTCGATCGA.....

Figür 1. A, B ve C örneklerinde baz dizilim farklılığı sonucu oluşan sekans polimorfizmi. (Figür 1'de A ve C'de belirtilen baz dizilimleri birbiri ile eşleşirken, B'nin baz dizilimi bu iki diziden tek baz değişikliği sonucu bir farklılık oluşturmaktadır.)

2- Uzunluk Polimorfizmleri: Polimorfizmler aynı zamanda insan genomunda belirli baz dizilimlerinden oluşan çekirdek ünitenin çeşitli sayılarda ardarda tekrarı ile oluşmaktadır. Dizinin tekrar sekansı birbirine benzemekte, ancak tekrarın sayısına bağlı olarak oluşan baz dizisinin uzunluğu popülasyondaki bireyler arasında farklılıklar göstermektedir (8). Bu bölgeler genellikle değişen sayıda ardarda tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats; VNTRs) olarak bilinmektedir. VNTR'lar nükleotid veya nükleotidlerin delesyonu, insersiyonu ve/veya eşit olmayan krosing-over sonucu oluşabilmektedir. Klasik Mendel Yasaları'na uygun kalıtım göstermektedirler ve yüksek ayırt etme gücüne sahiptirler (4,6,8-11).

Tanımlanan VNTR polimorfizmlerinden çekirdek tekrar dizisi 6 bp'den büyük olanlar minisatellit veya Long Tandem Repeat (LTR), 2-6 bp arasında olanlar mikrosatellit veya short tandem repeat (STR) olarak adlandırılmaktadır. Şekil 1'de VNTR lokuslarının genetik varyasyonu şematik olarak sunulmaktadır (2).



Şekil 1. VNTR lokuslarının genetik varyasyonu (2).

POLİMORFİZMLERİN TANIMLANMASINDA KULLANILAN YÖNTEM VE PROSEDÜRLER

Sekans ve uzunluk polimorfizmlerinin analizi biyolojik örneklerin identifikasyonunda önemli bilgiler sağlamaktadır. Polimorfizmlerin analizinde iki temel yöntem kullanılmaktadır (1,2,6,7).

A-) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

B-) Polymerase Chain Reaction (PCR)

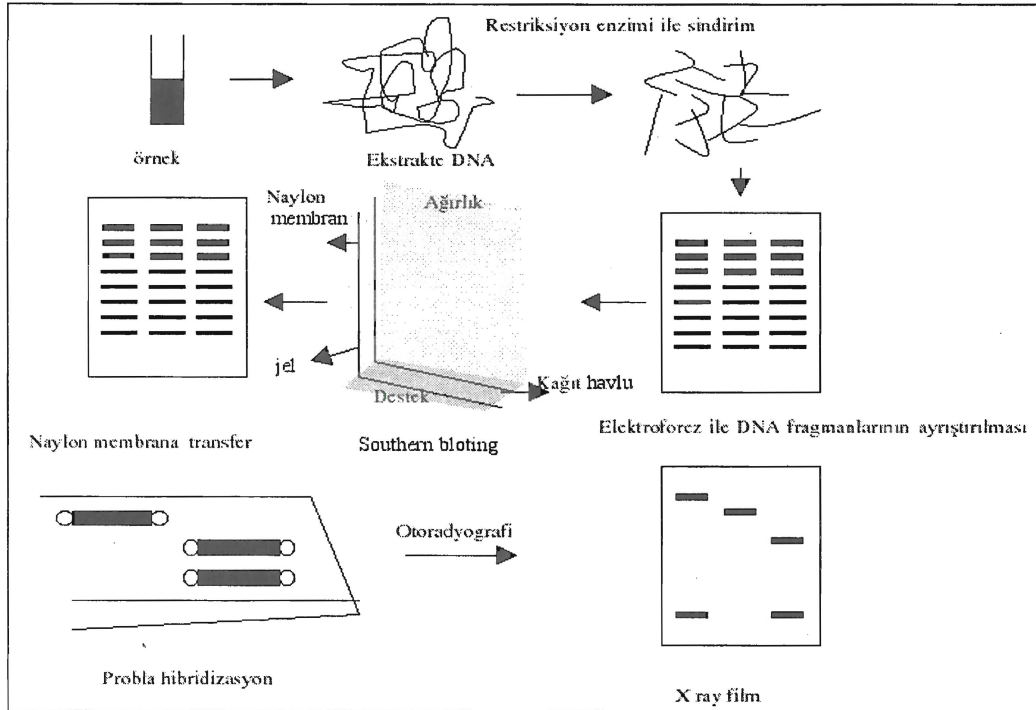
A-) RFLP

Restriksiyon Endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, Restriksiyon Endonükleazlar restriksiyon bölgeleri olarak bilinen çift zincirli DNA'nın sadece spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir. Sindirim sonucunda kesme bölgeleri arasındaki uzaklık farklarına bağlı olarak çeşitli uzunluktaki DNA fragmanlarının bir karışımı elde edilmektedir. Oluşan fragmanlar elektroforetik olarak ayrıştırıldığında çok sayıda ki DNA fragmanının bir sürüntüsü oluşmaktadır. Bu nedenle çift zincirli fragmanlar denatüre edilerek tek zincirli hale dönüştürüldükten sonra, naylon membran üzerine sabitleştirilmekte ve uygun radyoaktif işaretli proplar ile hibridize edilerek (Southern Blotting) oluşan bantların otoradyografik analizi yapılmaktadır. Sindirilmiş genomik DNA fragmanlarının oluşturduğu bu tip varyasyon Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) olarak bilinmektedir (1). Tablo 1'de adli amaçlı kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri gösterilmiştir (12-14).

Tablo 1. Adli RFLP analizlerinde kullanılan Restriksiyon Endonükleazlar (12-14).

Enzimler	Kesim Noktaları
Hae III	5'- GG/CC-3'
	3'-CC/GG-5'
Hinf I	5'-G/ANT C-3'
	3'-C TNA/G-5'
Pst I	5'-C TGCA/G-3'
	3'-G/ACGT C-5'

RFLP ile orijinal olarak spesifik bir restriksiyon enzim kesim bölgesinin varlığı veya yokluğunun ortaya çıkarılabilmesi ile popülasyonu ikiye ayıran nokta mutasyonları yanında, popülasyonda yüksek polimorfizm gösteren VNTR lokusları tanımlanabilmektedir (4,6,10,11). RFLP ile VNTR lokuslarının analizi iki şekilde yapılabilmektedir;



Şekil 2. Single-lokus RFLP polimorfizmi (1,2).

1- Single-lokus RFLP: Tek bir VNTR lokusu için, her birey birini anneden diğerini babadan aldığı iki allele sahiptir. Bu iki allel jel üzerinde her ikisi aynı uzunlukta (homozigot allele sahip kişilerde) tek bant veya farklı uzunlukta (heterozigot allele sahip kişilerde) iki bant oluşturmaktadır. Tek VNTR lokusu için oluşturulan RFLP polimorfizmi single-lokus RFLP adını alır (9,11,12). Şekil 2'de Single-lokus prob kullanımı ile oluşturulan RFLP (single-lokus RFLP)'nin şematik sunumu aktarılmıştır (1,2).

2- Multi-lokus RFLP: Benzer tekrar diziler aynı zamanda çeşitli kromozomlardaki çok sayıda lokusta oluşabilmektedir. Benzer tekrar dizilerin bulunduğu çok sayıdaki lokustan allelik varyasyonlarının her birinin aynı anda tanımlanması mümkün olabilmektedir. Bu tip uygulamayı gerçekleştiren Dr. Alec Jeffreys ve arkadaşları (15) 1985 yılında çeşitli VNTR lokusları tarafından paylaşılan çekirdek dizilere dayalı multi-lokus DNA problemleri (33.15 ve 33.6) ile düşük iyonik güçlü hibridizasyon koşullarında yaptıkları RFLP analizlerinde, birey spesifik bant paterninin oluştuğu kompleks bir parça uzunluk polimorfizmi ortaya çıkarmışlardır. Tanımlanan **multi-lokus polimorfizm (multi-lokus RFLP)** parmakizi gibi bireye özgü olduğundan, **DNA fingerprinting (DNA Parmakizi)** adı ile de anılmaktadır (15-17). O dönemde Dünya'da büyük yankı uyandıran bu teknik ile elde edilen verilerin ilk kez yargıda delil olarak kullanımı İngiltere'de 1986 yılında bir seksüel saldırı ve cinayet olgusudur. Ardından Amerika Birleşik Devletleri'nde Federal Bureau of Investigation (FBI) 1988 sonbaharında rutin olgu çalışmalarında DNA parmakizi tekniğinin kullanımına başlamış ve sonrasında gelişmiş ülke laboratuvarlarına hızla girmiştir (5,18).

Analiz için kullanılan DNA miktarı doğal olarak multi-lokus ve single-lokus RFLP'de farklıdır. Multi-lokus RFLP yöntemi ile DNA bütünlüğü bozulmamış örneklerde başarılı sonuçlar alınabildiği ve ayırt etme gücünün çok yüksek olduğu belirtilmektedir (18,19). Ancak single-lokus RFLP'nin multi-lokus RFLP'ye tartışmasız üstünlüğü kabul edilmektedir (10,12,20-22). Bu iki sistemin özellikleri aşağıda sunulmaktadır:

a- Single-lokus RFLP için 20-100 ng genomik DNA yeterli olurken, multi-lokus RFLP yaklaşık 500 ng yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ya ihtiyaç duymaktadır (9,10,12).

b- Single-lokus RFLP'de tanımlanan VNTR lokusları yüksek primatlara spesifik iken, multi-lokus problemleri bir-biri ile ilişkisiz türlerde çapraz reaksiyon verebilmektedir (10,20-23).

c- Single-lokus RFLP'de değerlendirilmesi ve yorumlanması daha kolay olan bir veya iki bant paterni elde edilirken, multi-lokus RFLP'de değerlendirmesi çok zor olan çok sayıda bant paterni elde edilmektedir (10,24).

d- Single-lokus RFLP'de tanımlanan lokusların kromozomal lokalizasyonu ve diğer lokuslarla olan bağlantısı belirlenebilmekte ve mutasyon oranları multi-lokus RFLP ile tanımlanan paternlerden daha düşük bulunmaktadır (25, 26). (Tablo 2).

	MLS	SLS
Ayrım gücü	10 ⁻¹¹	10 ⁻³
Tanımlanan lokus sayısı	Çok sayıda	Bir adet
Bağlantı (Linkage)	Belirsiz	Belirlenebilir
Fragments	10-20	1-2
Hassasiyet	500 ng	50 ng

Tablo 2. Single-lokus (SLS) ve multi-lokus (MLS) sistemlerinin genel özelliklerinin karşılaştırılması (10).

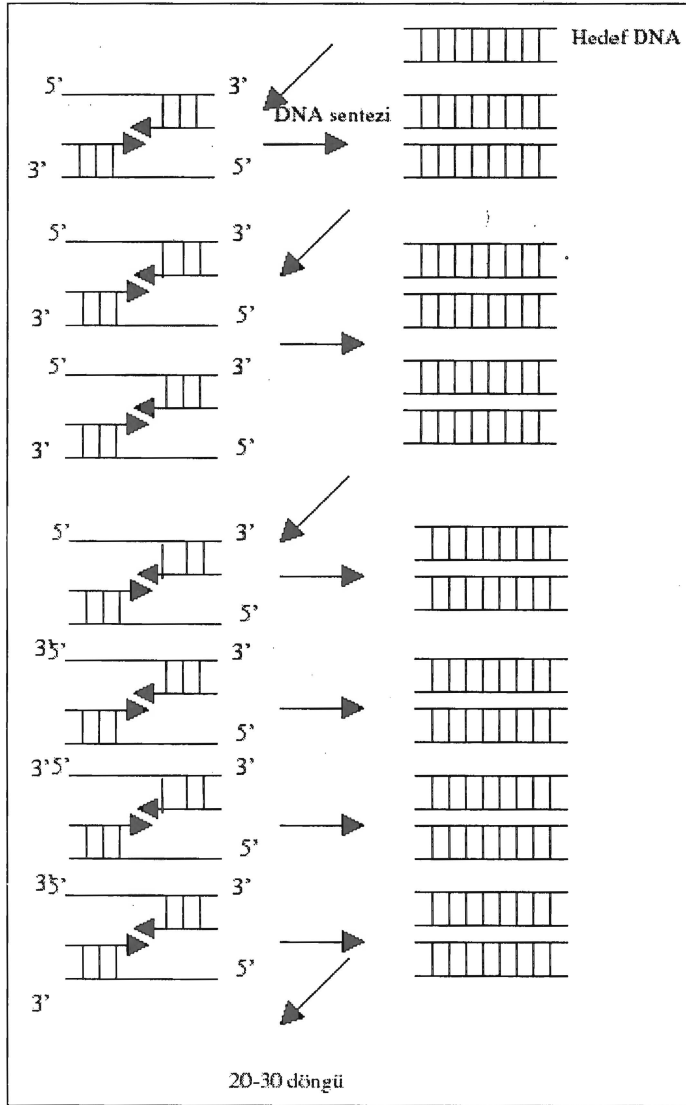
Normal şartlarda güvenilir ve etkili bir DNA tiplendirme metodu kabul edilen RFLP'nin radyoaktif işaretli problemler kullanımında 4-6 haftaya uzayan bir identifikasyon süresi ile zaman ve ekonomik olarak masraflı bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Bunun yanında, kısmen yüksek moleküler ağırlıklı DNA gerektirdiğinden parçalanmış biyolojik örneklerin analizinde etkinliği azalmaktadır. RFLP metodolojisinde örnek miktarının analitik ihtiyacı

karşılayabilecek miktarda ve moleküler ağırlıkta olması gerekmektedir. Adli örnekler için çoğunlukla bu şartlar yetersiz kalmaktadır (27, 28).

Adli analizlerde ciddi sorun olan bu engel, 1985 yılında Saiki (29) ve arkadaşlarının geliştirdiği PCR yöntemi ile aşılmış bulunmaktadır.

B-) PCR

Yöntem, DNA'nın ısı ile denatüre edilerek çift iplikçinin birbirinden ayrılmasını (denatürasyon, 90-95°C) takiben, primer olarak adlandırılan kısa oligonükleotid dizilerin templat DNA'ya yapışması (primer annealing, 55-60°C) ve DNA polimeraz enzimi varlığında templat DNA'ya komplementer olarak uzaması (70-75°C) aşamalarından oluşmaktadır. Bu üç aşama bir döngü kabul edilmekte ve döngü sayısı araştırılan hedef DNA dizisiye bağlı olarak değişmektedir (28, 30) (Şekil 3).



Şekil 3. PCR döngüsü (28).

PCR ile hedef DNA dizisinin milyonlarca kopyası yapılabildiğinden, Adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde özel bir yere sahip olmuştur (1,2,7,31-34)

Adli amaçlı kullanılan PCR'a dayalı polimorfizmler;

1. Amplifiye parça uzunluk polimorfizmi (Amplification Fragment Length Polymorphism AMP-FLP, STR)
2. Reverse dot-blot analizi (HLA-DQ alpha, amplitype PM)
3. Sekans analizi (mtDNA- mitokondriyal DNA)

1. Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi (AMP-FLP, STR)

8-16 bp'lik çekirdek ünitenin tekrarı ile 100-1300 bp uzunluğunda tekrar ünite içeren yapılar AMP-FLP, 2-7 bp uzunluğundaki çekirdek ünitenin 10-50 kopya ardarda tekrarı ile 100-400 bp uzunluğunda tekrar ünite içeren yapılar STR adını almaktadır (1). PCR'a dayalı tiplendirme yapılabilen AMP-FLP ve STR sistemlerinin RFLP'ye dayalı tiplendirmeden prensip olarak bir farkı yoktur. Baz dizilim uzunluklarının kısa olması nedeniyle, restriksiyon enzimlerine gereksinim duymadan hedef baz dizilerinin çoğaltılması ve agaroz jelde yüksek verimle ayrımı mümkün olmaktadır (33-36).

Ancak STR lokuslarının AMP-FLP ve tanımlanan diğer polimorfik lokuslardan daha kısa olması, özellikle adli örneklerin analizinde avantaj sağlamaktadır. İlk olarak Edwards ve arkadaşları (31,32) tarafından tanımlandıktan sonra, genom boyunca dağılmış çok sayıda STR lokusu bildirilmiş ve adli amaçlı kullanılabilirliği araştırılmıştır. Lokus sayısının çokluğu adli örneklerin DNA analizi için geniş bir kaynak oluşturmaktadır. Ancak adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde bazı temel kriterleri taşıyan STR lokusları kullanılmaktadır. Bu temel kriterler kullanılan lokusun ayırım gücünün %90'ın üzerinde ve gözlenen heterozigotluğun %70'in üzerinde olması, allellerin tahmin edilen uzunluklarının 90-500 bp arasında olması, hassasiyeti yüksek lokusların seçilmesi, biyolojik örnekler için uygun olmayan çevre koşullarından toplanan örneklerden sağlıklı sonuç alınabilmesi ve farklı biyolojik materyallerden elde edilen DNA örneklerinden incelemelerin sağlıklı yapılabilmesi gibi özellikleri içermektedir (35-40).

Bu değerlendirmeler dikkate alındığında, kimliklendirme ve paternite tayininde genellikle tetramerik STR lokusları tercih edilmektedir. Ayrıca tetramerik STR lokuslarının dimerik ve trimerik STR lokuslarına oranla tanımlanması esnasında hata payının düşük olması, jel üzerinde ayırımının kolay yapılması ve amplifikasyonu yapılan örneklerin elektroforezinde artık ürün oluşumunun daha az olması gibi avantajları bildirilmektedir (38-42).

Buna karşın, STR lokuslarının allelik varyasyonları diğer lokuslara oranla daha az olduğundan ayırım gücü daha düşüktür. Bu durum birden fazla STR lokusunun aynı anda amplifikasyonu ve elektroforezi ile çözümlenmektedir (2). Böyle bir multipleks reaksiyon ile çok az miktardaki (2-10 ng) adli örneklerin daha verimli kullanılması yanında, zaman ve malzemedeki ekonomi sağlanmaktadır (38,39). Ancak multipleks reaksiyonun seçimi rastgele olmayıp, seçilen lokusların kromozomal lokalizasyonu ve baz dizilimi dikkate alınarak yapılmaktadır (2).

Amplifikasyon ürünleri floresan işaretli primerler (42,43) kullanıldığında otomatik jel okuyucuda incelenebilmekle birlikte, gümüş boya ile makroskopik olarak görüntülenmesi mümkün olabilmektedir (44,45).

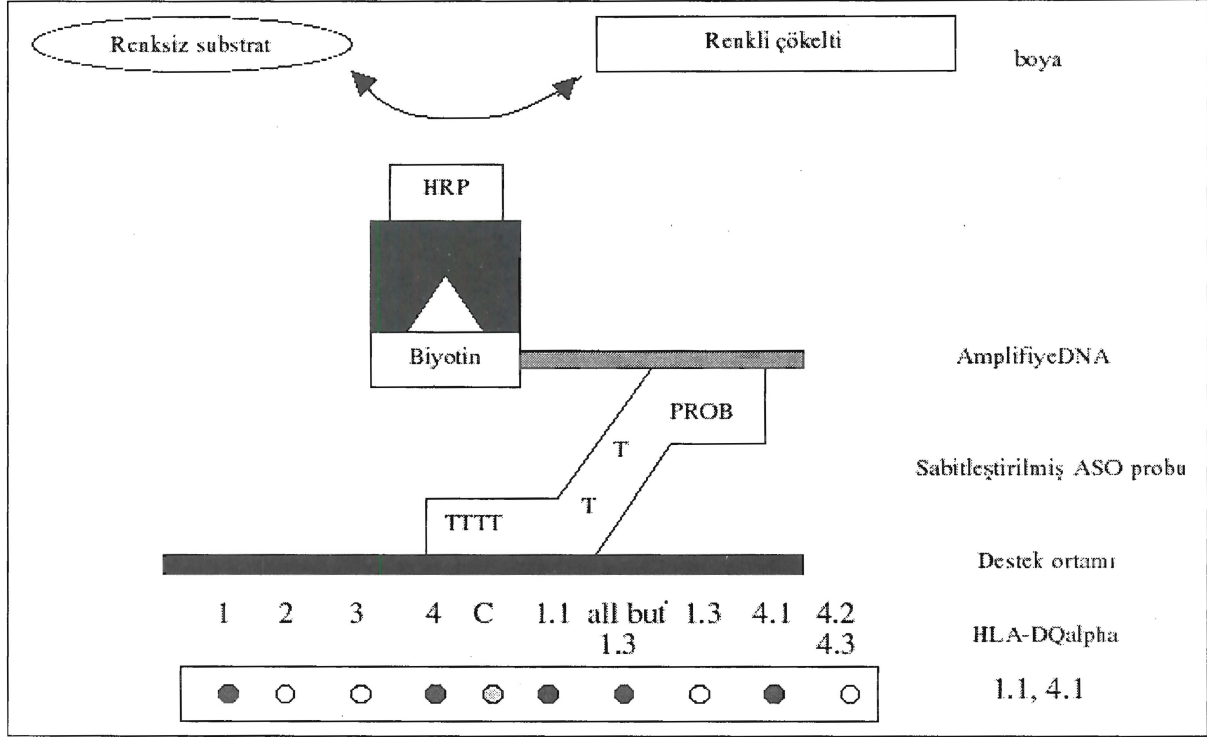
2. Reverse Dot-Blot Analizi [Allel Spesifik Oligonükleotid(ASO)'ler ile Hibridizasyon]

Bu teknik ile tanımlanan polimorfizmlerden adli amaçlı kullanılanlar HLA marker'larının hipervariable bölgele-ri (HLADQ alpha typing) ve ilave 5 farklı genetik lokusu içeren Ampli Type PM sistemleridir(46-50). Tanımlanan Ampli Type PM sistemleri Low Density Lipoprotein Receptor (LDRL), Glycophorin A (GYPA), Hemoglobin G Gamma-Globin Chain (HBGG), D7S8 ve Group Spesifik Component (GC) sistemlerinden oluşmaktadır. HLADQ alpha lokusu ve Amplitype PM sistemleri için geliştirilen allel spesifik oligonükleotidler ile tanımlanan allel spesifik varyasyonlar tek nükleotid yer değişiklikleri sonucu sekans varyasyonları oluşturmaktadır(1,46).

Bu iki sistem son dönemlerde Ampli Type PM+DQA1 adıyla bir kit olarak elde edilebilmektedir(50). İki sistemden oluşan altı lokusun allellerinin amplifikasyonu ve hibridizasyonu aynı anda yapılabilmektedir. Böylece daha az örnekle (2-10 ng) daha fazla çalışma yapılabilmektedir(46-49).

Yöntem, test edilecek nükleer hücrelerden ekstrakte edilen genomik DNA'da hedef dizinin biyotin ile işaretli

allel spesifik primerler ile çoğaltılması ve amplifiye edilen PCR ürünlerinin immobilize edilmiş problemlerle uygun koşullarda tam eşleşmesi prensibine dayanmaktadır. Membran üzerine sabitleştirilmiş ASO (Allel Spesifik Oligonükleotid) problemleri ile çoğaltılan PCR ürünleri hibridize edildikten sonra, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate biyotin ile işaretli PCR ürünlerine bağlanır. Oluşan renksiz kompleksin kromojen solusyonu ile muamelesinde ilgili allellerin mavi renge dönüşmesi beklenir (1,2,50) (Şekil 4).



Şekil 4. Hibridizasyon ve renklendirme reaksiyonu (1,57).

3. MtDNA Analizi

İnsanlarda mtDNA genomu 16569 bp uzunluğunda kapalı sirküler bir yapıya sahiptir. MtDNA nükleer DNA'ya benzer şekilde 13 protein, 2 ribozomal RNA (ribonükleik asit) ve 22 tRNA'yı kodlayan coding bölge ve tek kopya kodlanmayan non-coding bölgeden oluşmaktadır. Yaklaşık 1000 bp'lik kodlanmayan bu bölge control region, displacement loop veya kısaca D-loop bölgesi olarak adlandırılır. MtDNA'nın D-loop bölgesi bilinen üç hipervariable bölgeden oluşmaktadır. Adli analizlerde şu anda bunlardan iki tanesi kullanılmaktadır (51-54). Kullanılan bölgeler,

Hipervariable bölge I: 16024-16365 nükleotid pozisyonları arasında bulunan bölge (HVR1)

Hipervariable bölge II: 73-340 nükleotid pozisyonları arasında bulunan bölge (HVR2)'dir.

Her iki bölgedeki varyasyonlar dizi analizi ile tanımlanmaktadır. Dizi analizi genetik alfabeyi oluşturan dört nükleotidin lineer düzenlenişinin direkt olarak tanımlanmasıdır. Kullanılan standart dizi analizi protokollerinden biri dideoxy zincir sonlandırma ile dizi analizi (dideoxy-chain termination sequencing)'dir (55,56). Sanger metodu olarak bilinen metodun prosedürü, DNA polimeraz enziminin DNA kalıbı ile hibridize olan primerleri uzatma kabiliyetine dayanmaktadır.

Sekansın belirlenmesi, Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C) ve Timin (T) bazları ile bir bazın dideoksi formunun her birinin bir reaksiyonda sınırlı konsantrasyonda bulunması ile oluşturulan 4 ayrı reaksiyona ihtiyaç duymaktadır. 3'OH grubunun yokluğu nedeni ile ddNTP'lerin inkorporasyonu zincir sentezini durdurmaktadır. Reaksiyonda dNTP ve ddNTP konsantrasyonları dizi analizi yapılacak ürün için bir nested seti oluşturacak şekilde ayarlan-

maktadır. Bunların her biri ortak bir orijine sahip olmakla beraber, farklı bir nükleotid ile sonlanmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan DNA parçaları [a-35S] dATP veya [a-33P] dCTP ile primerlerin uç işaretlenmesi veya uzama reaksiyonu esnasında radyoaktif olarak işaretlenmekte ve DNA parçaları denatürasyon şartlarında akrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmaktadır (2).

MtDNA babadan bağımsız olarak direkt anneden çocuğa aktarılmaktadır. Böylece ilgili mtDNA dizilerinin karşılaştırılması maternal neslin belirlenmesini mümkün kılmaktadır. Bu durum aşırı dekompoze olmuş veya kaçırılan bireylerden referans örnek alınamadığı durumlarda, kişinin yaşayan herhangi bir maternal akrabasından referans örnek alınması bakımından önemlidir. Nükleer DNA'daki diploid kalıtım ve mayotik rekombinasyon nedeniyle nükleer profilin doğrudan yaratılması sadece 1. derece akrabalarından sağlanabilmektedir (57).

MtDNA özellikle tükürük lekesi, kıl shaftı (nükleer DNA'nın hemen hiç bulunmadığı) veya eski ve parçalanmış iskelet kalıntıları gibi çok az miktardaki adli örneklerin analizinde kullanılabilmektedir (58-60). Evriminin nükleer DNA'ya oranla 10 kat daha hızlı olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle mtDNA örnek popülasyon çalışmasının çok daha geniş bir popülasyon aralığında yapılması gerekmektedir (61-62).

Sonuç

Yapılan araştırmalar single lokus prob ve RFLP tekniği ile VNTR lokuslarının araştırılma yüzdesinin 1997'de % 83'ten 1999'da %66'ya düştüğünü göstermektedir. Bunun aksine PCR'a dayalı STR sistemlerinin analizinin ise yükselerek 1999 yılında %90'ın üzerine yükseldiğini göstermektedir. Benzer şekilde, HLA ve Polymarker (Amplicon) sistemleri ile mtDNA'nın dizi analizi çalışmaları yükselen bir grafik çizmektedir. Laboratuvarlar arasında yapılan standardizasyon çalışmalarında, laboratuvarlar arasındaki sonuç farklılıklarının RFLP ile yapılan VNTR tiplendirmelerinde %1.2-1.3 iken, PCR'a dayalı test sonuçlarında %0.3'e düşmesinin bu sonucun ortaya çıkmasında önemli bir etken olduğu kabul edilmektedir (63).

Hızlı ve kolaylaştırılmış DNA testi hedefi, DNA tiplendirme prosedürlerinin hızla evrim geçireceğini ve yararlanma yollarının genişleyeceğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Duncan GT, Tracey ML. Serology and DNA typing, in Introduction to Forensic Science, Eckert WG, Ed. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1992: 233-293.
2. Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirmady F. DNA typing in forensic science. Am J Forensic Med and Pathol, 1994; 15(4):269-282.
3. Sensabaugh GF, Crim D. Biochemical markers of individuality, in Forensic Science Handbook, Saferstein R, Ed. New Jersey: A Simon and Schuster Company, 1982:338-415.
4. Balazs I. Properties of hypervariable single locus polymorphisms and their application to identity testing, in DNA in Forensic Science, Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Ed. England: Ellis Horwood Limited, 1990: 112-124.
5. Jeffreys AJ, Royle NJ, Patel I, Armour JAL, McLeod A, Collick IC, Gray IC, Neumann R, Gibbs M, Croiser M, Hill M, Signer E, Monckton D. Principles and recent advances in DNA fingerprinting, in DNA-Technology and Its Forensic Application, Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M, Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 3-19.
6. Fowler JCS, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HWJ. (1988) Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation- A concise review relevant to forensic biology. J Forensic Sci (JFSCA), 33(5), 1111-1126.
7. Sensabaugh GF. Genetic typing of biological evidence using the polymerase chain reaction, in DNA Technology and Its Forensic Application, Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M, Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990:33-40.
8. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. Genetics, 1980; 77: 6754-6758.
9. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 1987(235): 1616-1622.
10. Brinkmann B, Wiegand P, Rand S. A critical review of the forensic application of DNA technology, in DNA-Technology and Its Forensic Application, Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M, Ed., Berlin: Springer-Verlag, 1990:41-49.
11. Rittner C, Schacker U, Schneider PM. DNA fingerprinting as a tool of paternity testing in Germany, in DNA-Technology and Its Forensic Application, Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M, Ed., Berlin: Springer-Verlag, 1990:20-32.
12. Schacker U, Kaufmann T, Schneider PM, Rittner C. Reliability of restriction enzyme digestions of genomic DNA for the generation of DNA fingerprints, in DNA-Technology and Its Forensic Application, Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M, Ed., Berlin: Springer-Verlag, 1990:103-108.
13. Budowle B, Wayne JS, Schutter GG, Baechtel FS. Hae III- a suitable restriction endonuclease for restriction fragment length polymorphism analysis of biological evidence samples. J Forensic Sci (JFSCA), 1990; 35(3): 530-536.
14. Von Eede PH, Henke L, Fummers R, Henke J, de Lange GG. Forensic Sci Int, 1991; 49: 21-31.
15. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellit' regions in human DNA. Nature, 1985; 314: 67-73.
16. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature, 1985; 316: 76-79.
17. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature, 1985; 318: 577-579.

18. Gill P, Lygo JE, Fowler SJ, Werrett DJ. An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purpose. *Electrophoresis*, 1987; 8:38-41.
19. Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ. Characterization of a panel of highly variable minisatellite cloned from human DNA. *Ann Hum Genet*, 1989; 51:269-271.
20. Fowler C. Polymorphism in the major human repetitive DNA sequences: theory, practice and comparison with other methods of measuring human genome variation, in *DNA in Forensic Science*, Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Ed. England: Ellis Horwood Limited, 1990:87-111.
21. Hill WG. DNA fingerprinting applied to animal and bird populations. *Nature*, 1987; 327:98.
22. Dallas JF. Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridisation with a human minisatellite DNA probe. *Proc Natl Acad Sci*, 1988; 85: 6831.
23. Rogstad SH, Palton JC, Scheal BA. A human minisatellite probe reveals RFLPs among individuals of two angiosperms. *Nuc Acids Res*, 1988; 16:11378.
24. Kanter E, Baird M, Shaler R, Balazs I. Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid (DNA) recovered from dried bloodstains. *J Forensic Sci*, 1986; 31: 403-408.
25. Wong Z, Wilson V, Jeffreys AJ, Thein SL. Cloning a selected fragment from a human DNA fingerprint isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nuc Acids Res*, 1986; 14:4605.
26. Lynch M. Estimation of relatedness by DNA fingerprint. *Mol Biol Evol*, 1988; 5:584.
27. Budowle B, Guisti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fournay RM, Adams DE, Presley LA, Deadmann HA, Monsol KL. Fix-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet*, 1991; 48: 841-855.
28. Horn GT, Richards B, Klingens KW. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17:2140.
29. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230: 1350-1354.
30. Ross MD. Polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med*, 1990; 114: 627.
31. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 1992; 12: 241-253.
32. Edwards A, Civitello A, Hammond H, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 1991; 49: 746-756.
33. Kasai K, Nakamura Y, White R. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1990; 35(5): 1196-1200.
34. Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E, Chang L. Rapid DNA typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 212-216.
35. Rand S, Puer C, Skowasch K, Wiegand P, Budowle B, Brinkmann B. Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's. *Int J Legal Med*, 1992; 104: 329-333.
36. Sparkes R, Kimpton C, Watson S, Oldroyd N, Clayton T, Barnett L, Arnold J, Thompson C, Hale R, Chapman J, Urquhart A, Gill P. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: (I) mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int J Legal Med*, 1996; 109: 186-194.
37. Sparkes R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N, Thomas D, Urquhart A, Gill P. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: (II) artefacts, casework studies and success rates. *Int J Legal Med*, 1996; 109: 195-204.
38. Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, Kimpton CP. A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database. *Int J Legal Med*, 1996; 109: 14-22.
39. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med*, 1994; 107: 13-20.
40. Gill P, Kimpton CP, D'Aloja E, Andersen JF, Bär W, Brinkmann B, Holgersson S, Johnsson V, Kloosterman AD, Lareu MV, Nellemann L, Pfitzinger H, Phillips CP, Schmitter H, Schneider PM, Stenerson M. Report of the European DNA profiling group (EDNAP)- towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Int J Legal Med*, 1994; 65: 51-59.
41. Wiegand P, Ambach E, Augustin C, Bratzke H, Cremer U, Edelmann J, Erikson B, German U, Haas H, Henke L, Holtz Z, Keil W, Kreike J, Nagy M, Prinz M, Rand S, Rothämel T, Scheithauer R, Schneider HR, Schürenkamp M, Teifel-Greding J, Bär W. GEDNAP IV and V. The 4th and 5th stain blind trials using DNA technology. *Int J Legal Med*, 1995; 108: 79-84.
42. Schneider HR, Rand S. High resolution vertical PAGE : an alternative electrophoretic system with multipl forensic application. *Int J Legal Med*, 1996; 108: 276-279.
43. Fregeau C, Fournay R.M. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques*, 1993; 15:100-119.
44. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 1991; 48: 137-144.
45. Allen RC, Graves G, Budowle B. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques*, 1989; 7:736-744.
46. Herrin G, Fildes N, Reynolds R. Evaluation of the AmpliType PM DNA test system on forensic case samples. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(5): 1247-1253.
47. Scholl S, Budowle B, Radecki K, Salvo M. Navajo, Pueblo, and Sioux population data on the loci HLA-DQA1, LDRL, GYPA, HBGG, D7S8, Gc and D1S80. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(1): 47-51.
48. Tsongalis GJ, Anamani DE, Wu AHB. Identification of urine specimen donors by the PM+DQA1 amplification and typing kit. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(6): 1031-1034.
49. Gross AM, Guerrieri RA. HLA-DQA1 and polymarker validations for forensic casework: standard specimen, reproducibility, and mixed specimens. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(6): 1022-1026.
50. AmpliType User Guide Perkin Elmer, 1995.
51. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981; 290:457-465.
52. Lewin B. *Genes V*. 2th ed. Oxford University Press and Cell Press, 1994:733-748.
53. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med* 1998; 111:67-77.
54. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Mt DNA as a tool for identification of human remains identification using mtDNA. *Int J Legal Med* 1996; 109:205-209.

55. Gyllensten UB. PCR and DNA sequencing. *BioTechniques*, 1989; 7: 700-708.
56. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour, 1982:
57. Allen M, Engström A-S, Meyers S, Hanth O, Saldeen T, von Haeseler A, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 1998;43(3):453-464.
58. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Bensdn N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*, 1994; 6:130-135.
59. Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 9350-9354.
60. Yamamoto T, Uchihi R, Kojima T, Nozawa H, Huang XL, Tamaki K, Katsumata Y. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1998; 43(3): 701-705.
61. Cann RL, Stokening M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 1987; 325:31-36.
62. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am J Hum Genet*, 1996; 59:501-509.
63. Hallenberg C, Morling N. A report of the 1997, 1998 and 1999 paternity testing workshops of the English speaking working of the international society for forensic genetics. *Forensic Sci Int*, 2001; 116(1):23-33.

Kısaltmalar:

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR: Polymerase Chain Reaction
AMP-FLP: Amplification Fragment Length Polymorphism
STR: Short Tandem Repeat
ASO: Allel Spesific Oligonükleotid
HVR: Hypervariable region

İletişim Adresi: Ayşe Serin Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Adli Tıp Anabilim Dalı 01330 / Balcalı - ADANA