

ADLİ TIP VE POLİMERAZ ZİNCİR RAKSİYON TEKNİĞİ

Dr. İbrahim PİRİM
Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

GİRİŞ:

Polimeraz zincir reaksiyon tekniği (PCR) moleküler çalışmalara yeni bir boyut kazandırmıştır. Bu teknik 1985 de ortaya çıkmış olup araştırma ve klinik laboratuvarlarında DNA yı analiz etme imkanını sağlamıştır. PCR spesifik bir DNA segmentinin enzimatik invitro senteziyle milyonlarca kopyasını ihtiva eder. Bu reaksiyon dublexs DNA da hedef bölgeyle üst üste gelen iki oligonükleotid primerlerinin genişlemesine ve istenilen reaksiyonların meydana gelmesi için değişen sıcaklıklara bağlıdır. Makalemizde bu tekniğin özellikle adli tıpta nasıl kullanılabileceği hakkında bilgi vermeyi amaçladık.

ADLİ TIPTA DNA TEKNOLOJİSİ

Adli tıptaki araştırmacılar vucut sıvılarının yada kan lekelerinin orjinini tesbit etmek için elektroforetik ve serolojik metodları yıllardan beri kullanmaktadırlar (1). Bu sistemleri potansiyel olarak ayırt edebilme gücü belli DNA polymorphism ile kıyaslandığı zaman düşüktür. DNA polymorphismi bir proteinin bir bileşiminin de fiziksel bir değişikliği tesbit edebilme ihtimaline ve polymorphik proteinlerin ekspresyonuna bağlıdır (2). DNA seviyesinde kodlanan genetik markerler kodlama sıralarındaki genetik değişikliklerle sınırlandırılmamıştır. Gerçekte, insan genomunda polymorphik bölgelerin çoğu amino asid kodlayan bölgelerin dışında uzanır. Bütün çekirdekli hücrelerdeki DNA nın varlığı ve DNA seviyesinde potansiyel bilginin yüksek olmasından dolayı, adli tıp alanındaki araştırmacılar 1980 li yılların ortalarında vaka çalışma örneklerinde rekombinant DNA teknolojisini kullanmaya başladılar.

O yıllarda, Alec Jeffrey polymorphik DNA segmentlerinin düşük sıcaklık şartları altındaki hibridizasyonundan sonra tek, spesifik DNA 'fingerprint' lerinin meydana getirilebileceğini gösterdi (3). Daha ilkeri yıllarda tekrar meydana getirilebilir genetik profillerin farklı çevre şartlarına expose olmuş kan lekelerinden, saç kökünden ve meni lekelerinden üretililebileceğide gösterilmiştir (4,5). Belkide DNA teknolojisinin adli tıp'a Ven büyük yardımı tecavüz edenlerin bulunmasında olmuştur. Vajinal bölgeden alınan örneklerde, sperm hücrelerinin yanında epithel hücrelerde bol bulunmaktadır, fakat sperm DNA sını epithel hücre DNA sindan

ayırmak mümkündür (6). Sperm hücresinin baş kısmındaki protein kılıf dithiotreitol (DTT) ile kırılabilir disülfid köprülerini ihtiva eder. Çeşitli deterjan ve proteinazlar kullanılarak kontamine eden hücrelerin DNA sı sperm hücresinin baş kısmında hiç bir değişiklik olmadan salıverilir (şekil 1). Bu işlemten sonra semen hücreleri santrifüjle toplanır (epithel hücrelerden ayırmak için) ve DTT ile muamele edilir.

Yüksek polimorfik 'Loci' için başlangıçtaki yöntemler Southern blots ve radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA Proplarına bağımlıydı. Bu metodlar yüksek moleküler ağırlıklı DNA örneklerindeki farklı alellerin 69 ng kadar tesbitini yapacak kadar hassastır (7). Özellikle bu metodlar babalık davalarında kan örneklerinden ekstrakte edilmiş DNA örnekleri için kullanılır. Bununla beraber, suç vakalarındaki forensik örnekler değişken birçok sıralı tekrar loci (variable number of tandem repeats (VNTR) nin yeterli miktarda yıkılmamış DNA sını her zaman ihtiva etmeyebilir. Yapılan çalışmalar vakalarda bakılan DNA nın stabilitesinin % 48 olduğunu ve örneklerin ya yıkılmış DNA veya tesbit edilemeyecek miktarda DNA nın olabileceğini göstermiştir (8). Diğer mevcut olan problem fragment büyüklüğüne göre yapılan ayırım için kullanılan agarose jelin düşük ayırabilme kapasitesidir. İki allel arasında büyüklük farkı 9 ile 70 baz çifti büyüklüğünde olabilir ve böyle bir farka sahip DNA fragmentleri bir birine yakın göç edecek ve iki allel yerine tek bir allel olarak tiplendirilebilir (9).

FORENSİK DNA TİPLERİ VE PCR

Forensik biyolojik örneklerin DNA tipleri ile ilgili problemleri (mesela, yetersiz DNA, yıkılmış DNA, Jel rezilüsyonu) polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile (PCR) çözülebilir. PCR dayanan tipleri ayırma basit ve çok hassastır (10). Buna ilave olarak bu teknik analiz zaman aralığı çok daha azdır. Yıkılmış veya bölünmüş DNA bir DNA fragmenti olduğu müddetçe amplifikasyon için yeterli bir substrattır. Primer bölgeden VNTR loci de direkt olarak tekrarlanan bölgelerde yanında olarak dizayn olabilirler, böylelikle bir tekrar ünitesinin küçük farklılıkları yüksek ayrımlı jellerde büyüklüğe göre ayırımdan sonra tesbit edilebilirler. Bu alleleri ayırmadaki problemi minimuma indirir ve daha doğru allelleri tahmin etme imkanı sağlar. İlave olarak, bir populasyonda gözlenmiş amplifiye edilmiş allellerden meydana gelmiş bir referans büyüklük markerleri her bir VNTR locus'u için meydana getirmek mümkündür (11). Bu markerler böylece analiz edilmek için PCR ürünleriyle büyüklüklerine göre ayrılırlar.

PCR in yüksek hassaslığından dolayı, polymorphizmi belirlemek için fazla miktarda DNA ya ihtiyaç yoktur. Bu tekrarlanan analizler teknik başarısızlıkların meydana gelme ihtimalinden dolayı büyük bir avantajdır. Veya sonuçların tekrarlanması, tastik edilmesi gerektiğinde az DNA ya ihtiyaç duyulduğundan iyi bir avantajdır.

Kanıt oluşturacak örneklerden DNA anilizi için PCR kullanımı bir suçla ilgili olarak diğer materyallerin kullanılabilmesini mümkün kıldı. (Tablo 1). Şüpheli ve

kurbanlardan DNA örnek referansları her zaman kan olmak zorunda değildir, ağız içi epitel hücreleri, saç, idrardan epitel hücreleri, hatta tımak DNA kaynağı olarak kullanılabilir (12). Sigara izmaritleri tükürüğü ihtiva eder, bu sadece küçük bir miktar DNA dır (10 ile 100 ng arası) ve Sauthern blot analizi için yeterli değildir. Mektup üzerindeki ve puldaki tükürük (az bir miktarda olmasına rağmen) fideye isteme mektuplarında, şantajlarda bunu yapan şahısların bulunmasında biyolojik materyal kaynağı olabilir

Tablo 1: inceleme için toplanmış biyolojik örnekler

	%
1. Karışık örnekler (Semen+kan yada biyolojik örnekler)	41.4
2. Saç	6.8
3. Semen veya kan lekeleri (Elbise, bardak, bıçak vs.)	40.9
4. Tükürük (Sigara izmariti, zarf, pul vs.)	2.8
5. Diğerleri (Kemik, diş vs)	8.1

PCR TEKNİĞİ ÖNEMİ

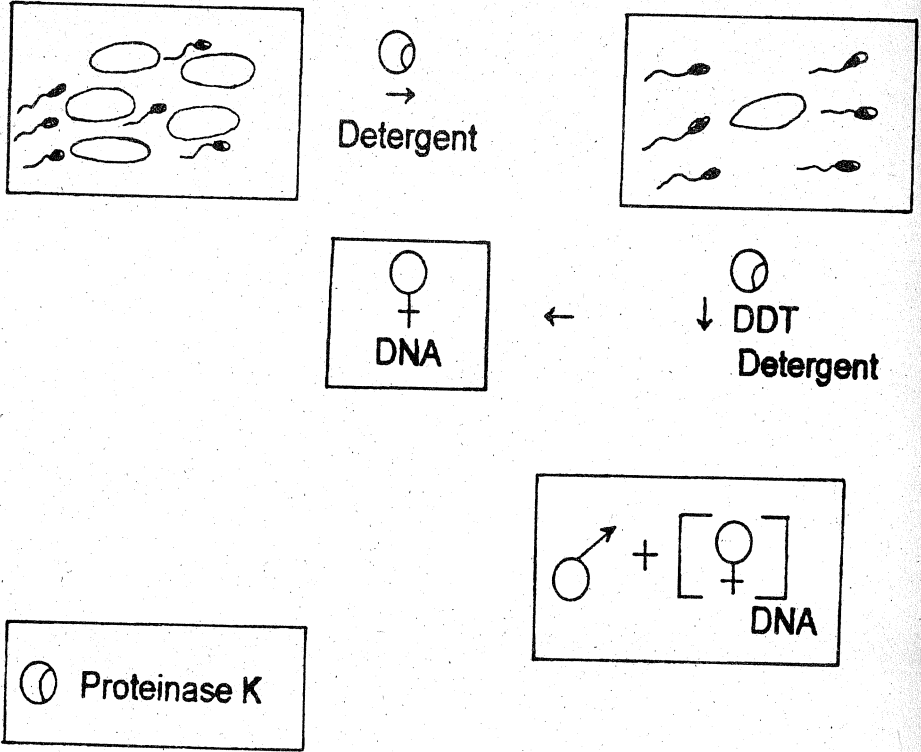
Polimeraz zincir reaksiyonunun hassaslığı DNA örneklerinin yada PCR reaksiyonlarının kontamine olması ilgili şüpheleri artırıyor. Kontaminasyonun en önemli formu önceki amplifikasyondan amplifiye edilmiş DNA daki buluşmadır. Yanlış blir pozitif sonucun neticeleri doğru olmayan sonuçlara yol açabilecek ve önem arz eden vakalarda şüpheliyi suçlu veya suçsuz gösterebilecek durumları oluşturabilir. Bu yüzden kontaminasyonun ortadan kaldırılması oldukça önemli bir konudur (şekil 2). Bu sadece adli tıp oldukça önemli bir konudur (Şekil 2). Bu sadece adli tıp laboratuvarları için değil aynı zamanda PCR'nin kullanıldığı laboratuvarlarda da önemlidir. Diğer potansiyel kontaminasyon kaynağı numunenin alınması esnasında veya numunenin incelenmeye başlamasından evvel hücredeki DNA'nın bulaşmaya maruz kalmasıdır. Bazı ekspertler bu kontaminasyon problemlerini PCR'in tesbit edemeyeceği seviyedeki kontaminasyonları bu hassalıkta DNA örnekleri ile çalışarak minimuma indirirler. Bunlar da gösteriyor ki PCR çalışmaları kontaminasyon kaynaklarından iyi haberdar olmayı ve bunlara karşı tedbir almayı öncelikle gerektiren araştırmalardır.

SONUÇ

Polimeraz zincir reaksiyon tekniği, değişken bir çok sıra tekrarları gibi polimorfik 'loci'lerin tesbiti için Souther blotting tekniğine geçerli bir alternatif olarak kullanılmaktadır. Teknik sadece genetik poliformizimin analizini kolaylaştırmadığı gibi mitokondrial kontrol bölgeleri ve mikrosatelitler gibi yeni markerlerin kullanımı için yeni bir yol açmıştır. Protokolün basitliğinden dolayı, PCR diğer adli tıplaboratuvarları ile veri değişimi ve standardizasyonu sağlar PCR ile yapılan tekniklerde yukarıda da bahsedilen kontaminasyon kaynakları da minimuma indirildiğinde yüksek standart ve hassaslıkta DNA analizleri yapmak mümkündür. Erzurum'da yeni oturtmaya çalıştığımız PCR tekniğini kullanarak yapacağımız çalışmalarımız Biyokimya, Genetik ve Pediatri bölümlerince yürütülecektir. Bu

rada bu tekniğin özellikle adli tıpta ne gibi faydalar sağlayacağını ve tekniğin ne olduğu hakkında bilgi vermek amacıyla ele aldık.

Şekil 1: Kurbanın epitel hücrelerinin saldırganın spermlerinden ayırma işlemi



SUMMARY

POLYMERAZ CHAIN REACTION TECHNIQUE AND FORENSIC MEDICINE

The polymerase chain reaction technique has become a valid alternative to Southern blotting for the detection of highly polymorphic loci such as variable

number of tandem repeats. It has not only facilitated the analysis of genetic polymorphism but it has also opened the way for the use of new markers such as microsatellites and the mitochondrial control region. Because of the simplicity of the protocols, it allows for standardisation and exchange of data with other research and forensic laboratories. It is possible to obtain DNA at high sensitivity by minimizing contamination sources. In our laboratory, we are trying to set up PCR technique by cooperating with genetic and pediatric departments. In here, we planned to introduce the technique which is going to widely use in different areas.

REFERENCES

1. Sensabaugh, G.F.: Uses of polymorphic red cell enzymes in forensic science. *Clin Haematol* 10: 185,207,1981.
2. Jeffrey, A.J., Wilson, V., Thein, S.L.: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73, 1985.
3. Gill, P., Jeffreys, A.J., Werrett, D.J.: Forensic applications of DNA 'fingerprints'. *Nature* 318: 577-579, 1985.
4. 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* 31: 403-408, 1986.
5. Giusti, A., Baird, M., Pasquale, S., Balazs, I., Glassberg, J.: Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J Forensic Sci.* 31: 409,417, 1986.
6. Gill, P., Lygo, J.E., Fowler, S.J., Werrett, D.J.: An evaluation of DNA Fingerprinting for forensic purposes. *Electrophoresis* 8: 38-44, 1987.
7. McNally, L., Shaler, R.C., Baird, M., Balazs, I., De Forest P., Kobilinsky, L.: Evaluation of deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from human bloodstains exposed to ultraviolet light, heat, humidity, and soil contamination. *J Forensic Sci.* 34: 1059-1069 1989.
8. Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S., Jeffreys, A.J.: Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA, *Ann Hum Genet* 51: 269-288, 1987.
9. Lewontin, R.C., Hartl, D.L.: Population genetics in forensic DNA typing. *Science* 254: 1745-1750, 1991.
10. Chakraborty, R., Kidd, K.K.: The utility of DNA typing in forensic work. *Science* 254: 1735-1739, 1991.

11. Impraim, CC., Saiki, RK., Erlich, HA., Teplitz, RL: Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biophys Res Commun* 142: 710-716, 1987.

12. Sajantila, A., Puomilahti, S., Johnsson, V., Ehnholm, C.: Amplification of reproducible allele markers for amplified fragment length polymorphism analysis. *Biotechniques* 12: 16-21, 1992.