

Göz ve Saç Rengini Tahmininde Kullanılan HirisPlex Panelinin Optimizasyonu ve Validasyonu

Optimization and Validation of HirisPlex Panel for Predicting of the Eye and Hair Color

İlksen TAVACI^a, Sümeyye Zülal ŞİMŞEK^a, Veysel SAPAN^a, Cemaleddin ARSLAN^a,
Faruk AŞICIOĞLU^a, Gönül FİLOĞLU^a, Özlem BÜLBÜL^a

^aİstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Günümüzde olay yerinden gelen biyolojik örneklerin kimliklendirilmesinde, şüphelilerin bulunamadığı vakalarda veya toplu felaket kurbanlarının kimliklerinin belirlenmesinde, biyolojik kalıntılardan kişilerin fiziksel karakterini belirlemek mümkün hâle gelmiştir. Tek nükleotid polimorfizmi [single nucleotide polymorphism (SNP)] belirteçleri ile kişinin dış görünüşüne ait bazı fiziksel özellikleri [Externally visible characteristics (EVCs)] (göz, saç, ten rengi gibi) belirlenebilmektedir. Walsh ve ark. tarafından geliştirilen 24 SNP lokusu içeren HirisPlex paneli ile göz ve saç rengini yüksek olasılıkla tahmin etmek mümkündür. Bu çalışmanın amacı, HirisPlex panelinin mini sekanslama (SNaPshot) yöntemiyle optimizasyon ve validasyon çalışmasını yaparak laboratuvarımızda çalışmasını sağlamaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Optimizasyon ve validasyon çalışmalarında pozitif kontrol DNA örnekleri ve 6 bireye ait DNA örnekleri kullanıldı. HirisPlex panelinin SNP belirteçlerinin belirlenmesi için mini sekanslama yönteminde SNaPshot kiti (Thermo Fisher Scientific) uygulandı. Örnekler ABI 310 Genetik Analizör cihazında yürütüldü ve analiz edildi. HirisPlex panelinin validasyonunda analiz eşiği, hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri çalışıldı. Çalışmamızda yeni nesil sekanslama [next generation sequencing (NGS)] yönteminden ve kapiller elektroforezden elde edilen genotip sonuçların karşılaştırılması yapıldı. Saç ve göz rengi tahmininde, multinominal lojistik regresyon modeli (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) kullanıldı. **Bulgular:** Çalışmanın validasyonunda hassasiyet limiti 0,25 ng ve 110 rölatif floresan ünitesi olarak belirlendi (LOD). Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik çalışmalarının sonuçlarında aynı genotipler elde edildi. İki farklı kapiller elektroforez cihazında (ABI 310 ve ABI 3130) gözlenen alellerin uzunlukları arasındaki farklar belirlendi. NGS yöntemi ile kapiller elektroforez sonucu elde edilen genotipler arasında farklılık saptanmadı. Çalışılan örneklerin bilinen göz ve saç renkleri ile bu çalışma sonucunda yapılan tahminlerinin XY5 örneği haricinde uyumlu olduğu görüldü. **Sonuç:** Araştırma sonucunda, HirisPlex panelinin optimizasyon ve validasyon çalışması başarı ile gerçekleştirilerek laboratuvarımızda en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

ABSTRACT Objective: Today, it is possible to predict the physical characteristics of the individuals from their biological remains found in the crime scene, in cases where suspects are absent, or in the identification of the mass disaster victims. Externally visible characteristics (such as eye, hair, skin color) (EVCs) can be determined using SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers. HirisPlex panel by Walsh et al., contains 24 SNP loci, can be used to predict eye and hair color with high probabilities. The aim of this study is to perform optimization and validation studies of the HirisPlex panel using the minisequencing (SnaPshot) method for its application in our laboratory. **Material and Methods:** The positive control DNA samples, and DNA samples belonging to six individuals are included in the optimization and validation studies. The SNaPshot kit (Thermo Fisher Scientific) minisequencing method is applied for the detection of the HirisPlex panel SNPs. Samples were run and analyzed on the ABI 310 Genetic Analyzer instrument. In the validation of the HirisPlex panel, the analysis threshold, sensitivity, repeatability, and reproducibility were studied. We also compared the genotype results obtained from the next generation sequencing (NGS) and capillary electrophoresis. The multinomial logistic regression model (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) is used for hair and eye color prediction. **Results:** In the validation of the study, the sensitivity limit is determined as 0.25 ng and 110 RFU (LOD). The same genotypes were obtained from the reproducibility and reproducibility studies. The observed allele sizes varied on two capillary electrophoresis devices (ABI 310 and ABI 3130). No genotypes difference detected between NGS and capillary electrophoresis methods. The predicted eye and hair color of the study samples are compatible with the known eye and hair colors except XY5. **Conclusion:** Optimization and validation studies of HirisPlex panel have been successfully carried out under the most favorable working conditions in our laboratory.

Anahtar Kelimeler: Fenotip tahmini; tek nükleotid polimorfizmi; validasyon

Keywords: Phenotype prediction; single nucleotide polymorphism; validation

Correspondence: Özlem BÜLBÜL

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: ozlem.bulbul@istanbul.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences.

Received: 22 Oct 2020

Received in revised form: 15 Dec 2020

Accepted: 14 Jan 2021

Available online: 21 Jan 2021

2619-9459 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Adli kimliklendirmede uzun yıllardan beri kısa tekrar dizileri [short tandem repeat (STR)] kullanılmaktadır. Ancak bir suçu aydınlatmak üzere olay yerinden gelen örnekler veya toplu felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi amacıyla çalışılan örnekler çoğunlukla çevresel koşulların etkisiyle “degrade” olduklarından, STR ile başarılı bir profil elde edilememektedir. Ayrıca STR ile elde edilen DNA profillerinin şüphelilerin bulunmadığı durumlarda karşılaştırmaya olanak verilmemesinden dolayı alternatif yaklaşımlara gerek duyulmaktadır.^{1,2} Son teknolojik gelişmeler ışığında yapılan genetik çalışmalarda, insan genomu üzerinde bulunan bazı tek nükleotid polimorfizmi [single nucleotide polymorphism (SNP)] belirteçlerinin [fenotipik SNP (PISNPs)] insan boy uzunluğu, ten rengi, yüz şekli, saç ve göz rengi gibi gözle görülebilir fiziksel özelliklerden [external visible characteristics (EVC)] sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu bilgilerin kullanılabilmesi için bu özelliklerin genetik yapılarına ait araştırmaların tamamlanması ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi gerekmektedir.³

Günümüzde, genetik yapısı en iyi bilinen pigmentasyon varyasyonları; göz, saç ve ten ile ilgili varyasyonlardır. Bu nedenle araştırmalar bu 3 fenotip ile başlamıştır.⁴ Şimdiye kadar genetik yapısı en iyi bilinen göz rengi ile ilgili birçok adli amaçlı analiz ve tahmin yöntemi geliştirilmiştir. Özellikle *OCA2* geninin promotör bölgesinde bulunan ve *HERC2* geninde yer alan mavi ve kahverengi göz rengi varyasyonlarının büyük bir bölümünden sorumlu olan rs12913832 SNP belirteçleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır.⁵⁻⁷ Göz rengi ile ilgili bilinen ve Avrupa’da birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılan Irisplex panelinde 6 SNP belirteci ile mavi ve kahverengi göz rengi tahmini yapılmaktadır.⁸ Irisplex panelinde *HERC2* geninde bulunan rs12913832 SNP belirteci esas alınmış ve buna ek olarak *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *TYR* ve *IRF4* genlerinden birer SNP belirteci seçilmiştir. Tahmin modeli olarak önceki çalışmada geliştirilen, multinominal lojistik regresyon model istatistiği yöntemini kullanılmışlardır.⁹ Bu yöntemle seçilen 6 PISNP belirteciyle mavi ve kahverengi göz rengi %91,6 ve %87,5 başarıyla tahmin edebilmektedir. Türkiye’de de benzer şekilde toplumumuza ait göz rengi dağılımının belirlenmesi ve tahmini için çalışmalar yapılmıştır.^{10,11}

Saç rengi ile ilgili ilk adli araştırmalar ise kırmızı/kızıl saç rengine etki eden *MC1R* gen bölgesinin çalışılması ile başlamıştır. Grimes ve ark., *MC1R* geninde bulunan 12 SNP belirteci ile yaptıkları çalışmada, kırmızı saç renginin ayırt edilemeyeceğini test etmişlerdir. Kırmızı saçlı kişilerde geliştirilen bu tahmin yönteminin başarı oranı %84 olarak gösterilmiştir.¹² Son yıllarda saç ve göz rengi ile ilgili bilgi veren adli amaçlı Hirisplex yöntemi geliştirilmiştir. Bu SNP setine daha önceden göz rengi ile ilgili geliştirilen Irisplex setine ilaveten 18 PISNPs belirteci daha eklenmiştir. *MC1R* geninde yer alan bir dizi SNP yanında diğer gen bölgelerinden de SNP belirteci seçilmiştir. HirisPlex panelinde yer alan toplam 24 SNP belirteci, 11 gen (*MC1R*, *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *IRF4*, *EXOC2*, *TRYPI*, *TYR*, *KITLG* ve *PIGU/ASIP*) bölgesinde bulunmaktadır. Hirisplex seti oluşturulurken Avrupa’da pigmentasyon varyasyonlarıyla ilgili en fazla bilgi veren SNP belirteçleri seçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre saç rengi ile ilgili tahmin yüzdeleri sırasıyla sarı saçlarda %69,5, kahverengi saç rengine %78,5, kızıl saçlarda %80 ve siyah saç rengine %87,5 olarak bulunmuştur. Ancak araştırmacılar, Avrupa dışındaki popülasyonlarda bu panelin test edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.^{2,13}

Bu çalışmanın amacı, 24 SNP HirisPlex sisteminin polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ve kapiller elektroforeze dayalı minisekanslama yöntemiyle optimizasyon ve validasyonunun yapılmasıdır. Böylece laboratuvarımızda olay yerinden gelecek eşkali bilinmeyen örneklerin saç ve göz rengi tahmini yapılarak polis ve jandarmanın faillere daha hızlı bir şekilde ulaşmasına katkı sağlamasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, örneklerin DNA izolasyonu (gönüllü örnekleri için) ve DNA miktar tayini, PCR, PCR ürünlerinin saflaştırılması, SNaPshot (Thermo Fisher Scientific, ABD) reaksiyonu, SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması, SNaPshot reaksiyon ürünlerinin ABI 310 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile elektroforezi ve analizi, göz ve saç renklerinin istatistiksel tahmini olmak üzere 7 basamakta gerçekleştirildi. Validasyon çalışması için analiz eşiği,

hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri çalışıldı.

Çalışma ile ilgili etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (8.7.2016 tarih ve 217664 sayı). Çalışma Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak planlandı.

ÖRNEKLEM GRUBU

Bu çalışmada biyolojik örnek olarak; miktarı bilinen 9947A (10 ng/μL) (Thermo Fisher Scientific, ABD), K562 (10 ng/μL) (Promega, ABD), Taqman (Thermo Fisher Scientific, ABD), XY5 (Qiagen, Almanya) kodlu pozitif kontrol DNA'ları, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi- Genetik Departmanı bünyesinde bulunan Kidd Laboratuvarı'ndan elde edilen 2 DNA örneği (JK5060 ve JK1105) ve bilgilendirilmiş onamları alınan 4 kişinin ağız içi sürüntü (bukkal swab) örnekleri kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan gönüllü DNA örneklerine ait bilenen göz ve saç renkleri şu şekildedir; Örnek 1, Örnek 2, Örnek 3'ün göz rengi kahverengidir. Örnek 4'ün bilenen göz rengi ise yeşildir. Örnek 1 ve Örnek 2'nin saç rengi siyahtır. Örnek 3 ve Örnek 4'ün saç rengi kahverengidir. Kontrol DNA örneklerinin beklenen göz renkleri daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre 9947A (Thermo Fisher Scientific, ABD), ve K562 (Promega, ABD) mavi; Taqman (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve XY5 (Qiagen, Almanya) kahverengi göz rengine sahiptirler. Kontrol DNA örneklerinin beklenen saç renkleri ise Taqman (Thermo Fisher Scientific, ABD) siyah saç renkli, K562 (Promega, ABD) kıvılc saçlı, XY5 (Qiagen, Almanya) koyu kahverengi ve 9947A (Thermo Fisher Scientific, ABD) açık kahverengiye sahiptirler. JK5060 örneği kahverengi gözlü ve siyah saçlı, JK1105 ise kahverengi göz ve saç rengine sahiptir.

GENOTİPLEME

DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini: Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu, PureLink-Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak yapıldı. DNA miktarları florometrik (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, ABD) yöntem ile belirlendi.

PCR: HIRISplex panelinin içerdiği 24 SNP'ye ait (N29insA, rs11547464, rs885479, rs1805008, rs1805005, rs1805006, rs1805007, rs1805009, Y152OCH, rs2228479, rs1110400, rs28777, rs16891982, rs12821256, rs4959270, rs12203592, rs1042602, rs1800407, rs2402130, rs12913832, rs2378249, rs12896399, rs1393350, rs683) PCR primerleri ve SNaPshot primerleri Walsh ve ark.nın çalışmalarından referans alınarak tasarlandı. Çalışmanın ilk aşamasında 24 SNP lokusunun büyüklüklerini (size) saptamak için önce tekli daha sonra çoklu PCR yapıldı. Çoklu PCR reaksiyonu için 10 μL hacimde; 1X Taq PCR Master Mix (Qiagen, Almanya), 0,4-0,5 mM aralığında hazırlanan primer karışımı, ddH₂O ve 63 pg-1,5 ng DNA örnekleri kullanıldı. PCR döngüsü; 95°C'de 10 dk denatürasyon, 95°C'de 30 sn, 61°C'de 30 sn olacak şekilde 33 döngü ve 61°C'de 5 dk'ya ayarlandı.

Birinci Saflaştırma: PCR sonrası reaksiyona girmeyen deoksiniükleotid trifosfat ve primerlerin uzaklaştırılması için ekzonükleaz I (Exo I-Thermo Fisher Scientific, ABD) ve shrimp alkalin fosfat (SAP-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Bu işlem için her 2,5 μL PCR ürünü üzerine 0,75 μL (1 u/μL) SAP ve 0,25 μL (10 u/μL) Exo I eklendi. Karışım 37°C'de 90 dk ve 85°C'de 15 dk bekletildi.

Tek Baz Uzama Reaksiyonu (SBE) (SNaPshot reaksiyonu): Her bir SNaPshot reaksiyonu için 1 μL SNaPshot reaksiyon karışımı (Thermo Fisher Scientific, ABD), 0,1 mM SNaPshot primer, 0,39 μL ddH₂O ve üzerine 2 μL saflaştırılmış ürün eklenerek tek baz uzama reaksiyonu hazırlandı. SNaPshot reaksiyon döngüsü; 96°C'de 2 dk denatürasyon, 96°C 10 sn, 50°C'de 5 sn ve 60°C'de 30 sn olacak şekilde 25 döngü olarak ayarlandı.

İkinci Saflaştırma: SNaPshot reaksiyon sonrasında floresan işaretli bağlanmamış dideoksiribonükleozid trifosfatları etkisiz hâle getirmek için SNaPshot ürünü-SAP karışımı hazırlandı. 5 μL SNaPshot reaksiyon ürünü üzerine 1 μL SAP (1 U/μL) eklendi. Karışım 37°C'de 80 dk, 85°C'de 15 dk bekletildi.

Kapiller Elektroferez ve Verilerin Analizi: PCR ürünlerinin elektroforezi POP4 polimeri kullanılarak ABI Prism 310 Genetik Analizör (Applied Bi-

osystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında yapıldı. Verilerin analizi de GeneMapper Software v4.0 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD)'de gerçekleştirildi. 24 SNP lokusunun beklenen alel uzunluklarıyla elektroforegramdaki alel pik uzunlukları karşılaştırılarak SNP alellerinin görünen uzunlukları (size) belirlendi. Belirlenen SNP alellerinin uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları Microsoft Excel 2010 programı ile hesaplandı.

VALIDASYON ÇALIŞMASI

Validasyon çalışmasında ilk olarak analiz eşiği belirlendi. Bunun için 10 adet negatif kontrol örneği yürütüldü. Hassasiyet çalışması için 9947A kontrol DNA örneği 0,125-0,25-0,5-1,5 ng olacak şekilde sunulandırıldı. Hazırlanan her konsantrasyon için beşer reaksiyon hazırlanarak 9700 PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında hedeflenen bölgeler çoğaltıldı. Tekrarlanabilirlik için; 9947A pozitif kontrol DNA örneği 5 defa aynı laboratuvar ve aynı cihazda ve farklı zamanlarda farklı analistler tarafından çalışıldı. Tekrar üretilebilirlik için 5 gönüllüden alınan örnekler POP7 polimerinin kullanıldığı ABI Prism 3130 Genetik Analizör cihazında farklı bir laboratuvar ve farklı analistler tarafından yürütüldü. Sonuçlar analiz edilerek gözlenen alellerin uzunlukları karşılaştırıldı ve genotip tayini yapıldı.

Ayrıca 2 kapiller elektroforez cihazı (ABI Prism 3130 ve ABI Prism 310, Thermo Fisher Scientific, ABD) arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmanın yanında analiz yöntemi farklı olan yeni nesil sekanslama yöntemi [next generation sequencing (NGS)] ile de sonuçlar karşılaştırıldı. Taqman (Thermo Fisher Scientific, ABD), K562 (Promega, ABD), 9947A (Thermo Fisher Scientific, ABD), XY5 (Qiagen, Almanya) kontrol DNA'ları, 4 gönüllünün örneği ve Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi- Genetik Departmanı bünyesinde bulunan Kidd Laboratuvarı'ndan elde edilen 2 DNA örneği Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında analiz edildi. Sekanslama sonucu elde edilen genotipler ABI 310/3130 (Thermo Fisher Scientific, ABD)'dan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Göz ve saç rengi tahmini, Walsh ve ark. tarafından geliştirilen, multinominal lojistik regresyon model istatistiğine dayalı online yazılım (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) kullanılarak yapıldı. 24 SNP genotipi için minör alel sayısı (0, 1 veya 2) olarak programa giriş yapıldı. Göz rengi için 0,7 eşikten daha yüksek olasılık kabul eşiği olarak değerlendirildi.⁷ Saç rengi için Walsh ve ark.'nın belirlemiş olduğu 0,5 olasılık eşiğine göre sınıflandırma yapıldı.¹⁴

BULGULAR

OPTİMİZASYON VE VALIDASYON

Çalışmanın ilk aşamasında HirisPlex 24 SNP lokusunun görünen uzunluklarını saptamak için her bir lokus tek tek çalışıldı. Daha sonra yapılan çoklu reaksiyonlarda elde edilen bu uzunluklar referans olarak kullanıldı. ABI 310 cihazında çalışılan tüm örneklere göre hesaplanan SNP alel uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları **Tablo 1**'de görülmektedir.

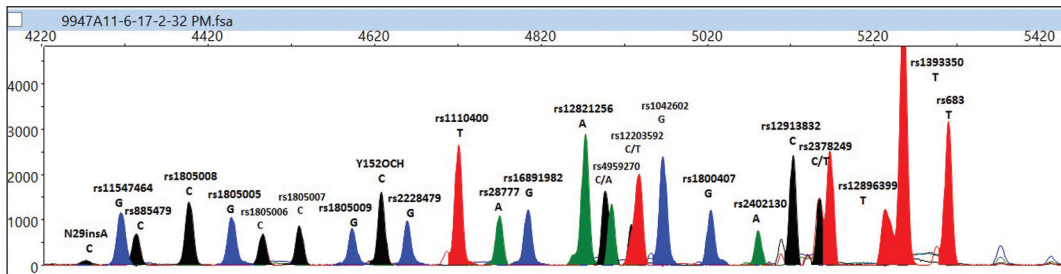
Çalışmada, HirisPlex panelinin çoklu PCR çalışmasında Walsh ve ark. tarafından önerilen primer miktarları kullanıldı.¹⁴ Ancak elde edilen elektroforegramda bazı piklerin çok yüksek bazılarının ise analiz eşiğinin altında kaldığı veya hiç görülmediği belirlendi. Örneğin N29insA lokusu ilk hazırlanan primer karışımında analiz eşiğinin altında kaldığı için pik görülemedi. Bu lokusun çoklu PCR karışımındaki konsantrasyon miktarı artırılarak analiz eşiğinin üzerinde görülmesi sağlandı. rs1393350 lokusunun ise en yüksek pik yüksekliğine sahip olduğu görüldü. Pik dengesi için konsantrasyon miktarı azaltılarak pikler arasında denge sağlandı. 9947A kodlu pozitif kontrol ile çalışılan HirisPlex'e ait örnek bir elektroforegram görüntüsü **Şekil 1**'de verilmiştir.

Panelin validasyonunda analiz eşiğini belirlemek için 10 adet DNA içermeyen negatif kontrol örneği yürütüldü. Elde edilen sonuçlarda cihazın gürültü seviyesinin görüldüğü "base line"daki piklerin [<50 rölatif floresan ünitesi (relative fluorescence unit "RFU")] analizi etkilemeyecek kadar küçük olduğu saptandı.

TABLO 1: HirisPlex panelinin ABI 310 cihazında gözlenen SNP uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları.

SNP kodları	SBE primer uzunluğu	Görülen polimorfizm	Görülen renk	Görülen renk	Ortalama (T)	Standart sapma (T)	Ortalama (C)	Standart sapma (C)	Ortalama (A)	Standart sapma (A)	Ortalama (G)	Standart sapma (G)
P1	23	C-insA					28,860	0,580				
P2	28	G-A									31,61	0,621
P3	34	C-T					33,770	0,564				
P4	33	C-T					38,520	0,298				
P5	35	G-T									40,982	0,563
P6	38	C-A					44,694	0,304				
P7	44	C-T					47,452	0,266				
P8	48	G-C									51,884	0,409
P9	51	C-A					53,738	0,301				
P10	54	G-A									56,662	0,427
P11	56	T-C			58,912	0,325						
P12	58	A-C							61,552	0,195		
P13	62	G-C									64,904	0,551
P14	66	A-G							69,614	0,349		
P15	68	C-A					71,880	0,383	72,562	0,378		
P16	69	C-T			74,452	74,745	73,858	0,206				
P17	73	G-T									75,876	0,382
P18	77	G-A									79,936	0,236
P19	80	A-G							83,890	0,309		
P20	83	C-T					86,730	0,370				
P21	86	T-C			89,562	0,204	88,742	0,170				
P22	88	T-G					93,606	0,287				
P23	92	C-T					95,706	0,205				
P24	95	T-G					99,450	0,323				

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi, SBE: Tek baz uzama reaksiyonu.

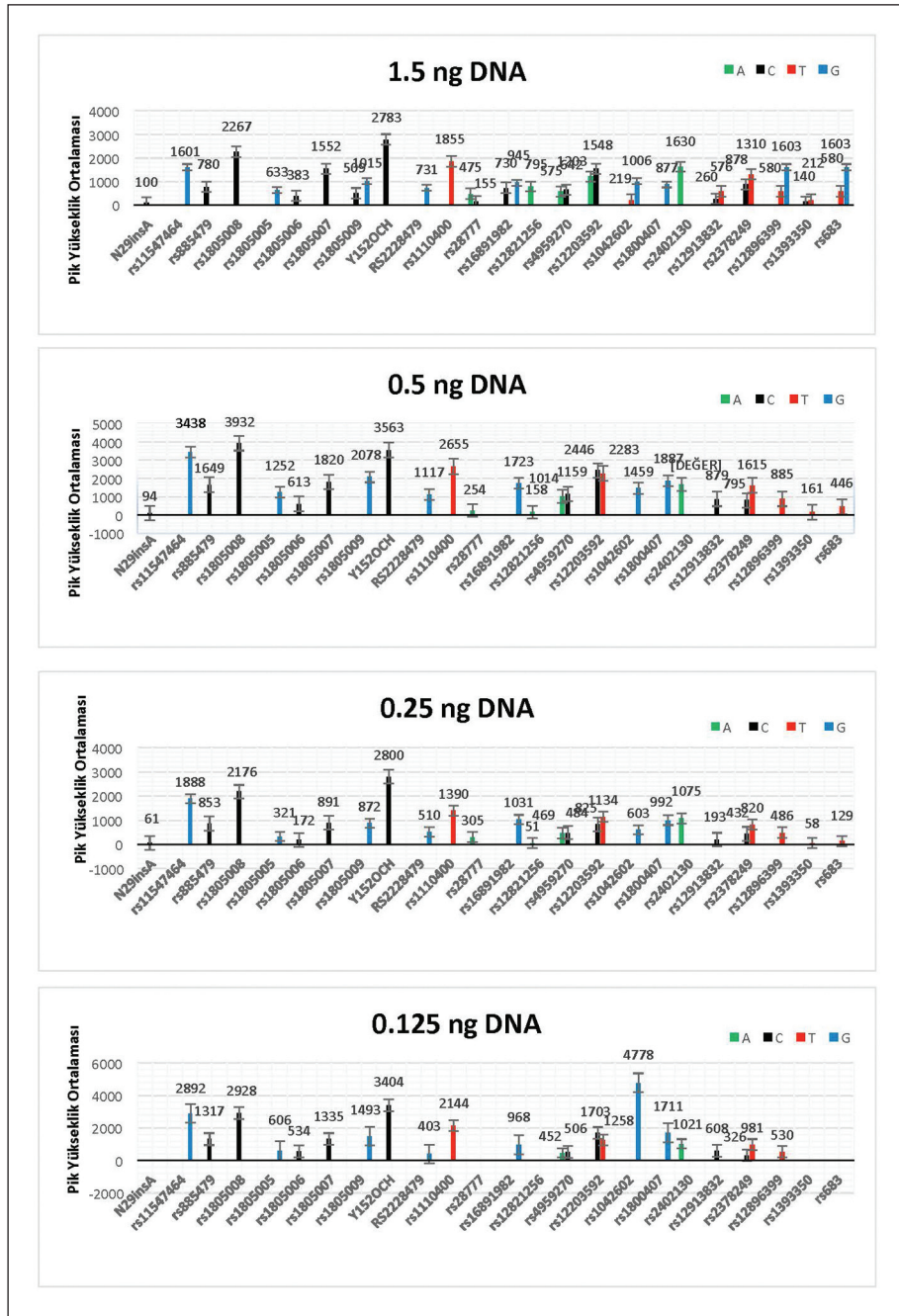


ŞEKİL 1: HirisPlex panelinin 9947A kontrol örneğine ait elektroferogram görüntüsü.

DNA örneklerinden tam güvenilir profil elde etmek için kullanılacak en az DNA miktarı analiz yönteminin hassasiyetini göstermektedir. Hassasiyet parametresinin belirlenmesinde 9947A kodlu pozitif kontrol DNA örneğinden hazırlanan 0,125-1,5 ng aralıktaki her bir DNA konsantrasyonu için 5 kez çalışma yapıldı. PCR ürünlerine ait yürütmeler en düşük DNA miktarından (0,125, 0,25, 0,5 ve 1,5 ng) en yüksek DNA miktarına doğru tüm yürütmeler analiz edilerek genotipleme yapıldı. Değerlendirilebilir

piklerin elde edildiği DNA miktarı 0,25-1,5 ng arasında olduğu belirlendi. Alel kayıpları 0,125 ng ve altındaki konsantrasyonlarında görüldü (Şekil 2). Buna göre hassasiyet limiti 0,25 ng ve 110 RFU olarak belirlendi.

Tekrarlanabilirlik çalışması için, 9947A pozitif kontrol örneği aynı laboratuvarında ve aynı cihazlarda farklı zaman dilimlerinde aynı analist tarafından 5 kez çalışıldı. Her çalışmanın analizi sonucunda aynı genotipler elde edildi.



ŞEKİL 2: Çalışma sonucunda elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması. (Kullanılan konsantrasyonlar sırasıyla; 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng'dir).

Tekrar üretilebilirlik çalışmasında ise aynı örneklerin farklı laboratuvarlar ve analistlerin çalışması sonucunda; ABI 310 genetik analizör cihazında gönüllülere ait yürütülen örneklerin uzunluk ortalamaları ile ABI 3130 genetik analizör cihazında görülen uzunluk ortalamaları ile karşılaştırıldı (Tablo 2). Göz-

lenen ortalama en düşük uzunluk 0,009 (R6G, uzunluk: 68) ile ortalama en yüksek uzunluk 4,1 (dTAMRA™, uzunluk:34, Thermo Fisher Scientific, ABD) olarak belirlendi. İki cihaz arasında gözlenen ortalama uzunluk farkı ise 1,34 olarak hesaplandı (Tablo 2).

TABLO 2: ABI 310 ve ABI 3130 genetik analizör cihazında gözlenen tek nükleotid polimorfizmi uzunluk ortalamaları arasındaki fark.

Beklenen uzunluk	dROXTM	dTAMRATM	R6GTM	dR110TM
	ddTTP	ddCTP	ddATP	ddGTP
	ABI 310/ABI 3130 POP4/POP7	ABI 310/ABI 3130 POP4/POP7	ABI 310/ABI 3130 POP4/POP7	ABI 310/ABI 3130 POP4/POP7
23	0,55			
28				3,62
34	4,10			
33	2,10			
35			2,57	
38	1,96			
44	1,81			
48			0,92	
51	1,73			
54			0,60	
56	1,88			
58			1,89	
62				1,21
66			0,54	
68		0,45	0,09	
69	1,18	0,76		
73				1,50
77				1,65
80			1,24	
83		1,52		
86	0,71	2,42		
88	0,28			
92	0,71			
95	1,03			

Çalışmada ayrıca analiz teknolojisi farklı olan NGS yöntemi ile kapiller elektroforez yöntemine dayalı genotip sonuçları karşılaştırıldı. Bulbul ve Filoglu tarafından NGS yöntemi ile Hirisplex SNP belirteçlerinin de olduğu bir panel çalışıldı.¹⁵ Bu çalışmada da önceki NGS çalışmasından elde edilen pozitif kontrol DNA örneklerinin (9947A, Taqman, K562 ve XY5) ve 6 gönüllü örneğinin genotipleri ile ABI 310/3130'da elde edilen genotiplerle karşılaştırıldı. *MCRI* geni üzerinde bulunan rs1805005 belirtecinin NGS için tasarlanan panelde yer almaması nedeniyle, genotip karşılaştırması 23 lokus üzerinden yapıldı. Elde edilen tüm örneklerin genotipleri arasında hiç bir farklılık saptanmadı. Ayrıca, kapiller elektroforez yönteminde düşük RFU değerinden dolayı analizi en zor olan N29insA lokusu, NGS yönteminde yüksek kapasite (coverage) ile analiz edilebildi.

FENOTİP ANALİZİ

Bu çalışmada kullanılan kontrol DNA örneklerinin (9947A, Taqman, K562 ve XY5) ve 6 gönüllü örneğinin genotiplerinin göz ve saç renk tahminleri çevrim içi Hirisplex (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) programında hesaplandı. Toplam 10 örneğin göz ve saç rengi tahminleri Tablo 3'te görülmektedir. Bu sonuçlara göre kontrol DNA örneklerinin göz rengi; 9947A'nın p değeri 0,974 ve K562'nin p değeri 0,848 hesaplanarak mavi gözlü olarak tahmin edildi. Taqman'nın p değeri 0,998 olarak hesaplanarak kahverengi gözlü olarak bulundu. XY5'in kahverengi göz rengi p değeri 0,632 olup, analiz eşliğinin (0,7) altında kaldığı için değerlendirilemedi.

Gönüllülerden alınan DNA örneklerine ait göz rengi analizleri şu şekildedir; Örnek 1'in p değeri 0,971, Örnek 2'nin p değeri 0,998, Örnek 3'ün p de-

TABLO 3: Örneklerin saç ve göz rengi tahmin sonuçları.

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Taqman DNA	K562	XY5	9947A	JK1105	JK5060
	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri	Göz rengi p değeri
Mavi	0,004	0	0,001	0,001	0	0,848	0,157	0,974	0,001	0
Yeşil	0,025	0,002	0,005	0,035	0,002	0,088	0,211	0,023	0,017	0,002
Kahverengi	0,971	0,998	0,995	0,964	0,998	0,065	0,632	0,004	0,982	0,998
	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri	Saç rengi p değeri
San	0,031	0,003	0,026	0,115	0,002	0,04	0,096	0,354	0,088	0,005
Kahverengi	0,418	0,351	0,565	0,598	0,333	0,024	0,769	0,562	0,685	0,362
Kızıl	0,001	0	0	0	0	0,936	0,002	0,007	0	0
Siyah	0,551	0,646	0,409	0,286	0,665	0	0,133	0,076	0,226	0,634
	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri	Saç rengi tonu p değeri
Açık	0,062	0,005	0,045	0,243	0,002	0,996	0,37	0,771	0,203	0,01
Koyu	0,938	0,995	0,955	0,757	0,998	0,001	0,63	0,229	0,797	0,99

En yüksek değerler kalın ve italik yazılmıştır.

ğeri 0,995, Örnek 4'ün p değeri 0,964 ve Kidd Laboratuvarı'ndan alınan örneklerden JK1105'in p değeri 0,982 ve JK5060'ın p değeri 0,998 olarak hesaplandı ve göz rengi tahmini olarak kahverengi bulundu.

DNA örneklerinin saç rengi analizinde ise K562'nin saç rengine ait p değeri 0,936, saç rengi tonuna ait p değeri 0,996 hesaplanarak kırmızı (kızıl) olarak tahmin edildi. Diğer DNA örnekleri için sırasıyla; saç rengi ve saç rengi tonuna ait p değerleri Örnek 1 için 0,551-0,938 Örnek 2'nin 0,646-0,995, Taqman'ın 0,656-0,998 ve JK5060'ın 0,634-0,99 hesaplanarak saç renkleri siyah olarak tahmin edildi. Örnek 3'ün 0,565-0,955, Örnek 4'ün 0,598-0,757, XY5'in 0,769-0,63, JK1105'in 0,68-0,797 p değerleri hesaplanarak saç rengi koyu kahverengi ve 9947A p değerleri 0,562-0,771 olarak hesaplanarak ve açık kahverengi olarak tahmin edildi.

Elde edilen göz ve saç rengi tahminlerinin tüm örneklerin (Örnek 4 ve XY5 hariç) bilinen göz ve saç renkleri ile uyumlu olduğu görüldü. Örnek 4'ün bilinen göz rengi yeşil olmasına rağmen 0,964 tahmin oranıyla kahverengi göz rengi olarak tespit edildi. XY5 pozitif kontrol DNA örneğinin göz rengi tahmini ise her ne kadar kahverengide en yüksek değere ulaşsa da belirlenen analiz eşliğinin altında kaldığı için tahmin sonucu verilemedi.

TARTIŞMA

Günümüzde rutinde kimliklendirme için fiziksel özellik olarak sadece cinsiyet ayrımı yapılmaktadır. Bunun yanında kullanılacak diğer fiziksel özellikler bir şüpheliye ait önemli bilgiler sağlamaktadır.¹⁶⁻¹⁸ Özellikle soruşturma aşamasında şüphelinin bulunmadığı durumlarda faile ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, semen tükürük gibi) kişinin dış görünüşüne ait fikir verebilecek herhangi bir bilginin bulunması soruşturmanın aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Şüpheli

haricinde kimliklendirme gerektiren diğer olgularda da (kayıp kişilerin bulunması, toplu felaketlerde insana ait kalıntıların kimliklendirilmesi gibi) fiziksel görünümüne ait bilgi edinilmesi önemlidir. Bu çalışmada, saç ve göz rengi tahmini için HirisPlex panelinin laboratuvarımızda güvenilir bir şekilde çalışılabilmesi için gerekli optimizasyon ve validasyon çalışması yapılmıştır.

Adli bilimlerde olay yerinden toplanan örnekler genellikle eser miktarda ve bozulmuş durumda olduğundan, DNA miktarları ve kaliteleri düşüktür. Bu tür örneklerde tam bir profil elde etmek için kullanılacak SNP analiz yönteminin hassasiyeti yüksek olmalıdır.¹⁹ Çalışmamızda HirisPlex panelinin hassasiyetini belirlemek için 9947A pozitif kontrol DNA örneği (Thermo Fisher Scientific, ABD) farklı miktar aralıklarında (0,125-1,5 ng) sulandırılarak çalışılmıştır (Şekil 2). DNA miktarı 0,125 ng kullanıldığında alel düşmeleri (allelic drop-out) nedeniyle tam profil elde edilememiştir. Böylece laboratuvarımızda SNaPshot (Thermo Fisher Scientific, ABD) yöntemi ile HirisPlex panelinin analizi için en düşük DNA miktarı 0,25 ng ve en ideal DNA miktarının 0,25-1,5 ng aralığında olduğu belirlenmiştir. Walsh ve ark., HirisPlex panelinin hassasiyeti için değişik miktarlarda (500, 250, 125, 63 ve 32 pg) DNA örneği kullanmışlardır. Araştırmaya göre, en az 500 pg DNA örneği kullanıldığında güvenilir bir tiplendirme yapılabildiğini bildirmişlerdir.² Ayrıca Walsh ve ark., özellikle düşük miktarda ve kalitede DNA ile çalışıldığında, kırmızı saç belirleyen N29insA lokusunun belirlenemediğini bildirmişlerdir.^{2,14} N29insA bir InDel (İnsersiyon/Delesyon) lokusu olup, bu lokusların çoğaltılması için yapılan tasarımlar zordur. Bu nedenle, N29insA lokusu paneldeki en düşük pike sahiptir.² Çalışmamızda da N29insA lokusu tiplendirmede en çok zorlandığımız bölge olup paneldeki pik yüksekliğinin en düşük olduğu lokustur. 0,125 ng DNA kullanıldığında sadece bu lokusta alel kayıpları gözlenmiştir.

Validasyonun tekrarlanabilirlik parametresi için 9947A kodlu pozitif kontrol (Thermo Fisher Scientific, ABD) örneği farklı zamanlarda 5 kez çalışılmış ve her çalışmada aynı genotip elde edilmiştir. Bu da yöntemin tekrarlanabilir olduğunu ortaya koymuştur. Tekrar üretilebilirlik parametresinde ise farklı cihaz (ABI 310 ve ABI 3130, Thermo Fisher Scientific,

ABD) ve farklı analistlerin çalışması sonucu cihazın lazerine, ortam koşullarına ve kullanılan polimere (POP-4 ve POP-7, Thermo Fisher Scientific, ABD) bağlı olarak SNP alel uzunluklarında kaymaların olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). SNaPshot yönteminde bu tür kaymaların olduğu çeşitli araştırmacıların çalışmalarında da belirtilmiştir.^{20,21} Çalışmamızda, 2 cihaz arasında yapılan karşılaştırmada görülen kaymaların nedeninin kullanılan cihaza, polimere ve ortam koşullarına bağlı olduğu belirlenmiş ve POP7'nin kullanıldığı ABI 3130'daki alellerin uzunlukları POP4'ün kullanıldığı ABI 310 cihazına göre daha ilerde olduğu gözlenmiştir. Aynı lokuslar arasındaki farkın ise en fazla 4 baza kadar çıktığı görülmüştür (Tablo 2).

Yöntemler arası, kapiller elektroforez ve NGS arasındaki karşılaştırmaya bakıldığında; Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific, ABD) NGS ile elde edilen genotiplerle ABI 310 (Thermo Fisher Scientific, ABD)'da elde edilen genotiplerin aynı olduğu ve saç-göz rengi tahminlerinin de birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir.¹⁹ Aradaki fark NGS yönteminde rs1805005 lokusu analiz edilemediğinden 23 lokus ile hesaplama yapılırken, kapiller elektroforez yönteminde 24 lokus ile tahmin yapılmıştır. İki yöntem sonucunda çalışılan örnekler için genotiplerinin uyuşması hâlen adli laboratuvarlarda kullanılan kapiller elektroforeze dayalı yöntemlerin NGS yöntemi ile aynı güvenilirlikte sonuçlar verdiğini göstermektedir. SNaPshot'a dayalı kapiller elektroforez yönteminin diğer bir avantajı da analiz edilemeyen lokusların (alel düşmesi gibi) ayrı bir şekilde "singleplex" çalışılabilmesidir. Ayrıca SNaPshot yöntemi NGS yöntemine göre daha az maliyetlidir.

Fenotip sonuçları incelendiğinde; mavi ve kahverengi gözlü örneklerin tahminleri başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Ancak sadece Örnek 4'ün göz rengi tahmini doğru olarak yapılamamıştır. Bilinen göz rengi yeşil olmasına rağmen 0,964 doğruluk oranıyla kahverengi göz rengi olarak tahmin edilmiştir. Bu paneli geliştiren araştırma grubu Hirisplex sisteminin, mavi/ kahverengi göz renklerini yüksek doğrulukta tahmin edilebildiğini ancak yeşil-ela ve ara renklerin tahminlerinin düşük olduğunu/doğru yapılamadığını bildirmişlerdir.^{2,13} Göz rengi tahmini ile ilgili Bulbul ve ark. tarafından Irisplex paneli (HI-

risplex'in sadece göz ile ilgili SNP lokuslarını içeren alt grubu) kullanılarak Türkiye toplumunda yapılan araştırmada mavi/kahverengi göz rengi fenotiplerinin yüksek doğrulukla tahminin mümkün olduğunu ancak yeşil ve ela gibi ara göz renkleri için daha az güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.¹¹ Yeşil göz rengi fenotipi diğer göz renklerine göre genetik olarak çok daha kompleks olduğundan daha fazla bilgi verici SNP kullanılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir. Saç rengi tahmininde ise örnekler 0,5 olasılık eşiği üzerinde kalarak beklenen değerler doğrultusunda doğru tahmin edilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada, kayıp kişilerin kimliklendirilmesinde veya olay yerinde bulunan biyolojik delillerden kişinin fiziksel görünümünün tahmini amacıyla geliştirilmiş olan HIRISplex panelinin optimizasyonu yapılarak yöntem için laboratuvarımızda en uygun çalışma koşulları belirlendi ve validasyon çalışması başarı ile gerçekleştirildi. HIRISplex paneli Avrupa'da birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de de bu panelin çalışılması soruşturma aşamasında polis ve jandarmaya katkı sağlayacak olması bakımından önemlidir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu; **Tasarım:** İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu; **Denetleme/Danışmanlık:** İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** İlksen Tavacı, Sümeyye Zülal Şimşek, Veysel Sapan, Cemaleddin Arslan; **Analiz ve/veya Yorum:** İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, Sümeyye Zülal Şimşek, Cemaleddin Arslan; **Kaynak Taraması:** İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu; **Makalenin Yazımı:** İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu; **Eleştirel İnceleme:** Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu; **Malzemeler:** İlksen Tavacı, Sümeyye Zülal Şimşek, Gönül Filoğlu, Özlem Bülbül.

KAYNAKLAR

- Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:33-48.[Crossref] [PubMed]
- Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HIRISplex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;9:150-61.[Crossref] [PubMed]
- Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3(3):154-61.[Crossref] [PubMed]
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet.* 2007;39(12):1443-52.[Crossref] [PubMed]
- White D, Rabago-Smith M. Genotype-phenotype associations and human eye color. *J Hum Genet.* 2011;56(1):5-7.[Crossref] [PubMed]
- Meyer OS, Børsting C, Andersen JD. Perception of blue and brown eye colours for forensic DNA phenotyping. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2019;7(1):476-7.[Crossref]
- Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(3):170-80.[Crossref] [PubMed]
- Walsh S, Lindenbergh A, Zuniga SB, Sijen T, de Knijff P, Kayser M, et al. Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(5):464-71.[Crossref] [PubMed]
- Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol.* 2009;19(5):R192-3.[Crossref] [PubMed]
- Bulbul O, Filoğlu G, Altuncel H, Aradas AF, Ruiz Y, Fondevila M, et al. A SNP multiplex for the simultaneous prediction of biogeographic ancestry and pigmentation type. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2011;3(1):500-1.[Crossref]
- Bulbul O, Zorlu T, Filoğlu G. Prediction of human eye colour using highly informative phenotype SNPs (PISNPs). *Australian Journal of Forensic Sciences.* 2020;52(1):27-37.[Crossref]
- Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, Urquhart A. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int.* 2001;122(2-3):124-9.[Crossref] [PubMed]

13. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(1):98-115.[Crossref] [PubMed]
14. Walsh S, Kayser M. A practical guide to the HirisPlex System: simultaneous prediction of eye and hair color from DNA. *Methods Mol Biol.* 2016;1420:213-31. [Crossref] [PubMed]
15. Bulbul O, Filoğlu G. Development of a SNP panel for predicting biogeographical ancestry and phenotype using massively parallel sequencing. *Electrophoresis.* 2018;39(21):2743-51.[Crossref] [PubMed]
16. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):179-92.[Crossref] [PubMed]
17. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, Cruz R, et al. Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(1):28-40.[Crossref] [PubMed]
18. Pulker H, Lareu MV, Phillips C, Carracedo A. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):100-4.[Crossref] [PubMed]
19. Bülbül Ö, Argaç D, Shahzad MS, Filoğlu G, Altunçul H. [Determination of autosomal SNP loci for the identification and paternity test]. *Türkiye Klinikleri J Foren Med.* 2013;10(1):7-13. [Link]
20. Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int.* 2003;137(1):74-84.[Crossref] [PubMed]
21. Bulbul O, Phillips C, Argac D, Shahzad MS, Fondevilla M, Acar E, et al. Internal validation of 29 autosomal SNP multiplex using a ABI 310 genetic analyser. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2009; 2(1):129-30. [Crossref]