

Kimliklendirme ve Nesep Tayini İçin Otozomal SNP Lokuslarının Belirlenmesi

Determination of Autosomal SNP Loci for the Identification and Paternity Tests

Özlem BÜLBÜL,^a
Doruk ARGAÇ,^a
M. Saqib SHAHZAD,^b
Gönül FİLOĞLU,^a
Havva ALTUNÇUL^a

^aİstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul

^bUniversity of the Punjab, Lahore Pakistan

Geliş Tarihi/Received: 05.01.2012

Kabul Tarihi/Accepted: 11.06.2012

Yazışma Adresi/Correspondence:

Özlem BÜLBÜL
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
oslembil@yahoo.com

ÖZET Amaç: Son yirmi senedir adli kimliklendirmede kısa tekrar dizinleri [short tandem repeat (STR)] lokusları kullanılmasına rağmen bozulmuş ve beklenmiş eski biyolojik örneklerin tiplendirilmesinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle STR lokuslarına alternatif yeni polimorfik bölgeler keşfedilmiştir. Eski ve bozulmuş örneklerde son zamanlarda tek nükleotid polimorfizmi [single nucleotide polymorphism (SNP)] lokusları tercih edilmektedir. SNP'ler, genomda tek bir nükleotid değiştiğinde açığa çıkan DNA dizi varyasyonlarıdır. Bu çalışmanın amacı; adli bilimlerde kullanımı giderek artmakta olan ve gelecekte STR lokuslarının yerini alacağı öngörülen SNP lokuslarını laboratuvarımızda optimize etmek (deney koşullarını iyileştirmek) ve validasyon (geçerli kılma) çalışmalarını yapmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada, araştırmaya gönüllü katılmayı kabul eden 29 kişinin ağız içi sürüntüsü veya kan lekesi örnekleri kullanıldı. DNA izolasyonu Fenol-Kloroform-İzoamil alkol ve QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak yapıldı. Yirmi dokuz otozomal SNP lokusunun belirlenmesi için minisekanslama tekniğine dayalı SNaShot kiti (Applied Biosystems) kullanıldı. Örnekler ABI 310 Genetik Analizör cihazında yürütüldü ve analizi edildi. **Bulgular:** Yirmi dokuz SNP lokusunu optimize ettikten sonra validasyon çalışmaları yapıldı. Bunun için; hassasiyet, tekrarlanabilirlik, kesinlik ve yeniden üretilebilirlik için laboratuvarlar arası karşılaştırmalar yapıldı. Araştırma sonunda 29 SNP setinin en uygun çalışma koşulları belirlendi ve validasyon çalışması başarı ile gerçekleştirildi. Yirmi dokuz kişinin çalışılan 29 SNP bölgesine ait profilleri (genotipi) belirlendi. **Sonuç:** Elde edilen sonuçlara göre 29 SNP seti ile kişiler birbirinden ayrılabilir. Validasyonu tamamlanan 29 SNP lokusu adli laboratuvarlarda kimliklendirmede kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Çok biçimlilik, tek nükleotid; adli genetik; polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT Objective: The last 20 years, short tandem repeats (STRs) are used for identification in forensic sciences. But it is not possible to get the whole genotype especially we confront degraded and ancient samples. For this reason, alternative new STR loci polymorphic sites were discovered. Recently single nucleotide polymorphism (SNPs) are being preferred to degraded and ancient samples. A single-nucleotide polymorphism (SNP) is a DNA sequence variation occurring when a single nucleotide in the genome. The aim of this study is optimising and to validate SNPs loci in our laboratory conditions so that these may be use to replace STR system in future. **Material and Methods:** In this study, parameters to test autosomal 29 SNP loci have been validated using samples of blood pattern or buccal swabs from 29 healthy individual. DNA was extracted using phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and QIAamp DNA Mini Kit method. Single base extension reaction is done with SNaPhot minisequencing technic and subsequent detection with an ABI Prism 310 Genetic Analyzer. **Results:** After optimisation of the 29 SNP loci, validation study is performed. We tested the sensitivity, reproducibility, precision and external proficiency. We successfully optimized and validated autosomal 29 SNPs. We genotyped 29 individual for the described loci. **Conclusion:** Obtained results shows that 29 SNP multiplex can be discriminate each person. These validated 29 SNP loci can be used in forensic laboratories for identification.

Key Words: Polymorphism, single nucleotide; forensic genetics; polymerase chain reaction

Kimliklendirme ve soy tayininde kısa ardışık tekrar [short tandem repeat (STR)] lokusları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda DNA teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte STR lokuslarına alternatif tek nükleotid polimorfizm [single nucleotide polymorphism (SNP)] lokusları keşfedilmiştir.^{1,2} SNP'ler; mitokondriyal SNP, Y-SNP, soya ait bilgi veren [Ancestry Informative Markers (AIMs)] ve fenotipik özelliklerin belirlenmesi gibi pek çok alanda bilgi veren genetik işaretlerdir.³

SNP lokuslarının STR lokuslarına alternatif olmasının nedeni, ileri derecede bozulmuş örneklerde STR lokuslarına göre daha iyi sonuç vermeleridir. Çünkü STR lokusları 300 bç (baz çifti)'den daha uzun olduğundan bozulmuş örneklerde "polymerase chain reaction (PCR)" başarısız olmaktadır. Bozulmuş biyolojik örneklerin DNA uzunluğu 150 bç'den daha küçük olduğundan STR lokusları ile kimliklendirme yapmak zordur. Olay yerinden toplanan eser miktarda ve bozulmuş biyolojik örneklerde (kan lekesi, saç, kemik ve diş gibi) STR lokusları ile tipleme yapılamadığı durumlarda SNP lokusları ile kolaylıkla tipleme yapılabilmektedir. SNP'lerin PCR ürünleri 100 bç'den küçüktür. Dolayısıyla 300-400 bç uzunluğuna sahip STR lokuslarından daha iyi sonuç vermektedirler.^{4,5} SNP'ler, genomda STR'lerden daha yüksek sıklıkta bulunurlar, daha kararlıdır ve çok düşük mutasyon oranlarına sahiptirler (2×10^{-8} mutasyon/nesil). Düşük mutasyon oranlarına sahip olmaları babalık ve akrabalık tayinlerinde güvenilirliği arttırmaktadır. Her bir SNP lokusu yalnızca 2 allele sahiptir, yeterli yüksek ayırım gücüne ulaşabilmek için çok sayıda lokus incelenmelidir. Rutinde kullanılan 13 CODIS STR lokusuna eş ayırım gücü sağlamak için yaklaşık olarak 50-60 SNP kullanılması gerekmektedir.⁶⁻⁸

SNP'lerle ilgili teknoloji ve bilgi birikimi gün geçtikçe artmakta, standardizasyon çalışmalarını amaçlayan çok sayıda SNP panelleri yapılmaktadır.^{1,3,9-11} Beş adli laboratuvarın (The SNPforID Consortium, www.snpforid.org) oluşturduğu bir araştırma grubu, validasyon, polimorfizm, dizinleme, SNP tipleme teknolojileri ve bağlantı noktalarını inceleyerek 52 otozomal SNP setini tanımlamışlardır.

Bu SNP seti; üç büyük toplum (Asya, Afrika ve Kafkas) için polimorfik, bilinen genlerden en az 100 kb (kilobaz) uzaklıkta, primer uzunlukları 62-115 bç aralığında ve heterozigotlukları en yüksek olacak şekilde belirlenmiştir. Bu 52 SNP lokusu tek bir PCR ile çoğaltılmakta ve PCR sonrasında iki ayrı set (Auto1 ve Auto2) oluşturularak minisekanslama tek baz uzaması [single base extension (SBE)] reaksiyonu ile tespit edilmektedir.¹¹ Geliştirilen 52 SNP seti tüm dünyada kabul görmüş ve standardizasyon çalışmalarıyla birlikte birçok toplum verileri yayımlanmıştır.¹²⁻¹⁶ Bu çalışmada SNPforID laboratuvarlarının adli bilimler için belirlemiş olduğu 52 SNP setinin bir bölümü 29 SNP lokusu (Auto2) çalışılmıştır.

SNP lokusları için pek çok analiz ve tespit yöntemleri bulunmaktadır. Ancak adli bilimlere en uygun olan yöntemi seçmek için bu yöntemlerin hassasiyetleri, tekrarlanabilirlikleri, çoklu PCR (multipleks) kapasiteleri, sonuç verme oranları, maliyetleri ve gerektirdikleri cihazlar detaylı olarak incelenmelidir. Belirlenecek SNP analiz ve tespit yöntemi adli laboratuvarlarda kolayca uygulanabilmeli, yüksek doğrulukta, ucuz, hızlı ve basit olmalıdır. DNA miktarlarının çok az olduğu örneklerde bile sonuç verebilmelidir.^{10,17} Adli laboratuvarlarda en çok tercih edilen yöntem minisekanslama teknolojisi olup bunun için SNaPshot kiti (Applied Biosystems) kullanılmaktadır. Yöntemin en önemli tercih sebebi her adli laboratuvarında bulunan PCR ve kapiller elektroforez cihazında uygulanabilmesidir. SNaPshot yönteminin çoklu PCR kapasitesinin yeterli olması, az miktarda DNA örnekleri ile çalışılabilmesi ve kolay uygulanabilmesi önemli avantajlarındandır. Ancak her bir SNP setinin hazırlanmasında PCR ve minisekanslama reaksiyonu için gerekli primer tasarımı, yoğunluğunun belirlenmesi ve zaman alıcı olması yöntemin dezavantajıdır. Birçok adli laboratuvarında SNaPshot yöntemi ile SNP çalışmaları yapılmıştır.^{7-9,18-22} Bu çalışmada da laboratuvarımızda yöntemin avantajları ve dezavantajları değerlendirilerek minisekanslama, SNaPshot yöntemi tercih edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; gelişen teknoloji ile adli bilimler alanında yeni geliştirilen SNP sistemlerini optimize etmek ve validasyonunu yaparak toplum

çalışmaları için gerekli alt yapıyı oluşturmaktır. Yirmi dokuz otozomal SNP lokusunu içeren bir set oluşturularak Türkiye'deki Adli laboratuvarlarda SNP kullanımını sağlamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada biyolojik örnek olarak; miktarı bilinen 9947A kodlu pozitif kontrol DNA örneği (0,10 ng/μL) ve İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarına başvuran ve adli bilimler alanında bilimsel çalışmalar yapılmasına izin veren rastgele seçilmiş 29 kişiden alınan ağız içi sürüntüsü (buccal swab) veya kan lekesi kullanılmıştır. Çalışma ile ilgili İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışma yedi basamakta uygulanmıştır. Bu basamaklar;

- DNA izolasyonu,
- DNA miktarının belirlenmesi,
- PCR,
- PCR ürünlerinin saflaştırılması,
- SNaPshot reaksiyonu,
- SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması,
- SNaPshot reaksiyon ürünlerinin ABI 310 ile elektroforezi ve analizinin yapılmasıdır.

Validasyon çalışması için hassasiyet, tekrarlanabilirlik, kesinlik ve laboratuvarlar arası karşılaştırmalar yapıldı.

DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için iki farklı yöntem uygulandı. Ağız içi sürüntü örnekleri Fenol-Kloroform-İzoamil alkol yöntemi ve kurumuş kan lekesi örnekleri QIAamp® DNA Mini Kit yöntemi ile izole edildi.²³ DNA miktarları spektrofotometrik veya florometrik (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit) yöntem ile belirlendi.

PCR

SNPforID Birliği'nin seçmiş olduğu 52 SNP-Pleks'in bir kısmı olan (Auto2) 29 SNP (rs2831700, rs873196, rs1382387, rs2111980, rs2056277,

rs1024116, rs727811, rs1413212, rs938283, rs1979255, rs1463729, rs2076848, rs1355366, rs907100, rs354439, rs2040411, rs737681, rs2830795, rs251934, rs914165, rs10495407, rs1360288, rs964681, rs1005533, rs8037429, rs891700, rs1335873, rs1028528, rs1528460) PCR ve SNaPshot primerleri kullanıldı. 25 mL'lik PCR reaksiyonu için; 1X PCR buffer, 8 mM MgCl₂, 10 mM dNTP karışımı, her bir primer için 0,01-0,17 mM ve 2U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) kullanıldı. DNA örnekleri 1-10 ng aralığında olacak şekilde sulandırıldı ve PCR karışımına eklendi. PCR, 9700 (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. PCR döngüsü; 94°C'de 5 dakika denatürasyon, 95°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn ve 65°C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü ve 65°C'de 7 dakikaya ayarlandı. PCR sonrası reaksiyona girmeyen dNTP ve primerlerin uzaklaştırılması için *Escherichia coli* Ekzonükleaz I (Exo I) ve Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP-Karides Alkalın Fosfataz) 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 dakika ve 85°C'de 15 dakika bekletildi.

Her bir SNaPshot reaksiyonu için 2,5 μL SNaPshot reaksiyon karışımı, 1,5 μL SNaPshot primer karışımı hazırlandı ve üzerine 1 μL çoğaltılmış DNA/Kontrol DNA örneği eklendi. Her çalışmada olası kontaminasyonu (bulaşmayı) belirlemek amacıyla pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanıldı. SNaPshot reaksiyon döngüsü; 96°C'de 10 sn, 50°C'de 5 sn ve 60°C'de 30 sn olacak şekilde 30 döngü olarak ayarlandı. SNaPshot reaksiyon sonrasında floresan işaretli bağlanmamış ddNTP'leri etkisiz hale 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 dakika, 85°C'de 15 dakika ve 25°C'de 5 dakika bekletildi.

PCR ürünlerinin elektroforezi ABI Prism 310 Genetik Analizör (Applied Biosystems) cihazında Data Collection Software 3.0 kullanılarak yapıldı. Verilerin analizi GeneScan Analysis Software 3.1.2 (Applied Biosystems)'de yapıldı. Yirmi dokuz SNP'nin beklenen allel uzunluklarıyla elektroregramdaki pikler karşılaştırılarak SNP allellerinin görünen uzunlukları belirlendi. Belirlenen SNP al-

lellerinin uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları Microsoft Excel 2007 programı ile yapıldı.

Laboratuvarlar arası karşılaştırma için; laboratuvarımızda tespit edilen 9947A pozitif kontrol örneğinin sonuçları Santiago de Compostela Üniversitesi, Adli Genetik laboratuvarı ile karşılaştırıldı. Ayrıca laboratuvarımızda ABI 310 cihazında analiz ettiğimiz 9947A pozitif kontrol örneğinin yürütme dosyası aynı laboratuvara gönderilerek ABI 3130 cihazında yeniden analizi ve genotipleme yapıldı.

BULGULAR

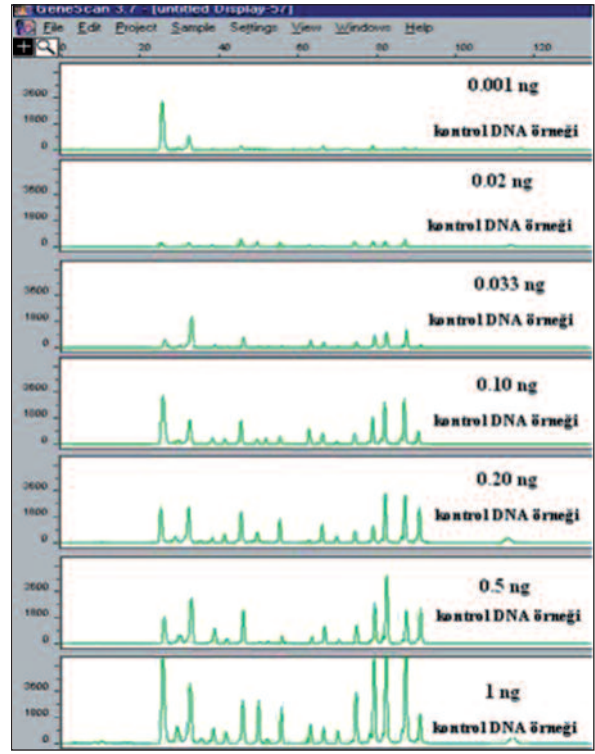
Çalışmada 29 otozomal SNP lokusunun en uygun çalışma koşulları belirlendi ve validasyon çalışması yapıldı. 29 SNP setinin validasyonunda hassasiyet ve kesinlik parametreleri 9947A kodlu pozitif kontrol DNA (0,10 ng/μL) örneği kullanıldı. Kontrol örneği çeşitli miktarlarda (1 ng, 0,5 ng, 0,20 ng, 0,10 ng, 0,033 ng, 0,02 ng ve 0,001 ng) sulandırılarak çalışıldı. DNA miktarı 0,2-1 ng (nanogram) aralığında değerlendirilebilir pikler elde edildi (Şekil 1).

Yeniden üretilebilirlik ve kesinlik için yine kontrol DNA örneği kullanılarak farklı zamanlarda beş kez çalışıldı. Bu beş çalışmadan elde edilen elektroforegram üst üste çakıştırılarak gösterilmiştir (Şekil 2).

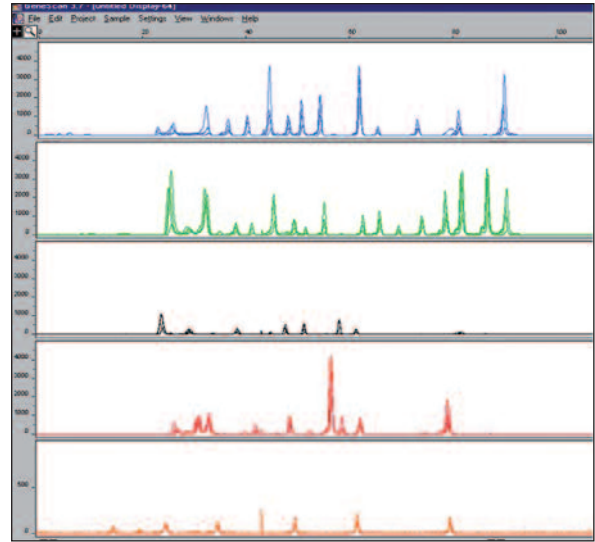
ABI 310 cihazında belirlenen SNP allel uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları tabloda görülmektedir (Tablo 1). Uygun çalışma koşulları ile belirlenen 29 SNP seti ile 29 kişiye ait genotipler Tablo 2’de verilmiştir. Yirmi dokuz otozomal SNP lokusuna ait bir örneğin elektroforegramı Şekil 3’te görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde otozomal SNP lokuslarının validasyonu için pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar içinde SNPforID laboratuvarlarının belirlediği 52 otozomal SNP seti tüm dünyada kabul görmüş yeni bir settir.^{8,9} Adli bilimlerde yaygın olarak kullanılmaya başlanan ve validasyon çalışmaları birçok laboratuvar tarafından yapılmış SNPforID’nın belirlediği 52 SNP setinin bir parçası olan otozomal 29 SNP lokusunun laboratuva-



ŞEKİL 1: 29 SNP seti hassasiyet çalışması. (Sadece yeşil boya ile işaretlenmiş Adenin içeren SNP allelleri gösterilmiştir).



ŞEKİL 2: 29 SNP seti kesinlik, sağlamlık ve yeniden üretilebilirlik çalışması. Pozitif kontrol örneği (9947A) ile yapılan 5 deney sonuçlarının üst üste çakıştırılmış elektroferogramı.

Mavi Pikler: Guanin, Yeşil Pikler: Adenin, Siyah Pikler: Sitozin, Kırmızı Pikler: Timin, Turuncu Pikler: Genescan-120 LIZ Size Standard.

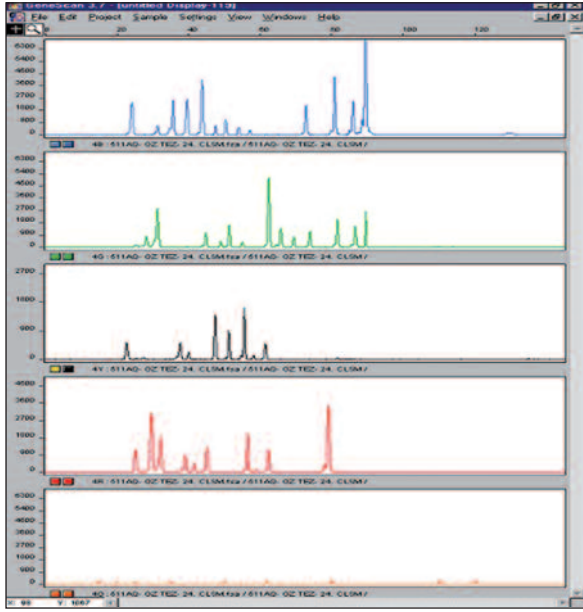
rımızda çalışılmasını sağlamak ve toplum çalışmaları için gerekli altı yapıyı oluşturmak üzere bu çalışma yapılmıştır.

TABLO 1: 29 SNP Setinin ABI 310 cihazında gözlenen SNP uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları.

SNP Kodları	SBE primer uzunluğu	Görülen Polimorfizm	Görülen Renk	Görülen Renk	Ortalama (T) (n=35)	Standart Sapma (T) (n=35)	Ortalama (C) (n=35)	Standart Sapma (C) (n=35)	Ortalama (A) (n=35)	Standart Sapma (A) (n=35)	Ortalama (G) (n=35)	Standart Sapma (G) (n=35)
A41	16	CT			26,131	0,985	23,265	0,593				
A46	17	AG							24,733	0,688	24,610	0,697
A27	22	AG							28,401	0,784	26,688	0,681
A33	22	CT			30,156	0,516	28,449	0,794				
A36	27	AT			32,653	0,474			31,784	0,472		
A38	27	GC					33,265	0,495			31,965	0,457
A44	32	CT			39,520	0,416	38,019	0,384				
A51	32	AG							37,711	0,461	35,876	0,326
A48	36	CT			41,811	0,317	40,343	0,412				
A49	36	AG							40,987	0,332	39,864	0,327
A34	40	GC					44,802	0,521			44,011	0,318
A52	40	AT			45,549	0,534			45,097	0,313		
A32	44	CT			48,560	0,254	47,622	0,270				
A42	44	AG							49,139	0,333	47,933	0,621
A37	48	CT			52,393	0,217	51,390	0,231				
A53	48	AG							51,492	0,240	50,465	0,238
A24	52	CT			56,672	0,205	55,711	0,363				
A29	52	AG							55,054	0,511	54,094	0,321
A30	56	AC					58,421	0,428	58,593	0,571		
A26	56	GT			58,804	0,271					57,197	0,597
A40	60	AG							62,680	0,452	61,785	0,307
A45	60	CT			62,380	0,479	61,724	0,514				
A25	64	AG							65,924	0,482	65,280	0,395
A54	68	AG							69,614	0,314	69,438	0,541
A50	72	AG							74,057	0,338	73,003	0,313
A39	76	AT			79,079	0,522			78,591	0,237		
A35	80	AG							81,562	0,345	80,869	0,400
A43	84	AG							86,622	0,224	86,064	0,207
A28	88	AG							89,760	0,478	89,408	0,513

TABLO 2: 29 SNP seti ile çalışılmış 29 kişiye ait genotipler.

SNP Kodu	A41	A46	A27	A33	A36	A38	A44	A51	A48	A49	A34	A52	A32	A42	A37	A53	A24	A29	A30	A26	A40	A45	A25	A54	A50	A39	A35	A43	A28
1	CT	AG	AG	CT	AT	GG	CT	AG	TT	AG	GG	AA	CT	AG	CC	GG	TT	AG	CC	TT	AG	CT	AA	AA	AG	AT	AG	AA	AG
2	CT	AG	AA	CT	AT	GC	CT	AG	TT	AG	GG	AT	TT	AA	CT	AG	TT	AG	-	TT	AG	CC	AG	AA	AG	AT	AG	AA	GG
3	CT	AG	GG	TT	AT	GC	CT	AG	CT	AG	GC	AA	CT	AA	CT	AG	TT	AG	AC	TT	AG	CT	AG	AA	AG	AT	AG	AG	AG
4	CT	AG	AA	CT	AT	GC	CT	AG	TT	AA	GC	AA	CT	AA	CT	AA	CT	GG	-	-	AG	CT	AG	AA	AG	AT	GG	AA	AG
5	CT	AG	AA	CT	AA	GC	CC	GG	CT	AG	GC	AT	CT	AA	CT	AA	CT	GG	-	GG	AG	CT	AG	AA	AG	AT	AG	AA	AG
6	CT	AG	AA	CT	AT	GC	CC	GG	CT	AA	GC	AT	CT	GG	CT	AG	CT	AA	CA	GT	AG	CT	GG	AG	AG	AT	AG	AA	AG
7	CT	AG	AA	TT	AA	GC	CT	GG	CT	AG	GC	AT	CT	AG	CT	AG	CT	AA	AA	TT	AG	CT	AG	AA	AG	AT	AG	AA	AG
8	CT	GG	-	TT	AT	GC	CT	GG	TT	AG	GG	AT	CT	AG	CT	AA	CC	AA	-	GG	AG	CT	GG	AG	AG	AT	AG	AA	GG
9	CT	AG	AG	TT	AT	GG	-	AA	TT	GG	GC	AT	CC	AG	CC	-	TT	AG	AC	GT	AG	CC	AG	GG	AG	AT	AG	AA	GG
10	CT	AG	AA	TT	AT	GC	CT	AA	TT	AG	GC	AA	CT	AA	CT	AG	TT	AG	AC	TT	AG	CC	AG	AA	AA	AT	AG	AG	GG
11	CT	AG	AG	TT	AT	GC	CT	AA	CC	AG	GC	AA	CT	AA	CT	AA	TT	AG	CC	TT	AG	CT	AG	AA	AA	AT	AG	AG	AG
12	CT	AG	AA	TT	AT	GG	CT	AA	CC	AG	GC	AA	CT	AG	TT	AA	TT	GC	AC	GT	AA	CC	AG	AA	AG	AT	AG	AA	AG
13	CT	AG	AA	CT	AT	GC	CT	AG	CT	AG	GC	AT	CT	AA	CT	AG	TT	AG	AC	TT	AG	CT	AG	AG	AG	AA	AG	AG	AG
14	CT	AG	AG	CT	AT	GC	CT	AG	TT	AG	GC	AT	CT	AG	CT	AA	CT	GG	AC	TT	AG	CT	AG	AG	AG	AT	AG	AG	GG
15	CT	AG	GG	CT	AT	GC	TT	AA	CT	AG	GC	AT	CT	AG	TT	AA	TT	AG	-	GG	AG	CT	AG	AA	AA	AT	GG	AA	AG
16	CT	AG	AG	CT	AT	GC	CT	AG	CT	AG	GC	AT	CT	AG	CT	AG	CT	AG	AC	GG	AG	CT	AG	AA	AG	AT	AG	AG	AG
17	CC	AG	GG	TT	AT	CC	CC	AG	CT	AA	GC	AT	CT	AG	TT	AA	CT	AA	AC	TT	GG	CC	AG	GG	AG	AA	AG	AA	AG
18	CC	AG	AG	TT	TT	CC	CT	AG	CT	AG	CC	AA	CC	AG	CT	AA	CT	AG	AC	TT	AA	CC	AG	GG	AG	AT	AG	GG	AG
19	CT	AG	AG	TT	AT	CC	CT	AG	TT	AG	GG	AT	CT	AG	CT	AG	CT	GG	AA	GT	AG	CC	AG	AA	AG	AT	AG	AG	AG
20	CT	AG	AA	TT	AT	GC	CT	GG	TT	AG	GC	AT	CT	AG	CT	AA	CT	GG	CC	TT	AG	CT	AG	AA	GG	AT	AG	AA	AG
21	CC	GG	AG	TT	AA	CC	CC	AA	CC	GG	GG	AA	CC	AG	TT	AA	TT	AG	AC	TT	AA	CT	GG	AA	AG	TT	AA	AG	AG
22	CT	AG	AG	TT	AT	GG	CC	AA	TT	GG	GC	AT	CT	AG	CT	AG	TT	GG	CC	GT	AG	CT	AG	AA	GG	AT	AG	AG	AG
23	CT	AG	AA	CT	AT	GC	CT	AA	CT	AA	GC	AA	CT	AA	CT	AG	CT	AG	-	GG	AG	CT	AG	AA	-	AT	GG	AA	AG
24	CT	GG	AG	CT	AT	CC	CT	AA	CT	AA	GG	AA	CT	AG	TT	AG	CT	AG	CC	TT	AG	CC	AA	AA	AG	AT	AG	AA	AG
25	CT	AG	AG	TT	AT	GC	CT	AG	TT	AG	GG	AA	TT	AA	TT	AG	CC	AG	AC	GT	AA	CT	AG	AG	AG	AT	AG	AA	AG
26	CT	AG	AG	TT	TT	GC	CT	AG	CT	GG	GG	AA	CT	AA	CT	AA	CC	AG	AC	GT	GG	CC	AG	AG	AG	TT	AG	AG	AG
27	CT	GG	AA	CT	AT	GG	CT	GG	CT	GG	GG	AT	CC	AG	CC	AG	CT	AG	CC	GT	AA	CT	AA	AA	AG	AT	AG	AG	AG
28	CC	GG	GG	TT	AA	CC	CC	AG	CC	GG	GG	AA	CC	AA	TT	AG	CT	GG	AC	TT	AG	CC	AA	AG	GG	AT	AG	AG	GG
29	CT	GG	-	TT	TT	GG	CT	GG	CC	AG	GG	TT	CT	AA	CC	AG	CT	AA	-	GG	AA	CC	AG	AA	AG	AT	AG	AG	AG



ŞEKİL 3: 29 SNP setine ait örnek bir elektroferogram.

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. Sanchez ve ark.nın 52 SNP setinin hassasiyeti için değişik miktarlarda (0,07, 0,14, 0,27, 0,55, 1,09, 2,19, 4,37, 8,75, 17,50, 35 ve 70 ng) DNA örneği kullanmışlardır. Araştırmaya göre, en az 500 pg (pikogram) DNA örneği kullanıldığında güvenilir bir tiplleme yapılabildiğini bildirmişlerdir.¹¹ Çalışmamızda ise 29 SNP lokusunun hassasiyetini belirlemek için 9947A pozitif kontrol örneği (0,10 ng/μL) kullanıldı. Kontrol örneği 1,0 ng, 0,5 ng, 0,20 ng, 0,10 ng, 0,033 ng, 0,02 ng ve 0,001 ng miktar aralıklarında çalışıldı (Şekil 1). DNA miktarı 0,001 ng kullanıldığında birkaç SNP alleli dışında tiplleme yapılamazken; 0,02, 0,033 ve 0,10 ng kullanıldığında allel düşmeleri (allelic droup out) nedeniyle heterozigot SNP lokuslarında yanlış homozigot alleller görüldü ve yeterli hassasiyete ulaşılamadı. DNA miktarı arttıkça SNP allellerinin pik yüksekliklerinin (RFU) arttığı ve yanlış değerlendirmelerin önlenildiği belirlendi. 0,2 ng ve üstündeki miktarlarda daha iyi sonuçlar elde edildi. SNaPshot yöntemi ile 29 SNP setinin analizi için en ideal DNA miktarının 0,2-1,0 ng aralığında olduğu belirlendi.

Validasyon çalışmasında yöntemin tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleri de test edildi. Bunun için 9947A kodlu pozitif kontrol (0,10 ng/μL) örneği farklı zamanlarda beş kez çalışıldı. Her çalışmada aynı genotip elde edildi. Beş çalışmadan elde edilen elektroferogramlar üst üste çakıştırılarak verilmiştir (Şekil 2). Bu tespit validasyonunun tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametrelerinin gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.

Laboratuvarlar arası testler için İspanya, Santiago de Compostela Üniversitesi, Adli Genetik laboratuvarı ve Adli Tıp Enstitüsünün Adli Genetik laboratuvarları ile ortak çalışma yapılarak 9947A pozitif kontrol örneğinin sonuçları karşılaştırıldı. Analizler her iki laboratuvar tarafından değerlendirilirken kullanılan cihazlar (ABI 310 ve ABI 3130) ve ortam koşullarına bağlı olarak SNP allellerinin uzunluklarında kaymaların olduğu tespit edildi. Bu kaymaların nedenini araştırmak için SNaPshot kitinde yer alan pozitif kontrol örneği ve kontrol primer karışımı kullanılarak kitin kullanıcı talimatında belirtilen parametrelere bağlı kalınarak SNaPshot reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu kontrol örneğinin sonuçlarında da benzer kaymalar gözlemlendi.*

Sanchez ve ark.nın yapmış olduğu Y SNP çalışmalarında elektroforez aşamasında beklenen uzunluklar ile gözlenen uzunlukların farklı olduğu belirtilmiştir. Değişik floresan boyalar benzer uzunluktaki ürünleri farklı etkilediği gösterilmiştir. Beklenen ve gözlenen farklılıkların azaltılması için primer tasarımı yapılırken kısa olan oligonükleotidlerin Poli C kuyruğu ile uzatılması önerilmiştir.²⁴ Çalışmamızda; yapılan karşılaştırmalarda SNP allellerinin elektroferogram üzerindeki kesin yerleri tespit edilerek 29 SNP lokusu doğru olarak tiplendirilmiştir. Laboratuvarımızda bulunan ABI 310 genetik analizör cihazında çalışması tamamlanan 29 otozomal SNP lokusuna ait SNP allel uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları tablo 1'de görülmektedir. Tablo 1'de verilen SNP allel boyutları yukarıda ifade edilen kaymalar göz önünde bulun-

*SNaPshot Multiplex Kit (AB) kullanma kitapçığında; floresan boyaların elektroforez sırasında DNA parçacıklarının kaymasına neden olabileceği gibi primer uzunlukları 36 nükleotitten kısa olan SNP lokuslarında da yaklaşık 5-6 bazlık kaymaların olabileceği bildirilmiştir.

durularak belirlenmiştir. Bu SNP setinin ABI 310 Genetik Analizör cihazında analizi yapıldığında bu tablo referans olarak kullanılabilir. SNP allel bo-yutları tespit edildikten sonra validasyon çalışması yapılmış olan 29 SNP setinin 29 kişiye ait genotip-leri Tablo 2’de verilmiştir. Bu set ile kişilerin birbi-rinden ayrılabilmesi gözlenmiştir. Ancak tam bir yeterli dışlama gücüne ulaşabilmek için 52 SNP se-tinin tümünün çalışılması gerekmektedir. Önü-müzdeki süreçte, 52 SNP setinin diğer kısmı olan 23 SNP lokusunun çalışılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada, olay yerinden elde edilen bo-zulmuş veya az miktarda DNA içeren örneklerin, kimliklendirilmesinde kullanılacak 29 otozo-mal SNP lokusu çalışıldı. Çalışmanın amacı doğ-

rultusunda yöntemin koşulları belirlendi ve vali-dasyon çalışması başarı ile gerçekleştirildi. Bu ça-lışmada, kullanılan 29 otozomal SNP lokusunun Türkiye’de yapılan ilk otozomal SNP çalışması ol-ması ve SNP lokuslarının tüm dünya ile birlikte ül-kemizde de standardizasyonun yapılmasına katkı sağlaması nedeniyle önemlidir.

Teşekkür

Santiago de Compostela Üniversitesi, Adli Genetik Bö-lümü’nden Chris Phillips ve diğer tüm laboratuvar ça-lışanlarına yardımları için teşekkür ederiz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Bi-rimi tarafından (Proje No: T- 1745) ve TÜBİTAK Yurtiçi Yüksek Lisans Burs programı tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. Analysis of arti-ficially degraded DNA using STRs and SNPs--results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci Int* 2006; 164(1):33-44.
- Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 2004; 5(10):739-51.
- Butler JM, Budowle B, Gill P, Kidd KK, Phillips C, Schneider PM, et al. Report on ISFG SNP Panel discussion. *Forensic Science Interna-tional: Genetics Supplement Series* 2008; 1(1):471-2.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing*. A Harcourt Science and Technology Company. 1st ed. San Diego, California: Academic Press; 2001. p.647.
- Senge T, Madea B, Junge A, Rothschild MA, Schneider PM. STRs, mini STRs and SNPs--a comparative study for typing degraded DNA. *Leg Med (Tokyo)* 2011;13(2):68-74.
- Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 1999;20(8):1682-96.
- Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, Fondevila M, Gómez-Tato A, Alvarez-Dios J, et al. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(3-4):273-80.
- Inaoka Y, Tajima A, Tamura T, Satoh F, Osawa M. Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2011;3(1):e275–e276.
- Kidd KK, Pakstis AJ, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SL, Karoma NJ, et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci Int* 2006;164(1):20-32.
- Sobrinho B, Brión M, Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 2005;154(2-3):181-94.
- Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27(9):1713-24.
- Porrás L, Phillips C, Fondevila M, Beltrán L, Ortiz T, Rondon F, et al. Genetic variability of the SNPforID 52-plex identification-SNP panel in Central West Colombia. *Forensic Sci Int Genet* 2009;4(1):e9-10.
- Drobnic K, Børsting C, Rockenbauer E, Tomas C, Morling N. Typing of 49 autosomal SNPs by SNaPshot in the Slovenian popula-tion. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4(5):e125-7.
- Santos C, Phillips C, Fondevila M, Porrás-Hurtado L, Carracedo A, Souto L, et al. A study of East Timor variability using the SNPforID 52-plex SNP panel. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(1):e25-6.
- Børsting C, Tomas C, Morling N. SNP typing of the reference materials SRM 2391b 1-10, K562, XY1, XX74, and 007 with the SNPforID multiplex. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(3):e81-2.
- Musgrave-Brown E, Ballard D, Balogh K, Bender K, Berger B, Bogus M, et al. Forensic vali-dation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(2):186-90.
- Kwok PY. Methods for genotyping single nu-cleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:235-58.
- Vallone PM, Decker AE, Butler JM. Allele fre-quencies for 70 autosomal SNP loci with U.S. Caucasian, African-American, and Hispanic samples. *Forensic Sci Int* 2005;149(2-3):279-86.
- Lee HY, Park MJ, Yoo JE, Chung U, Han GR, Shin KJ. Selection of twenty-four highly in-formative SNP markers for human identifica-tion and paternity analysis in Koreans. *Forensic Sci Int* 2005;148(2-3):107-12.
- Petkovski E, Keyser C, Ludes B, Hienne R. Validation of SNPs as markers for individual identification. *International Congress Series* 2003;1239: 33-6.
- Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P. Validation of a 21-locus auto-somal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci Int* 2005; 154(1):62-77.
- Timur S, Demircin S. Y-SNP haplogroups in the Antalya population in Turkish Republic. *Rom J Leg Med* 2009;17(1):59-68.
- Signer E, Kuenzle CC, Thomann PE, Hüb-scher U. DNA fingerprinting: improved DNA extraction from small blood samples. *Nucleic Acids Res* 1988;16(15):7738.
- Sanchez JJ, Børsting C, Balogh K, Berger B, Bogus M, Butler JM, et al. Forensic typing of autosomal SNPs with a 29 SNP-multiplex--results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2(3):176-83.