

Vücut Sıvılarının Tanımlanmasında Çeşitli Doku Spesifik mRNA Belirteçlerinin Etkinliğinin Araştırılması

An Investigation of Various Tissue Specific mRNA Markers in Body Fluid Identification

Ayşe SERİN,^a
Hüsnüye CANAN,^a
Ayça ULUBAY,^a
Behnan ALPER^a

^aAdli Tıp AD,
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Adana

Geliş Tarihi/Received: 26.07.2017
Kabul Tarihi/Accepted: 09.10.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ayşe SERİN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Adli Tıp AD, Adana,
TÜRKİYE/TURKEY
ayserin@yahoo.com

ÖZET Amaç: Tam kan için hemoglobin beta (HBB), beta spektrin (SPTB), porfobilinojen deaminaz (PBGD), semen için protamin 1 (PRM1), protamin 2 (PRM2), menstrüel kan için matriks metalloproteinaz 7 (MMP7) ve 11 (MMP11) ile tükürük için statherin (STATH), histatin 3 (HTN3) ve vajinal sekresyon için mucin 4 (MUC4), insan beta defensin 1 (HBD1) mRNA'larının hedef dokuların tanımlanmasında kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Çalışmada, 18S ribozomal RNA (18 SRNA) ve gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) endojen kontrol genleri olarak kullanılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Deneysel olarak hazırlanan 10'ar adet kan, menstrüel kan, semen, tükürük ve vajinal sekresyon lekisinde sırası ile RNA izolasyonu, cDNA sentezi, single- ve multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. Ardından PCR ürünleri otomatik kapiller elektroforezde yürütülmüştür. **Bulgular:** Çalışmada kullanılan tüm mRNA belirteçleri hedef vücut sıvılarında bulunmuştur. Semen, tükürük, vajinal sekresyon belirteçleri, ilgili vücut sıvıları için spesifik iken; diğer belirteçlerde çapraz reaksiyonlar da gözlenmiştir. Kan, menstrüel kan, semen, tükürük ve vajinal sekresyon belirteçlerinin tamamı deneysel olarak hazırlanan ve farklı ortam koşullarında bekletilen 6 aylık lekelerde gösterilebilmiştir. **Sonuç:** Bulgular, vücut sıvılarının identifikasyonunda seçilen belirteçlerden MMP11 dışındakilerin hedef dokuların ayrımında kullanılabileceğini, ayrıca bu belirteçlerin multipleks amplifikasyonu ile lekelerin hedef vücut sıvılarına ait olup olamayacağı sorusuna bir kere de yanıt verebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA stabilitesi; adli genetik; vücut sıvıları

ABSTRACT Objective: The goal of this study was to investigate the usefulness of mRNAs in the identification of target tissues: hemoglobin beta (HBB), beta spectrin (SPTB), and porphobilinogen deaminase (PBGD) for whole blood; protamine 1 (PRM1) and 2 (PRM2) for semen; matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) and 11 (MMP-11) for menstrual blood; statherin (STATH) and histatin 3 (HTN3) for saliva; and mucin 4 (MUC4) and human beta defensin 1 (hBD1) for vaginal secretion. In the study 18S ribosomal RNA (18S rRNA) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used as endogenous control genes. **Material and Methods:** RNA isolation, cDNA synthesis, and single- and multiplex PCR were performed for each of 10 experimental samples consisted of whole blood, menstrual blood, semen, saliva, and vaginal secretion. The PCR products were run on capillary electrophoresis. **Results:** All mRNA markers used in the study were found in the target body fluids. Semen, saliva and vaginal secretion markers were specific for the respective body fluids, while cross-reactions were also observed in the other markers. All of the whole blood, menstrual blood, semen, saliva, and vaginal secretion markers were present in 6-month stains that had been prepared experimentally and stored at various ambient conditions. **Conclusion:** The findings show that, with the exception of MMP-11, the selected markers for identification of aforementioned body fluids can all be used in the distinguishing of target tissues, and that with multiplex amplification these markers can give an immediate answer to the question of whether or not the stains originated to the target body fluids.

Keywords: RNA stability; forensic genetics; body fluids

Adli olgu analizlerinde, vücut sıvılarının identifikasyonu, olay yerinin yeniden canlandırılması ve olayın aydınlanmasına katkıda bulunması bakımından önemlidir. Lekelerin biyolojik kaynağının bilinmesi, aynı zamanda DNA analizinin başarısını tahmin etmede ve DNA

analizi sonuçlarının yorumlanmasında da yardımcı olabilmektedir. Adli vakalarda biyolojik sıvı ve lekelerin orijini geleneksel olarak enzimatik ve immünolojik testlerle değerlendirilmektedir.¹⁻⁹ Ancak bu testlerle ilgili bazı problemlerle karşılaşılacaktır. Testlerin çoğu spesifik olmadığından diğer türler ve dokularla çapraz reaksiyonlar oluşturmaktadır. Bundan başka, menstrüel kan ve vajinal sekresyonun identifikasyonu için geliştirilmiş enzimatik veya immünolojik doku identifikasyon testi bulunmamaktadır.¹⁰⁻¹³

Son dönemlerde, hücre spesifik mRNA belirteçlerinin analizi vücut sıvılarının identifikasyonu için umut verici yeni bir yöntem olarak ileri sürülmektedir. Kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon ve menstrüel kanda adli analizler için kullanılabilirliği test edilen çok sayıda genetik belirteç tanımlanmıştır.¹⁴⁻²⁶

Bu çalışmada, doku spesifik olduğu belirtilen çeşitli sayıda mRNA belirtecinin, ters transkripsiyon son nokta polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] metodu ile analizi yapılmış olup, vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılıp kullanılamayacağını araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada; kan için porfobilinojen deaminaz (PBGD), β -spektrin (SPTB) ve hemoglobin beta (HBB); tükürük için statherin (STATH) ve histatin 3 (HTN3), sperm için protamin 1 ve 2 (PRM1, PRM2); vajinal sekresyon için insan beta-defensin 1 (HBD1) ve musin 4 (MUC4) ile menstrüel kan için matriks metalloproteinaz 7 ve 11 (MMP7, MP11) mRNA belirteçleri test edilmiştir.^{15,16,27-34} Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve 18S RNA endojen kontrol olarak kullanılmıştır. Seçilen belirteçlerin biyolojik sıvılarda özgünlüğü, multipleks amplifikasyona uygunluğu ve lekelerde mRNA stabilitesi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır. Sağlıklı ve gönüllü vericilerin bilgilendirilmelerini takiben yazılı onamları

alındıktan sonra; kan (10 kişi), semen (10 erkek), menstrüel kan ve vajinal “swab” (10 kadın) ile tükürük (10 kişi) örnekleri alınmıştır. Vajinal sekresyon örnekleri ile menstrüel kan örnekleri steril koton sürüntü çubuğuna alınmış olup, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Belirteçlerin zamana bağlı olarak stabilitesinde bir değişiklik olup olmadığını araştırmak için taze örneklerden lekeler oluşturulmuştur. Vajinal sekresyon ve menstrüel kan örnekleri steril koton sürüntü çubuğuna alınmış olup, sürüntü çubukları kurutulduktan sonra kâğıt zarflarda saklanmıştır. Kan, tükürük ve semen lekeleri ise “whatman” filter kâğıdı üzerine hazırlanan 10’ar μ L’lik lekelerden oluşturulmuştur. Hazırlanan lekeler oda sıcaklığı, etüv (37°C) ve buzdolabında (4°C) belirli zaman aralığında (3 ay ve 6 ay kapalı kâğıt zarflar içinde) bekletilmiştir.

RNA EKSTRAKSİYONU VE TERS TRANSKRİPSİYON

Sıvı biyolojik örneklerden 5’er μ L, sürüntü ve lekelerden de 0,5 mm²’lik alanlar kesilerek izolasyon için kullanılmıştır. RNA izolasyonu, AllPrep DNA/RNA/miRNA izolasyon kiti (Qiagen) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Ters transkripsiyon reaksiyonu için random primerler ve “Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogene)” kullanılmış olup, ters transkripsiyonda üretici firmanın önerdiği protokol izlenmiştir.

SON NOKTA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Multipleks reaksiyon için seçilen amplifikasyon primerleri ve amplifikasyon ürün uzunlukları Tablo 1’de görülmektedir. 5 ϕ -FAM, 5 ϕ -VIC veya 5 ϕ -NED floresans boyaları ile işaretli primerler kullanılmıştır. Singlepleks reaksiyonlar ile multipleks reaksiyonlar için 10 μ L total reaksiyon oluşturacak şekilde Qiagen multipleks PCR amplifikasyon kiti kullanılmıştır. Singlepleks PCR’ler için her bir primerden 0,1 μ M kullanılmıştır. Total PCR hacmi 10 μ L olup, amplifikasyon altta belirtilen PCR döngü parametrelerinde gerçekleştirilmiştir.

PCR koşulları: 95°C/15 dk; 31 döngü: 94°C/30 saniye, 58°C/90 saniye, 72°C/60 saniye; final elon-gasyon süresi 72°C’de 10 dk’dır (GeneAmp PCR system 9700).

TABLO 1: Polimeraz zincir reaksiyonu primer dizileri ve amplifikasyon ürün uzunlukları.

Vücut sıvısı	Gen	Primer dizisi	Floresan boya	Gözlenen fragman büyüklüğü
Kan	SPTB	F: AGG ATG GCT TGG CCT TTA AT R: ACT GCC AGC ACC TTC ATC TT	FAM	244
	PBGD	F: TGG ATC CCT GAG GAG GGC AGA AG R: TCT TGT CCC CTG TGG TGG ACA TAG CAA T	VIC	177
	HBB	F: GCA CGT GGA TCC TGA GAA C R: ATG GGC CAG CAC ACA GAC	FAM	59
Tükürük	STATH	F: TTT GCC TTC ATC TTG GCT CT R: CCC ATA ACC GAA TCT TCC AA	FAM	93
	HTN3	F: GCA AAG AGA CAT CAT GGG TA R: GCC AGT CAA ACC TCC ATA ATC	FAM	132-152
Semen	PRM1	F: GCC AGG TAC AGA TGC TGT CGC AG R: TTA GTG TCT TCT ACA TCT CGG TCT	NED	150
	PRM2	F: GTG AGG AGC CTG AGC GAA CGC R: TTA GTG CCT TCT GCA TGT TCT CTT C	FAM	287
Vajinal sekresyon	HBD1	F: CCC AGT TCC TGA AAT CCT GA R: CAG GTG CCT TGA ATT TTG GT	FAM	214
	MUC4	F: GGA CCA CAT TTT ATC AGG AA R: TAG AGA AAC AGG GCA TAG GA	NED	231
Menstrüel kan	MMP7	F: TCA ACC ATA GGT CCA AGA AC R: CAA AGA ATT TTT GCA TCT CC	VIC	237
	MMP11	F: CAA GAC TCA CCG AGA AGG GG R: TAG CGA AAG GTG TAG AAG GCG	FAM	174
Kontrol genler	GAPDH	F: TCT TCA CCA CCA CGG AGA A R: AGG GGG CAG AGA TGA TGA C	VIC	69
	18S RNA	F: CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC R: CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG	VIC	110

KAPİLLER ELEKTROFOREZ

PCR ürünleri ABI 3130 otomatik kapiller elektroforez cihazında yürütülmüştür. Sonuçlar rölatif kantitasyon miktarları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Yüz rölatif floresan ünitesinin altındaki pikler değerlendirmeye alınmamıştır.

BULGULAR

ÖZGÜNLÜK

Kan için seçilen HBB belirteci kanda ve ekspresyon seviyesi kısmen daha az olmakla birlikte, tüm menstrüel kan örneklerinde de tanımlanmıştır. PBGD tüm kan örneklerinde bulunmakta iken, menstrüel kan örneklerinin sadece %40'ında ta-

nımlanmamıştır. Bu iki belirteç semen, tükürük ve vajinal sekresyon örneklerinde tanımlanmamıştır. Kan belirteci olarak seçilen SPTB kan örnekleri dışında menstrüel kanda %72 oranında bulunur iken, ekspresyon seviyesi oldukça düşük olmakla birlikte vajinal sekresyon örneklerinin de %4'ünde gösterilmiştir (~100 rfu).

Menstrüel kan için seçilen MMP7, menstrüel kan dışında 10 vajinal sekresyon örneğinin 1'inde çok düşük ekspresyon seviyesinde de olsa gözlenmiştir (100 rfu⁻). MMP11 ise test edilen kan örneklerinin %68'inde gösterilmiştir.

Semen belirteçleri PRM1 ve PRM2 semen dışında test edilen diğer hiçbir vücut sıvısında tanımlanmamıştır.

Vajinal sekresyon için seçilen HBD1 ve MUC4 belirteçleri vajinal sekresyon dışında; tükürük belirteçleri STATH ve HTN3 bir başka vücut sıvısında çapraz reaksiyon göstermemiştir.

Çalışma için seçilen belirteçlerin test edilen farklı vücut sıvılarında tanımlanan amplifikasyon yüzdeleri Tablo 2'de görülmektedir.

MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Bu çalışmada, tüm belirteçlerin aynı anda analiz edilebileceği bir multipleks PCR'nin optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla aynı miktarda kan, semen, menstrüel kan, tükürük ve vajinal sekresyon örneklerinden hazırlanan cDNA'dan 1'er µL alınarak karıştırıldı. Karışımdan 1 µL cDNA alınarak her belirtecin kendini ifade edebilmesi için uygun primer konsantrasyonları belirlendi. Bu çalışmada her belirtecin kendini ifade edebildiği multipleks PCR

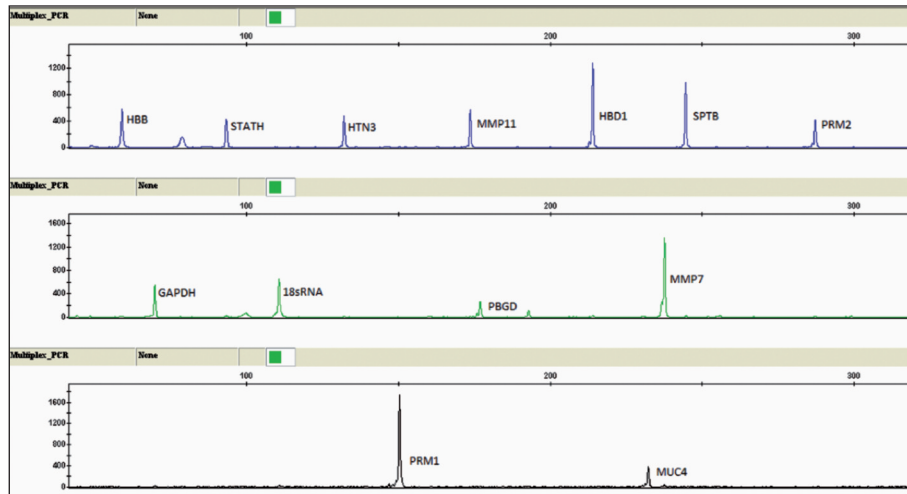
primer konsantrasyonları 10 µL PCR reaksiyonu için 0,01µM HBB, 0,2 µM PBGD, SPTB, STATH, HTN3, PRM1 ve PRM2'nin her birinden, 0,3 µM HBD1 ve MMP7, 0,1 µM MMP11, GAPDH ve 0,05 µM 18SRNA olarak belirlendi. Şekil 1'de multipleks PCR ürünlerinin kapiller elektroforez görüntüsü görülmektedir.

LEKELERDE STABİLİTE

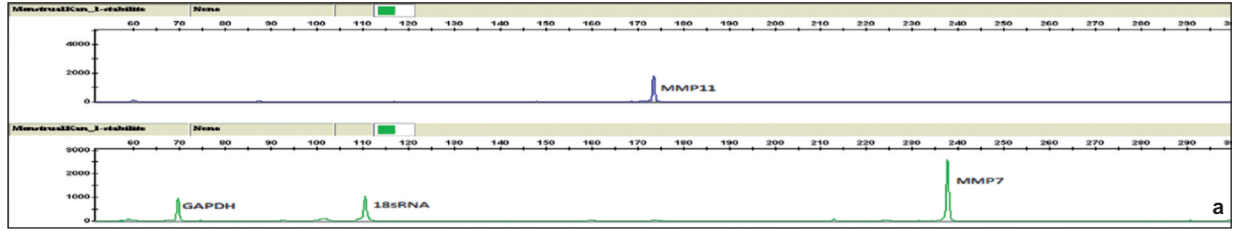
Kan, semen, menstrüel kan, tükürük ve vajinal sekresyon lekelerinin 6 ay süre ile 4°C oda sıcaklığı (22-25°C) ve 37°C'de bekletilen örneklerde yapılan stabilite deneylerinde, bu süre ve sıcaklıkların seçilen mRNA belirteçlerinin tanımlanabilirliğine görülebilir negatif bir etkisi saptanmamıştır. Şekil 2a-e'de oda sıcaklığında bekletilen biyolojik lekelerden bazı örneklerin, kapiller elektroforez görüntüleri görülmektedir.

TABLO 2: RT-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile kan, menstrüel kan, vajinal sekresyon ve semen belirteçlerinin farklı vücut sıvılarında tanımlanma yüzdeleri (n=örnek sayısı).

Vücut sıvısı	n	HBB (%)	PBGD (%)	SPTB (%)	MMP7 (%)	MMP11 (%)	PRM1 (%)	PRM2 (%)	STATH (%)	HTN3 (%)	HBD1 (%)	MUC4 (%)
Kan	10	100	96	100	0	68	0	0	0	0	0	0
Menstrüel kan	10	100	40	72	100	100	0	0	0	0	0	0
Vajinal sekresyon	10	0	0	4	10	0	0	0	0	0	100	100
Semen	10	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Tükürük	10	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0



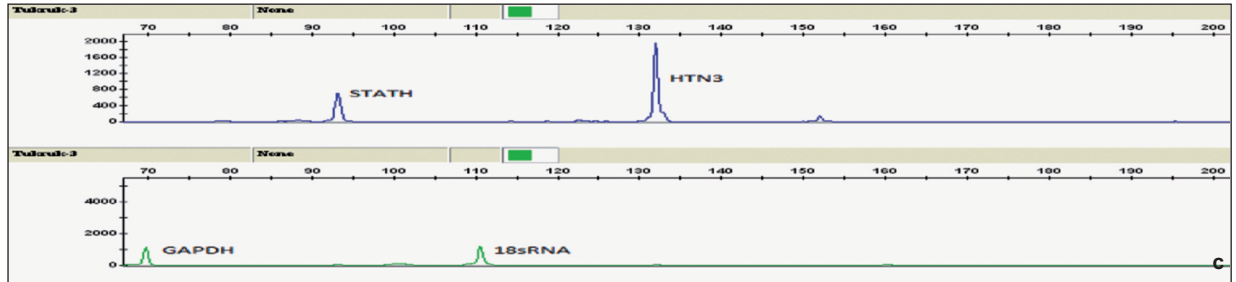
ŞEKİL 1: Tam kan, menstrüel kan, semen, tükürük ve vajinal sekresyon belirteçlerinin multipleks PCR sonrası kapiller elektroforez görüntüsü.



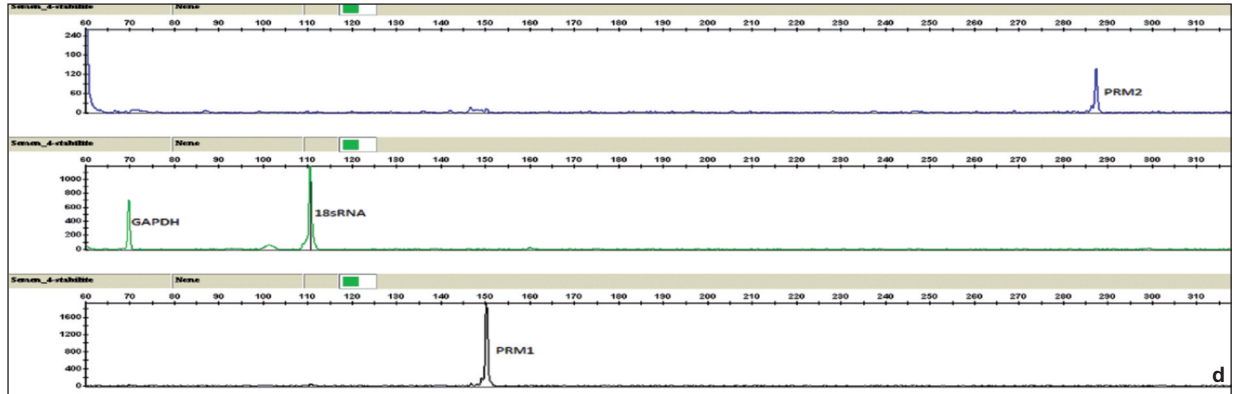
ŞEKİL 2: a) 6 ay oda sıcaklığında bekletilen menstrüel kan lekesi.



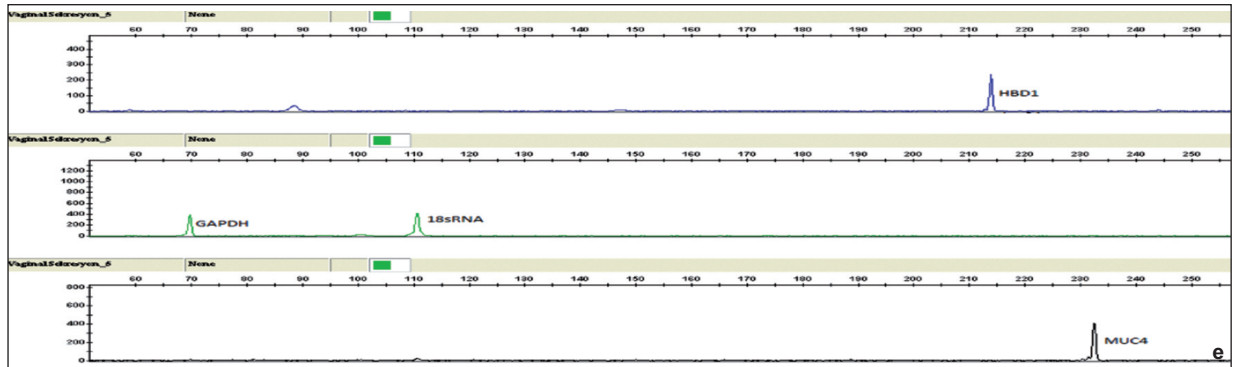
ŞEKİL 2: b) 6 ay oda sıcaklığında bekletilen tam kan lekesi.



ŞEKİL 2: c) 6 ay oda sıcaklığında bekletilen tükürük lekesi.



ŞEKİL 2: d) 6 ay oda sıcaklığında bekletilen semen lekesi.



ŞEKİL 2: e) 6 ay oda sıcaklığında bekletilen vajinal sekresyon lekesi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Adli analizlerde kullanılan biyolojik deliller genellikle çok az miktarda olumsuz çevre koşullarına maruz kalmışlardır. Delil olarak kullanılacak biyolojik örneğin az olması nedeni ile, biyolojik delilin insan kaynaklı olup olmadığının ve orijinini belirleme konusunda tercih edilecek analiz yöntemlerinin dikkatle seçilmesi gerekmektedir. DNA analizi öncesi yapılması gereken bu ön analizlerde, geleneksel olarak enzimatik ve immünolojik testler kullanılmaktadır. Enzimatik ve immünolojik testler, diğer türler ve dokularla çapraz reaksiyonlar oluşturabilmektedir. Bunun yanında, her bir test için ilave biyolojik materyale de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, DNA/RNA birlikte izole edilebilmiş ve DNA analizi için kullanılan biyolojik materyalin aynısı mRNA analizi için de kullanılabilmiş olduğundan (AllPrep DNA/RNA ekstraksiyon kiti ile) ilave materyal gereksinimi ortadan kalkmıştır.³⁴⁻³⁸ Bununla birlikte, özellikle vajinal sekresyon ve menstrüel kan için spesifik bir enzimatik ya da immünolojik yöntem bulunmadığından vajinal sekresyon ve menstrüel kan için seçilen doku spesifik mRNA'lar, bu iki biyolojik sıvının ayırt edilebilmesinin de yolunu açmıştır.

Geçmişte RNA'nın postmortem örnekte RNaz'lar etkisiyle hızla parçalandığı düşünülmüştür. Bu durum adli biyolojik örneklerin analizinde negatif etki yaratacağından, adli örneklerde RNA analizi ile ilgili çalışmalar pek yapılmamıştır. Ancak yapılan ön çalışmalarda beklenmedik bir şekilde RNA'nın belirli koşullar altında yüksek stabilite gösterdiğine dair sonuçlar alınmıştır. Örneğin; bir çalışmada, 15 yıllık bir kan lekesinden RNA izolasyonu yapılabildiği, diğer iki çalışmada da 16 ve 23 yıllık kan lekelerinden mRNA profillemeye yapılabildiği belirtilmiştir.³⁹⁻⁴¹ Benzer şekilde, 16 yıllık tükürük lekelerinde de mRNA profillemeye yapılabildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli koşulların etkisinin test edildiği bir çalışmada ise olumsuz çevre koşullarına maruz kalmış lekelerde, 547 güne kadar yeterli kalite ve miktarda RNA elde edilebildiği bildirilmiştir.⁴² Semen lekelerinin zamana bağlı stabilitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise 20 yıldan fazla süre derin don-

durucuda bekletilmiş örneklerde sonuç alınabildiği belirtilmektedir.⁴³

Bu çalışmada farklı ortam koşullarında [6 ay, üç ayrı sıcaklıkta-oda sıcaklığı (22-25°C), etüv (37°C) ve buzdolabı (4°C)] bekletilmiş 5'er adet kan, menstrüel kan, semen, tükürük ve vajinal sekresyon lekeleri ile yapılan çalışmalarda tüm mRNA belirteçlerinin belirlenen sürelerde ve sıcaklıklarda tanımlanabildiği gözlenmiştir.

Çapraz reaksiyon kontrolü amacıyla yapılan çalışmalarda, sperm belirteçleri PRM1 ve PRM2'nin, semen dışında test edilen hiçbir biyolojik materyalde pozitif sonuç vermemesi, PRM1 ve PRM2'nin semen lekelerinin tanımlanmasında etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, adli vakalarda semen lekesinin tanımlanmasında sadece sperm spesifik bu iki belirtecin kullanılmasının, azospermik olguların gözden kaçırılmasına neden olabileceği unutulmamalıdır.⁴⁴

Vajinal sekresyon belirteçleri olarak seçilen MUC4 ve HBD1 ile tükürük belirteçleri STATH ve HTN3 hedef doku dışında diğer vücut sıvıları ile de çapraz reaksiyon göstermemiştir. Ancak, çeşitli sayıda literatürde bu belirteçlerin hedef spesifik bulunmadığını gösteren sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle bu belirteçlerin daha çok örnekle çalışılarak özgünlüklerinin doğrulanması gerekmektedir.²⁰

Menstrüel kan belirteci olarak seçilen MMP7'nin hedef doku dışında vücut sıvısında tanımlanmamış olması (1 vajinal sekresyon örneği hariç) MMP7'nin menstrüel kan belirteci olarak kullanılabilmesini, ancak dikkatli yorumlanması gerektiğini göstermektedir. MMP11'in ise tam kan örneklerinin %68'inde gösterilmesi MMP11'in tam kan menstrüel kan ayırımında etkin olamayacağını göstermiştir.

Seçilen iki adet internal kontrol belirtecin, adli amaçlı olarak vücut sıvılarının varlığının gösterilmesinde indikatör olup olamayacağı da araştırılmıştır. Analiz edilen spesifik vücut sıvısı için seçilen belirteçlerle birlikte internal belirtecin kullanılması, sonuç negatif olarak gözlemlendiğinde düşünülen vücut sıvısının yokluğu veya hiç biyolojik materyal olmadığı ayırımını yapabilmek içindir. Bu çalışmada, internal kontrol belirteçleri GAPDH'nin, örnek tip-

lerine göre ekspresyon seviyelerinde farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. Bazen hedef vücut sıvısı belirteç ile karşılaştırıldığında, amplifikasyon seviyesinin çok daha düşük olduğu saptanmıştır. İnternal kontrol belirteçlerin tüm dokularda eksprese olması ve ekspresyon seviyesinin hedef belirteçlerle aynı veya daha yüksek seviyede olması beklenmektedir. Maalesef adli amaçlı vücut sıvılarının analizine ihtiyaç duyulan tüm sıvılar için tam olarak uygun olacak bir belirteç tanımlanamamıştır. Seçilen bir diğer internal kontrol belirteç olan 18S RNA sonuçları incelendiğinde, tüm dokularda yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu test edilen lekenin, herhangi bir biyolojik materyal olabileceğini göstermek için uygun olabileceği gözlenmiştir. İnternal kontrol belirteçleri 18S RNA ve GAPDH'nin lekelerde gösterilebilirliğine bakıldığında, her üç sıcaklıkta ve farklı zaman aralıklarında bekletilen lekelerde her iki belirteçte gösterilebilmiştir.

Sonuç olarak; mRNA profillemenin vücut sıvılarının tanımlanmasında etkin olarak kullanılabilceğini, az miktardaki adli lekeden aynı anda RNA/

DNA eldesi mümkün olduğundan adli vakalarda örnek kaybının da önlenilebileceği düşünülmektedir. Çalışmada test edilen belirteçlerden MMP11 dışındakilerin, biyolojik sıvı ve lekelerin tanımlanmasında kullanılabilceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu proje Çukurova Üniversitesi BAP Koordinasyon Biriminin mali katkıları ile gerçekleştirilmiştir. (Proje No: TF2012BAP43).

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ayşe Serin; **Tasarım:** Ayşe Serin; **Denetleme/Danışmanlık:** Ayşe Serin, Behnan Alper; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Ayşe Serin, Hüsnüye Canan, Ayça Ulubay; **Analiz ve/veya Yorum:** Ayşe Serin, Hüsnüye Canan; **Kaynak Tarayması:** Ayşe Serin, Hüsnüye Canan, Ayça Ulubay; **Makalenin Yazımı:** Ayşe Serin; **Eleştirel İnceleme:** Ayşe Serin, Behnan Alper; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Ayşe Serin, Behnan Alper; **Malzemeler:** Hüsnüye Canan, Ayça Ulubay.

KAYNAKLAR

- Lomholt B, Keiding N. Tetrabase, an alternative to benzidine and orthotolidine for detection of haemoglobin in urine. *Lancet* 1977;1(8011):608-9.
- Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. *J Forensic Sci* 1976;21(4):816-21.
- Kohn J, O'Kelly T. An ortho-tolidine method for the detection of occult blood in faeces. *J Clin Pathol* 1955;8(3):249-51.
- Weber K. [The use of chemiluminescence of luminol in forensic medicine and toxicology. I. identification of blood stains]. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 1966;57(3):410-23.
- Creamer JI, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel RA. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence* 2005;20(6):411-3.
- Kent EJ, Elliot DA, Miskelly GM. Inhibition of bleach-induced luminol chemiluminescence. *J Forensic Sci* 2003;48(1):64-7.
- Foot CH, Wiener K. Phadebas amylase test kits. *Clin Chem* 1979;25(5):818.
- Quarino L, Dang Q, Hartmann J, Moynihan N. An ELISA method for the identification of saliva amylase. *J Forensic Sci* 2005;50(4):873-6.
- Keating SM, Higgs DF. The detection of amylase on swabs from sexual assault cases. *J Forensic Sci Soc* 1994;34(2):89-93.
- Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(1):69-74.
- Haas C, Hanson E, Kratzer A, Bär W, Ballantyne J. Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(5):449-58.
- Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3(2):80-8.
- Haas C, Muheim C, Kratzer A, Bar W, Maake C. mRNA profiling for the identification of sperm and seminal plasma. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2009;2(1):534-5.
- Bauer M, Kraus A, Patzelt D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Forensic Sci* 1999;44(6):1232-6.
- Bauer M, Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci* 2002;47(6):1278-82.
- Bauer M, Patzelt D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *Int J Legal Med* 2003;117(3):175-9.
- Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int* 2003;135(2):85-96.
- Ferri G, Bini C, Ceccardi S, Pelotti S. Successful identification of two years old menstrual bloodstain by using MMP-11 shorter amplicons. *J Forensic Sci* 2004;49(6):1387.
- Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int* 2005;152(1):1-12.
- Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschneck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci Int* 2006;157(2-3):181-6.
- Fang R, Manohar CF, Shulze C, Brevnov M, Wong A, Petrauskene OV, et al. Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. *Int Congr Ser* 2006;1288:685-7.
- Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* 2007;52(6):1252-62.

23. Bauer M, Patzelt D. Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: technical improvements and the practical value of negative results. *Forensic Sci Int* 2007;174(1):55-9.
24. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* 2008;122(2):135-42.
25. Haas C, Hanson E, Bär W, Banemann R, Bento AM, Berti A, et al. mRNA profiling for the identification of blood--results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(1):21-6.
26. Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4(4):244-56.
27. Gubin AN, Miller JL. Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2 splice variants. *Blood* 2001;97(3):815-7.
28. Chu ZL, Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC. Erythroid-specific processing of human β -spectrin I pre-mRNA. *Blood* 1994;84(6):1992-9.
29. Levings PP, Bungert J. The human β -globin locus control region. *Eur J Biochem* 2002;269(6):1589-99.
30. Sabatini LM, Ota T, Azen EA. Nucleotide sequence analysis of the human salivary protein genes HIS1 and HIS2, and evolution of the STATH/HIS gene family. *Mol Biol Evol* 1993;10(3):497-511.
31. Sabatini LM, Azen EA. Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160(2):495-502.
32. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000;6(3):219-25.
33. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101(8):1633-42.
34. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Moccia R, Zhan Q, Toribara N, Ho SB, et al. MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol Reprod* 1999;60(1):58-64.
35. Bauer M, Patzelt D. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic Sci Int* 2003;136(1-3):76-8.
36. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem* 2004;335(2):289-98.
37. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Bär W, Banemann R, Berti A, et al. RNA/DNA co-analysis from blood stains--results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6(1):70-80.
38. Bowden A, Fleming R, Harbison S. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the promega DNA IQTM system. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(1):64-8.
39. Bauer M, Polzin S, Patzelt D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int* 2003;138(1-3):94-103.
40. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci* 2008;53(2):296-305.
41. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med* 2009;123(1):71-4.
42. Kohlmeier F, Schneider PM. Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6(2):274-6.
43. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Banemann R, Berti A, Borges E, et al. RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains--results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7(2):230-9.
44. Roeder AD, Haas C. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int J Legal Med* 2013;127(4):707-21.