



**TÜBİTAK – BİDEB**

**LİSE ÖĞRETMENLERİ-FİZİK, KİMYA, BİYOLOJİ, MATEMATİK- PROJE  
DANIŞMANLIĞI EĞİTİMİ ÇALIŞTAYI**

**(LİSE-3 [ÇALIŞTAY 2013])**

**BİYOLOJİ PROJE RAPORU**

**GRUP TUHAF**

**PROJE ADI**

**TUHAF MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN DNA ÖRNEKLERİNİN  
ADLİ TIPTA KULLANIM ÖRNEKLERİ**

**PROJE EKİBİ**

Deniz SARAÇOĞLU

Ersin ÇELİKBAŞ

**PROJE DANIŞMANLARI**

Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ

Doç. Dr. Kemal Melih ÜNAL

**ÇANAKKALE**

**02 – 10 ŞUBAT 2013**

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	1
PROJENİN AMACI .....	1
1.GİRİŞ .....	1
2.MATERYAL ve YÖNTEM .....	5
2.1. Materyalin Eldesi .....	5
2.2. Metod .....	5
2.2.1. DNA İzolasyonu .....	5
2.2.2. PZR Analizi .....	5
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	7
3.BULGULAR .....	9
3.1.1. DNA İzolasyonu .....	9
3.1.2. PZR Analizi .....	9
4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	9
5.KAYNAKÇA.....	11

## **PROJE ADI**

Tuhaf Materyallerden İzole Edilen DNA Örneklerinin Adli Tıpta Kullanım Örnekleri

## **PROJENİN AMACI**

1. İnsanın temas ettiği materyallerde iz bıraktığını tespit etmek,
2. Bazı maddelerden DNA izolasyon yöntemleri kullanılarak DNA elde etmek,
3. PZR yöntemini uygulayarak DNA çoğaltmak.

## **1. GİRİŞ**

Adli alanda DNA analizi ile kimlik tespiti tüm dünyada ve buna paralel olarak ülkemizde de uygulanmaktadır. DNA (deoksiribonükleik asit) yapısının tiplendirilmesi, adli bilimler (forensic science) alanında yüzyılın en olağan üstü buluşu olarak kabul edilmektedir(1).

DNA analizi yapmak için olay yerinden, mağdur ve sanıktan biyolojik örnekler alınır(Tablo1). Bu örneklerden DNA izole edilir ve DNA molekülü üzerindeki belirli bazı bölgeler ve mümkün olduğu kadar çok sayıdaki bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile binlerce kez çoğaltıldıktan sonra görünür hale getirilir. Tek yumurta ikizi olmadığı takdirde iki insanın aynı DNA profiline sahip olma ihtimali trilyonda birden azdır. Bir başka deyişle, yeryüzünde aynı DNA profiline sahip ikinci bir kişinin bulunması teorik olarak olanaksızdır. DNA profili yalnız saldırı ve cinayetlerin aydınlatılmasında değil aynı zamanda babalık tayinlerinin, akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında ve tıp alanında kalıtsal hastalıkların nedenleri ve olası tedavilerinde güvenilir bir yöntemdir(2,3)

Olay yerinde bulunan delil	Delil üzerinde DNA elde edilebilecek biyolojik materyalin olası yeri	Biyolojik materyalin cinsi
Şapka veya Maske	İç kısmı	Saç kılları
Gözlük	Burun ve Kulağa temas eden kısımları	Deri hücreleri
Kürdan	Uç kısımları	Tükürük (ağız epitel hücreler ve akyuvarlar)
Çiğnenmiş sakız	Yüzey kısmı	Tükürük
Diş fırçası	Fırça kısmı	Kan, tükürük
Isırık izi	Mağdur yada sanığın derisi ve/veya elbisesi	Tükürük
Sigara izmariti	Filtreli kısmı	Tükürük
Pul ve zarf	Yapışkanlı kısım	Tükürük
Şişe, bardak, çatal, teneke kutu	Kenarlar , ağız kısmı	Tükürük
Kullanılmış prezervatif	İç/dış yüzeyi	Meni, vajinal veya rektal hü.
İç çamaşır	İç/dış yüzeyi	Kan, meni, deri hücreleri
Giysi	Her yerinde	Kan, meni, saç kılları, vücut kılları, tükürük, deri hücreleri
Tırnak, tırnak parçası	Yüzey ve iç kısmında	Kan, doku
Tırnak makası	Yüzeyinde ve kesici kısmında	Kan, doku
Battaniye, yastık, çarşaf vb.	Yüzey kısmında	Kan, tükürük, meni lekesi, saç kılları, vücut kılları, mekonyum, amnion sıvısı lekesi
Silah	Kabza	Kan, doku, deri
Mermi çekirdeği	Dış yüzeyi	Kan, doku
Bıçak, balta vb.	Kabza, kesici yüzey	Kan, saç/vücut kılları, doku, deri
Fayans, Yer döşemesi, duvar, koltuk, perde	Yüzey kısmında	Kan, saç/vücut kılları
Ağaç, ağaç dalları, toprak, yaprak	Yüzey kısmında	Kan, saç/vücut kılları
Araba tamponu, far, asfalt vb.	Yüzey kısmında	Kan, doku, saç/vücut kılları

Tablo 1: Olay yerinde bulunan delilin üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynakları(4).

Moleküler genetik araştırmaların ilk adımı genomik DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesidir. Genomik DNA'nın elde edilmesi hücre zarının eritilmesi, proteinlerin parçalanması, proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gibi başlıca adımları içerir(5).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir(6,7). Teknik ilk bulunduğu 1985 yılından itibaren hızlı bir gelişme göstermiş ve günümüzde bitki biyoteknolojisinin her alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır (7,8,9).

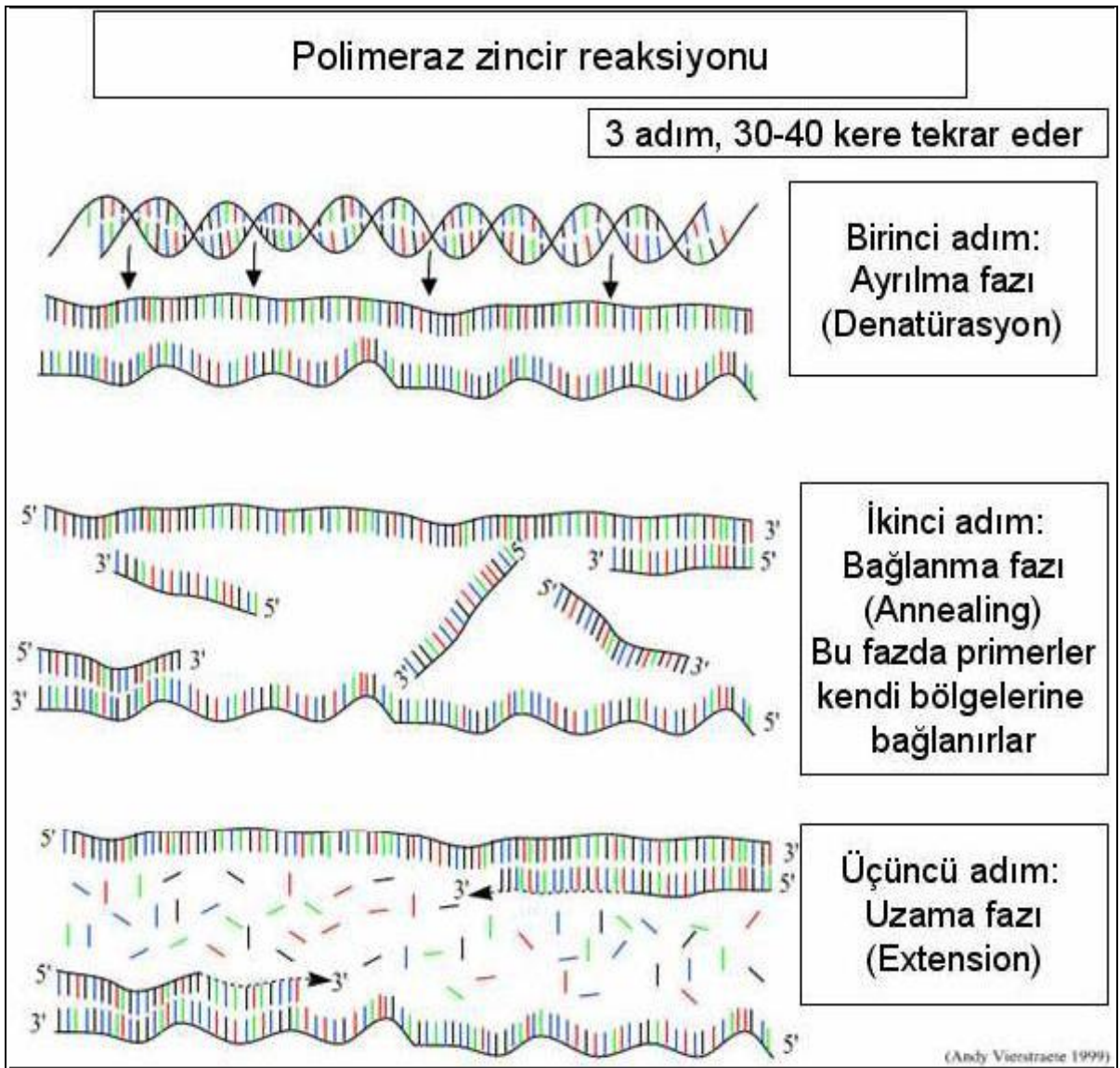
PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır(11).

- 1- DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)
- 2- Primerlerin Açılan DNA Yapışması (Annealing)
- 3- Primer Uzaması (Primer Extension)

PZR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojide çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PZR metotları geliştirilmiştir(Tablo:2).

PZR ürünleri UV ışığı altında görüntülenerek bantlar elde edilir. Bu bantlar ile yapılan DNA izolasyon sonucu ve PZR çalışmaları değerlendirilmektedir. Elde edilen bantlar numuneden alınan DNA örneklerinin büyüklüğü hakkında detaylı bilgi vermektedir.

Lochard'ın "her temas bir iz bırakır" sözü bize biyolojik delillerin vazgeçilmez olduğunu göstermektedir. Günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak adli tıpta suçlulardan kalan izlerin doğru bir biçimde tespitiyle adalet sağlanmaya devam edecektir (1).



Şekil 1: PZR döngüsünün basamakları (10)

<b>Çoğaltılması İstenen DNA Dizisinin Bilindiği Durumlarda Kullanılan PZR Metotları</b>	<b>Çoğaltılması İstenen DNA Dizilerinin Bilinmediği Durumlarda Kullanılan PZR Metotları</b>	<b>PZR'ın Diğer Tekniklerle Birlikte Kullanıldığı Metotlar</b>
Standart PZR (Standart PZR):	Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD PZR)	Çoğaltılan Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP):
Ters Transkriptaz PZR (Reverse Transcriptase PZR, RT-PZR):	Ters PZR (Inverse PZR)	PZR Ürününün Enzimle Kesilmesi (PZR RFLP)
Katlı PZR (Multiplex PZR):	Kanca PZR (Anchored PZR)	Çoğaltılmış DNA Dizilerinin Enzimle Kesilmesi (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; CAPS):
Antiserumla Sabitleme PZR (Immunocapture PZR):	Asymmetric PZR	RAPD Bantlarının Spesifik Primere Dönüştürülmesi (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR):
İç içe PZR (Nested PZR)		
Renkli PZR (Colorimetric PZR)		
Damlatma PZR (Spot PZR)		
Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (Touchdown PZR)		

Tablo 2: Çoğaltılması istenen DNA dizisinin bilindiği durumlarda kullanılan PZR metotları.

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Materyalin Eldesi**

Çalışmamızda materyal olarak tükürük kullanılacaktır. DNA izolasyonun yapılacak tükürük numunelerinin için elde edilmesi için pet şişe ve sakız kullanılmıştır. Pet şişenin ağız kısmından bisturi ile kesilerek alınan parça ve çiğnenmiş bir sakızdan alınan numune dikkatli bir şekilde bir tüplere aktarılmıştır.

### **2.2. Metot**

Numunelerden aşağıdaki protokollere uygun şekilde DNA izolasyonu ve PZR çalışmaları yapılmıştır.

#### **2.2.1. DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Ekstraksiyon tamponunun hazırlanması: 2,4248 gr. TrisHCl (pH):7.5) 90 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözündürülür ve 1N HCl ile pH:7.5 e ayarlanır. 1,461 gr. NaCl eklenir ve çözündürülür. 0,9306 gr. EDTA eklenir ve çözündürülür. 0,25 gr. SDS eklenir ve çözündürülür. Son haim dH<sub>2</sub>O ile 100 ml ye tamamlanır.
2. Örneğin üzerine 400 µl. Ekstraksiyon tamponu eklenir. İyice vortekslenir., oda sıcaklığında 2 dk. Bekletilir ve 13000 rpm de 1 dk santrifüje edilir.
3. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınır.
4. Opsiyonel olmak üzere eşit miktarda phenol:kloroform:izoamylaleohol(25:24:1) eklenir tüp birkaç defa alt üst edilir ve 13000 rpm 1 dk santrifüje edilir.
5. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınır ve 500 µl. %96 lık soğuk ethanol eklenir ve tüp alt üst edilerek 2 dk oda sıcaklığında bekletilir.
6. Oluşan pellet 13000 rpm de 5 dk. Santrifüj edilir ve alkol dökülerek uzaklaştırılır.
7. Pellet %70 lik alkolde yıkanır ve alkol uzaklaştırılır. Tüpler kapağı açık şekilde oda sıcaklığında 5 dk bekletilir ve 50 µl. dH<sub>2</sub>O içinde çözündürülür.

#### **2.2.2. PZR analizleri:**

PZR analizleri Techne Progene marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Çalışılan PZR karışımı 50 mikrolitre olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 2: PZR cihazı.

Tris Buffer 10 $\mu$ M pH: 8	5 $\mu$ l
PZR döngüsü Primer	4 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ l
Taq polimeraz	1 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
Kalıp DNA	5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	31,5 $\mu$ l
Toplam:	50 $\mu$ l

Çalışmada aşağıda nükleotid dizileri verilen COX-U geni primeri kullanılmıştır (Tablo 3).

Primerin adı	Primer nükleotid dizisi
COX-U (F)	Primer I : 5'TGGAGTCCTAGGCACAGCTC
COX-U (R)	Primer II : 5'GATGGGCATGAACTGTGGT

Tablo 3: PZR'da kullanılan primerler.



PZR programı aşağıdaki şekilde Techne Progene markalı PZR cihazında gerçekleştirilmiştir.

**İlk Döngü :**

18X	{	5 dakika 95°C	Denatürasyon
		1 dakika 95°C	Uzama
		1 dakika 60°C	Polimerizasyon
		4 dakika 72°C	Son döngü

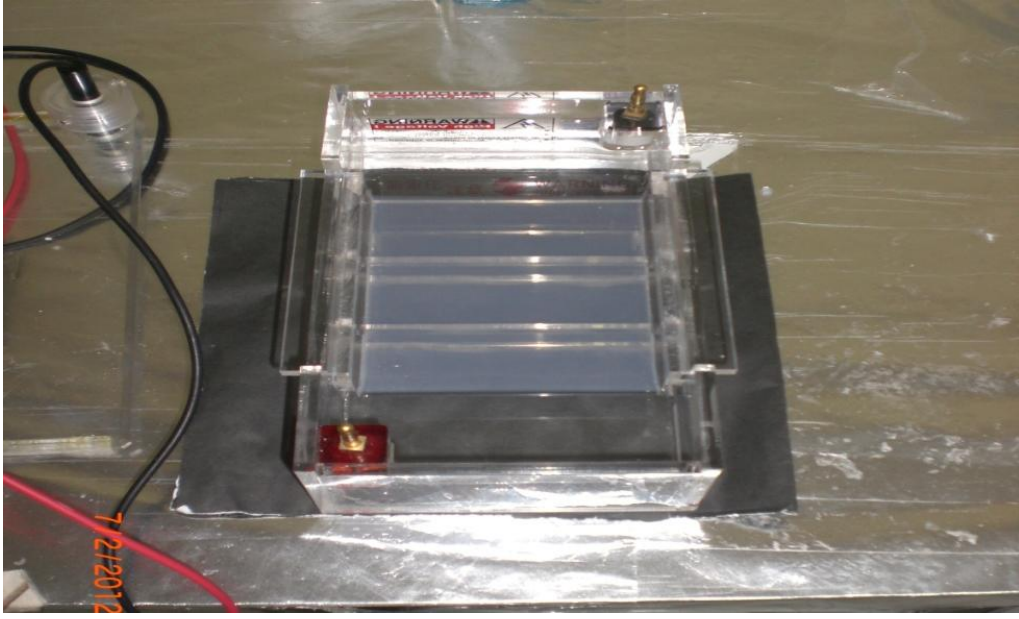
**Son Döngü:** 7 Dakika 72 °C

**Bekleme Sıcaklığı:** 1 dakika > 4 °C

**2.2.3. Agaroz Jel Elektrofözezi:**

%1'lik bir agaroz jel hazırlamak için; 50ml 1X TAE ve 0,5 g agaroz bir erlen içerisine ilave edilerek mikrodalga fırında agaroz tamamen özölünceye kadar kaynatıldı, bu aşamada jelin taşmasına engel olmak için yaklaşık 200 ml'lik bir erlen kullanılmıştır. Agaroz tamamen çözündükten sonra biraz soğuması beklenmiş fakat katılaşmamasına dikkat edilmiş ve yaklaşık 5 µl EtBr(Etidium Bromür 10 mg/ml) solüsyonu eklenmiştir. Tarakların doğru olarak yerleştirilip yerleştirilmediği kontrol edildikten sonra jel elektroföze tepsisine üzerinde herhangi bir kabarcık kalmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Agaroz jel bu şekilde 15–30 dk bekletilmiştir. EtBr güçlü bir mutajenik ajan olduğu için jel dökme işlemine çok dikkat edilmiştir.

Agaroz jelin tamamen donmasının ardından kuyunun örnek yükleme kapasitesine uygun olarak 6x jel yükleme solüsyonu ve bunun 6 katı oranında örnek (1'e 6 oranında) karıştırılarak ilgili kuyuya yüklendi, jel yükleme solüsyonu örneğin kuyuya oturmasına ve elektroföze sırasında örneğin takip edilmesine imkân vermiştir. Ayrıca bant büyüklüklerinin karışlaştırılabilmesi amacı ile bant büyüklükleri bilinen bir DNA standardı (marker) yüklenmiştir.. Ortalama olarak 100V 30 dk yürütölmüştür. Elektroföze işleminin ardından UV işık altında görüntüleme sistemi ile bantların değerlendirmesi yapılmıştır.



Şekil 3: Agaroz jel ve elektroforez



Şekil 4: UV görüntüleme cihazı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. DNA İzolasyonu

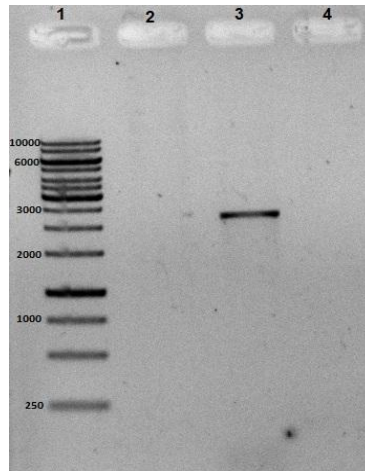
Çalışmada çiğnenmiş sakız ve kullanılmış bir pet şişeden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların miktarları çok düşük olduklarından agaroz jel elektrofezi ile tespit edilememiştir. Buna karşın az miktarda da olması PZR reaksiyonları için yeterli olabileceği bildirilmiştir(6). Çalışmada pozitif kontrol olarak insan genomik DNA'sı kullanılmıştır. Bu DNA Arş. Gör. Meliha Merve HIZ'dan temin edilmiştir.

#### 3.2. PZR Analizleri

PZR analizlerinde kalıp DNA'lardan COX-U geni çoğaltılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada kullanılan primer çifti Arş. Gör. Dr. Özlem Erol'dan temin edilmiştir. Bu primer çiftinin son ürünü 2300 kb uzunluğunda olması beklenmiştir. PZR ürünleri 1'lik agaroz jel içerisinde yürütülmüş, etidyum bromür ile fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 5). Çalışmada PZR ürünlerinin boyutlarının belirlenebilmesi için 1 kilo baz (kb) uzunluğunda belirteçler kullanılmıştır. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak insan DNA'sı kullanılmış ve bu DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PZR reaksiyonlarında beklenen boyutta bir bant elde edilmiştir (Şekil:5 3 no'lu kuyucuk). Bu sonuç bu çalışmada kullanılan primerlerin doğru gen bölgesini çoğalttığını işaret etmiştir.

### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Genomik DNA'nın kolay ve ucuz bir yöntemler izole edilmesini amaçlayan bu çalışmada farklı organizma ve biyolojik örneklerin bulunduğu materyallerden DNA izolasyon çalışması yapılmıştır.



Şekil 5: PZR görüntüleri: 1 no'lu kuyucuk=1 kb Belirteç (Fermentas), 2 no'lu kuyucuk =Sakız, 3 no'lu kuyucuk =Pozitif Kontrol, 4 no'lu kuyucuk =Pet Şişe.

Kalıp olarak sakızdan elde edilen DNA'nın kullanıldığı PZR reaksiyonunda ise beklenen düzeyde bir bant elde edilememiş olmasına rağmen jel üzerinde sürüntü ile karşılaşılmıştır. Bu sürüntünün nedeni proteinaz K enziminin kullanılmaması, kalıp DNA miktarının, primer, dNTP ve magnezyum miktarının uygun olmaması olabilir. Ayrıca az miktarda DNA kullanılan PZR'lerde karışımın toplam hacminin düşük tutulması yararlı olabilir. Genelde böyle düşük DNA miktarlarında hacmin fazla olduğu reaksiyonlarda bantlar görünmezken, toplam hacim azaltıldığında PZR ürünleri görüntülenebilir(12). Buna karşın kalıp olarak pet şişeden elde edilen DNA'ların kullanıldığı PZR reaksiyonlarında beklenen boyutta bir bant elde edilememiştir (Şekil:5 4 no'lu kuyucuk).

## **TEŞEKKÜR**

Çalıştay koordinatörü: Prof. Dr. Mehmet AY' a, sunuları ve çalışmalarıyla bizleri aydınlatan danışmanlarımız Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ ve Doç. Dr. Kemal Melih TAŞKIN'a, Arş. Gör. Meliha Merve HIZ'a, tüm çalıştay ekibine ve Çanakkale OnSekiz Mart Üniversitesi' ne teşekkür ederiz.

## 5. KAYNAKÇA

1. Açıkgöz N, Hancı H, Çakır H, (2002). Olay Yerinden DNA Analizi İçin Biyolojik Örnek Toplama Ve Örneklerin Laboratuvara Gönderilme Usulleri, ANKARA.
2. Atasoy S, Suçla mücadelede DNA profilleri ve DNA bankalarının önemi <http://abone.turk.net/atasoy/ottenderdna.htm>: erişim tarihi: 18/07/2000
3. Evett IW, Weir BS., Interpreting DNA Evidence, Statistical Genetics for Forensic Scientists, Sinauer Associates, Inc. U.S.A., 1998; 21
4. Olay yerinde bulunan delilin üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynakları. <http://www.biyolojigunlugu.com/forum/adli-biyoloji-t1555.0.html#ixzz2KDt829zE> (Erişim tarihi: 5 Şubat 2013).
5. Bozkaya F, (2012). DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi, Harran Üniv Vet Fak Derg, 1(2):92-96.
6. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230:1350-1354.
7. Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American, April:56-61.
8. Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PZRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). PZR protocols A guide to methods and applications. Academic Press. 3-12 pp.
9. Henson J. M. and Frech, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology 31:81-109.
10. Andy V, Principle of the PZR 199. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/PZR.html> (Erişim tarihi: 5 Şubat 2013).
11. Yılmaz S, Devran Z, (2003). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. Tagem yayınları sf:31-42.
12. Anonim, 2005. PCR Generalities. Standard PCR Reaction Mix. <http://www.info.med.yale.edu/genetics>.

## **GRUP ÜYELERİNİN ÖZGEÇMİŞLERİ**

### **Deniz SARAÇOĞLU**

1980 yılında Konya’da doğdu. İlköğretimini Mustafa Karacığın İlköğretimini tamamladıktan sonra liseyi Selçuklu Lisesinde okudu ve üniversite eğitimini Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. Halen Cihanbeyli Seniha Ali Fuat Belgin Teknik ve Endüstri Meslek Lisesinde görev yapmaktadır.

### **Ersin ÇELİKBAŞ**

1981 yılında Nevşehir’de doğdu. İlköğretimi ve liseyi bitirdikten sonra Gazi Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü bitirdi. Halen Eskişehir Muzaffer Çil Anadolu Lisesinde görev yapmaktadır.