

DNA PARMAK İZİ (DNA FINGERPRINT)

¹ Dr. Oğuz POLAT, ² Dr. Murat DEMİRİZ, ³ Dr. Ömer GÜNHAN, ⁴ Dr. Rıfki FİNCİ

ÖZET

1985'te, DNA parmak izi kavramı, İngiliz genetikçi Alec Jeffreys tarafından geliştirildi. Jeffreys, insan genomunda, değişik lokalizasyonlarda kendini tekrarlayan ve hibridizasyonla ortaya çıkarılabilen bölümlerin bulunduğunu ortaya koydu. Bu minisatellit adlı bölümlerin, bir kişiyi diğerinden ayırdetmede kullanılabileceği düşünüldü. Minisatellit bölgeler bir kişinin kan, semen ve diğer dokularındaki DNA'da aynı lokalizasyonlardadır ve herbirinden DNA fingerprint elde edilebilir. Minisatellit bölgelerden hazırlanan DNA hibridizasyon problemleri, elektroforetik bant kalıbını oluşturmak için kullanılır. Bu problemler, doğal ya da sentetik olarak üretilmiş ve işaretlenmiş olan minisatellit DNA segmentlerinden oluşmaktadır. Elektroforetik bant kalıbı, hipervariabiliteyi gösteren ve şahıslar için spesifik olan DNA parmak izini meydana getirmektedir.

Sonuç olarak, DNA parmak izinin, adli tıpta özellikle ırza geçme olaylarının çözümünde devrim yaratacağı düşünülmektedir.

DNA PARMAK İZİ (DNA FINGERPRINT)

Son yıllarda, DNA rekombinasyon teknolojisindeki gelişmeler; insan genetik özelliklerinin görüntüsünün elde edilmesini mümkün kılmıştır. Bu konudaki çalışmalar, genellikle genlerdeki defektleri ortaya çıkarmak amacıyla yöneliktir. Kusurlu geni içeren DNA segmenti; izole edilip çoğaltılmakta, radyoaktif madde veya biotinle işaretlenerek DNA problemleri haline getirilmekte ve şüpheli genetik materyaldeki kusurlu geni ortaya çıkarmak amacıyla kullanılmaktadır (1,2).

İnsan genomunu oluşturan DNA molekülü, çift sıralı nükleotid polimerlerinden meydana gelmekte-

SUMMARY

In 1985, DNA fingerprinting was developed by British geneticist Alec Jeffreys. He found that simple repetitive regions of DNA (minisatellites) which are dispersed in the human genome can be detected by hybridization. It is realized that these minisatellite regions would be ideal markers to use in distinguishing the DNA of one person from that of another. Minisatellite regions of DNA has been shown to be stable in human blood, semen and other tissues and obtained DNA fingerprints. DNA hybridization probes for minisatellite regions are used for forming of electrophoretic band patterns. These probes are naturally or synthetically produced and labelled minisatellite DNA segments. Electrophoretic band pattern is DNA fingerprint which shows hypervariability and is completely specific to an individual.

It is envisaged that DNA fingerprinting will revolutionize forensic biology particularly with regard to the identification of rape suspects.

dir (Resim 1). Bazlardan; adenin ile timin, guanin ile sitozin birbirleri ile eşleşmişlerdir. Uygun şartlar altında; tek sıralı bir DNA segmenti, kendine eş olan baz dizisini taşıyan diğer bir tek sıralı DNA segmenti ile karşılaştırıldığında, hibridizasyon adı verilen birleşme işlemi gerçekleşmektedir. DNA rekombinasyon teknolojisi, bu temel özellikten yararlanılarak geliştirilmiştir.

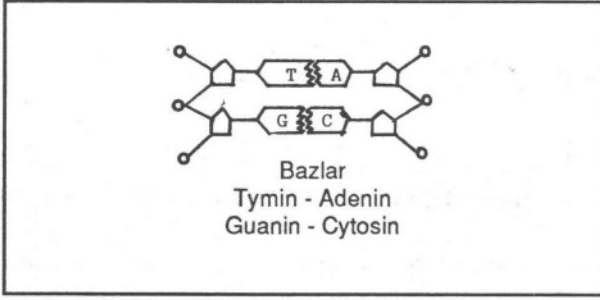
Nükleotidlerdeki bazların dizilim sırası, genetik yapıyı oluşturan şifreleri meydana getirmektedir. Bu dizilimin sırası, minisatellit adı verilen bölümler dışında tüm insanlarda aynıdır. Junk DNA adı da verilen bu bölümlerin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bu dizinin DNA boyunca, ki-

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Adli Tıp Uzmanı.

² Patoloji uzmanlık öğrencisi.

³ Patoloji Doçenti.

⁴ Patoloji Profesörü, Anabilim Dalı Başkanı.



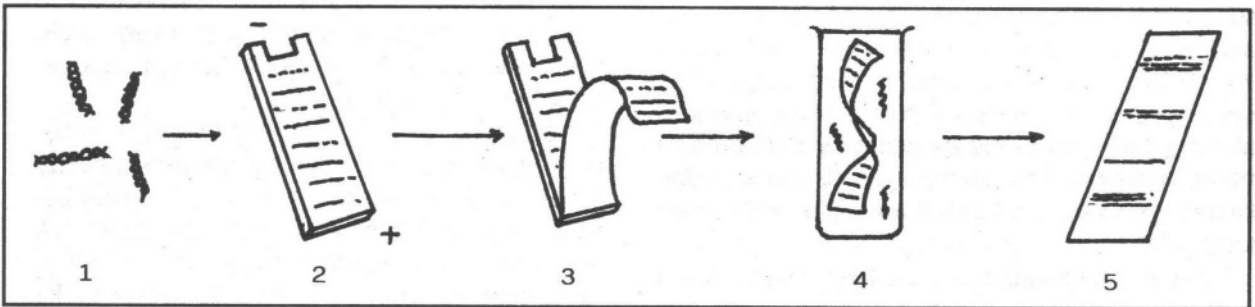
Resim 1 : DNA molekülü

şiden kişiye değişen lokalizasyonlarda kendini tekrarlaması, rekombinasyon çalışmalarına değişik bir boyut kazandırmıştır. Hipervariabilite denilen bu özellik nedeni ile, minisatellit bölgelerinin tek yumurta ikizleri dışında, iki ayrı kişide aynı lokalizasyonlarda bulunma olasılığı yaklaşık olarak 1/30 milyardır (3). Bu da, minisatellit bölgelerinin görüntüsünün elde edilmesiyle, çalışmanın kişiye özgü bir marker olarak kullanılabileceğini akla getirmiştir. Adli tıp alanında, bu yöntemle, insan vücuduna ait olan ve nükleusu bulunan hücreler içeren herhangi bir kalıntının incelenmesi sonucu, suçlunun ortaya çıkarılması konusunda çalışmalar ve uygulamalar yapılmıştır.

İlk kez 1985'te, Leicester Üniversitesinden genetikçi Alec Jeffreys, "DNA fingerprint" adıyla, bu tekniği ortaya koymuştur (4,5,6). Jeffreys, bu yöntemi, 5 yıl önce ortaya attığı, "DNA'nın fonksiyonu bilinmeyen (unexpressed) alanlarında kendini tekrarlayan dizilerin varlığı" varsayımı üzerine kurdu. Minisatellit bölgelerinin görüntüsünü elde etti ve bu çalışmanın, kişiye özgü, ideal bir marker olduğunu gösterdi.

Literatürde, genellikle tekniğin ırza geçme olaylarının çözümünde kullanılmasına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (4,7). Uygulama sırasında, suçlunun kurban üzerinde bıraktığı semenden faydalanılmaktadır. Test için kullanılacak semende, yeterli miktarda DNA, yani; en az 300.000 canlı sperm olmalıdır. Semen yanında, kan lekesi gibi kalıntılarla ilgili çalışmalarda bulunmaktadır (8). Alınan örneklerin sonuçları, zanlı kişilerin periferik kan lökositlerinden hazırlanan sonuçlar ile karşılaştırılmakta ve zanlının suçlu olup olmadığına karar verilmektedir.

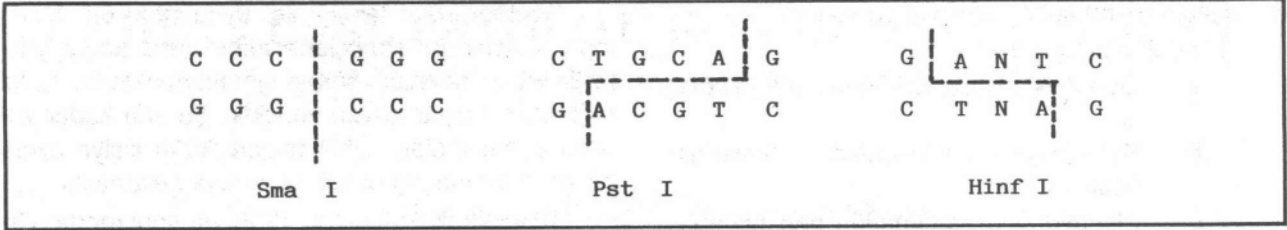
Uygulamaların temeli, Southern Blot adlı hibridizasyon tekniğine dayanmaktadır (Resim 2). Bu teknikte; önce toplanan materyalin DNA'sı izole edilmekte, sonra DNA, birlikte bulunduğu proteinler ve RNA'dan ayırılmaktadır. İzole edilen DNA, restriksiyon endonükleaz adı verilen enzimlerle parçalanmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA'yı belirli alanlardan bölen özel enzimlerdir (Resim 3). 400'e yakın restriksiyon enziminin varlığı bilinmektedir. Genellikle bakterilerden elde edilmektedirler. Bu enzimlerle yapılan parçalama işleminden sonra değişik molekül ağırlıklarında DNA segmentleri ortaya çıkmaktadır. Bu segmentler, agaroz-jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre sıralanırlar. Bu işlemi kontrol etmek için segmentler geçici olarak etidium bromid ile boyanırlar. Kontrol, ultraviyole ışıkta yapılır. Elektroforez işlemi yeterli ise, sıralanmış olan segmentler, nitrosellüler kağıda ya da naylon filtreye transfer edilir. Transfer işlemi, segmentlerin düzlemdeki konumları bozulmadan gerçekleştirilir. Daha sonra, nitrosellüler kağıt üzerindeki DNA segmentleri, hibridizasyon solusyonunda, DNA problemleri ile hibridize edilir. DNA problemleri; görünür hale getirilecek olan DNA segmentini, yani; kendini DNA üzerinde tekrarlayan segmenti içermektedir. Bu segment



1. Hedef DNA'nın izolasyonu
2. Polycarmide-gel elektroforezi
3. Nitrosellüler kağıda transfer
4. Problemlerin uygulanışı ve hibridizasyon
5. Hibridize olan bölümün görünür hale getirilişi ve DNA "fingerprint" kalıbının ortaya çıkışı.

Resim 2 : Southern - Blott tekniği.

DNA Parmak İzi (DNA Fingerprint)



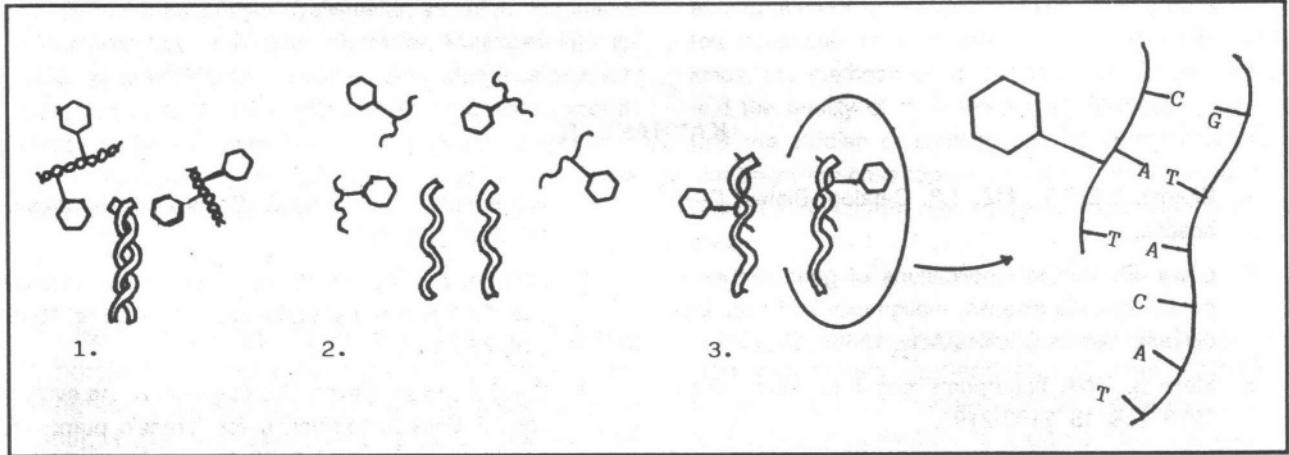
N: Herhangi bir baz.

Resim 3 : Restriksiyon enzimleri.

daha önceden DNA'dan izole edilmiş, bakteriler gibi uygun konaklarda üretilerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılan segmentler, ya radyoaktif atomlarla yada biotinle işaretlenerek DNA probları olarak hazırlanmışlardır.

Problardaki DNA segmentleri, sentetik olarak ta üretilmektedir. Bu ürünlere deoksiligonükleotidler denmektedir. Bunlar, normalin yaklaşık 100 katı ağırlığındadır ve benzer şekilde işaretlenerek DNA probu olarak kullanılırlar (2).

DNA probuna ait olan segmentler, hibridizasyon sonrası, işaretlenme şekline göre; ya otoradyografi ile sayılarak yada kromojenle boyanarak görünür hale getirilirler (Resim 4). Sonuç olarak, nitrosellüler kağıt üzerinde, çeşitli tonlarda ve genişlikte bantlar ortaya çıkar. Bu bantlar aranan segmentin toplandığı yerlerdir. Söz konusu olan segmentler, içerisinde bulunduğu DNA fragmantının molekül ağırlığına göre, değişik bölgelerde toplanmışlardır.



1. İşaretlenmiş Prob ve Hedef DNA

2. Denatürasyon

3. Hibridizasyon

Resim 4 : Hibridizasyon

Bantların tonunun koyuluğu veya açıklığı, toplanan materyaldeki DNA miktarına bağlıdır. Minisatelit bölgelerinin, DNA molekülündeki lokalizasyonları, kişiden kişiye değiştiği için, sonuçta oluşan bantların genişliği ve aralıkları kişiden kişiye farklı olmaktadır. Bu nedenle; bantların oluşturduğu kalıp, kişinin DNA parmak izini oluşturmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi, bu kalıbın; tek yumurta ikizleri dışında, iki ayrı kişide aynı olma osallığı, yaklaşık olarak 1/30 milyardır.

Tekniğin basamakları şu şekilde özetlenebilir:

- A- Örneğin toplanması ve analiz için hazırlanması.
I- Hücrelerin hazırlanması

- a. Periferik kan lökositlerinin elde edilmesi
 - b. Doku kültüründen hücrelerin elde edilmesi
 - c. Diğer dokulardan (kan lekesi, sperm, deri parçası) hücrelerin elde edilmesi
- II. DNA'nın izolasyonu (ekstraksiyon)
- a. Salting-out prosedürü
 - b. Fenol ekstraksiyonu protokolü
- III. İzole edilen DNA'nın kalitesinin kontrolü
- a. DNA konsantrasyonunun spektrofotometre ile ölçümü
 - b. RNA'nın ayrılması

B- Restriksiyon enzimlerinin uygulanması

I. Kontrol sindirimi

- a. Genomik DNA volümünün hesaplanması
- b. Restriksiyon enzimlerinin volümlerinin hesaplanması
- c. Plasmid DNA volümünün hesaplanması
- d. Total sindirim volümünün hesaplanması
- e. Su volümünün hesaplanması
- f. Hesaplanan volümlerin karıştırılması (Sindirim için 37 C'de, 5 saat ile 1 gece arasında bekletilir)

II. Southern-Blot analizi için sindirim (Kontrol sindirimindeki işlemler tekrarlanır)

C- Agaroz-jel elektroforez

D- Southern transfer

E- Hibridizasyon

F- Renk oluşturulması veya otoradyografik sayım

Southern-Blot tekniği ile, uygulama; örneklerin toplanmasından, sonuçların alınmasına kadar yaklaşık iki haftalık bir süreyi gerektirmektedir. buna rağmen sonuçlar güven vericidir. Şu ana kadar yapılan uygulamalar, "DNA fingerprint" in kişiye özgü, güvenilir bir marker olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Tekniğin ilk kullanımı, 1986 yılı sonlarında, Orlando'da bir dizi ırza geçme olayının sorumlusunu bulabilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. İngiltere'de 8 adli olayın çözümünde bu yöntem kullanılmış ve güvenilir bir marker olduğu kabul edilmiştir. Ünlü kriminolog Baird, "DNA fingerprint" in, aynen parmak izinin ilk çıkışında olduğu gibi, devrim yaratacak bir olay olduğunu öne sürmektedir.

DNA fingerprint sayesinde şu söylenebilir: "Bir kişinin suç yerinde DNA sını bırakması, adını soyadını bırakmasıyla aynı şeydir."

KAYNAKLAR

1. Biotest, B.E.S.T., MZ. 1.3. Catalog, Biotest Diagnostics.
2. Lowe JB. Clinical applications of gene probes in human genetic disease, malignancy and infectious disease. Clinica Chimica Acta. 1986; 157: 1-32.
3. Merz B. DNA fingerprints come to court. Jama. 1988; 259; 15: 2193-2194.
4. Gill P, Jeffreys AJ. and Werrett DJ. Forensic application of DNA "fingerprints". Nature, 1985; 318: 577-579.
5. Jeffreys AJ. Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. Biochemical Society Transactions, 1987; 15: 309-317.
6. Jeffreys AJ. Wilson V. and Thein SL. Individual specific "fingerprints" of human DNA. Nature, 1985; 316: 75-79.
7. Gill P. Lygo JE. Fowler SJ. Werrett DW. An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes. Electrophoresis, 1987; 8: 38-44.
8. Gill P. Lygo JE. Fowler SJ. Werrett DJ. An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes. Electrophoresis. 1987; 8: 38-44.