TIRNAK ALTI MATERYALİNDEN ELDE EDİLEN DNA DELİLLERİNİN TOPLANMASI VE ANALİZİ ÜZERİNE BİR KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASI

A COMPARATIVE STUDY ON THE COLLECTION AND ANALYSIS OF DNA EVIDENCE OBTAINED FROM UNDER THE NAIL MATERIAL

Elif YÜKSEL

Yüksek Lisans Öğrencisi,Yıldız Teknik Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü,Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,

ORCID: 0000-0002-4517-6988

Doç.Dr.Tülin ARASOĞLU

Doç.Dr.,Yıldız Teknik Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü,Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,

ORCID:0000-0001-6858-7045

DoçDr.Beytullah KARADAYI

Doç.Dr.,İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Adli Tıp Ana Bilim Dalı,

ORCID: 0000-0002-1728-0550

ÖZET

Adli DNA örnekleri çoğunlukla DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerindeki tekrarlayan DNA dizileri kullanılarak analiz edilir. Short Tandem Repeats (STR) 2-6 baz uzunluğunda tekrarlayan polimorfik DNA dizileridir. Genellikle adli örnekler ileri düzeyde parçalanmış, moleküler yapısı bozulmuş ve DNA içeriği 100 nanogramdan az olan biyolojik materyaller oldukları için birçok yöntem (VNTR, RFLP gibi) sonuçsuz kalırken STR lokusları ile güvenilir sonuçlar alınabilmektedir.Cinayet, cinsel istismar ve intihar gibi birçok adli vakanın aydınlatılmasında kullanılan biyolojik delillerden biri, tırnak altı materyalleridir. Elde edilen tırnak altı materyallerinden DNA analizi ile suçlunun kimliği belirlenmeye çalışılır.Fakat toplanan bu örnekler hem kadın hem de erkek DNA'sını içerdiği için STR analizi sonuçlarının yorumlanması güçleşmekte ve bu aşamada örnek toplama şekli önem kazanmaktadır. Şu ana kadar tırnak altı materyallerinin toplanmasından analizine giden süreçte henüz 'en iyi' ya da 'ideal' diye ifade edilebilecek prosedürler ortaya konulamamış ve belli bir standart oluşturulamamıştır.

Bu projede 3 farklı tırnak altı materyali toplama yöntemi karşılaştırılıp en verimli örnek toplama prosedürü belirlenerek adli vakalarda faili bulmaya yönelik rutin çalışmalara katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda 12 gönüllü çift üzerinde deneysel bir senaryo kurgulandı. Kadınlardan partnerlerinin sırtlarını 30 saniye boyunca kaşıması istendi. Ardından kadınlardan 3 farklı yöntemle tırnak altı materyali toplandı. Birinci yöntemde tırnak altı materyali nemli bir svap ile, ikinci yöntemde kürdana sarılmış pamuktan yapılmış daha ince bir svap ile ve üçüncü yöntemde ise tırnak altı materyali tırnak kesilerek toplandı. Referans örnek olarak erkeklerden bukkal svap ile örnek toplandı.Örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA miktar tayininin ardından örnekler amflifiye edildi. Amplifikasyon ürünleri, kapiller elektroforeze tabi tutuldu.Veriler, ABI PRISM1 GeneMapper1 ID yazılımı kullanılarak analiz edildi.

STR analiz sonuçları incelendiğinde; tırnak kırpıntılarından elde edilen STR profillerinin bazı lokuslarında kadına ait allel piklerinin erkeğe ait allel piklerini gölgelediği gözlendi.Tırnak

altından alınan materyalin STR profili çıkarılması ve raporlanmasında en güvenilir sonuçların kürdana sarılmış pamuktan yapılan ince uçlu svap yöntemiyle elde edildiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Adli bilimler, tırnak altı materyali, DNA, STR analizi

ABSTRACT

Forensic DNA samples are mostly analyzed using repetitive DNA sequences in non-coding regions of DNA. Short Tandem Repeats (STR) are polymorphic DNA sequences that are repeating 2-6 bases in length.Generally, forensic samples are highly fragmented, molecular structure degraded and DNA content is less than 100 nanograms (ng), so many methods (such as VNTR, RFLP) remain ineffective, while STR loci can yield reliable results. Fingernail samples are one of the biological evidences used in elucidating many forensic cases such as murder, sexual abuse and suicide. The identity of the criminal is tried to be determined by DNA analysis from the under the nail material obtained. However, since these collected samples contain both female and male DNA, the interpretation of the STR analysis results becomes difficult and the way of sample collection becomes important at this stage. Until now, the procedures that can be expressed as 'best' or 'ideal' in the process from collection to analysis of under-nail materials have not been revealed and a certain standard has not been established.

In this project, it is aimed to contribute to the routine studies to find the perpetrator in forensic cases by comparing 3 different procedures for collecting nail material and determining the most efficient sample collection procedure.For this purpose, an experimental scenario was designed on 12 volunteer couples.The women were asked to scratch back of their partners for 30 seconds. Then, nail material was collected from women using 3 different methods.In the first method, the under-nail material was collected with a moist swab, in the second method a thinner swab made of cotton wrapped in a toothpick,and in the third method, the undernail material was collected by cutting the nail.As a reference sample, samples were also collected from men by buccal svap.DNA isolation was performed from the samples.After DNA quantification, samples were amplified.Amplification products were subjected to capillary electrophoresis. Data were analyzed using ABI PRISM1 GeneMapper1 ID software.

According to STR analysis results; in some loci of the STR profiles obtained from nail clippings, the female allele peaks were observed to shade the male allelic peaks. It was concluded that the most reliable results in STR profiling and reporting of material taken from under the nail were obtained with the fine-tipped swab method made of toothpick wrapped in a cotton.

Keywords: Forensic science,fingernail evidence, DNA,STR analysis

GİRİŞ

Adli genetik, DNA analizleri ile nesep davaları, toplu felaketler, suçlunun kimliklendirilmesi ve miras gibi davalarda adalet sistemine yardım etmeyi amaçlayan bir bilim dalıdır.[1] Adli olguların aydınlatılmasında DNA teknolojilerinin kullanılması önemli olup sürekli olarak geliştirilmektedir.[2] Suçun aydınlatılması, sebep sonuç ilişkisinin kurularak suçlunun bulunması amacı ile olay yerinin tespit edilmesine, olay yerinin bilimsel teknik ve metotlar ile incelenmesine, olay yerinde bulunan iz ve bulguların toplanıp incelenmesi için ilgili birimlere ulaştırılmasını da kapsayan faaliyetlerin hepsine olay yeri incelemesi denir.[3] İşlenen bir suçun açıklığa kavuşturulmasına ve suç sanıklarının tespitine yarayan hukuka uygun olarak elde edilmiş her türlü ispat vasıtasına delil denir.[4] Canlıların vücudundan kopan, düşen veya akan her türlü delile biyolojik delil denir. Biyolojik deliller kan, semen, diş, tırnak, ter, deri, saç,

kemik, idrar ve gaita şeklinde sıralanabilir.[5] Biyolojik delillerin incelemesinde temel amaç, canlıların genetik materyali olan deoksiribonükleik aside (DNA) ulaşmaktır. Adli DNA örnekleri çoğunlukla DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerindeki tekrarlayan DNA dizileri kullanılarak analiz edilir.[1]

Short Tandem Repeats (STR) yani kısa ardışık tekrar dizileri 2-6 baz uzunluğunda tekrarlayan polimorfik DNA dizileridir.[6] Genellikle adli örnekler ileri düzeyde parçalanmış, moleküler yapısı bozulmuş ve DNA içeriği 100 nanogramdan (ng'dan) az olan biyolojik materyaller oldukları için birçok yöntem (VNTR, RFLP gibi) sonuçsuz kalırken STR lokusları ile güvenilir sonuçlar alınabilmektedir.[7] Günümüzde STR lokuslarının PCR tekniği ile çoğaltılmasına dayanan adli DNA analizleri kullanılmaktadır. Kullanılan polimorfik STR lokusları ticari markalar altında kit şeklinde temin edilebilmektedir.[8]

STR analizi, bireyler arasında STR lokuslarının tekrar sayısının varyasyonuna dayanır. İnsan genomunda her STR lokusuna ait iki alel mevcuttur. Bunlardan biri anneden, diğeri babadan gelir.

Cinayet, cinsel istismar ve intihar gibi birçok adli vakanın aydınlatılmasına yardımcı olan biyolojik delillerden biri, tırnak altı materyalleridir. Elde edilen tırnak altı materyallerinden DNA analizi ile suçlunun kimliği belirlenmeye çalışılır. Fakat tırnak altı materyallerinin toplanmasından analizine giden süreçte henüz 'en iyi' ya da 'ideal' diye ifade edilebilecek prosedürler ortaya konulamamış ve bir standart oluşturulamamıştır.[9]

Bu projede bu probleme katkı sağlamak amacıyla 12 gönüllü çift üzerinde deneysel bir senaryo kurgulanmıştır. Erkeklerden referans örnek olması adına bukkal svap ile, kadınlardan 3 farklı tırnak altı materyali toplama prosedürüyle örnekler toplanarak 3 farklı tırnak altı materyali toplama yöntemi karşılaştırılıp en verimli örnek toplama prosedürü belirlenerek adli vakalarda faili bulmaya yönelik rutin çalışmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL-METOT

Kadınlardan üç farklı tırnak altı materyali toplama prosedürü olarak bir tırnağın kesilmesi, bir tırnaktan hali hazırda rutinde kulanılan svap ile örnek alınması, diğer tırnaktan rutinde kullanılan svaptan daha ince uçlu bir svapla örnek alınması planladı. Fakat piyasada istenilen incelikte svap bulunamadı. Kürdan ve pamuktan belli standart ölçülerde svaplar oluşturuldu.

Kürdan ve Pamuktan Svap Yapımı

-Kürdanların ucuna bir miktar pamuk sarılarak aynı ölçülerde yaklaşık 40 adet svap elde edildi. Svaplar bir cam behere koyuldu.
-Elde edilen svaplar 160 °C 'lik etüvde 2 saat sterile edildi.
-Daha sonra kürdanlardan 2 tanesi ile 2 NA besiyerine, 2 tanesi ile 2 SDA besiyerine ekim yapıldı.
-NA petrileri 37 °C derecelik etüvde, SDA petrileri ise kenarlarına parafilm çekilerek oda sıcaklığında kültüre bırakıldı.
-İçerisinde svapların olduğu cam beherin ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldı.



Şekil 1. Kürdanlardan Yapılmış Svaplar

3-4 gün sonunda petrilerde herhangi bir üreme gözlenmedi.



Şekil 2. Kürdanlardan yapılmış svapların sterilizasyon kontrolü için yapılan kültürlerde üreme gözlenmedi.

Örneklerin Toplanması

Çiftlerin kadınlarından 30 sn boyunca eşlerinin ense altındaki sırt bölgesini baş parmak ve serçe parmak harici üç parmak ile eşit basınç uygulayarak kızarana dek kaşıması istendi. Bu işlemden sonra aynı eldeki tırnaklara üç farklı toplama prosedürü uygulandı:

- Tırnak kesilerek bir tüpe konuldu (1.Tırnak)
- Tırnak altından rutin işlemler için kullanılan svap (nemli) ile sürüntü alınıp tüpe konuldu (2.Tırnak)
- Kürdan ve pamuktan elde edilmiş ince uçlu svap ile sürüntü alınıp tüpe konuldu (3.Tırnak)

Örneklerden DNA İzolasyonu
Toplanan örneklerin DNA izolasyonu QIAamp® DNA İnvestigator Kit (QIAGEN) protokolüne göre gerçekleştirildi.[11]

DNA Miktar Tayini
DNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin miktar tayini Qubit florometre ile yapıldı.

DNA Örneklerinin Amplifikasyonu

Çalışmaya 15 otozomal STR markerı (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51,D5S818 and FGA) ve Amelogenin dahil edilmiştir.[10]

STR genetik lokusları 96 oyuklu bir GeneAmp1 PCR Sistemi 9700 (Applied Biosystems) üzerinde 28 döngü boyunca AmpFISTR Identifiler Plus PCR Amplifikasyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak 1ng DNA kullanılarak amplifiye edilmiştir.

Tablo 1. Amplifikasyon Döngü Parametreleri.

Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Son Uzama
95°C 20 Dakika	95°C 1 Dakika	63°C 90 Saniye	70°C 2 Dakika	70°C 20 Dakika

STR Analizi

Amplifikasyon ürünleri, bir ABI PRISM1 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) üzerinde kılcal elektroforeze tabi tutuldu. Bir MicroAmpTM Optik 96 Kuyu Reaksiyon Plakasının her bir oyuğuna;

- ✓ 8,7 µl Hi-Di Formamid ve 0,3 µl GeneScan™-500LIZ™ (internal size standart)
- ✓ 1 µL PCR ürünü eklendi.

Not: Boş kuyucuklar için 10 µL Hi-DiTM Formamide eklendi.[10]

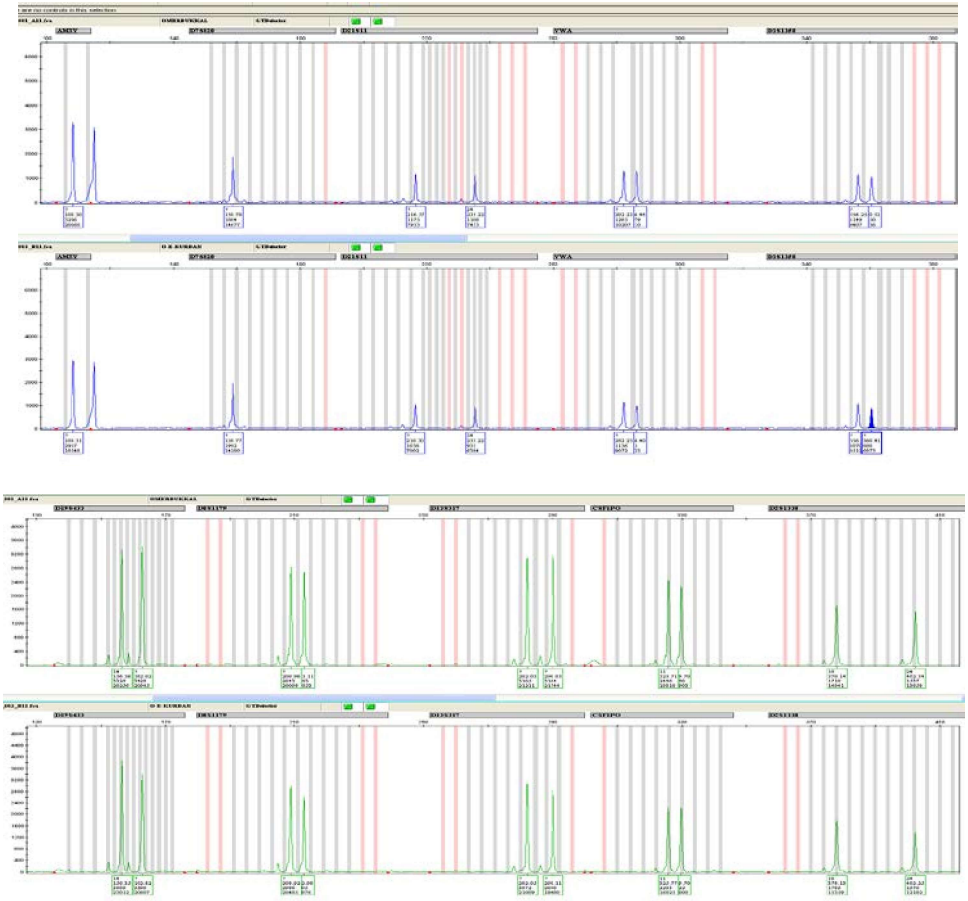
Veriler, ABI PRISM1 GeneMapper1 ID yazılımı v.3.2 (Applied Biosystems) kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Toplanan örneklerden elde edilen DNA miktar tayini sonuçlarına göre ortalama olarak en yüksek DNA miktarı 7,4 nanogram ile tırnak kırpıntısından elde edilirken, en düşük DNA miktarı 1,7 nanogram ile rutin adli tıp pratik uygulamalarında kullanılan svap yöntemiyle elde edilmiştir. Pamuğa sarılmış kürdandan ise ortalama olarak 5,22 nanogram DNA elde edilmiştir. Fakat bu noktada asıl önemli olan elde edilen kadın ve erkeğe ait toplam DNA miktarından ziyade STR profil analizi için erkeğe ait materyalin daha fazla elde edilmesidir.

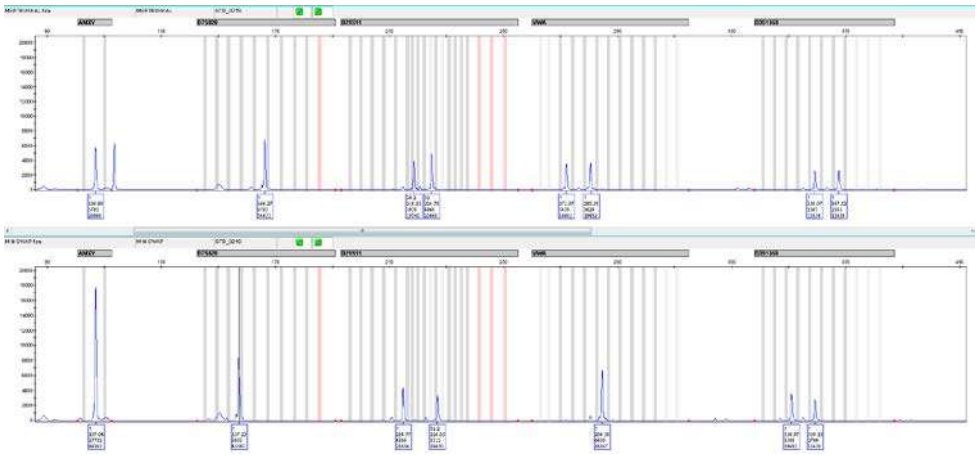
Her çift için referans örnek olması adına erkekten alınan materyallerle üç farklı tırnak altı toplama prosedürünün STR profilleri analiz edilmiştir.

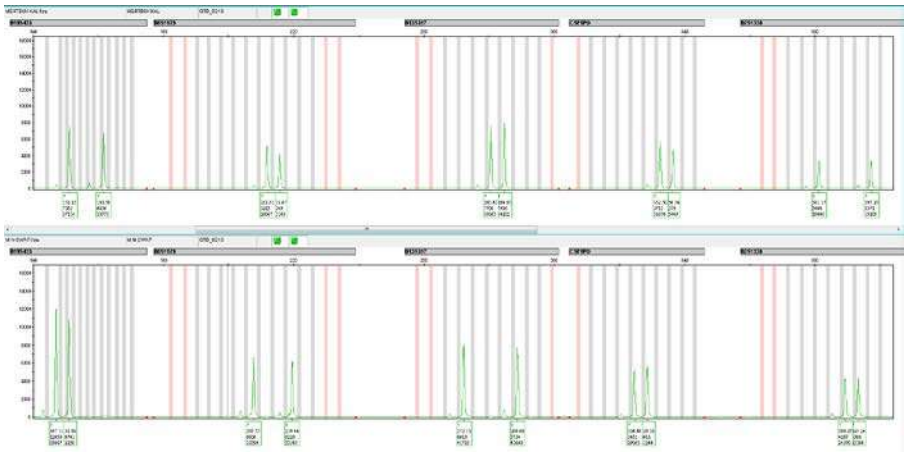
Aşağıda üç farklı örnek toplama prosedürüne ait üç ayrı şekil ile bazı çiftlerin referans örnekler ile karşılaştırmalı olarak DNA STR profil analizleri karşılaştırmalı olarak verildi. Sonuçlar tüm analizler dikkate alınarak kıyaslandı ve yorumlandı.



Şekil 3. Çift 1 için bukkal svaptan elde edilen DNA örneğinin STR profili ile kürdan svaptan elde edilen DNA örneğinin STR profilinin karşılaştırılması

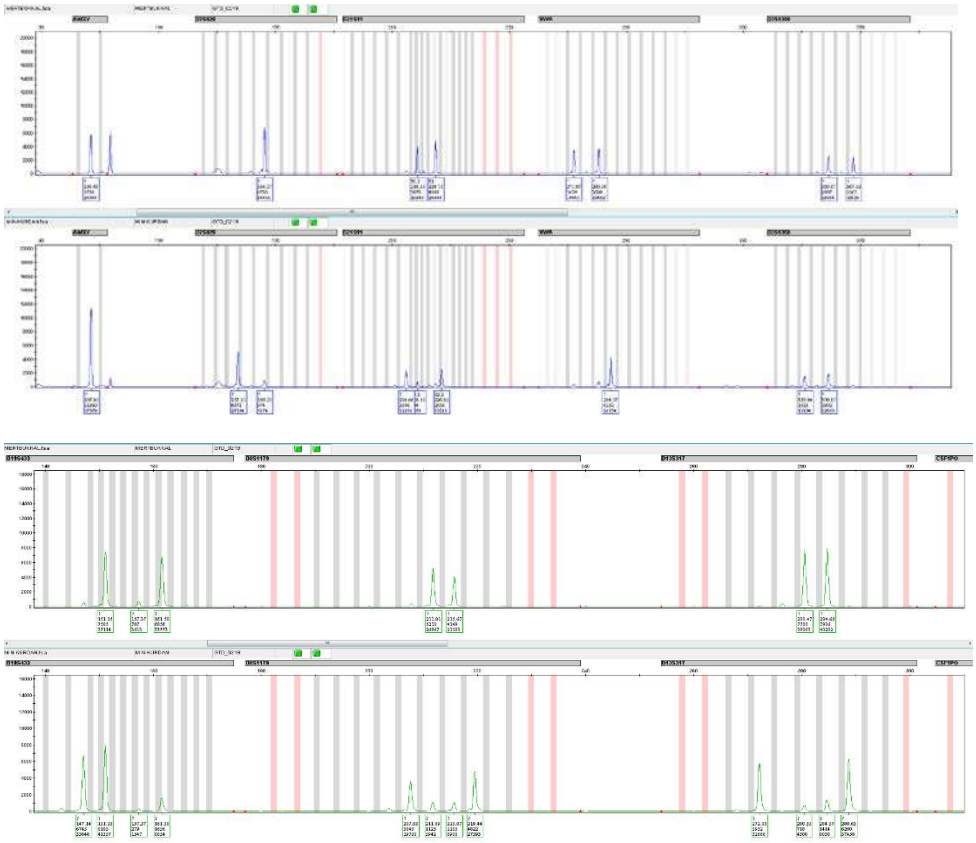
Çift 1 için yapılan STR analizlerine göre tırnak altından alınan materyalin referans örnek olması adına erkekten alınan örnek ile birebir uyuştuğu görülmüştür. Çift 1 için svap yöntemiyle yeterli DNA miktarı elde edilemediğinden STR profili analiz edilememiştir.





Şekil 4. Çift 2 için bukkal svaptan elde edilen DNA örneğinin STR profili ile svaptan elde edilen DNA örneğinin STR profili karşılaştırması

Çift 2 için yapılan STR analizlerine göre svap ile tırnak altından alınan materyalin referans örnek olması adına erkekten alınan örnek ile uyuşmadığı görülmektedir. Svaptan elde edilen STR profili hem erkeğe hem de kadına ait pikler içeren miks bir profildir. Lakin erkeğe ait pikleri her lokusta göremekteyiz. Bu durum svaptan elde edilen erkeğe ait DNA'nın az miktarda olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 5. Çift 2 için bukkal svaptan elde edilen DNA örneğinin STR profili ile kürdandan elde edilen DNA örneğinin STR profilinin karşılaştırılması

Çift 2 için yapılan STR analizlerine göre tırnak altından kürdan ile alınan materyalin referans örnek olması adına erkekten alınan örnek ile uyuştuğu görülmektedir. Lakin STR profilinde miks bir profil görülmektedir. Kadına ait allel piklerinin yüksekliği erkeğe ait allel piklerinin

yüksekliğinden fazladır. Bu durum alınan materyalde erkeğe ait DNA miktarının az miktarda olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu şekilde çalışmaya dahil edilen tüm çiftlerin STR profilleri analiz edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tırnak altı DNA materyali uzun yıllardan beri adli vakalarda önemli bir delil olarak görülmekte ve çalışılmaktadır. Cinayet ve tecavüz olgularında maktulün ölmeden önce en son kimle temas ettiğinin tespit edilebilmesi için tırnak örnekleri veya tırnak altından alınan sürüntü örnekleri (svaplar) çok önemli rol oynamaktadır. Tırnak altı materyallerinin toplanmasından analizine giden süreçte henüz 'en iyi' ya da 'ideal' diye ifade edilebilecek prosedürler ortaya konulamamış ve bir standart oluşturulamamıştır.

Bu çalışmada üç farklı tırnak altı materyali toplama prosedürü belirlenerek, STR analizi ile bu yöntemlerin referans örnek olması adına erkekten alınan örnekle uyuşması noktasında en verimli yönteme karar verilmiştir. DNA miktar tayinine göre ortalama olarak en yüksek DNA miktarı tırnak kırpıntılarından elde edilirken, STR profilleri analiz edildiğinde tırnak kırpıntılarından elde edilen STR profillerinin bazı lokuslarında kadına ait allel piklerinin erkeğe ait allel piklerini gölgelediği gözlendi.Svaptan elde edilen DNA örneklerinden birden fazla çift için STR profili elde edilememişken, bazı STR profillerinde ise kadının DNA'sı ile karışmış profiller elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre tırnak altından alınan materyalin STR profili çıkarılması ve raporlanmasında en güvenilir sonuçların kürdana sarılmış pamuktan yapılan ince uçlu svap yöntemiyle elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKÇA

1. Budowle B., Bieber F.R., Eisenberg A.J. (2005). Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. Leg. Med., 7(4): 230–243.
2. Børsting C, Fordyce SL, Olofsson J, Mogensen HS, Morling N. Evaluation of the Ion Torrent™ HID SNP 169-plex: A SNP typing assay developed for human identification by second generation sequencing. Forensic Sci Int Genet 2014;12:144-54.Dellamonica P., Cefuroxime axetil, International J Antimicrobial Agents, 1994; 4:1:23-36.
3. Adli dna analizleri kitabı
4. Kalemoğlu M. Acil Serviste hekim sorumluluğu. Türkiye Klinikleri J Med Sc 2005, 25: 824-8.
5. James SH. (2005) Principles of Bloodstain Pattern Analysis, p: 1, 295 CRC Press, New York.
6. Brinkmann, B. (1992). The use of STR_s in stain analysis. In: Prooceedings from the Third International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, USA. 132: 357-73.
7. Alford, R.L, Hammond, H.A, Coto, I., Caskey, C.T. (1994). Rapid and efficient resolution of parantage by amplification of short tandem repeats. Am. J. Hum. Genet. 55: 190-195.
8. Budowle B., van Daal A. (2008) Forensically relevant SNP classes. Biotechniques, 44(5) 603610.
9. DOĞAN, M., ERCAN, Ö. B., & TÜFEK, G. F. (2020). Tırnak Altı DNA Materyalinin Adli Genetik Açısından Önemi ve Farklı Çalışma Metotlarının Karşılaştırılması. Turkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med, 17(2), 162-6.

10. Applied Biosystems AmpFISTR Identifiler Direct User Guide, 2012
11. QIAamp® DNA Investigator Handbook, January 2020