

Olay Yerinden Biyolojik Örnek Toplanması **Adli Genetik**

Prof Dr N Lale Şatıroğlu-Tufan

Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Adli Tıp AD Adli Genetik Laboratuvarı

Adli Tıp ve Genetik

- 1900 Karl Landsteiner, ABO Kan grupları tanımladı.
- 1915 Leone Lattes, ABO Kan grupları ile babalık tayini-kitap
- 1931 Absorbsiyon –İnhibisyon ABO tiplene –adli lab rutin
- Serolojik testler
 - Kan grubu belirteçleri, serum proteinleri vs
- 1968 DNA üzerindeki polimorfik bölgeler – Southern Blot
- 1983 Karry Mullis Polimeraz Zincir Reaksiyonu keşfetti.
- 1984 Alec Jeffreys DNA üzerindeki (VNTR) polimorfik bölgelerin analizi enzim kesimi yapıldı ve
“DNA parmak izi” terimi kullanıldı.

Biyolojik Delil-DNA

- saldırı ve cinayetlerin aydınlatılmasında,
- babalık tayininde,
- akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında,
- kimliklendirmede,

tek güvenilir yöntemdir.

Adli Genetik

Biyolojik Materyal-Biyolojik Delil

- Olay yerinden toplanabilir

veya

- Referans biyolojik örnekler:
 - Mağdur
 - Sanık

DNA analizi yapmak için

Olay yerinden alınan biyolojik örneğin kaynağı bilinmeyebilir ancak olay ile ilgisi olabilecek kişi ya da kişilerle mutlaka karşılaştırılmalıdır.

- Bu örneklerden DNA izole edilir.
- DNA üzerindeki belirli bazı bölgeler (mümkün olduğu kadar çok sayıdaki bölge) polimeraz zincir reaksiyonu ile milyon kopya olacak şekilde çoğaltıldıktan sonra analiz yapılabilir.

DNA analizi yapılacak örnekler “çekirdekli hücreler” içermelidir.

- - Kan ve kan lekeleri,
- - Meni ve meni lekeleri,
- - Dokular ve hücreler,
- - Kemikler ve organlar,
- - Kılıf hücreli saç kılları,
- - İdrar, tükürük ve tükürük lekeleri (epitel hücreleri-çekirdek hücreli olan) gibi biyolojik örneklerden

DNA izolasyonu yapılarak analiz gerçekleştirilebilir.

Biyolojik Delillerin

- Belgelenmesi
- Toplanması
- Korunması
- Paketlenmesinde

genel kurallar vardır.

Olay yerinden elde edilen biyolojik deliller üzerinde başarılı bir DNA analizi yapılması,

- hangi çeşit örneklerin toplandığına ve
- onların nasıl korunduğuna bağlıdır.

- Biyolojik delillerin toplama ve belgelemede kullanılan
- teknikler,
 - toplanan delilin tipi ve miktarı,
 - delili kontrol altında tutma ve paketleme şekli ve
 - delilin nasıl korunması gerektiği,

adli DNA test programı için kritik noktalardır.

- DNA delili toplanmadan önce uygun bir şekilde belge ile kanıtlanamazsa, kaynağından kuşku duyulabilir.
- DNA delili uygun bir şekilde paketlenmezse çapraz bulaş oluşabilir.
- DNA delili uygun şekilde korunmazsa delil bozulabilir ya da özelliğini kaybedebilir.

Delilin belgelenmesi

- Delilin orijinal kořulları ve pozisyonu belgelenmeden önce hiçbir Őeyin yeri deęiřtirilmemelidir.
- Delile dokunmadan, hareket ettirmeden ya da toplamadan önce, fotoğraflanmalı ya da video kasete alınmalıdır. Delilin yeri ve pozisyonu not edilmelidir.
- Delilin, olay yeri ve mevcut diğer nesnelere olan iliřkileri not edilmeli ve krokisi çizilmelidir.

Delilin toplanması

- DNA teknikleri oldukça hassas olduğundan bulaş gerçek bir sorundur. Açıkça görülebilen lekelerin zor görünen farklı lekelerle bir araya getirilmesinden kaçınılmalıdır.
- Her delilde ayrı eldiven kullanılmalıdır. Eldivenler her zaman giyilmeli ve sık sık değiştirilmelidir.
- Fiziksel temasta bulaş, uygun pens kullanılarak ve eldiven giyilerek engellenebilir.

Deliller toplanırken

- mutlaka maske takılmalıdır.
- aksırıp öksürmemelidir.
- eli ağza, burna götürmemeli, sıvı bir içecek ya da sigara içilmemelidir.
- nereden ve kimden alındığının kaydı tutulmalıdır ve ayrı ayrı toplanmalıdır.
- Mağdur ve sanığa ait örneklerin her seferinde birbiri ile teması önlenmelidir.
- Kişiyeye kan nakli yapılmış ise laboratuvar bilgilendirilmeli ve nakledilen kanın özellikleri temin edilmelidir.

Deliller toplanırken

- Her türlü delil için karşılaştırma örneği olarak sanık ya da mağdurdan kan, kılıflı saç örneği ya da yanak içi sürüntü alınıp laboratuvara gönderilmelidir.
- Makas, pens ve bıçak ağızı gibi kullanılan aletler, her zaman her bir örnek alındıktan sonra %5'lik H₂O₂ (ya da alkol) ile tamamen temizlenmelidir.

Delilin korunması

- DNA analizi için alınan numuneler +4 °C de saklanmalı ve mümkün olduğunca çabuk laboratuvara gönderilmelidir.
- Donmuş örnekler de uygundur, ama bunlar donmuş seviyede tutulmalıdır.
- Olay yeri örnekleri gibi DNA kimliği elde edilebilecek diğer örneklerde de, küf ve bakterilerin gelişmesine neden olan, DNA'ya zarar veren nemli ve sıcak koşullarda saklanmamalıdır.

Delilin korunması

- İdeal olarak, örnekler ayrı ayrı paketlenmeli ve laboratuvara gönderilmeden önce dondurulmalı ya da buzdolabında saklanmalıdır.
- Nemli örnekler kurutulmalı ve öyle saklanmalıdır. Kuru ve soğuk ortamlar en uygundur, nemli ve sıcak ortamlardan kaçınılmalıdır.

Delilin paketlenmesi

- Deliller ıslak paketlenmemelidir. Islak örnekler oda sıcaklığında kurutulmalıdır.
- Plastik torbalar nemli parçaların kurummasını engellediğinden, küf ve bakterilerin üremesine ve kokuşmaya elverişli bir ortam oluşturmalarından kullanılmamalıdır. Bunların yerine kağıt torbalar tercih edilmeli ve kağıt torbalar bez torbaların içine konmalıdır.
- Böylece hem örnekler uygun şartlarda korunur hem de mühürlenmek suretiyle laboratuvara ulaşma aşamasında delillerin değiştirilmesi engellenebilir.

Delilin paketlenmesi

- Ambalajları kapatmak için tel zımba ya da toplu iğne kullanılmamalıdır.
- Sıvı kan, vücut sıvıları ve diğer bulaşıcı sıvılar ya da kontamine olmuş keskin uçlu maddeler (iğneler, bıçaklar) içeren numuneler, sızıntı geçirmez, kırılmaz, delinmeye dayanıklı, koruyuculara konmalıdır

Biyolojik Örneklerin Laboratuvara Gönderilme Usulleri

- Olay yerinden toplanan kan, meni gibi leke örnekleri temiz bir ortamda doğal seyri ile havada kurutularak ayrı ayrı ambalajlanıp, etiketlenerek gönderilmelidir.
- Etiket üzerine tarih, zaman, şahsın ismi, yeri, toplayıcının ismi, olay numarası ve gösterim numarası yazılmalıdır.

- Mahkeme ve savcılıklar tarafından nesep tayini için gönderilen şahısların DNA test çalışmalarına başlayabilmek ve ilgili şahısların kimlik tespitinin yapılabilmesi için sol kollarının mühürlü olarak, nüfus cüzdanları ve mahkemeler ile savcılıklardan onaylı ikişer adet fotoğraflarıyla müracaat etmeleri gerekmektedir.

Nesep tayini için;

- ilgililerin kan örnekleri en az 5 ml olacak şekilde kapaklı EDTA'lı tüplere alınmalı, tüpler pıhtılaşmayı önlemek amacıyla karıştırılmalıdır.

- Ölen bir kişinin kimlik tespiti isteniyorsa, kan ya da kan lekesi soğuk hava zincirine uyularak,
- embriyo, fötüs, yeni doğmuş bebek, otopside alınan dokular ise steril petri içinde ve herhangi bir koruyucu madde konulmaksızın,

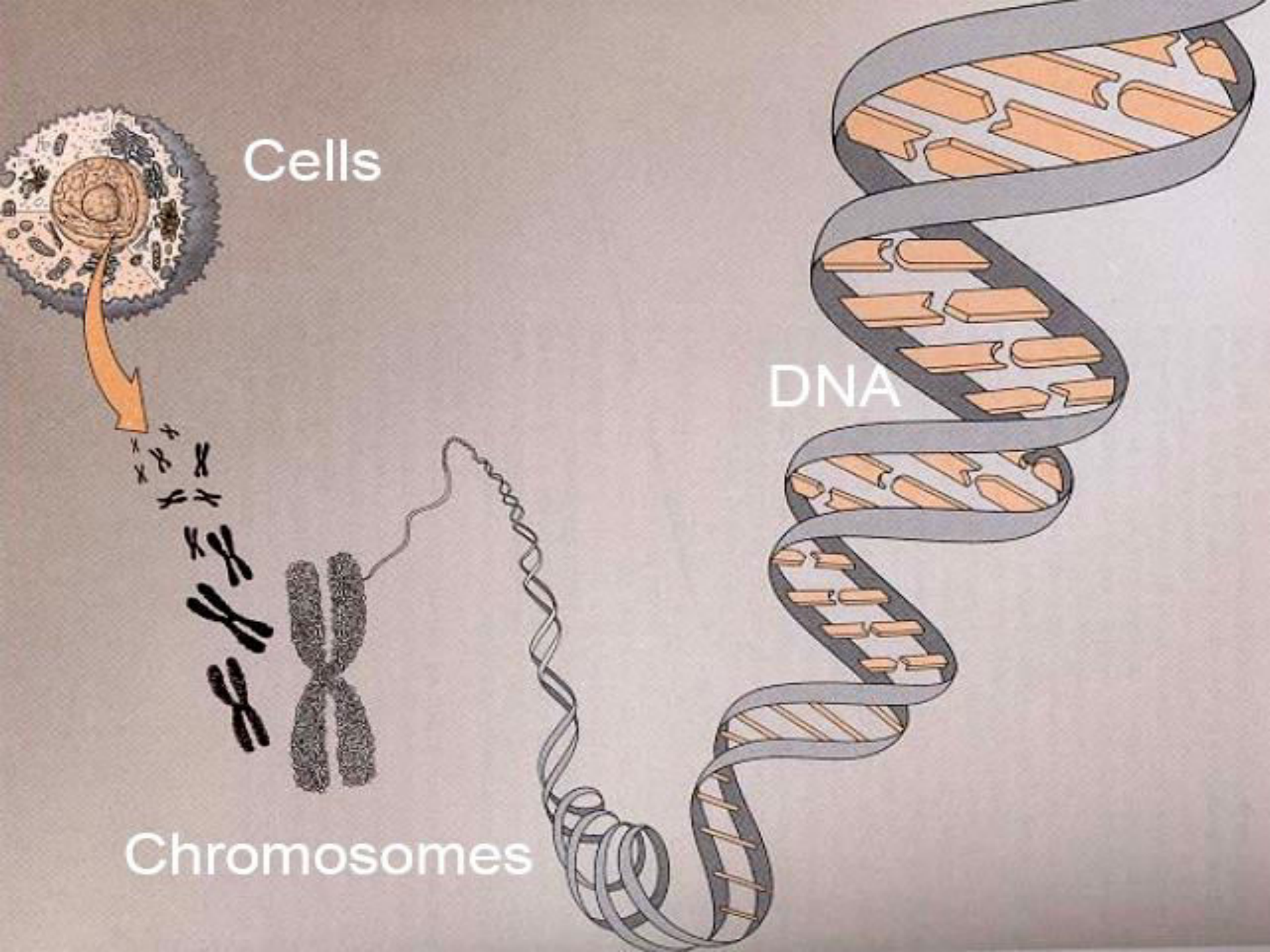
en kısa zamanda ve soğuk hava zincirine uyularak gönderilmelidir.

Adli DNA Laboratuvarı

- DNA delillerini toplayanlar ile bu materyalleri çalışanların çok özel eğitimlerden geçmesi şarttır.
- Laboratuvarın kalite güvencesi ancak akreditasyon ve dış kalite kontrolü ile sağlanabilir.
- Çalışan personelin bağımsız bir organ tarafından yeterlilik belgesi ile güvenilir kılınması gereklidir.
- Türkiyede kriminal laboratuvarlar akredite değildir, çalışanların güvenilirliğini belgeleyen sertifikaları yoktur ve bağımsız organlar tarafından yürütülen dış kalite kontrol programları uygulanmamaktadır.

Adli DNA Laboratuvarı

- Numune laboratuvara geldikten sonra tutanakla açılarak gerekli incelemesi yapılmak üzere DNA izolasyon odasına alınır.



DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT

DNA, genetik temeli nasıl oluşturur?
“Double Helix” (Watson)

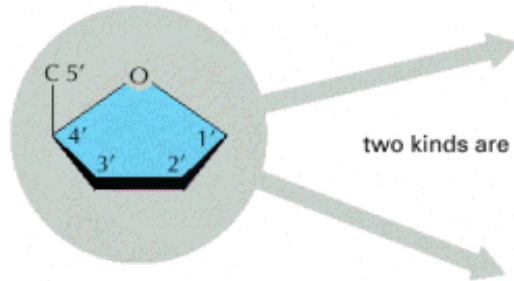
WATSON-CRICK MODELİ

1. Merkez ekseninde, sağ-el ikili sarmal yapısı
2. İki zincir, antiparalel (C-5' – C-3')
3. Bazlar eksene diktir, ardışık dizilirler (0.34 nm)
4. Azotlu bazlar-hidrojen bağları (A=T, G ≡C)
5. Her dönüşte 10 bp (10.4) var ve 3.4 nm kadardır
6. Büyük (major) ve küçük (minör) oluklar
7. Sarmalın çapı, 2 nm

SUGARS

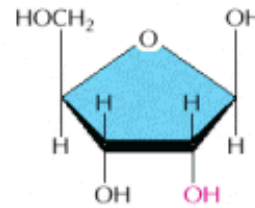
PENTOSE

a five-carbon sugar

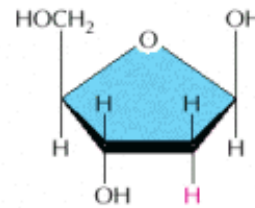


two kinds are used

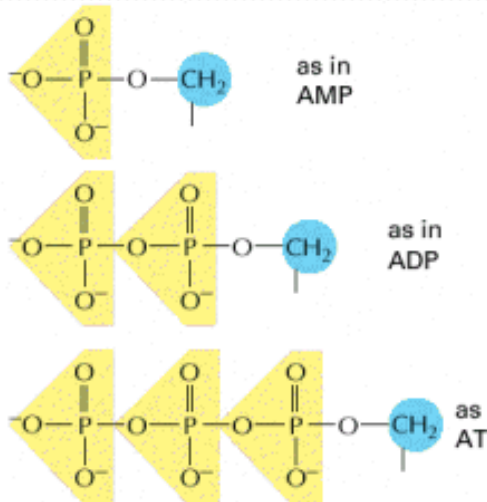
Each numbered carbon on the sugar of a nucleotide is followed by a prime mark; therefore, one speaks of the "5-prime carbon," etc.



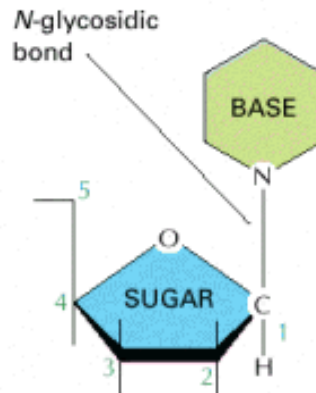
β -D-ribose
used in ribonucleic acid



β -D-2-deoxyribose
used in deoxyribonucleic acid



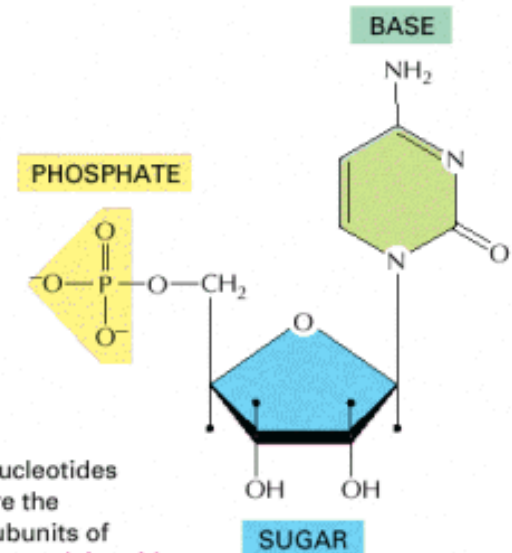
The phosphate makes a nucleotide



The base is linked to the same carbon (C1) used in sugar-sugar bonds.

NUCLEOTIDES

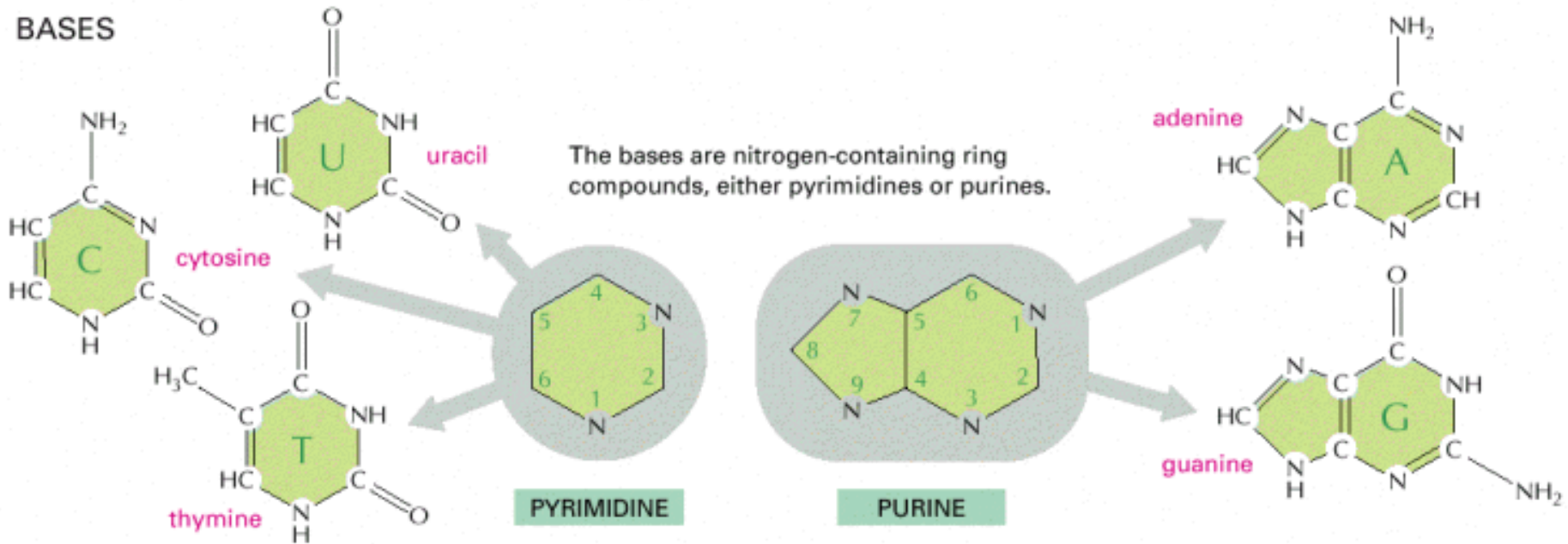
A nucleotide consists of a nitrogen-containing base, a five-carbon sugar, and one or more phosphate groups.



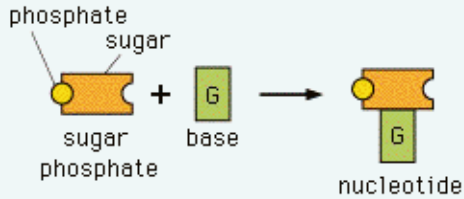
Nucleotides are the subunits of the nucleic acids.

DNA DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT

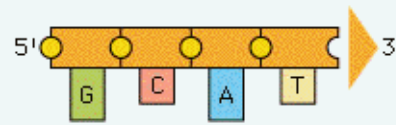
BASES



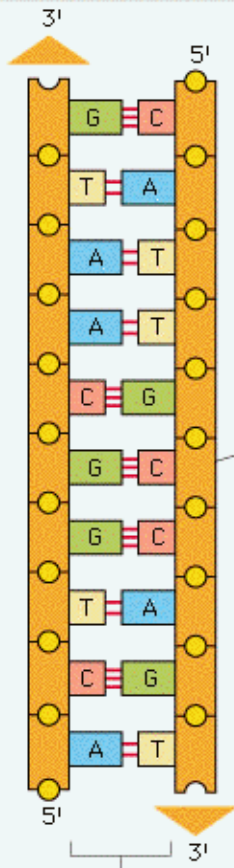
building blocks of DNA



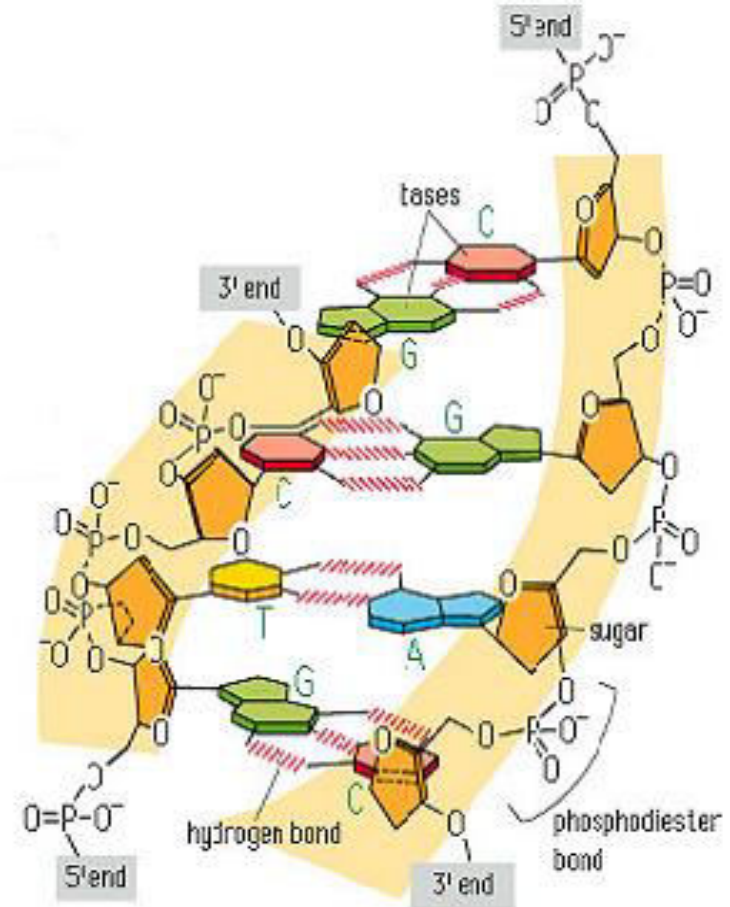
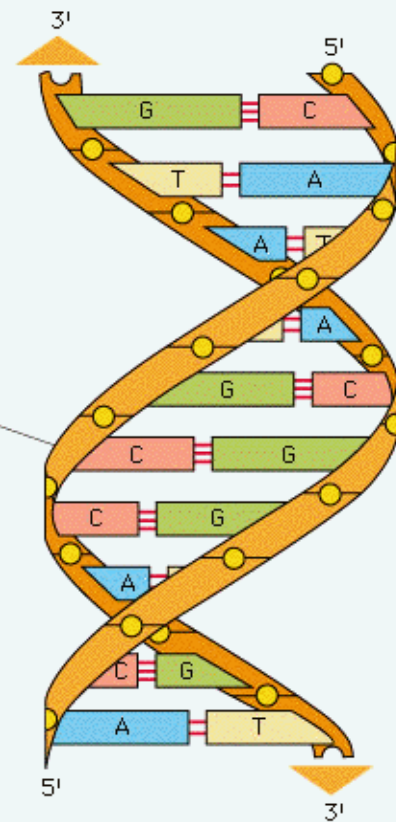
DNA strand



double-stranded DNA



DNA double helix



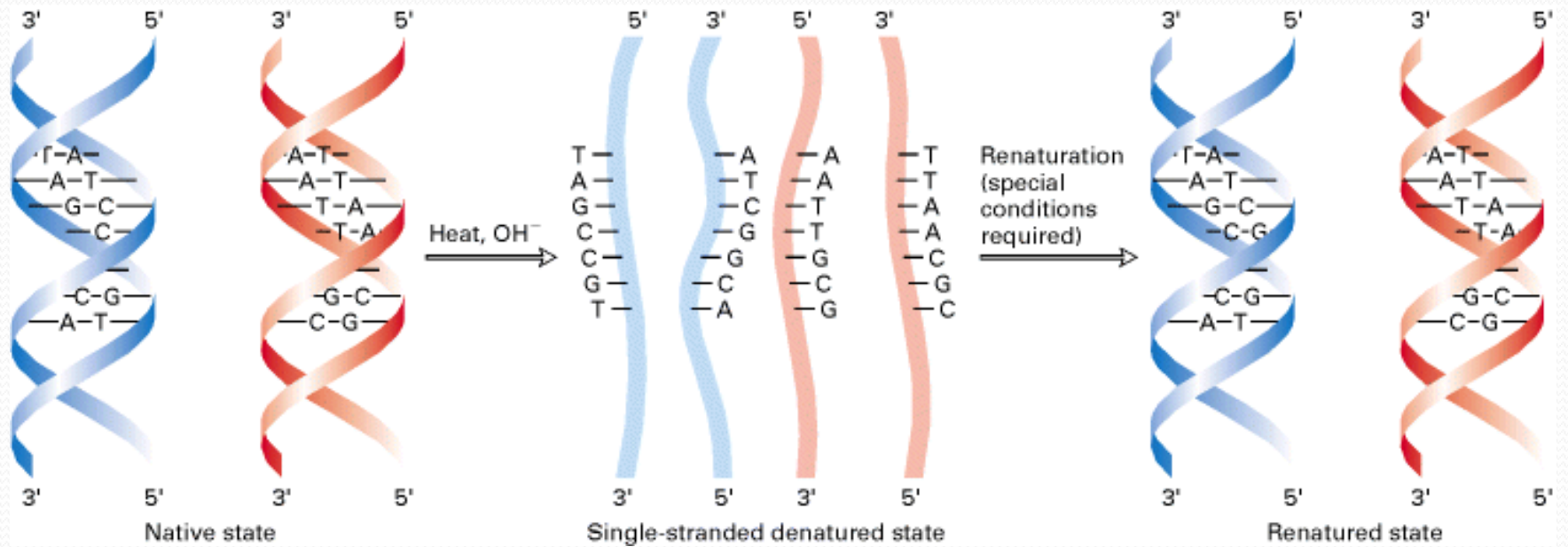
Nukleozit

Nukleotid

Polinukleotid

Fosfodiester bağı

Komplementer



DENATÜRASYON-RENATÜRASYON

Denatürasyon

H bağları kopar, zincirler ayrılır
Kovalent bağlar kopmaz
Isı ve kimyasal yollar

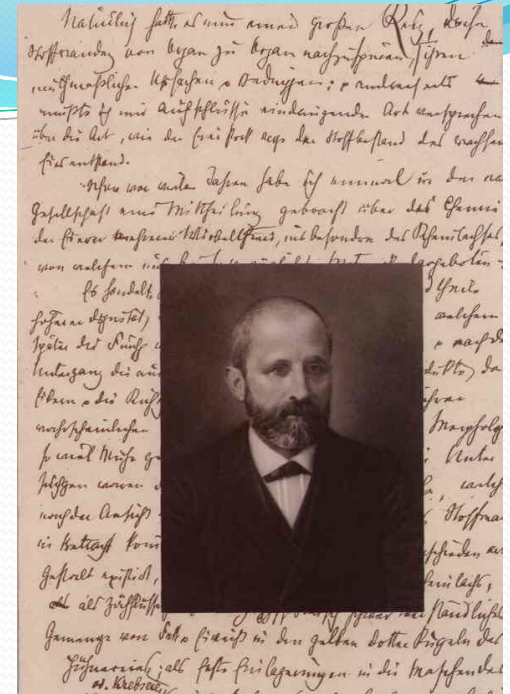
Renatürasyon

H bağları tekrar kurulur
Ayrılan zincirlerin tekrar birleşmesi
Yavaşça soğutma
Moleküler teknikler

DNA izolasyonu

- 1869 Miescher

- Miescher discovers "nuclein" (DNA) in the cells from pus in open wounds -- cells composed mostly of nuclear material. It became known as nucleic acid after 1874, when Miescher separated it into a protein and an acid molecule.



İzolasyon Sonrasında Hedeflenen Nükleik Asit

- Protein
- Karbonhidrat
- Lipid
- diğer nükleik asitleri

çermemelidir.

DNA İzolasyon Aşamaları

- Hücre membranı ve nükleer membranın nükleik asitlere zarar vermeden parçalanması. (Lysis)
- Pürifikasyon-arıtma
- Konsantrasyon ve saflık ölçümü

DNA İzolasyonu

- Hücrenin parçalanması ve yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın ortaya çıkması
- Basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerin ayrılması
- Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein komplekslerinin ayrılması.
- DNA'nın çözünür hale getirilmesi

Table 4. Total nucleic acid yields with QIAamp Kits using successive elutions

Sample	Amount	Yield (μg)			
		Elution 1	Elution 2	Elution 3	Total
Whole blood	200 μl	3–8	1–2	0–2	4–12
Lymphocytes	5 x 10 ⁶ cells/200 μl	13–18	5–8	3–5	20–30
Buffy coat	200 μl	15–25	8–15	5–10	28–50
Liver*	25 mg	25–45	25–45	10–25	60–115
Brain*	25 mg	20–30	10–20	5–10	35–60
Lung*	25 mg	5–10	2–6	1–4	8–20
Heart*	25 mg	15–25	8–15	2–5	25–45
Kidney*	25 mg	25–40	20–30	5–15	50–85
Spleen*	10 mg	15–25	8–15	2–5	25–45

DNA was purified with QIAamp Kits following standard protocols. Successive elutions were each performed with 200 μl Buffer AE.

* Results refer to the QIAamp DNA Mini Kit only.

DNA İzolasyon Tipleri

- Organik izolasyon metodları
- İnorganik izolasyon metodları
- Katı evre izolasyon metodları (Solid phase)
- Basit-ham parçalama metodları(Crude Lysis)

Nükleik asitlerin nitelik ve niceliklerinin belirlenmesi

- Nitelik-Quality

- Agaroz Jel

- EtBr
- SybrGreen I
- Gümüş

- Yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA

- Yüksek molekül ağırlıklı genomik RNA

- Nicelik – Miktar

- Densitometry

Spektrofotometre

- Nükleik Asitler - 260nm
- Absorptivity Constant
 - dsDNA = 50
 - 1 Optical Density Unit at 260nm = 50µg/mL

Spektrofotometre

- DNA
 - $A_{260} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 50 = \mu\text{g/mL}$
 - $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}} > 1.5$

Fluorometry

- Fluorescent spectroscopy
- DNA özgül boya-DNA konsantrasyonu
 - DABA
 - Hoechst 33258
 - PicoGreen
 - OliGreen

Forensic Investigations

Crime Scene Investigations

Latent Prints

Forensic Photography

Bloodstain Pattern Analysis

Impression Evidence

Crime Laboratory

Drug Chemistry

Trace Evidence

Forensic Biology

Firearms/ Toolmarks

Questioned Documents

Latent Prints

Fire Debris & Explosives

Digital Evidence

Death Investigation

Forensic Pathology

Forensic Toxicology

Forensic Anthropology

Forensic Odontology

Forensic Entomology

Forensic Nursing

Miscellaneous Other

Forensic Engineering

Forensic Psychology

Forensic Psychiatry

Forensic Accounting

Laboratory-Based

