

Profiling of 6 mini STR loci (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) on blood spots waited on various surfaces

Çeşitli yüzeyler üzerindeki kan lekelerinde 6 mini str lokusunun (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) profilendirilmesi

Tugba Unsal¹, Gonul Filoglu¹, Havva Altuncu¹, Kadir Dastan², Ozlem Bulbul¹

¹*İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Turkey*

²*Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Turkey*

Received 21 July 2016; Accepted 15 August 2016

Available online 23.08.2016 with doi: 10.5455/medscience.2016.05.8521

Abstract

Conventional STR loci are insufficient for successful analysis of DNA specimens from mass disasters or forensic evidence. In order to solve this problem, The National Institute of Standards and Technology (NIST) developed 26 new STR loci. The PCR products of these loci are less than 150 bp in size. Especially the PCR products of 6 loci (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) are less than 125 bp in size. In this study, blood was dripped on various surfaces that may be found in crime scenes (jean, t-shirt, couch upholstery, towel, knife hilt, laminate parquet, door lock iron and grouting between tiles) and they were kept waiting for 1 week, 1 month, 3 months and 6 months. For the mentioned loci, the PCR conditions previously determined in the optimization and validation process were applied [8]. At the end of this study, it was determined that the minimum DNA quantity of 6 mini STR loci can be 0.1 ng/μl for identification of blood spots.

Keywords: Forensic sciences, DNA analysis, waited biological samples, blood spots, miniSTR, D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045

Öz

Klasik STR lokusları ile olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş biyolojik örneklerde ya tiplendirme sorunları yaşanmakta ya da sonuç alınamamaktadır. Bunu ortadan kaldırmaya yönelik, National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından 26 yeni mini STR lokusu geliştirilmiştir. Bu lokusların PCR ürünleri 150 bp'den küçük olup özellikle de 6 lokusun (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) PCR ürünleri 125 bp'den küçüktür. Bu çalışmada olay yerinde bulunabilecek çeşitli yüzeylere (kot, penye, döşeme, havlu, bıçak kabzası, laminant parke, kapı kilit demiri ve kalebodur arası dolgu-derz) kan damlatılarak 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay bekletildi. Bu lokuslar için daha önceden optimizasyon ve validasyon çalışmasında belirlenen PCR koşulları uygulandı [8]. 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 aylık kan lekelerinde 6 miniSTR lokusu tiplendirildi. Yapılan hassasiyet çalışması sonucunda 6 mini STR lokusuna ait analizlerde kullanılabilecek en az DNA miktarının 0.1 ng/μl olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Adli bilimler, DNA analizi, beklemiş kan lekeleri, miniSTR, D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045

Giriş

Günümüzde babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi ve kriminal araştırmalarda olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin (kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, tükürük, tükürük lekesi kıl, kemik v.s) kimliklendirilmesinde STR lokusları kullanılmaktadır. Bu lokusların alel büyüklüklerinin 350 baz çiftinden (bp) küçük olması, eski ve iyi korunmamış biyolojik örneklerde tiplenebilmesi, ayrıca otomasyon ve çoklu analize imkan vermesi, pahalı donanım gerektirmemesi ve hemen hemen tüm dünya popülasyonlarında alel sıklıklarının bilinmesi bu lokusları

ideal genetik işaretler haline getirmiştir [1-3,5,9,10]. FBI tarafından kurulan ve bir DNA veri bankası olan CODIS (Combined DNA Index Systems) adli bilimlerde kullanılmak üzere 13 STR lokusu belirlemiştir. Bu lokusları içeren multiplex PCR ticari kitleri hala kullanılmakla beraber, olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş biyolojik örneklerde tiplendirme sorunları yaşanmaktadır [3]. Bu sorunları ortadan kaldırmaya yönelik, National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından 26 yeni mini STR lokusu geliştirilmiştir. Bu lokusların PCR ürünleri 150 bp'den küçüktür. Özellikle D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045 STR lokuslarının PCR ürünleri 125 bp'den de küçüktür. Olay yerinde bulunan eski ve bozulmuş biyolojik örneklerde başarılı DNA profili elde edildiğinden bu lokusların çeşitli ülkelerde validasyonu ve optimizasyonu

*Corresponding Author: Tugba Unsal, Istanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kampüsü Fatih, İstanbul, Turkey
E-mail: tugbaunsal86@gmail.com
Phone: +902124143000/ 22841

yapılarak adli laboratuvarların rutin kullanımına sunulmuştur [3-5,11]. Bu lokuslardan D2S441, D10S1248, ve D22S1045 ilk dönemlerde Avrupa'da benimsenmiş ve adli laboratuvarlarda kişi identifikasyonlarında kullanılan STR lokuslarına eklenmiştir. Yine aynı üç lokus CODIS için de uygun görülmüş ve 2015 yılında başlatılan projeye validasyonu Ocak 2017'de tamamlanacak olan diğer yeni eklenen lokuslarla beraber CODIS lokus sayısı Amelegenin lokusu ile birlikte 20'ye çıkartılacaktır. Birçok ticari firma bu lokusları içeren ya yeni kitler üretmiş olup ya da var olan kitlerine yeni mini STR lokuslarını eklemişlerdir [13].

Bu çalışmada; D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045 yeni mini STR lokuslarının çeşitli yüzeyler üzerinde ve değişik sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde tiplemadaki hassasiyetleri saptanarak rutin adli laboratuvarlarda çalışılması amaçlanmıştır.

Tablo 1. Çeşitli yüzeylerdeki örneklerin DNA konsantrasyonları

Süre	Kot	Penye	Havlu	Döşeme	Bıçak	Demir	Kalebodur arası dolgu	Laminant
DNA Miktarları								
1 hafta	0.7 ng	1.4 ng	0.6 ng	0.9 ng	1.5 ng	1.6 ng	1.1 ng	0.9 ng
1 ay	0.6 ng	1.2 ng	0.5 ng	0.7 ng	1.5 ng	1.4 ng	0.8 ng	0.7 ng
3 ay	0.4 ng	1 ng	0.2 ng	0.5 ng	1.3 ng	1.3 ng	0.6 ng	0.5 ng
6 ay	0.2 ng	1 ng	0.1 ng	0.5 ng	1 ng	1.1 ng	0.6 ng	0.5 ng

PCR Primerleri ve Diğer Bileşenler

6 mini STR lokusunun PCR reaksiyonları Ünsal ve ark.'nın çalışmasına göre yapıldı [8]. Primerler; D10S1248

Materyal ve Metod

Kan Lekelerinin Oluşturulması ve DNA İzolasyonu

Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Kan Lekelerinin Oluşturulması: Gönüllü bir kişiden alınan kan örneğinden 200'er µl, olay yerinde bulunma olasılığı bulunan çeşitli yüzeylere (kot, penye, havlu, koltuk döşemesi, bıçak kabzası, laminant parke, kalebodur dolgusu-derz ve kapı kilit demiri) damlatılarak 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay oda ısısında bekletildi. Kan örneklerinin DNA izolasyonları QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN) ile yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinin miktar tayini Qubit® Fluorometer - Invitrogen™ cihazında, Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) kullanılarak yapıldı. İzole edilen örneklerin DNA konsantrasyonları Tablo 1'de verilmiştir.

ve D4S2364 6FAM, D2S441 ve D14S1434 HEX, D1S1677 ve D22S1045 TET ile işaretlendi. Lokuslara ait primer dizinleri ve boyları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.Yeni mini STR lokusların primer dizileri ve boyları

Lokus	Primer Dizini (5' - 3')	Floresan Boya
D1S1677	İleri -TTCTGTGGTATAGAGCAGTGT Geri *GTGACAGGAAGGACGGAATG	TET
D2S441	İleri -CTGTGGCTCATCTATGAAACTT Geri *GAAGTGGCTGTGGTGTATGAT	HEX
D4S2364	İleri -CTAGGAGATCATGTGGGTATGATT Geri *GCAGTGAATAAATGAACGAATGGA	6-FAM
D10S1248	İleri -TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG Geri *GCAACTCTGGTTGTATTGTCTTCAT	6-FAM
D14S1434	İleri -TGTAATAACTCTACGACTGCTCTCTG Geri *GAATAGGAGGTGGATGGATGG	HEX
D22S1045	İleri -ATTTTCCCCGATGATAGTAGTCT Geri *GC GAATGTATGATTGGCAATATTTT	TET

D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 miniSTR lokuslarının PCR'ları 3'lü multipleks oluşturularak çalışıldı (NC01: D10S1248, D14S1434, D22S1045; NC02: D4S2364, D2S441, D1S1677) [8]. PCR karışımı her bir örnek için toplam hacim 25 µL olacak şekilde; 1ng/ µL genomik DNA, 12.5 µL TopTaq™ Master Mix Kit - QIAGEN®, 1.5 µL steril distile su ve her multipleks seti için belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan 10 µL primer karışımı (primer konsantrasyonları: D4S2364 için 1.3 µM, D1S1677, D14S1434 ve D22S1045 için 1.5 µM, D10S1248 için 1.6µM ve D2S441 için 1.7µM) kullanıldı. PCR, GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems) ısı döngü

cihazında yapıldı. *PCR Programı:* 95 °C de 10 dak., (94 °C de 1 dak., 55 °C de 1 dak. 72 °C de 1 dak.= 32 döngü) ve 60 °C de 45 dak. olacak şekilde yapıldı [8].

Elektroforez için örneğin hazırlanması

1 µl PCR ürünü, 12.5 µl Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems) ve 0.5 µl GeneScan™ - 350 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystems) karışımı hazırlanarak ABI 310 Genetik Analizör cihazına yüklendi. *Elektroforez koşulları;* ABI 310 Genetik Analizör'de 36 cm'lik kapillerde, POP-4 polimeri kullanılarak, DS-34 Matrix standartında, C Filtresi seçilerek, enjeksiyon süresi 5 saniye olacak şekilde, 24 dakika 60°C'de ve 15000 V'de

yapıldı. Elektroforez sonrasında elde edilen pikler GeneScan 3.7 programında NIST'te Hill ve ark.'nın belirledikleri size-alel tablosu (Tablo 3) ve NIST'te

belirlenen pozitif kontrol DNA örnekleri (9947-A ve K562) kullanılarak genotip tayini yapıldı [5-7].

Tablo 3. 6 mini STR lokusunun büyüklüğü (size) ve alel aralığı [5]

	Lokus Adı	Alel Büyüklüğü (Size) Aralığı	Alel Sayısı ve Aralığı
MİNİPLEX 2: NC02	D1S1677	77 -117	9-19
	D2S441	78 -110	9 -17
	D4S2364	67 -83	7-11
	D10S1248	79 -123	8-19
MİNİPLEX 1: NC01	D14S1434	70 - 102	9-17
	D22S1045	76 -109	8-19

Hassasiyet Çalışması

Bu aşamada, kontrol DNA (9947A) örneğinin çeşitli konsantrasyonları oluşturularak (0.005 – 0.025 – 0.05 – 0.1 – 0.5 ng/μL) PCR yapıldı ve elektroforez sonrasında tam profil elde edilebilecek en az DNA miktarda belirlendi.

Bulgular

MiniSTR lokusunun kan lekelerindeki performansı

Çeşitli yüzeylerde (kot, penye, döşeme, havlu, bıçak kabzası, laminant parke, kapı kilit demiri ve kalebodur arası derz dolgu) kan damlatılarak çeşitli sürelerde (1 hafta,

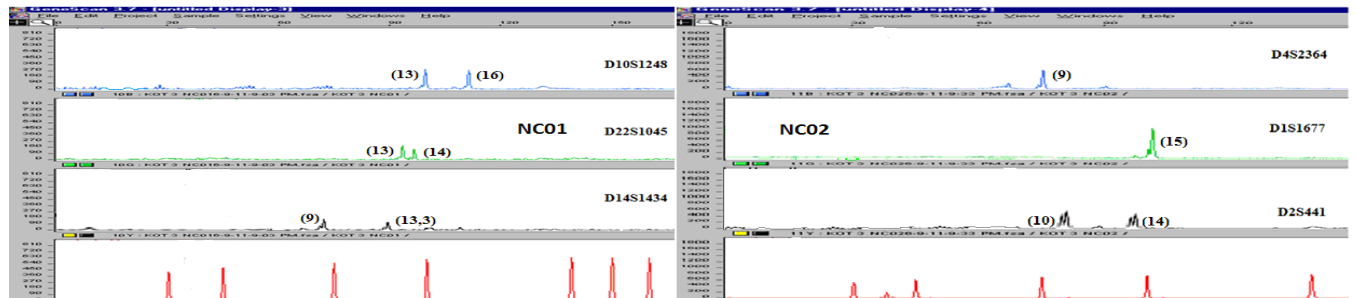
1 ay, 3 ay ve 6 ay) bekletilen kan örneklerinden; havludan DNA elde etmenin diğer yüzeylere göre daha zor olduğu belirlendi. Bu nedenle havlu üzerindeki kan lekelerinde 1 saat olan inkübasyon süresi 24 saate çıkarıldı. 6 ay beklemiş kan lekelerinde yapılan ilk PCR çalışmalarında sonuç elde edilemedi. Bunun üstesinden gelebilmek için; PCR döngü bu örneklerde 32'den 34'e çıkartıldı. Dolayısıyla, tüm yüzeylerde ve sürelerde bekletilmiş kan lekelerinin hepsinde 6 miniSTR lokusu başarıyla tiplendirilmiş oldu (Şekil 1,2,3,4). Bu örneklerle ait alel tipleri sırasıyla Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Çeşitli yüzeylerde bir hafta, 1ay, 3ay ve 6 ay bekletilmiş kan lekelerinde 6 miniSTR lokusuna ait alel profili

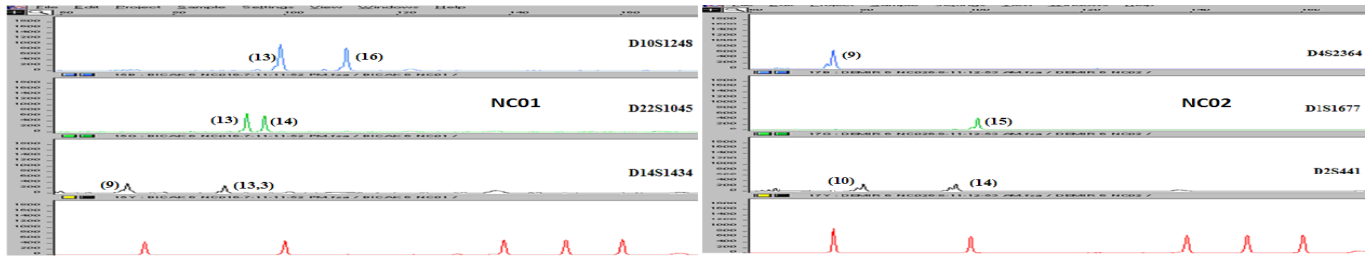
	Kot	Penye	Havlu	Döşeme	Bıçak	Demir	Kalebodurarası dolgu	Laminant
D1S1677	15,15	15,15	15,15	15,15	15,15	15,15	15,15	15,15
D2S441	10,14	10,14	10,14	10,14	10,14	10,14	10,14	10,14
D4S2364	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
D10S1248	13,16	13,16	13,16	13,16	13,16	13,16	13,16	13,16
D14S1434	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)	9,(13,3)
D22S1045	13,14	13,14	13,14	13,14	13,14	13,14	13,14	13,14



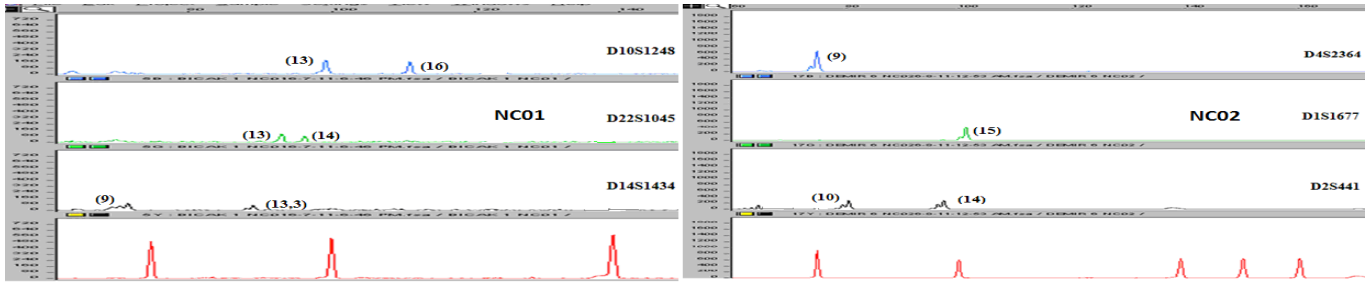
Şekil 1. Çeşitli yüzeylerde bir hafta bekletilmiş kan lekesinin NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 2. Çeşitli yüzeylerde bir ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 3. Çeşitli yüzeylerde üç ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 4. Çeşitli yüzeylerde altı ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegram

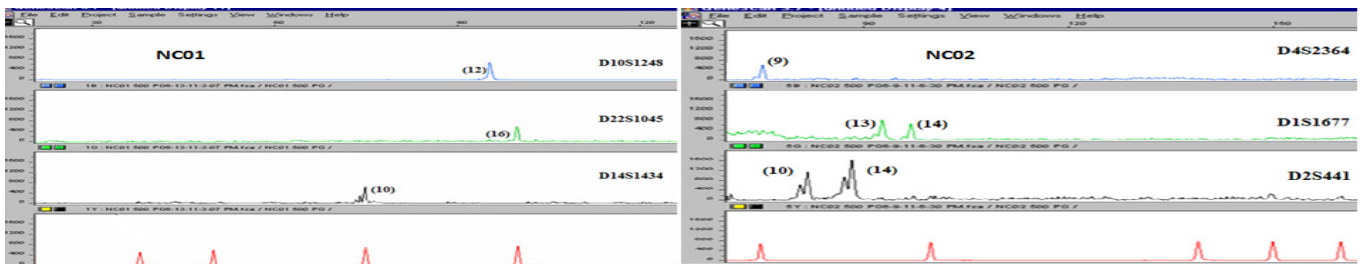
Hassasiyet çalışması

(K562) kontrol DNA örneğinden oluşturulan çeşitli konsantrasyonları (0.005, 0.025, 0.05, 0.1 ve 0.5 ng/µl) çalışılarak, 6 miniSTR lokusu için kullanılabilen en az miktardaki DNA oranı belirlendi. 0.5 ve 0.1 ng/µl DNA ile tam profil elde edilebildiği gözlemlendi. 0.05, 0.025 ve 0.005

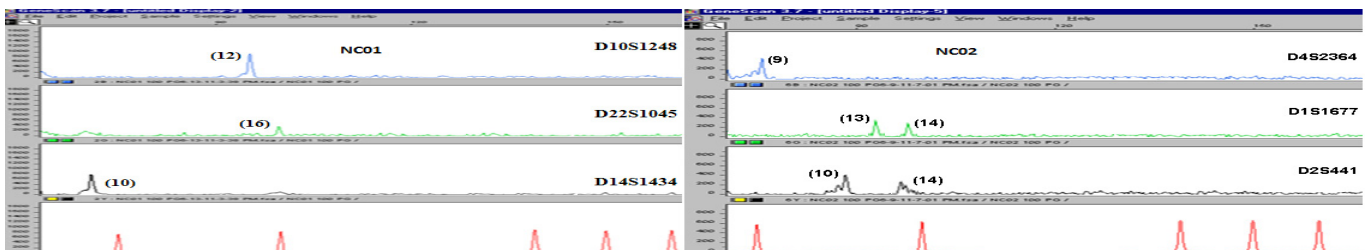
ng/µl DNA ile hiç profil elde edilemedi (Tablo 8). DNA konsantrasyonlarına göre NC01 ve NC02'ye ait elektroforegram Şekil 5 ve 6'da gösterilmiştir. DNA konsantrasyonlarına karşı RFU değerleri Şekil 7'de gösterilmektedir.

Tablo 8. 6 miniSTR lokusunun DNA oranlarına göre hassasiyet sonuçları

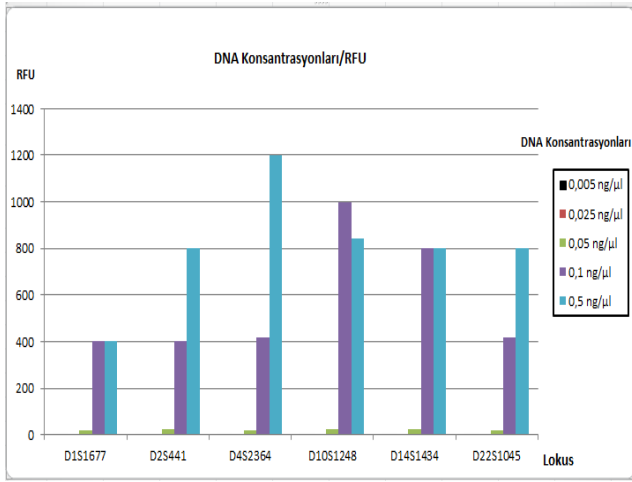
LOKUS	0.005 ng/µl	0.025 ng/µl	0.05 ng/µl	0.1 ng/µl	0.5 ng/µl
D1S1677	-	-	-	+	+
D2S441	-	-	-	+	+
D4S2364	-	-	-	+	+
D10S1248	-	-	-	+	+
D14S1434	-	-	-	+	+
D22S1045	-	-	-	+	+



Şekil 5. 0.5 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC01 ve NC02 multiplekslerine ait elektroforegram



Şekil 6. 0.1 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC01 ve NC02 multiplekslerine ait elektroforegram



Şekil 7. Oluşturulan DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen RFU değerleri

Tartışma

Olay yerinde en sık rastlanan biyolojik delil kan lekeleridir. Olayın oluş şekline göre bu lekelerin ne kadar süre beklediğini bazen bilemeyebiliriz. Olayın üstünden haftalar, aylar hatta yıllar geçebilmektedir. Ayrıca bu lekeler çeşitli yüzeyler üzerinde de bulunabilmektedir. Olay yerinde en çok karşılaşılan durumlar: Kanın; penye, havlu, koltuk döşemesi gibi yüzeylere bulaşmış olması, kapı, kalebodur, parke gibi yüzeylere sıçraması ya da akması ve en çok kullanılan cinayet aletlerinden biri olan bıçağın kabzasına sızmasıdır. Ancak olay yerinden gelen bu tür örnekler genellikle miktarı az ve bozulmuş durumdadır. Bu tür örneklerde DNA üzerinde daha çok yer kaplayan klasik STR lokusları ile tipleme sorunu yaşanabilmekte ve sonuç alınamadığı bilinmektedir [12].

Bu amaçla kan lekelerinin, olay yerinde en çok karşılaşılabilecek yüzeylere; kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, kapı kilit demiri, laminant parke, kalebodur arası dolgu-derz üzerinde 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Tüm yüzeylerde ve sürelerde bekletilmiş kan lekelerinin hepsinde 6 yeni mini STR lokusu başarıyla tiplendirildi. Ancak havlu üzerinde 3 ve 6 ay bekletilmiş kan lekesinde DNA konsantrasyonunun düşüklüğüne bağlı olarak tiplendirmede güçlük yaşandı. Bu nedenle bu örnekte PCR aşamasında 32 olan döngü sayısı 34'e yükseltildi. Bu şekilde yapılan 4 deneme sonucu havludaki kan lekesi başarıyla tiplendirildi. Bu tür yüzeylerde DNA emilmeden yüzeyde tutulduğu için DNA izolasyonu zorlaşmaktadır. Bu tür örneklerde PCR döngü sayısını artırmak, örneğin tiplendirilmesinde başarı oranını artırmaktadır. M.D. Coble ve J.M. Butler (2005) tarafından yapılan mini STR hassasiyet çalışmalarında da 0.1 ng/μl konsantrasyonlarda alel düşmesi gözlemlendiğinden bunu önlemek için döngü sayısını artırarak tam profil elde edebilmişlerdir [3].

Duyarlılık çalışmasında; 0.5 – 0.1 – 0.05 – 0.025 – 0.005 ng/μl DNA miktarlarıyla yapılan PCR'de; 0.5 ve 0.1 ng/μl

DNA konsantrasyonlarında tam profil elde edilirken diğer konsantrasyonlarda da PCR döngü sayısı 32'den 34'e yükseltildiğinde bile hiç pik gözlenmedi. Bunun nedeni hedef DNA miktarı azaldıkça DNA kopya sayısının azalması ve buna bağlı PCR performansının düşmesidir. Bu nedenle zorlu ve eser miktarda örneklerde PCR performansını artırmak için PCR döngü sayısı ve Taq polimeraz artırılarak DNA kopya sayısının artırılması hedeflenmektedir [3,14].

Sonuç

Sonuç olarak; 6 ay beklemiş kan lekelerinde miniSTR lokusları kullanılarak beklemiş kan lekelerinden kimliklendirme yapılabileceği saptanmıştır. Ancak bundan sonraki çalışmalarda süre uzatılarak bir ya da birkaç yıl bekletilmiş kan lekelerinde de çalışılabilir. Hassasiyet çalışması sonucunda 6 yeni miniSTR lokusuna ait analizlerde kullanılabilecek en az DNA miktarının 0.1 ng/μl olduğu saptanmış oldu. Ayrıca bu çalışmada kullanılan sistemler degrade olmuş biyolojik örneklerde de çalışılarak performansları belirlenebilir.

Finansal Destek

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 4046 ve 18624 numaralı tez projeleriyle desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Butler JM, Shen Y, McCord BR. The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA. J Forensic Sci Int. 2003;48(5):1054-64.
- Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. Bio Techniques. 2007;43(4):2-4.
- Coble MD, Butler JM. Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. J Forensic Sci. 2005;50:43-53.
- Hill CR, Coble MD, Butler JM. Development of 27 New MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. American Academy of Forensic Sciences, Seattle, WA. 2006; Poster B105.
- Hill CR, Coble MD, Butler JM. Characterization of 26 New MiniSTR Loci. Promega Meeting, Nashville, TN. 2006; Poster 44.
- Carboni I, Lozzi S, Nutini AL, Torricelli F, Ricci U. Improving complex kinship analyses with additional STR loci. Electrophoresis. 2014;35(21-22):3145-51.
- NIST mini STR homepage <<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/miniSTR.htm>>
- Unsal T, Filoglu G, Sipahi E, Rayimoglu G, Altuncul H. New MiniSTR Loci D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Validation And Optimization On Blood Samples. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2011;3:e473-e474.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet. 1989;44(3):388-96.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey T, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats. Genomics. 1992;12(2):241-53.

11. Hill CR, Kline MC, Coble MD, Butler JM. Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. *J Forensic Sci.* 2008;53(1):73-80.
12. Constantinescu CM, Barbarii LE, Ianc CB, Constantinescu A, Neagu E, Iancu D, Girbea G. Challenging DNA samples solved with MiniSTR analysis. *Rom J Leg Med.* 2012;20:51-6.
13. National DNA Index System (NDIS) Operational Procedures -FBI <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/pla> access date 21.06.2016
14. McCord B, Opel K, Funes M, Zoppis S, and Jantz LM. An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic Samples. U.S. Department of Justice Final Report. 2011;2006-DN-BX-K006.