

DNA PARMAK İZİ İLE KİŞİ FARKLILIKLARININ GÖSTERİLMESİ*

Mehmet TOKDEMİR H. Ergin DÜLGER M. Ziya DOYMAZ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.03.1998

Demonstrations of Differences Between Individuals by DNA Fingerprinting**SUMMARY**

The aim of study was to determine the differences between individuals by using DNA fingerprinting method. For this purpose DNA samples from a total of 75 people made up from medical student and staff were obtained. In each individual, DNA were extracted from hair root and blood by phenol-chloroform extraction. DNA fingerprinting was carried out in order to generate DNA fingerprint, DNA were subjected to Polimerase Chain Reaction (PCR) amplification with an eight nucleotide long primer specific for short-arbitrary repeat sequences of the genome. When these products examined by electrophoresis on the 2% agarose, the result has shown that DNA fingerprint from different subject hair roots and bloods demonstrated variability.

These result indicate that DNA fingerprinting with short-arbitrary repeat primers can be used to determine the polymorphism of individuals. But, the number of bands required for determination of paternity and relativity among people are much larger. Therefore, in paternity and relativity determination cases, PCR products should be analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel which is known to have more resolving power than agarose gel electrophoresis.

Key Words: DNA Fingerprinting and Forensic Medicine.

ÖZET

Bu çalışmada DNA parmak izi yöntemi ile kişi farklılıklarının gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu maksatla Tıp Fakültesi öğrencileri ve çalışanlarından olmak üzere toplam 75 kişiden DNA tayini için örnekler alınmıştır. Her kişinin DNA 'sı kıl kökü ve kandan fenol-kloroform ile özütlenmiştir. DNA parmak izi, 8 baz uzunluğunda kısa-rastgele primerin, genomda tekrar eden dizilerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak elde edilmiştir. Bu ürünler %2'lik agaroz jelde incelendiği zaman, kan ve kıl kökünden elde edilen DNA parmak izinin, kişilere göre farklı bantlara sahip olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlar kısa-rastgele tekrar eden primerler ile elde edilen DNA parmak izinin kişi farklılığını ortaya koymada kullanılabilineceğini gösterdi. Fakat ebeveyn/akraba incelemesinde daha fazla bant gereklidir. Bundan dolayı ebeveyn/akraba ogularında, PCR ürünleri, çözümüleme gücü agaroz jelden fazla olduğu bilinen poliakrilamid jel elektroforezinde incelenmelidir.

Anahtar Kelime: DNA Parmak Izi ve Adli Tıp.

GİRİŞ

İnsan myoglobulin geninde 33 bazlık tekrar eden dört adet dizinin olduğu ve buna benzer tekrar eden dizilerin, insan genomu boyunca bir çok bölgede bulunduğu ilk kez Jeffreys ve arkadaşları tarafından ortaya

konulmuştur (1,2). Bu tekrar eden benzer diziler uydu (satellit) DNA olarak isimlendirilir. Bu sekansların problemlerle incelenmesi neticesinde, ardışık tekrar eden dizilerin sayılarının değişkenliği (Variable Number

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) tarafından desteklenmiştir. (FÜNAF-Proje No:230)

Tandem Repeat) bulunmuştur (3,4). Bunun üzerine DNA analizinde, daha önceleri restriksiyon enzimlerinin kesim ürünlerinin boylarına göre polimorfizminin (RFLP) yerine, bu yöntem kullanılmaya başlandı (5,6,7,8,9).

1985 yılından bu yana, PCR'ın laboratuvarlarda kullanıma girmesiyle (10,11), DNA analizinde yeni ufuklar açıldı (12). Daha sonra 1990'lı yıllarda çok kısa ve tamamen rastgele primerler kullanılarak farklı organizmalar ve insan genomunun polimorfizmi, DNA çoğaltım parmak izi (DNA Amplification Fingerprinting) veya diğer adıyla rastgele primerlerle çoğaltılmış DNA (Random Amplification Polimorphic DNA) yöntemi ile DNA analizi çok daha kolay, daha fazla bilgi veren ve otomasyona uygun hale gelmiştir (13,14,15,16,17,18,19).

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma FÜNAP tarafından 230 numaralı proje kapsamında desteklenerek, tüm deneyler F.Ü. Tıp. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada F.Ü. Tıp. Fak. öğrencisi ve personeli olan 75 kişiden 0.5 ml kan ve vücudun çeşitli yerlerinden kökleriyle çekilen ortalama 15 adet kıl örnekleri kullanıldı. Kanlar ETDA'lı, kıllar ise boş eppendorf tüplere konuldu. Daha sonra bu iki örnekten farklı solüsyonlar kullanılarak DNA özütleme işlemine geçildi.

Kıl kökleri bulunan 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine, 10 mM Tris-HCl (pH:8), 10mM EDTA, 50mM NaCl, 0.04mM DDT (Di Tiyo Tretiol) ve 50µl/ml proteinaz K konularak 37 °C 1 gece bekletildi. Fenol ile proteinler ve RNA ortamdan uzaklaştırıldı. DNA bulunan üst faz kloroform/izoamil alkol ile muamele edilerek DNA'nın geri kalan proteinlerden ve fenolden ayrılması sağlandı. Elde edilen DNA'ya 1/10 hacminde 3M Na asetat (pH:5.0) eklenip, 20 kat saf etil alkol ilave edilip -20°C'de 1 gece bekletildi. Sonra DNA %70'lik etil alkol ile yıkandı. Daha sonra DNA'nın alkolü uçurup distile suda çözüldü.

EDTA'lı tüplere alınan 0.5ml kan, 10mM Tris (pH:7.6) 10mM KCl, 10mM MgCl₂ 10ml suya tamamlanmış solüsyon I ile 1ml'ye tamamlandı. Bunun üzerine 12µl triton-X100 konularak eritrosit ve lökosit zarları parçalandı. Sonra 10mM Tris (pH:7.6) 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5M NaCl, %0.5 SDS 2mM EDTA içeren solüsyon II ile çözülen materyal daha sonra kıl kökü dokusuna uygulanan fenol, kloroform/izoamil alkol, Na asetat ve etil alkol safhaları aynen tekrarlandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için her tüpe 1µl kalıp DNA, 2µl primer [TUB 127 (5'-CGCGCCGG-3')], 4µl 10mM dNTPs, 5µl 10X PCR tamponu, 5µl 25mM MgCl₂, 1µl Taq Polimeraz (1Ü/ml), 32µl steril saf su konulur. Bu karışım ısısal döngü cihazına konularak (MJ Research USA) 94°C'de 1dakika, 36°C'de 1 dakika, 72°C de 2 dakikadan oluşan 40 döngüde sonlandırıldı.

BULGULAR

Toplam 75 örnekten DNA elde edilerek, %0,7'lik agaroz jel elektroforezinde incelendi. Marker olarak Hae III enzimi ile kesilmiş pBR32 DNA kullanıldı (Şekil 1). Ayrıca elde edilen DNA'ların miktar tayinleri 260 nm dalga boyunda optik dansiteleri ölçülerek yapıldı. Bunun için 10µl alınan örnekler 1 ml'ye tamamlanmış, çift sarmal DNA'nın OD₂₆₀=1 olmasının 50µg/ml'ye tekabül edeceği bilindiğinden, basit orantı kullanılarak elde edilen DNA miktarları hesaplandı. Olgulardan alınan 0.5 ml kan örneklerinden ortalama 5.33µg, yaklaşık 15 adet kıl kökünden ise 5.22 µg DNA elde edildi (Tablo 1).

Tablo 1- Saç ve kan örneklerinde elde edilen DNA miktarları

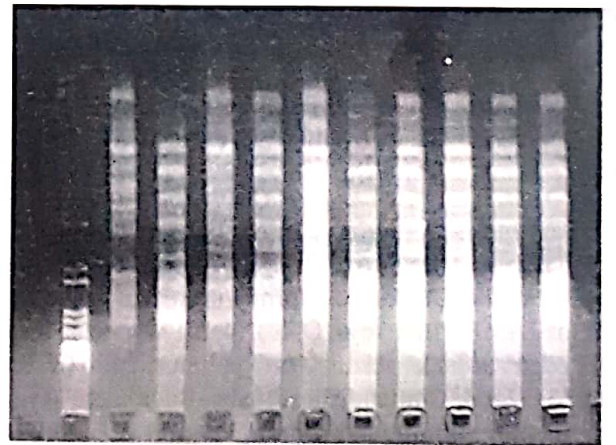
KOD	KAN (µg)	KIL (µg)
01	6.24	4.60
02	5.62	4.46
03	4.79	6.24
04	2.26	5.07
05	4.08	5.37
06	2.60	4.37
07	10.9	0.89
08	2.73	4.02
09	3.72	1.21
10	8.29	5.77
11	3.72	8.96
12	7.45	9.67
13	6.50	7.25
14	4.90	2.05
15	9.84	2.60
16	4.98	3.89
17	7.90	1.05
18	6.36	7.80
19	14.8	2.76
20	2.45	9.00
21	6.06	2.89
22	2.64	8.50
23	1.23	4.60
24	9.60	5.90
25	4.37	4.00
26	4.69	8.30
27	1.04	2.32

KOD	KAN (µg)	KİL (µg)
28	5.78	3.90
29	8.90	5.98
30	4.56	6.98
31	7.00	5.02
32	4.50	5.57
33	7.89	2.53
34	2.30	3.45
35	6.70	2.00
36	4.67	8.90
37	1.24	6.43
38	5.66	0.97
39	7.64	3.55
40	7.66	7.90
41	3.00	8.92
42	6.05	4.56
43	6.81	4.01
44	4.42	7.90
45	3.31	5.68
46	3.66	6.00
47	5.67	5.26
48	6.01	6.50
49	2.44	9.55
50	4.08	3.46
51	5.97	5.61
52	2.08	5.05
53	5.32	4.54
54	14.0	9.08
55	2.00	9.55
56	5.07	8.00
57	2.90	5.55
58	1.98	3.43
59	8.88	9.22
60	5.60	4.44
61	5.29	6.71
62	5.62	3.87
63	3.30	7.95
64	4.56	1.66
65	4.80	6.13
66	6.22	0.97
67	2.24	3.55
68	5.04	4.55
69	7.00	2.38
70	7.90	5.76
71	1.70	4.0
72	8.76	3.0
73	3.69	7.05
74	4.50	6.31
75	6.08	5.05



Şekil 1- Genomik DNA'nın %0.7'lik agaroz jel elektroforezinde incelenmesi (marker: pBR32 DNA'nın Hae III enzimiyle kesimi)

Elde edilen PCR çoğaltım ürünleri %2'lik agaroz jelde incelendiğinde PCR sonucunda örneklerin sadece 7 tanesinden, PCR ürünü elde edilememiştir. Geri kalan PCR ürünleri ile kişi farklılıkları gösterilmiştir. Marker olarak Eco RI- Hind III ile kesilmiş Lamda DNA kullanıldı (Şekil 2).



m 1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b

Şekil 2- Beş ayrı bireyin kıl kökü ve kan DNA çoğaltım parmak izlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde incelenmesi (Marker: Lamda DNA'nın Eco RI-Hind III enzimiyle kesimi a: Kıl kökü b: Kan dokusu)

TARTIŞMA

DNA parmak izi tekniğinden önce insanların kimlik ve ebeveyn/akraba tayininde ABO, Rh, NNSS gibi kan grubu ve HLA doku antijenleri, antikorlar,

proteinler ve enzimler gibi, frekansı %1'den fazla olan ve birden fazla alel gen ile kalıtılan genetik polimorfizm kullanılmaktaydı (5,20). Bunlardan son zamanlarda özellikle HLA antijen sistemi nispeten daha yüksek bir olasılıkla ebeveyn/akraba testinde kullanılmaya başlanmıştı. Ama bu yöntemle bile yirmişer kodominant aleli olan HLA için kişide haploid oranı $20^4 = 160.000$ olarak hesaplanmaktadır. Bu kadar fazla polimorfik genle kalıtılan HLA'nın bireyselliği belirleme oranı DNA parmak izi yanında çok az hassastır (20).

Ayrıca postmortem birçok analiz için uygun olmayan dokulardan yapılabilen DNA parmak izi yöntemi sayesinde, adli vakaların aydınlatılması mümkün olmaktadır (21,22,23,24). Öyle ki Pääbo Mısır'daki mumyalardan, 3.5 kb dan küçük molekül ağırlıklı DNA elde etmeyi bile başarmıştır (25).

Son yıllarda diğer tekniklere üstünlüğü nedeniyle DNA parmak izi, akrabalık testlerinde, cinayet olgularının aydınlatılmasında, tecavüz olaylarında, düşük olgularında fetusun anne ve babasının belirlenmesinde, göçmen hakları/soy iddialarının ortaya konmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (26,27,28,29,30).

Önceleri RFLP (31,32,33,34,35,36) ile yapılan DNA analizinde 50-500 ng gibi nispeten fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyuluyordu. Ayrıca deneyler daha uzun zaman almakta ve radyoaktif problara ihtiyaç duyulmaktaydı. Bundan dolayı bu yöntemle DNA tiplendirilmesi zahmetli ve otomasyona uygun değildi.

Oysa bugün PCR tekniği sayesinde tekrar eden mikrosatelitler üzerinde durularak eski ve alışılan yöntemlere nazaran daha güvenilir ve daha kolay kimliklendirme mümkün olmuştur (37,38,39).

Bazı minisatelitlerin ve tüm mikrosatelitlerin tekrar eden sayısının değişkenliği, PCR idaresinde kolayca gösterilmektedir. Bunlar çoğaltılmış ürünlerin boy polimorfizmi (AMP-FLPs veya DAF) (4,10) veya çok kısa tekrar eden ardışık sekansların polimorfizmi (STR) (11,12,13) olarak isimlendirilmektedir. Bu yöntem sayesinde insanların kimliklendirilmesi, kalıtımı ve hastalıklarının teşhisi kolayca yapılabilmektedir İnsan genomunun yaklaşık 500.000 STR içerdiği tahmin edilmekte ve bunlar üç-beş baz gibi kısa tekrar unitelerden meydana gelmektedir (14,37,40,41, 42,43,44,45,46,47).

Herhangi bir ön bilgiye sahip olmadan tamamen kısa-rastgele primerler ile DNA polimorfizmini ilk ortaya koyanlardan Caetano ve arkadaşları (18) 5-21 baz uzunluğunda dizileri primer olarak kullanıp, prokaryotlar ve ökaryotlar arasındaki polimorfizmi gösterdiler. Yine bu çalışmada "CGCGCCGG" dizisini primer olarak kullanarak poliakrilamit jelde Amerikalı Zenciler

ve Beyaz aile üyelerinin DNA parmak izlerinin farklı olduğunu ortaya koydular. Bu primerle dört kardeş 2kb uzunluğundan daha kısa 46 bant elde edilmiş, bu bantların 40 tanesi ebeveyn tarafından paylaşılırken 3 tanesinin anneden, 3 tanesinin babadan kalıtımla geçmiş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 7 tane olması gereken bantların transfer edilmemiş olduğunu ve belirgin farklı bantların bulunduğunu da tespit etmişlerdir. Farklı bantlara bir ve birkaç nesil geriye dönülüp bakıldığında o aileye ait oldukları görülmüştür. Çok sık olarak tekrarlayan, kişisel olan 2-3 bantın ise, bu aile için genetik hastalıkların kaynağı olabileceği bildirilmiştir (18).

Bizde çalışmamızda insan genomunda GC oranının AT oranına göre düşük olması sebebiyle (7), hem daha sınırlı hem de daha özgün bantların izlenmesini sağlamak için "CGCGCCGG" dizisini primer olarak kullandık.

Çalışmamızda kişisel farkı agaroz jelde ortaya koymamıza rağmen, belirgin bantların ortalama sayısı ancak 12 civarındadır (Şekil 2). Oysa poliakrilamit jelin çözümüleme gücü (Resolving Power) agaroz jele göre 50-100 kat fazladır (48). Bu nedenle kişisel farklılıkların ortaya konmasında agaroz jel elektroforezinin kullanılabilmesi ancak ebeveyn/akrabalık testi ve bazı genetik hastalıkların tespitinde çözümüleme gücü fazla olan poliakrilamit jel kullanmanın gerekli olduğu görülmüştür.

Aynı zamanada poliakrilamit jele daha fazla miktarda DNA yüklenmesi ve jelden çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere daha saf olarak DNA elde edilmesi, bu jelin diğer avantajları olarak kabul edilmektedir (48).

Erdağ tarafından yapılan bir çalışmada (49) 10 ml kandan ortalama 120 µg, Dülger ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise (5) 0.5 ml kandan 2.85 µg DNA elde edildiği bildirilmiştir. Her iki araştırmayla 0.5 ml kandan elde ettiğimiz 5.33µg DNA miktarı karşılaştırdığımızda; aynı miktarda kandan yaklaşık 6µg DNA elde edilen Erdağ'ın çalışmasına çok yakın miktarda DNA elde ettik, yine aynı miktar kandan 2.85µg DNA elde eden Dülger ve ark. çalışmasına göre ise, yaklaşık iki katı DNA elde ettik (Tablo 1).

Ortalama 15 adet kıl kökü dokusunda elde ettiğimiz 5.22µg DNA miktarı, aynı sayıdaki kıl kökünden Erdağ'ın (49) çalışmasında elde edilen yaklaşık 2µg DNA miktarı ve Dülger ve ark.(5) tarafından elde edilen 2.35µg DNA miktarının iki katından fazladır (Tablo 1).

Kan ve kıl kökü dokularından tamamından DNA elde edilmiş ve bunlar %0.7'lik agaroz jelde gösterilmiştir

(Şekil 1). Bu DNA'ları PCR ile çoğaltıp agaroz jelde incelediğimizde, farklı kişilerin gerek kanlarından, gerekse kıl köklerinden elde edilen bantların farklılıkları ile kişi polimorfizmi açıkça görülmüştür (Şekil 2).

Örneklerin 7 tanesinden PCR ürünü elde edilememesinin sebebinin, DNA özütlenme sırasında fenol pH'sının zamanla bozulmasına bağlı olarak protein ve nükleazların DNA'dan uzaklaştırılmaması veya fenolün DNA'dan tam olarak ayrılmaması nedeniyle PCR reaksiyonunun çalışmaması sonucu olduğu kanısına vardık.

Sonuç olarak:

1-) Üniversitemizde DNA parmak izi yapılabileceği kanıtlanmıştır,

KAYNAKLAR

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL, Hypervariable " minisatellite" regions in human DNA. Nature (London)1985;314:67-73.
2. Weller P, Jeffreys AJ, Blanchetot A, Organization of the human myoglobin gene. EMBO J. 1984;3:438-446.
3. Wong Z, Wilson V, Patel I, et al. Characterization of a panel highly minisatellites cloned from human DNA. Ann. Hum. Genet. 1987;51: 269-288.
4. Wrong Z, Wilson V, Jeffreys AJ. et al. Cloning a selected fragment from a human DNA "fingerprinting" isolation an extremely polymorphic minisatellite. Nucleic Acids Res. 1986;14:4605-4616.
5. Dülger H, Tokdemir M, Erdağ B. ve ark. Farklı örneklerden elde edilen DNA parmak izi çalışması. Adli Tıp Bülteni1997;2: 15-20
6. Arda M, Biyoteknoloji, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara, 3. Baskı 1995.
7. Strachan T. Read A.P, Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited. New York. 1.Baskı 1992.
8. Lorne T, DNA fingerprinting An Introduction. W.H Freeman Company New York. 1.Baskı 1992.
9. Chantal J, Forney RM and F. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. BioTechniques 1993;15:100-119.
10. Saiki R, Scharf S, Faloona F. et al. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985;230:1350-1354.
11. Mullis KB, Faloona FA, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 1987;155-335.
12. Henry A, Gelfand D, Sninsky E and J.J, Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991;252:1643-1650.
13. Boerwinkle V, Xiong WE, Fourest E. et al. Rapid typing of tandemly repeated hyper variable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc Natl. Acad. Sci. USA 1989;86:212-216.
14. Wolff RK, Nakamura Y, White R, Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence. Gnomics 1988;3:347-351.
15. Edwards A, Gibss RA, Nyugen W. et al. Automated DNA sequencing methods for detection and analysis of mutations: applications to Lesch-Nyhan syndrome. Trans Assoc. Am Physicians 1989;102:185-194.
16. Litt M, Luty JA, A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. 1989; 44:397-401.
17. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphism's which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 1989;44:388-386.

18. Caetano G, Bassam BJ, Gresshof PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 1991;9:553-557.
19. Allen RC, Graves G, Budovelle B. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Bio Techniques* 1989;7:736-744.
20. Şaylı BS, Medikal Genetik İlkeleri. Türkiye Klinikleri Yayını. 3. Baskı Ankara 1995.
21. Ludes B, Pfitzinger H, Mangin P. et al. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. *J. Foren. Sci.* 1993;38(3):686-690.
22. Gill P, Jeffreys AJ, Werret DJ. Forensic application of DNA fingerprints *Nature* 1985;318:577-579.
23. Hagelberg E, Jeffreys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 1991;352:427-429.
24. Ogato M, Mattern R, Schneider PM. et al. Quantitative and qualitative analysis of DNA extracted from post mortem muscle tissues. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1990;103:397-406.
25. Pääbo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985;314:664-645.
26. Atasoy S. Adli olayların aydınlatılmasında DNA parmak izinden yararlanılması. *Adli Tıp Dergisi* 1989;5:212-219.
27. Richard A, Balding N and DJ. Effects of population structure on DNA fingerprint analysis in forensic science. *Heredity* 1991;66:297-302.
28. Gill P, Jeffreys AJ, Werret DJ. Forensic application of DNA fingerprints *Nature* 1985;318:577-579.
29. Mangin PD, Ludes BP. A forensic application of DNA typing paternity determination in a putrefied fetus. *A. J. Forensic Med. Path.* 1991;12(2):161-163.
30. Comey CT, Budowle B, Adams DE. et al. PCR amplification and typing HLA DQ α gene in forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 1993 38(2): 239-249.
31. Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprint. *Nature* 1985;317:818-819.
32. Gill P, Werret DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Sci Int.* 1987;35:145-148.
33. Hill WG. DNA profiling in immigration test cases. *Nature* 1986;322:290-291.
34. Nathans D, Smith H. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 1975;44:273-293.
35. Evett IW, Werret DJ, Bucleton JS. Paternity calculations from DNA multilocus profiles. *J Forensic Sci. Soc.* 1989;29:249-254.
36. Gill P, Lygo JE, Fowler SJ. et al. An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes. *Electrophoresis* 1987;8:38-44.
37. Edwards A, Civitello A, Hammond HA. et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 1991;49:746-756.
38. Edwards A, Hammond HA, Jin T. et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241-253
39. Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)_n, (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 1990;7:524-530.
40. Biancalana V, Serville F, Pommier J. et al. Moderate instability of the trinucleotide repeat in spino bulbar muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1992;1:255-258.
41. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
42. Hazan J, Dubay C, Pankowiak MP. et al. A genetic Linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. 1992;12:183-189.
43. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetics traits. *Trends Genet* 1992;8:288-294.
44. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L. et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable GTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992;255:1253-1255.
45. Riggins GJ, Lokey LK, Chastain JL. et al. Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nature Genet* 1992;2:186-191.
46. Oost BA, Smits AP, Dreesen JC. et al. Validation of linkage-based DNA diagnosis of Fragile X gene carries with the CGG repeat probe. *Am. J. Med. Genet.* 1992;43:320-327.

47. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 1990;18(22):6531-6535.
48. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.2. Baskı.1989.
49. Erdağ B, DNA Parmakizi tekniğine farklı bir yaklaşım. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul 1993.