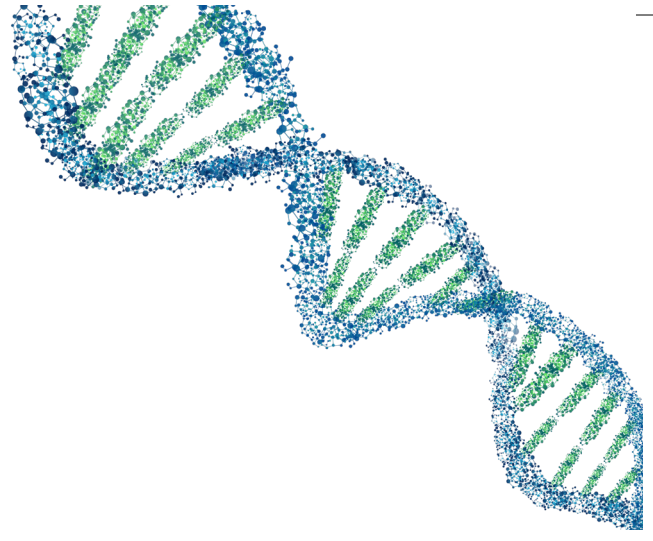


## BÖLÜM 4

### NÜKLEİK ASİT İZOLASYON YÖNTEMLERİ



Fatma Filiz COŞKUN ARI<sup>1</sup>

Günümüzde enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların tanısı, karakterizasyonu ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde yoğun olarak başvurulan nükleik asit temelli analizlerin performansını etkileyen önemli faktörlerden biri de kullanılan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'nın kalitesi ve miktarıdır. Bu bölümde, nükleik asitlerin izolasyon ve analiz yöntemleri hakkında teorik ve pratik bilgiler yer almaktadır.

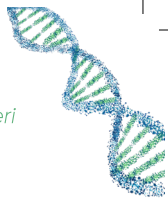
#### Nükleik Asitlerin Yapısı

Her canlının özgün olmasını sağlayan genetik bilginin depolanması, ifade edilmesi ve hücre içi metabolik işleyişin yönetiminden sorumlu **nükleik asit** molekülleri **nükleotit** adı verilen monomerlerden oluşan polimer yapısına sahiptir. Bir nükleotit monomeri ise fosfat grubu, beş karbonlu pentoz şeker ve azotlu organik baz olmak üzere üç farklı bileşen içerir. Nükleotitlerin polimerizasyonu, bir nükleotidin şekerinin 3' karbonuna bağlı hidroksil grubu ile onu takip eden nükleotidin şekerinin 5' karbonuna bağlı fosfat grubu arasında oluşan

“fosfodiester bağı” ile sağlanır. İki çeşit pentoz şekeri (deoksiriboz ve riboz) ve buna bağlı olarak **DNA** ve **RNA** olmak üzere iki farklı nükleik asit polimeri vardır. Organik bazlar da çift-halkalı pürin [Adenin (A) ve Guanin (G)] ve tek-halkalı primidin [Sitozin (C), Timin (T) ve Urasil (U)] olmak üzere iki çeşittir ve nükleotitlerin pentoz şekerinin 1' karbonuna “glikozidik bağ” ile bağlanırlar. DNA polimeri A, G, C ve T, RNA ise A, G, C ve U bazları taşır. DNA ve RNA arasındaki yapısal farklardan bir diğeri de DNA'nın çift zincirli, RNA'nın ise tek zincirli olmasıdır (Şekil 1). Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda nükleotit çeşitleri aynı olmasına rağmen DNA ve RNA moleküllerinin nükleotit sayısı ve dizilişleri canlı türüne göre farklılık gösterir <sup>1,2</sup>.

RNA virüsleri dışında, canlıların tümünde genetik bilgiyi taşıyan nükleik asit DNA molekülüdür. DNA'nın birbirine zıt yönde uzanan çift zinciri, pürin ve primidin bazları arasında oluşan “hidrojen bağları” ile bir arada tutulmaktadır. Nükleotitler arasındaki eşleşmeler son derece spesifik olup, A bazı T ile eşleşirken, G bazı da C ile eşleşir. DNA'nın

<sup>1</sup> Prof. Dr. Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., filiz.ari@ahievran.edu.tr, filizari@hotmail.com



leotit uzunluğunda, stabil olmayan, homopolimerik ve heteropolimerik (A, U, G, C) tiplerden oluşur ve mRNA'ların yıkımında rol almaktadır<sup>41,42</sup>.

Ökaryotik mRNA izolasyonu oligo(deoksiTimin) afinite kromatografisi yöntemi ile manuel veya kit kullanılarak **i**) saflaştırılmış total RNA çözeltisindeki mRNA'ların poli A kuyrukları ile oligo (dT) reçine içeren kolonlara özgün olarak bağlanması, **ii**) oligo(dT) kolona bağlanmayan rRNA ve tRNA'ların yıkama çözeltisi ile kolondan uzaklaştırılması ve **iii**) mRNA'ların oligo(dT) kolondan elüsyonu olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir<sup>20</sup>.

Bakteriyel mRNA izolasyonu ise oldukça zorlu bir işlemdir çünkü saflaştırılmış total RNA örneğinde zaten oranı çok düşük (~%5) olan mRNA'ların çok az bir kısmında (~%1-10) bulunan ve oldukça kısa poli A kuyruğu nedeniyle izolasyon kapasitesi son derece yüksek yöntemler kullanılması gerekmektedir. Bakteriyel mRNA izolasyonu için oligo(dT)<sub>25</sub> bağlı manyetik boncuklar içeren "Dynabeads mRNA direct kit" yönteminin poli A kuyruklu mRNA'ların izolasyonunda hayli etkin olduğu bildirilmektedir<sup>21</sup>. Ancak bu yöntemle örnekteki tüm mRNA popülasyonunun elde edilemediği göz önünde bulundurulmalıdır.

mRNA'ların tümüne gerek duyulan çalışmalarda ise bu amaca yönelik tasarlanmış bir ürün olan "MICROExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit" kullanılabilir. Yöntem, farklı gram pozitif ve gram negatif bakteri türlerinden izole edilmiş total RNA örneklerinden 16S ve 23S rRNA'ların "capture oligonucleotides" taşıyan manyetik partiküller ile yakalanması, rRNA hibritleri taşıyan partiküllerin mıknaatısla toplanması ve sıvı kısım yeni tüpe aktarıldıktan sonra mRNA'ların EtOH ile çöktürülmesi esasına dayanmaktadır<sup>29</sup>.

### Viral RNA İzolasyonu (Hepatit C Virüs Örneği)

Bu "in-house" protokol ile elde edilen RNA'dan beklemeden revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) ile komplementer DNA (cDNA) oluşturulduktan sonra cDNA ve hedef virüse özgü bir primer çifti kullanılarak standart PCR yöntemi ile çoğaltılan ve

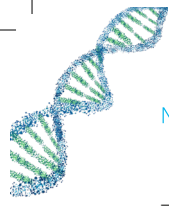
jelde yürütülen PCR ürünü değerlendirilerek RNA virüslerinin tanısında kullanılabilir.

RNaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpüne 800 µl izolasyon reajeni (RNAzol) ve 100 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) karışımı konulduktan sonra üzerine 200 µl hasta serumu, plazma veya homojenize edilmiş karaciğer biyopsi materyali eklenir. Tüp kısa süreli vortekslenir, 15 dakika buz içinde bekletilir ve +4°C'de 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Üst faz yeni tüpe alınır, 600 µl izopropanol ve çökeltmeyi arttırıcı olarak 2 µl glikojen (8 µg/µL) eklenir, kısa süreli vortekslenir, -70°C'de minimum 1 saat (-20°C'de 16 saat) bekletildikten sonra +4°C'de 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı atılır, çökelti üzerine 600 µl %70'lik soğuk EtOH eklenir ve +4°C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, EtOH dökülür ve steril kurutma kâğıdı ile doğrudan temas etmeden çökelti kısa sürede kurutulur ve 20 µl RNaz içermeyen steril saf su ile çözdürülür. Örnek bekletilmeden RT-PCR işlemine alınır<sup>39</sup>.

Son olarak, nükleik asit temelli çalışmalarda başarının, nükleik asit izolasyonu ve takip eden analizlerde kullanılacak doğru yöntemlerin seçilmesi kadar örnek alımı, transportu, saklanması ve deneylerin uygun koşullarda ve deneyimli personel tarafından gerçekleştirilmesi ile doğrudan ilişkili olduğu unutulmamalıdır.

### Kaynaklar

1. Büyükkunal Bal B, Karataş M. Nükleik Asitler, pp: 55-142. In: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (eds), Moleküler Biyoloji. 2007. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
2. Atılı E. DNA, RNA, Genler ve Kromozomlar, pp: 27-56. In: Filik İşçen C, Aktan MB (eds), Genetik ve Biyoteknoloji. 2017. Lisans Yayıncılık, İstanbul.
3. [https://www.researchgate.net/figure/A-short-sequence-A-CTG-of-a-double-stranded-DNA-molecule-Two-nucleotides-are-attached\\_fig9\\_236218402](https://www.researchgate.net/figure/A-short-sequence-A-CTG-of-a-double-stranded-DNA-molecule-Two-nucleotides-are-attached_fig9_236218402) (Erişim: Mayıs, 2022).
4. <https://slideplayer.com/slide/3386535> (Erişim: Mayıs, 2022).
5. Hill CE. Nucleic acid isolation: Overview of sample preparation methods, pp: 119-126. In: Persing DH, Tenover FC, Tang Y, Nolte FS, Hayden RT, Belkum Av (eds), Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice. 2011, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
6. Topal Sarıkaya A. Güncel Organizmalardan DNA İzolasyonu, pp: 71-82. In: Temizkan G. Arda N (eds), Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri, Genomik ve Proteomik Analizler. 2018, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.



7. Sözen E, Yıldırım A, Arslanyolu M, Parmaksız İ. Rekombinant DNA Teknolojisi, pp: 446-517. In: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (eds), Moleküler Biyoloji. 2007. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
8. Coskun Ari FF, Guldemir D, Durmaz R. One-Step Multiplex PCR Assay for Detecting *Streptococcus pneumoniae* Serogroups/Types Covered by 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13). PLoS One 2012; 7(12): e50406.
9. Kessler HH. Extraction of nucleic acids, pp:47-51. In: Kessler HH (ed), Molecular Diagnostics of Infectious Diseases. 2010. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/New York.
10. <https://www.semanticscholar.org/paper/Establishing-a-canine-genome-sequencing-protocol-Heiden-Darlene/bb310373e2eb06860837f618a6eaa2fcb8842535/figure/18> (Erişim: Mayıs, 2022).
11. <https://www.labome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html> (Erişim: Mayıs, 2022).
12. <https://www.thermofisher.com/search/browse/category/us/en/90222171/dna+extraction+and+purification> (Erişim: Mayıs, 2022).
13. <https://www.danagen.es/en/products/rna-purification-kits/danagene-dna-rna-purification-kit/> (Erişim: Mayıs, 2022).
14. <https://www.epigentek.com/catalog/fitamp-plasmase-rem-dna-isolation-kit-p-35.html#gallery2-1> (Erişim: Mayıs, 2022).
15. <https://www.epigentek.com/catalog/epiquick-magbeads-quick-rna-isolation-kit-p-84426.html#gallery2-1> (Erişim: Mayıs, 2022).
16. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/nucleic-acid-purification-thermo-scientific/magjet-magnetic-bead-based.html> (Erişim: Mayıs, 2022).
17. <https://www.bioeksen.com.tr/robotik> (Erişim: Mayıs, 2022).
18. Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. Biosensors and Bioelectronics 2020;169: 112592.
19. Ayoib A, Hashim U, Gopinath SCB, Arshad MK. DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods. Appl Microbiol Biotechnol 2017;101(22): 8077-88.
20. Topal Sarıkaya A. Total RNA ve mRNA İzolasyonu, pp: 113-21. In: Temizkan G, Arda N (eds), Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri, Genomik ve Proteomik Analizler. 2018. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
21. Bijoy K, Mohanty BK, Giladi H, Maples VF, Kushner SR. Analysis of RNA Decay, Processing, and Polyadenylation in *Escherichia coli* and Other Prokaryotes. Methods Enzymol 2008;447: 3-29.
22. Topal Sarıkaya A. Nükleik Asitlerin Analizi, pp: 127-37. In: Temizkan G, Arda N (eds), Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri, Genomik ve Proteomik Analizler. 2018. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
23. <https://www.anamed.com.tr/blog/nukleik-asitlerin-saflik-ve-konsantrasyonunun-belirlenmesi> (Erişim: Mayıs, 2022).
24. <http://www.rotalab.com/tr/urunler/molekuler-spektroskopi/mikro-hacim-spektrofotometre-nano-drop.html>. (Erişim: Mayıs, 2022).
25. <https://www.fishersci.com/shop/products/nanodrop-2000-spectrophotometer/ND2000> (Erişim: Mayıs, 2022).
26. Bardakçı F, Yenidünya AF, Karataş M. Moleküler Biyoloji Teknikleri, Nükleik Asit Analiz Teknikleri, pp: 519-53. In: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (eds), Moleküler Biyoloji. 2007. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
27. <https://biotech.illinois.edu/htdna/samplesubmission> (Erişim: Mayıs, 2022).
28. <https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/is-plasmid-dna-quality-affecting-your-transfections> (Erişim: Mayıs, 2022).
29. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/purify-bacterial-mrna.html> (Erişim: Mayıs, 2022).
30. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. Kuwait Medical Journal 2009;41(2): 117-22.
31. Yamagishi J, Sato Y, Shinozaki N, Ye B, Tsuboi A, Nagasaki M, et al. Comparison of Boiling and Robotics Automation Method in DNA Extraction for Metagenomic Sequencing of Human Oral Microbes. PLoS One 2016;11(4): e0154389.
32. Dimitrakopoulou ME, Stavrou V, Kotsalou C, Vantarakis A. Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples. J Food Sci Nutr Res 2020;3(4): 311-19.
33. [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/6150/mod\\_resource/content/1/3.%20Hafta.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/6150/mod_resource/content/1/3.%20Hafta.pdf) (Erişim: Mayıs, 2022).
34. Winfrey MR, Rott MA, Wortman AT. Small-Scale Plasmid Isolations, pp: 113-194. Unraveling DNA, Molecular Biology for the Laboratory. 1997. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
35. <https://www.qiagen.com/us/product-categories/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/> (Erişim: Mayıs, 2022).
36. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-purification-isolation/cell-lysis-fractionation/cell-lysis-total-protein-extraction.html> (Erişim: Mayıs, 2022).
37. Trung NT, Thau NS, Bang MH, Song LH. PCR-based Sepsis@Quick test is superior in comparison with blood culture for identification of sepsis-causative pathogens. Sci Rep 2019;9(1): 1-7.
38. CDC: Chapter 10: PCR for Detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.pdf>
39. Durmaz R, Otlu B. Hepatit B, C ve TT Virüs İnfeksiyonlarının Tanısında PCR, pp: 201-214. In: Durmaz R (ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001. Nobel Tıp Kitabevleri, Adana.
40. <https://thebiologynotes.com/rna-isolation-protocol/#total-rna-isolation-from-bacterial-cells> (Erişim: Mayıs, 2022).
41. Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. Annu Rev Biochem 1997;66(1): 173-97.
42. Slomovic S, Portnoy V, Liveanu V, Schuster G. RNA Polyadenylation in Prokaryotes and Organelles; Different Tails Tell Different Tales. Crit Rev Plant Sci 2006;25: 65-77.