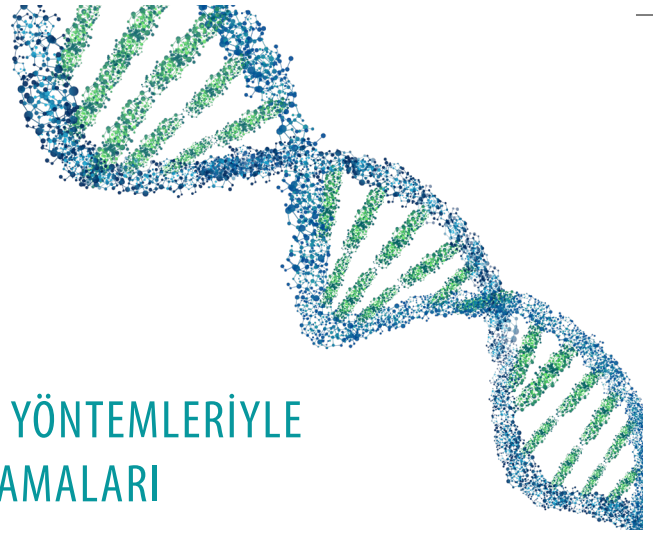


BÖLÜM 20

16S rRNA GENİNİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMLERİYLE ANALİZİ VE MİKROBİYOLOJİDEKİ UYGULAMALARI



Yunus DOĞAN¹
Bülent BOZDOĞAN^{1,2}

Mikrobiyolojinin temel amaçlarından biri mikroorganizmayı tanımlamaktır. Mikroskopi ve kültür bu amaçla kullanılan en eski yöntemler iken serolojik yöntemler ve sonrasında moleküler yöntemler ayırıcı tanıda kullanılmaya başlanmıştır. Klasik yöntemde bir bakteriyi tanımlayabilmek için, o bakterinin çoğalabileceği optimal kültür şartlarına ihtiyaç vardır. Geleneksel olarak bakteriyel patojenleri tanımlamada kültür ve biyokimyasal temelli testler kullanılan "altın standart" yöntemler olarak kabul edilmektedir. Hastalarda enfeksiyona sebep olan bakterinin kültür ile tanımlanması zaman alan bir işlemdir¹. Aynı zamanda çoğalan kültürleri yorumlamak için uzman personele ihtiyaç vardır. Kültür bazlı yöntemlerin limitleri konusunda öne çıkan konular arasında rutin kültür koşullarında anaerobik bakterilerin çoğalamaması, bazı nadir bulunan patojenlerin uygun testler olmadığı için gözden kaçırılabilmesi, birden fazla mikroorganizma üremesi durumunda ürettikleri metabolitler sebebiyle farklı sonuçlar alınabilmesi, bazı patojenlerin düşük üreme hızına sahip olmaları sayılabilir². Tüm

bu kısıtlamalar kültür bazlı yöntemlere alternatif bir yöntemde duyulan ihtiyacı artırmıştır.

16S rRNA Geni

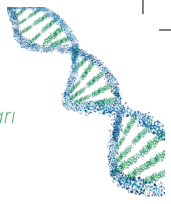
16S ribozomal RNA, ribozomun 30S alt biriminin bileşenidir. Bu RNA'yı sentezleyen gen 16S rRNA geni olarak adlandırılır ve oldukça az miktarda mutasyon geçirmiştir. Bu korunmuş gen, türler arası farklılıkları tayin etmede kullanılmaktadır. Carl Woese ve George E. Fox 16S rRNA geninin filogenetikte kullanılabileceğini keşfetmişlerdir³.

Ribozomu oluşturan RNA'lar arasında yer alan 16S rRNA 30S alt biriminin yapısına katılır ve mRNA'daki Shine dalgarno (ribozom bağlanma bölgesi) dizisine bağlanan diziyi içerir. Aynı zamanda 23S rRNA ile etkileşime girerek ribozomun alt birimlerinin biraraya gelmesine yardımcı olur⁴.

Bakteriyel 16S rRNA geni, 30-100 [baz çifti (bç)] boyutlarında dokuz adet değişken bölge (V1-V9) içerir (Şekil 1). Bu değişken bölgeler, türler arasında farklı seviyelerde değişkenlikler gösterir ve filogenetik tanımlamada oldukça kullanışlıdır.

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, Aydın

² Prof. Dr., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,



dırlar. YND yöntemlerinin ileri kullanımlarıyla hem bir bakteri kolonisindeki mikro ve makro genetik varyasyonlar ortaya konabilecek hem de diğer canlılarla ortak yaşamın neden olduğu varyasyonlar daha iyi anlaşılabilir. Yalnızca 16S rRNA geni analizi ile tür tayininde değil mikrobiyomdaki bakterilerin genomlarının dizilenmesinde de YND yöntemleri kullanılmaktadır²⁹. Çoklu bakteriyel ortamlardan alınan örneklerde *de novo* genomik DNA dizi analizi şimerik genom oluşturma riski taşısa da bu yöntem mikrobiyom dünyasını anlamamıza büyük katkı sunacaktır.

Kaynaklar

- Washington JA. Principles of Diagnosis. In: Baron S editor. In Medical Microbiology. UTMB. Galveston TX USA; 1996.
- Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2015;28(1): 208-236.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. PNAS 1977;74(11): 5088-5090.
- Czernilofsky AP, Kurland CG, Stöffler G. 30S ribosomal proteins associated with the 3'-terminus of 16S RNA. FEBS Lett 1975;58(1-2): 281-284.
- Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nat Commun 2019;10(1): 1-11.
- Kitahara K, Miyazaki K. Revisiting bacterial phylogeny: natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. Mob Genet Elements 2013;3(1): e24210.
- Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 1981;214(4526): 1205-1210.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol 1999;65(11): 4799-4807.
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. J Appl Genet 2011;52(4): 413-435.
- Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature 2012;489(7415): 250-256.
- Biorender. Shotgun Sequencing Sanger vs NGS. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5ef64c17c54d5000aea3d7aa-shotgun-sequencing-sanger-vs-ngs> Accessed 3 August 2022.
- Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. Arch Pathol Lab Med 2013;137(9): 1296-1303.
- Siqueira JF, Fouad AF, Rôças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. J Oral Microbiol 2012;4(1): 10743.
- Ju J, Kim DH, Bi L, Meng Q, Bai X, Li Z, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. PNAS 2006;103(52): 19635-19640.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem 2009;55(4): 641-658.
- Pennisi E. Semiconductors inspire new sequencing technologies. Science 2010;327(5970): 1190.
- Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol 2021;82(11): 801-811.
- Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Mol Genet Metab 2013;110(1-2): 3-24.
- Woese CR, Fox GE, Zablen L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, et al. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. Nature 1975;254(5495): 83-86.
- Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004;17(4): 840-862.
- Muhamad Rizal NS, Neoh HM, Ramli R, A/LK Periyasamy PR, Hanafiah A, Abdul Samat MN, et al. Advantages and limitations of 16S rRNA next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: perspectives from a middle-income country. Diagnostics 2020;10(10): 816.
- Glenn TC, Pierson TW, Bayona-Vásquez NJ, Kieran TJ, Hoffberg SL, Thomas Iv JC, et al. Adapterama II: universal amplicon sequencing on Illumina platforms (TaggIMatrix). PeerJ 2019;7: e7786.
- Illumina. 16S metagenomic sequencing library preparation protocol: preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Illumina Part no 15044223 Rev B. 2013; San Diego, CA.
- Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. Annu Rev Anal Chem 2013;6: 287-303.
- Alkan C, Sajjadian S, Eichler EE. Limitations of next-generation genome sequence assembly. Nat Methods 2011;8(1): 61-65.
- Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD Jr, Rivera MC, Fetteis JM, Serrano MG, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. BMC Microbiol 2015;15(1): 1-14.
- Lobanov V, Gobet A, Joyce A. Ecosystem-specific microbiota and microbiome databases in the era of big data. Environ Microbiome 2022;17(1): 1-17.
- Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. J Clin Invest 2022;132(7): e154944.
- Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. Nature 2019;568(7753): 499-504.