

BÖLÜM 13

Nükleik Asitlerin İzolasyonu, Saflaştırılması, Analizi ve Hibridizasyonu

İsmail BEZİRGANOĞLU¹

Merve ŞİMŞEK GEYİK²

Giriş

Nükleik asitler hücrel rolleri yerine getiren ve önemli biyolojik makromolekül sınıfıdır. Bu makromoleküller yani nükleik asitler, yaşayan tüm organizmalarda mevcuttur. Nükleik asitlerin bulunduğu her organizmayla yapılacak olan çalışmalar için izolasyonu gereklidir. İzolasyon aşamasından sonra nükleik asitlerin diğer hücre bileşenlerinden ayrılması saf hale getirilmesi yapılacak olan çalışmalar için elzemdir. Saflaştırılan bu nükleik asitlerin ileriki çalışmalar için analizinin yapılması da çalışmanın güvenilirliğini artırmak için gerekli bir adımdır. Bu bölümde bir nükleik asitin hücreden izolasyonu, saflaştırılması, analizine yer verilmiştir. Ayrıca nükleik asitlerin tespiti için hibridizasyon yöntemlerine değinilmiştir.

1. Nükleik Asitler

Yeryüzünde bulunan organizmalar kompleks sistemlerdir ve bu sistemlerin doğru bir şekilde yönetilebilmesi için çok fazla bilgi gereklidir. Bu bilgiler hücrelerde nükleik asitler olarak depolanmıştır. Nükleik asitlerin hücrelerde farklı işlevlere sahip olan çeşitleri mevcuttur. **Nükleik asitler**, genetik bilgilerin korunması ve taşınması görevlerini yerine getiren makromoleküllerdir. Bunlar **Deoksiribo nükleik asit (DNA)** ve **Ribo nükleik asit (RNA)** olarak

¹ Doç. Dr., Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, ismail.bezircanoglu@erzurum.edu.tr, ORCID iD: 0000-0003-4079-5998

² Dr., Erzurum Teknik Üniversitesi, merve.simsek49@erzurum.edu.tr, ORCID iD: 0000-0002-4088-183X

sonra preparatlar distile su ile yıkanarak ve havada kurutulur. Kurutulan preparatlar üzerindeki kuyucuklara özel bir solüsyon (citifluor) damlatılarak lamel kapatılır ve floresan mikroskopta incelenir. Bu solüsyon floresan boyaaların solmasını önlemek için kullanılmaktadır (36).

SONUÇ

Organizmalardan izole edilen nükleik asitler genetik araştırmalarda, gen klonlanmasında, adli tıp, DNA parmak izi, taksonomi, evrimsel ilişkilerin araştırılması, hastalık teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. İzolasyon için geliştirilen yöntemler sonucu daha iyi sonuçlar elde edilebilmekte ve bu da çalışmalarını olumlu yönde etkilemektedir. Çalışmaların doğru bir şekilde ilerlemesi için organizmalara özgü saflaştırma yöntemleri tercih edilmelidir. Saflaştırma yöntemleriyle elde edilen nükleik asitlerin analizlerinin yapılarak bir sonraki çalışma için hazırlanması gerekmektedir. Doğruluğu tespit edilen nükleik asitle çalışmalar devam ettirilebilmekte ve daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Hibridizasyon yöntemleri sayesinde nükleik asitler problemler aracılığıyla tespit edilebilmekte yapılan çalışmaların başarısı artmaktadır. Özellikle *in situ* hibridizasyon yöntemleri sayesinde yerinde tespitler yapılabilmektedir. Bu yöntemlerin gelişmesiyle doğruluğu yüksek, hızlı ve güvenilir yeni proseler ortaya çıkmaktadır.

Kaynaklar

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. USA: New York: Garland Science;2002.p. 627.
2. Saenger W, Principles of Nucleic Acid Structure. New York, Springer-Verlag Inc.; 1984. doi:10.1016/0307-4412(85)90046-9
3. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles Of Biochemistry.4th Edition, WH Freeman;2004.
4. Passarge E. Renkli Genetik Atlası. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2000. 34–39, 44–47, 72–73.
5. Herbert A, Karapetyan S, Poptsova M, Vasquez K M, Vicens Q, Vögeli B. A, b and z: The structure, function and genetics of z-dna and z-rna. International journal of molecular sciences;2021; 22(14):7686. doi:10.3390/ijms22147686
6. Higgs PG. RNA secondary structure: physical and computational aspects. Quarterly reviews of biophysics;2000;33(3):199-253. doi:10.1017/S0033583500003620
7. Valentin K, John U, Medlin L. Nucleic acid isolation from environmental aqueous samples. In: *Methods in enzymology*. Academic Press; 2005. p. 15-37.
8. Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. *Parasite*; (2013); 20, 52. doi:10.1051/parasite/2013051

9. Hwang KY, Kwon SH, Jung SO. Miniaturized bead-beating device to automate full DNA sample preparation processes for gram-positive bacteria. *Lab Chip* ;2011;11:3649e55. doi:10.1039/C1LC20692C
10. Neugebauer JM. Detergents: an overview. *Methods Enzymol*;1990; 182:239e53.
11. Moore D, Dowhan D. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Current protocols in molecular biology*;2002;59(1):2-1.doi:10.1002/0471142727.mb0201as59
12. Bogner PN, Killeen AA. Extraction of nucleic acids. *Molecular diagnostics: For the clinical laboratorian*;(2005); 25-30. doi:10.1385/1-59259-928-1:025
13. Broemeling DJ, Pel J, Gunn DC. An instrument for automated purification of nucleic acids from contaminated forensic samples. *J Lab Autom* 2008;13:40e8. doi:10.1016/j.jala.2007.10.008
14. Hourfar MK, Michelsen U, Schmidt M. High-throughput purification of viral RNA based on novel aqueous chemistry for nucleic acid isolation. *Clin Chem*; 2005;51:1217e22. doi:10.1373/clinchem.2005.048603
15. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem*;2010;82:3e10.doi:10.1021/ac9013989
16. Chiu ML, Lawi W, Snyder ST, Wong PK, Liao JC, Gau V. Matrix effects—a challenge toward automation of molecular analysis. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*;2010;15(3):33-242.doi:10.1016/j.jala.2010.02.001
17. Mark AM, Butler GC. The isolation of sodium desoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem*; 1951;190: 165e76. doi:10.1016/S0021-9258(18)56056-7
18. Cler L, Bu D, Lewis C, Euhus D. A comparison of five methods for extracting DNA from paucicellular clinical samples. *Molecular and Cellular Probes*;2006;20:191–196.doi: 10.1016/j.mcp.2005.12.003
19. Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *Journal of analytical toxicology*;1995;19(6):359-374. doi:10.1093/jat/19.6.359
20. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*;1997;25:4692–4693.doi:10.1093/nar/25.22.4692
21. Thangjam R, Maibam D, Sharma JG, A simple and rapid method for isolation of DNA from imbibed embryos of *Parkia timoriana* (DC.) Merr. for PCR analysis. *Food, Agric. Environ.*;2003;1:36–38.
22. Yuan S, Cohen DB, Ravel J. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS ONE*;2012;7:e33865.doi:10.1371/journal.pone.0033865
23. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci*;1979; 76:615e9. doi:10.1073/pnas.76.2.615
24. Rivero E, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes, FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology-Research and Practice*;2006;202(7):523529.doi:10.1016/j.prp.2006.02.007
25. Senguvan B, Baris E, Oygur T, Bertkas, M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *International journal of medical sciences*;2014;11(5):494.doi:10.7150%2Fijms.8842
26. Nilsen TW. The fundamentals of RNA purification. *Cold Spring Harbor Protocols*;2013(7):pdb-top075838.
27. Pawlowski K, Kunze R, De Vries S, Bisseling T. Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant tissues. *Plant molecular biology manual*;(1994);231-243.doi:10.1007/978-94-011-0511-8_16

28. Shen C. Diagnostic Molecular Biology. January 2019 In book; pp.143-166.
29. Varma A, Padh H, Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*; (2007);2(3):386-392. doi:10.1002/biot.200600195
30. Puchooa D, Khoyratty SUSS. Genomic DNA extraction from *Victoria amazonica*. *Plant Molecular Biology Reporter*;2004;22(2):195a.
31. Huang Q, Fu WL. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*;2005;43(8): 841-2.
32. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Mosby Inc., St. Louis;1998;140-144.
33. Brown T. Southern blotting. *Current protocols in molecular biology*;1993;21(1):29. doi:10.1002/0471142727.mb0209as21
34. He SL, Green R. Northern blotting. In *Methods in enzymology*;2013;530:pp.75-87.
35. Ozdemir K, Muranlı FG, Kanev M. In situ Hibridizasyon Yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*; 2015;3(2): 613-621.
36. Borekci G. Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminin klinik mikrobiyolojide kullanımını. *Türk Mikrobiyol Cem. Dergisi*; 2010; 40(3):131-142.