DNA İzolasyonu

Doç. Dr. İnci Başak Müştak
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji ABD

DNA İzolasyonu hangi amaçlarla yapılır?

- Klonlama
- Teşhis (PCR, Hibridizasyon yöntemleri v.b)
- Tiplendirme (RFLP, PFGE v.b)
- Korunma (DNA aşıları)
- Adli tıp
- Analık babalık tayini

DNA İzolasyonu

1. Hücrenin parçalanması
2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve böylece DNA'nın çözünür duruma gelmesi
3. Enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması

DNA İzolasyonu

- Molekülün fiziksel özellikleri, diğer moleküllerden ayırılmasına olanak sağlar
- En basit izolasyon; tuz, sabun ve alkol iledir
  - Sabun: hücre yapısını bozar
  - Tuzlar DNA'yı selektif olarak bağlar
  - Alkol DNA'yı presipite eder
- Özel solüsyonlar
- İnkübasyon (kaynatma yöntemi)
- Santrifüjleme
- Alkol eklenmesi (etanol veya izopropanol)
- Soğutma ve santrifüjleme

DNA İzolasyonu

- DNA tüpün dip kısmında pelet olarak toplanır
- DNA cama yapışır
- Camın etanolle muamelesi DNA'yı camdan ayırır

- DNA ve RNA benzer fiziksel özellikler gösterir
- Saflaştırmada ortamda bulunan RNA'nın parçalanması için bazı enzimler (**RNAse**'lar) kullanılır
- DNA molekülüne bağlanan proteinleri parçalamak için enzimler (**Proteazlar**, **Proteinase-K**) kullanılır

Hücre Duvarının Parçalanması

1. Fiziksel olarak (dondurup-çözme) yada Kimyasal maddelerle (lizozim, EDTA) hücre duvarının zayıflatılması
2. İyonik (SDS) veya iyonik olmayan (Triton X-100) deterjanlar kullanılarak parçalama işlemi

- Parçalama işleminde kullanılacak yöntem temelde 2 faktöre bağlıdır:
  - DNA'nın boyu
  - Kullanılacak organizma

Bakterilerde; lizostafin (Stafilokoklar), lizozim (Streptokoklar), proteinaz K

Mayalarda; novozim

DNA-Protein Kompleksinin Çözülmesi

- Denatürasyon : Fenolle proteinlerin denatüre edilerek ortamdan uzaklaştırılmaları
- Burada önemli olan kullanılan fenolün pH'sıdır; çünkü alkali pH'ta (pH 8.0) RNA'lar uzaklaştırılırken, asidik pH'ta (pH 5.0) DNA'lar uzaklaştırılır

DNA’nın Ortamdaki Diğer Moleküllerden Ayrılması

- DNA’nın fiziksel ve kimyasal etkenlere maruz bırakılması ile sağlanır
  - DNA’nın kimyasal olarak çöktürülmesi: örn.: etanol kullanılarak
  - Çökelmeyi artırıcı bazı kimyasallar da (örn.: izopropanol) kullanılır
  - DNA’nın fiziksel olarak çöktürülmesi: santrifüjleme

Nükleik Asit Purifikasyonu

- Nukleik asitin daha sonraki kullanım amacı gerekli olan saflık düzeyini belirlemektedir
- İzolasyonu takiben amaca göre purifikasyon uygulanmaz ya da birbirini izleyen çoklu aşamalar halinde uygulanır
  - En basit purifikasyon işlemi % 70'lik etanol ile muamele- tuzları uzaklaştırır
  - Fenol/kloroform uygulaması ortamdan proteinleri uzaklaştırır
- Kolon kromotografisi: küçük DNA fragmentlerini ve nükleotidleri uzaklaştırılması
- Sezyum-yoğunluk santrifüjlemesi (cesium density santrifugation): yüksek saflık derecesine sahip DNA eldesi
- Elektroforez ve bunu takiben jelden kesilerek de saf olarak elde edilebilir

Materyal

- İdrar
- Biyopsi ve katı doku materyali (organ v.b)
- Farengeal ve ağız yıkantısı
- Formalinle fikse edilmiş parafinlenmiş doku
- Serebrospinal sıvı (BOS)
- Kan

İzolasyonda Kullanılacak Malzemeler

- Nukleaz enzimlerinden ari (nuclease free, DNAase, RNAase-free, PCR-grade) plastik sarf malzemeleri (ependorf tüpler, filtreli pipet uçları)
- Sadece bu amaç için kullanılan otomatik pipetler
- Su banyosu veya ısıtma bloğu
- Soğutmalı santrifuj, vorteks, steril kabin, tüp rockları, ice-bucket, homojenizatörler

İzolasyonda Kullanılacak Solüsyonlar

- TE (Tris-EDTA) buffer
- DEPC (dietilpirokarbonat)'lı su, distile su
- PBS, NaCl (%0.9'luk)
- Proteinaz-K (10mg/ml)
- Lizostaphin, lizozim enzimi, RNAase
- Lizis buffer (SDS+TNE, Tris-HCl, NaCl, EDTA)
- Fenol, kloroform, izoamilalkol (ayrı ayrı ya da karışım halinde)

DNA İzolasyon Yöntemleri

- İzole etmeden direkt kullanım
- Kaynatma yöntemi
- Fenol/kloroform ekstraksiyonu
- Alkali-lizis yöntemi
- Ticari kitler

Hangi yöntem?

- Harcanacak toplam zaman ve işgücü
- Teşhis açısından izolasyon yönteminin güvenilirliği
- Kontaminasyon riskleri
- Amplifikasyon için yeterli miktarda ve saflıkta DNA örneğinin elde edilmesi
- Ne kadar çok işlem o kadar DNA kaybı!

İzole Etmeden Direkt Kullanım

- Özellikle bakteri kültürlerinde, katı besiyerlerinde izole edilen bakteri kolonileri alınarak, template DNA olarak direkt PCR karışımına eklenir

Kaynatma Yöntemi

1. Nukleaz içermediği bilinen bir mikrosantrifüj tüpüne 500 µl steril su eklenir
2. Katı besiyerinde üretilmiş bakteri kolonisi öze ile alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak süspanse edilir
3. Vorteksleme yapıldıktan sonra tüp su banyosunda 100°C'de 5-10 dk. tutulur
4. Hazırlanan bakteri lizatından 1-5 µl alınarak PCR testinde template DNA olarak kullanılır

Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu

- Parçalanmış numuneleri bir fenol-kloroform çözeltisi ile karıştırmak ve birkaç dakika santrifüjlemek gerekir
- Santrifüjden sonra, üç faz görülür:
  - Üstte nükleik asitler içeren bir sulu faz,
  - Bir altta lipidlerin organik fazı
  - Proteinlerden oluşan bir interfaz.
- Sulu faz uzaklaştırılır ve DNA'yı saflaştırmak ve konsantre etmek için etanol çökeltmesi kullanılır

Alkali Lizis Yöntemi

- Temeli; ortamdaki pH değişimlerinin kromozomal ve plazmid kökenli DNA parçalarına farklı etki etmesi yatmaktadır.

Ticari Kitler

- Genomic DNA isolation kit (Thermo Fischer Scientific, USA)
- DNA isolation kit for blood/bone marrow/tissue (Roche)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- DNeasy Tissue Kit / QIAamp DNA Mini Kit / QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre)

İzole Edilen DNA'nın Saklanması

- DNA TE (Tris-EDTA, pH 7.4-8.3) tamponu, DEPC (dietilpirokarbonat)'li su ya da sadece steril distile su içerisinde saklanmalıdır
- DNA her ne kadar oda sıcaklığında bile saklanabilsede
  - Günlük saklamalarda 4°C
  - Uzun süreli saklamalarda -20°C
  - Daha uzun süreli saklamalarda -70°C tercih edilmelidir.