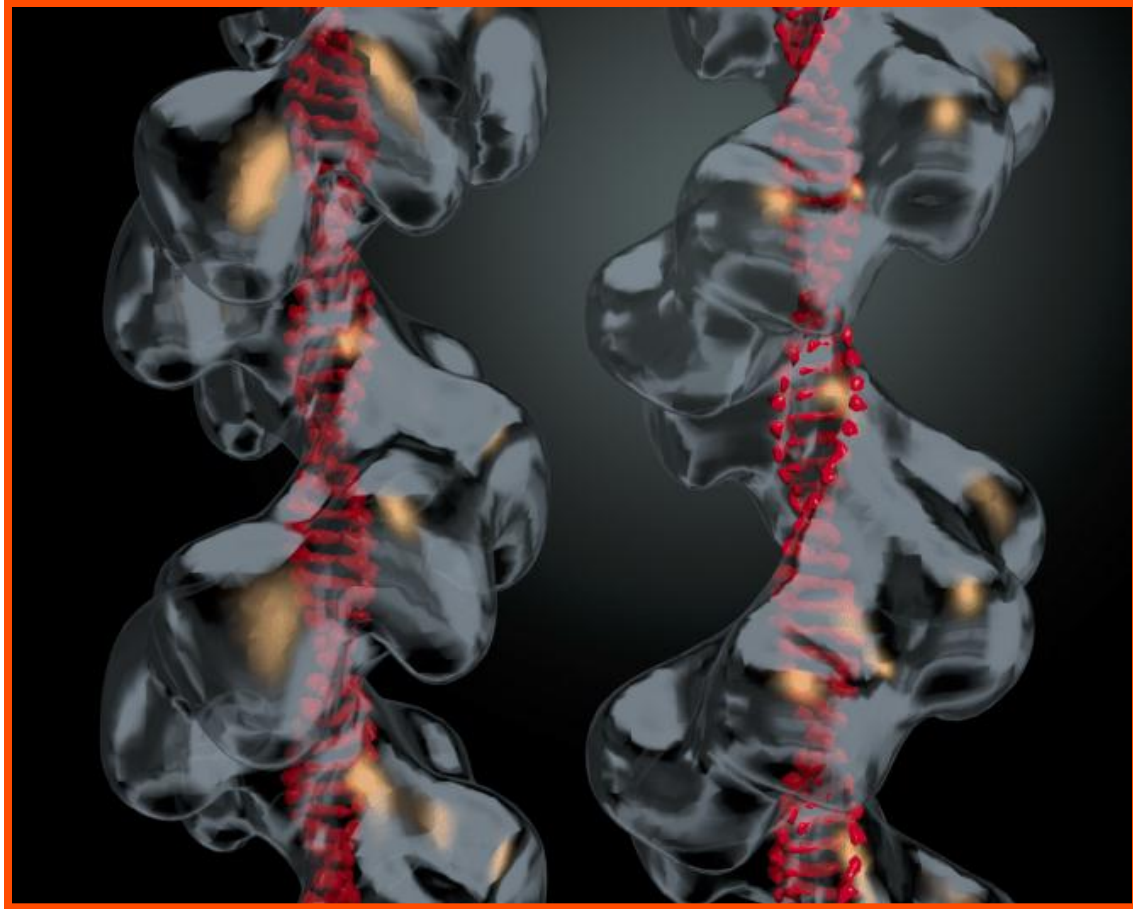


# 3. Hafta

# DNA izolasyonu hangi amaçlarla yapılır?





- Klonlama
  - Teşhis
- PCR



Hibridizasyon yöntemleri (Southern blotting)



- Tiplendirme (RFLP)
  - Korunma
- Örn. DNA aşıları

© 1997 Randy Glasbergen.  
E-mail: randy@glasbergen.com



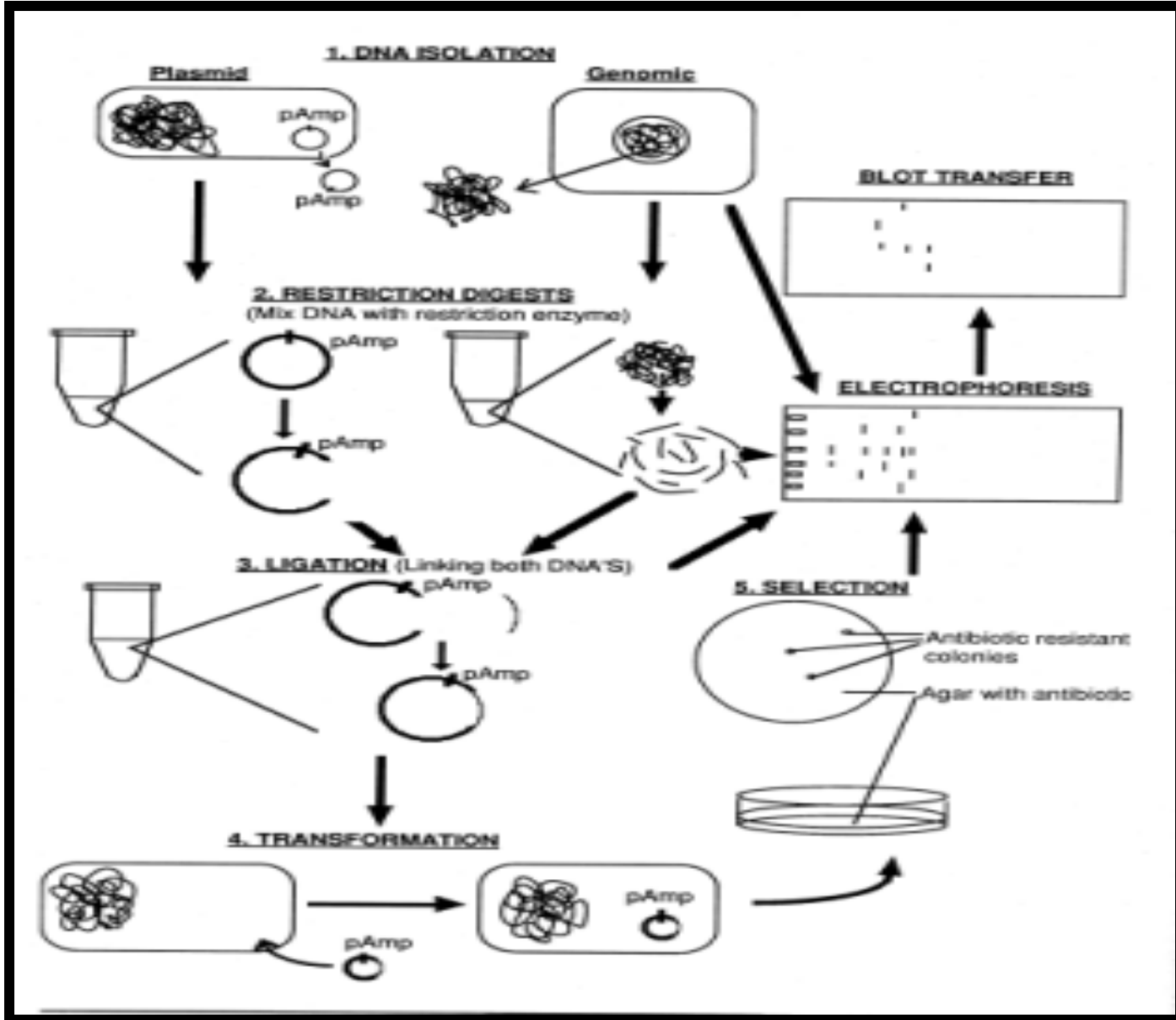
**“You don’t look anything like the long haired, skinny kid I married 25 years ago. I need a DNA sample to make sure it’s still you.”**

- DNA fingerprinting ile adli tıp
- analık babalık tayini

**Astro do cinema  
suspeita de traição  
e pede teste de DNA.**



# Moleküler (DNA) Klonlamanın Aşamaları



# **DNA İzolasyon ve Purifikasyon (Saflaştırma) Prensipleri**

# DNA İzolasyonu



- Bu molekülün fiziksel özellikleri bize onu diğer moleküllerden ayırma şansını sağlar
- DNA – en basit izolasyon tuz, sabun & alkol
  - sabun hücre yapısını bozar
  - tuzlar (özellikle de  $\text{Na}^+$ ) DNA'yı selektif olarak bağlar
  - Alkol DNA'yı presipite eder

# DNA İzolasyonu-2



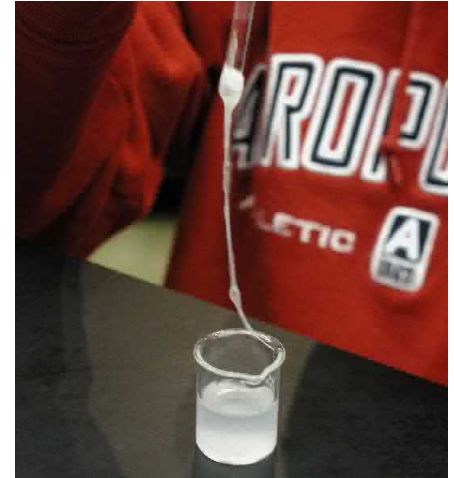
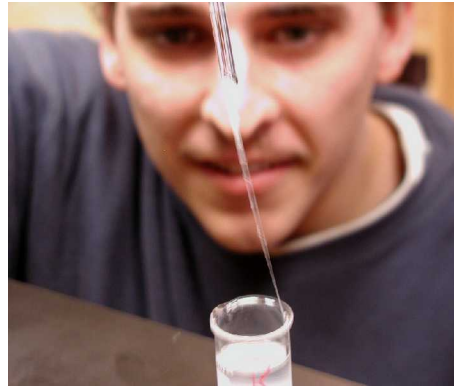
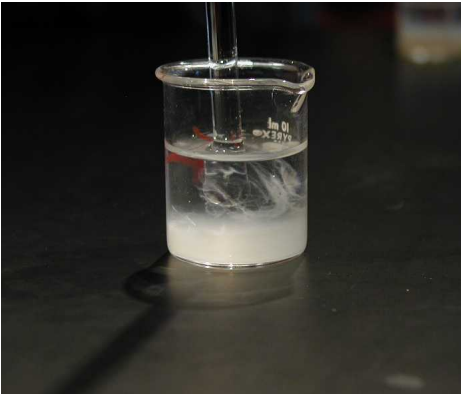
- Özel solüsyonlarda (örn. Lizis sol.) hücreler ezilir ve parçalanır.
- İnkubasyon (çoğunlukla yüksek sıcaklıklarda; kaynatma yöntemi)
- Hücre kalıntılarının uzaklaştırılması-santrifüjleme
- Alkol eklenmesi (etanol veya izopropanol)
- Soğutma ve santrifüjleme
- DNA tüpün dip kısmında pelet olarak toplanması



# DNA İzolasyonu-3



- DNA cama yapışır
- Bu özelliğinden purifikasyonunda faydalanılabilir
- Camın etanol ile muamelesi DNA'yı camdan ayırır



# DNA İzolasyonu-4



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

# DNA İzolasyonu-5



- DNA hücrede bazı proteinler (histonlar, histon olmayan proteinler, High mobility group (HMG) proteinler) ve RNA ile bir kompleks halinde bulunur. Viruslar gibi m.o.larda da bir protein kılıfı içerisinde yer alır.
- DNA izolasyonu, değişik organizma gruplarında hatta aynı organizma grubu içerisinde değişmekle birlikte temelde 3 aşamadan meydana gelir:
  1. Hücre duvarının parçalanması
  2. DNA-protein kompleksinin çözülmesi
  3. DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması

# Hücre Duvarının Parçalanması:



- 1. İlk aşama duvarın zayıflatılmasıdır:
  - Fiziksel olarak (dondurup-çözme)
  - Kimyasal maddelerle (lizozim, EDTA)
- 2. Parçalama işlemi:
  - İyonik deterjanlar kullanılarak (sodium dodecyl sulphate, SDS)
  - İyonik olmayan deterjanlar kullanılarak (Triton X-100)
- Kimyasal uygulanma süreleri her organizmaya göre farklılık gösterir
- Parçalama işleminde kullanılacak yöntem temelde 2 faktöre bağlıdır:
  - 1.DNA'nın boyu
- Örn.: 15 kb'den büyük DNA'lar fiziksel etkenlere karşı çok duyarlı olduklarından uygulama süresi en aza indirgenmeli ve dikkatli çalışılmalıdır
  - 2.Kullanılacak organizma
- Organizmanın hücre duvarı içeriği de parçalamada farklı kimyasalların kullanılmasını gerektirebilir:
- Bakterilerde----- lizostafin (Stafilokoklar), lizozim (Streptokoklar), proteinaz K
- Mayalarda ----- novozim

Örn.: *Shizosaccharomyces pombe*

# DNA-Protein Kompleksinin Çözülmesi



- Denatürasyon ----- fenol ekstraksiyonu
- Fenolle proteinler denatüre edilerek ortamdan uzaklaşmaları sağlanır.
- 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
- Santrifüjleme hızı ayrılması istenen molekülün ağırlığına göre değişkenlik gösterir.

# Nükleik Asit Purifikasyonu



- Nükleik 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

# Nükleik Asit Saflığı



- Kolon kromatografisi – küçük DNA fragmentlerini ve nukleotidleri uzaklaştırılması
- Sezyum-yoğunluk santrifüjlemesi (cesium density santrifugation)– yüksek saflık derecesine sahip DNA eldesi
- Elektroforez ve bunu takiben jelden kesilerek de saf olarak elde edilebilir



# **Çeşitli Klinik Materyallerinin PCR'a Hazırlanması**

# Örnek Hazırlanması ve Saklanması

- İdrar  
Bazen, idrar PCR inhibe edici maddeler içerebilmektedir.
- Biopsi ve katı doku örnekleri  
Doku örnekleri soğuk izotonik tuz solüsyonlarına alınarak mümkün olan en kısa sürede laboratuvara gönderilirler. Örnek izotonik solüsyondan hemen alınarak temiz bir tüpe alınır ve sıvı azot içerisine daldırılarak dondurulur.

# Farengeal ve ağız yıkantıları

- Orofarengeal mukus iki ağız yıkantısı birkaç  $\mu\text{g}$ 'lık DNA
- %0.9'luk NaCl (10 ml) kullanılarak hipotonik hücre parçalanmasını önlenmesi
- 1-50 ml örnek 350 x g'de 10-30 dk. santrifüj
- pelet 1-3 ml %0.9'luk NaCl veya PBS ile yıkanır
- daha küçük bir santrifuj tüpü 350 x g 5dk. santrifüj
- pelet 50-200  $\mu\text{l}$  bidistile su süspanse edilir
- pelet süspansiyonu ve supernatant  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de ekstraksiyon için saklanır.

# Formalinle fikse edilmiş parafinlemiş dokular

- Doku kesitlerindeki parafin organik bir çözücü (örn. ksilen) ile uzaklaştırılır
- *Örneğin saklanma süresi ve fiksatiflerin kalitesine* bağlı olarak çoğaltılabilen DNA fragment miktarı çoğunlukla <650 bp olacaktır
- organik çözücü uygulamasını proteinaz K uygulaması izler
- Fenol-kloroform ekstraksiyonu

# İdrar

- PCR inhibitörleri
  1. 50 ml idrar, 10-30 dk. 350 x g'de santrifüjleme
  2. Oluşan pelet bir kez %0.9'luk NaCl ile yıkanarak 350 x g'de 5dk. 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınır.
  3. Pelet 10-100  $\mu$ l'lik steril bidistile su ile süspansiyon edilir.
  4. Süspansiyon pelet ve eşit hacimdeki supernatantı  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır.

# **Kraşe (balgam) materyalinden mikobakteriyel DNA izolasyonu**

- Mikobakteriyel hücre duvarının özel yapısı
- Mikobakteriyel partiküllerin konsantrasyonu
- Farklı klinik materyal farklı metotlar gerektirebilir
- Fakültatif intrasellüler patojen olmaları

# Kraşe (balgam) materyalinden mikobakteriyel DNA izolasyonu-2

1. Örneklere eşit hacimde 20mM'lık NaOH, %0.5'lik w/v NALC (N-Acetyl-L-Cystein) solüsyonu eklenir (dekontaminasyon)
2. Örnekler iyice vortekslenir, 5 dk mevcut mukusun lizisi için beklenir.
3. DNA'nın önceden hazırlanan örneklerden ekstrakte edilmesi:
  - a) Proteinaz-K lizisi ve bunu izleyen fenol kloroform ekstraksiyonu
  - b) Alkali-lizis yöntemi

# Serebrospinal sıvı (BOS)

- çoğunlukla 5 hücre/ $\mu$ l içermekte
- PCR ile teşhis için çok az miktarda örnekleme yapılabilmektedir
- 1 ml'lik BOS 10 dk. 350 x g'de santrifüj
- pelet PBS ile bir kez yıkanır.
- Supernatant ve pelet  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır.



# DNA İzolasyonunda Kullanılacak Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması



# Ekipman ve 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

# Solüsyonlar

- TE (Tris-EDTA) buffer
- DEPC'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



# DNA İzolasyon Yöntemleri

- En kolayı: izole etmeden direkt kullan
- Kaynatma yöntemi
- Fenol/kloroform ekstraksiyonu
- Alkali-lizis yöntemi
- Ticari kitlerin üretici firma direktifleri doğrultusunda kullanılması

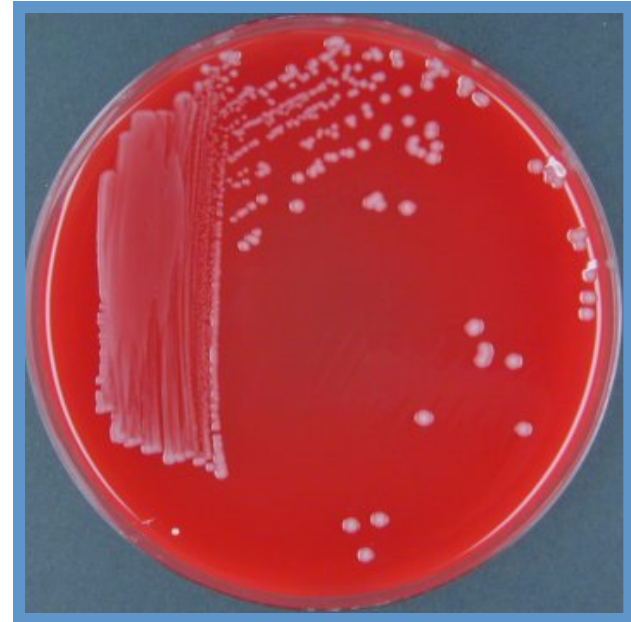
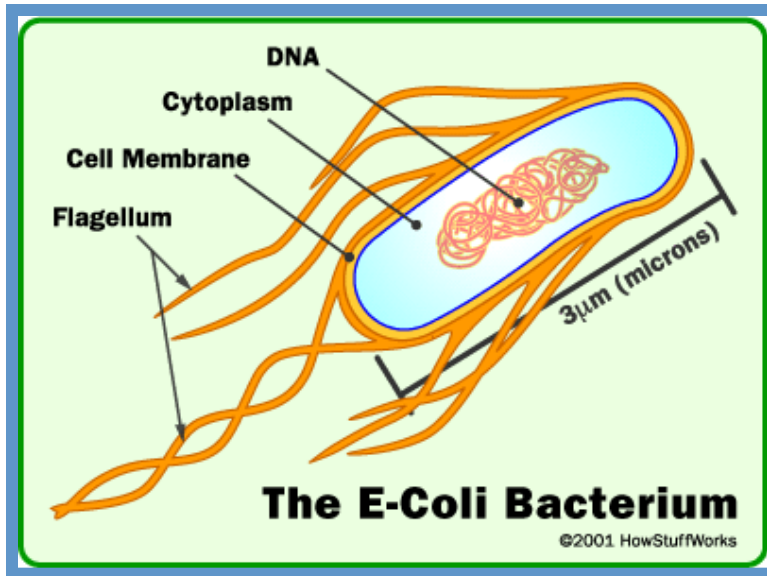
# Hangi DNA yöntemi?



- 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 etme direkt kullan!!!

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

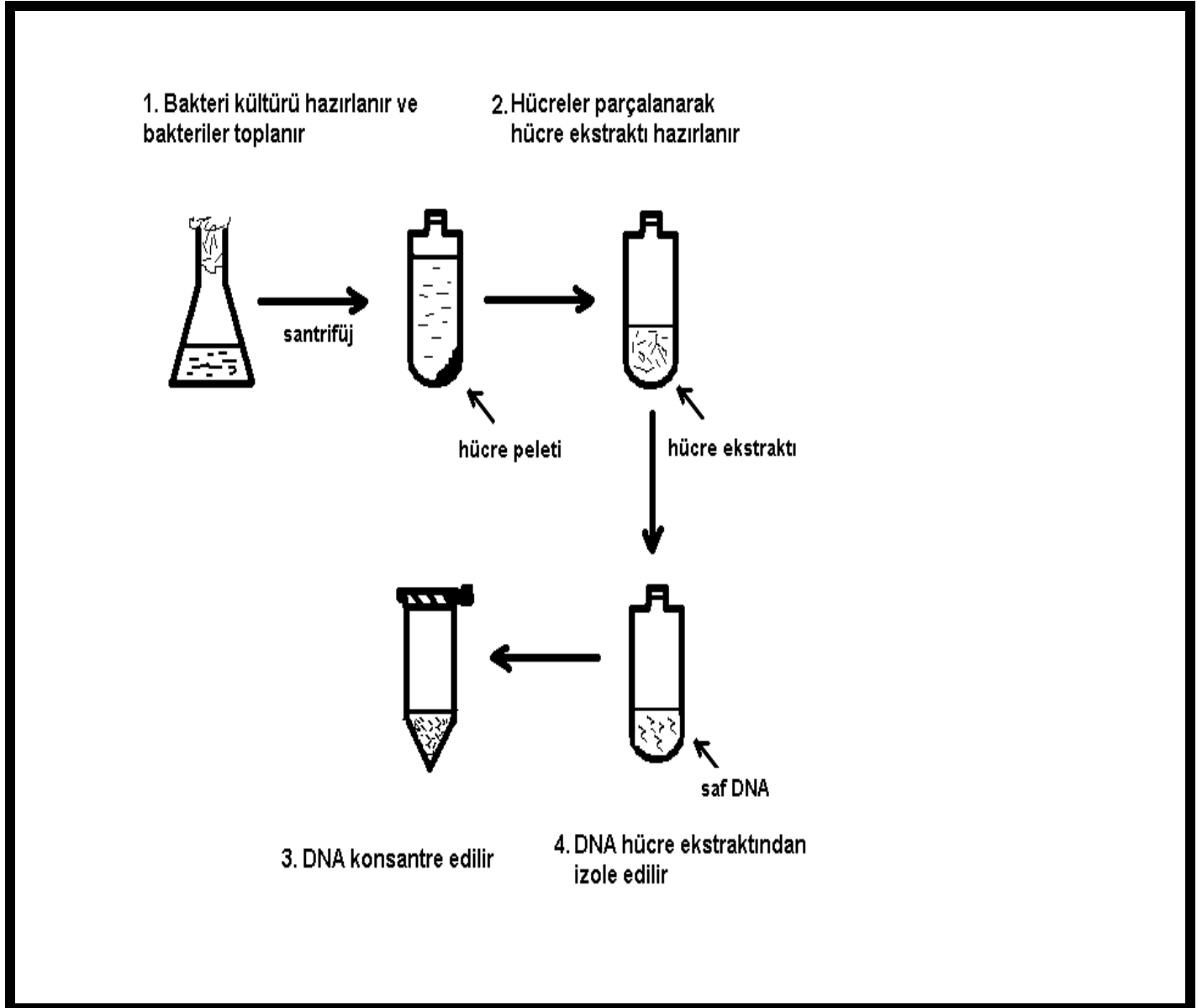


# Kaynatma Yöntemi-1

- Özellikle *Gram negatif* bakterilerden DNA izole edilirken:
  1. Nukleaz içermediği bilinen bir mikrosantrifüj tüpüne 500  $\mu$ l 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  $\mu$ l alınarak PCR testinde template DNA olarak kullanılır.



# Bakteriden DNA izolasyonu



# Kaynatma Yöntemi-2

1. Yaklaşık 10 mg'lık doku örneği, 30  $\mu$ l'lik tam kan, 2.5 mm'lik kan damlası 1.5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine aktarılır ve hacim PBS ile 100  $\mu$ l'ye tamamlanır.
2. 100  $\mu$ l 0.1 M'lık NaOH örneklerle eklenir, tüpün kapağı kapatılır, iğne ile kapak üstten delinir ve örnekler 5 dk. kaynatılır.
3. 5 dk. 13000 x g'de santrifüjlenir.
4. Supernatant yeni bir tüpe aktarılır ve bunun 1-10  $\mu$ l'si PCR'da kullanılır.

# Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu için hazırlık

- Sıvı azot
- Steril PBS
- Lizis tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, % 0.5 SDS ve 1 mg / ml'de proteinase-K hemen kullanımdan önce eklenir)
- Fenol
- Kloroform / izoamil alkol (24:1)
- 3 M sodium acetate (pH 5.2)
- absolut etanol, -20°C
- % 70'lik etanol -20°C
- ultrapure water (PCR grade, DEPC-treated)

# Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu-1

1. Dokular bir doku homojenizatörü ya da steril havan içerisinde sıvı azot kullanılarak iyice ezilir ve toz haline getirilir ve daha sonra bu toz mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Taze doku örnekleri direkt olarak mikrosantrifüj tüpüne alınır. (homojenizasyon)
2. lizis tamponu 50 mg'lık doku başına 0.5 ml olacak şekilde eklenir ve 37°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkube edilir. (Proteinaz-K ile lizis)
3. Eşit hacimde fenol örneklere eklenir ve iyice vortekslenir ve fazlar 13000 x g'de 5 dk. santrifüjlenerek ayrılır. (fenol ekstrak.)
4. Üstteki sıvı faz ara faza dokunulmadan dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne eklenir.
5. Örnekler kloroform / izoamil alkol (24:1) karışımıyla tekrar ekstrakte edilir ve üst sıvı faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. (kloroform ekst.)

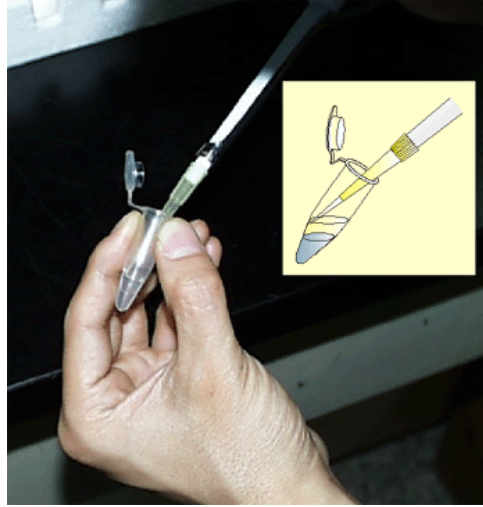
# Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu-2

6. 0.1 hacimlik 3 M'lık NaOAc (pH 5.2) örneklere eklenir, karıştırılır, daha sonra 2.5 hacim soğuk etanol eklenir ve DNA'nın presipite olması için 1 saat oda sıcaklığında beklenir. (presipitasyon)
7. DNA santrifüjlenerek (13000 x g, 10 dk) peletlenir ve solüsyon dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır.
8. Elde edilen pelet % 70'lik soğuk etanol içerisinde yıkanır ve 6. aşamadaki gibi santrifüjlenir. (yıkama)
9. Etanol uzaklaştırılır, artanın kağıt havlu üzerinde tüp ters çevrilerek kaybolması sağlanır. Tüpler 30 dk. bu şekilde havada kurutulur.
10. DNA 100-200 µl steril suda çözündürülür. Bu hazırlanan DNA'nın 1 µl'si PCR testinde kullanılır.

## Homojenizasyon



## Üstteki sıvı fazın pipetle alınması



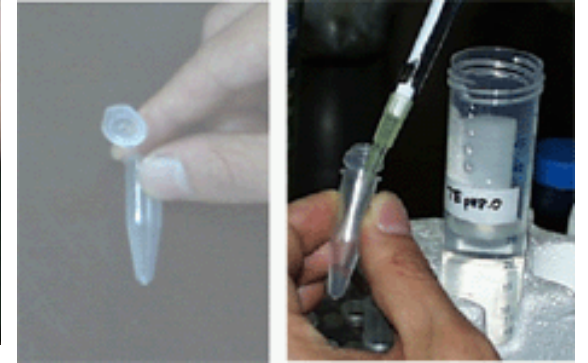
## Etanolun uzaklaştırılması



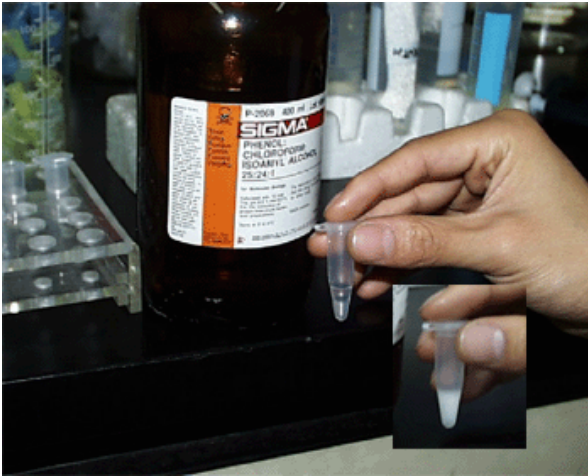
## Etanol ve izopropanol sonrası tüpler çevrilerek karıştırılır



## DNA'nın çözdürülmesi



## Fenol ekstraksiyonu



# Alkali-Lizis Yöntemi

- farklı DNA kaynaklarından, PCR'a uygun DNA eldesinde hızlı bir metot
- Sert dokular, biyopsi materyalleri
- rutin olarak, bütün vücut sıvı ve dokularından teşhis amaçlı DNA ekstraksiyonunda kullanılmakta
- Örn. *Cytomegalovirus* ve mikobakteriyel DNA'nın PCR ile saptanması
- kros-kontaminasyon riskinin düşük olması.
- alınan örnek tüm prosedür boyunca aynı tüpte kalmakta ve örnek mineral yağ ile kaplanmaktadır ki bu da fiziksel bir koruyucu olmaktadır.

# Alkali-Lizis Yöntemi-2

1. Materyallere eşit hacimde steril su eklenir. Sert dokular, hücre peletleri ve biopsi örnekleri 2 kez dondurulup çözündürülür. Bunun için ependorf tüpleri, sıvı azot ve kaynar su kullanılır. Eğer doku çok sert ise bu işlem öncesinde homojenize edilmeye çalışılır.
2. Doku homojenizatının üzerine 1.5 ml'lik ependorf tüpünde 10-500  $\mu$ l (10  $\mu$ l  $10^5$  hücre için; 100  $\mu$ l  $5 \times 10^6$  hücre için; en az hücre ya da doku süspansiyon hacmi ile aynı hacimde olacak şekilde) 50 mM'lık NaOH eklenir.
3. Şiddetli şekilde vortekslenir. Hücre peletlerinin iyice süspansiyon edilmesine dikkat edilmelidir.
4. Hafifçe santrifüjlenir.
5. Materyalin üzeri 150  $\mu$ l mineral yağ (Sigma M-5904) ile kaplanır.
6. Örnekler 10 dk. 95°C'lik ısıtıcı blokta tutulur.
7. Örnekler, 1 M Tris-HCl, pH 7.0 ile nötralize edilir. Mineral yağ altına doğru miktar pipetlenir. (50  $\mu$ l NaOH için 8  $\mu$ l Tris-HCl kullanılır).
8. İzole DNA  $-70^\circ\text{C}$ 'de saklanır.



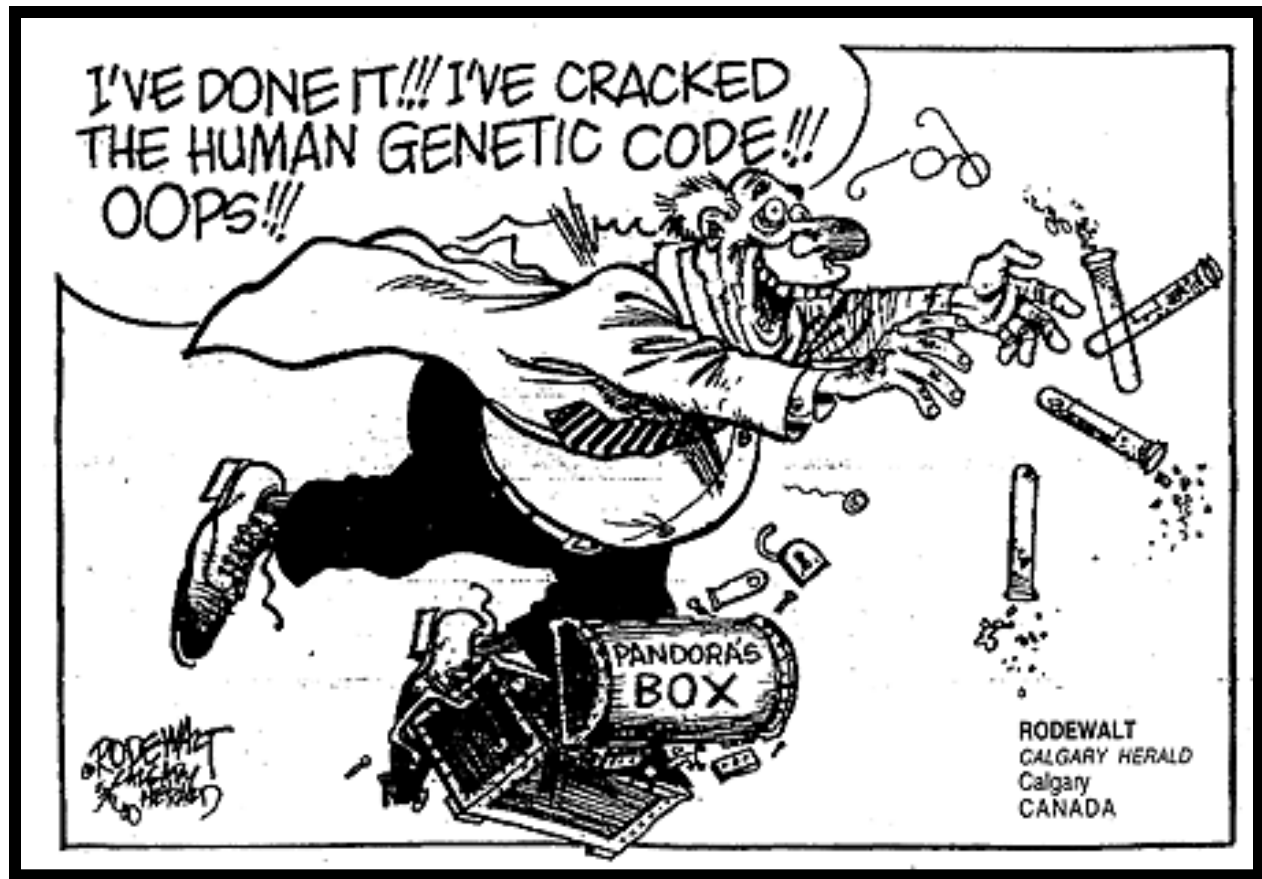
# Ticari DNA İzolasyon Kitleri

- Genomic DNA isolation kit (Fermentas)
- 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)
- 200-400 € arasında değişen fiyatlar

# İzole Edilen DNA'nın Saklanması

- DNA TE (Tris-EDTA, pH 7.4-8.3) tamponu, DEPC (diethylpyrocarbonat)'li su ya da sadece steril distile su içerisinde saklanmalıdır.
- DNA her ne kadar oda sıcaklığında bile saklanabilse de
- Günlük saklamalarda 4°C
- Uzun süreli saklamalarda -20°C
- Daha uzun süreli saklamalarda -70°C tercih edilmelidir.
- Yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA'nın sıkça dondurulup çözülmesi DNA'da mekanik parçalanmaya yol açacağı unutulmamalıdır

# DNA İzolasyonunda Karşılaşılabilecek Sorunlar



# Bunlar;

- Kros-kontaminasyon
- Çevresel kaynaklı kontaminasyon
- DNA'nın hatalı manipulasyona bağlı kaybı
- Yetersiz DNA eldesi