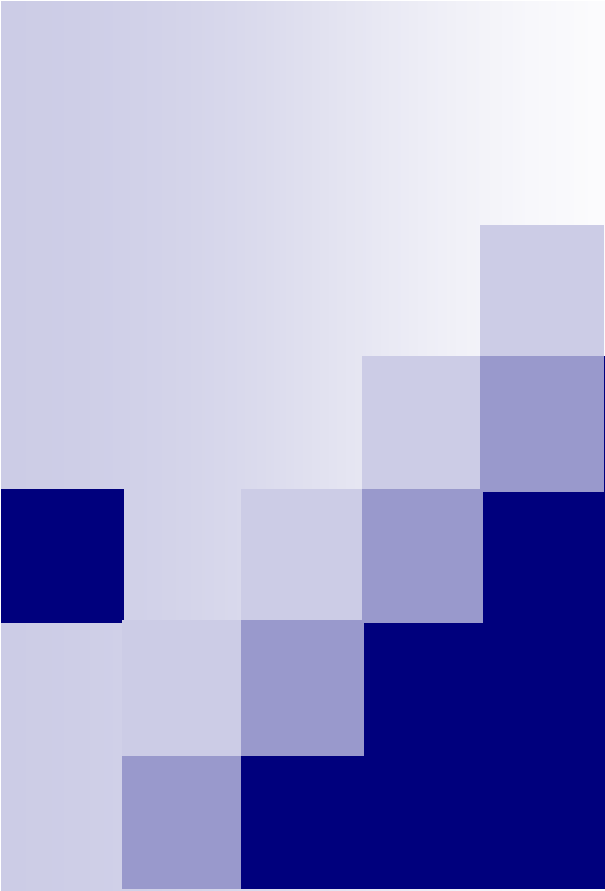
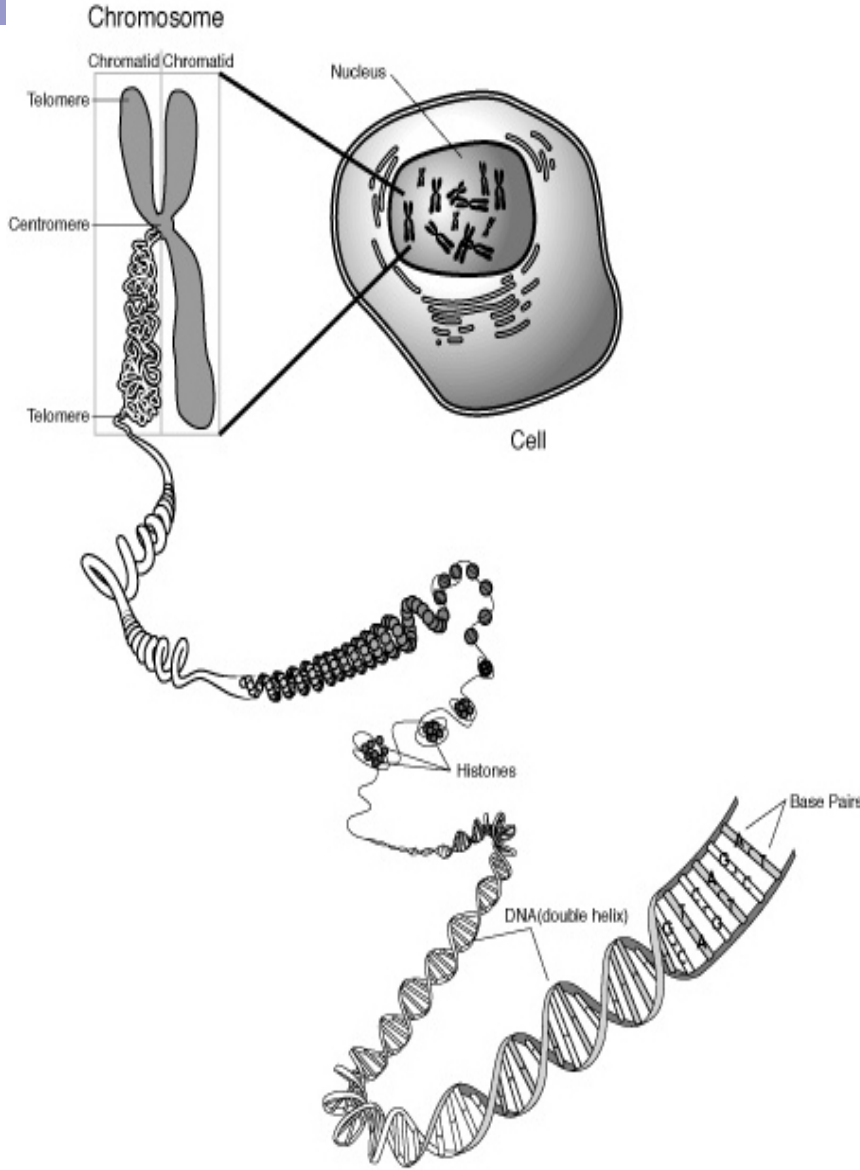




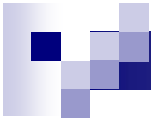
# DNA ve RNA İzolasyonu

Dr Gülnur Güler



## ■ DNA

- genetik bilgi deposu
- özellikle inaktif DNA nükleusda çok sıkı paketli
- çevresel, kimyasal ve fiziksel zararlı etkenlere dayanıklı
- Bu nedenlerle taze, dondurulmuş, parafine gömülü dokularda ve genomik DNA olarak ekstrakte edildiğinde relatif olarak dayanıklı



## DNA Ekstraksiyonu

- Tüm fiksatifler DNA'ya bir miktar zarar verir
- Özellikle pikrik asit içeren fiksatifler ve yüksek konsantrasyonlu asitler DNA'yı parçalar
- Formalinle ideal fiksasyon süresi 12-36 saat
- DNA
  - taze ve donmuş dokudan,
  - parafine gömülü dokudan,
  - parafine gömülü veya frozen dokudan hazırlanan kesitlerden
  - frozen veya parafine gömülü doku kesitlerinden mikrodisseksiyon ile alınan hücrelerden izole edilebilir.



## DNA Ekstraksiyonu

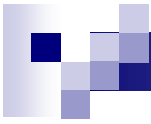
- Dokulardan DNA ekstraksiyonu için kullanılan çok sayıda farklı protokol ve ticari kit mevcut
- DNA ekstraksiyonunun üç ana basamağı var
  - Hücrelerin parçalanması ( Lysis)
  - Proteinlerin uzaklaştırılması ( Pürifikasyon)
  - DNA'nın presipite edilmesi (Presipitasyon)



# Hücre Lizisi

## ■ Dokunun parçalanması:

- ☐ Bistüri ile küçük parçalara ayırma
- ☐ Sonikatörle parçalama
- ☐ Motorlu havan tipi pellet parçalayıcılar
- ☐ Teflon-cam homogenizatörler
- ☐ Rotor-stator polytron tipi homogenizatör
- ☐ Blender
- ☐ Likid nitrojende dokuyu dondurup ezme





# Lizis buffer

- **Lizis buffer:**

- **Deterjan**

SDS (sodium dodecyl sulfate) → membranların eritilmesi ve proteinlerin denatürasyonu

- **Buffer**

Tris → ( trishydroxymethylaminomethane) → DNA'nın soluble ve stabil kalması

- **Selasyon ( divalan ve trivalan metal iyonlarının bağlanması)**

EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid) → DNAaz'ların inhibisyonu

- **Proteinaz K: peptid bağlarının yıkılması → DNAaz'ların inhibisyonu**



## Lizis Buffer (Hirt Buffer)

- 5.66 gr SDS

- 1.1 gr Tris

- 3.5 gr EDTA

Distile su ile 1 lt'ye tamamla

pH'sını 7.4' e getir ( genelde 100 µl

10M NaOH yeterli....)



## Hücre Lizisi

- Lizis buffer ve parçalanmış dokunun 55°C'de su banyosunda bir gece boyunca inkübasyonu ( 50 mg doku için 2.5 ml lizis buffer+20mg/ml proteinaz K)
  - proteinaz K bir serine alkaline protease ve 37°C-60°C arasında aktif



# DNA Pürifikasyonu

- ☐ Sellüler ve histon proteinlerinin ve hücre debrisinin uzaklaştırılması

# Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

- Fenol ve kloroform **organik solventler**. Hidrofobik hücre komponentleri bu solventlere hapsolur: membran lipidleri, hidrofobik polipeptidler, polisakkaritler.....
- Her ikisi de güçlü **denaturasyon ajanları**. proteinleri denatüre ederler

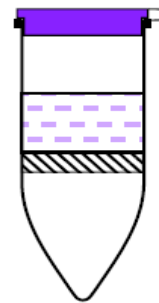
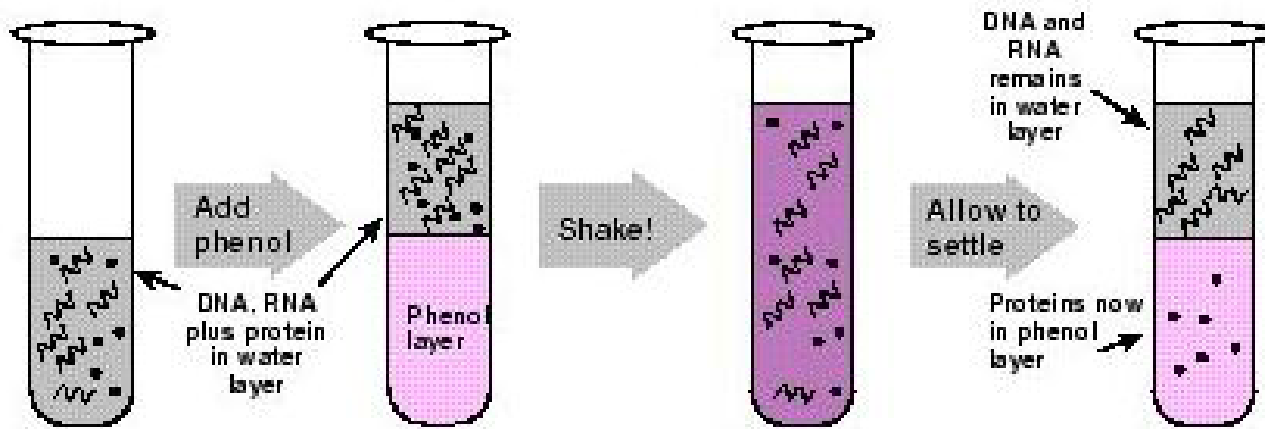




# Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

- Lizis buffer içinde DNA'ya 25/24/1 oranlarında hazırlanmış Fenol/Kloroform/Izoamilalkol eşit miktarda eklenir ve sürekli rotasyon yapılarak 20 dk/ 5 saat karıştırılır.
- DNA ekstraksiyonu için kullanılacak fenol pH 8'de bufferlanmış olmalıdır.  
( pH 8 phenolde DNA, pH 4.5 phenolde RNA sıvı fazda kalır)

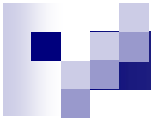
# Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu



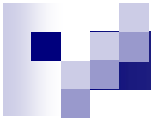
Aqueous layer (DNA & RNA)  
Protein precipitate  
Phenol layer



hidrofilik bileşenler sıvı fazda kalır: nükleik asitler, şeker, tuzlar....)



- Fenol; proteinleri çok iyi ayırır ancak çok az da olsa suda çözünür yani DNA'nızı kontamine eder
- Kloroform ise suya karışmaz ve fenolü de organik fazda tutar
- Izoamilalkol kloroformu stabilize eder ve yüzey gerginliğini azaltarak örnek ve organik solventler arasında kabarcık ve emülsiyon formasyonunu azaltır.
  - Fenol irritan ve nörotoksik bir maddedir.



- PCI sonrası sıvı fazı yeni bir tüpe dikkatle al ve berrak hale gelince dek 2-3 kez CI ile aynı işlemi tekrarla

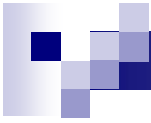


# DNA Presipitasyonu

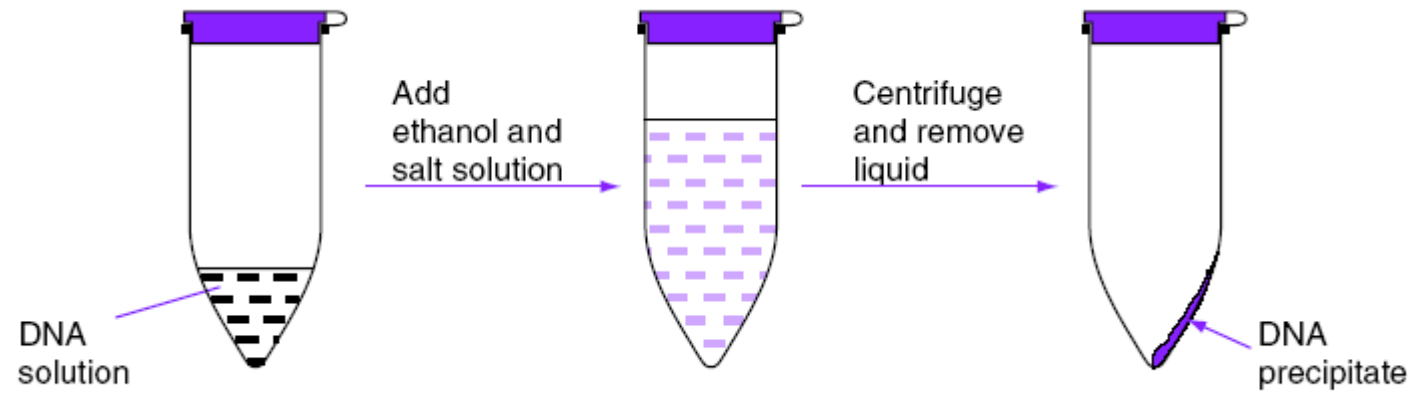
- Sıvı fazdan gelen miktarın üzerine x2.5 hacimde -20°C de bekletilmiş absolü etanol yada x1 hacimde isopopanol ekle ve tuz (amonium asetat, sodyum asetat veya lityum kloride) solusyonu ekle, karıştır ve beklet. (etanolden sonra -20C O/N, -80Cde 1-2 saat, isopropanolden sonda RT de 10-15 dak)..

1/10, 3M sodyum asetat pH5.5

1/2 5M amonium asetat



- Sıvı haldeki solusyona %100 etanol katılınca, solusyon genellikle %80'in üzerinde etanol içerir hale gelir, DNA ancak %65'e kadar olan etanol solusyonlarına eriyebilir olduğu için küçük partiküller oluşturmaya başlar.





# DNA Presipitasyonu

- +4C de sentrifuj, pellatını %70'lik alkolle yıka ( isopraponal sonrası birkaç kez), etanolü/isopropanolü kurut, pellatını TE (Tris-EDTA) buffer ya da su ile DNA'yı 37C'de çöz.

- 
- Formalinle fikse paraffine gömülü dokularda aynı fenol-kloroform ekstraksiyon metodu dokunu başlangıçta ksilol ve azalan derecelerde etanolle deparafinizasyonu sonrası uygulanabilir.

- ☐ 50 mikronluk kesiti tüpe al
- ☐ 1 ml ksilen de 45C'de 30 dk iki kez inkübe et
- ☐ %100, %90 ve % 75'lik alkolde üç kez 30 dk
- ☐ PBS ile yıka

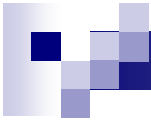
NaSCN( sodyum tiyosiyanat): protein denatürasyonu

1M NaSCN ile 37C'de bir gece inkübasyon

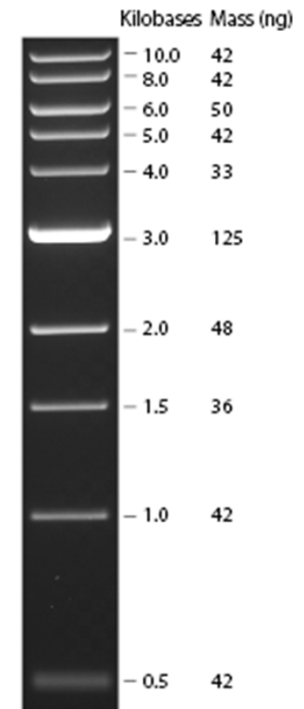
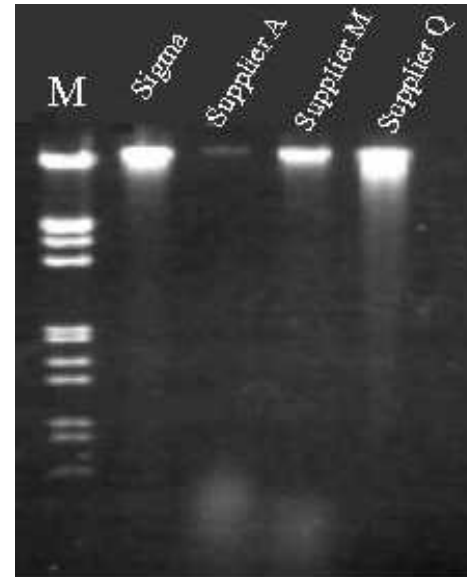
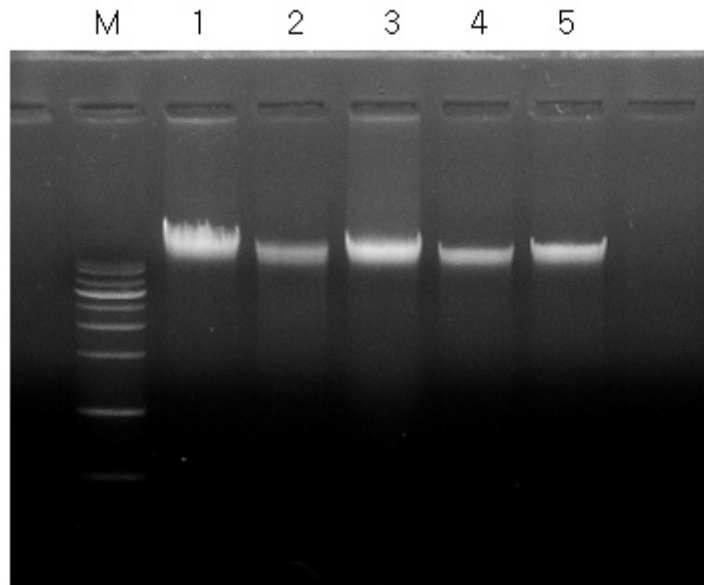


# Kandan DNA izolasyonu

- Toplanan kan EDTA ya da sitratlı tüpte alınmış olmalı ve -80C'de saklanmalı
  - Kırmızı kan hücrelerinin lizisi (sitrat buffer ile iki-üç kez inkübe et ve supernatantı at)
  - Kırmızı kan hücreleri uzaklaştıktan sonra lizis ve ekstraksiyon



- Ekstrakte edilen DNA'nın agaroz jelde degrade olup olmadığının kontrol edilmesi ve spektrofotometre ile konsantrasyonunun ölçülmesi gerekir



- Kolayca görülebilen bir band 20 ng kadar DNA içerir

# DNA ve RNA miktarının UV spektrofotometre ile belirlenmesi

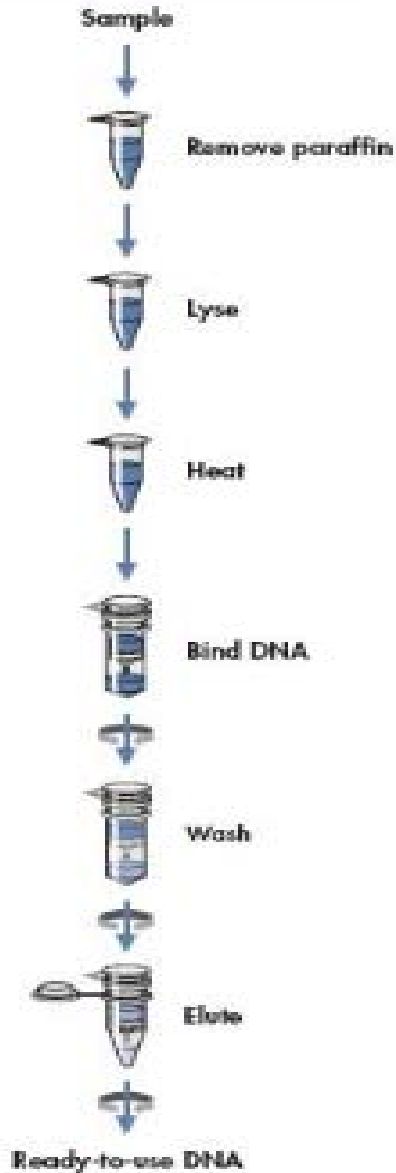
- Pürin ve pirimidinlerin halka yapısının UV absorpsiyonu DNA ve RNA miktarını ölçmekte kullanılır.
- 260 nm de optik densitesi (OD) 1 olan çift sarmallı DNA miktarı 50µg/ml, tek sarmallı DNA ve RNA için 20 µg/ml





# DNA izolasyonunun basitleştirilmiş yöntemleri

- **Tuzla proteinleri uzaklaştırma:** Lizis sonrası satüre tuz solusyonu (6M NaCl ) ile proteinlerin presipite edilmesi
- **Basit kaynatma:** Dokunun distile su ile 20 dk kaynatılması
- **Chelex 100 ile kaynatma:** Selasyon yapan bir resin. Polar resin taneleri polar sellüler komponentleri bağlar.
- **Basitleştirilmiş proteinaz K ekstraksiyonu:**
  - Lizis buffer (50mM KCL, 1.5mM MCl<sub>2</sub>, 10mM TRIS-HCL, 0.5%Tween 20, pH9 25C'de) ve 200 µg/ml proteinaz K ile 55C'de 24 saat inkübasyon
  - 10 dk 97C'de kaynatark **proteinaz K'nın inaktivasyonu** ve 14000 rpm'de 5 dk sentrifüj ve supernatantı 4C veya -20C'de sakla



# Hazır Kit Kullanarak DNA ekstraksiyonu

- Ticari kitler DNA pürifikasyonu için farklı metodlar kullanır. Tüm kitlerde hücre lizisi ve protein denaturasyon basamakları var. Bazı kitler DNA'yı bağlamak için silika-jel bazlı kolumnlar içerir. DNA bağlanmasını diğer komponentleri uzaklaştırmak için yıkama basamakları izler ve DNA elusyonu düşük tuz içeren buferlerle yapılır. Diğer kitler yüksek konsantrasyonda tuzla protein denatürasyonu ve alkol presipitasyonu içerir.
- Bir grup kit ise DNA'nın monodisperse manyetik partiküllere bağlanması esasına dayanır.



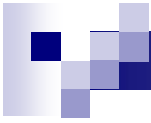
# Hücrelerdeki total RNA

- Bakterilerde toplam hücre ağırlığının %6'sını,
- Gelişmiş yapıli canlılarda ise %1.1 kadarını kapsar
- Memeli hücresi yaklaşık 10-15µg total RNA içerir
- Bu miktarın %80-85'i rRNA(28S, 18S ve 5S rRNA), kalan %15-20'lik miktar ise düşük molekül ağırlıklı RNA türlerini (tRNA, nukleusa ait küçük RNA'lar) içermektedir
- mRNA total RNA'nın %1-5'ni kapsar



## ■ RNA

- Düzenlenmiş gen ekspresyonunun dinamik protein translasyonu için geçici olarak bilgi iletir
- Sinyalin işlevi tamamlanınca durdurulması kritik önem taşır
- Riboz rezidüleri 2' ve 3' pozisyonlarında hidroksil grup taşıdıklarından kimyasal olarak DNA'dan daha reaktiftir ve RNaz ile kolayca yıkılır



- RNaz tüm dokularda bulunur ve çevresel etkilere karşı çok dayanıklıdır
- Disülfid bağlarından dolayı uzun süre kaynatmaya, denatürlanlara dirençlidir ve denatüre olduğunda hızla yenilenebilir
- Aktivitesi için katyonlara gereksinim duymadığından EDTA gibi şelatörlerle inhibe olmaz



# RNaz ile Savaşı Kazanma Yolları

- Ekzojen RNaz profilaktik tedbirlerin dikkatli kullanılması ile tamamen ortadan kaldırılabilir.
- Ekzojen RNaz kontaminasyonu en sık:
  - Kontamine bufferlar
  - Otomatik pipetleme araçları ile olur



# Yöntem

Mutlaka eldiven giyilmelidir. Ancak RNaza karşı mutlak koruma yapmayacağı akılda tutulmalıdır.

RNA kullanımı için özel pipet seti ayrılmalıdır

Mümkünse kullanılan tüm kimyasalları, elektroforez tankları, diğer tüm malzemeleri sadece RNA çalışmalarına ayırmak önemlidir



# Yöntem

Bütün çözeltiler, cam ve plastik eşyalar özel yöntemlerle hazırlanmalıdır

İzolasyonda kullanılacak çözeltiler RNaz aktivitesini yokeden dietilpirokarbonat (DEPC) ile hazırlanmalıdır

Tris DEPC'ı inaktive ettiğinden Tris içeren çözeltiler DEPC ile hazırlanmamalıdır



# Yöntem

- Bazı cam eşyalar içinde %0.1 oranında çözünmüş DEPC bulunan su ile 2 saat 37 °C'de bekletilir sonra birkaç kez steril distile su ile yıkanır ve 15 dakika otoklavlanır
- Cam eşyalar 180°C'da 8 saat/300 °C'da 4 saat veya kloroform ile yıkanarak RNaz inaktive edilebilir

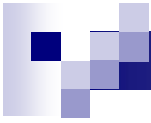


# RNA Ekstraksiyonu

- Hücre çeperi ve membranın parçalanması (lisis)
- Hücre lizatının santrifüjlenmesi (RNA diğer hücresel makromoleküllerden ayrılır)



- Güçlü denatüranlar: guanidinium HCl veya guanidinium tiosiyanat kullanılır
- Guanidinium tiosiyanat homojenatının düşük pH da fenol:kloroform ile ekstrakte edilmesi (Chomczynski ve Sacchi-1987)



- Dokulardan RNA ekstraksiyonu için kullanılan çok sayıda farklı protokol ve ticari kit mevcut
- DNA ekstraksiyonuna çok benzer şekilde phenol-kloroform ekstraksiyonu yapılabilir
- Genomic DNA'nın elimine edilmesi asidik solusyonlarla muamele edilerek sağlanır

## RNeasy FFPE Procedure

