

Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılmak Üzere, Gram-Pozitif Bakteriler ve Mikobakterilerin Hücre Duvarlarının Ortadan Kaldırılmasında Yeni Bir Yöntem: Kum Yöntemi

A New Method for The Disruption of Cell Walls of Gram-Positive Bacteria and Mycobacteria On The Point of Nucleic Acid Extraction: Sand Method

Fikret ŞAHİN¹, Mehmet KIYAN¹, Djursun KARASARTOVA², M. Kerem ÇALGIN³, Shameem AKHTER¹, Buse TÜREGÜN ATASOY¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çorum.

² Hitit University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Çorum, Turkey.

³ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu.

³ Ordu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ordu, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.10.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.12.2015

ÖZ

Günümüzde moleküler yöntemler, enfeksiyon etkenlerinin hızlı tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla en sık olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi tercih edilmektedir. PCR kullanımında yeterli ve saf DNA veya RNA elde edilmesi önemlidir. Gram-negatif bakterilerde fenol-kloroform, DNAzol, proteinaz K, cam boncuk, kaynatma gibi farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri başarıyla kullanılmaktadır. Hücre duvarında daha kalın peptidoglikan tabakası olan gram-pozitif bakteriler ile kompleks glikolipid bulunan mikobakteri cinsi bakterilerde ise, DNA ve RNA izolasyonu için bu kompleks yapıların ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu amaçla, stafilokok cinsi gram-pozitif bakterilerde lizostafin kullanılarak sferoplast oluşturulması, mikobakterilerde setil-trimetil amonyum bromür gibi kimyasallar kullanılarak bakteri duvarının tamamen veya kısmen uzaklaştırılması gerekmektedir. Herhangi bir kimyasal ajana gerek duyulmaksızın, bakteri hücre duvarının mekanik olarak ortadan kaldırılmasının amaçlandığı bu çalışmada, ince elenmiş kum partikülleri kullanılmış ve yöntem "kum yöntemi" olarak adlandırılmıştır. DNA ekstraksiyonu amacıyla ince elenmiş kum, küçük partiküllerini kaybetmeyecek şekilde ddH₂O ile yıkanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. RNA ekstraksiyonu için ddH₂O ile yıkanan kum, daha sonra

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Fikret Şahin, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 8277, **E-posta (E-mail):** fsahin29@hotmail.com

%10 HCl'de (30 dakika) inkübe edilmiş ve otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmada, daha önce klinik bir örnekten izole edilen ve tanımlanan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu, 100 mg hazırlanan kum ve 100 µl Tris-EDTA çözeltisi içerisinde, 5 dakika maksimum hızda vortekslenmiş, DNA eldesi için proteinaz K ile muamele edilmiş ve sonrasında fenol kloroform-etanol presipitasyon protokolü takip edilmiştir. Kum yönteminin diğer yöntemler ile kıyaslanması amacıyla, kum yönteminde kullanılan miktardaki bakteri lizostafin ile bir saat inkübe edildi ve kum yönteminde kullanılan miktarda proteinaz K eklenerek DNA ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Boncuk yönteminde steril cam boncuklar kum yönteminde olduğu şekilde kullanılmıştır. RNA eldesi için *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 ve *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur Enstitüsü RSKK 598 standart suşları, 100 mg hazırlanan kum ve 20 µl Tris-EDTA çözeltisi içerisinde 3-5 dakika maksimum hızda vortekslenmiş ve guanidinyum tiosiyanat-fenol-kloroform (GTFK) ile klasik RNA ekstraksiyon protokolü tamamlanmıştır. Elde edilen DNA'nın kullanılabilirliği, çalışmada kullanılan MRSA suşundaki stafilokinaz ve enterotoksin genlerine özgül primerler kullanılarak PCR ile araştırılmıştır. Kum yöntemi ile elde edilen RNA'nın kullanılabilirliğini saptamak için, önce cDNA sentezi yapılmış; daha sonra *M.tuberculosis* atım pompa genlerinden *Rv1410c*, *Rv2333c* ve *DrrA*'ya özgül primerler kullanılarak PCR uygulanmıştır. Karşılaştırma amacıyla, kum yönteminde kullanılan miktardaki mikobakteriye doğrudan GTFK protokolü uygulanmıştır. MRSA suşlarından lizostafin uygulanarak elde edilen DNA ile kum yöntemi uygulanarak elde edilen DNA'lar agaroz jelde yürütülmüş, spektrofotometrede miktar ve saflıkları kıyaslanmıştır. Sonuç olarak, yaklaşık aynı miktar ve saflıkta DNA'ların elde edildiği gözlenmiştir. Kum yöntemiyle elde edilen DNA'ların herhangi bir inhibitör ajan içermediği, PCR'nin etkin olarak çalışmasıyla gösterilmiştir. Mikobakteri suşlarından kum yöntemiyle RNA elde edilebildiği halde, diğer yöntemlerle RNA elde edilememiştir. Kum yöntemi kullanılarak elde edilen RNA'ların gerek cDNA sentezinde gerekse bu cDNA'ların kullanıldığı PCR yönteminde etkin olarak çalıştığı gösterilmiştir. Çalışmamızda tanımlanan kum yöntemi ile nükleotid eldesi zor olan sert ve kompleks hücre duvarına sahip bakterilerden, saf ve yeterli miktarda DNA ve RNA elde edildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu yöntemin, pahalı sayılabilen lizostafin veya farklı kimyasalların yerine herhangi bir masrafı olmayan kumun kullanılması sayesinde ekstraksiyon maliyetini düşüreceği, ayrıca DNA ekstraksiyon süresini kısaltması açısından avantajlı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: DNA; RNA; ekstraksiyon; mikobakteri; stafilokok; kum yöntemi.

ABSTRACT

Nowadays molecular methods are widely used in the rapid diagnosis of infectious agents. Polymerase chain reaction (PCR) is the most preferred method for this purpose. Obtaining sufficient and pure DNA or RNA is important for the PCR. Different DNA extraction protocols such as phenol-chloroform, proteinase K, glass beads and boiling have been used successfully for DNA isolation from gram-negative bacteria. However since gram-positive bacteria have a thicker layer of peptidoglycan and mycobacteria have complex glycolipids in their cell walls, for the isolation of DNA or RNA from these microorganisms, the complex cell wall structure must be eliminated. For this purpose, the bacterial cell wall must be completely or partially removed forming sferoblast using lysostaphin in the *Staphylococcus* genus as gram-positive bacteria and using a chemical like cetyltrimethyl ammonium bromide for the *Mycobacterium* genus. In this study, we planned to use sand particles for the mechanical elimination of the cell wall without any need for chemicals and we called this procedure as "sand method". For the purpose of DNA extraction, the fine-grained sand was washed with ddH₂O without losing small particles and then sterilized by autoclaving. For the purpose of RNA extraction; the sand was washed with ddH₂O, incubated for 30 minutes with 10% HCl, and then autoclaved. A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain previously isolated and identified from a clinical specimen was mixed in 100 µl Tris-EDTA buffer with 100 mg sand. The mixture of bacteria and sand was vortexed at the maximum speed for 5 minutes. The MRSA-sand mix was treated with proteinase K and phenol-chloroform, and ethanol precipitation protocol was then followed for obtaining DNA. For comparison of the sand method with the other methods, the same amount of bacteria used in the sand method was incubated for one hour with lysostaphin, and then the proteinase K DNA extraction method were completed in the same way

used in the sand method. For obtaining RNA from *M.tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 and *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur Institute RSKK 598 standard strains, bacteria were dissolved in 20 µl Tris-EDTA buffer with 100 mg sand. The mixture of bacteria and sand was vortexed at the maximum speed for 5 minutes. After that, the classic RNA extraction protocol using guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (GTPC) was completed. To investigate the usefulness of the obtained DNA, a PCR was performed with specific primers for staphylokinase and enterotoxin genes that were shown in the genome of the chosen MRSA strains from our previous studies. To investigate the usefulness of the obtained RNA from the sand method; first cDNA synthesis is completed. The PCR efficiency was then tested using primers specific to the efflux pump genes of *M.tuberculosis* including *Rv1410c*, *Rv2333c*, and *DrrA* genes. To compare the effect of the sand method, GTPC protocol was applied in the same amount of mycobacteria without the sand treatment. The DNA obtained from MRSA with the application of lysostaphin and the DNA obtained from MRSA by the sand method were run in agarose gel electrophoresis. The amount and purity of DNAs were measured with a spectrophotometer. The same amount and purity of the DNAs were approximately the same in both of the extraction methods. The existence of non-inhibitors of DNA in the sand method was shown with the PCR, which have worked efficiently with the DNAs obtained from the sand method. RNA was obtained efficiently from the *Mycobacterium* strains by the sand method, but no RNA could be obtained from the mycobacteria with the other methods. It was shown that the RNA obtained using the sand method worked effectively in both cDNA synthesis and PCR in which synthesized cDNA was used. The sand method described in the study worked effectively to obtain sufficient amount of pure DNA and RNA from the bacteria containing rigid cell walls that are difficult to obtain the nucleotide. It was concluded that, using the sand method instead of relatively expensive lysostaphin or other chemicals, has important advantages such as decreasing the cost and the shortening of the DNA extraction period.

Keywords: DNA; RNA; extraction; mycobacteria; staphylococci; sand method.

GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında mikroorganizmanın izolasyonu ve tanımlanması al-
tın standart olmasına rağmen, etkenin her zaman üretilmemesi ve bakteriyemiler gibi
acil tedavi gerektiren durumlar nedeniyle, etken DNA'sının araştırıldığı hızlı tanı yöntem-
leri ön plana çıkmıştır¹⁻³. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı (real-time)
PCR gibi, enfeksiyon etkeninin özgül DNA veya RNA'sının çoğaltılması ve görüntülen-
mesine dayalı yöntemler, hızlı tanı için en etkili yöntemler olarak bilinmektedir^{3,4}. Bu
yöntemlerin uygulanabilmesi için, etken mikroorganizmaya ait DNA'nın saf ve yeterli
miktarla elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, fenol-kloroform, DNAzol, proteinaz
K, termal şok ve kaynatma gibi farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır^{2,5-8}.
Bu yöntemler, genel olarak gram-negatif bakterilerde başka bir işleme gerek kalmadan
uygulanabilirken, kalın peptidoglikan tabaka bulunduran gram-pozitif bakteriler ile hü-
cre duvarlarında peptidoglikan ve kompleks glikolipid bulunan mikobakterilerde DNA ve
RNA izolasyonu için bu yapıların ortadan kaldırılması gerekmektedir⁹. Nükleotid elde-
sinin zor olduğu enfeksiyon etkenlerinin önemli kısmını gram-pozitif bakteriler oluşturu-
maktadır; zira kalın peptidoglikan tabaka, DNA ekstraksiyonu için gerekli hücre lizisine
karşı dirençlidir^{5,9}. Bunun için hücre duvarının ortadan kaldırılarak sferoplast formuna
dönüşmesinin sağlanması gerekmektedir¹⁰. Bu işlem yapılmadan standart ekstraksiyon
yöntemlerinin etkili olmadığı bilinmekte ve bu nedenle bakterinin sferoplast formuna
dönüşmesi amacıyla lizostafin enzimi kullanılmaktadır.

Gram-pozitif bakteri hücre duvar yapısına sahip ve hücre duvarında bol miktarda kompleks lipidler içeren mikobakterilerden de DNA ve RNA izolasyonu oldukça zordur^{7,11,12}. Bu durumlarda setil-trimetil amonyum bromür (CTAB) gibi hücre duvarını ortadan kaldıran kimyasallar kullanılmaktadır¹¹. Gerek gram-pozitif bakteriler gerekse mikobakterilerde adı geçen kimyasal kullanımlarına ek olarak, bakteri duvarının ortadan kaldırılması için Fransız basınç (French press), cam boncuk gibi mekanik cihaz ve yöntemler kullanılmakta; bu yöntemler de farklı ekipmanlar gerektirmektedir^{5,13}. Bu çalışmada, stafilokok ve mikobakteri cinsi bakterilerden DNA ve RNA ekstraksiyonunda, söz konusu enzim veya kimyasalları kullanmadan hücre duvarının mekanik olarak parçalanmasına dayanan "Kum yöntemi" adını verdiğimiz yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

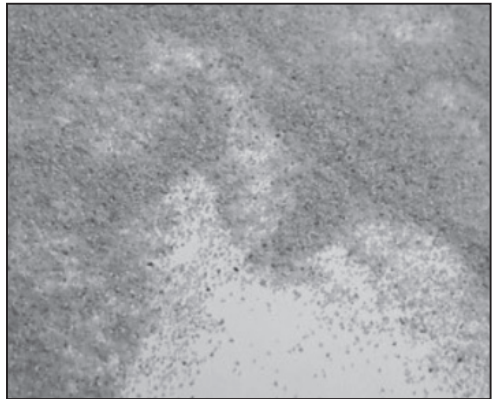
Kum

Doğal olarak kaya ve minerallerden oluşmuş granüler yapıda olan kum, akarsu ve deniz sahillerinde daha saf olarak bulunmaktadır. Akarsu kenarında bulunan kum partiküllerinin kenar yapılarının, deniz kumuna göre daha keskin olması beklenen bir durumdur. Bu nedenle çalışmada, DNA ekstraksiyonu amacıyla akarsu kenarından elde edilen ve büyüklüğü 0.5-3 mm olacak şekilde elenen ince kum kullanıldı. Kum, içerisinde kir kalmayınca kadar ddH₂O ile yıkandı ve otoklavda (121°C'de 20 dakika) sterilize edildi (Resim 1). Elde edilen kum, su içerisinde 24 saat inkübe edildi ve sonra ddH₂O'nun pH değerinde değişiklik olmadığı tespit edildi.

RNA ekstraksiyonu için elenmiş kum, aynı şekilde ddH₂O ile yıkandıktan sonra %10 HCl ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi, daha sonra tekrar ddH₂O ile yıkanarak HCl artığı kalmaması sağlandı ve otoklavda (121°C'de 20 dakika) sterilize edildi.

Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışma, farklı hastalardan izole edilen ve daha önceki çalışmalarımızda da kullanılan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları üzerinde yürütüldü¹⁴. Gram boyama, katalaz, plazma koagülaz ve DNaz testleri ile tanımlanan *S.aureus* suşlarının metisilin direnci, oksasilin disk difüzyon testi ve PCR ile *mecA* geninin saptanması sonucu belirlendi. Mikrobank saklama tüplerinde -20°C'de saklanan her bir suş için birer boncuk alındı ve içinde 3 ml beyin-kalp infüzyon buyyonu (Brain Heart Infusion Broth [BHIB]; Difco Laboratories, ABD) bulunan tüplerin içine atıldı. Tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, %5 koyun kanlı agar be-



Resim 1. Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanmış kum partikülleri.

siyerlerine tek koloni düşecek şekilde ekimler yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kum yöntemi ile elde edilen DNA'ların PCR'da çalışabilirliğini belirlemek amacıyla, önceki çalışmalarımızda bakteriyofajlarla taşındığını tespit ettiğimiz stafilokinaz (SAK) ve enterotoksin (SEK) genlerini bulunduran MRSA suşları kullanıldı.

Çalışmada mikobakteri suşları olarak; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan elde edilen *M.tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 ve *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur Enstitüsü RSKK 598 standart suşları kullanıldı. Mikobakteriler Löwenstein-Jensen (LJ) (Difco, ABD) besiyerinde üretildi.

Kum ile MRSA Hücre Duvarının Parçalanması, DNA Ekstraksiyonu ve DNA Saflığının Belirlenmesi

Her bir suşun kanlı agar besiyerinde 37°C'de bir gecelik kültürünü takiben alınan bir öze dolusu bakteri, içinde 100 mg kum ve 100 µl Tris-EDTA çözeltisi (20 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA [pH 8.0]) (Sigma, Almanya) bulunan ependorf tüpüne aktarılıp karıştırıldıktan sonra 3200 rpm'de 3-5 dakika şiddetli olarak vortekslendi. Daha sonra 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldıktan sonra üzerine 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma Almanya) eklendi. 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 300 µl fenol (Sigma, Almanya): kloroform (Sigma, Almanya): izoamil alkol (Sigma, Almanya): (25:24:1) eklenerek DNA ekstrakte edildi. Kloroform ile yıkamayı takiben saf etanolde DNA çöktürüldü, %70 ile alkolle yıkanıp ddH₂O içinde çözündürüldü. Elde edilen DNA'nın miktarı ve saflığı (A260/A280) Biotek mikrolept okuyucuda (Synergy HTX Multi-Mode Reader, Biotek, ABD) belirlendi.

Lizostafin İle Hücre Duvarının Parçalanması, DNA Ekstraksiyonu ve DNA Saflığının Belirlenmesi

Kum yönteminde olduğu gibi, her bir suşun kanlı agar besiyerinde 37°C'de 18 saatlik kültürünü takiben, bir öze dolusu koloni, içinde 100 µl Tris-EDTA çözeltisi bulunan ependorf tüpüne aktarıldı, üzerine 50 µl lizostafin (1 mg/ml) (Sigma, Almanya) eklenip 37°C'de 3 saat bekletildikten sonra, üzerine 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) konup karıştırıldı. 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 300 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenerek DNA ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Kloroform ile yıkamayı takiben saf etanolde DNA çöktürüldü, %70'lik alkolle yıkanıp ddH₂O içinde çözündürüldü. Elde edilen DNA miktarı ve saflığı (A260/A280) Biotek mikrolept okuyucu ile belirlendi.

Cam Boncuk ile Hücre Duvarının Parçalanması ve DNA Ekstraksiyonu

100 µg 450-600 mikron steril cam boncuk (Sigma, G1277) kum yönteminde açıklandığı şekilde kullanıldı.

***M.tuberculosis* Suşlarından Kum Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi**

LJ besiyerinde üretilen standart mikobakteri suşlarına ait koloniler, besiyeri yüzeyinden bir öze dolusu olacak şekilde kazınarak toplandı ve 20 µl Tris-EDTA çözeltisi ve 100 mg kum bulunduran ependorf tüpü içinde karıştırıldıktan sonra 5 dakika şiddetli olarak

(3200 rpm) vorteksledi. Üzerine temel olarak, asit guanidinyum tiyosiyanat-fenol-kloroform kullanımına göre hazırlanmış olan kitin (Invitrogen, ABD) birinci çözeltisi (guanidinium thiocyanate) eklenip 15 saniye elde şiddetli olarak karıştırıldı ve daha sonra kit protokolüne göre RNA elde edildi. Kontrol olarak LJ besiyerinde üremiş koloni direkt olarak RNA ekstraksiyon kitinin birinci çözeltisi içerisine konduktan sonra elde şiddetli şekilde karıştırıldı ve kit protokolü takip edildi. Elde edilen RNA'lar -80°C 'de saklandı.

RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Life Technologies, ABD) protokolüne göre her bir suştan elde edilen RNA'lara cDNA sentez işlemi uygulandı. Kısaca; her suş için hesaplanan RNA miktarı ve hacmini tamamlamak amacıyla içinde RNaz bulundurmayan steril distile su toplam hacim 9 μl olacak şekilde karıştırıldı. Üzerine 1 μl oligo dNTP (dNTP mix, ThermoScientific, ABD) eklendi, vorteksleme ve santrifüjleme işlemlerinden sonra ısıtma bloğunda 70°C 'de 10 dakika bekletildi. 8 μl RT Reaksiyon Mix (Life Technologies, ABD) eklendi, vorteksleme ve santrifüjleme işlemlerinden sonra ısıtma bloğunda 42°C 'de bir saat bekletildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C 'de saklandı.

Primerler ve PCR Yöntemi

Bu çalışmada kullanılan primerler <http://www.ebi.ac.uk/clusterw> dizi programı kullanılarak tarafımızdan tasarlandı ve IDT (Integrated DNA Technologies, ABD) firmasında sentez ettirildi. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 1'de gösterildi. Bu çalışmada, mikrobakterilerin atım pompasıyla ilişkili genlerinden olan ve daha önceki çalışmamızda kullandığımız *Rv1410c*, *Rv2333c* ve *DrrA* genlerine özgül primerler kullanıldı¹⁵.

Her bir suştan elde edilen DNA veya cDNA'lar kalıp DNA olarak kullanıldı. PCR karışımı; 10x PCR çözeltisi, 2.5 U Taq DNA polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP ve 2 μl DNA veya cDNA olacak şekilde hazırlandı. Eppendorf Mastercycler Personal Thermocycler (T10 Thermal Cycler, BioRad, ABD) kullanılarak, 34 döngünün her biri 94°C 'de 30 sn; 60°C 'de 45 sn ve 72°C 'de 45 sn olacak şekilde uygulandı. Çoğaltılmış PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüledi.

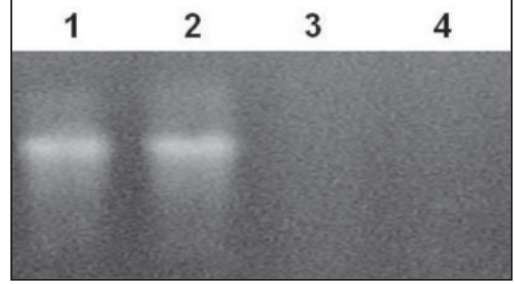
Tablo 1. PCR'de Kullanılan Primerler

Gen	Primer dizileri	Ürün büyüklüğü (baz çifti)
<i>Rv1410c</i>	5'TCT TGG ACT TCC GGT TCA TC-3'	221
	5'TAC CGG TTC AAC CAG ATC CTG-3'	
<i>Rv2333c</i>	5'ATA TGA CTA ACC GCG CAC TC-3'	178
	5'TTG CGG AGG AGG ATT TCA TC-3'	
<i>DrrA</i>	5'ATG GTG GAC ATC TTG TCG AC-3'	158
	5'AGG TTC TGC TCA CCG GAA AG-3'	
<i>SAK</i>	5' TGTGACTGGAGTTGATGGTAC	140
	5' TGCCATCTAATGCCCATTCGAC 3'	
<i>SEK</i>	5' CTCCTATAGCTAATCAACTAC 3'	315
	5' TGTATTCTTCTGAAGGTAC 3'	

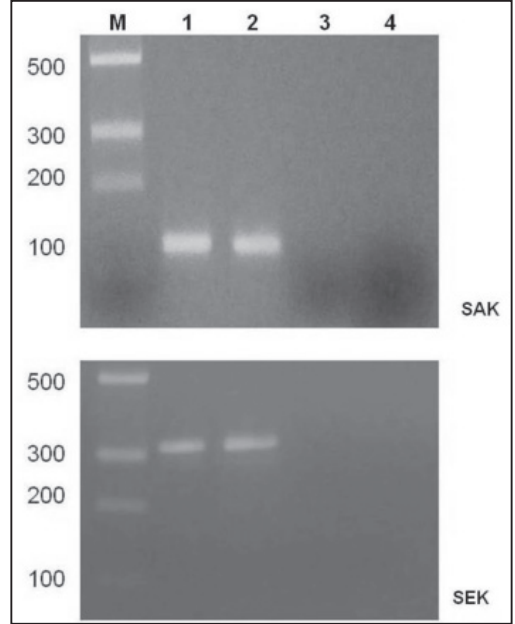
RNA eldesinin etkinliğinin araştırılması amacıyla, elde edilen cDNA'lara PCR uygulandı. Bu işlemden önce RNA ekstraksiyonu esnasında olması muhtemel DNA kontaminasyonunu önlemek için, elde edilen RNA çözeltisi (20-100 ng/μl) içersine 1 μl DNaz (2000 u/m M0303-L, New England Biolabs, İngiltere) eklendi; 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 75°C'de 10 dk bekletilerek DNaz inaktive edildi. Bu çözelti kullanılarak yapılan PCR ile DNA kontaminasyonu araştırıldı.

BULGULAR

Kum yönteminin etkinliğinin araştırılması için, lizostafin enzimiyle cam boncuk ve kum yöntemi kullanılarak bakteri hücre duvarı parçalama işlemi yapıldıktan sonra aynı proteinaz K işlemine tabii tutulmuştur. MRSA suşuna ait DNA ekstraksiyonu sonuçları karşılaştırıldığında, lizostafin ve kum yönteminden elde edilen DNA miktarları birbirlerine yakın bulunmuştur. Cam boncuk kullanılan bakteri duvarı parçalama işleminde ise bakteri DNA'sı elde edilememiştir (Resim 2). Bu arada kum yönteminde kullanılan kumda DNA kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek amacıyla sadece kum kullanılarak yapılan ekstraksiyonda hiç DNA gözlenmemiştir. Kum yöntemi ve lizostafin ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen DNA'ların saflikları spektrofotometre ile ölçüldükten sonra, 260/280 oranı iki yöntemde de benzer şekilde 1.80 ve üzeri olarak belirlenmiştir. Kum yöntemi ile elde edilen DNA'da PCR yöntemini engelleyebilecek herhangi bir inhibitörün olup olmadığını araştırmak amacıyla, stafilokinaz ve stafilokok enterotoksin genlerine özgül primerler kullanılarak aynı koşullarda PCR yapılmış; bu primerlere özgü bantlar elde edilmiştir. Cam boncuk kullanılarak elde edilen DNA'dan yapılan PCR sonucunda ise PCR ürününe rastlanmamıştır (Resim 3).

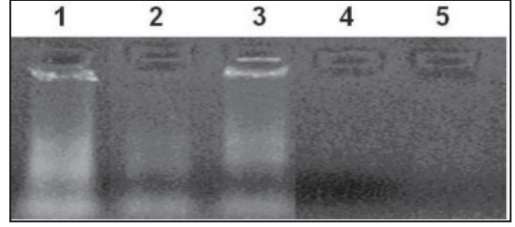


Resim 2. Kum ve diğer yöntemlerle elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü. Hat 1: Lizostafin kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonu; Hat 2: Kum yöntemi kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonu; Hat 3: Cam boncukla yapılan DNA ekstraksiyonu; Hat 4: Kumdan gelebilecek DNA'nın (kontaminasyon) ekstraksiyonu.



Resim 3. Stafilokinaz (SAK) ve stafilokokal enterotoksin (SEK) DNA'larına özgül primerlerle yapılan PCR. M: Moleküler belirteç; Hat 1: Lizostafin kullanılarak elde edilen DNA'dan yapılan PCR ürünü; Hat 2: Kum yöntemi kullanılarak elde edilen DNA'dan yapılan PCR ürünü; Hat 3: Cam boncukla elde edilen DNA'dan yapılan PCR ürünü; Hat 4: Kumdan gelebilecek DNA'dan yapılan PCR ürünü.

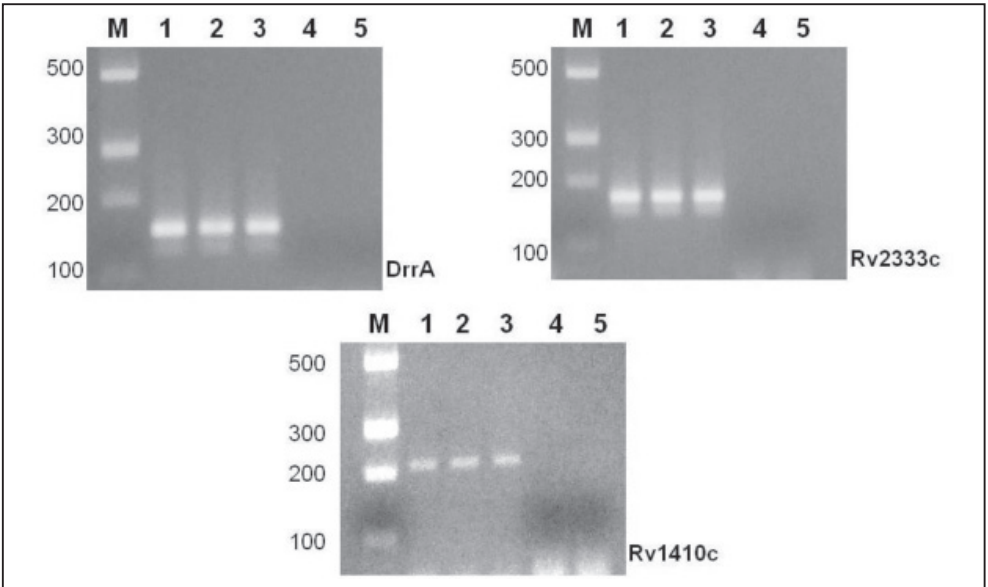
Standart üç mikobakteri suşuna kum yöntemi uygulandığında, tümünden RNA elde edildiği halde, cam boncuk ve sadece RNA ekstraksiyon kiti kullanıldığında RNA elde edilmemiştir (Resim 4). Elde edilen RNA'nın kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu DNA'lar kullanılarak mikobakterilerin efluks pompası ile ilgili genlerinden olan ve daha önceki çalışmamızda¹⁵ kullanmış olduğumuz *Rv1410c*, *Rv2333c* ve *DrrA* genlerine özgül primerlerle yapılan PCR sonucunda beklenen büyüklükte PCR ürünleri elde edilmiştir (Resim 5).



Resim 4. Kum ve diğer yöntemlerle elde edilen RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi. Hat 1, 2 ve 3: Kum yöntemi kullanarak *M.tuberculosis* H37Rv ATCC, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC, *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur Enstitüsü standart suşlarından yapılan RNA eldesi; Hat 4: Cam boncuk kullanılarak yapılan RNA ekstraksiyonu; Hat 5: Sadece RNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılan RNA ekstraksiyonu.

TARTIŞMA

Gram-pozitif bakterilerden etkin olarak DNA elde edilebilmesi için, hücre duvarının lizostafin gibi enzimlerle veya mekanik parçalama yöntemleriyle parçalanması gerekmektedir⁹. Bu çalışmada, mekanik olarak hücre duvarının parçalanmasına dayanan kum yönteminin etkinliği, lizostafin ve cam boncuk yöntemleriyle kıyaslanmıştır. Kum yöntemiyle,



Şekil 5. *Rv2333c*, *drrA* ve *Rv1410c* RNA'larına özgül primerlerle yapılan PCR. M: Moleküler belirteç; Hat 1, 2 ve 3: Kum yöntemi kullanarak *M.tuberculosis* H37Rv ATCC, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC ve *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur Enstitüsü standart suşlarından elde edilen RNA'larla yapılan cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı *Rv2333c*, *drrA* ve *Rv1410c* genlerine özgül primerlerle yapılan PCR sonuçları, Hat 4: Cam boncuk kullanılarak yapılan elde edilen RNA'larla yapılan PCR sonucu; Hat 5: Sadece RNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılan RNA'lardan oluşturulan cDNA'larla yapılan PCR sonuçları.

stafilokoklardan yapılan DNA ekstraksiyonundan elde edilen DNA'nın, lizostafin kullanıldığında elde edilen DNA miktarı ile aynı olduğu saptanmıştır. Yapılan spektrofotometrik analizler sonucunda, her iki yöntemde elde edilen DNA'ların benzer saflıkta olduğu tespit edilmiştir. Kum yönteminde kullanılan bakteri miktarı ve vorteksleme süresi aynı olduğu halde, cam boncuk kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonunda, belirgin bir DNA eldesi olmamıştır. Bu sonucun, mekanik parçalama amacıyla kullanılan kumun yüzeyinin, cam boncuk yüzeyine göre daha sert ve keskin olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Gerek kum yöntemi gerekse lizostafin yöntemiyle elde edilen DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı, bakteri kromozomunda farklı gen bölgelerine özgül primerlerle yapılan PCR çalışmalarıyla, hedeflenen gen bölgelerinin etkin olarak çoğaltıldığı gözlenmiştir. DNA eldesine göre çok daha zor olan RNA ekstraksiyon işlemi amacıyla da kum yöntemi kullanılmış ve RNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lardan oluşturulan cDNA'ların kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan PCR çalışmalarında da hedef gen bölgeleri çoğaltılmıştır.

Çalışmamızda bakteri hücre duvarının ortadan kaldırılması amacıyla geliştirilen kum yöntemi, her ne kadar lizostafin ve cam boncuğun kullanıldığı yöntemlerle kıyaslanırsa da, bu uygulamaları takip eden proteinaz K, fenol-kloroform ve etanol presipitasyon işlemleri ortaktır. Çalışmamızda sunmamıza karşın, DNA ekstraksiyonunda kullanılan diğer bir yöntem olan Guanidin-silika yöntemi, hücre duvarı parçalandıktan sonra denenmiş ve proteinaz K ekstraksiyonu kadar DNA elde edilmiştir. Guanidin-silika yöntemi, gerek gram-negatif gerekse memeli hücrelerinden direkt DNA elde edilmesinde etkili bir yöntem olmasına karşın, kum yöntemi kullanmadığımızda stafilokok DNA ekstraksiyonunda çalışmamıştır (veriler gösterilmedi)^{16,17}.

Bakteri hücre duvarını parçalamak amacıyla silika ve zirkonia partiküllerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır¹⁸. Başta silika olmak üzere her iki partikül de DNA'ya yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Dolayısıyla, her ne kadar bu çalışmada test etmememize rağmen, bu iki molekülün kullanıldığı ekstraksiyon işlemleri sonucunda daha az miktarda DNA elde edilmesi ihtimali yüksektir. Literatür ve partiküllerin tanıtım bilgilerinde, bu partiküllerin DNA elde etmek amacıyla kullanılmadan önce farklı kimyasallarla muamele edilmelerinin gerekliliği belirtilmektedir¹⁸. Çalışmada kullandığımız kumun bulunması, hazırlanması, kullanılması ve bir kez elde edildikten sonra süresiz olarak saklanması, diğer kimyasallara göre avantaj sağlamaktadır. Bir diğer önemli avantajı ise maliyetinin sıfır olmasıdır. Sonuç olarak, geliştirdiğimiz "Kum Yöntemi" ile nükleotid eldesi zor olan sert hücre duvarına sahip bakterilerden saf ve yeterli miktarda DNA ve RNA elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca pahalı sayılacak lizostafin veya farklı kimyasalların yerine, herhangi bir masrafı olmayan kum kullanılarak ekstraksiyon maliyeti düşürülebilmekte, DNA ekstraksiyon süresi kısalmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56(2): 103-11.
2. Liu YT. A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases. Infect Disord Drug Targets 2008; 8(3): 183-8.
3. Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. Clin Infect Dis 2011; 52(4): 326-30.

4. Lisby G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Mol Biotechnol* 1999; 12(1): 75-99.
5. Bollet C, Gevaudan MJ, de Lamballerie X, Zandotti C, de Micco P. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(8): 1955.
6. Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, et al. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol* 2006; 29(2): 111-9.
7. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, et al. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2471-3.
8. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clin Chem* 2015; 61(1): 89-99.
9. Oliveira CF, Paim TG, Reiter KC, et al. Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56(1): 29-33.
10. Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, et al. Impact of enhanced *Staphylococcus* DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum. *PLoS One* 2012; 7(3): e33127.
11. Amaro A, Duarte E, Amado A, et al. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47(1): 8-11.
12. Radomski N, Kreitmann L, McIntosh F, et al. The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS One* 2013; 8(10): e78749.
13. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 574398.
14. Sahin F, Karasartova D, Ozsan TM, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying an exfoliative toxin A gene encoding phage isolated from a hospitalized patient in Turkey. *Can J Microbiol* 2013; 59(4): 260-5.
15. Calgın MK, Sahin F, Turegun B, et al. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3): 291-7.
16. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3): 495-503.
17. Vingataramin L, Frost EH. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques* 2015; 58(3): 120-5.
18. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, et al. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One* 2012; 7(3): e33865.