

DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi

Faruk BOZKAYA^{1*}

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Özet: Bu çalışmanın amacı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemlerinde kullanılmak üzere kandan genomik DNA izolasyonu amacıyla fenol-kloroform yöntemi yerine potasyum asetat çözeltisi kullanımının elde edilen DNA miktarı ve kalitesi üzerine etkisini araştırmaktır.

Bu amaçla Kilis keçilerinden toplanmış olan 13 adet kan örneği kullanılmıştır. Her bir örnekte proteinaz K uygulamasını ardından fenol-kloroform ile DNA izolasyonu veya potasyum asetat ile çöktürme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen DNA çözeltilerinin konsantrasyonları ve saflığı sırasıyla 260 nm ve 260nm/280nm de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Fenol-kloroform ve potasyum asetat grubunda ortalama DNA konsantrasyonu sırasıyla 0,4185±0,2368 ve 0,2753±0,0846 bulunmuştur. Absorbans oranları ise fenol-kloroform ve potasyum asetat grubunda sırasıyla ortalama 1,6380±0,1817 ve 1,7435±0,0659 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Sonuç olarak DNA izolasyonunda proteinleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla potasyum asetat kullanıldığında fenol-kloroform grubuna göre daha düşük düzeyde DNA elde edilmiş olsa da yeterli miktar ve kalitede DNA elde edilebildiğinden araştırmacının sağlığı ve çevreye zararlı olan fenol yerine potasyum asetatın DNA izolasyonunda kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: DNA izolasyonu, fenol-kloroform, potasyum asetat, DNA konsantrasyonu

Effect of Using Potassium Acetate Instead of Phenol-Chloroform for DNA Isolation on DNA Yield and Quality

Abstract: The objective of this study was to investigate the effect of using potassium acetate instead of phenol-chloroform on the yield and quality of DNA used for polymerase chain reaction (PCR) assays. For this purpose 13 blood samples collected from Kilis goats were used. After proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction or treatment with potassium acetate was performed on aliquots of each sample. Concentration and purity of DNA samples were measured at 260 nm and 260nm/280nm by using a spectrophotometer, respectively. Concentration of DNA in phenol-chloroform and potassium acetate groups were found to be 0.4185±0.2368 and 0.2753±0.0846 respectively. Absorbance ratio values of phenol-chloroform and potassium acetate groups were 1.6380±0.1817 and 1.7435±0.0659 respectively. Differences between groups were statistically significant.

The results suggested that sufficient amount of DNA were obtained by using potassium acetate in order to remove proteins. Therefore potassium acetate can be used instead of phenol-chloroform which is more hazardous for the health of researchers or for the environment, although DNA yield obtained by using potassium acetate was lower than that obtained by using phenol-chloroform.

Keywords: DNA isolation, phenol-chloroform, potassium acetate, DNA concentration

Giriş

Moleküler genetik araştırmaların ilk adımı genomik DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesidir. Genomik DNA'nın elde edilmesi hücre zarının eritilmesi, proteinlerin parçalanması, proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gibi başlıca adımları içerir. Hücre zarı lipid yapısında olduğundan hücre zarını eritmek için çeşitli anyonik deterjanlar kullanılmaktadır. Proteinlerin parçalanması amacıyla genellikle Proteinaz K ya da çeşitli proteaz enzimler (Pronase E gibi) kullanılmaktadır (Bailes ve ark., 2007).

Ortamda bulunan parçalanmış proteinleri uzaklaştırmak amacıyla çeşitli denatüre edici maddelerden yararlanılır. Bunların başında güçlü bir denatüre edici olan fenol gelmektedir. Ancak fenol aynı zamanda yakıcı ve irkiltici bir özellikte olduğundan uygun olmayan şartlarda kullanıldığında insan sağlığını tehdit edebilmektedir. Diğer taraftan DNA izolasyonu sonucunda ortaya çıkan atık fenol uygun bir şekilde bertaraf edilmediğinde çevre için de oldukça zararlı bir maddedir. Proteinler lizat üzerine eşit miktarda doymuş sodyum klorür çözeltisi eklenerek de çöktürülebilir (Lahiri ve ark., 1992).

Bu ise 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri ile çalışıldığında DNA izolasyonu yapılacak olan başlangıç çözeltisinin miktarının oldukça az olmasını gerektirmektedir.

DNA izolasyonu amacıyla slika jel teknolojisi kullanan hazır DNA izolasyon kitlerinden de yararlanılabilir. Ancak bu tür yöntemler yüksek maliyetlidir. Küçük miktarlarda doymuş potasyum asetat çözeltisi de proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılabilir. Proteinler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen çözelti içerisindeki DNA, izopropanol ile presipite edilerek saflaştırılabilir (Sambrook ve ark. 1989).

Türkiye'de yapılmış olan çalışmalarda DNA izolasyonu amacıyla genellikle fenol-kloroform yöntemi (Akyüz ve ark., 2008; Akyüz ve Ertuğrul, 2008; Bozkaya ve ark., 2011; Korkmaz-Ağaoğlu ve ark., 2010) ya da hazır DNA izolasyon kitleri (Özşensoy ve ark., 2008; Balcıoğlu ve ark., 2010; Budak-Yıldıran ve ark., 2010) kullanılmıştır. Proteinlerin potasyum asetat ile çöktürülerek ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan yöntem kullanım alanı bulamamıştır. Bu yöntem çok az miktarda potasyum asetat çözeltisi gerektirdiğinden ve kolayca uygulanabildiğinden fenol-kloroform ile saflaştırma işlemi için alternatif olarak kullanılabilir.

Bu çalışmanın amacı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemlerinde kullanılmak üzere kandan genomik DNA izolasyonu amacıyla fenol-kloroform yerine potasyum asetat çözeltisi kullanımının elde edilen DNA miktarı ve kalitesi üzerine etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, başka bir çalışma kapsamında Kilis keçilerinden toplanmış olan tam kan örnekleri (n=13) oluşturmuştur (Bozkaya ve ark., 2008; Bozkaya ve Gürler, 2011). Her bir hayvana ait 400'er µL tam kan örneği iki ayrı mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 1000 µL 20 mM Tris-Cl (pH 8.0) eklenmiştir. Eritrositlerin hemolize olması için 5 dakika bekletildikten sonra 12000xg de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Lökositlerin yıkanması amacıyla aynı işlem ikinci bir kez daha tekrarlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra lökosit peleti üzerine 600 µL lizis çözeltisi (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA ve %1' sodyum dodesil sülfat, pH 8.0) ve 20 µL proteinaz-K (10 mg/mL) çözeltisi eklenmiştir. Hücrelerin parçalanması amacıyla 56 °C'de 90 dakika inkube edilmiştir. Ortamda bulunan RNA kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla her bir örnek üzerine 5 µL RNase çözeltisi eklenerek (Fermentas, Vilnius, Litvanya) 37 °C'de 30 dakika inkube edilmiştir.

Her bir örneğe ait iki tüpten biri üzerine 200 µL distile su ve 400 µL fenol + 200 µL kloroform, diğerine ise 200 µL 5 M potasyum asetat çözeltisi eklenmiştir. Tüpler iki dakika çalkalandıktan sonra 10000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Fenol-kloroform grubundaki örneklerde üstteki sulu fazdan, potasyum asetat grubundaki örneklerde ise süpernatant kısımdan 600 µL yeni bir tüpe aktarılmıştır. Fenol-kloroform grubundaki örnekler üzerine 60 µL 3 M sodyum asetat çözeltisi ve 660 µL izopropanol eklenmiştir. Potasyum asetat grubundaki örnekler üzerine ise 60 µL distile su ve 660 µL izopropanol eklenmiştir.

13000xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki kısım atılmış ve üzerine %75'lik soğuk etanol eklenerek 13000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki kısım dökülerek kalan etanol tamamen uzaklaştırılmış ve peletlerin kurumması için oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilmiştir. Pelet 50 µL nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüştür.

Çözelti içerisindeki DNA konsantrasyonu bir spektrofotometre yardımıyla 260 nm UV ile ölçülmüş, çözeltinin saflığı ise 260 nm ve 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri arasındaki oran (absorbans oranı; OD260/280) ile değerlendirilmiştir. Ölçüm amacıyla DNA çözeltisi distile su ile 20 kat sulandırılmıştır. DNA konsantrasyonu;

DNA konsantrasyonu (µg/µL) = OD260 x 50 x SO/1000 formülü ile hesaplanmıştır. Burada; OD260: 260 nm ölçülen absorbans değerini SO: Sulandırma oranını göstermektedir

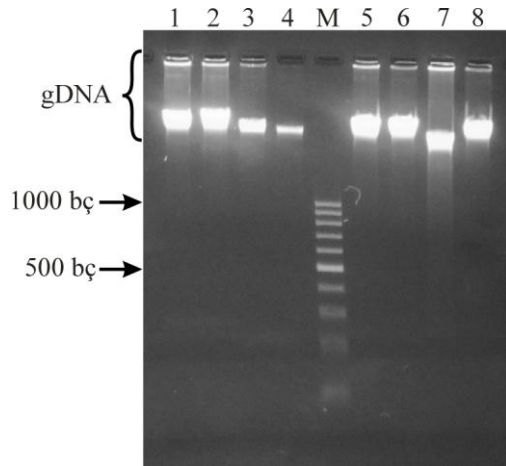
İzole edilen DNA örneklerinin PZR işlemine uygunluğunu belirlemek amacıyla alfa-S1-kazein geninin (CSN1S1) 9. exonu ile bunu takip eden intronu içine alan DNA bölgesi Ramunno ve ark. (2000) tarafından bildirilen primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen genomik DNA örneklerinin kalitesi %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile, PCR ürünleri ise %3'lük agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. DNA konsantrasyonları ve absorbans oranları açısından fenol-kloroform ile potasyum asetat grupları arasındaki farkın önem düzeyi bağımlı t-testi ile belirlenmiştir. Verilerin analizinde Minitab 12 paket programı kullanılmıştır.

Bulgular

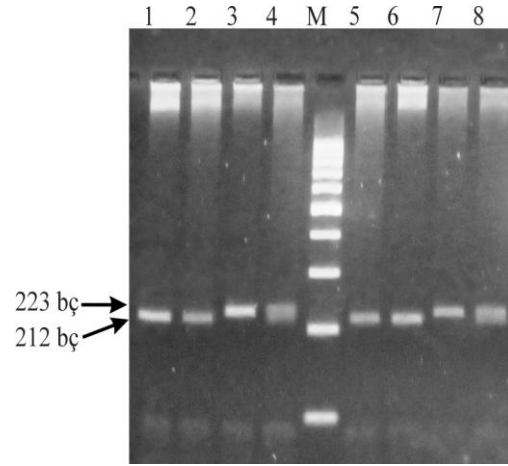
Hem fenol-kloroform hem de potasyum asetat grubunda yüksek molekül ağırlığına sahip genomik DNA elde edilmiştir (Şekil 1). Fenol-kloroform ve potasyum asetat grubunda ölçülen DNA konsantrasyonları (OD260) ve absorbans oranları

(OD260/280) Tablo 1’de gösterilmiştir. DNA konsantrasyonları fenol-kloroform grubunda 0,112 ile 0,802 arasında potasyum asetat grubunda ise 0,118 ile 0,433 arasında değişmiştir. Absorbans oranları ise fenol-kloroform grubunda 1,379 ile 2,056 arasında potasyum asetat grubunda ise 1,587 ile 1,837 arasında değişmiştir.



Şekil 1: Bazı örneklere ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1-4: Fenol-kloroform ve 5-8 potasyum asetat ile elde edilen DNA örnekleri. M: Moleküler büyüklük belirteci (100 bç merdiven).

Fenol-kloroform grubunda ölçülen DNA konsantrasyonu potasyum asetat grubunda ölçülenden daha yüksek ($p=0,02$), OD260/280 oranı ise daha düşük ($p=0,01$) olarak bulunmuştur. Her iki gruba ait örnekler PCR işleminde benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 2).



Şekil 2: Bazı örneklere ait PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1-4 fenol kloroform; 5-8 aynı örneklere ait potasyum asetat grubundaki PCR ürünleri. M: Moleküler büyüklük belirteci (100 bç merdiven)

Tablo 1: DNA konsantrasyonları ve absorbans oranları

Örnek No	DNA konsantrasyonu (OD260)		Absorbans oranı (OD260/280)	
	Fenol-Kloroform	Potasyum asetat	Fenol-Kloroform	Potasyum asetat
1	0,155	0,118	1,400	1,587
2	0,328	0,206	1,677	1,735
3	0,726	0,318	1,596	1,761
4	0,369	0,278	1,532	1,740
5	0,601	0,291	1,599	1,773
6	0,112	0,170	1,379	1,684
7	0,221	0,262	1,606	1,696
8	0,802	0,433	1,521	1,733
9	0,760	0,352	1,587	1,712
10	0,383	0,322	1,794	1,837
11	0,170	0,220	1,734	1,813
12	0,456	0,356	1,813	1,786
13	0,357	0,253	2,056	1,808
Ortalama	0,4185	0,2753	1,6380	1,7435
Standart sapma	0,2368	0,0846	0,1817	0,0659
P value	0,017		0,011	

Tartırma ve Sonuç

Aynı hacimdeki kan örneklerinden elde edilen DNA miktarı bireylere göre değişebilmektedir (Richardson ve ark., 2006). Sunulan çalışmada bireyler arasındaki varyasyondan kaynaklanan farkın ortadan kaldırılması açısından aynı bireye ait kan örnekleri iki farklı yöntemi karşılaştırmak amacıyla kullanılmış ve gruplar arasındaki farklılık bağımlı t-testi ile analiz edilmiştir. Riemann ve ark. (2007) 200 μ L kan örneğinden fenol-kloroform yöntemi ile yapmış oldukları bir çalışmada elde ettikleri DNA konsantrasyonunu (200 μ L içerisinde çözünmüş) ortalama 0,024 μ g/ μ L olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada kullanılan kan rneği miktarı ve DNA'yı çözmek için kullanılan suyun hacmine göre düzeltildiğinde bu miktar 0,191 μ g/ μ L olarak bulunmaktadır. Bu miktar sunulan çalışmada fenol-kloroform (0,4185 \pm 0,2368) ve potasyum asetat (0,2753 \pm 0,0864) gruplarında elde edilen DNA konsantrasyonundan daha düşüktür. Riemann ve ark. (2007) tarafından bildirilen sonuçlar ile sunulan çalışmanın sonuçları arasındaki fark araştırmada kullanılan canlı türlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Fenol-kloroform grubunda elde edilen yüksek OD260 değeri bu grupta potasyum asetat grubuna göre daha fazla miktarda DNA elde edildiğini düşündürmektedir. Ortama potasyum asetat eklendiğinde suda çözünmeyen potasyum-SDS bileşiği oluşmakta ve proteinlere bağlı olan bu bileşik çökmektedir (Demeke ve Jenkins, 2010). Bu nedenle bir miktar DNA çökelen potasyum-SDS-protein kompleksi içerisinde tutulmuş olabilir. Ancak sadece genomik DNA değil aynı zamanda RNA, protein, serbest nükleotidler ve fenol de 260 nm'de yüksek absorbands göstermektedir. Bu durumda çözelti içerisindeki DNA miktarı olduğundan daha yüksek olarak hesaplanabilir. Hücre lizati proteinaz-K ile muamele edildikten sonra RNase ile muamele edildiğinden llen OD260 değerinin çözelti içerisindeki RNA'dan kaynaklanmadığı söylenebilir.

Saf DNA zeltisinin OD260/280 oranının 1,8 RNA zeltilerinin ise 2,0 ve üzeri olması gerektiği bildirilmektedir (Sambrook ve ark., 1989). Bununla birlikte Wilfinger ve ark. (1997) OD260/280 oranının nükleik asitleri çözmekte ya da sulandırmakta kullanılan çözücünün pH'sına bağlı olarak değiştiğini bildirmiştir. Bu nedenle sunulan çalışmada gözlenen 1,8 den düşük OD260/280 değerleri kısmen DNA örneklerini sulandırmakta kullanılan saf suyun pH'sından kaynaklanabilir.

Ancak sunulan çalışmada örnekler aynı distile su ile sulandırıldıklarından gruplar arasındaki farkın kullanılan sulandırıcıdan kaynaklanmadığı söylenebilir. Diğer taraftan özellikle potasyum asetat grubunda llen OD260/280 değerleri DNA için bildirilen değerlere yakın bulunmuştur. Çözelti içerisindeki fenol yaklaşık 270 nm'de yüksek absorbands gösterdiğinden (Hiesinger ve ark., 2001) DNA zeltisi içerisinde fenol kontaminasyonu bulunduğunda OD260 değeri yükselmesine rağmen absorbands oranında düşmeye neden olur. Sunulan çalışmada fenol-kloroform grubunda potasyum asetat grubuna göre daha düşük düzeyde bulunan OD260/280 değerleri fenol-kloroform grubunda fenol kontaminasyonu olduğunu düşündürmektedir (Anonim, 2012). Bu nedenle fenol grubunda potasyum asetat grubuna göre daha yüksek olarak llen OD260 değeri DNA zeltisi içerisindeki fenol kontaminasyonundan kaynaklanabilir. Fenol kalıntısının uzaklaştırılması için kloroform ile ikinci bir saflaştırma işlemi gerekmektedir. Bu ise daha fazla iř gücü, sarf malzeme ve zaman gerektirmektedir. Agaroz jel elektroforezinde iki farklı yöntemle elde edilen DNA rneklerinin birbirine benzer yoğunlukta bantlar gösterdikleri görülmektedir (şekil 1). Diğer taraftan her iki yöntemle elde edilen DNA rnekleri PCR işleminde benzer sonuçlar vermiştir (şekil 2).

Sonuç olarak DNA izolasyonunda proteinleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla potasyum asetat kullanıldığında fenol-kloroform grubuna göre daha düşük düzeyde DNA elde edilmiş olsa da yeterli miktar ve kalitede DNA elde edilebildiğinden araştırıcının sağlığı ve çevreye zararlı olan fenol-kloroform yerine potasyum asetatın DNA izolasyonunda proteinleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- Akyüz B, Bayram D, ErtuğruL O, Işcan KM, 2008: Türkiye' de yetistirilen holstayn ve bazı yerli siğir ırklarında citrullinemia allelinin belirlenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 5 (1), 17-20.
- Akyüz B, ErtuğruL O, 2008: Türkiye'de Holstayn ve yerli siğirlerde üridin monofosfat sentez eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 55, 57-60.
- Anonim (2012): 260/280 and 260/230 Ratios. Thermo Scientific. Technical Bulletin. http://batzerlab.lsu.edu/genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf (Erişim Tarihi 27.06.2012)

- Bailes SM, Devers JJ, Kirby JD, Rhoads DD, 2007: An inexpensive, simple protocol for dna isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Sci* 86, 102–106.
- Balcıoğlu MS, Sahin E, Karabağ K, Karslı T, Alkan S, 2010: Türkiye Yağlı Kuyruklu Koyun Irklarında DNA Parmak izinin RAPD-PCR Yöntemi Kullanılarak Saptanması *Tarım Bilimleri Dergisi*, 16, 55-61
- Bozkaya F, Mundan D, Karabulut O, Yerturk M, Gurler S, Aral F, 2008: An investigation on the distribution of O and D alleles of the CSN1S2 gene in goat populations raised in southeastern region of Turkey. *Small Rumin Re.*, 78, 193-196.
- Bozkaya F, Gürler Ş, 2011: Diversity of a microsatellite locus in the CSN1S1 gene in goat populations raised in the southeastern region of Turkey. *Afr J Biotechnol*, 16, 3087-3090
- Budak Yıldırım FA, Yıldız K, Çakır Ş, Gazyağcı AN, 2010: Kırıkkale bölgesinde koyun kökenli *Echinococcus granulosus* izolatlarının moleküler karakteri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2), 245-250.
- Demeke T, Jenkins GR, 2010: Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem*, 396, 1977–1990
- Hiesinger M, Löffert D, Ritt C, Oelmüller U, 2001: The effects of phenol on nucleic acid preparation and downstream applications *Qiagen News*, 5, 23-26
- Korkmaz Ağaoğlu Ö, Çınar Kul B, Akyüz B, Özkan E, Ertuğrul O, Erol H. 2010. Keçi türünde mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesinde farklı çoklu-PZR (Multipleks PCR) sistemleri. *Vet Hekim Der Derg*, 81, 21-27
- Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Hodes ME, Crisp M, 1992: A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested *J Biochem Bioph Met*, 25, 193–205
- Minitab Inc. 1998: MINITAB release 12 for Windows. Minitab Inc., State College, Pennsylvania.
- Özsensoy Y, Kurar E, Bulut Z, Nizamlıoğlu M, 2008: Mikrosatellit DNA markörleri kullanılarak atlarda ebeveyn tayini: Bir vaka takdimi. *Vet Bil Derg*, 24, 87-91.
- Richardson AJ, Narendran N, Guymer RH, Vu H, Baird PN, 2006: Blood storage at 4°C-factors involved in DNA yield and quality. *J Lab Clin Med Volume* 147, 290-294.
- Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Kurt W. Schmid, Brockmeyer NH, Siffert W, 2007: Comparison of Manual and Automated Nucleic Acid Extraction From Whole-Blood Samples. *J Clin Lab Anal*, 21, 244–248
- Ramunno L, Cosenza G, Pappalardo M, Pastore N, Gallo D, Digregorio P, Masina P, 2000: Identification of the goat CSN1S1^F allele by means of PCR-RFLP method. *Anim Genet* 31, 342-343
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P, 1997: Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22, 474-481

***Yazışma Adresi:**

Faruk BOZKAYA
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Genetik Anabilim Dalı,
Eyyübiye Kampüsü, 63200, Şanlıurfa
e-posta: farukbozkaya@yahoo.com