

## Hızlı Bakteriyel DNA Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması

Emine Arslan<sup>1</sup>, U. Sait UÇAN

Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

**Özet:** Bu çalışma bakteriyel DNA ekstraksiyonunda kullanılan hızlı metotları karşılaştırmak amacıyla yapıldı. Bu amaçla Gram pozitif bakterilere örnek olarak *Staphylococcus sp.*, Gram negatiflere örnek olarak *Escherichia coli* seçildi. Bu bakterilerin buyyon kültürlerinden ( $\sim 10^7$  cfu/ml) kaynatma, sonikasyon ve dondurma-çözme yöntemleri ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA miktarları 260 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okundu. Sonikasyon ile elde edilen DNA miktarı diğer yöntemlerle elde edilen DNA miktarlarından istatistiksel olarak daha fazla bulundu ( $p < 0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, DNA ekstraksiyonu

### Comparison Of Rapid Bacterial DNA Extraction Methods

**Summary:** This study was carried out to compare rapid bacterial DNA extraction methods. Strains of *Staphylococcus sp.* and *E. coli* were preferred to represent Gram positive and Gram negative bacteria, respectively. DNA extractions from the cultured bacteria ( $\sim 10^8$  cfu/ml) were made by the methods of boiling, sonication and freeze-thawing. Then, the quantities of DNA extracted were measured by spectrophotometric analysis at 260nm. DNA quantities obtained by sonication method were statistically more than those obtained by other methods ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, DNA extraction

---

<sup>1</sup> E-mail: earslan@selcuk.edu.tr

## Giriş

Bakteriyel enfeksiyonların epidemiyolojik araştırmalarında geleneksel biyokimyasal ve fizyolojik tiplendirme metodlarının yerini günümüzde Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) analizi gibi moleküler teknikler almıştır [1, 2, 3]. Moleküler çalışmaların ilk basamağını bakteriyel DNA ekstraksiyonu oluşturur. Bu amaçla mikrobiyal DNA ekstraksiyonu için çeşitli laboratuvar yöntemleri geliştirilmiştir.

Bununla birlikte bu tekniklerden hangisinin, bakteriyel DNA izolasyonunda daha etkili olduğu kesin olarak açıklanmamıştır [4].

Moleküler çalışmalarda yeterli DNA ekstrakte edebilmek için çalışılacak örnek miktarı her zaman yeterli olmayabilir. Bu nedenle DNA ekstraksiyonunda hangi metodun seçileceği önemlidir [5]. Bu çalışmanın amacı, herhangi bir kimyasal ya da kit kullanmadan kaynatma, sonikasyon ve dondurma-çözme yöntemleri ile bakteri hücre duvarını parçalayarak ekstraksiyon süre ve giderlerini düşürmek ve az miktarlardaki materyalden etkili bir şekilde DNA ekstrakte etmek amacıyla farklı ve hızlı ekstraksiyon metotlarını karşılaştırmaktır.

## Materyal ve Metot

Çalışma için Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus* sp., Gram negatif bakterilerden ise *Escherichia coli*'ye ait birer suş kullanıldı. Çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Laboratuvarındaki *Staphylococcus* sp ve *E. coli* stok kültürlerinden Triptone Soy Agar'a pasajlanan bakteri suşları 37°C'de 18 saat inkübe edildi, fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  sulandırılmaları yapılarak koloni sayma metodu ile bakteri sayımı yapıldı. Bakteri süspansiyonları  $2 \times 10^7$ /ml olacak şekilde sulandırıldı ve bu süspansiyonlardan 5'er ml ( $\sim 10^8$  / ml bakteri) DNA ekstraksiyonunda kullanıldı. Her bir suştan 20 kez sonikasyon, dondurma-çözme ve kaynatma yöntemleri ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Sonikasyon ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml ( $\sim 10^8$  /ml bakteri) alınarak 5 dakika sonikatörde, 25 Hz'de tutularak parçalandı [6]. Daha sonra 10 dk 13500 rpm de santrifüj edilerek üst sıvı toplandı. Dondurma-çözme ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml ( $\sim 10^8$  /ml bakteri) alınarak üç kez hızlı bir şekilde dondurulup, hızlı bir şekilde çözündürülmüştür. Santrifüjlenerek parçalanmış bakteriler uzaklaştırıldı [7]. Kaynatma ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml ( $\sim 10^8$  /ml bakteri) alınarak 10 dk kaynatıldı. Santrifüjlenerek hücre kalıntıları uzaklaştırıldı [7].

DNA miktarları spektrofotometre (SHIMADZU 1700) ile ve yönergesine uygun olarak 260nm'de okutulularak belirlendi.

Santrifüj sonrası tüplerin pelet kısımlarından bir öze dolusu alınarak preparat hazırlandı. Preparatlar, kurutulup, alevden üç kez geçirerek tespit edildi. Metilen mavisi ile 8 dk boyandı ve hafif akan suda yıkandı. Mikroskop ile parçalanmamış bakteri varlığı arandı. Bir mikroskop sahasında rastlanan  $\leq 3$  sayıdaki parçalanmamış bakteri varlığı dikkate alınmadı.

Sonuçların istatistikî değerlendirilmesi varyans analizi (P=0.05) ile ve SPSS programı kullanılarak yapıldı.

## Sonuç ve Tartışma

Bu çalışma ile bakterilerden DNA izosyonunda bakteri hücresinin duvarını parçalamak için yaygın olarak kullanılan hızlı ekstraksiyon yöntemlerinden sonikasyon, dondurma-çözme ve kaynatma yöntemleri karşılaştırıldı. DNA konsantrasyonları 260nm ( $A_{260}$ ) de absorbanslarına göre belirlendi. (Tablo 1).

Tablo 1: Kaynatma, dondurma-çözme ve sonikasyon metoduyla elde edilen DNA miktarlarının karşılaştırılması. (n: Bir örneğe uygulanan ekstraksiyon sayısı)

Metot	<i>Staphylococcus</i> sp.		<i>E. coli</i>
	n	* $A_{260}$	* $A_{260}$
Kaynatma	20	0.028±0.018a	0.273±0.0130c
Dondurma-çözme	20	0.020±0.010a	0.275±0.024c
Sonikasyon	7	0.081±0.040b	0.306±0.028d

\*  $A_{260}$ :260 nm'de ölçülen ekstraksiyonlara ait DNA miktarlarının aritmetik ortalaması ve standart sapması. Aynı satır ve sütunda farklı harf bulduran ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Hem *Staphylococcus sp.* hem de *E. coli* DNA miktarları istatistiksel olarak değerlendirildi ve kaynatma ve dondurma-çözme metodu ile elde edilen DNA miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü (P>0.05). Fakat sonikasyon metodu ile elde edilen DNA miktarının hem kaynatma hem de dondurma-çözme metodu ile elde edilen DNA miktarından farklı olduğu istatistiksel olarak tespit edildi (P<0.05).

Bu çalışmada her iki bakteri izolatu için, basit boyama ile sonikasyon ve kaynatma yöntemlerinde parçalanmamış bakteriye rastlanmazken, dondurma metodunda çok az da olsa ( $\leq 3$ /mikroskop sahası) parçalanmamış bakteri hücreleri görüldü. More ve ark. [8] bakteri hücre duvarının parçalanma oranını dondurma-çözme ve cam boncuklarla homojenizasyonla parçalama öncesi ve sonrasında ölçtüklerinde; boncuklarla parçalanma yönteminin (parçalanmamış bakteri hücreleri %2) dondurma-çözme yöntemine göre (parçalanmamış bakteri hücreleri %8) daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise dondurma-çözme metodu ile  $\leq 3$  adet bakteri parçalanmadan kalmıştır. More ve ark. [8] % ile ifade ettikleri değeri (%8), araştırmacılar sayı vermediği için, bu çalışmada ifade edilen adet ile karşılaştırma olanağı yoktur. Ancak More ve ark. [8] 'larının çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmada da dondurma-çözme ile en az bakteri parçalandığı belirlenmiştir.

Yeates ve ark. [9], çeşitli yöntemlerle topraktan bakteri DNA'sını ekstrakte etmişler ve DNA'nın büyüklüğü bakımından bu teknikleri kıyaslamışlardır. Sonikatör kullanarak ekstrakte edilen DNA miktarını, enzimlerle ve cam boncukları çalkalama ile DNA ekstraksiyonu gibi diğer metodlara göre daha düşük bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise en yüksek parçalama gücü sonikasyon ile elde edilmiştir. Yeates ve ark. [9]'nın sonikasyon ile yüksek miktarda DNA ekstrakte edememeleri kullandıkları toprak kökenli bakterilerin sporlu yaşam formu gösteren türler olmaları ve mekanik etkilere (sonikasyon gibi) daha dirençli olmaları ile açıklanabilir. Pitcher ve ark. [10], Gram negatif bakteri hücrelerinin küçük miktarlarından yüksek DNA elde edilmesi için uygun ve hızlı Guanidyum tiyosiyanat ekstraksiyon metodunu tanımlamışlardır. Gram negatif bakterileri Guanidyum tiyosiyanat: 5 mol/l, EDTA 100 mmol/l ve % 0.5 v/v sarkosil (GES) ayırıcı ile karıştırıp parçalayarak, Gram pozitif bakterileri ise GES ayırıcı ile daha yavaş ve daha fazla miktarda DNA eldesi için, lizozim enzimi veya *S. aureus* için lizostafin ile muamele etmişlerdir. Araştırmacılar [10] *S. aureus*'un 260 nm'de moleküler absorpsiyonu 1.97 bulunurken, Gram negatif olan *E. coli*'nin 1.79 olduğunu gözlemişlerdir. Bu durum, lizostafinin *S. aureus*'un hücre duvarını parçalamaya özgü bir enzim olması ile açıklanabilir. Bu çalışmada ise hiçbir kimyasal madde kullanmadan *E. coli*'nin DNA absorbans değeri 0.306 bulunurken *Staphylococcus sp.*'un 0.081 bulunmuştur. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı farklılığından dolayı *Staphylococcus sp.*'den DNA izolasyonunda 0.081 absorbans değerinin üzerinde izolasyonlar için enzim kullanımı önerilebilir.

Deneyisel çalışmalarda DNA ekstraksiyon metodunun etkinliği ve DNA ekstraksiyon kitlerinin ve metodlarının kullanımı, klinik örnekler üzerindeki başarılı ve geçerli PCR çalışmalarında önemli bir basamaktır. Bu yüzden DNA miktarının önemli olduğu çalışmalarda ekstraksiyon metodunun seçilmesi önem arzedebilir. Sonuç olarak, çok sayıda *E. coli* suşuna ait DNA izolasyonlarına ihtiyaç duyulan çalışmalarda (epidemiolojik çalışmalar gibi) sonikasyon yöntemi, başvurulabilecek bir izolasyon metodu olarak önerilebilir.

## Kaynaklar

1. Maslow, J. N., Mulligan, M. E., Arbeit, R. D. **Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms.** Clin. Infect Dis. 17: 64-153 (1993).
2. van Belkum, A. **DNA Fingerprinting of Medically Important Microorganisms by Use of PCR.** Clin. Microbiol. Rev. 7: 84-174 (1995).
3. Wang, G., Whittam, T. S., Berg, C. M., Berg, D.E. **RAPD (Arbitrary Primer) PCR is More Sensitive Than Multilocus Enzyme Electrophoresis for Distinguishing Related Bacterial Strains.** Nucleic Acids Res. 21: 5930-5933 (1993).
4. Kevin, A., **Comparison of Rapid Methods for the Extraction of Bacterial DNA from Colonic and Fecal Lumen Contents of the Pig.** J. Applied Microbiol. 94: 988-993 (2003).
5. Rengarajen, K., Cristol, M.S., Mehta, M., Nickerson, J.M. **Quantifying DNA Concentrations Using Fluorometry: A Comparison of Fluorophores.** Molecular Vision. 8: 416-421 (2002).
6. Maniatis, T., Sambrook, J. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual,** Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA. (1989).
7. Newton, C.R. **PCR Essential Data.** John Wiley and Sons LTD. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO 19, 1UD, UK. (1995).
8. More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., Madsen, E.L. **Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganism and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment.** Applied and Environmental Microbiology 60:5, 1572-1580 (1994).
9. Yeates, C., Gillings M. R., Davison, A. D., Altavilla, N., Veal, D. A. **Methods for Microbial DNA Extraction from Soil for PCR Amplification.** Biological Procedures Online. 1:40-47 (1998).
10. Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen R. J. **Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate.** Letters in Applied Microbiology 8:151-156 (1989).