

**SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK
YÜKSEKOKULU**

PATOLOJİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ

PLT214-MOLEKÜLER PATOLOJİ TEKNİKLERİ

Öğr. Gör. Nüket ÇALIŞKAN
nuket.caliskan@omu.edu.tr

1

DNA, RNA ve PROTEİN İZOLASYONU

PLT214-MOLEKÜLER PATOLOJİ TEKNİKLERİ

Hafta 5-6

2

Moleküler Teknikler

- Moleküler tekniklerin esas avantajı;
 - ✓ hastalığın fenotipini değerlendirmeksizin doku analizine ve tanıya ulaşmayı sağlayan, güçlü teknikler olmasıdır.
 - ✓ Ayrıca RNA veya DNA düzeyindeki anormallikleri tespit ettiği için sensitif ve spesifiktirler.
 - ✓ Çünkü bir çok hastalığın doğuştan (konjenital) veya sonradan kazanılmış olsun, genetik bir temeli vardır.

3

Moleküler Patoloji Kullanım Alanları ve Yöntemler

1. Tek gen mutasyonları
 - ✓ Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
2. Kromozom anormallikleri
 - ✓ Çoğunlukla floresan in situ hibridizasyon (FISH)
3. DNA'daki anormallikler
 - ✓ In situ hibridizasyon (ISH)
4. Protein ifadesindeki değişiklikler
 - ✓ İmmünohistokimya
5. Tek bir örnekte birden fazla moleküler hedefin değerlendirilmesi
 - ✓ Multipleks test yöntemleri

4

Moleküler patoloji testleri için kullanılabilir materyaller;

- ✓ Taze/dondurulmuş doku
- ✓ Formalin ile tespit edilmiş doku,
- ✓ Parafine gömülü doku,
- ✓ H-E ile boyanmış veya boyasız kesitler,
- ✓ Boyalı veya boyasız sitoloji yayma preparatları,
- ✓ Hücre bloğu,
- ✓ Taze vücut sıvıları,
- ✓ Kan

5

Moleküler Analiz Öncesi İş Akışı

1. Doku/Sıvı Örnekleme ve Ön hazırlık Basamakları
2. Test Aşaması
3. Raporlama

6

1. Doku/Sıvı Örneklemesi ve Ön hazırlık Basamakları

- **Preanalitik Süreç:** Dokunun/sıvının örneklediği andan, moleküler çalışmanın başladığı aşamaya kadar geçen süreç
- Preanalitik süreçte;
 - ✓ morfolojik detaylar,
 - ✓ moleküler analizlerde kullanılacak nükleik asit ve proteinlerin de test amacına uygun şekilde korunmalıdır.



7

1. Doku/Sıvı Örneklemesi ve Ön hazırlık Basamakları

Preanalitik sürecin aşamaları;

- ✓ dokunun cerrahi eksizyonu/sıvı örneklemesi/ kan alınması,
- ✓ dokuların patoloji laboratuvarında makroskopik olarak değerlendirilmesi ve örneklenmesi,
- ✓ Doku takip süreci,
- ✓ doku bankası için uygulanacak işlemler olarak sıralanabilir.



8

1. Doku/Sıvı Örneklemesi ve Ön hazırlık Basamakları

- Doku/sıvı örneklemesi ile doku tespiti ya da dondurma işlemi arasındaki süre en fazla 30dk
- Taze olarak patoloji laboratuvarına ulaşan materyallerin zaman kaybetmeden örneklenerek doku işlem prosedürüne alınması hem morfolojinin hem de moleküler içeriğin korunması için önem taşımaktadır.
- Moleküler inceleme için kullanılacak en uygun tespit solüsyonları dokularda %10'luk tamponlu formalin solüsyonu, sıvılarda %70 etanoldür.



9

2. Test Aşaması

- Materyal Hazırlık aşamasından sonra amaca uygun olarak kullanılacak yöntemlerdir.
- Hedefe göre farklılık gösterebilir.



10

3. Raporlama

- Moleküler patoloji raporlarında standardizasyon ve verilmek istenen bilgilerin yeterliliği çok önemlidir.

Raporda;

- ✓ Hasta kimlik bilgileri
- ✓ Test laboratuvarı bilgileri
- ✓ Materyalin tanımı ve yeterliliği
- ✓ Çalışma uygulanacak materyalin biyopsi tanısı ve tanıyı veren merkez
- ✓ Yapılan testin adı
- ✓ Kullanım yöntemlerle ilgili bildilendirme
- ✓ Testin sonucu ve açıklaması
- ✓ Test sonuçlarından sorumlu hekimin onayı



11

Ekstraksiyon-İzolasyon

•Ekstraksiyon (Özütleme):

–Çalışılacak molekül grubunun yalıtımı (izolasyon) amacıyla gerçekleştirilen işlemler

- Parçalama
- Ayırma
- Saflaştırma



12

DNA İzolasyonu



Organik olarak bozulmaya uğramamış hücresel yapılardan özel teknikler kullanılarak, DNA molekülünün ortaya çıkarılmasıdır.

DNA hücre içerisinde,

- ✓ Çekirdek,
- ✓ Mitokondri ve
- ✓ Kloroplastlarda bulunmaktadır.



13

DNA MOLEKÜLÜ

- ✓ Negatif yüklüdür,
- ✓ Suda çözünür,
- ✓ Alkolde çözünmez.



14

DNA İzolasyonu

- DNA ekstraksiyonu veya izolasyonu sonrasında elde edilen sıvıya, **ekstrakt** veya **izolat** denir.



15

- 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 mikrodiseksiyon ile alınan hücrelerden izole edilebilir.



16

DNA Ekstraksiyonu

- Dokulardan DNA ekstraksiyonu için kullanılan çok sayıda farklı protokol ve ticari kit mevcut
- DNA ekstraksiyonunun üç ana basamağı vardır;
 - ✓ Hücrelerin parçalanması (Lizis)
 - ✓ Proteinlerin uzaklaştırılması (Pürifikasyon)
 - ✓ DNA'nın çöktürülmesi (Presipitasyon)



17

1.Hücrelerin parçalanması (Lizis)

Amaç DNA'yı açığa çıkarmak;

- ✓ Önce doku parçalanır
- ✓ Daha sonra hücre ve çekirdek zarı patlatılarak DNA açığa çıkarılır.



18

1.Hücrelerin parçalanması (Lysis)

➤ Dokunun parçalanması:

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



19



20

1.Hücrelerin parçalanması (Lysis)

Kullanılacak parçalama yöntemi:

- amaçlanan çalışmaya
- Kullanılan biyolojik materyalin tipine
- İzole edilecek molekül grubuna
- Eldeki olanaklara
- Kabul edilebilir etkinliğe bağlıdır.

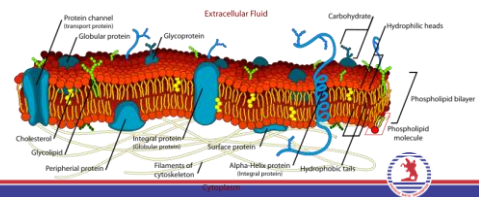


21

Hücre Membranının parçalanması

Dna Ekstraksiyonu için SDS veya CTAB gibi çözücüler ile muamele edilerek, hücre zarı parçalanır.

Bu işlem için Lysis Bufferları kullanılır.



22

Lysis buffer

□ Deterjan

- ✓ SDS (sodium dodecyl sulfate)
 - membranların eritilmesi ve proteinlerin denatürasyonu

□ Buffer

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

□ Selasyon (divalent ve trivalent metal iyonlarının bağlanması)

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

□ Proteinaz K: peptid bağlarının yıkılması →DNAaz'ların inhibisyonu



23

1.Hücrelerin parçalanması (Lysis)

- Parçalama (homojenizasyon) yöntemleri uygulanarak doku veya hücrelerin çeper ve zar yapıları yok edilir.
- Ele geçen ve çalışılacak molekül grubunu (DNA, RNA, Protein) içeren karışıma **HOMOJENAT** denir.



24

• Homojenatta:

- Membran parçaları
- Parçalanmamış doku veya hücreler
- Bu kısımların uzaklaştırılması için ön ayırma işlemi yapılır.
- Ön ayırmadan sonra elde edilen, çalışılacak molekülle birlikte birçok molekülü içeren karışıma “ham özüt” (crude extract) denir.

25

Hücre Lizisi

- Lizis buffer ve parçalanmış doku 55°C’de su banyosunda bir gece boyunca inkübe edilir (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 aktiftir.



26

2. DNA Pürifikasyonu

- Sellüler ve histon proteinlerinin ve hücre içeriklerinin uzaklaştırılmasıdır.
- Bu amaçla **fenol-kloroform-izoamilalkol** organik çözücüler kullanılır.
- Her ikisinde güçlü denatürasyon ajanlarıdır ve proteinleri denatüre ederler.
 - Fenol, protein ve lipidleri çözer.
 - Kloroform, fenolün faz yoğunluğunu artırır.
 - İzoamil alkol köpürmeyi azaltır.



27

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

- Fenol ve kloroform **organik solventler**. Hidrofobik hücre komponentleri bu solventlere hapsolur: membran lipitleri, hidrofobik polipeptidler, polisakkaritler.....



28

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

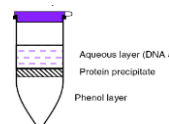
- Lizis buffer içindeki DNA’ya 25/24/1 oranlarında hazırlanmış Fenol/Kloroform/Izoamilalkol eşit miktarda eklenir ve sürekli rotasyon yapılarak 20 dk/5 saat karıştırılır.
- DNA ekstraksiyonu için kullanılacak fenol pH 8’de bufferlanmış olmalıdır.



29

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

- Santrifüj yapılır : (10000rpm 10°C 10 dk.),
 - ✓ sulu faz (üst): DNA ve RNA
 - ✓ Ara faz : hücre proteini, lipid ve hidrofob içerik
 - ✓ Alt faz: Fenol tabakası

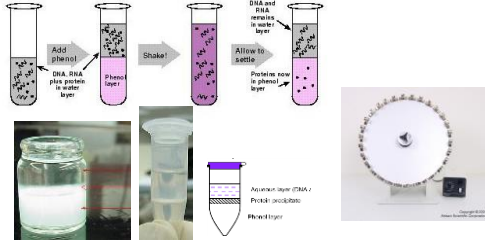


❖ pH 8 Fenolde DNA, pH 4.5 Fenolde RNA sıvı fazda kalır



30

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu



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



31

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

- **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
- **İzoamilalkol** kloroformu stabilize eder ve köpüklenmeyi engelleyerek protein çöktürülmesinin orta fazda stabil kalmasını sağlar
- Fenol iritan ve nörotoksik bir maddedir.



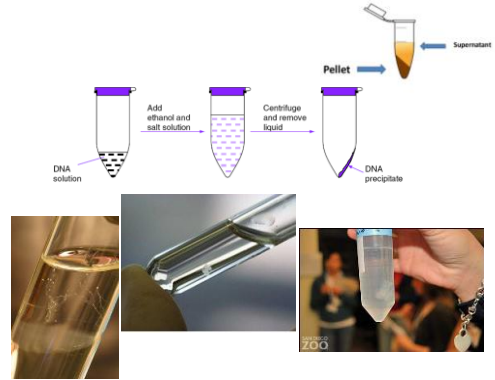
32

3. DNA'nın çöktürülmesi (Presipitasyon)

- Sıvı fazdan gelen miktarın üzerine hacmin 2.5-3 katı **soğuk 95% etanol** eklenir ve -20°C'de bir gece bekletilir.
- Bir gece bekletmeyip santrifüj edilebilir.
- Sıvı haldeki solusyona %100 etanol katılınca, solüsyon genellikle %80'in üzerinde etanol içerir hale gelir, DNA ancak %65'e kadar olan etanol solüsyonlarına eriyebilir olduğu için küçük partiküller oluşturmaya başlar.



33

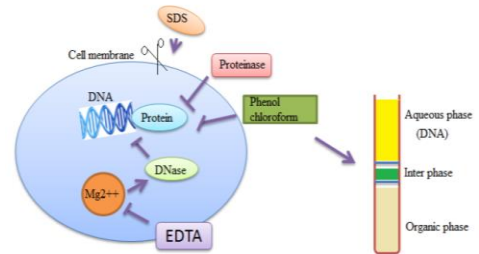


34

- 10000 rpm'de 10 dk. 4°C'de santrifüj et.
- Fazla tuzu uzaklaştırmak için DNA çöktürülmesini %70 EtOH ile yıka ve kurumaya bırak.
- etanolü/isopropanolü kurut, DNA'yı (pellet) TE (Tris-EDTA) buffer ya da su ile 37°C'de çöz.
- 4°C'de veya uzun süreler için -20°C'de sakla



35



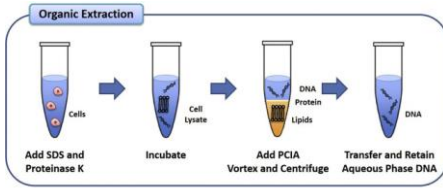
36

Özet

- DNA ekstraksiyonu için örnek
- Yüksek sıcaklık + deterjan + tuz tamponunda enzim ile hücreleri parçalamak
- Hücresel proteinleri uzaklaştırmak
- Nükleasitleri etanol ile çöktürmek



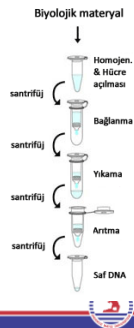
37



39

Silika kolon temelli kitler

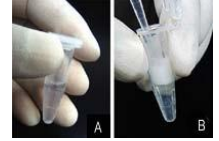
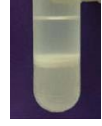
- Prensip, DNA'yı hidrojen bağlarını bozarak denatüre etmek için örneğe kaotropik tuzların eklenmesidir
- Bu koşullar altında DNA seçici olarak kolondaki silika reçineye bağlanacaktır, böylece onun örneğin diğer yarısından ayrılması sağlanır
- Yıkamadan sonra, DNA'yı renatüre hale getiren düşük bir tuz çözeltisi ile kolondan alınır, çünkü silikaya afinitesini kaybeder



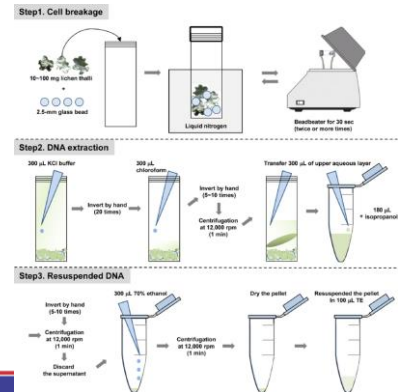
41

Özet

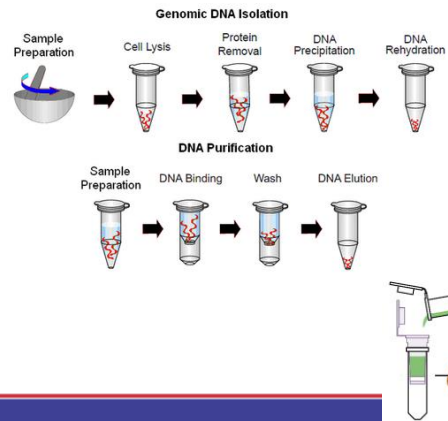
1. Hücreler liziz tamponunda parçalanır.
✓ Liziz tamponu:
✓ deterjan (SDS), tuz (NaCl), Proteinaz K
2. Fenol/Kloroform/Izoamil (PCI) eklenir ve karıştırılır.
✓ Fenol, protein ve lipidleri çözer.
✓ Kloroform, fenolün faz yoğunluğunu artırır.
✓ Izoamil alkol köpürmeyi azaltır.
3. Kısımların ayrılması için santrifüjlenir:
✓ sulu faz (üst): DNA ve RNA
✓ Ara faz: hücre proteini, lipid ve hidroforb içerik
4. Üst kısım uzaklaştırılır ve saflaştırılır
5. Su veya TE (Tris/EDTA) tamponu içinde DNA elde edilir.



38



40



42

UNUTMAYIN!!!

Bazı genel kurallar bütün DNA deneylerinde geçerlidir!!!

- Deneyi iyi bilmek
- Örneği olabildiğince saf elde etmek
- Mümkün olduğunca her zaman dikkatli ve nazik olmak.
- Molekülün özelliğini çok iyi bilmek
- İhtiyaç olan malzemelerin miktarını dikkatlice düşünmek



43

Temel kurallar

- Kan – kırmızı kan hücrelerini, Triton-X-100 gibi hafif bir deterjan ile liziz edin, patlatın.
- Örnekleri kendinizden korumak için eldiven giyin.
- Enzimatik işlemleri yavaşlatmak için buz üzerinde çalışın.
- Tüm çözeltileri otoklavlayın ve (SDS ve organik çözücüler hariç) buzdolabında saklayın.
- İsteddiğiniz DNA'yı alana kadar, tüm peletleri ve süpernatantları saklayın.



44

RNA İZOLASYONU

- RNA, DNA gibi her hücrede benzer bir dağılım göstermemektedir. Bu nedenle ilgilendiğimiz RNA türünün hangi hücreye özgül olduğunun bilinmesi gerekir.
- Ökaryot hücrelerde total RNA oranının hücre ağırlığının %1 civarındadır
- Ökaryot hücre yaklaşık 10-15 µg toplam RNA içermektedir.
- saf olarak elde edilebilen mRNA 2-3 µg'dır.



45

RNA**Hücrede Bulunan RNA'ların;**

- %80-85 rRNA (28S, 18S, 5S ökaryot)
- %1-5 mRNA
- %10-15 tRNA
- Ayrıca miRNA, siRNA, snRNA gibi farklı küçün RNA'lar da vardır.



46

RNA İZOLASYONU

- RNA çalışmalarında en önemli koşul **hasar görmemiş ve en saf** haliyle RNA'nın izolasyonudur.
- Moleküler Biyoloji çalışmalarının en kritik aşamalarından biri RNA izolasyonudur.
- RNA izolasyonu çok zordur.
- DNA kadar kararlı bir molekül değildir RNaz ile kolayca yıkılır.
 - ✓ Çünkü, Ribonükleazlar (RNaz = RNase) çok stabildir.
 - ✓ İzolasyon sırasında RNA'ların parçalanması çok sık karşılaşılan bir durumdur.
 - ✓ Çünkü, RNA stabil olmayan bir moleküldür. Kolay yıkılır.
- İzolasyon sırasında en sık karşılaşılan sorun aktivitesini uzun süre koruyan, ribonükleaz (RNaz) kontaminasyonudur.
- Çok az miktarda RNaz kontaminasyonu bile RNA'nın bütün olarak eldesini engelleyebilir.



47

RNA İZOLASYONU

- RNA izolasyonu kesinlikle soğuk ortamda (Buz içerisinde) yapılmalıdır.
- İzolasyon sırasında tüpler 30 saniye kadar kısa bir süre dışarıda kalsa bile RNA'lar degrade olur.
- İzole edilen RNA'lar -80 derecede saklanmalıdır.



48

RNase Kontaminasyonunu Engellemek

- Bütün çözelti ve sarf malzemeleri uygun şekilde steril edilmelidir.
- Kullanılacak tüpler ve pipetler otoklavlanmalı.
- Çalışma RNase kontaminasyonunu en aza indirecek koşullarda başlatılmalıdır.
- RNA izolasyon çalışmalarında mutlaka steril eldiven kullanılmalı
- çalışma esnasında konuşmamaya özen gösterilerek maske takılmalıdır.



49

RNase Kontaminasyonunu Engellemek

- Kullanılacak tüm solüsyonlar RNase free (RNase'siz) distile su ile hazırlanmalıdır.
 - ✓ Bu amaçla RNase free su **Diethylpropionat (DEPC)** ile hazırlanmalıdır.
 - ✓ DEPC RNazları irreversibl (Geri Dönüşümsüz) olarak denatüre eder.
- İzolasyonda kullanılacak çözeltiler RNase'in aktivitesini yok edecek DEPC ile hazırlanmalıdır.
- Bunun dışında Tris, DEPC'yi inaktive ettiği için Tris içeren çözeltiler DEPC ile hazırlanmamalıdır



50

RNase Kontaminasyonunu Engellemek

- RNA kullanımı için özel pipet seti ayrılmalıdır
- Mümkünse kullanılan tüm kimyasalları, elektroforez tankları, diğer tüm malzemeleri sadece RNA çalışmalarına ayırmak önemlidir.
- İzolasyon sırasında kullanılacak olan materyaller çok dikkatli bir şekilde hazırlanmalıdır.



51

RNA İZOLASYONU

- DNA ile aynı basamaklardan oluşur
 - ✓ Hücrelerin parçalanması (Lizis)
 - ✓ Proteinlerin uzaklaştırılması (Pürifikasyon)
 - ✓ RNA'nın çöktürülmesi (Presipitasyon)



52

RNA İZOLASYONU

- 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 solüsyonlarla muamele edilerek sağlanır



53

RNA İZOLASYONU

- Hücre çeperi ve membranın parçalanması (lizis)
- Hücre lizatının santrifüjlenmesi (RNA diğer hücrel makromoleküllerden ayrılır)
- RNA izolasyonunda hücre tipi ve RNA'nın ne amaçla kullanılacağı ÇOK önemli !



54

RNA İZOLASYONU

- Trizol Yöntemi en çok kullanılan yöntemdir.
- ✓ Guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform basamaklarından oluşur..

Lizis

- Lizis için ; Güçlü denatüranlar: guanidinium HCl veya guanidinium tiosiyanat kullanılır

Pürifikasyon

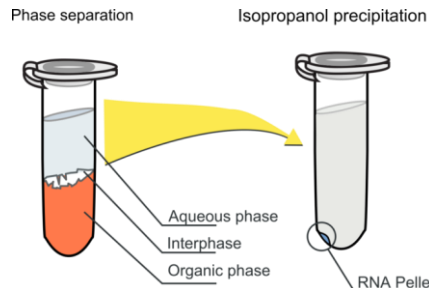
- Guanidinium tiosiyanat homojenatı düşük pH da fenol:kloroform ile ekstrakte edilir (Pürifikasyon)
- Santrifüj sonrasında RNA sıvı fazda kalır.
- Bu metottaki **Asidik Fenol RNA'yı** sıvı fazda bırakır.
- Bu asidik fenol DNA'yı kolay nötralize olan fosfat grupları varlığından dolayı fenol fazda tutar.

Presipitasyon

- Etanol eklenerek RNA presipite edilir.

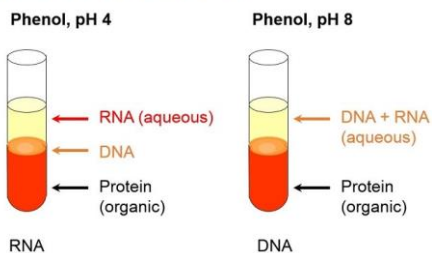


55

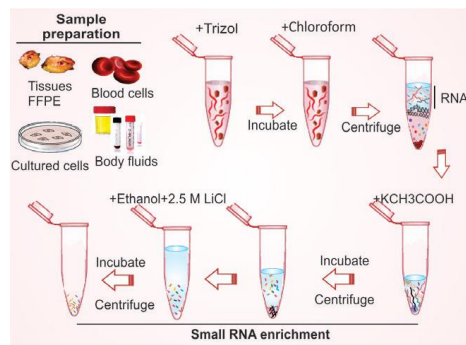


56

Traditional Phenol Extraction



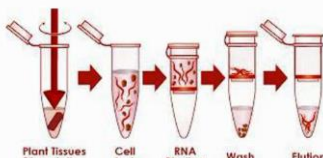
57



58

Ticari Kitlerdeki RNA izolasyonu

- RNA izolasyonu da tıpkı DNA izolasyonunda size anlatılan mantık ile presipite edilir.
- Hücreler lizis edilir.
- Hücre lizati kolon içeren tüplere alınır.
- Kolonlar RNA'yı kendine bağlarken, diğer molekülleri bağlamaz.
- Son olarak kolona bağlanan RNA kolondan ayrılarak presipite edilir.



59

Protein İzolasyonu

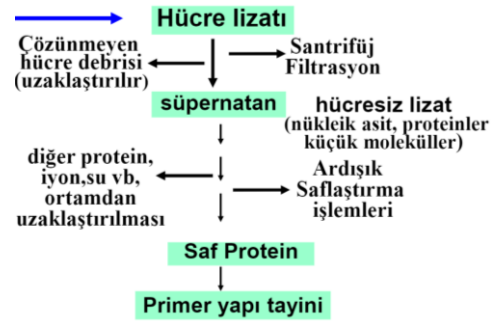
- DNA ve RNA izolasyonuna benzerdir.
- Tek fark burada hedef Proteinleri elde etmektir.



60



61



62

Saflaştırmada Kullanılan Prensipler



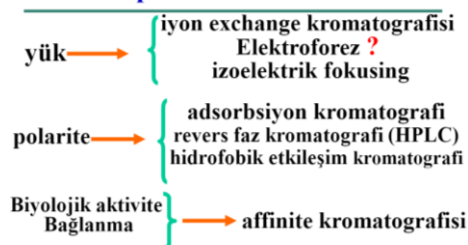
63

Saflaştırmada Kullanılan Prensiplere Yöntem

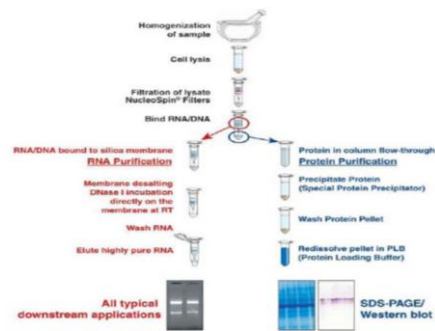


64

Saflaştırmada Kullanılan Prensiplere Yöntem



65



66

