

## Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek Plasentomu İçin Oldukça Etkili Metod Değerlendirmesi\*

Gözde R.ÖZALP<sup>1</sup> Gözde ŞİMŞEK<sup>2</sup> Sevim AKÇAĞLAR<sup>3</sup> Sima SHENAVAI<sup>4</sup>

Geliş Tarihi: 17.05.2010

Kabul Tarihi: 24.06.2010

**Özet:** Trizol gibi asit guanidium fenol kimyasalları, birçok numuneden yüksek-kalite total RNA izolasyonu için olanak sağlar. İnek plasentomundan (total, maternal ve fetal) ekonomik ve tekrar edilebilir bir metotla, yüksek-kalite RNA izolasyonu yapabilmek için, total RNA 1 ml guanidin tiyosiyanat içeren asit solüsyonu, sodyum asetat, fenol ve kloroform ile santrifüj edilmiştir. Total RNA isopropanol ile çöktürülmüş ve hiçbir saflaştırma kiti kullanılmamıştır. İzolasyonlar iki farklı protokole göre yapılmıştır. İsoopropanol fazına kadar çalışma (a) oda ısısında (20-22°C) ve (b) buz üzerinde (0-4°C) yapılmıştır. RNA kalitesi spektrofotometrik olarak, optik dansite (OD) ölçümü ile yapılmıştır (OD260 nm/OD280 nm > 1.7). RNA bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elektroforezis sonuçlarına göre (a) protokolüne göre 28s, 18s ve 5s rRNA bantlar gözlenirken, (b) protokolüne göre çoğu zaman degrade RNA bantları gözlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu (b) protokolüne göre belirgin ölçüde yüksek bulunurken, (a) protokolüne göre saflığı ve bütünlüğü çok iyi kaliteli RNA elde edilmiştir. Elde edilen total RNA'dan cDNA dönüşümü yapılarak PCR yapılmıştır. RT-PCR ürünleri (a) protokolüne göre izole edilen RNA'dan başarıyla elde edilmiştir. (a) protokolü, inek plasentomunun total, maternal ve fetal dokularından, hiçbir saflaştırma kiti kullanmadan, yüksek-kalite RNA izolasyonu için ekonomik ve tekrar edilebilir bir metod olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Plasentom, inek, Trizol, RNA.

## Trizol RNA Extraction Method: Evaluation of a Highly Efficient Method For Bovine Placental\*

**Abstract:** Acid guanidium phenol preparations such as Trizol allow the reproducible isolation of high-quality total RNA from various sources. In order to establish an economical and reproducible method for the high-quality RNA extraction from bovine total, maternal and fetal placenta, total RNA was isolated with 1 ml acidic solution containing guanidinium thiocyanate, sodium acetate, phenol and chloroform, followed by centrifugation. Total RNA was precipitated with isopropanol and no purification kit was used. The isolation was tested with two different protocols. Until isopropanol phase the isolation was carried out either a) at room temperature (20-22°C) or b) on ice (0-4°C). The RNA quality was determined by spectrophotometry, optical density (OD) absorption ratio (OD260 nm/OD280 nm > 1.7). Integrity of the RNA was verified by agarose-gel electrophoresis. The results of electrophoresis showed three clear bands of 28s, 18s and 5s rRNA, respectively with protocol

\* TOVAG-1070259 no'lu proje ile TUBITAK-DFG İkili İşbirliği tarafından desteklenmektedir.

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr., Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA, gozde.r.ozalp@gmail.com

<sup>2</sup> Araş.Gör., Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

<sup>3</sup> Uzm.Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

<sup>4</sup> Araş.Gör., Justus-Liebig-Üniversitesi-Giessen Veteriner Fakültesi Doğum, Jinekoloji ve Androloji Kliniği GIESSEN.

(a), whereas degraded RNA bands were mostly observed with protocol (b). Although the RNA concentration was significantly higher with protocol (b), the integrity and purity were better with protocol (a). First strand cDNAs were amplified with extracted RNA using a kit, followed by basic PCR. The RT-PCR products were successfully derived from the extracted RNA. RNA extraction method with protocol (a) suggested an economical and reproducible method in obtaining high-quality RNA from fetal, maternal parts of bovine placenta with Trizol, without any purification method.

**Key Words:** Placentom, cattle, Trizol, RNA.

## Giriş

Doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp, fenol yardımıyla total RNA'nın ekstrakte edilmesi prensibine dayanan protokol, ilk kez Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanmıştır<sup>3</sup>. Sonraki yıllarda bu protokol, süspansiyon yada tek tabakada çoğaltılmış kültür hücrelerinden, dokulardan ve bitkilerden yapılacak izolasyonlarda kullanılmak üzere kısaltılmış yada modifiye edilmiştir<sup>4,6,7,9,10</sup>.

Yüksek kaliteli ve bütünlüğü korunmuş RNA izolasyonu, transkriptomal, fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin doğru değerlendirilmesi için önemlidir. Bu amaçla farklı bitki örneklerinden ve dokulardan izolasyon yapabilmek için, farklı metotlar denenmiştir. Bitkilerden yapılan izolasyonlarda karşılaşılan en önemli problem; ortamda polisakkaritler, nişasta, fenolik bileşikler ve flavonoidlerin bulunması ya da erken presipite olmasıdır<sup>12</sup>. Moleküler çalışmalar sırasındaki, mikroarray kullanımında, eksprese edilen genlerin tanımlanması için, bütünlüğü korunan RNA'nın kullanılması oldukça önemlidir. RNA degradasyonunun olduğu durumlarda, elde edilen sonuç gerçek biyolojik yanıtta oldukça farklıdır<sup>10</sup>. Başarılı RNA izolasyonu sadece mikroarray tekniği için değil, RT-PCR ve Real Time PCR gibi moleküler tekniklerde doğru sonuçların alınması için de önemlidir. RNA degradasyonu kültüre edilen hücrelerde nadiren gözlenir, ancak RNaz-zengin dokulardan yapılan izolasyonlarda, RNA'nın çabuk degrade olmasına çok sık rastlanmaktadır<sup>1,8</sup>.

DNA, RNA, ve protein ekstraksiyonları, moleküler biyoloji laboratuvarlarındaki ortak uygulamadır. TRizol®, bu izolasyonlar için, fenol ve guanidin isothiosiyanat'ın monofazik bir solüsyonu olarak hazırlanmıştır<sup>2,5</sup>.

Bu izolasyonlar için çalışılması önerilen sıcaklık ortalama 18-22 °C'lik oda sıcaklığıdır. Ancak bu durum plasenta gibi, özellikle RNaz enziminin zengin dokuların enzim aktivitesini artırır. Soğuk zincirde yapılan izolasyonlarda,

Trizol, dokunun sadece dış yüzeyi ile temas ederek, dokulardaki RNaz aktivitesini artırıp, RNA bütünlüğünü önemli oranda etkiler<sup>10</sup>.

Bu amaçla RNaz'dan zengin inek plasentomundan total, fetal ve maternal doku örnekleri hazırlanmıştır ve iki farklı protokole göre total RNA elde edilmeye çalışılmıştır. (a) Oda ısısında Trizol ile yapılan homojenizasyondan elde edilen total RNA ve (b) 0-4°C'de Trizol ile yapılan homojenizasyondan elde edilen total RNA'lar kalite ve bütünlük açısından karşılaştırılmıştır.

## Materyal ve Metod

**Plasentomların alınması ve saklanması:** Çalışma materyali, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan ve TUBITAK-DFG/TOVAG1070259 nolu projeye ait 9 adet düveden toplandı. Çalışma için etik kurul onayı alındı (26.03.2007- 401/1510). Gebeliklerinin 270. gününde sürüden ayrılarak doğum bokslarına alınan inekler, 8 saat aralıklarla gözlemlendi. Doğum süresince hiçbir problemle karşılaşılma- dı ve buzağuların doğumunun ardından, vaginal kanaldan bir aplikatör aracılığıyla plasentomlar kesilerek uzaklaştırıldı. Uterus içi 2000 mg klortetrasiklin (Devamisin/Vetaş, Türkiye) kullanıldı.

Plasentomlar ikiye kesilerek yarısı (total plasentom) direkt sıvı azot içinde şok donduruldu. Kalan yarısı ise manuel olarak ayrıldı. Kotilodon (maternal) ve karunkel (fetal) kısımları sıvı azotta şok dondurularak, tüm doku örnekleri analiz yapılincaya kadar -80°C'de saklandı. **RNA izolasyonu: (a)** Doku örnekleri sıvı azot içinde seramik havan ve havaneli ile öğütüldü. Bir mililitre (ml) guanidin tiyosiyanat (Trizol® Reagent, Invitrogen/Life Technologies, Cat. No. 155961) içine 50-100 µg'lık doku tozu konarak 10 dakika oda ısısında bekletildi. Ultra-Turrax® (S8N-5g, IKA-Werke GmbH) ile 10 saniye homojenize edilerek, üzerine -20°C'de soğutulmuş 0.2 ml kloroform ilave edildi. Beş dakikalık oda ısısı inkübasyonu sonrasında, +4°C'de 15 dakika 14,000 x g'de santrifüj edil-

di. RNA içeren üst sıvı fazı dikkatlice uzaklaştırıldı ve yeni bir ependorf tüp içine alınarak kloroform fazı tekrar edildi. Santrifüj sonrasında üst faz alınarak eşit hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 30 dakika -20°C'de bekletildi. +4°C sıcaklıkta 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj sonrasında RNA topak haline getirildi. Oluşan RNA çökeltisi 0.5 ml 70%'lik soğuk etanol ile 10 dakika +4°C'de bekletilerek 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. RNA'yı etanol ile yıkama aşaması 2 kez yapıldı. Santrifüj sonunda oluşan pelletlerden etanol dikkatle çekildikten sonra, 37°C'lik etüvde 20 dakika kurutuldu. Üzerine 50 µl otoklavda sterilize edilmiş distile su eklendi ve 70°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek suda çözdürüldü. Tüpler kısa süreli vortexle karıştırıldıktan sonra 1.25 µl RNaz İnhibitörü (RiboLock™ RNase Inhibitor 40u/µl, Fermentas) eklenerek -20°C'de saklandı.

(b) Doku örnekleri sıvı azot içinde seramik havan ve havaneli ile öğütüldü. Bir ml guanidin tiyosiyanat içine 50-100 µg'lık doku tozu konarak 10 dakika 0-4°C'de bekletildi. UltraTurrax ile 10 saniye buz üzerinde homojenize edilerek üzerine -20°C'de soğutulmuş 0.2 ml kloroform ilave edildi. Buz üzerinde beş dakikalık inkübasyonu sonrasında +4°C'de 15 dakika 14,000 x g'de santrifüj edildi. RNA içeren üst sıvı fazı dikkatlice uzaklaştırıldı ve yeni bir tüp içine alınarak kloroform fazı tekrar edildi. Santrifüj sonrasında üst faz alınarak eşit hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 30 dakika -20°C'de bekletildi. +4°C sıcaklıkta 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj uygulanarak RNA topak haline getirildi. Oluşan RNA çökeltisi 0.5 ml 70%'lik soğuk etanol ile 10 dakika +4°C'de bekletilerek 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. RNA'nın etanol ile yıkama aşaması 2 kez yapıldı. Santrifüj sonunda oluşan pelletlerden etanol dikkatle çekildikten sonra 37°C'lik etüvde 20 dakika kurutuldu. Üzerine 50 µl otoklavda sterilize edilmiş distile su konarak 10 dakika 70°C'lik su banyosunda bekletilerek RNA suda çözdürüldü. Tüpler kısa vortexlendikten sonra 1.25 µl RNase İnhibitörü eklenerek -20°C'de saklandı.

**RNA Kalite Kontrolü (Purity Control) & Spektrofotometrik Ölçümler:** 5 µl RNA, 995 µl otoklavda sterilize edilmiş distile su ile karıştırıldı (1/200 dilüsyon) ve 260nm, 280nm'de optik dansite ölçümü yapıldı. (A260 / A280). Tüm RNA'ların 260 nm'deki absorbans değeri

$[\mu\text{g/mL}] = \text{OD değeri} \times 200 \times 40 \mu\text{g/mL}$   
formülü kullanılarak RNA konsantrasyonları hesaplandı.

**RNA Bütünlüğünün Kontrolü (Integrity Control) & Agaroz Jel Elektroforezi:** 1.5 µl RNA, 4.5 µl elektforez boyası (Loading Dye) ile karıştırılarak 5 dakika 65°C'de su banyosundan sonra buz üzerinde bekletildi. 1.2 gm agaroz, 84.7 ml DEPC (Diethylpyrocarbonate) ile muamele edilmiş distile su ve 10 ml MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) solüsyonuna katılarak, 2 dakika mikrodalga içinde eritildi. Jel birkaç dakika soğumaya bırakıldıktan sonra, 5.2 ml 37%'lik formaldehit ve 4 µl ethidium bromide katılarak jel tankına döküldü. Yarım saatlik polimerizasyondan sonra, RNA'lar jele yüklendi. 1kb büyüklüğünde marker kullanıldı. Örnekler 100 V ve 300 mA'lık güç kaynağı ile 1.2%'lik agaroz jelde 60 dakika yürütüldü.

#### RT-PCR

RNA örnekleri

$200 \text{ ng} \times 30 \mu\text{l} = \text{Ölçülen RNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} \times X$

formülü kullanılarak, 200ng/µl konsantrasyonunda hazırlandı. RT-PCR için, GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA) kullanıldı. 0.3 µg RNA 42°C'de 15 dakika ve 99°C'de 5 dakikalık programla cDNA'ya dönüştürüldü. 10 µl'lik transkripsiyon solüsyonu, toplam hacimde 2.5 µmol l<sup>-1</sup> random hekzamer, 1 mmol l<sup>-1</sup> dNTPs, RNaz inhibitör ve murine leukemia virus reverse transkriptaz içerecek şekilde hazırlandı. Her 10µl cDNA, 15pmol primer, 0.25 U/µl AmpliTaq DNA Polimeraz içeren reaksiyon solüsyonuyla karıştırılarak amplifikasyonu tamamlandı.

Amplifikasyon programı 34 döngü olacak şekilde programlandı. Her döngü, denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, primer bağlanması için 55°C'de 1 dakika ve DNA sentezi için 72°C'de 1 dakika şeklinde gerçekleşti. Tüm ürünler 2%'lik ethidium bromide ile hazırlanmış agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığında bantlar gözlemlendi.

#### İstatistiksel Değerlendirme

Çalışılan örneklerin Trizol izolasyonu ile elde edilen sonuçlar, çift yönlü varyans analizi (MANOVA) ile test edildi ve fark grupları Tukey HSD testi ile belirlendi. Tüm testler p<0.05 anlamlılık düzeyinde sınılandı. İstatistiksel analizler SPSS 13.0 bilgisayar paket programı ile değerlendirildi.

## Bulgular

### A) RNA kalitesi kontrolü

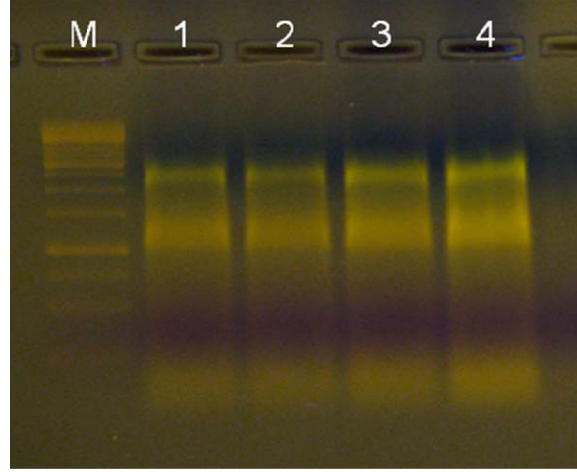
Plasentomdan elde edilen total RNA'lar, 260 ve 280nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü (UV-1601 UV-Visible Spectrophotometer SHIMADZU, Japan). Optik dansite oranları 1.7'nin üzerinde olanlar değerlendirmeye alındı. Yapılan istatistiksel analiz sonunda; (b) protokolüne göre, 260/280 ortalama değeri, total plasentomdan yapılan izolasyonlarda  $1,82 \pm 0.15$ , maternal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1,83 \pm 0.13$ , fetal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1,92 \pm 0.33$  bulundu. (a) protokolüne göre ise total plasenta dokusundan yapılan izolasyonlarda  $1,79 \pm 0.06$ , maternal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1,80 \pm 0.74$ , fetal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1,80 \pm 0.75$  bulundu. Yapılan varyans analiz sonucu, sıcaklık uygulamasının 260/280 değerleri üzerinde anlamlı bir farklılık ( $p < 0.05$ ) ortaya koyarken, total, maternal ve fetal izolasyonların 260/280 değerleri üzerinde anlamlı bir farklılık belirlenemedi. 260/280 değerleri üzerine sıcaklık ve farklı plasentom bölgelerinin interaksyonu çift yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde anlamlı bir sonuç belirlenemedi.

(b) protokolüne göre elde edilen RNA konsantrasyonlarının ortalama değeri, total plasentom dokusundan yapılan izolasyonlarda  $5241.6 \pm 2357.44$  maternal dokudan yapılan izolasyonlarda  $3922.40 \pm 1656.06$ , fetal dokudan yapılan izolasyonlarda  $2897.53 \pm 1609.50$  bulundu. (a) protokolüne elde edilen RNA konsantrasyonları, total plasentomdan yapılan izolasyonlarda  $1244.0 \pm 575.17$ , maternal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1483.80 \pm 765.15$ , fetal dokudan yapılan izolasyonlarda  $1198.85 \pm 836.72$  bulundu. Yapılan varyans analizi sonucunda hem sıcaklık uygulamasının hem de farklı plasentom izolasyonlarının, RNA konsantrasyon verileri üzerinde anlamlı bir farklılık bulundu ( $p < 0.001$ ). RNA konsantrasyon verileri üzerine sıcaklık ve plasentom bölgelerinin interaksyonu çift yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde anlamlı bir fark belirlendi ( $p < 0.001$ ).

### B) RNA Bütünlüğünün Kontrolü

RNA'ların bütünlüğü (integrity) denature agorose jel elektroforezi ile kontrol edildi. 28s, 18s ve 5s rRNA'lık 3 adet ribozomal bantların varlığı ve yoğunluğu, çalışmada izole edilen RNA'ların bütünlüğünü koruduğunu gösterdi (28S rRNA > 18S rRNA > 5SrRNA). (b) protokolüne göre elde edilen RNA'lardan hazırlanan

jel görüntülerinde yoğunluğun 18S rRNA>5SrRNA>28S rRNA oranında olduğu (Şekil 1), çoğu zaman tüm bantlar, RNA'nın degrade olduğunu gösterdi (Şekil 2). (a) protokolüne göre elde edilen RNA'nın daha stabil izole edildiği gözlemlendi Total, maternal, fetal plasentomlara ait RNA bütünlüğü arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmedi.

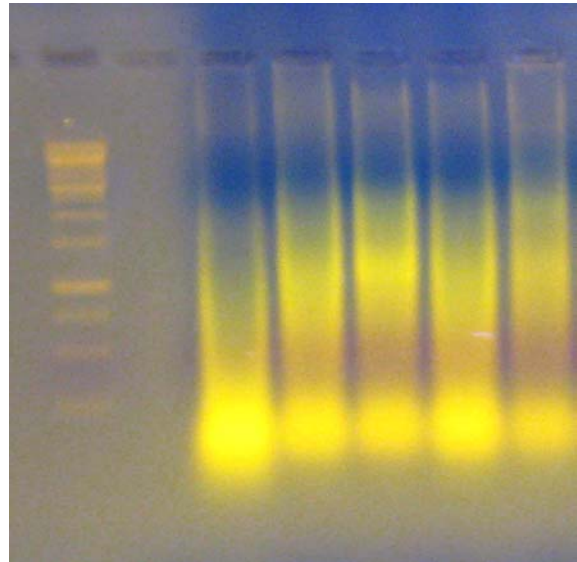


Şekil 1:

(b) protokolüne göre izole edilen total RNA'nın agaroz jelde görüntüsü

Figure 1:

Visualization of total RNA preparations on agarose gel according to protocol (b)



Şekil 2:

(a) protokolüne göre izole edilen total RNA'nın agaroz jelde görüntüsü

Figure 2:

Visualization of total RNA preparations on agarose gel according to protocol (a)

## Tartışma

Kalite ve bütünlüğü yüksek total RNA eldesi için iki farklı protokol, plasentomun farklı bölgelerinden alınan dokular (total, maternal ve fetal) arasında karşılaştırıldı. İlk protokolde RNA peletleri oluşuncaya kadarki tüm aşamalar oda ısısında (20-22 °C) çalışılırken, ikinci protokolda tüm aşamalar soğuk zincir üzerinde uygulandı. Her iki protokol sonunda elde edilen total RNA örnekleri RNA saflaştırma protokolü uygulanmadan test edildi.

(a) protokolüne göre izole edilen total RNA'ların bütünlüğü, 3 farklı rRNA bantların gözlenmesiyle kontrol edildi. Bantların görünürlüğü ve yoğunluğu istenilen düzeydeydi<sup>12</sup>. (b) protokolüne göre elde edilen 5S rRNA'nın oldukça yoğun olarak gözlenmesi, izole edilen total RNA'nın DNA, fenol ve proteinden yeterince ayrılmadığı ve saf olarak izole edilmediğini göstermektedir. Buna karşılık RNA kalite kontrollerine bakıldığında (b) protokolüne göre izole edilen RNA konsantrasyonlarının (a) protokolüne göre daha yüksek olduğu bulundu. RNA izolasyonu ile ilgili genel noktalardan biri RNazın geri dönüşsüz bir biçimde guanidin tiosiyanat tuzları ile denatürasyonudur. Optimal miktarın kullanılması inaktif endojen RNaz'ın, RNA denatürasyonunu da engeller<sup>6</sup>. Prosedür sonunda az miktarda denatüre olmuş RNaz bulursa bile, örneği bozabilir. Soğuk ortamda guanidin tiosiyanat ile homojenize edilen dokular, kimyasalın sadece dokunun dış yüzeyiyle etkileştiği tüm dokuya nüfuz edemediğini göstermektedir. (b) protokolüne göre total RNA konsantrasyonunun belirgin bir şekilde artışı, soğuk etkisiyle guanidin tiosiyanat'ın etkisini tam gösterememesinden kaynaklı, protein-fenol kompleksinin oluşumuna bağlanmaktadır. Bu kompleksin RNA bütünlüğünü bozarak yüksek konsantrasyona rağmen degradasyona yol açtığı düşünülmektedir<sup>11</sup>.

Total RNA izolasyon metodu dokuların sıvı azot içinde homojenize edilmesinden sonra ekstraksiyon solüsyonu içinde parçalanarak hücresel protein ve DNA'dan kloroform-alkol muamelesi ve yüksek devirli santrifüj işlemleriyle ayırma prensibine dayanmaktadır. Protokolün kilit noktaları; (a) kullanılan doku miktarı ve homojenizasyon solüsyonunun oranı (b) doku miktarına bağlı homojenizasyon süresi (c) homojenizasyon ve faz ayırma işlemlerinin uygulandığı sıcaklık değerleridir. Bir mililitre guanidin tiosiyanat içine 50-100 µg'lık sıvı

azot içinde parçalanmış doku tozu homojenize edilmiştir. Belirtilen miktarlardan fazla kullanılan dokuların homojenizasyonu tam olarak yapılamamıştır ve santrifüj sonrasında elde edilen aköz supernatant miktarı (350-420 µl), optimal miktardan (600 µl) oldukça azdır. Protokol içinde ikinci önemli nokta doku miktarına bağlı homojenizasyon süresidir. Bu da fazla miktarda dokunun iyi homojenize edilmesi için uzun süreli Ultraturrax muamelesidir ki bu durum RNA'nın hızlı degradasyonuna yol açmaktadır.

Sıvı azot içinde toz haline getirilen dokunun guanidin tiosiyanat içinde iyi homojenize olması için oda sıcaklığında (20-22 °C) inkübasyonunun iyi kalite RNA eldesi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Doku ve guanidin tiosiyanat karışımının buz üzerinde inkübe edilmesi durumunda homojenizasyon sıvısının dokuya yüzeysel etkisi olduğu, oda ısısında yapılan inkübasyonda ise parçalanmış dokulara derin etkisiyle kalite ve stabilitesi yüksek RNA elde edilebildiği sonucuna varılmıştır. Aynı ısı uygulamasının kloroform faz ayırımında da dikkate alınması ve izopropil alkol ile çöktürülen peletin eldesine kadar soğuk uygulamalardan kaçınılması, iyi kalite RNA peletin oluşması için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Soğuk zincir ya da buz uygulamaları üzerinde tüm aşamaların yapıldığı protokol denemelerinde, DNA ve proteinle kontamine pelet elde edilmiş, spektrofotometrik olarak yüksek değerlerin elde edildiği izolasyonlara rağmen saflık ve bütünlük açısından istenen RNA kalitesine ulaşamamıştır.

İzole edilen RNA'lardan cDNA amplifikasyonu yapılmış ve RT-PCR ile test edilmiştir. Düşük konsantrasyonuna rağmen, bütünlüğü yüksek RNA'lar daha belirgin bantlar oluşturmuştur. Birinci protokole göre hazırlanan RNA'lardan yapılan RT-PCR'da ise bantlara rastlanamamıştır.

Plasentanın maternal, fetal bölgeleri ve total plasentomdan alınan doku örneklerinden yapılan total RNA izolasyonları arasında istatistik olarak bir fark bulunmadı.

Bu sonuçlar RNA peletinin gözlemlendiği aşamaya kadar, ortalama 20-22°C'lik sıcaklık uygulamasıyla yapılan mRNA izolasyonunun standart bir protokol olabileceği ve bu protokole göre elde edilen RNA'nın biyolojik olarak aktif ve in vitro translasyon ve revers transkripsiyon için başarıyla kullanılacak güvenilirlikte olabileceği sonucuna varılmıştır.

## Teşekkür

Çalışmamıza istatistik bulgularının değerlendirmesiyle büyük destek veren U.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Chirgwin, J.M., Praybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 18: 5293–5294.
2. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 15: 532-537.
3. Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-159.
4. Chomczynski, P., Sacchi, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*. 1(2): 581-585.
5. Hummon, B.A., Lim, R.S., Difilippantonio, M.J., Ried, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*. 42: 467-472.
6. Ince, A.G., Karaca, M. 2009: TheMAGi RNA extractionmethod: a highly efficient and simple procedure for fresh and dry plant tissues. *J Sci Food Agric*. 89: 168–176.
7. Jahn, C.E., Charkowski, A.O., Willis, D.K. 2008. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 318-324.
8. Krosting, J., Latham, G. 2005. RNase activity in mouse tissue: classification, hierarchy, and methods for control. *Ambion TechNotes*, 12, Austin, TX: Ambion,
9. Li, D., Ren, W., Wang, X., Wang, F., Gao, Y., Ning, Q., Han, Y., Song, T., Lu, S. 2009. A modified method using TRIzol reagent and liquid nitrogen produces high-quality RNA from rat pancreas. *Appl Biochem Biotechnol*, 158: 253-261.
10. Maugh, K. 2006. Modification of the Standard Trizol-Based Technique Improves the Integrity of RNA Isolated from RNase-Rich Placental Tissue. *Clinical Chemistry*, 52: 159-160
11. Wan, C.H., Wilkins, T.A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem*, 223: 7-12.
12. Wu, Y., Llewellynn, D.J., Dennis, E.S. 2002. A Quick and Easy Method for Isolating Good-Quality RNA From Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)Tissues. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 213–218.