

## EDTA'lı Tam Kan Örneklerinden Otomatik DNA İzolasyonu: Manuel DNA İzolasyonu ile Karşılaştırma

Abdulkadir YILDIRIM\*, Hamdullah TURHAN, Vefa YANMAZ, Ebubekir BAKAN

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ERZURUM

### ÖZET

Son zamanlarda klinik laboratuvarlarda PCR-tabanlı moleküler tekniklerin kullanımı artmıştır. Bununla birlikte, bu tekniklerden yararlanabilmenin ön şartı, hızlı ve verimli DNA izolasyon yöntemlerine gereksinim duyulmasıdır. Bu amaçla manyetik bilye teknolojisini kullanan otomatik DNA izolasyon sistemleri geliştirilmiştir. Ancak manyetik partiküller elüsyon aşamasında DNA çözeltisinden yeterince uzaklaştırılmazsa, bu manyetik bilyeler amplifikasyon reaksiyonunu bozabilmektedir. Bu durum da PCR sensitivitesini azaltmakta veya yalancı negatif PCR sonuçlarına yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı manyetik bilye teknolojisini kullanan bir otomatik DNA izolasyon cihazıyla elde edilen DNA'ların saflık, verimlilik ve PCR-hibridizasyon performanslarını değerlendirmek ve manuel izolasyon yöntemiyle karşılaştırmaktır. EDTA'lı tam kan örneklerinden otomatik DNA izolasyon sistemiyle (QuadroProbe QP10) elde edilen DNA konsantrasyonları 28 – 74 ng/□l aralığında ve A260/A280 oranı ortalama  $2.5 \pm 0.73$  idi. PCR-hibridizasyon işlemlerinden elde edilen sonuçlar gösterdi ki QuadroProbe QP10 ile izole edilen DNA çözeltisi, PCR-hibridizasyon reaksiyonlarını inhibe edebilecek herhangi bir materyal içermemektedir. PCR laboratuvarlarında EDTA'lı tam kan örneklerinden yüksek kalitede DNA pürifikasyonu için QuadroProbe QP10 izolasyon cihazı kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Otomatik DNA izolasyonu, manyetik bilye, multipleks PCR, hibridizasyon

## Automated Purification of DNA from EDTA-Preserved Whole-Blood Samples: Comparison with Manual DNA Extraction

### SUMMARY

In recent years, the use of PCR-based molecular techniques in the clinical laboratories has increased. For this purpose, automated DNA isolation instruments using magnetic bead technology have been developed. However, if magnetic particles are not removed sufficiently from DNA solution, amplification reactions will be inhibited by the magnetic beads, which decrease PCR sensitivity or lead to false negative PCR results. The aim of this study was to evaluate PCR-hybridization performance, productivity and purity of genomic DNA extracted by the automated system based on magnetic separation technology, and to compare these results with those obtained with manual DNA isolation method. The yield of genomic DNA extracted by the automated system (QuadroProbe QP10) from human EDTA-preserved whole blood samples was 28 to 74 ng/□l and the A260/A280 ratio was  $2.5 \pm 0.73$ . The results obtained from PCR-hybridization showed that the final solutions of DNA isolated by magnetic bead technology did not contain any inhibitory material for the PCR-hybridization reactions. These results show that QuadroProbe QP10 can be used for purification of good quality DNA from whole blood samples in PCR laboratories.

**Key Words:** Automated DNA isolation, magnetic bead, multiplex PCR, hybridization

### GİRİŞ

Biyolojik örneklerden genomik DNA'nın izolasyonu moleküler tanı yöntemlerinin uygulamasında gerekli ilk adımdır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler tekniklerin kullanılmaya

başlamasından günümüze kadar pek çok farklı DNA izolasyon metodu yayınlanmıştır (1-5). Fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonuna dayanan yöntemler geleneksel izolasyon metotlarının en çok bilinenleridir (6).

Bununla birlikte, sağlık açısından son derece zararlı olan fenol gibi toksik maddelerin kullanılmasının yanı sıra uzun inkübasyon basamaklarının olması bu metotların dezavantajlarından bazılarıdır (4,7).

Günümüzde klinik laboratuvarlarda PCR tabanlı moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı hızla artmaktadır. Kan, idrar, BOS, gaita gibi çok sayıda farklı biyolojik örneğin analizinin yapıldığı rutin klinik laboratuvarlarda moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı hızlı ve verimliliği yüksek DNA izolasyon metotlarını gerektirmektedir. Verimliliği yüksek bir DNA izolasyon metodu basit, hızlı, yüksek kalitede DNA eldesine ve multipleks PCR, real-time PCR, DNA dizi analizi gibi gelişmiş moleküler tekniklerin uygulamalarına imkan verecek özellikte olmalıdır. Bu amaçla standart DNA izolasyon metotlarının çeşitli modifikasyonları ve yeni hızlı izolasyon protokolleri literatürde yayınlanmıştır (7,8). Hatta reaktif hazırlamayı gerektirmeyen kullanıma hazır ve izolasyon işlemini oldukça kolaylaştıran ticari manuel DNA izolasyon kitleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte artan test sayısı ve çeşitliliği moleküler tanı laboratuvarlarında otomatik DNA izolasyonu ihtiyacını gündeme getirmiş ve bu amaçla otomatize cihazlar geliştirilmiştir. Otomatik DNA izolasyonu sistemlerinde genellikle manyetik bilye teknolojisi kullanılmaktadır (9). Ancak bu manyetik partiküller elüsyon basamağında yeterince uzaklaştırılmazsa PCR amplifikasyon reaksiyonunu etkileyebilmekte ve yalancı negatif PCR sonuçlarına yol açabilmektedir (9, 10).

QuadroProbe QP10 (Bee Robotics, UK) cihazı, manyetik bilye yöntemiyle DNA izolasyonu yapan otomatize bir sistemdir. Ancak, bu cihazın analitik özelliklerini gösteren dokümanlarında, multipleks PCR, mikroarray hibridizasyon gibi ileri moleküler tekniklerde kullanılan DNA performanslarını gösteren verilere rastlayamadık

Bu çalışmanın amacı, sonuçlarını bildiğimiz bir manuel DNA izolasyon yöntemini referans metod kabul ederek, manyetik bilye tekniğiyle otomatik DNA

izolasyonu yapan QuadroProbe QP10 cihazı ile elde edilen DNA'ların saflığını, verimliliğini, multipleks PCR-hibridizasyon performanslarını karşılaştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Sekiz sağlıklı gönüllü kişiden K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere 2 ml venöz kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri + 4 °C de bekletildi ve 1 saat içerisinde DNA'ları izole edildi. Her kan örneğinden, aşağıda detayı verilen iki farklı yöntemlerle DNA izolasyonu yapıldı.

### Otomatize DNA izolasyonu

Tam kan örneklerinden DNA izolasyonu otomatize sistem (QuadroProbe QP10, Bee Robotics, UK) kullanılarak yapıldı. Bu sistemin izolasyon prensibi, özel polimerle kaplı manyetik bilye teknolojisine dayanmaktadır. Lökositlerden açığa çıkan DNA'nın bağlama tamponuyla manyetik bilyelere bağlanması sağlanır ve daha sonra proteinler, tuzlar ve alkolün uzaklaştırılmasından sonra DNA, manyetik rak üzerinde elüsyon tamponuyla bilyelerden sıvı faza alınır. Kısaca bu amaçla, cihazın kendi özel kartuşu (QuadroPak) içine 250 µl EDTA'lı tam kan örneği ve 350 µl lizis tamponu pipetlendikten sonra kartuş, cihaza yüklendi ve otomatik izolasyon prosedürü başlatıldı. Bu süreçte cihaz kendi ticari kit reaktiflerini kullanarak izolasyon işlemini gerçekleştirmektedir. İşlem sonunda QuadroPak kartuşlar cihaz üzerinden alınarak manyetik raka aktarıldı ve sıvı fazdan 300 µl DNA örneği alındı.

### Manuel DNA izolasyonu

Manuel DNA izolasyonu ticari bir kit kullanılarak, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapıldı (Invisorb Spin Blood Kit, Inviek GmbH, Germany). Bu izolasyon metodu spin-kolon yöntemine dayanmaktadır. Kısaca, 200 µl EDTA'lı tam kan örneği üzerine 200 µl lizis tamponu ve 20 µl proteinaz K pipetlenerek 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu karışım spin filter kolona aktarılarak DNA'nın kolon membranına bağlanması sağlandı. Yıkama basamaklarından sonra 200 µl elüsyon tamponuyla 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA izole edildi

### İzole edilen DNA'ların Kontrolü

İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları 260 / 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Ayrıca DNA çözeltilisi içerisinde partikül bulunup bulunmadığını belirlemek için 325 nm'de de absorbans ölçümü yapıldı. Bu amaçla Cecil CE3041 model spektrofotometre ve quartz küvet kullanıldı. Mikro quartz küvet içine 195 µl ultra saf su ve 5 µl DNA örneği pipetlenerek 260, 280 ve 325 nm dalga boylarında köre (ultra saf su) karşı absorbans değerleri okutuldu. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (11):

$$\text{DNA (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{SeyrelmeFaktörü (40)}$$

Keza izole edilen DNA'lar, 0.125 µg/ml etidyum bromür içeren % 0.7'lik agaroz jelde yürütülerek teyit edildi (1xTBE tamponda, 80 volt, 45 dakika). Bu amaçla jelle DNA örneklerinden 5'er µl yüklendi ve elektroforez sonrası oluşan bantlar UV transillüminatörde (Whatman T12, Biometra, Germany) görüntülendi.

### PCR ve Hibridizasyon İşlemleri

Manuel ve otomatik izolasyon işlemleri ile elde edilen DNA'ların amplifikasyon ve hibridizasyon performansları şu şekilde değerlendirildi. PCR-strip hibridizasyon yöntemi ile DPYD (dehidroprimidin dehidrogenaz) IVS14+1 G>A mutasyon analizi yapıldı. Ticari kitle (PGX-5FU Strip Assay, ViennaLab GmbH, Austria) DPYD gen sekansına ait primerler kullanılarak T Gradient Termal Cycler (Biometra, Germany) cihazıyla PCR amplifikasyonu yapıldı [15 µl amplifikasyon karışımı, 1 µl Taq DNA polimeraz (1Ü), 4 µl Taq dilüsyon tamponu ve 5 µl DNA (150 ng)]. PCR şartları aşağıdaki gibiydi: 94 °C'de 2 dk pre-PCR; 94 °C'de 15 sn, 58 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn olmak üzere toplam 30 siklus; 72 °C'de 3 dk. 187 bp'lik PCR ürünü % 3'lük agaroz jelde görüntülendi. Referans olarak 50 bp'lik DNA standardı kullanıldı. PCR amplifikasyon ürünleri otomatize hibridizasyon cihazı (ProfoBlot T48, TECAN, Austria) kullanılarak oligonükleotid problemler içeren test stripleriyle hibridize edildi.

Keza her iki metotla izole edilen DNA'ların mutipleks PCR ve mikroçip hibridizasyon performanslarını değerlendirmek için, spesifik primerlerle 8 farklı gen bölgesi PCR mutipleks yöntemiyle çoğaltıldı. Bu amaçla ticari bir kit kullanıldı (Osteocheck, Ogham Diagnostics GmbH, Germany). Kit, kollajen tip I α-1 (COLIA1) östrojen reseptör β- PvuII (ESR- PvuII), östrojen reseptör α-Xbal (ESR- Xbal), vitamin D reseptör- BsmI (VDR), laktaz T-13910C (LCT), osteoprogetrin (OPG) G209A ve T245G ve interlökin-6 G-174C (IL-6 G174C) gen bölgelerindeki polimorfik yapıların mutipleks PCR'la analizine olanak sağlayacak primerleri ve diğer kimyasalları içeriyordu (PCR mastermix). Mutipleks PCR protokolü aşağıdaki gibiydi: 40 µl PCR mastermix ve 100 ng genomik DNA veya kontrol DNA örneği (toplam PCR reaksiyon karışım hacmi 50 µl); 95 °C'de 15 dk başlangıç aktivasyon basamağı, 94 °C'de 1 dk, 56 °C'de 2 dk ve 68 °C'de 2 dk olmak üzere toplam 35 siklus; 68°C'de 5 dk. PCR amplikonları oligonükleotid problemler içeren mikroçiple, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hibridize edildi ve mikroçip okuyucu cihazda (Solas 1, Ogham Diagnostics GmbH, Germany) okutularak 8 farklı gen bölgesinde polimorfizm incelemesi yapıldı.

### İstatistiksel analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS for Windows (versiyon 11.0) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

### BULGULAR

Bu çalışmada 8 gönüllü kişiden alınan EDTA'lı tam kan örneklerinden ticari kitle hem manuel olarak hem de otomatize ekstraksiyon cihazıyla DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA konsantrasyonları manuel kit yöntemi için ortalama 28 ± 11 ng/µl, QuadroProbe otomatik izolasyon cihazı için 42 ± 14 ng/µl idi (Tablo 1). Her iki yöntemle izole edilen DNA'ların saflıkları  $A_{260}/A_{280}$  oranıyla değerlendirildi ve manuel kit yöntemi için ortalama 1.86 ± 0.32, otomatik izolasyon cihazı için 2.5 ± 0.73 olarak belirlendi (Tablo 1). Manuel kit ve otomatik

izolasyon yöntemiyle elde edilen DNA'lar, spektrofotometrik ölçüme ilave olarak, % 0.7'lik agaroz jel elektroforeziyle de teyit edildi. Bu DNA'lara ait jel görüntüleri Şekil 1'de görülmektedir.

**Tablo 1.** EDTA'lı kan örneklerinden hem manuel spin-kolon kit yöntemi hem de otomatik izolasyon cihazıyla elde edilen DNA konsantrasyonları ve  $A_{260}/A_{280}$  oranları. Sonuç-lar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

DNA İzolasyonu Yöntemi	DNA Konsantrasyonu (ng/ $\square$ ) (n=8)	$A_{260}/A_{280}$ (n=8)
Kitle manuel izolasyon (Invitek <sup>®</sup> )	28 $\pm$ 11	1.86 $\pm$ 0.32
QuadroProbe <sup>®</sup> otomatize sistem	42 $\pm$ 14	2.5 $\pm$ 0.73

Her iki yöntemle izole edilen DNA'larla yapılan 5-fluorourasil ilaç direnci DPYD IVS14+1 G>A mutasyon analizi PCR'ı olumlu sonuç verdi ve hedeflenen 187 bp'lik gen bölgesi her iki DNA için de amplifiye edildi (Şekil 2A). Daha sonra bu amplifikasyon ürünleri oligonükleotid proplar içeren test stripleriyle başarılı bir şekilde hibridize edildi (Şekil 2B). Özellikle manyetik bilyelerin muhtemel olumsuz etkilerini değerlendirmek için otomatik cihazla izole edilen DNA'larla yapılan multipleks PCR olumlu sonuç verdi ve amplifiye edilen 8 gen gölgesi mikroçip yüzeyde hibridize edildi.

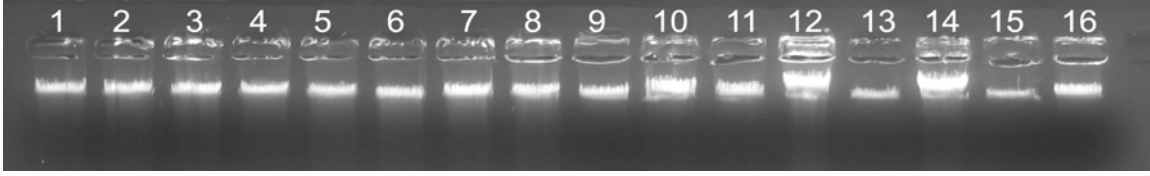
## TARTIŞMA

Son zamanlarda klinik laboratuarlarda PCR tabanlı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır ve yakın bir gelecekte bu yöntemler standart aplikasyon olacaktır. Bununla birlikte bu tekniklerden faydalanabilmenin ön şartı hızlı ve verimli DNA ekstraksiyon protokollerinin olmasıdır. Yapılacak moleküler testlerin sensitivitesini, nükleik asit ürünü, saflık derecesi ve amplifikasyon reaksiyonuna katılacak DNA miktarı belirlemektedir (12). Çok yorucu ve uzun zaman gerektirmelerinin yanı sıra

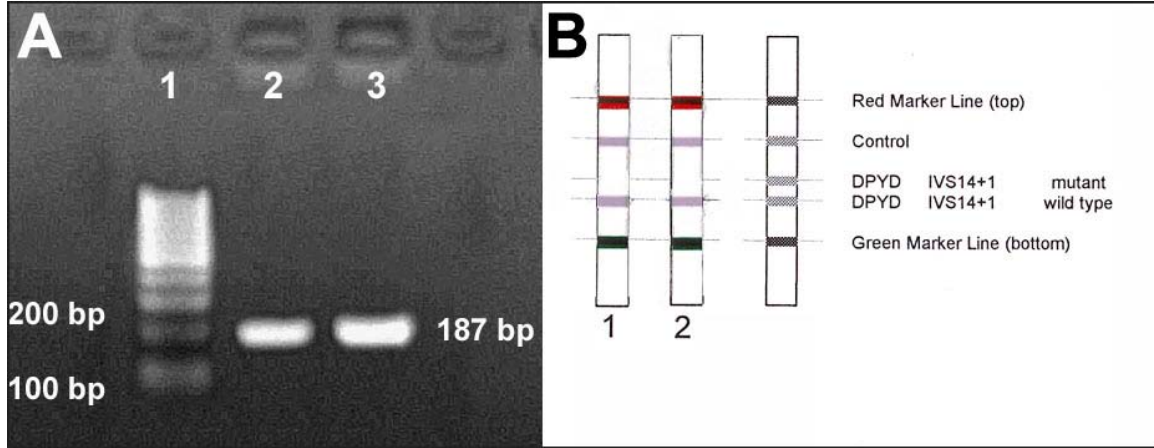
kontaminasyon ihtimalinin daha yüksek olması, manuel işlemlerdeki kişiye bağlı uygulama farklılıkları ve hatalar geleneksel manuel nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin önemli dezavantajlarından bazılarıdır (13). DNA izolasyonu için otomatik sistemlerin kullanılması, insan kaynaklı hataları azaltması, testin doğruluk derecesini artırması, tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesi ve kısa sürede çok sayıda örneğin analizine imkân vermesi gibi önemli avantajlar sağlamıştır. Bu amaçla, son zamanlarda manyetik bilye teknolojisiyle DNA izolasyonu yapan otomatize sistemler geliştirilmiştir (9, 12).

QuadroProbe QP10, özel polimerle kaplı manyetik bilye tekniğini kullanarak, taze veya dondurulmuş tam kan örneklerinden DNA izolasyonuna imkân veren otomatize bir sistemdir. Bu cihazla aynı anda 48 örnekten yaklaşık 50 dakika gibi kısa bir sürede DNA izolasyonu yapılabilmektedir. Geleneksel manuel DNA izolasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında bu önemli bir avantajdır. Bununla birlikte manyetik bilye tekniğinin kullanıldığı yöntemlerde elüsyon basamağında manyetik partiküller yeterince ortamdan uzaklaştırılmazsa bu manyetik partiküller, stabilizerleri veya onların metal oksitleri PCR reaksiyonunu interfere edebilmektedir. Bu durum PCR sensitivitesini azaltır veya yanlış negatif PCR sonuçlarına yol açar (9, 10). Bu çalışmada biz, QuadroProbe QP10 izolasyon sisteminde kullanılan manyetik partiküllerin PCR tabanlı bazı moleküler teknikler üzerinde herhangi bir olumsuz etkilerinin olup olmadığını araştırmayı hedefledik. Bu amaçla aynı kişiye ait EDTA'lı kan numunelerinden hem QuadroProbe QP10 izolasyon sistemi hem de manuel spin-kolon kit yöntemiyle izole edilen DNA örneklerini kullanarak PCR-hibridizasyon tekniğiyle mutasyon ve polimorfizm analizi yaptık.

5-fluorourasil (5FU), kanser kemoterapi protokollerinde en çok kullanılan ilaçlardan biridir. Dihidroprimidin dehidrogenaz (DPYD) 5FU'yu metabolize eden bir enzimdir ve DPYD IVS14+1 G>A mutasyonu bu en-



**Şekil 1.** Otomatik izolasyon cihazıyla ve manüel spin-kolon kit yöntemiyle elde edilen DNA'lar. Aynı kan örneklerinden otomatik cihazla (1-8. bantlar) ve spin-kolon kit kullanılarak (9-16. bantlar) elde edilen DNA'lar % 0.7'lik agaroz jelde yürütülerek, UV transillüminatörde etidyum bromürle görüntülendi.



**Şekil 2.** Elde edilen DNA'ların PCR-strip hibridizasyon sonuçları. Otomatik izolasyon cihazıyla ve manüel spin-kolon kit yöntemiyle elde edilen DNA'lardan DPYD IVS14+1'e ait 187 bp'lik amplicon ürünü PCR ile çoğaltıldıktan sonra % 2'lik agaroz jelinde görüntülendi (A). PCR ürünleri test stripleriyle hibritleştirildi (B). A, 1. bant, DNA standardı; 2. bant, invitek DNA PCR ampliconu; 3. bant, QuadroProb DNA PCR ampliconu. B, strip test reverse-hibridizasyon

zimi kodlayan gende % 52 oranıyla en sık gözlenen splice-site mutasyondur (14). Bu mutasyonun normal populasyondaki heterozigot taşıyıcılık oranı % 1.8 olarak tespit edilmiştir (15). DPYD IVS14+1 G>A mutasyonu kemoterapi alan hastalarda ciddi 5FU toksisitesine yol açmaktadır. Bu çalışmada biz her iki yöntemle izole edilen DNA örneklerini kullanarak PCR-strip hibridizasyon yöntemiyle DPYD IVS14+1 G>A mutasyonu analizi yaptık. Mevcut çalışmada manyetik bilye tekniğiyle izole edilen DNA'ların amplifikasyon ve strip hibridizasyonu aşamalarında sorun oluşturmadığı görüldü.

QuadroProbe QP10 izolasyon sistemiyle ekstrakte edilen DNA'ların multipleks PCR-mikroçip hibridizasyon performansını değerlendirmek için ticari bir kit kullanılarak osteocheck analizi yapıldı. Bu teste kemik yapım ve yıkımıyla ilgili 8 gen bölgesi mutipleks PCR yöntemiyle çoğaltıldı ve daha sonra PCR ampliconları

mikroçip yöntemiyle hibridize edilerek genotipleme yapıldı. Her iki yöntemle izole edilen DNA örnekleriyle yapılan multipleks PCR-mikroçip hibridizasyon işleminin olumlu sonuç verdiği ve manyetik bilye tekniğiyle izole edilen DNA'ların sorun oluşturmadığı görüldü.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenmesi, daha sonra uygulanacak moleküler teknikler için gereklidir. Bu amaçla DNA konsantrasyonu, 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümüyle spektrofotometrik olarak belirlenebilir (11). Mevcut çalışmada her iki yöntemle izole edilen DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Otomatik izolasyon cihazıyla aynı örnekten daha yüksek konsantrasyonda DNA izole edildi. Ancak bu çalışmada her iki DNA izolasyon metodunu, elde edilen DNA miktarı yönüyle karşılaştırmak yanıltıcı olabilir. Çünkü elüsyon basamağında kullanılan çözeltinin hacmi

DNA konsantrasyonunu doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada kullanılan manuel kit yönteminde DNA, 30-200  $\mu$ l elüsyon tamponuyla elde edilebilirken, otomatize sistemde en az 300  $\mu$ l elüsyon tamponu kullanılmaktadır. Bundan dolayı her iki prosedürü DNA konsantrasyonu açısından karşılaştırmak, hem yanıltıcı olabilir hem de bu çalışmanın amacı dışındadır. Ayrıca her iki izolasyon yönteminde başlangıçta kullanılan tam kan miktarları da farklıydı. QuadroProbe QP10 izolasyon sisteminde 250  $\mu$ l antikoagülanlı tam kan örneği kullanılırken, bizim kullandığımız manuel kit yönteminde 1-200  $\mu$ l kullanılmaktaydı. Bundan dolayı elde edilen DNA'nın saflığı yönüyle değerlendirilmesi daha doğru olacaktır.  $A_{260}/A_{280}$  oranı, bir DNA örneğindeki protein kontaminasyonunun bir ölçüsü olarak kullanılır. Genel olarak PCR uygulamaları için 1.5'in üzerindeki  $A_{260}/A_{280}$  oranı kabul edilebilir bir oran olsa da temiz bir DNA için bu oran, yaklaşık 1.8'in üzerinde olmalıdır (11). Bu çalışmada QuadroProbe QP10 izolasyon cihazıyla elde edilen DNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  oranları 1.75 – 4.20 aralığındaydı.

Manyetik bilye tekniğiyle izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflığı belirleneceği zaman 260 ve 280 nm dalga boylarına ilave olarak, ortamdaki partiküllerin varlığını belirlemek amacıyla 325 nm'de de spektrofotometrik ölçüm yapılmalıdır (11) ve hesaplamalar yapılırken 325 nm'de elde edilen absorbans değerleri, 260 ve 280 nm değerlerinden çıkartılmalıdır. Bizim çalışmamızda QuadroProbe QP10 izolasyon cihazıyla elde edilen DNA'ların 325 nm dalga boyundaki absorbans değerleri oldukça düşüktü ki bu da ortamdaki partikül miktarının çok az olduğunu göstermektedir. QuadroProbe QP10 izolasyon sisteminde elüsyon basamağında QuadroPak kartuşlar manyetik rak üzerinde yaklaşık 5 dakika bekletilerek manyetik bilyelerin DNA molekülünden uzaklaşması sağlanıyor ve yaklaşık 300  $\mu$ l DNA içeren elüsyon çözeltisi alınabiliyor. Bu durumda az da olsa manyetik partiküller DNA elüsyon sıvısına karışmaktadır. İkinci defa manyetik alanda (örneğin miknatıs plaka üzerinde) DNA'ları bekletme ve sıvının üst kısmından bir miktar alıp (ki biz 200  $\mu$ l aldık), ölçümlerde

kullanma DNA saflığını önemli oranda iyileştirmekte ve 325 nm dalga boyundaki absorbans değerlerini düşürmektedir.

Sonuç olarak, PCR tabanlı moleküler testlerde DNA izolasyonu ön basamaktır. Özellikle iş yükü yoğun klinik laboratuvarlarda işlem süresini kısaltması, hata oranını ve kontaminasyon riskini azaltması bakımından geleneksel manuel yöntemler yerine otomatik DNA izolasyon sistemleri tercih edilebilir. Bu çalışmanın sonuçları gösteriyor ki, manyetik bilye teknolojisini kullanan QuadroProbe QP10 otomatik izolasyon cihazıyla elde edilen DNA'lar, PCR ve multipleks PCR-hibridizasyon yöntemleriyle çalışılan moleküler testlerde sorun oluşturmamaktadır. Bu otomatize sistem, EDTA'lı taze ya da donmuş tam kan örneklerinden yeterli konsantrasyon ve saflıkta DNA eldesine imkan vermektedir.

**Yazışma Adresi:**

Abdulkadir YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Biyokimya Anabilim Dalı,

25240 ERZURUM

Tel: 0442 2316610

Fax: 0442 2361054

e-mail: [kadir.yildirim@hotmail.com](mailto:kadir.yildirim@hotmail.com)

[kadir@atauni.edu.tr](mailto:kadir@atauni.edu.tr)

**KAYNAKLAR**

1. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A: A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17: 8390, 1989.
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215, 1988.
3. Aljanabi SM, Martinez I: Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693, 1997.
4. Ciulla TA, Sklar RM, Hauser SL: A simple method for DNA purification from peripheral blood. *Anal Biochem.* 174: 485-488, 1988.
5. Bahl A, Pfenninger M: A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Res.* 24: 1587-1588, 1996.

6. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW, Rary JM: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 1245-1249, 1977.
7. Planelles D, Llopis F, Puig N, Montoro JA: A new, fast, and simple DNA extraction method for HLA and VNTR genotyping by PCR amplification. *J Clin Lab Anal.* 10: 125-128, 1996.
8. Parzer S, Mannhalter C: A rapid method for the isolation of genomic DNA from citrated whole blood. *Biochem J.* 273: 229-231, 1991.
9. Berensmeier S: Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 495-504, 2006.
10. Spanova A, Horak D, Soudkova E, Rittich B: Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 800: 27-32, 2004.
11. Leland J. Cseke, Peter B. Kaufman, Gopi K. Podila, Chung-Jui T: *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, pp: 1-24, CRC Press, New York, 2004.
12. Stormer M, Kleesiek K, Dreier J: High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. *Clin Chem.* 53: 104-110, 2007.
13. Beuselinck K, van Ranst M, van Eldere J: Automated extraction of viral-pathogen RNA and DNA for high-throughput quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 43: 5541-5546, 2005.
14. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH: High prevalence of the IVS14 + 1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics.* 12: 555-558, 2002.
15. van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, van Gennip AH: Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res.* 7: 1149-1153, 2001.