

# Mikrobiyota Çalışmalarında Örnek Alımı ve DNA İzolasyonu

## Sampling and DNA Isolation in Microbiota Studies

Mehmet KÖROĞLU

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Sakarya

Köroğlu M. Mikrobiyota Çalışmalarında Örnek Alımı ve Dna İzolasyon. J Biotechnol and Strategic Health Res. 2017;1 (Special issue): 50-55.

### Özet

İnsan vücudunda başta bağırsaklar olmak üzere mikrobiyota değişikliklerinin birçok hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır. Mikrobiyota çalışmalarının en önemli basamaklarından biri; numunenin uygun şartlarda toplanması, transferi, saklanması ve yine uygun koşullarda dizileme işlemlerine hazır hale getirilmesidir. Bu aşamalarda oluşabilecek hatalar ve eksiklikler çalışma sonucunu ciddi şekilde etkileyecektir. Yaş, diyet, kilo, antibiyotik kullanımı, diğer ilaçlar (metformin, proton pompa inhibitörleri, kortikosteroidler v.b.), menapoz/puberte gibi hormonal durumlar, sigara/alkol kullanımı, kronik hastalıklar ve ağız dış sorunları gibi birçok faktör mikrobiyota üzerine etkili olduğundan kayıt altına alınmalıdır. Çalışmaların büyük bir kısmı bağırsak mikrobiyotası üzerine yapılmıştır. Ancak; ağız, ürogenital sistem, deri, solunum yolu, burun, plenta, anne sütü ve göz gibi vücudun diğer kısımlarına odaklanan çalışmalar da bulunmaktadır. Bağırsak mikrobiyota çalışmalarında genellikle dışkı örneği (en az 1 gram) alınması tercih edilmektedir. Evde veya sağlık kurumunda alınabilir. Dışkı örneği, oda ısısında en fazla 24 saat, buzdolabında (+4°C) birkaç gün ve -80°C'de uzun süre saklanabilmektedir. Mümkünse birkaç alicot alınmalıdır. Fekal örneğin alındıktan sonra hızlıca dondurulması (-80°C) referans yöntemdir. Dondurulmadan önce stabilizasyon tamponuna alınması en uygundur. Rektal ve fekal swab örnekleri de kullanılmaya başlanmıştır. Fekal örnekler göre minör farklılıklar olduğu vurgulanmakta, daha kullanışlı, daha kolay ve büyük çalışmalara uygundur. Ancak bu konuda henüz yeterli sayıda çalışma yoktur. Kolon mukozasından alınan biyopsi örnekleri ve kolon lavaj sıvısı, çok yaygın olmasa da kullanılabilir. Mukozal mikrobiyota, bağırsak epitelinin yüzeyindedir. Bu nedenle daha az değişkendir/tutarlıdır ve konak hücreleri ile doğrudan etkileşim içerisindedir. Bundan dolayı mukozal biyopsi örneklerinin gold standart örnekleme tipi olduğu vurgulanmaktadır. Ancak; kolonun hazırlığı, kolonoskopik biyopsi gibi invaziv bir işlem gerektirmesi ve biyopsi boyutunun da sonucu etkileyebilmesi bu yöntemin önemli dezavantajlarıdır. Vücudun diğer bölgelerinden sürüntü veya doku örnekleri v.b. çeşitli örnekler mikrobiyota analizlerinde kullanılabilir.

Mikrobiyota çalışmaları için tüm amaçlara uyabilecek evrensel DNA ekstraksiyon yöntemi yoktur. Yüksek kaliteli saf DNA gereklidir. Çok sayıda farklı yöntemlerle çalışan ticari kit mevcuttur. Bunlar, çalışma öncesi iyi analiz edilip amaca uygun oldukları araştırılmalıdır. Otomatize sistemler en yüksek verimliliğe sahiptir. Sonucu etkileyebilecek potansiyel inhibitörlerin uzaklaştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, dışkı örneği alımı ve saklanması, rektal/fekal swab, mukozal biyopsi, nükleik asit izolasyonu.

### Abstract

Microbiota changes, especially intestines in the human body, have been found to be associated with many diseases. One of the most important steps of microbiota studies; transfer, storage and preparation of the specimen under appropriate conditions. Mistakes and omissions that may occur during these stages will seriously affect the result of the study. Many factors such as age, diet, weight, antibiotic use, other medications (metformin, proton pump inhibitors, corticosteroids, etc.), hormonal conditions such as menopause / puberty, smoking / alcohol use, chronic diseases and oral dental problems must be recorded. Much of the work has been done on intestinal microbiota. However, there are also studies focusing on other parts of the body such as mouth, urogenital system, skin, respiratory tract, nose, placenta, breast milk and eye.

It is generally preferred to take a fecal sample (at least 1 gram) in intestinal microbiota studies. It can be taken at home or at a health institution. The stool specimen can be stored for up to 24 hours in the room, in the refrigerator (+ 4 ° C) for a few days and at -80 ° C for long periods. If possible, several aliquots should be taken. Quick freezing (at -80°C) after taking sample is reference method. It is best to take it to the stabilization buffer before it is frozen. Rectal and faecal swab specimens have also begun to be used. It is emphasized that there are minor differences according to faecal examples, and it is more convenient and easier for bigger works. However, there is not enough work in this issue yet. Biopsy specimens from colon mucosa and column lavage fluid may be used, although not very common. Mucosal microbiota is at the surface of the intestinal epithelium. For this reason it is less variant / consistent and interacts directly with host cells. It is therefore emphasized that mucosal biopsy specimens are gold standard sampling types. Nevertheless; colon preparation, invasive procedures such as colonoscopic biopsy, and the effect of biopsy size on the outcome are significant disadvantages of this method. Various samples such as swabs or tissue samples from other parts of the body can be used in microbiota analysis.

There is no universal DNA extraction method that can fit all purposes for microbiota studies. High quality pure DNA is required. There are many different commercial kit available. They should be well analyzed before the study and investigated as appropriate. Automated systems have the highest efficiency. Potential inhibitors that may affect the end must be removed.

Keywords: Mikrobiyota, fecal sampling and storage, rectal/fecal swab, mucosal biopsy, nucleic acid extraction



Geliş Tarihi / Received : 29.10.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 31.10.2017

\*Corresponding Author:

Doç. Dr. Mehmet KÖROĞLU  
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Sakarya

E-mail: drmkoroglu@yahoo.com

## Giriş

İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde (ağız, boğaz, solunum sistemi, gastrointestinal sistem (GİS), deri ve ürogenital sistem gibi) hastalık yapmadan yaşayan mikroorganizmalar bulunmaktadır. Daha önceden normal flora olarak isimlendirilen bu durum şimdilerde mikrobiyota veya mikrobiyom olarak anılmaktadır. İnsan vücudunda başta bağırsaklar olmak üzere mikrobiyota değişikliklerinin birçok hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır<sup>1</sup>. Nükleik asit dizi analizi teknolojilerinin de gelişmesi ile mikroorganizma çeşitliliği ve mikroorganizmaların miktarı ölçülebilmekte olup, bu konuda çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaya başlanmıştır<sup>2-5</sup>. Bu tip çalışmaların en önemli basamaklarından biri, hatta en önemlisi numunenin uygun şartlarda toplanması, transferi, saklanması ve yine uygun koşullarda dizileme işlemlerine hazır hale getirilmesidir. Bu aşamalarda oluşabilecek hatalar ve eksiklikler çalışma sonucunu ciddi şekilde etkileyecektir<sup>3,6,7</sup>.

Mikrobiyota çalışmaları; Çalışma grupları oluşturulması ve vakaların seçimi, Örneklerin toplanması (alınması, transportu, stabilizasyonu ve saklanması), nükleik asit izolasyonu, moleküler çalışmalar (amplifikasyon-sekans analizi), sonuçların analizi ve yorumu aşamalarından oluşmaktadır. Kontrol grubunda yer alacak bireyler, araştırmanın amacına göre özenle seçilmelidir. Ayrıca aşağıda belirtilen hususlar mutlaka dikkate alınmalı ve kaydedilmelidir (2-5,8,9).

- Yaş; insan vücut mikrobiyotası yaklaşık 2 yaşında erişkin mikrobiyotasına benzer bir hal alır. Ancak bağırsak mikrobiyotasının, 3 yaşından sonra stabil hale geldiği kabul edilmektedir. Bir kısım çalışmalarda 18-40 yaş aralığının çocukluk, ergenlik ve menopoz dönemindeki değişkenliklerden en az etkilendiği vurgulanmıştır.
- Antibiyotik kullanımı çok önemlidir (birçok çalışmada raporlanmıştır). Özellikle yakın dönemde antibiyotik kullanımının ciddi etkileri vardır. Antibiyotik türüne ve dozuna göre bağırsak mikrobiyotasının normal haline dönebilmesi için 6 ay hatta 4 yıldan daha fazla süre gerekebilmektedir.
- Diğer ilaçlar; metformin, proton pompa inhibitörleri, kortikosteroidler, sitokinler, immünoşpresif ajanlar veya büyük doz probiyotikler.
- Menapoz, puberte gibi hormonal durumları,
- Sigara-tütün ve alkol kullanım alışkanlıkları,
- Diyetleri, diyet takviyeleri kullanımı ve yakın zamandaki diyet

değişiklikleri

- Malnütrasyon
- Fiziksel aktiviteleri,
- Kilo (vücut kitle indeksi)
- Kanser, bağışıklık sisteminin bozulması, belirlenmiş kronik hastalık öyküsü
- Ağız ve diş sorunları (örneğin; 8'den fazla diş eksikliği olan bireyler bazı çalışmalarda çalışma dışı bırakılmıştır).

## Mikrobiyota Çalışmaları İçin Örnek Alımı

Literatürde, yapılan çalışmaların büyük bir kısmı (yaklaşık 2/3'ü) bağırsak mikrobiyota çalışmalarına odaklanmıştır<sup>2,3,6</sup>. Bağırsak mikrobiyota çalışmalarında inceleyecek örnekler; dışkı, fekal swab-tuvalet kağıdı, rektal swab, doku örnekleri-mukozal biyopsi, intestinal mukozal lavaj örnekleri şeklinde sıralanabilir<sup>3,4,6-13</sup>.

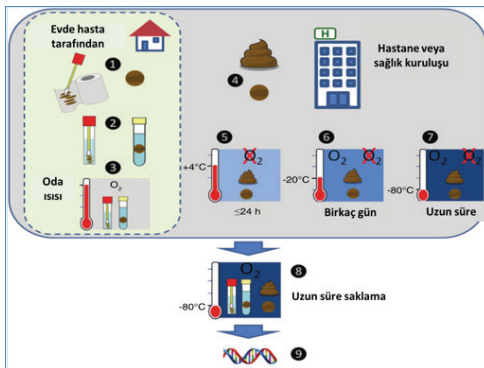
Bağırsak mikrobiyota çalışmalarında genellikle dışkı örneği kullanılır<sup>4,13</sup>. Ancak, dışkı mikrobiyotasının GİS'in çeşitli kısımlarındaki mikrobiyota ile özdeş olmadığı unutulmamalıdır. GİS'in çeşitli kısımlarında farklı sayılarda farklı bakteriler bulunmaktadır. Buna rağmen, bağırsak mikrobiyota çalışmalarında dışkı örneği kullanılır. Çünkü; non-invaziv, nisbeten toplanması kolay (evde hastanın kendisi alabiliyor) ve ucuz bir işlemdir. Dışkının kolon mikrobiyotasındaki genel varyasyonları yansıttığı düşünülmektedir. Eğer planlanan çalışmada bağırsak lümenine erişme imkanı veren bir endoskopik veya cerrahi girişim var ise dışkı örneği alınmayabilmektedir<sup>3,13,14</sup>.

Ancak dışkı örneğinin alınması düşünüldüğü kadar kolay değildir. Bazı önemli detaylara dikkat etmek gerekmektedir. Birkaç yöntem uygulanmaktadır. Ancak bazı soru işaretleri bulunmaktadır. Şöyle ki; Bir defekasyondaki tüm dışkıyı almak gerekir mi? yoksa bu dışkıdan bir kısmı mı alınmalı? Dışkı alikotlamanın önemli olduğu vurgulanmakta, alikotlarının hazırlanması ve alikotlamada kullanılan yöntemler/ticari kitler arasında fark bildiren çalışmalar var. Bu açıdan bakıldığında, homojen dağılım olmayabileceği düşünülüyor. Bu nedenle, şu anda üç ana alikotlama yöntemi vardır. Bunlar; oda ısısında beklettikten sonra, dondurmadan önce ve dondurduktan sonra alikotlama şeklindedir. Dondurduktan sonra alikotlama en mantıklısı gibi görünmektedir. Ancak bu işlem oldukça zordur. Son zamanlarda dondurduktan sonra alikotlama yapabildiği ticari

cihazlar kullanılmaya başlanmıştır<sup>13</sup>. Tüm bunlara rağmen alikotlar arasındaki farklılıkların çok anlamlı olmadığı da savunulmaktadır<sup>3</sup>.

Bağırsak mikrobiyota analizleri için standardize edilmiş ideal bir örnek toplama yöntemi ve örnek tipi henüz ortaya konulamamıştır. Gaita örneği sağlık kuruluşunda veya evde alınabilir (Şekil 1)<sup>3,15</sup>. Evde hastalar tarafından yapıldığında daha kolaydır<sup>3,15</sup>. Sadece 16 S rRNA analizi yapılacaksa, tuvalet kâğıdına alınması-sürülmesi yeterlidir<sup>3</sup>. Ancak tüm genom sekanslaması yapılacak ise yaklaşık (en az) 1 gram dışkı gereklidir. Her iki durumda da laboratuvara ulaştırılmadan önce toplanan materyal stabilizasyon tamponuna batırılmalıdır. Böylece uygun atmosfer ve ısı koşullarında transfer gerçekleştirilebilir<sup>3,13,15,16</sup>. Bağırsak mikrobiyota çalışmaları için dışkı örneklerinin alımı/toplanması amacıyla çeşitli yöntemler ve hazır ticari ürünler kullanılmaktadır (Şekil 2).

Sağlık kuruluşlarında gerçekleştirildiğinde; numunenin tamamı veya bir miktarı alınabilir, bu iki durumda da ara saklama uygulanabilir. Anaerobik koşullarda +4°C'de 24 saate kadar, Anaerob/normal ortam (O<sub>2</sub>) koşullarında ve -20°C'de birkaç gün (maksimum 1 hafta), Anaerob/aerob ortam koşullarında -80°C'de birkaç aydan birkaç yıla kadar saklanabilir. Stabilizasyon tamponu içindeki fekal örnek DNA ekstraksiyonu öncesinde normal aerob ortamda -80°C koşullarında uzun süre saklanabilir<sup>3,6,13</sup>. Gaita numunesinin, Bristol dışkı skaladaki hangi tipe uygun ise kayıt altına alınmalıdır. Bu skaladaki 7 alt tip, intestinal geçiş süresini yansıtmaktadır. Evde hasta kendisi örnek aldığındaki skalya göre tiplendirmede problemler oluşabiliyor<sup>3,6</sup>. Konstipasyon olan hastalarda dışkı örneği almak daha sorunlu olmakta, bazen laksatif veya lavman gerekebilmektedir<sup>17</sup>.



Şekil 1. Bağırsak mikrobiyota çalışmaları için evde veya sağlık kuruluşunda dışkı örneğinin alınması ve saklama koşulları (3 No'lu kaynaktan uyarlanmıştır).



Şekil 2. Bağırsak mikrobiyota çalışmaları için dışkı örneklerinin alımı/toplanması amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler ve bazı hazır ticari ürünler.

Bağırsak mikrobiyota çalışmaları için dışkı örneği toplamada tam olarak standardize edilmiş bir örnek tipi ve yöntemi olmasa da; alınan fekal örneğin hızlıca (şoklama yöntemi) dondurulması (direkt -80°C'de hızlı dondurma), referans yöntemdir. Bununla birlikte bazı bakteri sayılarında değişiklikler olsa da taze örnekten direkt DNA izolasyonu arasında anlamlı fark yoktur. Hızlı-şok dondurma işleminde normale göre hücre bütünlüğü korunmakta veya daha az bozmaktadır<sup>3,13</sup>. Hastaların örneği evde -20°C'de dondurup sonra laboratuvara de getirmesi mümkündür. Ancak transport-soğuk zincir- şartları sağlanamayabilir. Bu nedenle direkt dondurma için hastanede örnek alımı daha uygundur. DNA izolasyonu öncesi çözülüp-dondurma işlemi yapılmamalıdır. (DNA degradasyona uğramakta). Tek bir örnek yerine birkaç alikot alınması önerilmektedir<sup>3,13</sup>.

Görüldüğü gibi dışkı örneğinin dondurulması ile ilgili teknik kısıtlamalar bulunmaktadır ve bu konuda alternatif çözümler uygulanabilir. Bazı çalışmalarda 24 saat normal ortam (O<sub>2</sub>) atmosferinde dışkı örneğinin bekleyebileceği, hatta +20°C'de 14 veya 22 güne kadar 16SrRNA etkilenmeyeceği belirtilmiştir<sup>3,13,18</sup>. Ancak oda ısısında saklanabileceğini öne süren bir çalışmadaki örnekler, swab örnekleridir ve 1 örnekte-mantar üremesi olmuştur<sup>18</sup>. Bu sorunlar göz önüne alındığında alternatif çözümlerden birisi; + 4°C'de kısa süreli (<12 saat) saklama ve mümkünse dondurma veya mutlaka anaerobik koşullarda saklama (DNA ekstraksiyonundan önce oksijene aşırı duyarlı bakterilere zarar vermemek amacıyla) yöntemi olabilir<sup>3</sup>. Diğerisi ise; stabilizasyon tamponu kullanımı yöntemidir.

Böylece evde örnek alımı daha da kolaylaşmaktadır. Ayrıca; -80°C öncesi bekletme ve uzak yerlere transport avantajı da sağlar, çok sayıda alikotlarla biyobank teknolojisine uygundur, RNA'yı da korur ve +4°C'de veya oda sıcaklığında bile en az birkaç gün boyunca DNA'nın stabilize edilmesi mümkündür<sup>3,13</sup>. Bunlar, konsantre tamponlu tuz solüsyonlarıdır ve hazır ticari ürünler olarak temin edilebilmektedir. Ancak bu tamponlarla ilgili bazı soru işaretleri de vardır. Bu solüsyonlar tahriş edici olabilirler bu yüzden dikkatli olunmalı, dondurma-çözmenin etkisi tam bilinmemektedir, doğrudan ekstraksiyon ile mukayese çalışmaları yetersizdir ve homojenizasyon sorunu olabileceğinden her bir alikot içeriği aynı olmayabilir<sup>3,13</sup>.

Son zamanlarda rektal ve fekal sürüntü-swab örnekleri ile bağırsak mikrobiyota çalışmaları yapılmaktadır. Fekal örnekler göre minör farklılıklar olduğu vurgulanmakta, daha kullanışlı, daha kolay ve büyük çalışmalara uygun olduğu belirtilmektedir. Aynı kişilerde benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak bu konuda da yeterli çalışma olmadığından henüz dışkı örneğinin yerini alamamaktadır<sup>3,6,11,13</sup>. Kolon mukozasından alınan biyopsi örnekleri ve kolon lavaj sıvısı, çok yaygın olmasa da bir kısım mikrobiyota çalışmalarında (özellikle kolon kanserleri) kullanılmaktadır<sup>19,20</sup>. Mukozal biyopsi önerilme sebebi olarak; bağırsak lümen içeriğinin yani dışkının geçici olması, mukozal mikrobik çeşitliliği yansıtmaması ve diyetten etkilenmesi gösterilmektedir. Oysaki mukozal mikrobiyota, bağırsak epitelinin yüzeyinde bulunduğundan daha az değişkendir/tutarlıdır ve konak hücreleri ile doğrudan etkileşim içerisindedir<sup>19,20</sup>. Mukozal biyopsi örnekleri, göreceli olarak daha bol (daha fazla sayıda) mikroorganizma barındırmaktadır. Bu gibi nedenlerle mukozal biyopsi örneklerinin gold standart örnekleme tipi olduğu vurgulanmaktadır. Ancak; kolonun hazırlığı, kolonoskopik biyopsi gibi invaziv bir işlem gerektirmesi ve biyopsi boyutunun da sonucu etkileyebilmesi bu yöntemin önemli dezavantajlarıdır<sup>19,20</sup>.

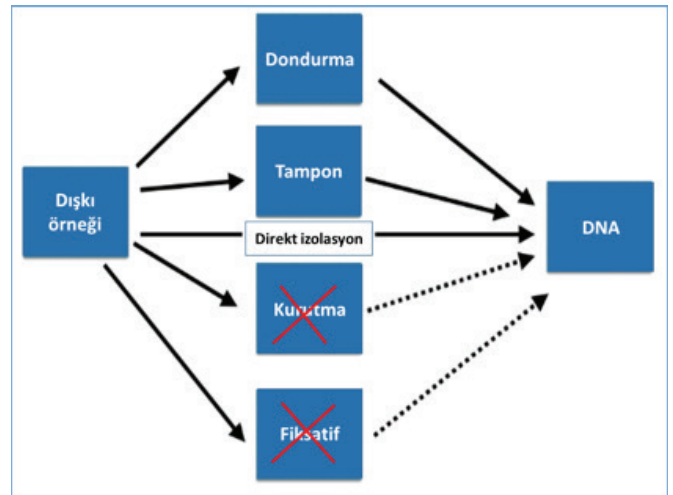
Bağırsak dışı mikrobiyota çalışmaları; ağırlıklı olarak ağız, ürogenital sistem, deri, solunum yolu, burun, plenta, anne sütü ve göz üzerine yoğunlaşmıştır<sup>2,5,10</sup>. Ürogenital sistem mikrobiyota çalışmalarına uygun örnekler; idrar, vajen sürüntüsü, serviks sürüntüsü, üretra sürüntüsü, penil sürüntü, deri sürüntü örnekleri, fırça örnekleri (cytobrush) vb. sayılabilir<sup>2-4,10,21,22</sup>. Ancak cinsiyet, yaş (özel-

likle kadınlarda), gebelik, cinsel davranışlar, antibiyotik kullanımı, erkeklerde sünnet, diğer ilaçlar ve hormonal değişiklikler mutlaka dikkate alınmalıdır<sup>4,8,21</sup>.

Vücudun diğer bölgelerinden; ağız mikrobiyota çalışmaları için oral örnekler (ağız, dil, diş, sub/supra gingival), burun sürüntüsü, diğer solunum yolu örnekleri, göz örnekleri, plenta, anne sütü örnekleri ve daha birçok sürüntü veya doku örnekleri v.b. çeşitli örnekler mikrobiyota analizlerinde kullanılabilir<sup>2,4,5,8</sup>.

### Mikrobiyota Çalışmaları İçin Dna İzolasyonu

Mikrobiyota çalışmaları için tüm amaçlara uyabilecek evrensel DNA ekstraksiyon yöntemi yoktur. Yüksek kaliteli saf DNA gereklidir. European MetaHIT Consortium protokolü-ökaryotlar için, American Human Microbiome Project (HMP) protokolü-Bacteroidetes için daha iyi denilmektedir<sup>3</sup>. En önemli hususlardan biri de dışkı örneği kurumamalı ve fiksatif içerisine konulmamalıdır (Şekil 3).



Şekil 3. Dışkı örneği için nükleik asit izolasyonunda izlenebilecek seçenekler<sup>23</sup>.

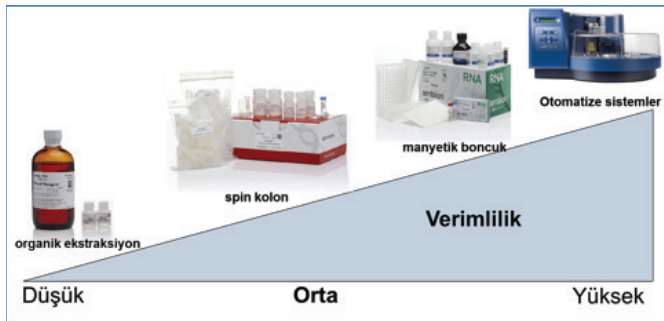
Konsantrasyon; stabilizasyon tamponunda seyreltilen numunelerin DNA ekstraksiyonundan önce konsantre edilmesi gerekebilir. Çalışma hedeflerine uygun çözümler düşünülmelidir. Örneğin; normal hızda ( $\leq 21,000$  rpm) santrifüj ile pellet elde edilmesi halinde virüs kaybı olacaktır. Virüs dışı mikroorganizmalar hedeflendiğinde, düşük hızda santrifüj ve filtrasyon işlemleri yapılabilmektedir<sup>3,24</sup>.

Lizis; manyetik separasyon (beads-beating) yöntemi, sporlu bakteriler ve mikobakterilerde DNA izolasyonu için diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlerden daha verimlidir ve bu yöntem çeşitli çalışmalarda önerilmektedir. Manyetik separasyon yönteminde; önce veya sonra 95°C'de bir ısıtma adımı lizis verimliliğini arttırmaktadır<sup>3</sup>.

DNA ekstraksiyonu; lizis adımı sonrası DNA ekstraksiyonu basamağı yer alır. Manuel veya ticari kitler (manyetik boncuk temelli) ile yapılabilir. Manuel izolasyon son derece verimli denilmektedir<sup>25</sup>. Ancak zaman alıcı ve büyük çalışmalara uygun değildir. Yarı-otomatik sistemler vardır. Bunlar, çalışma öncesi iyi analiz edilip amaca uygun oldukları araştırılmalıdır<sup>3,7,24</sup>. Bu sistemler; spin kolon veya manyetik boncuklar (manyetik separasyon) prensibi ile çalışıyor ve yüksek verimli sistemler. Yöntemlerin-kitlerin etkinliğini belirlemek zordur (başka unsurlar). Ek çalışmalar gereklidir<sup>3</sup>. Otomatize sistemler en yüksek verimliliğe sahiptir (Şekil 4)<sup>26</sup>.

Örneklerin saflaştırılması; potansiyel inhibitörlerin uzaklaştırılması (scatols, fecols, aromatik asitler v.b.) gerekmektedir<sup>3,27</sup>. Ticari ürünlerin bu özellikleri var, manuel prosedürlerde en sık Polyvinyl-pyrrolidone (PVPP) kullanılıyor<sup>3</sup>. Dışkı içeriğinde PCR ve nükleik asit dizileme yöntemlerinin sonucu etkileyecek düzeyde birçok inhibitor madde bulunduğu dikkate alındığında bu adımın önemi daha iyi anlaşılmaktadır<sup>4,27</sup>.

Yöntemlerin arasındaki farkın, bireyler arasındaki farkın gerisinde kalmakta olduğu belirtilmektedir. Ancak daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 4. Nükleik asit izolasyonu için yöntem/kit ve reaktif seçenekleri (26 No'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

1. Altuntaş Y, Batman A. Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Türk Kardiyol Dem Ars* 2017;45(3):286–296
2. Jason LP, Abu-Ali G, Huttenhower C. "The healthy human microbiome." *Genome medicine* 8.1 ,2016, 51.
3. Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology* 2015;10(9):1485-1504
4. Marchesi JR. The Human Microbiota and Microbiome. *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*. CAB International, 2014, Cardiff University, Cardiff.
5. Conrad R, Vlassov AV. The Human Microbiota: Composition, Functions, and Therapeutic Potential. *Med Sci Rev* 2015; 2:92-103
6. Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, et al. The Effect of Sampling and Storage on the Fecal Microbiota Composition in Healthy and Diseased Subjects. *PLoS ONE* 2015;10(5): e0126685.
7. Knudsen BE, Bergmark L, Munk P, Lukjancenko O, Priemé A, Aarestrup FM, Pamp SJ. Impact of sample type and DNA isolation procedure on genomic inference of microbiome composition. *mSystems* 2016;1(5):e00095-16.
8. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, et al. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J*. 2013;27:1012–22.
9. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;9:104.
10. Tong M, Jacobs JP, McHardy IH, Braun J. Sampling of intestinal microbiota and targeted amplification of bacterial 16S rRNA genes for microbial ecologic analysis. *Curr Protoc Immunol*. 2014 Nov 3;107:7.41.1-11.
11. Budding AE, Grasman ME, Eck A, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Rectal Swabs for Analysis of the Intestinal Microbiota. *PLoS ONE* 2014;9(7): e101344.
12. Bassis, Christine M., et al. "Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles." *BMC microbiology* 17.1 (2017): 78.
13. Vandeputte D, Tito RY, Vanleeuwen R, Falony G, Raes J. Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Aug 1;41(Supp\_1):S154-S167.
14. Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. *Sci Rep*. 2016 May 31;6:26775.
15. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–14.
16. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* (80-) 2016;352:560–4.
17. Parthasarathy G, Chen J, Chia N, O'Connor HM, Gaskins HR, Bharucha AE. Reproducibility of assessing fecal microbiota in chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil*. 2017 Oct;29(10):1-10.
18. Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol. Lett*. 2010;307(1), 80–86 ().
19. Watt E, Gemmell MR, Berry S, et al. Extending colonic mucosal microbiome analysis—assessment of colonic lavage as a proxy for endoscopic colonic biopsies. *Microbiome*. 2016;4:61.
20. Yoon H, Kim N, Park JH, et al. Comparisons of Gut Microbiota Among Healthy Control, Patients With Conventional Adenoma, Sessile Serrated Adenoma, and Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 2017;22(2):108-114.
21. Bao Y, Al KF, Chanyi RM, Whiteside S, Dewar M, Razvi H et al.. Questions and challenges associated with studying the microbiome of the urinary tract. *Ann Transl Med*. 2017 Jan; 5(2): 33.
22. Rampersaud R, Randis TM, Ratner A J. Microbiota of the upper and lower genital tract. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2012; (17)1:51-57.
23. Eisen j. Best practices for sample processing and storage prior to microbiome DNA analysis freeze? buffer? process? The microbiology of the Built Environment network. 2015
24. Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Licht TR. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome*. 2014 Jun 5;2:19
25. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol*. 1997;63(7), 2802–2813.
26. <https://static1.squarespace.com/static/52cc70d6e4b0a6453d00795/t/548718b1e4b09233f73d299b/1418139825380/Webinar+Microbiome+Vlassov.pdf>
27. Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC. Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. Hofreiter M, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0143334.