

Blastocystis Sp. DNA'sının Dışkıdan Eldesine İzolasyon Öncesi Uygulanan İki Farklı Ön İşlemin Etkisi

Impacts of Two Pre-Treatments Applied Prior to *Blastocystis* sp. DNA Isolation from Stool Samples

Gülcan Adıyaman-Korkmaz, Tuğçe Nil Yantıra, Funda Doğruman-Al

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Protozoonlara ait tanı ve araştırmalarda moleküler yöntemlerin uygulanmasındaki ilk basamak protozoona ait DNA izolasyonunun yapılmasıdır. Dışkı ortamından DNA izolasyonu, dışkı içeriğinin karmaşık, partiküler olması ve inhibitörler nedeniyle zorluk oluşturmaktadır. Bu çalışmada *Blastocystis* sp. izolatlarından DNA izolasyonu öncesinde, uygulanan iki farklı ön işlemin DNA eldesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Rutin parazitolojik inceleme için laboratuvara gönderilen dışkı örneklerinde nativ-lugol inceleme ile *Blastocystis* sp. belirlenen 12 dışkı örneğinin %10 at serumu ve %0.05 asparajin içeren Ringer solüsyonunda çift kültürleri yapılmıştır. DNA izolasyonu öncesinde Ringer solüsyonu kullanarak kendi modifiye ettiğimiz yöntem (RMY) ve sükröz gradient yöntemi (SGY) ile kültür süspansiyonları ön işlemden geçirilmiştir. İki farklı ön işlem sonrasında DNA eldesi için ticari DNAzol (MRC,USA) solüsyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. DNA eldesi işleminden sonra F1 ve RB primerleri kullanılarak protozoonun SSUrDNA bölgesine ait 1100bp uzunluğundaki gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Amplikonlar %1.5 agaroz jelde görüntülenmiştir.

Bulgular: Agaroz gel görüntülemesi soucunda RMY ile 12 örnekten 11'inde (%91.6), SGY ile ise altısında (%50) *Blastocystis* sp. ait 1100 bp büyüklüğünde bant görüldüğü belirlenmiştir. RMY ile belirlenen bantların daha belirgin olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda RMY yönteminin pratik olduğu ve kısa sürede gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Sonuç: Ticari kitlerde kit prosedürlerini uygulamadan önce kimyasal ve/veya mekanik ön işlemleri uygulamanın DNA izolasyonunun başarı şansını artırdığı belirlenmiştir. *Blastocystis* sp. DNA'sının eldesi öncesinde RMY ile ön işlemin yapılmasının, DNA izolasyonuna olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Blastocystis* sp., polimeraz zincir reaksiyonu inhibisyonu, dışkı, ön işlem

ABSTRACT

Objective: In the field of research and diagnosis of protozoa, the first step of the molecular methods is to isolate the DNA of protozoa. DNA isolation from stool samples has difficulties due to the complex and particulate structure of the stool and the presence of inhibitors. In this study, before isolating the DNA from *Blastocystis* sp. isolates, we aimed to examine the effects of the two different preprocesses applied before the isolation.

Methods: *Blastocystis* sp. was determined with native-lugol method in the 12 stool samples that were sent to laboratory for routine parasitological examination and the duplicate cultures were maintained in Ringer's solution containing 10% horse serum and 0.05% asparagine. Before DNA isolation, culture suspensions were processed in Ringer' solution the technique that we have modified (RMY) and sucrose gradient method (SGM). Upon two different pre-treatments, DNA isolation was performed with DNAzol® (MRC,USA) according to manufacturer's protocol and instructions. Then, 1100 bp gene belong to protozoa SSUrDNA locus was amplified with F1 and RB primers by PCR technique. Amplicons were runned and observed on 1.5% agarose gel.

Results: As a result of agarose gel visualization out of 12 samples, we have observed the 1100 bp band belong to *Blastocystis* sp. in 11 samples (91.6%) with RMY and in 6 samples (50%) with SGM. It was detected that the bands were more visible and prominent with RMY. Meanwhile, it has been determined that RMY technique is practical and it can be performed in a short time.

Conclusions: It has been shown that chemical and/or mechanic pre-treatments increase the success rate of DNA isolation before applying the kit procedures in commercial kits. It has been observed that RMY preprocess contributes positively to DNA isolation from *Blastocystis* sp. isolates.

Key Words: *Blastocystis* sp., inhibition of polymerase chain reaction, stool, pretreatment

GİRİŞ

Protozoonlara ait tanı ve araştırmalarda moleküler yöntemlerin uygulanmasındaki ilk basamak DNA izolasyonunun yapılmasıdır. Dışkı ortamından protozoona ait DNA izolasyonu, dışkı içeriğinin karmaşık, partiküler olması ve inhibitörler nedeniyle zorluk oluşturmaktadır. Lipid, hemoglobin, safra tuzları, mukustaki polisakaritler, bakteri, besinlerin sindirim ürünleri gibi inhibitörler DNA amplifikasyonundaki duyarlılığı azaltmaktadır(1). Dışkıdan DNA izolasyonunda guanidyum tiyoisosiyanat silika, aköz iki fazlı sistem, fenol-kloroform, Chelex yöntemleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu metodların uygulanmalarında emek yoğun olmaları, uzun sürmesi ve verimliliklerinin düşük olması gibi çeşitli kısıtlılıklar yaşanmaktadır. Inhibitörlerin varlığı, kullanılan dışkının miktarı, saklama solüsyonlarının gerekliliği veya taze örnek kullanımının verimliliği artırması bu faktörler arasında sayılmaktadır(2).

Günümüzde ise en popüler seçenek ticari kit kullanımı şeklindedir. Bu tarz kitler içeriklerinde hücrelerin parçalanmasını sağlayan parçalayıcı tamponlar, inhibitörleri absorbe eden maddeler ve DNA içeren solüsyondan inhibitörleri uzaklaştıran silika membranlar bulundurmaktadır(3). Kit temelli yöntemler verimli ve pratik olmakla birlikte pahalı olabilmekte ve farklı firmaların ürünlerinin verimliliği de değişkenlik gösterebilmektedir(4). Bununla birlikte ticari kit kullanımı sırasında veya öncesinde çeşitli ön işlemler ve modifikasyonlar yapılarak DNA eldesinin verimliliği artırılmakta, inhibitörler uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır(5). Moleküler yöntemlerin duyarlılığının artırılması için DNA eldesinde daha verimli tekniklerin geliştirilmesinin yanında duyarlı amplifikasyon tekniklerinin de kullanıma sunulması gerekmektedir.

Bu çalışmada dışkıda saptanan *Blastocystis* sp. izolatlarından DNA izolasyonu öncesinde, uygulanan iki farklı ön işlemin DNA eldesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Blastocystis taşıyıcısı olduğu nativ-lugol inceleme ile belirlenen 12 olgunun dışkı örneği %10 at serumu ve %0.05 asparajin içeren Ringer solüsyonuna ekilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. Her örnekten çift kültür yapılmıştır. Kültürlerin üreme kontrolü 3-4. günde mikroskopik inceleme ile yapılarak bir-iki kez subkültüre alınmıştır. DNA izolasyonu öncesinde Ringer solüsyonu kullanarak kendi modifiye ettiğimiz yöntem (RMY) ile sükröz gradient yöntemi (SGY) kullanılarak kültür süspansiyonları ön işlemden geçirilmiştir.

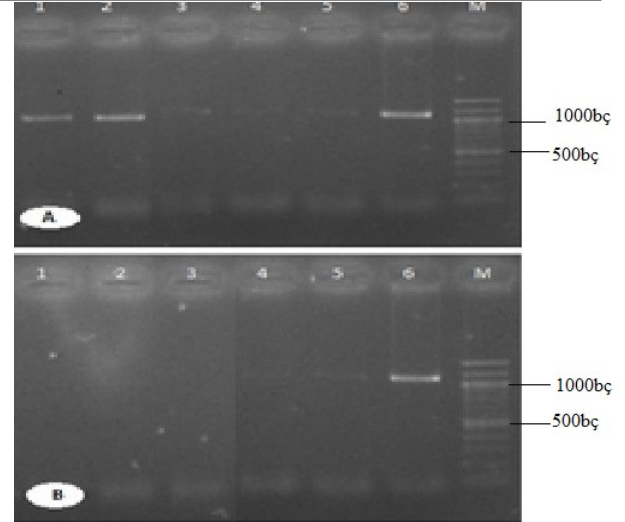
RMY kullanıldığında kültür süspansiyonu çift katlı bezden süzülmuş ve üzerine serumsuz Ringer solüsyonu eklenerek 15 dk santrifüj (500g/dk) edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra pellet üzerine tekrar Ringer solüsyonu eklenerek bu yıkama işlemi üç kez daha tekrarlanmıştır. Son yıkama sonrasında pellet üzerine DNA eldesi için kullanılan izolasyon solüsyonu (DNAzol®, MRC, USA) eklenerek üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapılmıştır.

SGY ise kültür süspansiyonu çift kat gazlı bezden süzülükten sonra üzerine 1:5 olacak şekilde serumsuz Ringer solüsyonu eklenerek 15 dk santrifüj (500g/dk) edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırılıp bu yıkama işlemi beş kez tekrarlanmıştır. Son yıkama sonrasında sediment üzerine 1M sukroz ile aynı oranda Ringer solüsyonu eklenmiştir. Karışım santrifüj edildikten sonra bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. En son Ringer solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra pellet üzerine DNA eldesi için kullanılan izolasyon solüsyonu (DNAzol®, MRC,USA) eklenerek DNA izolasyonu yapılmıştır.

Dışkıda *Blastocystis* izolatlarının varlığı parazit cinsine spesifik olan F: 5' GGAGGTAGTGACAATAAATC ve R: 5' ACTAGGAATTCCTGTTTCATG primerleri ile araştırılmıştır. Bu primerler ile *Blastocystis* sp.'e ait 1800 bp'lik rDNA bölgesinin 1100 bp'lik gen bölgesi konvansiyonel Polimeraz Zincir Yöntemi (PZR) ile çoğaltılmıştır(6). Isı döngü cihazı programı 94°C 5 dk denatürasyonun ardından, 35 döngü 94°C 1dk, 54°C 1 dk ve 72°C 1,5 dk ile bağlanma ve 72°C 10 dk uzama basamakları şeklinde düzenlenerek Hemo Klen Taq polimeraz (NEB, USA) ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çoğaltma sonrasında DNA bantları %1,5 agaroz jelde görüntülenmiştir.

BULGULAR

Agaroz gel görüntülemesi sonucunda RMY ile 12 örnekten 11'inde (%91.6), SGY ile ise altısında (%50) *Blastocystis* sp. ait 1.1 kbp büyüklüğünde band görüldüğü belirlenmiştir. RMY ile belirlenen bantların daha belirgin olduğu saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: Agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiş *Blastocystis* spp. ait DNA bantları. A) RMY sonrasında izole edilen DNA bantları B) SGY sonrasında izole edilen DNA bantları M: 100bp moleküler ağırlık standardı.

Aynı zamanda RMY ön işleminin SGY ön işlemine göre daha pratik olması ve kısa sürmesi nedeniyle zaman kullanımı açısından avantaj sağladığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

Dışkıdaki biyolojik ve biyolojik olmayan birçok madde PCR tepkimesini inhibe edebilmektedir. Verimli çalışan genetik temelli sistemler parazitlerin prevalansının belirlenmesinde, moleküler karakterizasyonlarının yapılmasında, ilaç direnci ve virülans faktörlerinin araştırılmasında doğru ve etkin sonuçların alınabilmesi için önem taşımaktadır. Bu konuda çeşitli araştırmacılar tarafından farklı PCR temelli metodlar kullanılmaktadır(7). Kullanılan bazı metodlar protozoonların kist formlarından DNA eldesinde ve aynı zamanda dışkıda bulunan ve enzimatik tepkimeleri inhibe eden proteaz, DNaz, bakteri ve mukustan kaynaklanan polisakaritler, safra tuzları nedeniyle yetersiz kalmaktadır(8). DNA eldesinin kalitesini ve miktarını artırmak için protozoonun dirençli kist duvarını parçalamak için mekanik metodların kullanılması ve inhibitörlerin ortadan kaldıracak yöntemlerin geliştirilmesi yarar sağlayacaktır. Babei ve ark. *Giardia intestinalis* için mekanik olarak ardı sıra yapılan dondurma ve çözme işlemi ile cam boncukla vorteks işleminin birlikte kullanılmasının Qiagen mini stool kit protokolü öncesinde uygulanmasının duyarlılığı %100'e yükselttiği gösterilmiştir(1).

Dışkıdan mikroorganizmaların DNA'sının çoğaltılması izolasyon aşamasında ortamın yoğun inhibitör içermesi nedeniyle zor olmaktadır. Ticari kitlerde kit prosedürlerini uygulamadan önce kimyasal ve/veya mekanik ön işlemleri uygulamanın DNA izolasyonunun başarı şansını artırdığı belirlenmiştir. Bu işlemler sırasında ek bir maliyet de söz konusu olmaktadır(7,9,10). Bununla birlikte *Blastocystis* sp. için dışkıdan yapılan ksenik kültür sonrasında bakteri yoğunluğunu ve inhibitörleri uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkama sonrasında parazite ait DNA eldesinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur(11,12). Hyeon ve ark. domuz dışkısından *Salmonella* Enteritidis DNA'sının eldesinde ticari kit kullanımı sırasında yıkama basamaklarını artırarak PCR inhibitörlerinin etkisini azalttıklarını ve bunun amplifikasyona başarılı etkisi olduğunu real-time PCR sonucunda gözlemlediklerini bildirmişlerdir(13).

SONUÇ

Blastocystis sp. DNA'sının eldesi öncesinde RMY ile ön işlemin yapılmasının, DNA izolasyonuna olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda görülen bantların daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol* 2011;128:159-62.
2. Zhang BW, Li M, Ma LC, Wei FW. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem Genet* 2006;44:503-12.
3. Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, Topp E. Evaluation of QIAampR DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J Microbiol Meth* 2003; 54:13-7.
4. Yoshikawa H, Dogruman-Al F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res.* 2011;109:1045-50.
5. Nagel R, Bielefeldt-Ohmann H, Traub R. Clinical pilot study: efficacy of triple antibiotic therapy in *Blastocystis* positive irritable bowel syndrome patients. *Gut Pathogens* 2014; 6:34.
6. Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res* 2008; 102:663-70.
7. Tang JN, Zeng ZG, Wang HN, Yang T, Zhang PJ, Li YL, Zhang AY, Fan W, Zhang Y, Yang X, Zhao SJ, Tian GB, Zou LK. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *J Microbiol Methods* 2008;75:432-6.
8. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing. *Mol Biotechnol* 2004;26:133-46 .
9. Smith B, Li N, Andersen AS, Slotved HC, Krogfelt KA. Optimizing bacterial DNA extraction from faecal samples: comparison of three methods. *Open Microbiol J* 2011;5:14-7.
10. Hawash Y. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *Korean J Parasitol* 2014;5283:263-71.
11. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* 2009; 105:1283-6.
12. Abdel-Hamed DM, Hassain OM, Zul-Fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res* 2011;108:553-60.
13. Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park C, Choi IS, Seo KH. Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella* Enteritidis using real-time PCR assay. *J Vet Sci* 2010;11:143-9.