



# KUZEY BİYOTEKNOLOJİ

Yeni Nesil Dizileme Hizmetleri -Biyoinformatik Analiz Hizmetleri-Oligonükleotid Sentezi Hizmetleri

## Örnek Gönderim Gereksinimleri



Tel: 0 346 224 00 56 E-mail:admin@kuzeybio.com

## İçindekiler

1. Genom Dizileme .....	1
1.1 İnsan Tüm Genom Dizileme .....	1
1.2 Ekzom Dizileme/Hedef Bölge Yakalama .....	1
1.3 Bitki & Hayvan Genom Dizileme.....	2
1.4 Mikrobiyal Genom Dizileme.....	3
1.5 Pacbio Dizileme.....	3
1.6 Nanopore Dizileme.....	4
1.7 PCR ürünü Dizileme.....	4
2. RNA Dizileme.....	5
2.1 Transkriptom Dizileme.....	5
2.2 Ökaryotik Küçük RNA Dizileme .....	6
2.3 Ökaryotik Uzun Kodlanmayan RNA Dizileme .....	6
2.4 Ökaryotik CircRNA Dizileme.....	7
2.5 PacBio İzofom Dizileme .....	7
3. DNA Ekstraksiyon Notları.....	7
3.1 Bitki Dokusu Örnekleri.....	7
3.2 Hayvan Dokusu Örnekleri .....	8
3.3 Mikrobiyal Örnekler .....	8
3.4 Dışkı Örnekleri.....	9
3.5 Su Örnekleri .....	9
3.6 Bakteri suşu ile hazırlanan kültür Örnekleri .....	9
3.7 Kan Örnekleri .....	10
4. RNA Ekstraksiyon Notları.....	10
4.1 Bitki dokusu Örnekleri .....	10
4.2 Hayvan Dokusu Örnekleri .....	10
4.3 Hücreler.....	11
4.4 Bakteri Kültür Örnekleri .....	11
4.5 Kan Örnekleri .....	11

## 1. Genom Dizileme

### 1.1 İnsan Tüm Genom Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
İnsan tüm genom dizileme (350 bp)	Genomik DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Genomik DNA (PCR'siz)	≥ 1.2 µg	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	
	FFPE* DNA	≥ 800 ng	-	-	Fragmanlar şundan daha uzun olmalıdır: 1500 bp

\* FFPE: Formalin-Fixed, Parafin-Gömülü  
Önerilen süspansiyon tamponu: TE, EB ve TB

### 1.2 Ekzom Dizileme/Hedef Bölge Yakalama

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
DNA kütüphanesi (İnsan Ekzomu veya İnsan hedefi bölgesi)	Genomik DNA	≥ 300 ng	≥ 15 µL	≥ 20 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	FFPE	≥ 500 ng	-	-	Fragmanlar şundan daha uzun olmalıdır: 1000 bp
	cfDNA/ctDNA	≥ 30 ng	-	-	Fragmanlar birden fazla olmalıdır 170 bp, genomik kontaminasyon olmamalıdır.

# KUZEY BİYOTEKNOLOJİ

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Fare Ekzom Kütüphanesi	Genomik DNA	≥ 300 ng	≥ 15 µL	≥ 20 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	FFPE*	≥ 500 ng	-	-	Fragmanlar şundan daha uzun olmalıdır: 1000 bp

\* FFPE: Formalin-Fixed, Parafin-Gömülü  
Önerilen süspansiyon tamponu: TE, EB ve TB

## 1.3 Bitki & Hayvan Genom Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Bitki ve hayvan tüm genom kütüphanesi (≤ 500 bp)	Genomik DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Genomik DNA (PCR içermeyen 350 bp olmayan)	≥ 5 µg	≥ 20 µL	≥ 30 ng/µL	
	Genomik DNA (PCR'sız 350 bp)	≥ 1.2 µg	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	

Önerilen süspansiyon tamponu: TE, EB ve TB

## 1.4 Mikrobiyal Genom Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Shotgun metagenomik kütüphane	Total DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degredasyon yok, kontaminasyon yok
Amplikon metagenomik kütüphane	Total DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	
Mikrobiyal tüm genom kütüphane (350 bp)	Genomik DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	
Mikrobiyal tüm genom kütüphane (PCR'sız 350 bp)	Genomik DNA	≥ 1.2 µg	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	

Önerilen süspansiyon tamponu: TE, EB ve TB

## 1.5 Pacbio Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Pacbio Sequel II DNA CLR kütüphanesi	HMW Genomik DNA (Hayvan ve Bitki)	≥ 5 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.75~2.0; OD260/230=1.5~2.6; NC/QC=0.95~3.00 Fragmanlar ≥ 30K olmalıdır
	HMW Genomik DNA (Bakteriyel ve Fungus)	≥ 2 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.7~2.2; OD260/230=1.3~2.6; NC/QC=0.95~3.00 Fragmanlar ≥ 20K olmalıdır
Pacbio Sequel II DNA HiFi kütüphanesi	HMW Genomik DNA (Hayvan ve Bitki)	≥ 15 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.75~2.0; OD260/230=1.5~2.6; NC/KK=1.00~2.20 Fragmanlar ≥ 30K olmalıdır
	HMW Genomik DNA (Bakteriyel ve Fungus)	≥ 8 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/230=1.3~2.6; OD260/280=1.7~2.0; NC/KK=1.0~2.2 Fragmanlar ≥ 20K olmalıdır

\*\*HMW: Yüksek Moleküler Ağırlık

\*\*\*NC/QC: NanoDrop konsantrasyonu/Qubit konsantrasyonu

Önerilen süspansiyon tamponu: EB

## 1.6 Nanopore Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Pacbio Sequel II DNA CLR kütüphanesi	HMW Genomik DNA (Hayvan ve Bitki)	≥ 5 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.75~2.0; OD260/230=1.5~2.6; NC/QC=0.95~3.00 Fragmanlar ≥ 30K olmalıdır
	HMW Genomik DNA (Bakteriyel ve Fungus)	≥ 2 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.7~2.2; OD260/230=1.3~2.6; NC/QC=0.95~3.00 Fragmanlar ≥ 20K olmalıdır
Pacbio Sequel II DNA HiFi kütüphanesi	HMW Genomik DNA (Hayvan ve Bitki)	≥ 15 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/280=1.75~2.0; OD260/230=1.5~2.6; NC/KK=1.00~2.20 Fragmanlar ≥ 30K olmalıdır
	HMW Genomik DNA (Bakteriyel ve Fungus)	≥ 8 µg	≥ 50 µL	≥ 70 ng/µL	OD260/230=1.3~2.6; OD260/280=1.7~2.0; NC/KK=1.0~2.2 Fragmanlar ≥ 20K olmalıdır

\*\*HMW: Yüksek Moleküler Ağırlık

\*\*\*NC/QC: NanoDrop konsantrasyonu/Qubit konsantrasyonu

Önerilen süspansiyon tamponu: EB

## 1.7 PCR Ürünü Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
PCR'sız Kütüphane	PCR ürünü	≥ 1.5 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
Kütüphane (PCR ile)	PCR ürünü	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	

Recommended suspension buffer: TE, EB and TB

## 2. RNA Dizileme

### 2.1 Transkriptom Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	RNA Integrity Number (RIN; Agilent 2100)	Safılık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Ökaryotik mRNA kütüphanesi (polA zenginleştirme)	Total RNA (Hayvan)	≥ 200 ng	≥ 10 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 4.0, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Total RNA (Bitki ve Fungus)	≥ 200 ng	≥ 10 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 4.0, düz taban çizgisi	
	Total RNA (Kan)	≥ 400 ng	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 5.8, düz taban çizgisi	
	Amplifiye edilmiş cDNA (çift zincirli)	≥ 100ng	≥ 10 µL	≥ 10 ng/µL	Fragmanlar zirve noktası ~2000bp olacak şekilde 400bp-5000bp arası, dağılım göstermelidir.	OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
Ökaryotik yönlü mRNA kütüphanesi (polA zenginleştirme)	Total RNA (Hayvan)	≥ 400 ng	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 5.8, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Total RNA (Bitki ve Fungus)	≥ 400 ng	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 5.8, düz taban çizgisi	
	Total RNA (Kan)	≥ 400 ng	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	≥ 5.8, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0, OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
Prokaryotik RNA kütüphanesi	Total RNA	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
Metatranskriptom kütüphanesi	Total RNA	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
Çift RNA kütüphanesi	Total RNA	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok

Önerilen süspansiyon tamponu: RNaz içermeyen ddH2O

## 2.2 Ökaryotik Küçük RNA Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	RNA Integrity Number (RIN; Agilent 2100)	Saflık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Küçük RNA kütüphanesi (18-40 bp insert)	Total RNA (Hayvan)	≥ 2 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 7.5, pürüzsüz taban çizgisi ile	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Total RNA (Bitki ve Fungus)	≥ 2 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 7.5, pürüzsüz taban çizgisi ile	
	Ekzom RNA	≥ 10 ng	≥ 20 µL	-	25-200nt arasında dağılan fragmanlar (Agilent 2100 Bioanalyzer), FU> 10, pik > 2000nt olmadan	

Önerilen süspansiyon tamponu: RNaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O

## 2.3 Ökaryotik Uzun Kodlanmayan RNA Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	RNA Integrity Number (RIN; Agilent 2100)	Saflık (Nanodrop™/Agaroz jel)
Yönlü RNA dizileme (rRNA kalıntısı olmadan)	Total RNA (Hayvan)	≥ 500 ng	≥ 10 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	OD260/280 = 1.8-2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Total RNA (Bitki ve Fungus)	≥ 500 ng	≥ 10 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6, düz taban çizgisi	
	Ekzom RNA	≥ 5 ng	≥ 10 µL	-	25-200nt arasında dağılan fragmanlar (Agilent 2100 Bioanalyzer), FU> 10, pik > 2000nt olmadan	
Çift RNA kütüphanesi	Total RNA	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok

Önerilen süspansiyon tamponu: RNaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O



## 2.4 Ökaryotik CircRNA Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	RNA Integrity Number (RIN; Agilent 2100)	Saflık (Nanodrop™/Agaroz jel)
CircRNA kütüphane	Total RNA (Hayvan)	≥ 2 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 7.0, düz taban çizgisi	OD260/280 ≥ 2.0; OD260/230 ≥ 2.0; degradasyon yok, kontaminasyon yok
	Total RNA (Bitki ve Fungus)	≥ 2 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.5, düz taban çizgisi	

Önerilen süspansiyon tamponu: RNaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O

## 2.5 PacBio Izoform Dizileme

Kütüphane Tipi	Örnek Tipi	Miktar (Qubit)	Hacim	Konsantrasyon	RNA Integrity Number (RIN; Agilent 2100)	Saflık (Nanodrop™/Agaroz jel)
PacBio sequel II/IIe RNA kütüphanesi	Total RNA	≥ 600 ng	≥ 15 µL	≥ 40 ng/µL	≥ 6.5	OD260/280=1.8-2.2; OD260/230=1.3-2.5; NC/QC ≤ 2

\*\*\*NC/QC: NanoDrop konsantrasyonu/Qubit konsantrasyonu

Önerilen süspansiyon tamponu: RNaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O

## 3. DNA Ekstraksiyon Notları

### 3.1 Bitki Dokusu Örnekleri

1. Bitkilerin genç kısımları gibi nispeten yüksek nükleik asit içeriğine sahip taze toplanmış dokular tercih edilmelidir.
2. Kriyoprezervasyon gerekiyorsa, örneklerin ayırmadan hemen sonra sıvı nitrojen ile dondurulması önerilmektedir. Dondurmadan önce, toplanan örnekleri steril su veya %75 etanol ile dezenfekte edilmelidir.
3. Örnek yüzeyini kurutmak için kurutma kağıdı kullanılabilir. Örneği yaklaşık 100 mg'lık
4. küçük parçalar halinde kesilmeli ve sıvı nitrojen ile hemen dondurulmalıdır.
5. Dondurulmuş örneği önceden soğutulmuş kriyoprezervasyon tüplerinde, 15 mL/50 mL santrifüj tüplerinde veya kilitli torbalarda -80°C'de saklanmalıdır.
6. Doku örnekleri folyo ile paketlenmişse, katlarken dokuya zarar verilmemeli ve folyo açıldığında örneğin dökülmesini önlemek için folyo kilitli bir torbaya yerleştirilmelidir.
7. Örnekleri toplarken, ekstraksiyon sırasında ikincil ayrılma ve birleştirme nedeniyle örnek degradasyonunu önlemek için örneklerin birincil ekstraksiyon miktarına göre ayrı tüplerde saklanması önerilmektedir.

## 3.2 Hayvan Dokusu Örnekleri

1. DNA ekstraksiyonu için taze toplanmış örnekler tercih edilmelidir. Nükleik asit içeriği yüksek dokuların (hayvan karaciğeri veya diğer dokular gibi) seçilmesi önerilmektedir.
2. Kan ve diğer kontaminantları uzaklaştırmak için toplanan örneğin soğuk tuzlu su ile durulanması tavsiye edilmektedir. İstenmeyen dokular (bağ dokusu ve saç gibi) temizlenmelidir.
3. Örnekleri yaklaşık 50 mg'lık küçük parçalara buz üzerinde bölünmelidir (doku ne kadar küçükse koruma etkisi o kadar iyiolacaktır).
4. Dondurarak saklama gerekiyorsa, hayvanlardan alınan taze örnekler sıvı nitrojen ile hemen dondurulmalıdır. Örnekler 1,5 mL veya 2,0 mL önceden soğutulmuş ependorf tüp veya vidalı kapaklı kriyoprezervasyon tüpüne koyup, sızdırmaz filmle kapatılmalı ve -80°C'de saklanmalıdır.
5. Dondurma sırasında çatlamayı ve örnek kontaminasyonunu önlemek için tüpü örneklerle aşırı doldurmaktan kaçınılmalıdır.
6. Doku örneklerinin korunması için bir nükleik asit stabilizatörü kullanılıyorsa, lütfen kesinlikle reaktif spesifikasyonunun gerekliliklerine uygun olarak yerine getirilmelidir. Bozulmayı önlemek için örneklerin reaktif tarafından tam olarak nüfuz etmesini sağlamak için doku bloğunu reaktifin gerektirdiği boyut aralığında tutulmalıdır.
7. Örnekleri toplarken, ekstraksiyon sırasında ikincil ayrılma ve birleştirme nedeniyle örnek degradasyonunu önlemek için örneklerin birincil ekstraksiyon miktarına göre ayrı tüplerde saklanması önerilmektedir.

## 3.3 Mikrobiyal Örnekler

1. 5~20 cm derinliğindeki toprağı kazmak ve toplamak için alkolle sterilize edilmiş bir kürek kullanın, görünen kökleri çıkarın ve toprağı 2 mm'lik bir elekten süzün. Her örnek üç farklı örnek alma noktasından toplanır ve bir araya toplanır.
2. Örnek steril santrifüj tüplerinde toplanır ve DNA ekstraksiyonu için laboratuvara geri gönderilmek üzere 0°C'nin altına yerleştirilir. Ekstraksiyon hemen yapılamıyorsa, toprak örnekleri -80°C veya -20°C'de dondurucuda dondurulmalıdır.
3. Toprak örneklerinin taşınması için 5 mL ependorf tüp veya 15 mL/50 mL santrifüj tüpünün kullanılması şiddetle tavsiye edilir. Tüpleri parafilm ile kapatın. Kendinden kapanan torbaların kullanımının örneklerde çapraz kontaminasyon riskini arttırdığını unutmayın.
4. Tekrarlanan donma-çözülme nedeniyle örnek degradasyonunu önlemek için örnekleri birkaç tüpe bölün ve saklayın.

**!! Bitki kökü mikrobiyal araştırması için lütfen bu makaleye bakınız:**

Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, vd. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(8).

**!! Ekstraksiyon için ticari kit kullanmıyorsanız, lütfen bu makaleye bakınız:**

Clegg C D, Ritz K, Griffiths B S. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25(1):30-33.

## 3.4 Dışkı Örnekleri

Ayrıntılı basamaklar için referans çalışma:

Kyle G. Bowel care. Part 3--obtaining a stool sample[J]. Nursing times, 2007, 103(44):24-25.

Temel basamaklar aşağıdaki gibidir:

- Ellerinizi defente ediniz, eldiven giyiniz ve dışkı kabını hazırlayınız.
- Örneği spatula ile alabilirsiniz (1 g toplanabilir ve her tüpte ayrı ayrı paketlenabilir) ve 5 mL, 15 mL veya 50 mL santrifüj tüpleri tercih edilmelidir. Topladıktan sonra kapağı sıkıca kapatılmalı ve parafilm ile kapak çevresi sarılmalıdır.
- Tekrarlanan donma ve çözülme için dışkı kabını ve eldivenleri atın ve örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklayın. Eğer dışkı örnekleri çok büyükse veya hemen alınamıyorsa, toplama en fazla 4 saat içinde tamamlanmalıdır.
- Tekrarlanan donma ve çözülme nedeniyle bozulmayı önlemek için örneği birkaç tüpe bölün ve saklayın.

Dışkı ekstraksiyonu için ticari kiti kullanmazsanız, aşağıdaki literatüre bakınız:

Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, et al. Comparative assessment of human and farm animal fecal microorganisms using real-time quantitative PCR. FEMS Microbiology Ecology, 2009.

## 3.5 Su Örnekleri

- Toplanan suyu filtre membranlarından filtreleyin. Su örneklerinin bulanıklığına göre uygun gözenek boyutlarına sahip filtre membranları seçilmelidir. Bulanık sularda askıda ki partikülleri çıkarmak için önce  $0,45\ \mu\text{m}$  gözenek boyutlu bir filtre membranı kullanılmaktadır. Daha sonra tortusuz su örneklerini filtrelemek için küçük gözenek boyutlarına ( $0,22\ \mu\text{m}$ ) sahip filtre membranları seçilmelidir. Mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş bir filtre membranı elde etmek için en az 10 L temiz su işlemlere tabi tutulmalıdır.
- Filtrelemeden sonra, mikrobiyal zenginleştirilmiş filtre membranı 50 mL'lik bir santrifüj tüpüne yerleştirilmelidir (filtre membranının alanı çok büyük olmamalıdır, mikroorganizmalar açısından zengin 3~4 cm çapındaki parçalar halinde olması avantaj sağlayacaktır).

## 3.6 Bakteri Suşu ile Hazırlanan Kültür Örnekleri

- Bakteri örnekleri için, logaritmik büyüme aşamasında bakterilerin toplanması tavsiye edilmektedir.
- Suşlar düşük hızda santrifüj ile toplanabilmektedir. Santrifüj sonrasında süpernatantı uzaklaştırılır. Sonrasında bakteri pelletleri steril suyla veya PBS ile yıkanabilir. 1,5 veya 2 mL ependorf tüplerde saklanabilmektedir. Sızdırmazlık filmi ile kapatın ve  $-8^{\circ}$ 'de saklanabilmektedir.
- Örneklerin donma ve çözülme nedeniyle bozulmayı önlemek için numuneyi birkaç tüpte bölmek ve farklı tüplerde saklamak avantaj sağlayacaktır.

## 3.7 Kan Örnekleri

1. EDTA antikoagülasyon kan toplama tüpleri ile tam kan örnekleri ile çalışılmalıdır (Heparin antikoagülanından kaçınılmalıdır).
2. Kan örnekleri tekrarlanan donma-çözülme döngülerine tabi tutulmamalıdır. Taze kan 4°C'de 12~24 saat süreyle tutulabilir. Ancak donmuş örnekler düşük sıcaklıklarda (-20° ve -80°C) saklanmalıdır.

## 4. RNA Ekstraksiyon Notları

### 4.1 Bitki dokusu Örnekleri

1. Bitkilerin genç kısımları gibi nispeten yüksek nükleik asit içeriğine sahip taze dokuların kullanılması tavsiye edilir.
2. Taze toplanmış bitki örneklerinin RNaz içermeyen su ile hızlı bir şekilde muamele edildikten sonra kurutma işlemi yapılması önerilmektedir.
3. Dokuları küçük parçalara (~100 mg) buz üzerinde bölünmektedir.
4. Örneği sıvı nitrojen ile dondurun ve önceden soğutulmuş RNaz içermeyen 1,5 mL/2.0 mL ependorf tüplerinde saklanmalı veya vidalı kapaklı tüplerde muhafaza edilmelidir.
5. Tüpleri parafilm ile kaplayıp -80°C'de saklanmalıdır.
6. Tekrarlanan donma ve çözülme nedeniyle degradasyonu önlemek için örnekler birkaç tüpte saklanmalıdır.

### 4.2 Hayvan Dokusu Örnekleri

1. RNA ekstraksiyonu için taze toplanmış örneklerin kullanılması tercih edilmelidir. Örnek toplama için yüksek nükleik asit içeriğine sahip dokuların (hayvan karaciğeri veya diğer dokular gibi) seçilmesi önerilmektedir.
2. Canlı hayvanlardan alınan taze doku örneklerinin hemen önceden ısıtılmış RNaz içermeyen su ile durulanması tavsiye edilmektedir. Kanın gibi istenmeyen dokuların (saç ve bağ dokusu gibi) ve diğer kontaminantlar uzaklaştırılmalıdır.
3. Dokuları buz üzerinde hızlıca daha küçük parçalara (50~100 mg) ayrılmalıdır ve sıvı nitrojen kullanarak dondurun. Örneği önceden soğutulmuş RNaz içermeyen 1,5 mL/2,0 mL ependorf tüplerinde veya vidalı kapaklı dondurma tüplerinde saklayın. Tüpleri parafilm ile kapatın ve hemen -80°C'de saklayın.
4. RNA korumasını sağlamak için, canlı bir vücuttan doku çıkarıldıktan sonra bu adımı 3 dakika içinde tamamlamanız önerilmektedir. Tekrarlı donma ve çözülme nedeniyle degradasyonu önlemek için örneği birkaç tüpe bölün ve saklayın.

Not: Ticari bir RNA koruma reaktifi kullanıyorsanız (RNAlater gibi), lütfen bizimle iletişime geçiniz.

## 4.3 Hücreler

1. Hücre süspansiyonları: Alınmış hücreleri PBS (Potassium Buffer Saline) tamponu ile durulamanız gerekmektedir. TRizol reaktifi ekleyin ( $5 \times 10^6$  hücre başına 1 mL). Süspansiyon berraklaşana kadar bariz kümeleri parçalamak için bir şırınga kullanarak hücre süspansiyonunu aspire edin.  $-80^\circ\text{C}$  derin dondurucuda saklayın.
2. Yapışkan hücreler: Yapışkan hücreleri PBS tamponu ile durulayın. TRizol reaktifi ekleyin ( $10\text{cm}^2$  kültür alanı başına 1 mL=6 oyuklu plaka kuyusu=35 mm çapında bir petri kabı). TRizol'ün tüm hücre yüzeyleriyle temas etmesini sağlamak için pipetlemeyi tekrarlayın. Süspansiyonları RNaz içermeyen 1,5 mL veya 2 mL santrifüj tüplerine aktarın. Süspansiyon berraklaşana kadar bariz kümeleri parçalamak için bir şırınga kullanarak hücre süspansiyonunu aspire edin.  $-80^\circ\text{C}$  dondurucuda saklayın.
3. Hücre örneklerini santrifüj tüpüne toplayın ve kültür ortamını çıkarın. Hücre peletlerini PBS tamponu ile durulayın ve süpernatantı santrifüjle çıkarın. Sıvı nitrojen ile hızla dondurun. Lizata gerek yoktur.  $-80^\circ\text{C}$  dondurucuda saklayın.
4. Hücre örnekleri için RNAlater kullanmayın çünkü RNAlater yüksek bir yoğunluğa sahip olduğundan RNAlater reaktiflerini santrifüjle çıkarmak zordur.
5. Tekrarlanan donma ve çözülme nedeniyle degradasyonu önlemek için örnekleri birkaç tüpe bölün ve saklayın.

## 4.4 Bakteri Kültür Örnekleri

1. Bakteri örnekleri için, logaritmik büyüme aşamasında bakterilerin toplanması tavsiye edilir.
2. Suşları düşük hızda santrifüjleyerek toplayın ve süpernatantı atın. Peleti steril su veya PBS tamponu (1~3 kez) ile yıkayın. Örneği önceden soğutulmuş RNaz içermeyen 1,5 mL/2,0 mL EP tüplerinde veya vidalı kapaklı dondurma tüplerinde saklayın. Tüpleri sızdırmazlık filmi ile kapatın ve hemen  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklayın. Tekrarlanan donma ve çözülme nedeniyle degradasyonu önlemek için örnekleri birkaç tüpe bölün ve saklayın.
3. TRizol yöntemi bazı bakterilerden nükleik asit ekstraksiyonunda başarısız olduğundan, TRizol lizat kullanan numunelerin gönderilmemesi önerilir.
4. Kütle yoğunluğu düşük olan örneklerin RNAlater ve diğer dokularda RNA koruma reaktifleri ile saklanması önerilmez. RNAlater'in yoğunluğu biraz yüksek olduğu için ekstraksi-

## 4.5 Kan Örnekleri

1. TRizol yöntemiyle örnek hazırlama
2. 15 mL'lik bir tüpe 6 mL TRizol ve 2 mL taze kan (TRizol: kan=3:1) ekleyin. TRizol'ün tüm hücre yüzeyiyle temas etmesini sağlamak için pipetlemeyi tekrarlayın.
3. Yoğun şekilde çalkalayın ve topak tamamen eriyene kadar örneği bir-iki dakika karıştırın.
4. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.
5. Örneği kriyoviyal (2 mL) içine bölün ve saklayın. Filmle kapatın ve  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklayın.