

Keçi Süt Somatik Hücrelerinden RNA İzolasyonu: Problemler ve Çözüm Önerileri

Hüseyin ÖZKAN¹, Aysel ERASLAN ŞAKAR¹, Akın YAKAN^{2*}

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

Geliş Tarihi: 17.05.2016

Kabul Tarihi: 20.06.2016

Özet: Süt, memelilerde besleyici bir sıvı olmanın yanında meme bezinin fizyolojisi ve biyolojisi hakkında önemli fikirler verebilen, verim, kalite ve sağlık durumunun değerlendirilebilmesi için önemli potansiyele sahip biyolojik bir kaynaktır. Sütte bulunan somatik hücreler, meme bezindeki moleküler aktivitenin biyopsi girişimlerine gerek kalmadan izlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte sütün ve sütte bulunan somatik hücrelerin elde edilme yöntemi gen ekspresyon çalışmaları gibi moleküler mekanizmalar üzerine yapılan çalışmaların kalitesini etkilemektedir. Keçi sütünün kompozisyonu (yağ, protein vb.) ve ml'deki somatik hücre sayısı gen ekspresyonu çalışmaları için gerekli RNA izolasyonu bakımından dikkat edilmesi gereken faktörlerdir. Sağlıklı olduğu kabul edilen sütteki somatik hücre sayısı geniş bir aralığa sahiptir. Çalışma materyalini oluşturan hayvanlardan izolasyon için gerekli optimum süt miktarının belirlenmesi çok önemlidir. Zira çalışılacak sütün miktarı, RNA izolasyonu için hem elde edilebilecek hücre pelletinde hem de sütün RNA izolasyonu aşamasına kadar nükleazlara maruz kalmadan tutulabilmesinde temel unsurdur. Bu notta keçi süt somatik hücrelerinden yapılacak total RNA izolasyonunun optimizasyonu için önemli olduğu düşünülen bazı noktalara değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hücre pelleti, Keçi sütü, Somatik hücre, RNA izolasyonu

RNA Isolation from Goat Milk Somatic Cells: Problems and Solutions

Abstract: Milk is an important biological source with to be a nutritional liquid which could give important ideas about mammary glands physiology and biology, has a potential about investigation of milk yield, quality and health at molecular levels. Milk somatic cells give possibility of examination the molecular activity of mammary gland without biopsy. However, milk and milk somatic cell's isolation method affect the quality of study which are made for molecular mechanisms studies like gene expression study. The composition of goat milk (lipid, protein etc.) and cell count in per ml are important factors for RNA isolation on gene expression studies. Somatic cell score has a wide range in healthy milk. It is very important the determination of milk quantity which require for cell isolation in the experiments. Because, milk quantity is the main factor for RNA isolation which require either cell pellet determination or stability of milk until the RNA isolation step. In this note, some points for optimization of total RNA isolation from goat milk somatic cells are mentioned.

Keywords: Goat milk, Somatic cell, RNA isolation, Cell pellet

Giriş

Memelilerde, doğum ile birlikte yavrunun yaşaması için gerekli besin maddelerinin karşılanması amacıyla meme bezlerinden süt salgılanır. Biyolojik bir sıvı olan sütün bileşimi, türler arasında bazı benzerlikler göstermekle birlikte mevsim ve besleme gibi çeşitli faktörler sonucunda aynı bireyde bile farklılıklar gösterebilmektedir (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999). Süt, epitel hücreler ile lökositlerden oluşan ve somatik hücreler olarak adlandırılan hücreler içerir. Sütte bulunan somatik hücre sayısı, meme dokusunun sağlığı ve sütün kalitesi hakkında fikir verir. Bununla birlikte süt somatik hücrelerinden izole edilen total RNA ile meme bezindeki gen ekspresyonu hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Sarıkaya, 2006). Meme bezinde gen ekspresyonu çalışmaları çoğunlukla meme bezinden biyopsi alınarak yapılmaktadır. Ancak meme bezinde yangı ve enfeksiyon oluşma ihtimali canlı sağlığı için risk oluşturmakta ve tekrarlı

çalışmalar için engelleyici olmaktadır. Biyopsi uygulamalarındaki zorlukların (ensizyon, anestezi, doku parçasının alımı vb.) yanı sıra tekrarlı çalışmalarda meme bezindeki biyolojik aktivitenin tam olarak anlaşılması güçleşmektedir (Boutinaud ve ark., 2015). Hayvan yetiştiriciliğinin yapıldığı özel işletmelerde yetiştiricinin hayvan üzerinde biyopsi uygulamalarına her zaman onay vermek istememesi de karşılaşılan başka bir problemidir. Süt, biyopsi işlemi gereksiz memelilerde verim, kalite, mastitis direnci gibi kriterlerin mRNA düzeyinde incelenmesi için önemli bir biyolojik kaynak olarak değerlendirilebilmektedir (Boutinaud ve ark., 2002).

Sığır, koyun ve keçilerin süt komponentleri farklılık göstermektedir (Tablo 1). Hayvan türlerine göre süttten hücre pelleti oluşturmada, yüksek yağ ve yüksek protein (kazein) oranları önemli problemlere sebep olmaktadır. Laktasyondaki sağlıklı bir sığır için 200.000 hücre/ml ve daha az sayıdaki süt

somatik hücre sayısı normal kabul edilirken, sağlıklı bir keçinin süt somatik hücre sayısı $50-1000 \times 10^3$ hücre/ml olarak kabul edilmektedir (Boutinaud ve ark., 2002). Somatik hücre sayısının keçilerde bu kadar geniş aralıkta bulunması gen ekspresyonu gibi moleküler çalışmalar için süttten yeterli miktarda hücre izole etmede, çalışılacak süt hacminin önemli

olduğunu göstermektedir. Ayrıca laktasyon boyunca keçilerde günlük süt verimindeki değişim göz önünde bulundurulduğunda uygun olan RNA izolasyonunu yapabilmek için yeterli seviyedeki en az süt hacminin belirlenmesi gerekmektedir (Boutinaud ve ark., 2015).

Tablo 1. Bazı Ruminantlara ait süt komponentleri oranları (Digraşkar ve Awaz, 2009; Paape ve ark., 2006; Raynal-Ljutovac ve ark., 2014; Yıldırım, 2013).

Özellik	Keçi	Koyun	İnek	Manda
Kazein (%)	2.4	4.2	2.6	3.7
Protein (%)	3.4	6.2	3.2	4.4
Yağ (%)	3.8	7.9	3.6	7.4
Kuru Madde (Yağ hariç) (%)	8.9	12	9	10.1
Somatik Hücre Sayısı	$<10^6$ /ml	$<10^6$ /ml	$<2 \times 10^5$ /ml	$<2.5 \times 10^5$ /ml

Sütün RNase aktivitesinin yüksek olduğu ve bu yüzden de süt somatik hücrelerinden izole edilecek RNA'nın degrade olmaya yatkın olduğu bildirilmektedir (Boutinaud ve ark., 2015). Ayrıca organizmadan alınan biyolojik materyal üzerinde çalışılma süresinin de RNA kalitesi bakımından önemli olduğu bilinmektedir (Mura ve ark., 2013). Yapılan literatür taramalarında, süttten RNA izolasyonu yapmak için gereken somatik hücrelerin 150 ml, 300 ml ve 500 ml gibi yüksek miktarlarda süttten elde edildiği görülmüştür (Boutinaud ve ark., 2002; Mura ve ark., 2013). Süt veriminin hayvanlarda türe ve mevsime bağlı olarak gösterdiği değişim göz önünde bulundurulduğunda hacim olarak daha az miktarda süt ile çalışmak zaman zaman zorunluluk haline gelmektedir.

Materyal ve Metot

Süttten RNA izolasyonu yapılarak bazı genlerin ekspresyon seviyelerinin tespit edilmesi istendiğinde süt somatik hücrelerinin toplanması aşamasında bazı sorunlarla karşılaşıldığı görülmüştür. Bu sorunların en önemlileri;

1. Yeterli miktarda hücre pelleti oluşturulamaması
2. Oluşturulan hücre pelletinden kazeinin uzaklaştırılamaması
3. Oluşturulan hücre pelletinde uygun sonikasyon yapılamaması

Hücre pelleti oluşturmada, birçok literatürde bildirildiği gibi (Boutinaud ve ark., 2002; Boutinaud ve ark., 2015; Mura ve ark., 2013; Sarıkaya, 2006) santrifüj ile fiziksel olarak hücrelerin tüpün dibinde toplanması amaçlanmıştır. Santrifüj hızı arttıkça hücrelerin tüpün dibinde daha çok toplanması beklenirken, bu durumun santrifüj hızı ile orantılı olmadığı tespit edilmiştir. 3044, 2000, 1800 ve 1500 g'de 10, 15 ve 20 dk süreli santrifüjler yapılarak en uygun hücre pelleti oluşturma yöntemi tespit edilmiştir.

Hücre pelleti oluşturma aşamasında bazı falkonların diplerinde pellet içerisinde kazein misellerinin sebep olduğu çamur kıvamında bir kirlilik oluşmaktadır. Bu durumun önüne geçilmeden RNA izolasyonu yapılan örneklerin RNA saflık ve konsantrasyonları kabul edilebilir düzeylerde bulunamamıştır (A260/280 oranı < 1.7). Ayrıca jel elektroforezinde bant bütünlükleri tespit edilememiştir. Bu sorun, hücre pelleti oluşturma aşamasındaki PBS yıkamalarına EDTA ilave edilmesi ile aşılmaya çalışılmıştır. EDTA kazein misellerinin bir araya gelerek çökelti oluşturmalarını engelleyebilmektedir. Hücre pelleti oluşturulduktan sonra total RNA izolasyonu için hücre pelleti üzerine TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA) ilavesi ile birlikte somatik hücrelerin tamamen parçalanarak total RNA'nın açığa çıkmasını sağlamak amacıyla hücre + TRI Reagent süspansiyonunu sonike etmek gerekmektedir. Yeterli süre ya da şiddette yapılamayan sonikasyon ya hücrelerin yeterince parçalanamayıp RNA'ların serbestleşmesini engellemekte ya da çok şiddetli sonikasyona bağlı olarak RNA'da kırılmalarla sebep olmaktadır. %30-35, %60-70 ya da %100 kapasite ile 30 sn sürekli ya da 10 sn aralıklarla 10 sn süreli 3 siklus sonikasyon işlemleri yapılarak en uygun sonikasyon yöntemi tespit edilmeye çalışılmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Yapılan denemeler, keçi süt somatik hücrelerinde gen ekspresyonu için gereken uygun kalitedeki RNA'nın 100 ml'lik süt örneklerinden +4 C'de 1800 g'de 15 dk santrifüj ile elde edilen hücre pelletlerinden yapılabileceğini göstermiştir. Santrifüj hızının çok yüksek olması santrifüj esnasında süttteki hücrelerin büyük bir kısmının falkonun üst kısmında biriken krema tabakasına geçtiğini göstermektedir. Santrifüj hızı düşük (1500 g) tutulan örneklerde ise RNA izolasyonu için yeterli hücre pelletinin

oluşmadığı gözlenmiştir. Ayrıca 10, 15 ve 20 dk tutulan santrifüj süreleri sonunda elde edilen pelletler incelendiğinde, 15 dk ve 20 dk santrifüj edilen örneklerin diplerindeki pellet büyüklüğünde ve RNA miktarında önemli bir fark bulunmadığı bununla birlikte 10 dk santrifüj edilen örneklerle göre daha büyük hacimde pellet oluştuğu gözlenmiştir. Pellet oluşturma işleminin ilk iki yıkamada 0,5 mM'lık EDTA'lı PBS ve son yıkamada ise normal PBS kullanılması arzu edilen RNA kalitesi için uygun izolasyon yapılabileceğini göstermiştir. Uygun hücre pelleti oluşturulduktan sonra %30-35 kapasitede 10 sn aralıklı ve 10 sn sürekli 3 siklus sonikasyon yapılması hücre zarını yeterince parçalamakta ve RNA yapısına da zarar verilmemektedir. Sonikasyon işleminin buz altında yapılması hücre + TRI Reagent süspansiyonunun ısınmasını engelleyerek RNA yıkımlanmasının önüne geçilmesine katkı sağlamaktadır.

Sonuç olarak, süttten RNA izolasyonu yapılmak istendiğinde 100 ml süttten 1800 g'de 15 dk 3 tekrar yapılacak santrifüj ve ilk iki yıkamada PBS'e 0.5 mM'lık EDTA ilave edilmesi en uygun hücre peletini oluşturabilecek, ardından yapılacak sonikasyon işleminin buz altında %30-35 kapasitede 10 sn süre ile 10 sn aralıklı 3 siklus şeklinde uygulanması yeterli olabilecektir.

Kaynaklar

- Akçapınar H, Özbeyaz C, 1999: Hayvan yetiştiriciliği temel bilgileri. ISBN: 975-96978-0-7, Kariyer Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Boutinaud M, Herve L, Lollivier V, 2015: Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Frontiers in Genetics*, 6.

- Boutinaud M, Rulquin H, Keisler DH, Djiane J, Jammes H, 2002: Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *Journal of Animal Science*, 80(5), 1258-1269.
- Digraskar SU, Awaz KB, 2009: Evaluation of buffalo milk with reference to somatic cell count and antitrypsin. *Veterinary World*, 2(7), 267-268.
- Jiménez-Granado R, Sánchez-Rodríguez M, Arce C, Rodríguez-Estévez V, 2014: Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1), 133-150.
- Mura MC, Daga C, Bodano S, Paludo M, Luridiana S, Pazzola M, & Carcangiu V, 2013: Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. *Molecular Biology Reports*, 40(3), 2169-2173.
- Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A, Miller RH, 2007: Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68(1), 114-125.
- Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y, 2008: Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1), 57-72.
- Sarıkaya H, 2006: Somatic cell populations in milk: Importance in mammary gland physiology and behaviour during technological processing. Doctor dissertation. Technical University, Munich.
- Yıldırım S, 2014: Farklı Orijinden Sütlerin Rennetlenme Kinetiklerinin Yüzey Hidrofobisitesi Yaklaşımıyla İncelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

***Yazışma Adresi:** Akın Yakan
Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Zootehni Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.
e-mail: yakanakin@hotmail.com