

EMRE AVCI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ FARKLI DNA
İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK
İNCELENMESİ**

EMRE AVCI

**DANIŞMAN
PROF. DR. MÜGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ FARKLI DNA
İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK
İNCELENMESİ**

EMRE AVCI

**DANIŞMAN
PROF. DR. MÜGE SAYITOĞLU**

**İKİNCİ DANIŞMAN
DR. DİLEK SEVER KAYA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığı süresince sabrı ve destekleyici tutumuyla her zaman yanımda olan danışman hocam sayın Prof.Dr. Müge Sayitoğlu'na yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

İkinci danışmanın olan değerli Dr. Dilek Sever Kaya'ya öğrencisi olduğum ilk günden beri ilgi ve sabırla yaklaştığı, bildiği her şey aktarmaya çalıştığı, kendisini ara ara bezdirsem de en zor koşullarda bile vazgeçmeyip benim için en iyisini istediği, ailesinden biri gibi beni desteklediği için sonsuz teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Merve Ordu ve Merve Sarıtaşa'a her zaman yanımda oldukları, desteklerini hissettirdikleri, sorunlarımı kendi sorunları gibi gördükleri hatta benim bile soru sormaktan bunaldığım zamanlarda bıkmadan usanmadan sabırla yanımda durdukları için çok teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşım Melisa Gümrükçü, manevi desteğini her zaman yanımda hissettirdiğin, ekipçe bizi hep güldürdüğün, her seferinde yardıma ihtiyacım olduğunda fedakârca kendi işlerini bırakıp benim işlerime koşturduğun için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansın bana kazandırdığı yakın arkadaşlarım Buneyan Tüzün, Betül Zorkaya ve Hülya Aydın'ya yardımları, destekleri ve etkinliklerimiz için teşekkür ederim.

Son olarak daima arkamda olan ve beni destekleyen ailem; Yunus Avcı, Mehtap Avcı, Cemre Avcı, Zübeyde Avcı ve en yakın arkadaşım Orhan Sadi'ye sonsuz teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduğunuzu hissetmek bana güç verdi.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikrobiyota.....	3
2.1.1. Mikrobiyotanın Oluşumu, Gelişimi ve Önemi	3
2.2. İBM Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	5
2.3. 16S rRNA Amplikon Dizileme Çalışmalarında Kullanılan Bakteriyel Genomik DNA İzolasyon Yaklaşımları.....	6
2.3.1. Hücre Lizisi.....	7
2.3.1.1. Enzimatik Lizis	7
2.3.1.2. Deterjan Türevi Maddelerle Lizis	7
2.3.1.3. Mekanik (fiziksel) Etkiyle Hücre Lizisi.....	8
2.3.2. Organik Çözücülerle İzolasyon.....	8
2.3.2.1. FK DNA İzolasyon Yöntemi	8
2.3.3. Alkol Çöktürmesi İle DNA Eldesi	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. GEREÇ	11
3.1.1. Gönüllü Seçimi	11
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	12
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	12
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar	13
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Tampon, Çözelti ve Solüsyonlar	13
3.2. YÖNTEM	15

3.2.1. Örneklerin Toplanması	15
3.2.2. Örneklerin Homojenizasyonu	15
3.2.3. Bakteriyel Genomik DNA İzolasyonu.....	16
3.2.3.1. FK DNA İzolasyon Yöntemi	17
3.2.3.2. QIAamp Powerfecal DNA Kit	18
3.2.3.3. ZymoBIOMICS Miniprep Kit.....	19
3.2.4. 16S rRNA Amplikon Dizileme.....	21
3.2.4.1. Amplikon PZR ve PZR Saflaştırma	21
3.2.4.2. İndeks PZR ve PZR Saflaştırma	22
3.2.4.3. Yeni Nesil Amplikon Dizileme ve İnfomatik Analizler	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Örneklerin Toplanması ve Homozjenizasyonu.....	25
4.2. Bakteriyel Genomik DNA İzolasyonu	25
4.2.1. FK DNA İzolasyon Sonuçları	25
4.2.2. QIAamp Powerfecal DNA Kit DNA İzolasyon Sonuçları	27
4.2.3. ZymoBIOMICS Miniprep Kit DNA İzolasyon Sonuçları.....	28
4.3. 16S rRNA Amplikon Dizileme Sonuçları	30
4.3.1. Amplikon PZR ve PZR Saflaştırma Sonuçları	30
4.3.2. İndeks PZR ve PZR Saflaştırma Sonuçları	31
4.3.3. 16S rRNA Amplikon Dizileme Sonuçları	32
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	45
HAM VERİLER	52
FORMLAR	53
PATENT HAKKI İZNİ	54
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	55

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Gönüllülerin demografik özellikleri	12
Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar	12
Tablo 3: Çalışmada kullanılan kitler	12
Tablo 4: Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar	13
Tablo 5: Gönüllü örneklerinin homojenizasyon koşulları	16
Tablo 6: Amplikon PZR karışımı	22
Tablo 7: Amplikon PZR koşulu	22
Tablo 8: PZR saflaştırma aşamasında her örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları	22
Tablo 9: İndeks PZR karışımı	23
Tablo 10: İndeks PZR koşulu	23
Tablo 11: PZR saflaştırma aşamasında her örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları	23
Tablo 12: FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri	25
Tablo 13: QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri	27
Tablo 14: ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri	28
Tablo 15: 16S rRNA Amplikon Dizileme Okuma Sayıları	32
Tablo 16: 16S rRNA amplikon dizilemede elde edilen ve beklenen kalite kontrol skorları	33
Tablo 17: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde incelenmesi	34
Tablo 18: Bu çalışmanın literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılması	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İBM'yi etkileyen faktörler.....	4
Şekil 2: Disbiyotik mikrobiyota ile sağlıklı mikrobiyota yapısının karşılaştırılması.....	4
Şekil 3: 16S rRNA geni.....	6
Şekil 4: Fenolün kimyasal yapısı.....	8
Şekil 5: FK ile yapılan organik izolasyon.....	9
Şekil 6: Çalışmanın iş akış şeması.....	15
Şekil 7: Gönüllü örneklerinin üç farklı DNA izolasyon yöntemi için gerçekleştirilen triplike çalışmaların şematik gösterimi ve örnek kodları.....	16
Şekil 8: FK DNA izolasyon yönteminin şematik gösterimi.....	18
Şekil 9: QIAamp PowerFecal DNA Kit protokolünün şematik gösterimi.....	19
Şekil 10: ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit protokolünün şematik gösterimi.....	20
Şekil 11: 16S rRNA geninde çalışılan bölge ve kullanılan primerler.....	21
Şekil 12: G1.F3 kodlu örneğin FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü.....	26
Şekil 13: FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	26
Şekil 14: G1.Q3 kodlu örneğin QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü.....	27
Şekil 15 : QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 16 : G1.Z1 kodlu örneğin ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü.....	29
Şekil 17: ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	29
Şekil 18: Amplikon PZR agaroz jel görüntüsü.....	30
Şekil 19: Amplikon PZR saflaştırma görüntüsü.....	31
Şekil 20: İndeks PZR agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 21: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde incelenmesi..	35
Şekil 22: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde farklı DNA izolasyon kitleriyle karşılaştırılması.....	35
Şekil 23: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının farklı DNA izolasyon yöntemlerinde filum seviyesinde gönüllüler arası farklarının incelenmesi.....	36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

İBM: İnsan bağırsak mikrobiyotası
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
FISH: Floresan in situ hibridizasyon
QPCR: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
HTS: Yüksek girdili çıktı dizileme
CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
SDS: Sodium dodecyl sulfate
FKİ: Fenol kloroform izoamil alkol
TAE: Tris-acetate-EDTA
VKİ: Vücut kitle indeksi
FK: Fenol-Kloroform
bp: Baz çifti
M: Molar
ml: Mililitre
g: Gram
mM: Milimolar
C: Santigrat
µl: Mikrolitre
°: Derece
%: Yüzde

ÖZET

Avcı, E. (2022). İNSAN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ FARKLI DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2022

İnsan mikrobiyotası en yoğun olarak bağırsakta bulunur. İnsan bağırsak mikrobiyotasının (İBM) homeostatik yapısının insan sağlığını olumsuz etkileyebilecek yönde değişimi bağırsak disbiyozisi olarak adlandırılır. Çalışmalarda son yıllarda yeni nesil dizileme (YND) yöntemleri, özellikle 16S rRNA amplikon dizileme hassas, düşük maliyetli ve yüksek çıktıli veri sunmasıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında gönüllülerden (n=3) alınan dışkı örneklerinden üç farklı (Fenol-Kloroform, QIAamp Powerfecal DNA Kit, ZymoBIOMICS Miniprep Kit) yöntem ile bakteriyel genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilip ürünlerinin 16S rRNA geni V3-V4 bölgeleri PZR işlemi ile çoğaltılarak Illumina Miseq cihazında dizilendi. 16S amplikon dizileme sonucunda ortalama 83.633 okuma başarısı sağlandı. Ancak taksonomik olarak sınıflandırılabilen ortalama okuma sayısı ise 40.603 olarak belirlendi ve bu okuma derinliğinde elde edilen en anlamlı veri filum düzeyinde gerçekleştirildi. En kapsamlı veri filtreli ticari kitlerle Qiagen (7 filum) ve Zymo (6 filum) elde edilen örnekler ile sağlanmıştır. Fenol klorofom (5 filum) ile elde edilen DNA miktarları çok olmasına rağmen bakteri temsiliyeti bakımından filtreli kitlelere göre daha başarısız olduğu görüldü. Örnekler arası karşılaştırmalarda Bacteroidetes filumunun tespitinin filtreli (Qiagen) izolasyonlarda daha etkin olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre bakteriyel genomik DNA izolasyon yönteminin bakterilerin tümünün DNA izolasyonunu gerçekleştirmedeki başarısı, biyolojik parametrelerden bağımsız olarak doğrudan mikrobiyal kompozisyonu etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: İnsan bağırsak mikrobiyotası, 16S rRNA, DNA izolasyonu, Amplikon dizileme, Bacteroidetes

ABSTRACT

Avci, E. (2022). INVESTIGATION OF HUMAN GUT MICROBIOTA USING DIFFERENT DNA ISOLATION METHODS İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics D. Mater Thesis. İstanbul. 2022

The human microbiota is most dense in the gut. The change in the homeostatic structure of the human gut microbiota in a way that may adversely affect human health is called intestinal dysbiosis. In recent years, next-generation sequencing methods, especially 16S rRNA amplicon sequencing, have been widely used in studies because they provide sensitive, low-cost and high-throughput data. In this thesis study, bacterial genomic DNA isolations were performed from stool samples taken from volunteers(n=3) with three different methods(Phenol-Chloroform, QIAamp Powerfecal DNA Kit, ZymoBIOMICS Miniprep Kit) and 16S rRNA gene V3-V4 regions of their products were amplified by PCR and analyzed in Illumina Miseq device. As a result of 16S amplicon sequencing, an average of 83,633 read successes was achieved. However, the average number of taxonomically classified reads was determined as 40,603, and the most meaningful data obtained at this reading depth was performed at the phylum level. The most comprehensive data is provided with samples obtained from commercial kits with filters, Qiagen(7 phyla) and Zymo(6 phyla). Although the amount of DNA obtained with Phenol-Chloroform(5 phyla) was high, it was seen that it was more unsuccessful in terms of bacterial representation compared to the filter kits. In the comparisons between samples, it was observed that the detection of the Bacteroidetes phylum was more effective in filtered(Qiagen) isolations.

According to the results of this study, the success of bacterial genomic DNA isolation method in performing DNA isolation of all bacteria directly affects the microbial composition regardless of biological parameters.

Keywords: Human Gut Microbiota, 16S rRNA, Amplicon sequencing, DNA isolation, Bacteroidetes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücudu trilyonlarca mikroorganizmayı barındıran bir ekosistemdir [1]. Bakteriler, arkealar, viruslar, parazitler ve bazı tek hücreli ökaryotlardan oluşup özel bir çevrede yaşayan bu topluluklar mikrobiyota olarak adlandırılır [2, 3]. İnsan vücudunun üzerinde veya içerisinde yaşayan mikrobiyal topluluklara insan mikrobiyotası denir [2]. Ağız, deri, solunum yolları, ürogenital sistem ve bağırsak gibi insan vücudunun farklı bölgelerinde bulunan mikrobiyal topluluklar içinde en büyük ve kompleks mikro-ekosistem bağırsakta bulunur ve İnsan Bağırsak Mikrobiyotası (İBM) olarak adlandırılır [1, 2, 3, 4].

İBM'nin insan fizyolojisinde amino asitler, vitaminler ve kısa zincirli yağ asitleri gibi pek çok metabolitin sentezlenmesi, safra tuzlarının metabolize edilmesi, toksinlerin elimine edilmesi, patojenlerin aşırı çoğalmasını önlemek gibi oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. İBM dinamik bir yapıdadır ve konağın coğrafik lokasyonu, genetik alt yapısı, kültürel alışkanlıkları, diyet, stres, vücut kitle indeksi, egzersiz sıklığı, yaşı ve yaşam tarzı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. İBM'nin kendi içindeki dengeli yapısının kötü beslenme, ilaç kullanımı, stres gibi faktörlerle bozulması sonucu gelişen disbiyozis İBM yapısındaki patojen türlerin artmasına ve insan sağlığı için yararlı türlerin azalmasına neden olabilmektedir. Bu durumun diyabet, huzursuz bağırsak sendromu, kolorektal kanser, obezite, tip 2 diyabet, alerji, astım, hepatik ensefalopati, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi İBM ile ilişkili olduğu düşünülen hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu hastalıkların bağırsak disbiyozisinin gelişimine neden olabileceği yönünde de görüşler bulunmaktadır [5, 6, 7].

İBM'nin insan sağlığı üzerindeki etkileri ve sağlıklı yaşam için önemi yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmakta ve bu alandaki çalışmaların sayısı artmaktadır. Sağlıklı İBM kompozisyon yapısının tanımlanması İBM-hastalık ilişkisi açısından oldukça önemlidir. Ancak henüz sağlıklı mikrobiyota kavramı netleştirilememiştir ve bu alanda yapılacak çok sayıda çalışmaya ve veriye ihtiyaç duyulmaktadır. İBM kompozisyonunun taksonomik çalışmalarında 16S rRNA amplikon dizileme yöntemi, çok sayıda örnekten binlerce dizinin aynı anda çalışılabilmesi, kültürden bağımsız bir teknoloji olması, hızlı sonuç vermesi, hassas ve düşük maliyetli olmasıyla en çok tercih

edilen yöntemdir. Bu yöntemin en kritik aşamalarından biri dizileme sonuçlarına doğrudan etkisi olan DNA izolasyon aşamasıdır. İnsan dışkısından bakteriyel genomik DNA izolasyonu bireyin tüketmiş olduğu gıdaların genetik materyali, insan DNA'sı, ve PZR reaksiyonlarını inhibe eden kompleks polisakkaritler, bitki ve sebze kökenli klorofil, safra tuzları, üre, glikolipidler, hemogloblin ve heparin gibi inhibitörler içerdiğinden hedeflenen DNA materyalinin amplikon dizileme analizleri için gerekli miktarda ve saflıkta elde edilmesi güçtür [8]. Dışkıda bulunan çeşitli PZR inhibitörleri ve bakterilerin hücre yapılarındaki farklılıklar nedeniyle DNA izolasyon yönteminin hem inhibitörleri ortamdan uzaklaştırabilmesi hem de tüm bakterilerin DNA izolasyonu için uygun olması gerekir [9]. Seçilmiş olan DNA izolasyon yöntemi dizileme çıktıları üzerinde olumsuz etkilere ve dolayısıyla mikrobiyal çeşitliliğin hatalı temsiline neden olabilir. DNA izolasyon yönteminin amplikon dizileme çıktılarına etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda DNA izolasyon yöntemi seçiminin analiz sonucunu etkilediği görülmüştür [10]. Örneğin bir çalışmada 9 farklı DNA izolasyon yönteminin amplikon dizileme sonucuna etkisi araştırılmış ve yöntemlerin DNA miktar ve saflıklarını etkilediği görülmüş, analiz çıktısında farklı yöntemlerin gram pozitif bakterileri daha yoğun izole edebildikleri görülmüştür [11]. DNA izolasyon yöntemi seçimi oldukça önemlidir ve amplikon dizileme analizlerinin çıktıları doğrudan etkilemektedir. Literatürde birçok çalışma metagenomik çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılabilir olması için aynı DNA izolasyon yönteminin kullanılmasını tavsiye etmekte ve başarılı bir amplikon dizileme çalışması gerçekleştirebilmek için DNA izolasyon yönteminin anahtar rol oynadığını belirtmektedir [10, 12].

Bu tez projesinde sağlıklı gönüllülerden toplanan dışkı örneklerinden iki farklı DNA izolasyon kiti ve Fenol-kloroform (FK) DNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların etkinliklerinin 16S rRNA amplikon dizileme yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

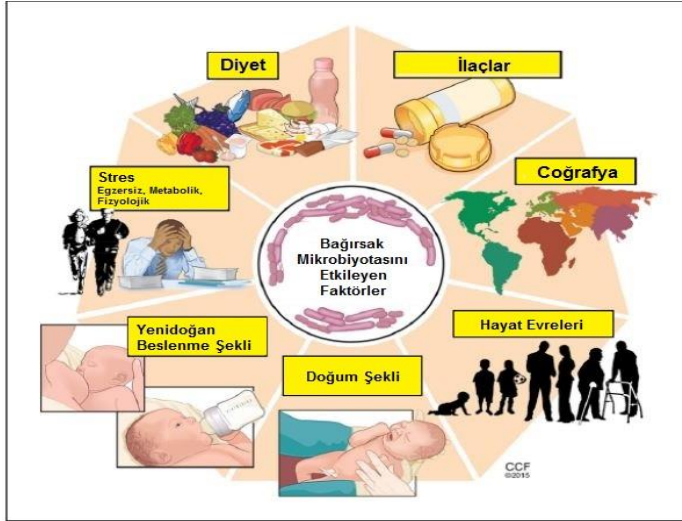
2.1. Mikrobiyota

Mikrobiyota terimi ilk kez insan vücudundaki mikroorganizmaların sağlık açısından önemini vurgulayan Lederberg ve McCray tarafından tanımlanmıştır [13]. Mikrobiyota, arkeler, bakteriler, viruslar ve bazı tek hücreli ökaryotlardan oluşan ve özel bir çevrede yaşayan mikoroorganizma topluluklarına verilen isimdir [2]. Mikrobiyotaya ait genetik materyalin toplamına mikrobiyom adı verilmektedir [3]. İnsan vücudunun üzerinde ve içerisinde yaşayan mikroorganizmalara insan mikrobiyotası denir [14]. İnsan Mikrobiyotası, ağız, deri, solunum yolları, ürogenital sistem ve bağırsakta bulunmakla birlikte en yoğun olarak bağırsakta bulunur ve baskın olan grup bakterilerdir [2, 3]. Gastrointestinal sistem gerek besin bolluğu gerekse yapısı bakımından mikrobiyal kolonizasyon için oldukça uygundur [15]. Enerji regülasyonu, kısa zincirli yağ asidi üretimi, vitamin sentezi, patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı bağırsağı koruma, immün sistemin modülasyonu gibi işlevleri bulunan İBM'nin bir organ işlevi gördüğü yönünde görüşler bulunmaktadır. Literatürde farklı sonuçlar olmakla birlikte İBM'de Bacterioidetes ve Firmicutes filumları bakteriyel kompozisyonun yaklaşık %90'nını oluşturmaktadır. Bu iki filuma eşlik eden diğer filumlar genellikle Actinobacteria, Proteobacteria ve Verrucomicrobia'dır [5, 14, 16].

2.1.1. Mikrobiyotanın Oluşumu, Gelişimi ve Önemi

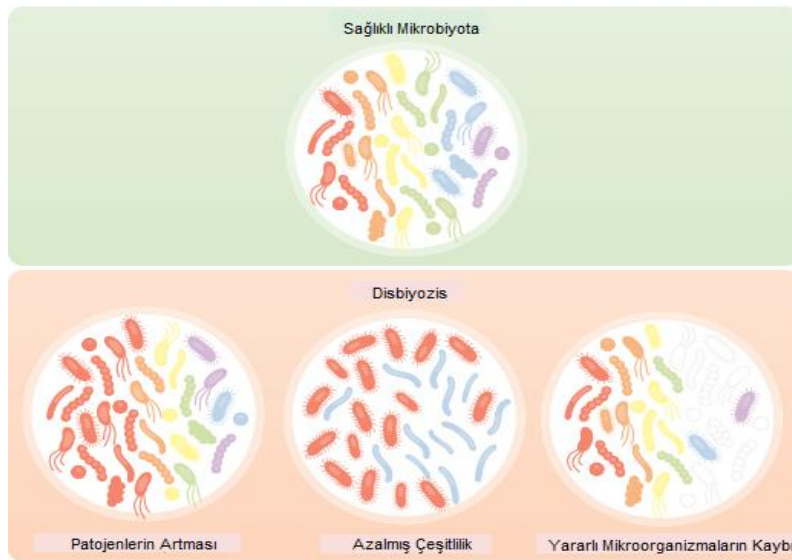
Geçmiş yıllarda bebeklerin steril doğduğu ve doğum anından itibaren mikrobiyota oluşumunun başladığı düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar gösterdi ki mikrobiyota oluşumu anne karnında başlar ve yenidoğan 2-3 yaşına geldiğinde mikrobiyotası yetişkin bir insanın mikrobiyotasına benzer hale gelir [2].

İBM'nin oluşumu ve gelişiminde bireyin doğum şekli, anne sütü genetik altyapı gibi faktörler önemlidir. Bununla birlikte mikrobiyota oldukça dinamik ve kompleks bir yapıdır ve çevresel koşullardan etkilenir. İBM kompozisyonunu etkileyen faktörler arasında yaş, coğrafya, kültürel alışkanlıklar, beslenme alışkanlıkları, stres, vücut kitle indeksi, egzersiz sıklığı bulunmaktadır (Şekil 1) [5, 7].



Şekil 1: İBM'yi etkileyen faktörler [7].

İBM her ne kadar çevresel koşullardan etkilense de kendi içinde bir denge içindedir. Bu denge bozulduğunda, mikrobiyal kompozisyon ve aktiviteler insan sağlığı için zararlı olabilecek duruma gelir ve disbiyoz olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. (Şekil 2) [17]. Disbiyozisin ortaya çıkmasında kötü beslenme, stres, antibiyotik kullanımı gibi faktörler rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda diyabet, huzursuz bağırsak sendromu, kolorektal kanser, obezite, tip 2 diyabet, alerji, astım, hepatik ensefalopati, inflamatuvar bağırsak hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık ile disbiyozis ilişkilendirilmiştir [5, 19, 20].



Şekil 2: Disbiyotik mikrobiyota ile sağlıklı mikrobiyota yapısının karşılaştırılması [18].

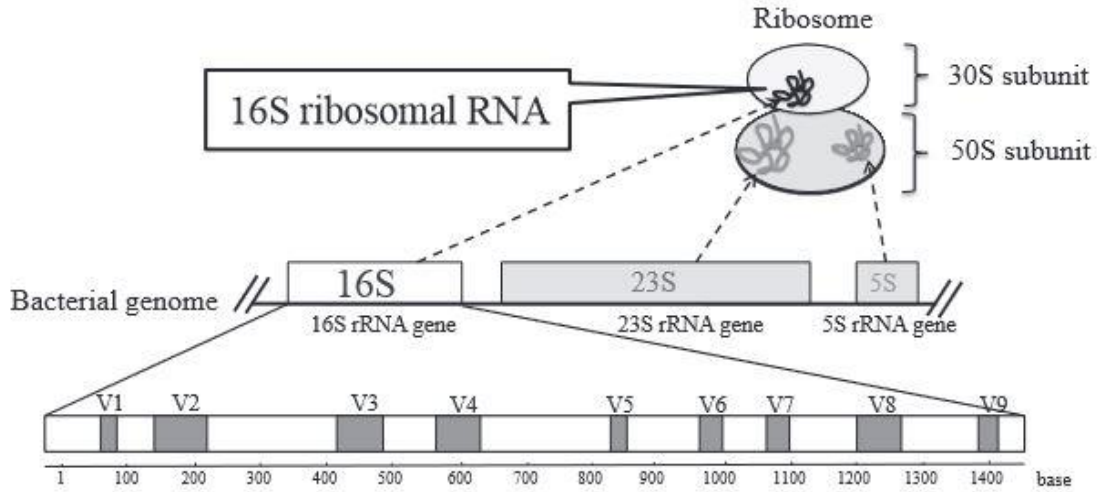
2.2. İBM Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

İBM kompozisyonunun tanımlanmasında kültür ve morfoloji temelli geleneksel yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Kültür yönteminin temel sınırlaması İBM mikroorganizmalarının önemli bir kısmının kültür koşullarında çoğaltılamıyor olmasıdır. Moleküler yöntemlerden moleküler fingerprinting (DGGE, TGGE, T-RFLP) bakteriyel kompozisyonun değişiminin saptanmasında etkilidir. Bu yöntemlerde taksonomik sınıflandırma yapılamamakta ve bant çakışması nedeniyle kompleks toplulukların yoğunluğu doğru tespit edilemeyebilmektedir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminde ise spesifik bir organizma grubunun tespiti için floresan işaretleyici ile etiketlenmiş kısa DNA parçaları (oligonükleotidler) kullanılır. Bu yöntemin sınırlaması belirli bakteri türleri ve grupları için tasarlandığından tüm kompozisyonun analizinde yeterli olmamasıdır. Mikroarray ise farklı taksonlardaki belirli bakteri gruplarını hedefleyen oligonükleotidlerden oluşur. Ancak bu yöntem yalnızca plaketeki taksonları analiz edebildiğinden organizma bolluğunu hatalı tespit edebilir. qPCR yöntemi genel olarak belirli organizma gruplarının saptanmasında kullanılır. Yöntemin en büyük sınırlaması her bir bakteri taksonu için farklı primer setleri gerektiriyor olmasıdır [2, 3, 21]. Moleküler yöntemler içerisinde HTS (high-throughput sequencing - yüksek girdi-çıktılı dizileme) yöntemlerinin son yıllardaki gelişmesi insan mikrobiyomunun etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağladı [22, 23]. Amplikon dizileme mikrobiyota kompozisyonunun tanımlanmasında en yaygın kullanılan HTS yöntemidir.

Amplikon dizilemede prokaryotlar için en yaygın marker gen olarak 16S rRNA geni kullanılmaktadır [24, 25]. 16S rRNA geni 9 yüksek oranda korunmuş bölge ve 9 hiperdeğişken bölge içerir (Şekil 3). 16S rRNA geninin bakterilerin taksonomik çalışmalarında en yaygın olarak kullanılmasının başlıca nedenleri ;

- tüm bakterilerde bulunuyor olması
- fonksiyonu nedeni ile evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş olması
- yaklaşık 1500 bp uzunluğuyla informatik analizlerde kullanmak için uygun olması

- primer dizaynı için kullanılan yüksek oranda korunmuş bölgeleri ve bakterilerin filogenetik özelliklerini tanımlamada kullanılan hiperdeğişken bölgeleri içeriyor olmasıdır [26, 27].



Şekil 3: 16S rRNA geni [28].

16s rRNA Amplikon dizileme yöntemi, çok sayıda örnekten binlerce dizinin aynı anda çalışılabilmesi, kültürden bağımsız bir teknoloji olması, hızlı sonuç vermesi, hassas ve düşük maliyetli olmasıyla

İBM taksonomik çalışmalarında en çok tercih edilen yöntem haline gelmiştir [24].

2.3. 16S rRNA Amplikon Dizileme Çalışmalarında Kullanılan Bakteriye Genomik DNA İzolasyon Yaklaşımları

Mikroorganizmalardan genomik DNA eldesi için farklı yaklaşımlar mevcuttur. Mikroorganizmalardan genomik DNA eldesi gram pozitif bakteriler (Örneğin; *Mycobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*) gibi hücre duvarı bulunan mikroorganizmalar ya da kalın polisakkarit ve psödopeptidoglikan yapısı bulunan bazı arkeler için zorlu ve spesifik aşamalar gerektiren bir süreçtir [29]. İBM’de ise mikroorganizmaların hücresel bileşeninde bulunan ve DNA elde etmeyi zorlayan yapıları, 1000’den fazla tür bulunmasının yanı sıra dışkı içeriğindeki inhibitörler ve kirleticiler nedeniyle saf ve yeterli miktarda genomik DNA eldesi zordur [30].

Literatürde mikroorganizmalardan DNA izolasyonu için çoğunlukla kullanılan yöntemler; FK DNA izolasyon yöntemi, Chelex-100 ile izolasyon, Tuzla çöktürme yöntemi, Triton X ve Tween 20' ve CTAB ile izolasyondur. Söz konusu yöntemler arasında en sık kullanılanı FK yöntemidir [29].

Bakterilerden genomik DNA eldesi için gerekli aşamaları üç başlık altında sıralamak mümkündür;

- Hücre lizisi
- Organik çözücülerle izolasyon
- Alkol çöktürme ile DNA eldesi [31].

2.3.1. Hücre Lizisi

Bakterilerden genomik DNA elde etme aşamaları içerisinde bu adım en zor olanıdır. En sık tercih edilen aşamalar enzimatik ve deterjanla lizistir. Parçalama aşamasında EDTA kullanmak lizisin etkinliğini artırır, ortamın alkali pH (8-9) olmasıyla birlikte DNA'nın temel proteinlerle elektrostatik etkileşimini azaltır, hücresel proteinlerin denatüre edilmesine yardımcı olur ve nükleaz aktivitesini azaltır [29]. Lizis aşaması için genellikle kullanılan 3 yöntem vardır, bu yöntemler tek tek ya da bir arada kullanılabilir.

- Enzimatik lizis
- Deterjan ve türevi maddelerle lizis
- Mekanik (fiziksel) etkiyle lizis

2.3.1.1. Enzimatik Lizis

Enzimle hücre yapısını bozma aşamasında genellikle lizozim ve proteinaz K kullanılmaktadır. Lizozim çoğu bakterinin hücre duvarının büyük bir kısmını oluşturan peptidoglikanın yapısındaki N-acetylmuramic acid- ve N-acetylglucosamine tekrar birimlerindeki β -1,4-glycosidic bağı bozarak hücre duvarının parçalanmasında rol oynar. Proteinaz K peptidoglikanın peptit bağları arasında çapraz bağ oluşturarak yapısının bozulmasında rol alır [32] .

2.3.1.2. Deterjan Türevi Maddelerle Lizis

DNA izolasyonu için kullanılan deterjanlar proteinlere bağlanarak yapısının bozulmasını sağlarlar. Kullanılan deterjanın etkinliği bakterinin hücre yapısı zarar

görmüşse artar. Bu aşama için SDS, CTAB, Triton X, Tween kullanılmakla birlikte SDS en yaygın kullanılanlardan [33].

SDS proteinlerin hidrofobik kısımlarıyla reaksiyona girip hücresel proteinleri ve lipoproteinleri bağlayıp denatüre eder [34].

2.3.1.3. Mekanik (fiziksel) Etkiyle Hücre Lizisi

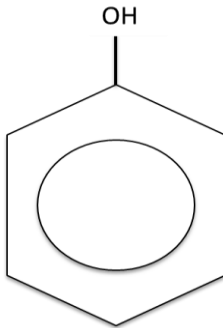
Enzimatik ve deterjan lizisi gibi yöntemlerin yetersiz kalabildiği ve daha etkin yöntemlerin denemesi gerektiği durumlarda bead beater ya da sonikasyon cihazı gibi mekanik yöntemler ya da yüksek ısı kullanılarak lizisin fiziksel olarak gerçekleştirilmesi gerekebilir. Örneğin dondurma ısıtma tekniği diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında yöntemlerin etkinliğini arttırmaktadır [35].

2.3.2. Organik Çözücülerle İzolasyon

Bu aşamada bir organik çözücü kullanılarak (Örneğin; FK) hücredeki protein ve lipoproteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanır ve santrifüj sayesinde DNA dışı hücresel bileşenlerin organik fazda kalmasını sağlar [36]. Fenol proteinleri denatüre ederken kloroformun etkinliği polisakkaritler üzerinedir.

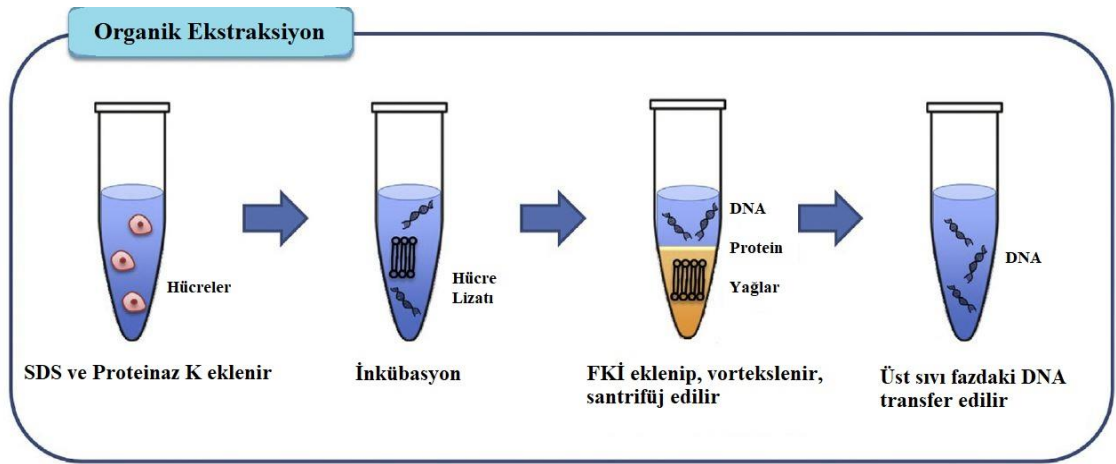
2.3.2.1. FK DNA İzolasyon Yöntemi

Fenoller benzen halkasına bağlı bir hidroksil grubu içeren aromatik hidrokarbonlara verilen genel isimdir. Fenoller moleküllerindeki hidroksil grubu sayısına göre bir ya da daha çok değerli olabilmektedir. Fenollerin en basiti tek hidroksil gruplu fenik asittir (C_6H_5OH) (Şekil4) [37].



Şekil 4: Fenolün kimyasal yapısı [38].

FK ile yapılan organik izolasyonlarda öncelikle proteinlerin ve nükleik asit olmayan hücresel bileşenlerin enzimatik sindirimleri için proteinaz K ve SDS kullanılır. Ardından Fenol-Kloroform-İzoamil (FKİ) alkol eklenmesiyle (25:24:1) karışım sıvı-sıvı faza ayrılır; organik faz ve sulu faz. FKİ'nin eklenmesi ve santrifüjüyle beraber lipidler ve diğer hücresel kalıntıları içeren organik faz tüpün aktında kalırken DNA içeren sulu faz üstte kalır ve temiz bir tüpe aktarılır. Ardından DNA alkol presipitasyonu ile çöktürülerek saflaştırılabilir (Şekil 5) [39].



Şekil 5: FK ile yapılan organik izolasyon [40].

2.3.3. Alkol Çöktürmesi İle DNA Eldesi

DNA'nın etil alkol veya izopropanol varlığında çöktürülmesi işlemidir. Elde edilen DNA'ya alkol eklenir ve santrifüj edilerek çöktürülür. DNA tuzsuz çözeltilerde daha az çöktüğünden en az 0,1 M bir katyon (örneğin; amonyum asetat ya da sodyum asetat) eklenmesi DNA'nın çöktürülmesini kolaylaştıracaktır [41].

DNA izolasyon yönteminin seçimi ampikon dizileme çalışmaları için önemlidir. Bakterilerin hücre yapılarındaki farklılıklar ve feçeste bulunan çeşitli PZR inhibitörleri nedeniyle DNA izolasyon yönteminin hem tüm bakterilerin DNA izolasyonu için uygun olması hem de inhibitörleri ortamdaki uzaklaştırabilmesi gerekir. Seçilen DNA izolasyon yöntemi dizileme çıktıları üzerinde olumsuz etkilere ve dolayısıyla mikrobiyal çeşitliliğin hatalı temsiline neden olabilir. Yapılan çalışmalarda örneklerde kullanılan farklı DNA izolasyon yöntemlerinin metagenomik çalışmaların dizileme çıktılarındaki farklılıklara neden olduğu gösterilmiştir [11, 12]. Bu nedenle özellikle

karşılaştırmalı çalışmalarda örneklerin hangi DNA izolasyon yöntemiyle izole edildiği önemlidir ve veri analizinde bu durumun göz önünde bulundurulması gereklidir [42]. Beş farklı ticari kitin karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışmada ticari kitlerden elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların miktar ve saflıklarında farklılık görülmüştür [43]. Yapılan başka bir çalışmada aynı örneğe farklı DNA izolasyon metodu uygulanmasıyla elde edilen bakteri kompozisyonunda farklılık olduğu tespit edilmiştir. Farklı DNA izolasyon kitleri bazı bakteri familyalarının yoğunluğunu arttırırken bazılarının yoğunluğunu düşük gösterebildiği tespit edilmiştir [44]. Bu çalışmalar da göstermektedir ki metagenomik çalışmalarda en önemli basamaklardan biri olan DNA izolasyonunun başarısı ampikon dizileme yöntemiyle yapılan çalışmaların sonucunu doğrudan etkilemektedir [11, 45]. Bu durum göz önüne alındığında DNA izolasyon yöntemlerinin etkinliklerinin karşılaştırıldığı çalışmalar literatür açısından önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar metagenomik çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılabilir olması için aynı DNA izolasyon yönteminin kullanılmasını tavsiye etmekte ve başarılı bir ampikon dizileme çalışması gerçekleştirebilmek için DNA izolasyon yönteminin anahtar rol oynadığını belirtmektedir [11, 44, 46].

Bu tez projesinde sağlıklı gönüllülerden alınan dışkı örneklerinden iki farklı DNA izolasyon kiti ve Fenol-kloroform (FK) DNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların etkinliklerinin 16S rRNA ampikon dizileme yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ülkemizde İBM kompozisyon yapısının tanımlanmasında farklı DNA izolasyon yöntemlerinin etkinliğinin 16S rRNA ampikon dizileme yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamakta, literatürde ise bu yönde yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla, araştırmacıların çalışmalarında kullanacakları DNA izolasyon protokollerini seçmelerinde ve standart çalışma prosedürlerini belirlemelerinde yol gösterici olma ve literatüre verilerine katkı sağlaması hedeflenmektedir. Hipotezimiz 16S dizileme bulgularını etkileyen en önemli faktörlerin başlangıç örneğinin kalite ve saflığı ile birlikte DNA izolasyon yönteminin ekosistemde bulunan tüm bakteri gruplarından DNA elde edebilecek etkinlikte olmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındıktan (2021/1412) sonra başlandı. Tüm gönüllülere çalışmayı detaylarıyla anlatan gönüllü onam formu imzalatıldı. Çalışmanın laboratuvar aşamaları İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı'nda gerekli izinler alınarak yürütüldü. Bu çalışmada, sağlıklı gönüllülerden toplanan dışkı örnekleri iki farklı DNA izolasyon kiti ve FK DNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların etkinlikleri 16S rRNA amplikon dizileme yöntemi kullanılarak incelendi.

3.1. GEREÇ

3.1.1. Gönüllü Seçimi

İBM kompozisyonunu yaş, cinsiyet, kronik hastalıklar, kilo, antibiyotik, prebiyotik, probiyotik kullanımı, ilaç kullanımı, beslenme şekli gibi faktörler etkilemektedir. Gönüllülerin seçiminde bu faktörlerin İBM üzerindeki etkileri göz önünde bulunduruldu. Bu faktörlerin etkisini en aza indirmek amacıyla aynı cinsiyet ve yaş grubunda kronik hastalığı bulunmayan, düzenli ilaç kullanımı olmayan genç gönüllüler çalışmaya dahil edildi (Tablo 1). Çalışmaya toplam 3 gönüllü dahil edildi. Gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri aşağıdaki gibidir.

Gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri

- Kronik hastalığı olmayan
- Son 3 ayda sağlık sorunu yaşamayan
- Son 3 ayda ilaç tedavisi görmeyen
- Son 3 ayda antibiyotik kullanmayan
- Son 3 ayda prebiyotik ve probiyotik kullanmayan
- Vücut Kitle İndeksi (VKİ) 20-24,9 arasında olan
- 25-30 yaş aralığındaki sağlıklı erkek gönüllüler çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

- Kronik hastalığı olan
- Son üç ayda sağlık sorunu yaşayan
- Son 3 ayda ilaç kullanan
- Son 3 ay içinde antibiyotik kullanan
- Son 3 ayda prebiyotik ve probiyotik kullanan

- VKİ: 20-24,9 olmayan
- 25-30 yaş aralığındaki ve erkek olmayan gönüllüler çalışmadan dışlandı.

Tablo 1: Gönüllülerin demografik özellikleri

	Gönüllü 1	Gönüllü 2	Gönüllü 3
Yaş	27	26	28
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Erkek
VKİ	23	24	24

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Otomatik Pipetler	Axygen
Homojenizatör	Seward
İnkübatör	Daihan
Mini santrifüj	Beckman Coulter
Vorteks	Neuation
+4 soğutucu	Arçelik
-20 soğutucu	Arçelik
-80 soğutucu	Sanyo
Bead beater	Roche
Çeker ocak	Kermanlar
Spektrofotometre	NanoDrop
Florometre	Qubit
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Steril Kabin	Thermo Scientific
PZR cihazı	Bio-Rad
Yeni nesil dizileme cihazı	İllumina
Otoklav	Kermanlar

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Çalışmada kullanılan kitlerin listesi Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3: Çalışmada kullanılan kitler

Kit Adı	Kullanım Amacı	Marka
---------	----------------	-------

QIAamp Powerfecal DNA Kit	DNA izolasyonu	QIAGEN
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	DNA izolasyonu	Zymo
Kapa HiFi Hotstart Ready mix	PZR	Roche
Nextera XT V2 Kit	İndeks PZR	Illumina
AMPure XP Reagent	PZR saflaştırma	Beckman Coulter

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan materyaller ve kimyasallar Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar

Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar	Kullanım Amacı	Marka
Tris-Hcl	F-K DNA izolasyon	Sigma
EDTA	F-K DNA izolasyon	Sigma
NaCl	F-K DNA izolasyon	Sigma
SDS	F-K DNA izolasyon	Sigma
Lizozim	F-K DNA izolasyon	Sigma
Proteinaz K	F-K DNA izolasyon	Qiagen
HCl	F-K DNA izolasyon	Merck
NaOH	F-K DNA izolasyon	Sigma
Sature Fenol	F-K DNA izolasyon	Sigma
Kloroform	F-K DNA izolasyon	Merck
İzoamil alkol	F-K DNA izolasyon	Merck
Amonyum asetat	F-K DNA izolasyon	Merck
Steril su	F-K DNA izolasyon, PZR, saflaştırma	Polifarma
Etanol	F-K DNA izolasyon, PZR saflaştırma	Merck

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Tampon, Çözelti ve Solüsyonlar

- **HCl (100 ml, 1M)**
8,3 ml %37 HCl, üzeri dH₂O ile 100 ml’ye tamamlandı.
- **NaOH (100 ml, 1M)**
4 g NaOH üzerine 100 ml dH₂O eklendi, NaOH tamamen çözünene kadar karıştırıldı.
- **Tris-HCl (100 ml, 0,5 M, pH:8)**

7,88 g Tris-HCl üzerine 80 ml dH₂O eklendi.

Manyetik karıştırıcıyla karıştırılıp pH 8 ayarlandı.

Karışım 100 ml'ye tamamlanıp 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

- **EDTA Çözeltisi Hazırlama (100 ml, 0,5 M, pH:8)**

18,61 g EDTA di sodium üzerine 80 ml dH₂O eklendi.

Manyetik karıştırıcıyla karıştırılıp NaOH ile pH 8 ayarlandı.

EDTA suda tamamen çözündükten sonra karışım 100 ml'ye tamamlanıp sterilize etmek için 20 dakika otoklavlandı.

- **NaCl Çözeltisi Hazırlama (50 ml, 0,5 M)**

1,461 g NaCl üzerine 50 ml dH₂O eklendi.

Vorteksle karıştırıldı.

- **%10 SDS Çözeltisi Hazırlama (100 ml)**

10 g SDS üzerine 80 ml dH₂O eklendi.

Manyetik karıştırıcıda yavaş döngüde 60°C'de tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

100 ml'ye tamamlandı.

Solüsyon partikülden arındırılmak için filtreden geçirildi.

- **3 M Amonyum Asetat (15 ml)**

3,46 g amonyum asetat üzerine 12 ml dH₂O eklendi.

Tamamen karışana kadar karıştırılıp 15 ml'ye tamamlandı, filtreden geçirildi.

- **50X TAE(Tris-Asetik asit-EDTA)**

100 ml EDTA (0.5M),

242 g Tris baz,

57,1 g Glasiyal asetik asit

1 lt distile su ile tamamlanarak 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

Lizis Tampon (Ph 8)

Lizis tamponun final konsantrasyonu 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl pH 8 olacak şekilde buffer hazırlandı.

- **25:24:1 Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (50 ml)**

24 ml Kloroform üzerine 1 ml izoamil alkol eklendi.

Karışım 25 ml fenol ile birleştirildi.

3.2. YÖNTEM

Bu çalışmada üç sağlıklı gönüllüden dışkı örneği toplandı. Toplanan örneklerin üç farklı DNA izolasyon yöntemiyle bakteriyel genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri çoğaltılarak Illumina Miseq platformunda dizilendi. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar farklı DNA izolasyon yöntemlerinin 16S rRNA amplicon dizileme çıktıları üzerindeki etkileri açısından değerlendirildi. Çalışmanın iş akış şeması Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: Çalışmanın iş akış şeması

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Gönüllülerden dışkı örneklerinin toplanması için steril idrar kapları kullanıldı. Örnekler uygun nakil koşullarında soğutucu çantayla +4°C sıcaklıkta İ.Ü. İ.T.F. Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı'na 1 saat içerisinde ulaştırıldı.

3.2.2. Örneklerin Homojenizasyonu

Gönüllülerden alınan dışkı örneklerinin İBM kompozisyonlarının en doğru şekilde temsil edebilmesi amacıyla DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce örnekler

homojenize edildi. Örnek miktarları hassas terazi ile belirlendi. Miktarı tespit edilen örnekler homojenizasyon poşetlerine aktararak, 1:1 oranında DNase RNase içermeyen su ile dilue edildi ve homojenizatöre yerleştirildi. 260 rpm de 60 saniye homojenize edildikten sonra örnekler kryo tüpler içerisine alınıp, yedekli olarak -80°C soğutucuya aktarıldı. Örneklerin adlandırılması, G1 (Gönüllü 1), G2 (Gönüllü 2) ve G3 (Gönüllü 3) şeklinde kodlanarak gerçekleştirildi. Gönüllü homojenizasyon koşulları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: Gönüllü örneklerinin homojenizasyon koşulları

Gönüllü kodu	Örnek miktarı (g)	Su miktarı (ml)	Homojenizasyon koşulu
G1	37	37	260 rpm, 60 sn.
G2	34	34	260 rpm, 60 sn.
G3	56	56	260 rpm, 60 sn.

3.2.3. Bakteriyel Genomik DNA İzolasyonu

Bakteriyel genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilecek homojenize dışkı örnekleri -80°C soğutucudan, -20°C soğutucuya, ardından +4°C soğutucuya aktararak çözdürüldü. Gönüllü örnekleri üç farklı DNA izolasyon yöntemi ile her yöntem için üç tekrarlı (triplike) olarak çalışıldı (Şekil 7).



Şekil 7: Gönüllü örneklerinin üç farklı DNA izolasyon yöntemi için gerçekleştirilen triplike çalışmaların şematik gösterimi ve örnek kodları

G1: Gönüllü 1, G2: Gönüllü 2, G3: Gönüllü 3

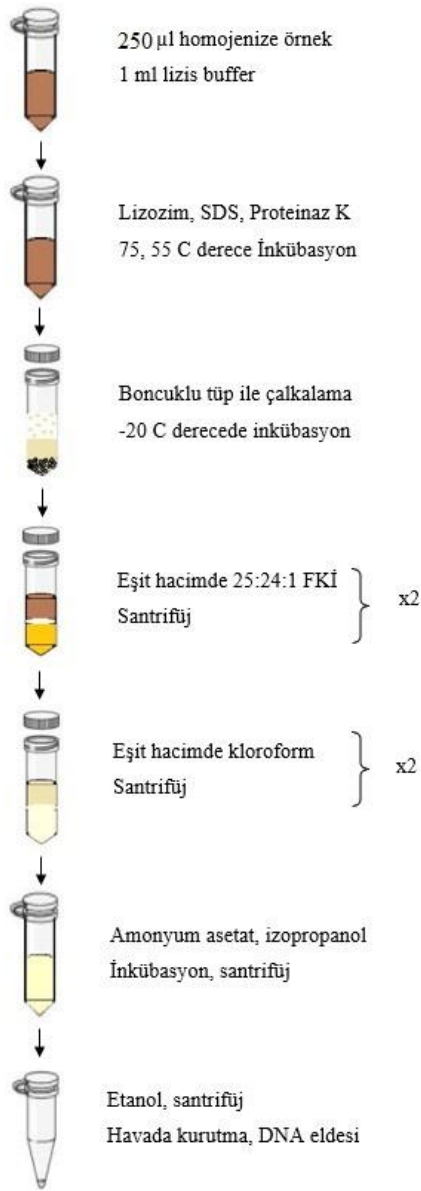
F: FK ile DNA izolasyon yöntemi, Q: QIAamp Powerfecal DNA kit, Z: ZymoBIOMICS Miniprep Kit

DNA izolasyonlarından elde edilen ürünlerin miktar ve saflık tayini spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle gerçekleştirildi. DNA degradasyonunun değerlendirilmesi

için ürünler %1'lik agaroz jele yüklendi, elektroforez cihazında yürütüldü ve görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

3.2.3.1. FK DNA İzolasyon Yöntemi

Çalışmada kullanılan FK DNA izolasyon yöntemi için literatür taranarak çalışma için uygun kaynaklar belirlenip küçük modifikasyonlar yapılarak FK DNA izolasyon protokolü oluşturuldu [47, 48]. 250 l homojenize örnek alındı. Santrifüj edilerek st sıvı atıldı. Pelete 1 ml lizis buffer eklenip 75°C sıcaklıkta aralıklı vorteksle 50 dakika inkübe edildi. Tüpe 20 l (20 mg/ml) lizozim eklenerek 55°C sıcaklıkta aralıklı vorteksle 30 dakika inkübe edildi. Ardından 100 l %10 SDS ve 40 l (20 mg/ml) Proteinaz K eklenerek 55°C aralıklı vorteksle 20 dakika inkübe edildi. Örnekler seramik boncuklu tüplere aktararak Magnalyzer cihazıyla 6000 devirde 90 saniye çalkalandı. Çalkalanan rnekler -20°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi. rnee eşit hacimde 25:24:1 fenol/kloroform/izoamil alkol eklendi. Santrifüj edilerek st sıvı yeni tüpe alındı. Eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol eklenerek işlem tekrarlandı. Ardından örneğe eşit hacimde kloroform eklenerek santrifüj edildi, bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra örneğe 1/10 hacim amonyum asetat ve 2 hacim izopropanol eklenip -20 C sıcaklıkta 12 saat bekletildi. Santrifüj edilip st sıvı alınıp 200 l %70 etil alkol eklenerek santrifüj edildi, st sıvı atılarak havada kurumaya bırakıldı. Peletin zerine 50 l steril su eklendi (şekil 8).



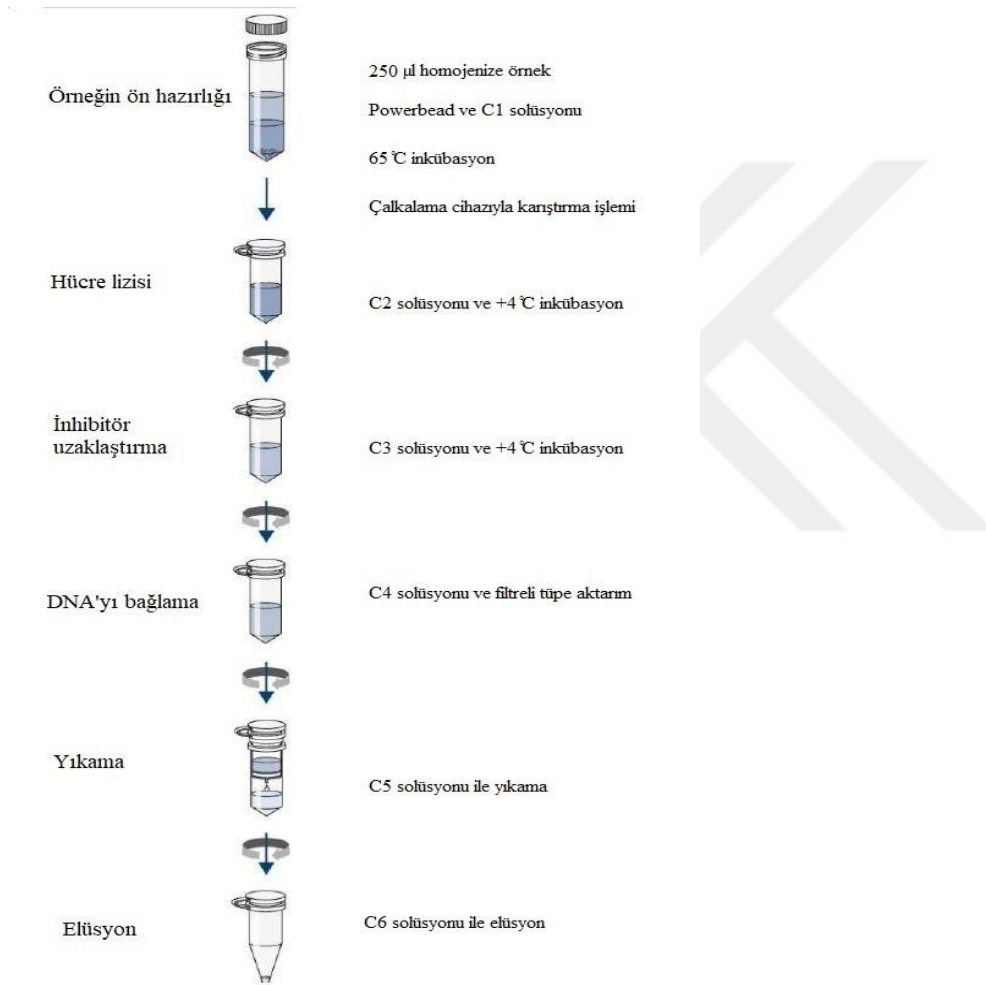
Şekil 8: FK DNA izolasyon yönteminin şematik gösterimi

3.2.3.2. QIAamp Powerfecal DNA Kit

Homojenize dışkı örneklerinin bakteriyel genomik DNA izolasyonları kit protokolüne küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.

250 µl homojenize dışkı örneği boncuklu tüpe aktarıldı. Üzerine 750 µl Powerbead solüsyonu eklendi. 60 µl C1 solüsyonu eklenerek 65 °C ısıda 30 dakika inkübe edildi. Örnek Magnalyzer cihazında 4 kez 6000 devirde 90 saniye çalkalandı. Ardından santrifüj edilip süpernatantı yeni tüplere aktarıldı. Tüpe 250 µl C2 solüsyonu eklenip

+4°C de 5 dakika inkübe edildi. Örnek santrifüj edilip süpernatant yeni tüpe aktarıldı. 200 µl C3 solüsyonu eklenerek +4°C de 5 dakika inkübe edildi. Tüp santrifüj edilerek 750 µl yeni tüpe aktarıldı. Üzerine 1200 µl C4 eklenip 650 µl örnek filtreli tüpe aktarıldı, santrifüj edilir alta inen sıvı atıldı, bu işlem 3 kez tekrarlandı. 500 µl C5 eklenip santrifüj edildi, alta inen sıvı atılıp tekrar santrifüj edildi. Filtre yeni tüpe aktarılıp üzerine 50 µl C6 eklendi, santrifüj edildi (Şekil 9).

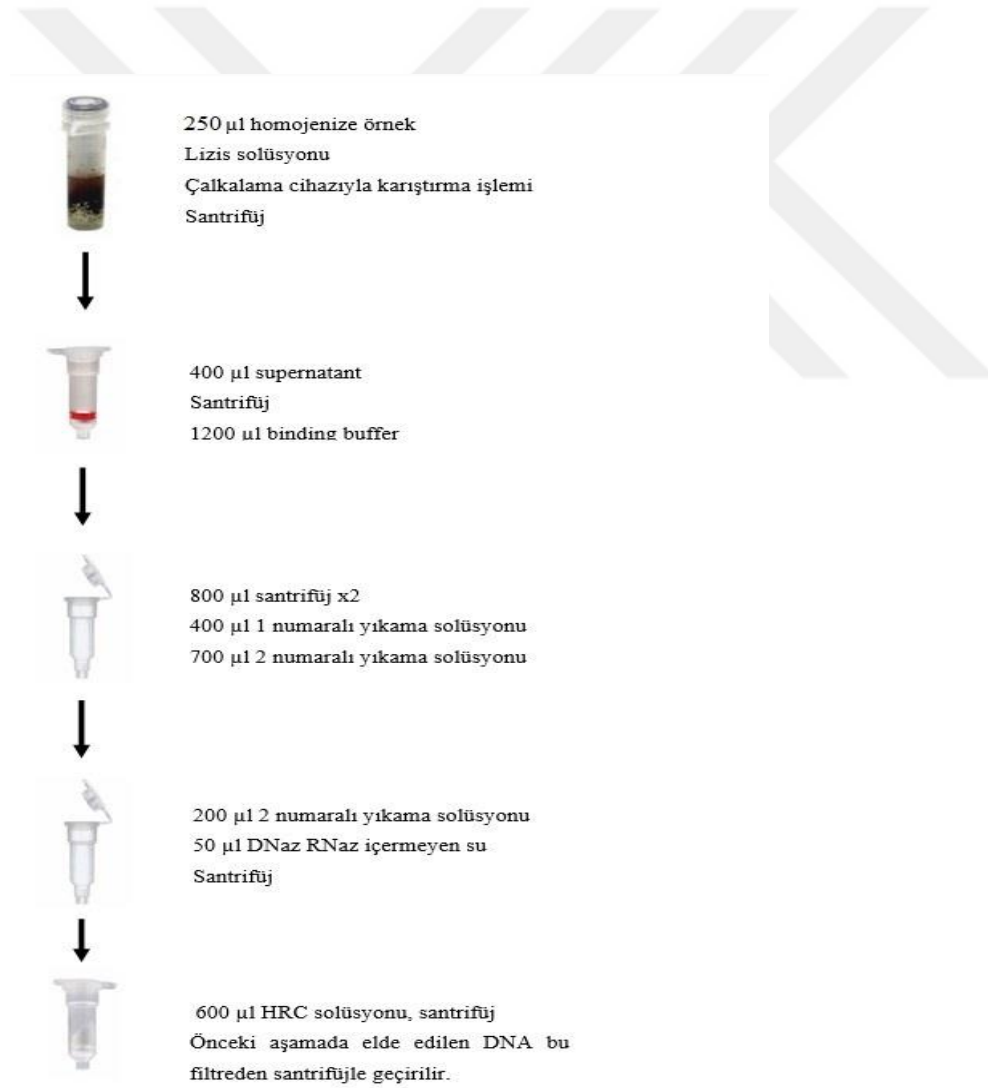


Şekil 9: QIAamp PowerFecal DNA Kit protokolünün şematik gösterimi

3.2.3.3. ZymoBIOMICS Miniprep Kit

Homojenize dışkı örnekleri bakteriyel genomik DNA izolasyonu kit protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. 250 µl homojenize dışkı örneği boncuklu tüplere aktarıldı. Üzerine 750 µl Lizis solüsyonu eklendi, magnalyzer cihazında 3 kez 6000 devirde 90

saniye çalkalandı. Örnek santrifüj edilip 400 µl süpernatant 1 numaralı filtreli tüpe aktarıldı. Tekrar santrifüj edilip filtre atıldı, filtrata 1200 µl binding buffer eklendi. 800 µl'si 2 numaralı filtreli tüpe aktarılıp santrifüj edildi, filtreden geçen sıvı atılıp işlem tekrarlandı. Filtre yeni bir tüpe alınıp üzerine 1 numaralı yıkama solüsyonundan 400 µl eklendi. Santrifüj edilip filtreden geçen sıvı atıldı. Filtreye 2 numaralı yıkama solüsyonundan 700 µl eklendi. Santrifüj edilip filtreden geçen sıvı atıldı. Üzerine 2 numaralı yıkama solüsyonunda 200 µl eklendi. Santrifüj edilip filtre yeni bir tüpe aktarıldı. Filtre üzerine 50 µl DNaz RNaz içermeyen su eklenip santrifüj edildi. 3 numaralı filtreye 600 µl HRC solüsyonu eklenip santrifüj edildi. 2 numaralı filtreden geçirilerek hazırlanan DNA 3 numaralı filtreye aktarılıp santrifüj edildi (Şekil 10).



Şekil 10: ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit protokolünün şematik gösterimi

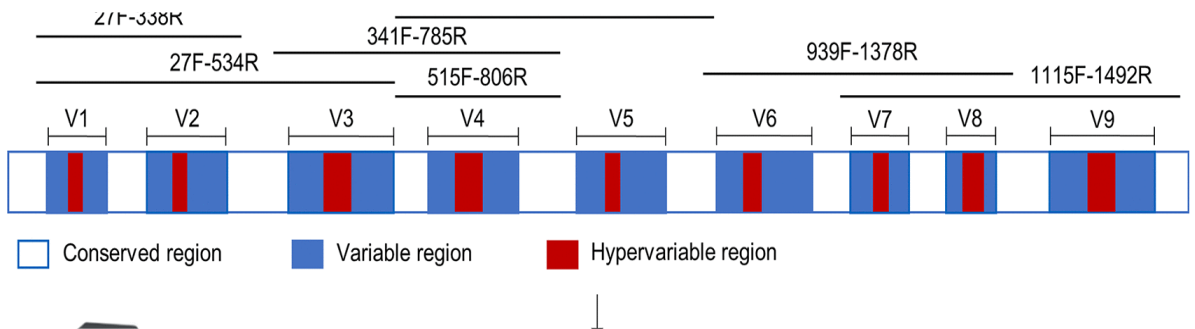
Herbir gönüllü örneği her bir DNA izolasyon yöntemi için üç tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen bakteriyel genomik DNA'lar %1'lik agaroz jele yüklendikten sonra elektroforez cihazında yürütülüp görüntüleme cihazıyla görüntülendi. Elde edilen bakteriyel genomik DNA'ların miktar ve saflık dereceleri nano-drop spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki emilim (absorbsiyon) değerleri ölçülerek değerlendirildi. Herbir yöntem için üç tekrarlı olarak çalışılan gönüllü örnekleri nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçlarına göre 5ng/μl konsantrasyona dilüe edilerek birleştirildi. Bu şekilde herbir gönüllü örneğinin DNA izolasyon yöntemleri için üç tekrarlı çalışılan örnekler birleştirilerek DNA havuzu oluşturuldu ve örnek kodları G1.F, G2.F, G3F, G1.Q, G2.Q, G3.Q, G1.Z, G2.Z ve G3.Z şeklinde güncellendi.

3.2.4. 16S rRNA Amplikon Dizileme

3.2.4.1. Amplikon PZR ve PZR Saflaştırma

Amplikon PZR, saflaştırması ve İndeks PZR, saflaştırması Illumina 16S metagenomik dizileme kütüphane hazırlık rehberine göre yapıldı [49].

DNA izolasyonundan elde edilen ve havuz oluşturularak birleştirilen örneklerden 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesinin çoğaltılması için amplikon PZR işlemi yapıldı (Tablo 6, 7) (Şekil 11). Amplikon PZR'da 16S rRNA V3-V4 gen bölgelerinin çoğaltılması için bu alanda yapılan primer karşılaştırma çalışmaları taranarak taksonomik çeşitliliği en iyi temsil edebildiği belirtilen universal primerler (341F-805R) kullanıldı [50, 51].



Şekil 11: 16S rRNA geninde çalışılan bölge ve kullanılan primerler [52]

Tablo 6: Amplikon PZR karışımı

Kullanılan Materyaller	Miktar
Mikrobiyal genomik DNA (5ng/μl)	12,5 ng
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	2,5 mM
Universal PCR forward primer	5 mM
Universal PCR reverse primer	5 mM

Tablo 7: Amplikon PZR koşulu

Isı	Süre	
95 °C	3 dk.	
95 °C	30 sn.	} x25
55 °C	30 sn.	
72 °C	30 sn.	
72 °C	5 dk.	

Amplikon PZR işlemi gerçekleştirildikten sonra primerleri ve primer dimerleri uzaklaştırmak amacı ile PZR saflaştırma işlemi yapıldı (Tablo 8). Saflaştırma işlemi sonrası örnekler agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 8: PZR saflaştırma aşamasında her örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları

Kullanılan Materyaller	Konsantrasyon
Amplikon PZR ürünü	25 μl
DNase RNase içermeyen su	52,5 μl
AMPure XP beadleri	20 μl
%80 Etanol	400 μl

3.2.4.2. İndeks PZR ve PZR Saflaştırma

Bu adımda Amplikon PZR ürünlerine Nextera XT indeks kiti kullanılarak Illumina sekanslama adaptörleri eklendi (Tablo 9, 10). PZR işleminin ardından PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 9: İndeks PZR karışımı

Kullanılan Materyaller	Konsantrasyon
Saflaştırılmış Amplikon PZR ürünü	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	2,5 mM
Nextera XT Index 1 Primer	5 mM
Nextera XT Index 2 Primer	5 mM
DNase RNase içermeyen su	10 µl

Tablo 10: İndeks PZR koşulu

Isı	Süre	
95°C	3 dk	
95°C	30 sn	} x25
55°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	5 dk.	

İndeks PZR işlemi gerçekleştirildikten sonra primerleri ve primer dimerleri uzaklaştırmak amacı ile saflaştırma işlemi yapıldı (Tablo 11). Saflaştırma işlemi sonrası örnekler agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 11: PZR saflaştırma aşamasında her örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları

Kullanılan Materyaller	Miktar
Amplikon PZR ürünü	50 µl
DNase RNase içermeyen su	27,5 µl
AMPure XP beadleri	56 µl
%80 Etanol	400 µl

Saflaştırılan İndeks PZR ürünlerinin çift zincirli DNA miktarı florometrik yöntemle ölçüldü. 16S rRNA sonucunda elde edilen taksonomik olarak sınıflandırılabilen okuma

sayısı Total Sum Scale (TSS) normalizasyon yöntemi ile normalize edilerek veriler değerlendirilmiştir. Ölçümleri yapılan örneklerin normalizasyonu Illumina 16S metagenomik dizileme kütüphane hazırlık rehberine göre gerçekleştirildikten sonra örnekler Illumina Miseq cihazında dizilendi.

3.2.4.3. Yeni Nesil Amplikon Dizileme ve İformatik Analizler

Illumina Miseq platformunda gerçekleştirilen 16S rRNA koşumu “Sequence Analysis Viewer” programı ile takip edildi. Elde edilen ham dataların biyoinformatik analizleri “Illumina MiSeq Reporter Software (v2.6.2.3)” ile gerçekleştirildi. Taksonomik sınıflandırma için “Greengenes Consortium Database (2013)” kullanıldı.

Aşağıda beklenen kalite kontrol değerleri verilmektedir;

- Beklenen toplam okuma sayısı: 24-30 Milyon okuma
- Her örnekte beklenen okuma sayısı: >100.000
- Beklenen kalite skoru (Q30): >%75
- Beklenen kümelenme yoğunluğu: 800-1000 K/mm²

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Toplanması ve Homojenizasyonu

Örnekler üç sağlıklı gönüllüden 23.03.2022 tarihinde toplandı, toplanan örnekler soğutucu çantayla İ.Ü. İ.T.F. Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvar'ına nakledildi. Örnekler Tablo 5'te belirtilen miktarlarda sulandırılıp homojenize edilmiştir.

4.2. Bakteriyel Genomik DNA İzolasyonu

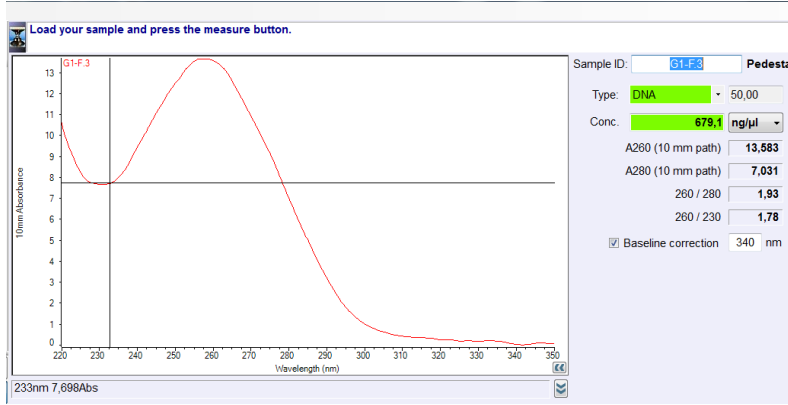
Homojenize dışkı örneklerinin DNA izolasyonları FK DNA izolasyon yöntemi, QIAamp Powerfecal DNA Kit ve ZymoBIOMICS Miniprep Kitleri gerçekleştirildi. DNA izolasyonlarından elde edilen ürünler spektrofotometrik yöntemle ölçüldü ve elektroforez yöntemi ile görüntülendi. Spektrofotometrik ölçümlerde örneğin 260 nm dalga boyunda pik vermesi gerekmekte, 260/280 oranının 1,8-2.0 arasında olması gerekmektedir [53].

4.2.1. FK DNA İzolasyon Sonuçları

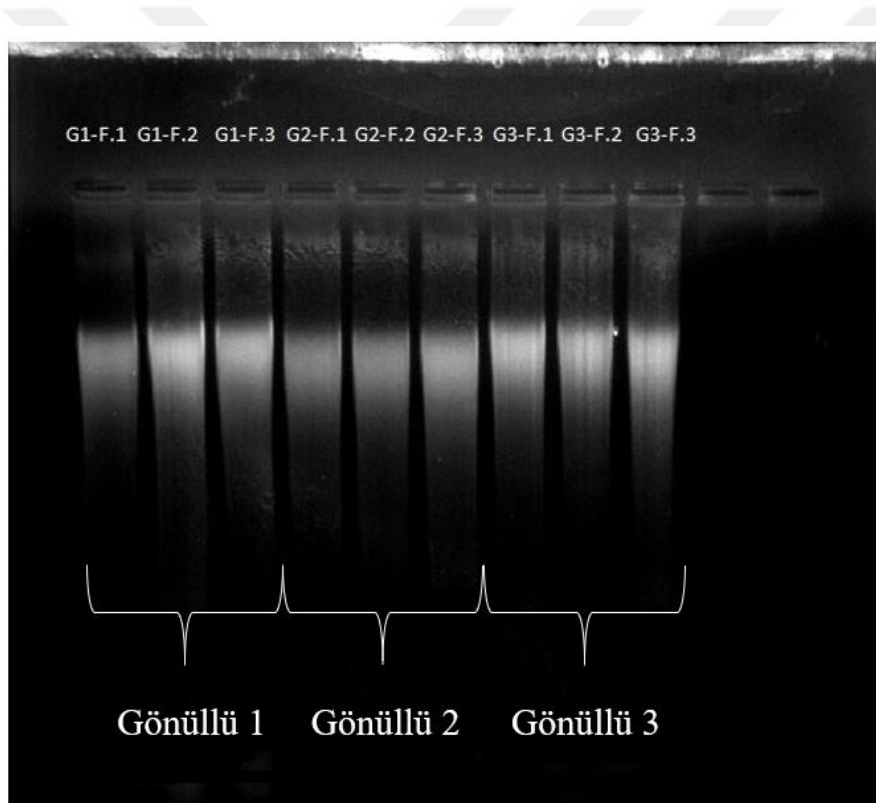
G1-F.1, G1-F.2, G1-F.3, G2-F.1, G2-F.2, G2-F.3, G3-F.1, G3-F.2, G3-F.3 olarak isimlendirilmiş örnekler FK yöntemi ile başarıyla izole edildi. Örneklerin spektrofotometre sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüleri Tablo 12 ve Şekil 12, 13'te gösterilmiştir.

Tablo 12: FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Gönüllü no	G1-F.1	G1-F.2	G1-F.3	G2-F.1	G2-F.2	G2-F.3	G3-F.1	G3-F.2	G3-F.3
ng/ μ l	1052,8	950,2	824,4	598,7	629	617,7	466	528	547,7
260/280	1,93	1,94	1,95	1,72	1,67	1,71	1,82	1,74	1,75



Şekil 12: G1.F3 kodlu örneğin FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü



Şekil 13: FK DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

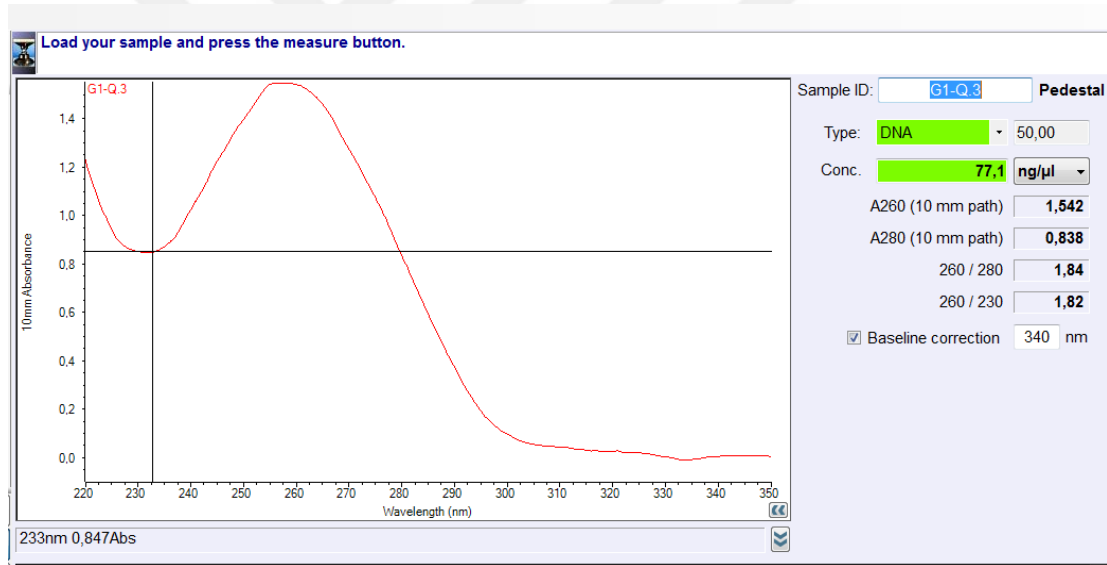
Elde edilen DNA ürünleri PZR aşaması için yeterli konsantrasyon ve saflıktadır. DNA izolasyonu sonrası örnekler Amplikon PZR aşaması için -20°C soğutucuya kaldırıldı.

4.2.2. QIAamp Powerfecal DNA Kit DNA İzolasyon Sonuçları

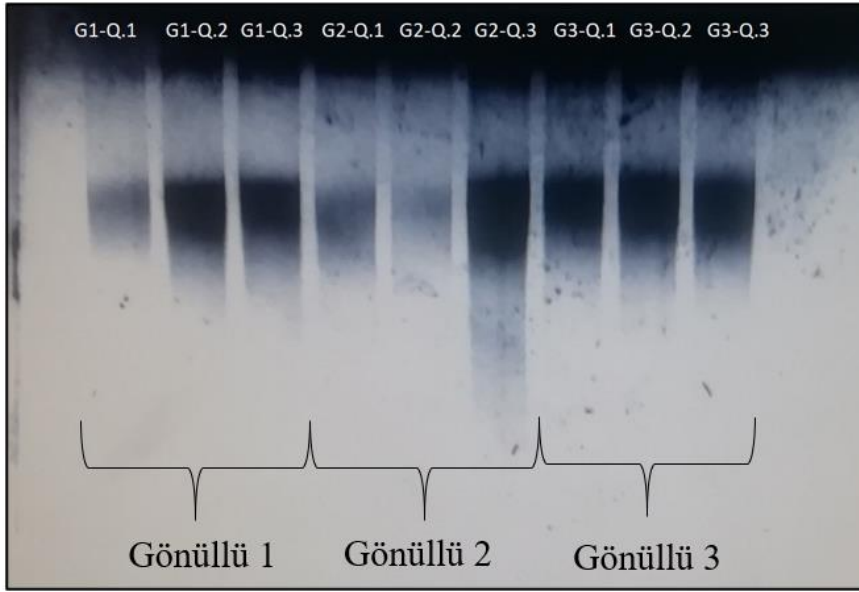
QIAamp Powerfecal DNA kit ile gerçekleştirilen DNA izolasyonlarında elde edilen DNA'ların spektrofotometre sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüleri Tablo 13 ve Şekil 14, 15'te gösterilmiştir.

Tablo 13: QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Gönüllü no	G1-Q.1	G1-Q.2	G1-Q.3	G2-Q.1	G2-Q.2	G2-Q.3	G3-Q.1	G3-Q.2	G3-Q.3
ng/μl	45,5	78	67,4	89,6	84,4	92	45	58,8	65,1
260/280	1,89	1,85	1,86	1,77	1,83	1,85	1,78	1,8	1,8



Şekil 14: G1.Q3 kodlu örneğin QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü



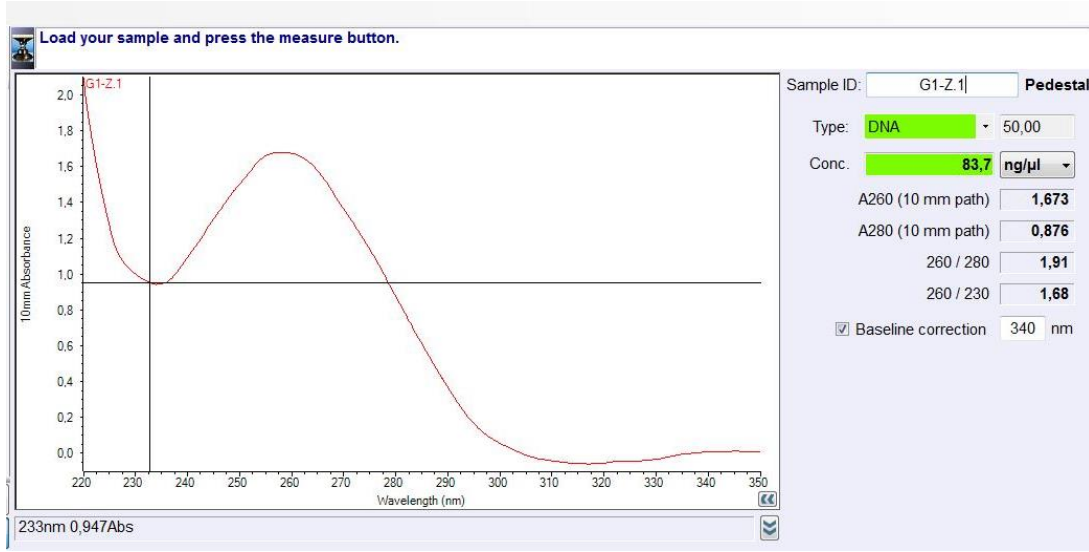
Şekil 15 : QIAamp Powerfecal DNA kit ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

4.2.3. ZymoBIOMICS Miniprep Kit DNA İzolasyon Sonuçları

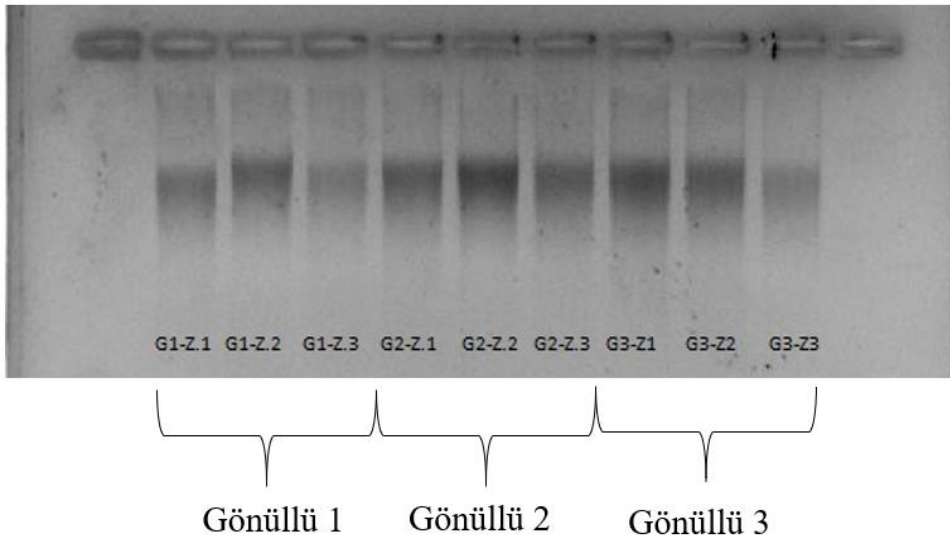
ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile gerçekleştirilen DNA izolasyonlarında elde edilen DNA'ların spektrofotometre sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüleri Tablo 14 ve Şekil 16, 17'de gösterilmiştir.

Tablo 14: ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Gönüllü numarası	G1-Z.1	G1-Z.2	G1-Z.3	G2-Z.1	G2-Z.2	G2-Z.3	G3-Z1	G3-Z2	G3-Z3
ng/µl	20,3	70	35,1	39,8	47,1	22,1	61,4	51,5	26,6
260/280	2,18	1,92	1,92	1,98	1,99	1,93	1,96	1,97	2,09



Şekil 16 : G1.Z1 kodlu örneğin ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA ürününün spektrofotometrik ölçüm görüntüsü



Şekil 17: ZymoBIOMICS Miniprep Kit ile elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

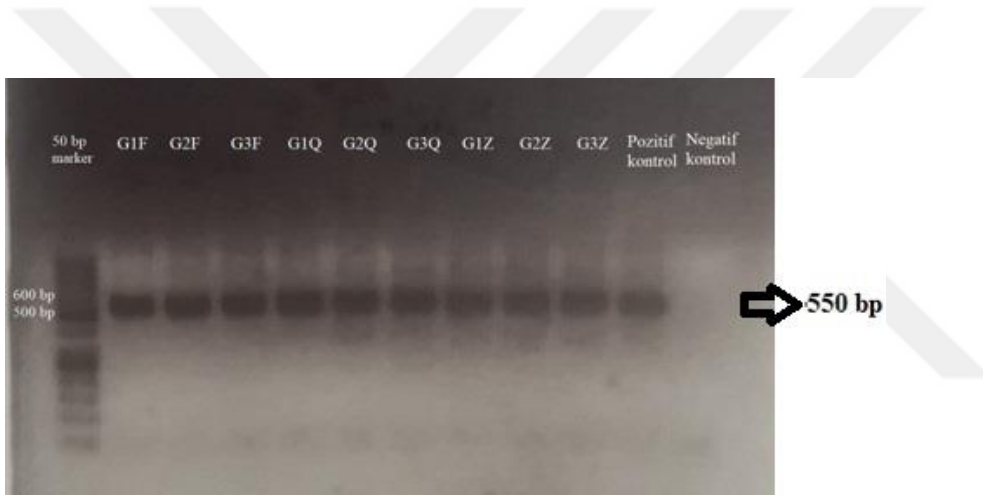
Herbir yöntem için üç tekrarlı olarak DNA izolasyonları gerçekleştirilen gönüllü örnekleri spektrofotometre ölçüm sonuçlarına göre 5ng/μl konsantrasyona dilüe edilerek birleştirildi. Florometrik yöntemle de ölçümleri yapılarak son konsantrasyonları 5ng/μl olduğu doğrulanan DNA örnekleriyle amplikon PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu şekilde herbir gönüllü örneğinin DNA izolasyon yöntemleri için üç tekrarlı çalışılan örnekler birleştirilerek DNA havuzu oluşturuldu ve örnek kodları G1.F, G2.F, G3F, G1.Q, G2.Q,

G3.Q, G1.Z, G2.Z ve G3.Z şeklinde güncellendi. Florometrik yöntemle de ölçümleri yapılarak son konsantrasyonlarının 5ng/μl olduğu doğrulanan DNA örnekleri ampikon PCR işlemi gerçekleştirildi.

4.3. 16S rRNA Ampikon Dizileme Sonuçları

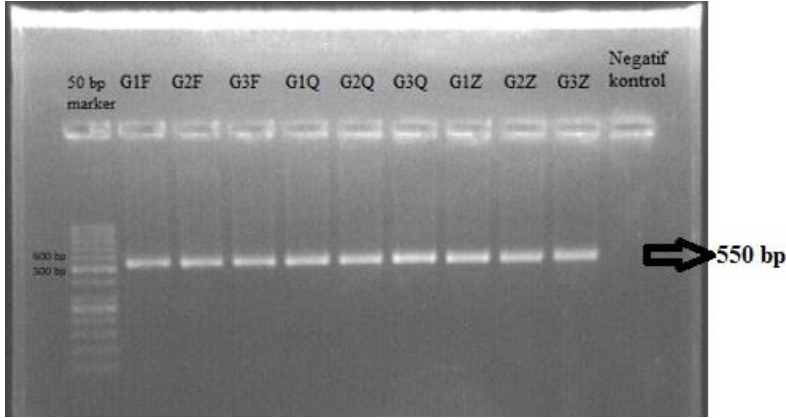
4.3.1. Ampikon PZR ve PZR Saflaştırma Sonuçları

Bakteriyel genomik DNA'larının 16S rRNA V3-V4 bölgeleri çoğaltıldı. Çoğaltılan hedef bölgelerin yaklaşık 550 bp olmaları beklenmektedir. Agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek Ampikon PZR işleminin başarıya ulaştığı görüldü (Şekil 18).



Şekil 18: Ampikon PZR agaroz jel görüntüsü

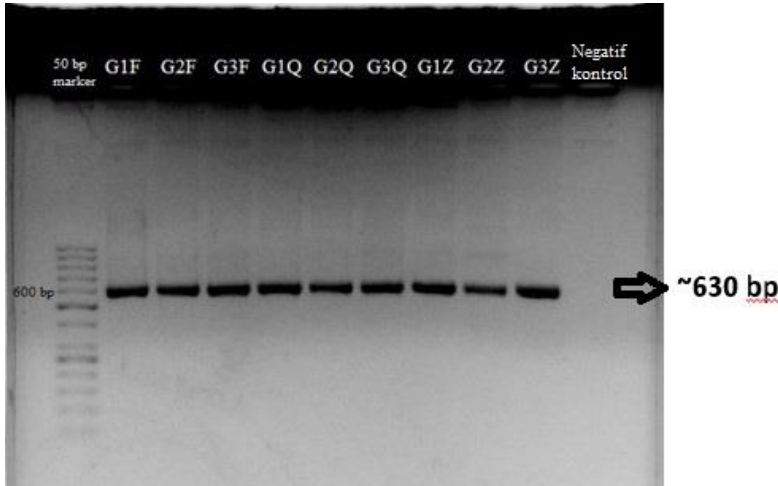
Ampikon PZR aşamasından sonra elde edilen ürünlere saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek primerler uzaklaştırıldı, işlemin başarısı agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi (Şekil 19).



Şekil 19: Amplikon PZR saflaştırma görüntüsü

4.3.2. İndeks PZR ve PZR Saflaştırma Sonuçları

Amplikon PZR ile V3-V4 bölgesi çoğaltılmış olan PZR ürünlerine indeks PZR aşaması uygulandı. Ürünler özel adaptörlerle etiketlendi. İndeks PZR sonucu örneğin yaklaşık 630 bp olması beklenmektedir. PZR işlemi sonrası agaroz jel elektroforeziyle görüntüleme sağlanarak işlemin başarısı tespit edildi.



Şekil 20: İndeks PZR agaroz jel görüntüsü

İndeks PZR aşamasından sonra elde edilen ürünlere saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek indeks primerleri uzaklaştırıldı, işlemin başarısı agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi (Şekil 20). Normalizasyonu yapılan örnekler Illumina MiSeq cihazında dizilendi.

4.3.3. 16S rRNA Amplikon Dizileme Sonuçları

16S rRNA Amplikon Dizileme koşumu “Sequence Analysis Viewer (Illumina, Amerika)” programı ile takip edildi. Koşumun sonunda toplam okumanın 27.55 Milyon, kümelenme yoğunluğunun 1042 ± 119 K/mm², filtreyi geçen küme yoğunluğunun %77,29, kalite skorlarının ise $>Q30 = \%59,9$ olduğu görüldü. Koşumdaki kümelenme yoğunluğu ve toplam okuma sayısı amplikon dizileme işleminin başarısı için yeterli olmasına rağmen Q30 değerlerinin düşük olduğu görüldü. Okumalar taksonomik analiz için filtrelendiğinde okuma sayılarında yüksek kayıplar olduğu tespit edildi (Tablo 15). 16S rRNA amplikon dizileme sonucunda elde edilen kalite kontrol skorları ile Illumina Miseq dizileme sonucunda beklenen kalite kontrol skorları karşılaştırılmıştır (Tablo 16).

Tablo 15: 16S rRNA Amplikon Dizileme Okuma Sayıları

Gönüllü kodu	Toplam okuma sayısı	Filtreyi geçen okuma sayısı	Taksonomik olarak sınıflandırılabilen okuma sayısı
G1F	98.534	78.587	34.664
G2F	115.221	97.787	53.104
G3F	107.698	90.116	45.938
G1Q	102.181	85.701	41.385
G2Q	92.565	78.205	40.389
G3Q	91.222	77.432	37.020
G1Z	105.741	86.654	44.408
G2Z	67.126	49.932	15.081

G3Z	132.308	108.282	53,434
-----	---------	---------	--------

Tablo 16: 16S rRNA amplikon dizilemede elde edilen ve beklenen kalite kontrol skorları

	Beklenen skorlar	Elde edilen skorlar
Toplam okuma sayısı	24-30 M	27.55 M
Kalite skoru (Q30)	>%75	%59.9
Kümelenme yoğunluğu (K/mm²)	800-1000	1042±119
Her örnekte ortalama okuma sayısı	>100.000	>100.000

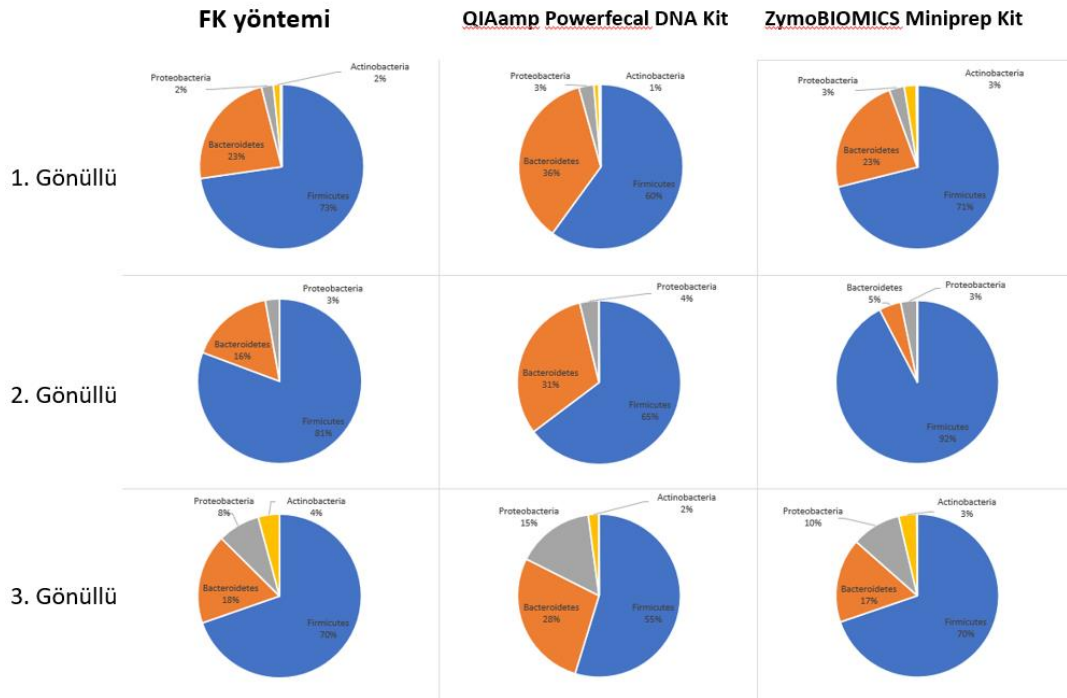
Elde edilen okumalar filum seviyesinde değerlendirilip var olan mikroorganizma gruplarının farklı DNA izolasyon yöntemlerindeki oranları incelendi (Tablo 17) (Şekil 21).

Gönüllülülere göre DNA izolasyon yönteminin bakteri filumları üzerindeki değişimleri incelendiğinde FK yönteminin ve Zymo kitinin benzer etki gösterdiği görülmektedir. Sonuçlar gönüllü bazında değerlendirildiğinde FK yöntemi ve Zymo kitinde benzer çıkan Bacteroidetes ve Firmicutes oranları QIAamp kitinde farklı çıkmıştır. Firmicutes filumu değerlendirildiğinde FK ve Zymo kitinde gönüllülerin oranları benzer çıkarken QIAamp kitinde belirgin şekilde düşük çıkmıştır (Şekil 22).

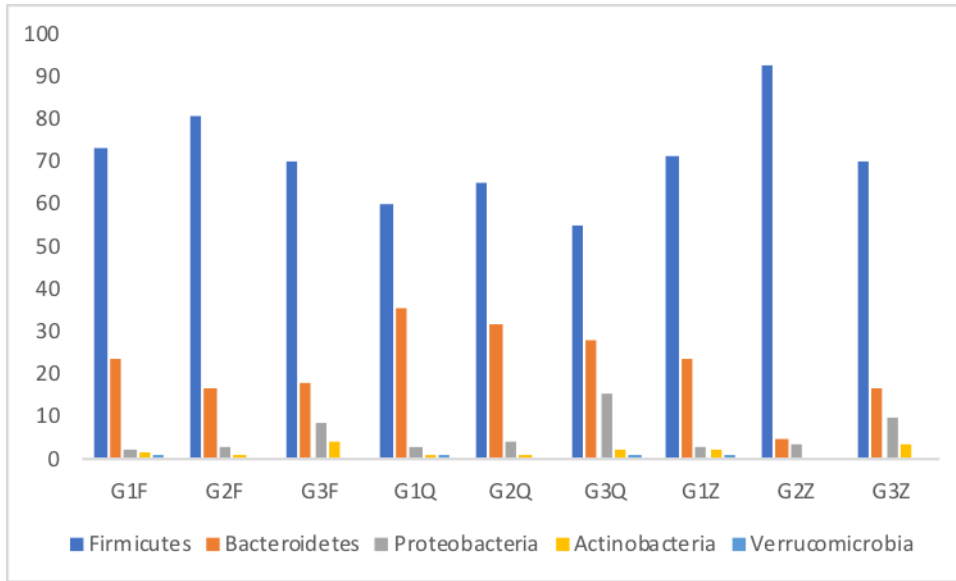
Bacteroidetes filumu ise FK ve Zymo kitinde düşük okumalara sahipken QIAamp kitinde daha yüksek okuma oranına sahiptir. Proteobacteria filumunun bolluğu QIAamp'da diğer yöntemlere oranla daha yüksektir. Actinobacteria filumunun bolluğu ise Firmicutes ile aynı şekilde FK ve Zymo kitinde QIAamp kitinden daha yüksektir (Şekil 22, 23).

Tablo 17: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde incelenmesi

	G1F	G2F	G3F	G1Q	G2Q	G3Q	G1Z	G2Z	G3Z
Firmicutes	72,72%	80,68%	69,67%	60,02%	64,73%	54,75%	71,09%	92,35%	69,76%
Bacteroidetes	23,30%	16,52%	17,76%	35,66%	31,47%	27,67%	23,33%	4,37%	16,73%
Proteobacteria	2,35%	2,77%	8,35%	2,94%	3,76%	15,46%	2,96%	3,28%	9,82%
Actinobacteria	1,39%	0,02%	4,22%	0,98%	0,02%	2,09%	2,39%	0,00%	3,60%
Verrucomicrobia	0,23%	0,00%	0,00%	0,38%	0,00%	0,01%	0,22%	0,00%	0,00%
Fusobacteria	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Chrysiogenetes	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Euryarchaeota	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,01%	0,00%	0,10%
Armatimonadetes	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
Chlorobi	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Chloroflexi	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%

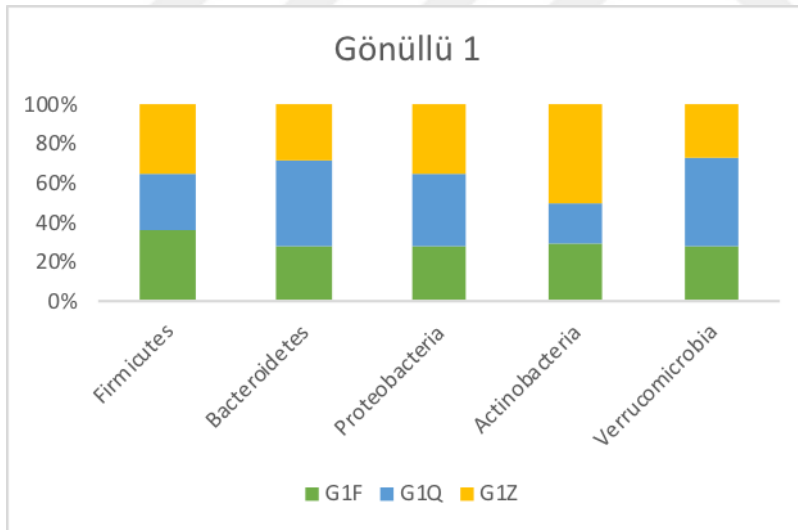


Şekil 21: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde incelenmesi

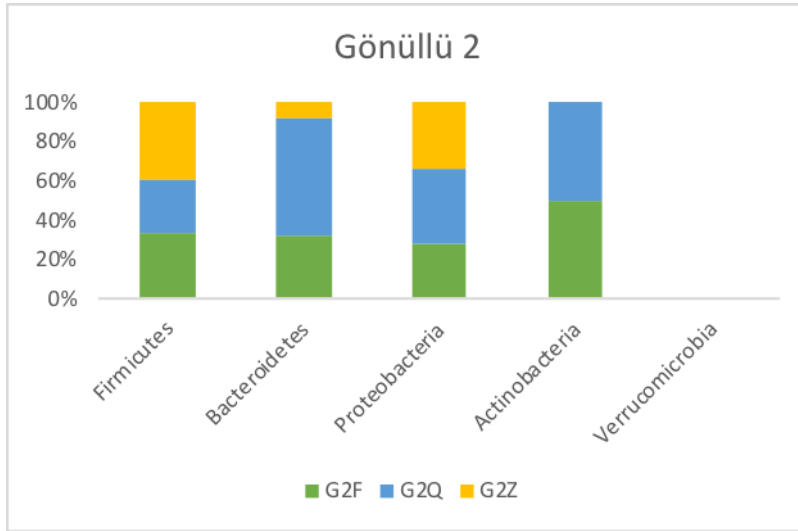


Şekil 22: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının filum seviyesinde farklı DNA izolasyon kitleriyle karşılaştırılması

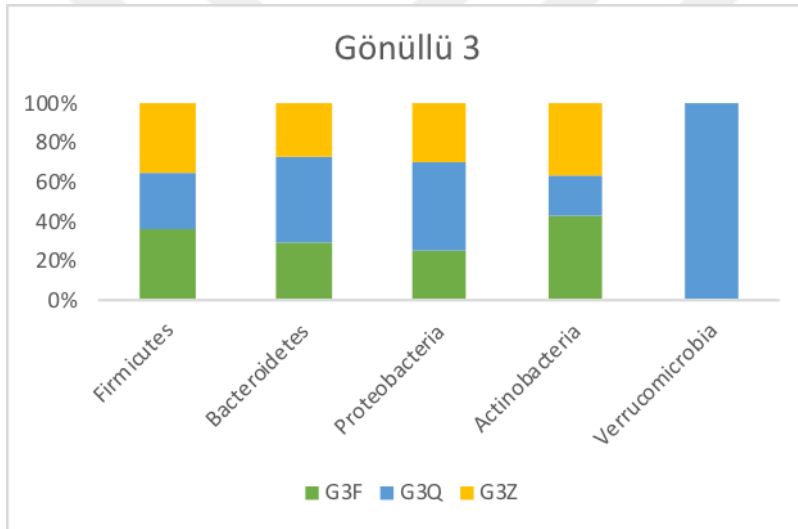
A



B



C



Şekil 23: 16S rRNA Amplikon dizileme sonuçlarının farklı DNA izolasyon yöntemlerinde filum seviyesinde gönüllüler arası farklarının incelenmesi

5. TARTIŞMA

İnsan bağırsak mikrobiyotası (İBM) oldukça kompleks ve dinamik bir yapıya sahiptir. İBM kompozisyonu yaş, coğrafya, kültürel alışkanlıklar, beslenme alışkanlıkları, stres, egzersiz sıklığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Birçok çalışmada İBM kompozisyonunun dengeli yapısının bozulmasıyla ortaya çıkan disbiyozis çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Disbiyozis ile ilişkili olduğu düşünülen hastalıklar arasında; huzursuz bağırsak sendromu, kolorektal kanser, obezite, tip 2 diyabet, alerji, astım, inflamatuvar bağırsak hastalığı, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar bulunmaktadır. İBM kompozisyon yapısında bireyler arasında yüksek varyasyon görülmesi ile iç ve dış faktörlerin mikrobiyal kompozisyon üzerindeki etkileri sağlıklı İBM kompozisyon yapısının hala tam olarak netleştirilememesine neden olmaktadır. İBM'nin insan fizyolojisindeki görevleri ve ilişkili olduğu hastalıklar düşünüldüğünde İBM alanında yapılan çalışmalar literatür açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, farklı bakteriyel genomik DNA izolasyon yöntemlerinin 16S rRNA amplikon dizileme çıktıları üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Elde ettiğimiz bulgular, seçilen DNA izolasyon yönteminin 16S rRNA amplikon dizileme çıktıları üzerinde İBM bakteriyel kompozisyonunun farklı temsiline neden olacak şekilde etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu durum, teknik yaklaşımların örneklerin biyolojik özelliklerinden bağımsız olarak nasıl farklı sonuçlar üretebildiğinin de bir göstergesidir.

Bu tez çalışması kapsamında iki farklı filtreli ticari kit ve fenol klorofom ile DNA izolasyon yöntemleri kullanılmış ve 16S rRNA amplikon dizileme sonucunda elde edilen veriler incelenmiştir. 16S rRNA amplikon dizileme hassas bir yöntemdir ve çalışma basamaklarından etkilenmektedir. Çalışmamızdaki tek değişkenin DNA izolasyon yöntemi olması hedeflendiğinden;

- Gönüllüler aynı yaş grubu ve cinsiyetden seçilmiştir.
- Gönüllülerden toplanan örnekler, aynı tarihte, aynı tür steril kaplarda alınmıştır.

Transfer koşulları, uygulanan ön işlem, saklanma koşulu ve başlangıç miktarları aynı tutulmuştur.

Veri analizlerinde taksonomik olarak sınıflandırılabilen ortalama 40.603 okuma sayısı ile Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Euryarchaeota, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Armatimonadetes, Chlorobi olmak üzere toplam 11 filum tespit edilmiştir (Tablo 17). İBM kompozisyonunun ~%99,9'u Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia filumlarından oluşurken, diğer filumlar bakteriyel kompozisyonun ~%0,1'ini oluşturmaktadır. Tüm gönüllülerde en bol bulunan filum Firmicutes, en bol bulunan 2. filum ise Bacteroidetes'tir. Literatür verileri elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir [54] Çalışmamızın sonuçları literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır (Tablo 18).

Tablo 18: Bu çalışmanın literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılması

	DNA izolasyon yöntemleri	Örnek sayısı	Sonuç
Kazantseva ve ark. (2021)	PL—PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, ZR—ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit	5	Zymo kitinden elde edilen bakteriyel genomik DNA ürününün miktarı ve saflığı daha yüksek olsa da elde edilen sonuçlarda taksonomik çeşitlilikleri benzer çıkmıştır.
Ducarmon ve ark. (2020)	ZymoBiomics, Protokol Q, Magna	3	Magna ile en düşük DNA konsantrasyonu elde edilmiş, en verimli yöntem protokol Q olarak kabul edilmiştir.
Kawada ve ark. (2018)	QuickGene DNA kit, Maxwell RSC kit, FK yöntemi, QIAamp DNA stool mini kit	5	Analizlerde Qiagen kitinde Actinobacteria ve Firmicutes belirgin derecede daha düşük iken, Bacteroidetes diğer üç yönteme göre daha yüksek oranlarda elde edilmiştir.
Panek ve ark. (2018)	MP biomedical, QIAGEN ve MOBIO	4	MP, kalite, konsantrasyonu diğer yöntemlere göre daha iyi olduğundan ve daha geniş bir taksonomik çeşitlilik ortaya çıkarabildiğinden üç yöntem arasında en etkin olanı olarak değerlendirilmiş.
Rintala ve ark. (2017)	Qiagen GmbH, MO BIO Laboratories, GXT(Hain Lifescience GmbH), MP (Roche Diagnostics GmbH), IHMS method	4	Kullanılan yöntemlerin taksonomik çeşitlilik üzerine etkisi vardır ancak düşük seviyededir.

Gerasimidis ve ark. (2016)	chaotropic (CHAO) method, FK (PHEC) extraction, proprietary kit (QIAG)	4	CHAO ve FK da DNA konsantrasyonu fazla Qiagende az. Ancak FK yönteminin kalitesi oldukça düşük. DNA izolasyon yöntemi 16S rRNA ampikon dizileme sonucunu etkilemiştir.
Mackenzie ve ark. (2015)	MoBio Powersoil kit, QIAamp DNA stool mini kit, ZR fecal DNA miniprep kit,HMP metot, FK	3	FK ise en yüksek DNA miktarını vermiştir, taksonomik sınıflandırma sonuçları diğer yöntem ve kitler ile benzer çıkmıştır. Zymo firmasının kiti en düşük DNA miktarını vermiştir, 260/280 değerleri 1.8 den düşüktür. 16S rRNA ampikon dizileme sonuçları diğer yöntemlerden farklı çıkmıştır.
Kennedy ve ark. (2014)	MoBio Powersoil kit, MP Biomedicals FastDNA SPIN Kit	4	MoBio da artmış Bacteroidaceae, Ruminococcaceae and Porphyromonadaceae ve düşük Enterobacteriaceae, Lachnospiraceae, Clostridiaceae ve Erysipelotrichaceae oranları
Avcı ve ark. (bu çalışma)	QIAamp powerfecal DNA kit, ZymoBIOMICS DNA miniprep kit, FK yöntemi	3	En yüksek DNA konsantrasyonu FK da çıkmasına rağmen çalışılan üç yöntem arasında QIAamp kitinden elde edilen bakteriyel genomik DNA'nın saflığı ve kalitesi en başarılısıdır. 16S rRNA ampikon dizileme sonucunda çalışılan diğer yöntemlere göre QIAamp powerfecal kit ile daha yüksek taksonomik çeşitlilik elde edilebilmektedir.

DNA izolasyon yöntemleri bakteriyel genomik DNA kalitesi ve miktarı bakımından karşılaştırıldığında en yüksek DNA miktarı FK yönteminden elde edilmiştir. Ancak filtreli izolasyon sistemlerinden elde edilen DNA ürünleriyle yapılan dizilemede daha fazla sayıda filum tespit edilmiştir (Tablo 17). Yapılan bir çalışmada MoBio Powersoil kit, QIAamp DNA stool mini kit, Zymo ZR fecal DNA Miniprep kit, İnsan mikrobiyom projesi metodu ve FK metodu karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en fazla bakteriyel genomik DNA ürünü FK'dan elde edilirken, 16S rRNA ampikon dizileme sonuçlarında Zymo ZR Fecal DNA Miniprep kit dışında taksonomik çeşitlilik açısından önemli bir fark görülmemiştir. Zymo ZR fecal DNA Miniprep kitinden elde edilen bakteriyel genomik DNA ürününün DNA kalitesi ve miktarı düşük çıkmakla birlikte 16S rRNA ampikon dizileme sonuçları analiz edildiğinde Zymo kitinin diğer yöntemlere göre taksonomik çeşitlilikte özellikle Firmicutes filumu miktarında farklılık gösterdiği

görülmüştür [55]. Yapılan başka bir çalışmada QIA Qiagen GmbH, MOBIO laboratories, GXT Hain Lifescience GmbH, MP Roche Diagnostics, IHMS metodu kullanılmıştır. Bakteriyel DNA izolasyon yöntemlerinin 16S rRNA ampikon dizileme sonuçlarına erkisine bakılmış, elde edilen analizlerde DNA izolasyon yönteminin taksonomik çeşitlilikte majör değişikliklere neden olmadığı sonucuna varılmıştır [56].

DNA izolasyon yöntemlerine kullanılan teknoloji açısından bakıldığında her üç yöntemde de hücreleri mekanik parçalama amaçlı *bead beating* aşaması kullanılmıştır. Ancak FK yönteminden farklı olarak QIAamp Powerfecal kit ve ZymoBIOMICS DNA Miniprep kitlerinde nükleik asitlerin kolay bağlanması, yıkanması ve elüsyonu için spin-column aşaması bulunmaktadır. Üç yöntemden elde edilen bakteriyel genomik DNA'lar spektrofotometrik sonuçlar doğrultusunda karşılaştırıldığında FK yönteminden elde edilen DNA ürününün kalitesi diğer iki yönteme göre daha düşüktür (Tablo 12). Ancak bu durum PZR aşamasında herhangi bir soruna neden olmamıştır. Agaroz jel sonuçları ve spektrofotometrik sonuçlar karşılaştırıldığında üç yönteme de aynı miktarda örnek ile başlanmasına rağmen FK yönteminden elde edilen genetik materyalin konsantrasyonu diğer iki yönteme göre çok daha yüksektir (Tablo 12). Yapılan bir çalışmada karşılaştırılan DNA izolasyon yöntemleri arasında FK yönteminden bakteriyel genomik DNA eldesinin yüksek olmasına rağmen elde edilen DNA'nın kalitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir [57]. Yapılan bir başka çalışmada PL—PureLink Microbiome DNA Purification Kit ve ZR—ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit isimli iki kit karşılaştırılmış, ZymoBIOMICS kitinden elde edilen bakteriyel genomik DNA ürününün miktarı ve saflığı daha yüksek olsa da 16S rRNA ampikon dizileme analiz sonuçlarında iki kitten elde edilen sonuçların taksonomik çeşitliliği arasında belirgin bir fark görülmemiştir [58].

16S rRNA ampikon dizileme veri analizi sonucunda en kapsamlı veri filtreli ticari kitlerle (Qiagen (7 filum) ve Zymo (6 filum)) elde edilen örnekler ile sağlanmıştır (Tablo 16). Fenol klorofom DNA izolasyon yöntemi (5 filum) ile elde edilen DNA miktarı yüksek olmasına rağmen bakteriyel kompozisyon temsiline filtreli kitlere göre daha başarısız olduğu görülmüştür. Örnekler arası karşılaştırmalarda *Bacterioides* filumunun tespitinin filtreli QIAamp Powerfecal DNA Kit izolasyonlarında daha etkin olduğu görülmüştür (Şekil 21). Sonuçlar *Firmicutes* ve *Bacterioides* filumlarının göreceli bollukları açısından değerlendirildiğinde fenol kloroform ve zymo kiti ile

gerçekleştirilen DNA izolasyonlarından G2Z örneği dışında birbirine oldukça benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. G2Z örneğinin, G2F'den ~ % 72, G2Q'dan ise ~% 63 daha düşük okuma sayısına sahip olmasını G2Z örneğindeki bu farklılığın nedeni olarak görmekteyiz (Tablo 15). G2Z örneğinin okuma sayısının düşük olmasının nedeninin örneğin yükleme konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Dizileme çıktıları gönüllülerin İBM kompozisyonunda en bol görülen diğer üç filum olan Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia için değerlendirildiğinde, fenol kloroform ve Zymo kiti ile gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonucunda elde edilen göreceli bolluk oranlarının bu filumlar için benzer olduğu, Qiagen'le elde edilen sonuçların ise özellikle Proteobacteria, Actinobacteria filumları için diğer yöntemlerden farklı olduğu görülmektedir (Şekil 21).

MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit ile Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kitin karşılaştırıldığı bir çalışmada elde edilen bakteriyel genomik DNA ürünlerinin kalite, saflık ve miktarları benzer olsa da 16S rRNA dizileme analiz sonuçları filum seviyesinde incelendiğinde MoBio kitinin Firmicutes ve Actinobacteria bolluklarının Qiagen kitine göre yüksek olduğu, Bacteroidetes filumunun bolluğunun ise Qiagen kitine göre belirgin seviyede daha düşük olduğu tespit edilmiştir [59]. Yapılan başka bir çalışmada QuickGene DNA kit, Maxwell RSC kit, FK yöntemi, QIAamp DNA stool mini kit karşılaştırılmış 16S rRNA dizileme analiz sonuçları filum seviyesinde incelendiğinde diğer üç yöntem taksonomik çeşitlilik açısından benzer sonuçlar elde ederken QIAamp DNA stool mini kit Actinobacteria ve Firmicutes filumlarının bollukları belirgin derecede daha düşük iken, Bacteroidetes filumunun bolluğu diğer yöntemlere göre yüksek çıkmıştır [60]. Literatürdeki bir çalışmada farklı DNA izolasyon kitleri karşılaştırılmış ve analizlerde Qiagenin aynı örnekte taksonomik çeşitliliği daha yüksek ortaya çıkarabildiği görülmüştür [45]. Yapılan başka bir çalışmada Zymo'nun karşılaştırılan diğer bakteriyel DNA izolasyon yöntemlerine göre gram (-) bakterilerin izolasyonlarında daha başarılı olduğu tespit edilmiştir [61]. Farklı DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kullanılan manuel izolasyon yönteminin ticari kitlere göre daha yüksek okuma verdiği görülmüştür [46].

Çalışılan yöntemler arasında FK yönteminin DNA kalite ve saflığının diğer iki yönteme göre daha düşük olduğu görülmüştür. Elde edilen bakteriyel genomik DNA'nın saflığı ve kalitesinin amplikon dizileme sonucuna etkisi olmadığı yönünde görüşler bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada DNA izolasyon yöntemlerinin 16S rRNA

amplikon dizileme sonuçlarına etkisi araştırılmış ancak elde edilen DNA'nın saflığı ve kalitesinin dizilemedeki okuma sayısına anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür [46]. Bununla birlikte DNA kalite ve saflığının PCR yönteminin etkinliği ile doğrudan ilişkili olması ve PCR başarısının dizileme sonuçlarını doğrudan etkilemesi nedeniyle yüksek kalite ve saflıktaki DNA'nın amplikon dizileme yöntemi için önemli bir kriter olduğu söylenebilir.

Amplikon dizileme hassas bir yöntemdir ve çalışmanın aşamalarından etkilenebilmektedir. Bu aşamalardan biri DNA izolasyon yöntemidir. Çalışmalar göstermektedir ki amplikon dizileme için kullanılacak DNA izolasyon yöntemi amplikon dizileme sonuçlarını doğrudan etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışma farklı DNA izolasyon yöntemlerinin amplikon dizileme sonucunda farklı mikrobiyal komüniteleri ortaya çıkarabildiğini göstermiştir [62]. Başka bir çalışmada MP Biomedicals, QIAGEN ve MO BIO kitleriyle bakteriyel genomik DNA izolasyonu yapılmış ve 16S rRNA amplikon dizileme sonucuna etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda MP kitinden elde edilen bakteriyel genomik DNA'nın kalite saflık ve miktarının diğer iki yönteme göre belirgin derecede yüksek olduğu aynı zamanda yüksek taksonomik çeşitlilik sağlaması nedeniyle İBM kompozisyonunu daha doğru temsil ettiği sonucuna varılmıştır [63]. Farklı DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada *bead beating* aşamasıyla mekanik etki uygulanıp amplikon dizileme işlemi gerçekleştirildiğinde gram pozitif bakterilerin *bead beating* aşaması uygulanmamış yöntemlere göre belirgin şekilde daha çok izole edilebildiği görülmüştür[11]. Qiagen DNeasy blood and Tissue ve ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit'in amplikon dizileme sonucuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın analiz sonuçlarında aile ve cins seviyesinde bazı taksonomik farklılıklar görülmesine rağmen sınıf seviyesine kadar belirgin bir farklılık görülmemiştir [64].

DNA izolasyon yöntemlerinin İBM'ye etkisi geçmişte de çalışılmış ve çalışılmaya devam eden bir konudur. Geçmişte İBM analizinde geleneksel yöntemler kullanılmaktaydı ancak bu yöntemler İBM kompozisyon analizinde kısıtlamalara sahipti. İBM analizinde HTS sistemlerinin kullanılması ise bu alanda göreceli olarak henüz yeni sayılmaktadır. HTS sistemleri çalışmanın basamaklarından etkilenebilmektedir ve DNA izolasyon yöntemi bu basamaklar arasında en önemlilerinden biridir. Dışkı örneği amplikon dizilemeyi etkileyecek inhibitörler

içerdiğinden yeterli kalitede ve konsantrasyonda DNA izole etmek oldukça önemlidir. DNA izolasyon yöntemi seçiminde DNA izolasyon yönteminin HTS çalışmalarına etkisini inceleyen çalışmaların literatürdeki yeri önemlidir. Çalışmamıza benzer bir proje ülkemizde gerçekleştirilmiştir. Ancak ülkemizde İBM analizinde farklı DNA izolasyon yöntemleri kullanılarak 16S rRNA ampikon dizileme sonucuna etkisini araştıran çalışma bulunmadığından çalışmamız gelecekte bu alanda yapılacak çalışmalara katkı sağlaması açısından önemlidir.

Çalışmamızda Illumina sistemlerinden kaynaklı olabileceği düşünülen bir problem nedeniyle biyoinformatik analiz sonucunda elde edilen okumaların yaklaşık %50'si taksonomik olarak sınıflandırıl原因amamıştır (Tablo 15). Bu nedenle çalışmanın analizi en iyi çözünürlüğün olduğu filum seviyesinde tutulmuştur. Filtreli ticari kitler ve fenol klorofom izolasyonlarından yeterli miktarda DNA elde edilmiş ve 16S ampikon dizileme sonucunda ortalama 83.683 okuma elde edilmiştir. Bu okuma değeri kalite kontrol değerlendirmesinde kabul edilebilir ve başarılı bir değer olarak değerlendirilebilir. Ancak buna rağmen taksonomik olarak sınıflandırıl原因abilen ortalama okuma sayıları oldukça düşüktür (ortalama 40.603 okuma). Dizileme hizmeti sağlayan firma ile yapılan ortak çalışmalarda bu tutarsızlığın nedeni olarak teknik bir sorun değerlendirmesi yapılmıştır. YND teknolojileri genomik çalışmalarda umut vaat eden, hassas ve bilgi verici teknolojiler olarak kabul edilse de hala teknik hata üretme ve analiz algoritmalarındaki eksiklikler nedeni ile sorunlar ortaya çıkabilmektedir.

Taksonomik olarak sınıflandırıl原因abilen kaliteli oluma sayısının düşük olması, çözünürlüğün azalmasına neden olmuştur. Bu nedenle taksonomik seviyeler içerisinde çözünürlüğün en az etkilediği seviye filum olduğu için analizler sadece filum düzeyinde gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak;

- Farklı DNA izolasyon yöntemleri DNA kalite, saflık ve konsantrasyonun etkilemektedir.
- Prosedüründe herhangi bir filtre aşaması bulunmayan DNA izolasyon yöntemlerinde elde edilen DNA'nın saflığı düşük olmaktadır.
- Farklı DNA izolasyon yöntemleri ampikon dizileme sonucunda farklı mikrobiyal komünitelerin görülmesini sağlayabilir.

- Farklı DNA izolasyon yöntemleri mikrobiyal kompozisyonun göreceli bolluk değerlerinde farklılıklar görülmesine neden olabilir.



KAYNAKLAR

- [1] V. C. Lombardi *et al.*, “Nutritional modulation of the intestinal microbiota: future opportunities for the prevention and treatment of neuroimmune and neuroinflammatory disease,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 61, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.04.004.
- [2] V. D’Argenio and F. Salvatore, “The role of the gut microbiome in the healthy adult status,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 451, pp. 97–102, 2015, doi: 10.1016/j.cca.2015.01.003.
- [3] S. A. Sankar, J. C. Lagier, P. Pontarotti, D. Raoult, and P. E. Fournier, “The human gut microbiome, a taxonomic conundrum,” *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 38, no. 4, pp. 276–286, 2015, doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.004.
- [4] M. C. Collado, C. B  uerl, and G. P  rez-Mart  nez, “Defining microbiota for developing new probiotics,” *Microb. Ecol. Heal. Dis.*, vol. 23, no. 0, 2012, doi: 10.3402/mehd.v23i0.18579.
- [5] E. Rinninella *et al.*, “What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 1, 2019, doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- [6] X. Xiong, S. L. Loo, L. Zhang, and M. M. Tanaka, “Modelling the effect of birth and feeding modes on the development of human gut microbiota,” 2021.
- [7] G. A. Cresci and E. Bawden, “Gut microbiome: What we do and don’t know,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 30, no. 6, pp. 734–746, 2015, doi: 10.1177/0884533615609899.
- [8] T. Thomas, J. Gilbert, and F. Meyer, “Metagenomics: A guide from sampling to data analysis,” *Role Bioinforma. Agric.*, no. Figure 1, pp. 357–383, 2014, doi: 10.1201/b16568.
- [9] J. M. Nechvatal *et al.*, “Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 72, no. 2, pp. 124–132, 2008, doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.007.
- [10] K. Leigh Greathouse, R. Sinha, and E. Vogtmann, “DNA extraction for human microbiome studies: The issue of standardization,” *Genome Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–4, 2019, doi: 10.1186/s13059-019-1843-8.

- [11] M. Y. Lim, E. J. Song, S. H. Kim, J. Lee, and Y. Do Nam, "Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 151–157, 2018, doi: 10.1016/j.syapm.2017.11.008.
- [12] B. Smith, "Optimising Bacterial DNA Extraction from Faecal Samples: Comparison of Three Methods," *Open Microbiol. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 14–17, 2011, doi: 10.2174/1874285801105010014.
- [13] J. LEDERBERG and A. T. B. T.-T. S. MCCRAY, "'Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words," vol. 15, no. 7, p. 8, Jun. 2001, [Online]. Available: <https://link.gale.com/apps/doc/A73535513/AONE?u=anon~293c604b&sid=googleScholar&xid=d7d6d98a>.
- [14] N. Weinstein, B. Garten, J. Vainer, D. Minaya, and K. Czaja, "Managing the microbiome: How the gut influences development and disease," *Nutrients*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/nu13010074.
- [15] J. S. Kim and C. B. de La Serre, "Diet, gut microbiota composition and feeding behavior," *Physiol. Behav.*, vol. 192, no. December 2017, pp. 177–181, 2018, doi: 10.1016/j.physbeh.2018.03.026.
- [16] K. Al-Assal, A. C. Martinez, R. S. Torrinhas, C. Cardinelli, and D. Waitzberg, "Gut microbiota and obesity," *Clin. Nutr. Exp.*, vol. 20, pp. 60–64, 2018, doi: 10.1016/j.yclnex.2018.03.001.
- [17] M. Levy, A. A. Kolodziejczyk, C. A. Thaiss, and E. Elinav, "Dysbiosis and the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 219–232, 2017, doi: 10.1038/nri.2017.7.
- [18] C. Petersen and J. L. Round, "Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease," *Cell. Microbiol.*, vol. 16, no. 7, pp. 1024–1033, 2014, doi: 10.1111/cmi.12308.
- [19] A. S. Neish, "Microbes in Gastrointestinal Health and Disease," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 1, pp. 65–80, 2009, doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080.
- [20] E. Ragonnaud and A. Biragyn, "Gut microbiota as the key controllers of 'healthy' aging of elderly people," *Immun. Ageing*, vol. 18, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1186/s12979-020-00213-w.
- [21] M. Costa and J. S. Weese, "Methods and basic concepts for microbiota

- assessment,” *Vet. J.*, vol. 249, pp. 10–15, 2019, doi: 10.1016/j.tvjl.2019.05.005.
- [22] L. Gao, T. Xu, G. Huang, S. Jiang, Y. Gu, and F. Chen, “Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body,” *Protein Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 488–500, 2018, doi: 10.1007/s13238-018-0548-1.
- [23] J. Yang and J. Yu, “The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get,” *Protein Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 474–487, 2018, doi: 10.1007/s13238-018-0543-6.
- [24] Y. X. Liu *et al.*, “A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data,” *Protein Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 315–330, 2021, doi: 10.1007/s13238-020-00724-8.
- [25] M. Kim, M. Morrison, and Z. Yu, “Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 84, no. 1, pp. 81–87, 2011, doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.020.
- [26] J. M. Janda and S. L. Abbott, “16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 9, pp. 2761–2764, 2007, doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- [27] B. Yang, Y. Wang, and P. Y. Qian, “Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis,” *BMC Bioinformatics*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.
- [28] K. Fukuda, M. Ogawa, H. Taniguchi, and M. Saito, “Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene,” *J. UOEH*, vol. 38, no. 3, pp. 223–232, 2016, doi: 10.7888/juoeh.38.223.
- [29] E. Moore, A. Arnscheidt, A. KrÜger, C. StrÖmpl, and M. Mau, “Section 1 update: Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures,” *Mol. Microb. Ecol. Man.*, no. January, pp. 1905–1919, 2008, doi: 10.1007/978-1-4020-2177-0_101.
- [30] M. Rajilić-Stojanović and W. M. de Vos, “The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 5, pp. 996–1047, 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12075.
- [31] J. Marmur, “A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms,” *J. Mol. Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 208-IN1, Apr. 1961, doi: 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
- [32] M. R. SALTON, “The lysis of micro-organisms by lysozyme and related

- enzymes,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 481–490, 1958, doi: 10.1099/00221287-18-2-481.
- [33] A. Helenius and K. Simons, “Solubilization of membranes by detergents.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 415, no. 1, pp. 29–79, Mar. 1975, doi: 10.1016/0304-4157(75)90016-7.
- [34] H. Noll and E. Stutz, “[103b] The use of sodium and lithium dodecyl sulfate in nucleic acid isolation,” *Methods Enzymol.*, vol. 12, no. PART B, pp. 129–155, Jan. 1968, doi: 10.1016/0076-6879(67)12124-1.
- [35] Y. L. Tsai and B. H. Olson, “Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 4, pp. 1070–1074, 1991, doi: 10.1128/aem.57.4.1070-1074.1991.
- [36] J. A. Gordon and W. P. Jencks, “The Relationship of Structure to the Effectiveness of Denaturing Agents for Proteins,” *Biochemistry*, vol. 2, no. 1, pp. 47–57, Jan. 1963, doi: 10.1021/bi00901a011.
- [37] M. Balcı, “Fenol Tayini İçin Elektrokimyasal Yöntem Geliştirilmesi,” *Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2010, 201.1.004.
- [38] W. H. Taylor, “I. The structure of analcite ($\text{NaAlSi}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$),” *Zeitschrift für Krist. - Cryst. Mater.*, vol. 74, no. 1–6, pp. 1–19, 1930, doi: 10.1524/zkri.1930.74.1.1.
- [39] C. T. Comey *et al.*, “DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis,” *J. Forensic Sci.*, vol. 39, no. 5, p. 13711J, 1994, doi: 10.1520/jfs13711j.
- [40] H. E. McKiernan and P. B. Danielson, *Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science*. Elsevier Ltd, 2017.
- [41] K. Wilson, “Preparation of Genomic DNA from Bacteria,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 56, no. 1, pp. 2.4.1-2.4.5, Oct. 2001, doi: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
- [42] D. Sever Kaya and B. Saka, “İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması,” *Istanbul Univ. Inst. Heal. Sci. J. Adv. Res. Heal. Sci.*, vol. 3, no. 3, 2020, doi: 10.26650/jarhs2020-792223.
- [43] S. Claassen, E. du Toit, M. Kaba, C. Moodley, H. J. Zar, and M. P. Nicol, “A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits

- for extraction of DNA from faecal samples,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 94, no. 2, pp. 103–110, 2013, doi: 10.1016/j.mimet.2013.05.008.
- [44] N. A. Kennedy *et al.*, “The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing,” vol. 9, no. 2, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088982.
- [45] A. L. McOrist, M. Jackson, and A. R. Bird, “A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 50, no. 2, pp. 131–139, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00018-0).
- [46] M. L. Hart, A. Meyer, P. J. Johnson, and A. C. Ericsson, “Comparative evaluation of DNA extraction methods from feces of multiple host species for downstream next-generation sequencing,” *PLoS One*, vol. 10, no. 11, pp. 1–16, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0143334.
- [47] D. S. Kaya, “Microcystis Spp. De Microcystin Üretiminden Sorumlu Genlerinin Tespiti,” Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- [48] S. Spada, N. P. Rudqvist, and E. Wennerberg, *Isolation of DNA from exosomes*, 1st ed., vol. 636. Elsevier Inc., 2020.
- [49] Illumina, “16S Metagenomic Sequencing Library,” *Illumina.com*, no. B, pp. 1–28, 2013, [Online]. Available: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.
- [50] A. Klindworth *et al.*, “Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1093/nar/gks808.
- [51] S. Thijs *et al.*, “Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. MAR, pp. 1–15, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00494.
- [52] I. Abellan-Schneyder *et al.*, “Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing,” *mSphere*, vol. 6, no. 1, 2021, doi: 10.1128/msphere.01202-20.
- [53] K. A. Boesenberg-Smith, M. M. Pessarakli, and D. M. Wolk, “Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting,” *Clin.*

- Microbiol. Newsl.*, vol. 34, no. 1, pp. 1–6, 2012, doi: 10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002.
- [54] L. Crovesy, D. Masterson, and E. L. Rosado, “Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 74, no. 9, pp. 1251–1262, 2020, doi: 10.1038/s41430-020-0607-6.
- [55] B. W. Mackenzie, D. W. Waite, and M. W. Taylor, “Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. FEB, pp. 1–11, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00130.
- [56] A. Rintala *et al.*, “Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16S rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 28, no. 1, pp. 19–30, 2017, doi: 10.7171/jbt.17-2801-003.
- [57] K. Gerasimidis *et al.*, “The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications,” *BMC Res. Notes*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1186/s13104-016-2171-7.
- [58] J. Kazantseva, E. Malv, A. Kaleda, A. Kallastu, and A. Meikas, “Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies,” *BMC Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1186/s12866-021-02233-y.
- [59] E. P. Velásquez-Mejía, J. de la Cuesta-Zuluaga, and J. S. Escobar, “Impact of DNA extraction, sample dilution, and reagent contamination on 16S rRNA gene sequencing of human feces,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 1, pp. 403–411, 2018, doi: 10.1007/s00253-017-8583-z.
- [60] Y. Kawada, Y. Naito, A. Andoh, M. Ozeki, and R. Inoue, “Effect of storage and DNA extraction method on 16S rRNA profiled fecal microbiota in Japanese adults,” *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 64, no. 2, pp. 106–111, 2019, doi: 10.3164/jcbtn.1884.
- [61] Q. R. Ducarmon, B. V. H. Hornung, A. R. Geelen, E. J. Kuijper, and R. D. Zwiittink, “Toward Standards in Clinical Microbiota Studies: Comparison of Three DNA Extraction Methods and Two Bioinformatic Pipelines,” *mSystems*, vol. 5, no. 1, 2020, doi: 10.1128/msystems.00547-19.
- [62] M. J. Claesson *et al.*, “Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 22, 2010, doi:

10.1093/nar/gkq873.

- [63] M. Panek *et al.*, “Methodology challenges in studying human gut microbiota- Effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23296-4.
- [64] M. E. C. Abundo *et al.*, “Assessment of two DNA extraction kits for profilin poultry respiratory microbiota from multiple sample types,” *PLoS One*, vol. 16, no. 1 January, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0241732.



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İNSAN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ FARKLI DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 2	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Michał Walicki. "Developing Bounded Reasoning", Journal of Logic Language and Information, 01/2009 Yayın	<% 1
5	kitaplar.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	repositorio.tec.mx İnternet Kaynağı	<% 1
7	DÜZLÜ, Önder, İNCİ, Abdullah, YILDIRIM, Alparslan, ÖNDER, Zuhale and ÇİLOĞLU, Arif. "Köpek periferik kan örneklerinde Neospora caninum ve Toxoplasma gondii takizoitlerinin	<% 1