

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Yüksek oranda fenolik bileşen içeren *Thymus* (Lamiaceae) türlerinin modifiye edilmiş CTAB yöntemiyle genomik DNA izolasyonu

Genomic DNA isolation of *Thymus* (Lamiaceae) species containing a high rate of phenolic components using the modified CTAB method

Damla KİY^a, Hüseyin Aşkın AKPULAT^{a*}

^aSivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58000, Sivas, Türkiye

Article Info

©2024 Ali Nihat Gökyiğit Botanical Garden Application and Research Center of Artvin Coruh University.

*Corresponding author:

e-mail: aakpulat@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-8394-2746

Article history

Received: May 14, 2024

Received in revised form: June 12, 2024

Accepted: June 26, 2024

Available online: June 29, 2024



This is an Open Access article under the CC BY NC ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anahtar Kelimeler: *Thymus*, DNA izolasyonu, CTAB, PVP 40, STE

Keywords: *Thymus*, DNA isolation, CTAB, PVP 40, STE

Öz

Sistematik botanik çalışmalarında morfolojik karakterlerin yetersiz kaldığı durumlarda moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmanın güvenilir olabilmesi için kaliteli ve yeterli miktarda DNA elde edilmelidir. Bu çalışmada *Thymus* L. cinsine ait bazı taksonlar kullanılarak 3 farklı izolasyon yöntemi denenmiştir. Araştırmalarımız ile klasik CTAB yöntemi modifiye edilmiştir. Yapılan yeni protokole CTAB protokolüne ek olarak STE, PVP 40 gibi kimyasallar eklenmiş ve bazı inkübasyon süreleri değiştirilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen DNA'da klasik yöntemlere ve hazır kit kullanımına oranla daha saf genomik DNA'nın elde edildiği görülmüştür.

ABSTRACT

In cases where morphological characters are insufficient in systematic botanical studies, molecular studies are carried out. For the study to be reliable, high quality and sufficient amount of DNA must be obtained. In this study, 3 different isolation methods were tried using some taxa belonging to the *Thymus* L. genus. With our research, the classical CTAB method has been modified. In the new protocol, in addition to the CTAB protocol, chemicals such as STE and PVP 40 were added and some incubation times were changed. It has been observed that purer genomic DNA was obtained from the DNA obtained as a result of isolation compared to classical methods and the use of ready-made kits.

Citation:

To cite this article: Kiy D, Akpulat HA (2024). Yüksek oranda fenolik bileşen içeren *Thymus* (Lamiaceae) türlerinin modifiye edilmiş CTAB yöntemiyle genomik DNA izolasyonu. *Turk J Biod* 7(1): 11-16. <https://doi.org/10.38059/biodiversity.1483575>

1. GİRİŞ

Aromatik bitkiler, doğal olarak oluşan polifenolikler, fenolikler ve flavonoid (Maltas vd., 2011) içerdiklerinden dolayı bitki araştırmacıları tarafından sistematik ve moleküler çalışmalarda daha fazla ilgi çekmektedir. Bu bileşikler, proteinleri parçalayabildikleri veya enzimlere müdahale edebildikleri için bu tür dokulardan nükleik asit veya protein ekstraksiyonunda zorluklar yaşanmaktadır (Hills & Staden, 2002). Fenolik bileşikler DNA ekstraksiyonu sırasında nükleik asitlere bağlanarak DNA'nın parçalanmasına sebep olur. Bu nedenle bitkilerden

yüksek saflıkta ve miktarda DNA elde edebilmek için klasik CTAB yöntemine (Doyle & Doyle, 1990) bazı modifikasyonlar (Drábková, 2014) uygulanmalıdır.

Lamiaceae familyasına ait *Thymus* L. cinsi bu gruba en iyi örneklerden biridir (Aneva vd., 2022). Uzun yıllardır halk arasında tedavi edici özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılan bu bitkinin yoğun uçucu yağ içeriğiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Henüz evrimini tamamlamamış olan *Thymus* L. kimyasal polimorfizm ve kolay melez oluşturma özelliklerinden dolayı çiçekli bitkilerin taksonomik olarak sorunlu türlerindendir (Yıldız vd., 2004).

Sistematik çalışmalar öncelikle morfolojik veya anatomik özellikler (Deniz, 2007) dikkate alınarak yapılmaktadır. Fakat *Thymus* L. gibi cinslerde bu veriler yetersiz kaldığı için güvenilir bir sonuç elde edilememektedir. Bu gibi durumlarda moleküler çalışmaların önemi daha da artmaktadır (Demirpolat, 2017).

Bitki moleküler biyolojisi çalışmalarının en önemli adımı yüksek kalitede genomik DNA elde etmektir (Şimşek vd., 2008). Bitkilerden genomik DNA izole edebilmek için hücre zarının eritilmesi (Sancar, 2021), proteinlerden arındırılması, fenolik bileşenlerin uzaklaştırılması ve sekonder metabolitlerin yıkanması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan birçok izolasyon protokolü vardır. Fakat her bitkinin biyokimyasal yapısının farklı olmasından dolayı her protokol her takson için başarılı sonuç veremeyebilir.

Bu çalışmamızda da klasik CTAB yönteminin veya hazır kitlerin sonuç vermediği *Thymus* L. cinsine ait bazı

taksonlar kullanılarak yeni bir protokol denenmiştir. *Thymus* L. cinsi içerdiği bileşenlerden dolayı tıp, eczacılık, parfümeri, kozmetik gibi birçok alanda kullanımı yaygın olan önemli bir bitki grubudur. Bu yüzden bu türlerin taksonomik olarak yerlerinin belirlenmesi de sistematikçiler tarafından oldukça önemlidir. Bu araştırma ile ilerde bu cinse dahil türler üzerinde yapılacak olan moleküler filogenetik çalışmalarına katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitki Örnekleri

Bu çalışmada kullanılan bitki örnekleri Prof. Dr. H. Aşkın Akpulat ve Prof. Dr. Bayram Yıldız tarafından Sivas ilinde toplanmıştır. Toplanan türler preslenerek kurutulup herbaryum materyali haline getirilmiştir.

Tablo 1. DNA izolasyonu yapılan türler ve lokaliteleri

Takson	Lokalite
<i>Thymus cappadocicus</i> var. <i>cappadocicus</i>	B6 Sivas: Gürün-Kangal arası, Böğrüdelik köyü batısı, kalker kayalıkları, 2000-2100m, 04.07.1997, B. YILDIZ, 14250!
<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	B6 Sivas: Hafik, Lota Gölleri doğu kısmı, jipsli alanlar, 1295-1300 m., 20.07.2017, Akpulat, 6354!
<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pallasicus</i>	B6 Sivas: Şarkışla, Kayadibi-Yeniçubuk arası, 1300-1400m, 12.06.2003, Akpulat, 3305!
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i>	B6 Sivas: Hafik, Lota Gölleri doğu kısmı, jipsli alanlar, 1295-1300 m., 27.06.2017, Akpulat, 6396!
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>rosulans</i>	B6 Sivas: Hafik, Lota Gölleri batı kısmı, jipsli alanlar, 1290-1295 m., 27.06.2017, Akpulat, 6390!
<i>Thymus leuchotrichus</i> var. <i>leuchotrichus</i>	Sivas: Suşehri-Zara arası, Arabca k. Kuzeyi, Quercus çalılığı, 1300m, 30.06.1985, B. YILDIZ, 6112!
<i>Thymus convolutus</i>	Sivas: Divriği, Gedikbaşı köyü, kaya üzeri, 1100m, 11.07.1999, B. YILDIZ, 14471!
<i>Thymus fallax</i>	B7 Sivas: İmranlı, Kızıl Da, bazalt, 2200m, 22.07.2000, B. YILDIZ, 14901!

2.2. DNA izolasyon metodları

2.2.1. EZ-10 Spin Column Genomic DNA isolation kit protokolü

Kullanılan Kimyasallar:

1. Buffer PCB
2. Buffer BD

3. PW Solüsyonu
4. Yıkama Solüsyonu
5. TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)
6. EZ-10 Column & Collection Tube
7. İzopropanol
8. β -merkaptöetanol
9. Etil alkol (%96)
10. RNaz
11. Kloroform

Kit ilk defa kullanılıyorsa PW solüsyonuna 24 ml izopropanol, yıkama solüsyonuna ise 45 ml etanol eklenip 65°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilmelidir. Daha sonra kimyasallar kullanıma hazır gelecektir.

Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir; 100 mg taze veya 20 mg kurutulmuş bitki dokusu sıvı azot ile öğütülür. Örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılır. 600µl Buffer PCB ve 12 µl β -merkaptotanol eklenerek vortekslenir. 25 dakika boyunca 65°C inkübasyona bırakılır. Eğer RNA içermeyen bir izolat elde edilmek isteniyorsa tüplere 20 µl RNaz eklenip vortekslenir. Daha sonra tüplere 0,6 ml kloroform eklenir. İyice karıştırılmak suretiyle en az on defa alt üst edilmelidir. 12000 g'de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant yeni tüplere aktarılır. Yeni tüplerin üzerine 200 µl Buffer BD eklenip vorteksle karıştırılır. Eğer bu aşamada jelatinimsi bir yapı oluşursa 70°C'de 10 dakika inkübe edilmelidir. 200 µl, %96'lık etanolde eklendikten sonra elde edilen karışım EZ-10 kolonlarına aktarılır. 9000 g'de 1 dakika santrifüj edilir ve kolonun altında kalan kısım dökülür. 500 µl PW solüsyonu eklenip 9000 g'de 1 dakika santrifüj edilir ve kolonun dibindeki çökelti atılır. 500 µl yıkama solüsyonu eklenip tekrar 1 dakika süresince 9000 g'de santrifüj edilir. Yine kolonun altındaki çökelti uzaklaştırılır. Kolonun üst kısmında elde edilmek istenen DNA bulunur. Daha temiz bir DNA için 2 dakika boyunca 9000 g'de santrifüj edilip kimyasalların uzaklaşması sağlanır. 50 veya 100 µl TE Buffer eklenip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip 1 dakika boyunca da 9000 g'de santrifüj edilir.

2.2.2. CTAB protokolü

Kullanılan Kimyasallar:

1. CTAB tamponu (2 gr %2'lik CTAB, 28 ml 5M NaCl, 40 ml 0,5M EDTA, 10 ml 0,1M Tris-HCl, 20 ml dH₂O)
2. β – merkaptotanol
3. Kloroform:izoamil alkol (24:1)
4. İzopropanol
5. Etil alkol (%70)
6. TE Tamponu (1 ml 1M Tris-HCl ph: 8,0, 0,2 ml 0,5M EDTA ph: 8,0 ve dH₂O)

Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir; yaklaşık 1 g taze ya da 100 g kuru bitki dokusu sıvı azot ile bir havan içerisinde parçalanır. Parçalanmış doku 2 ml'lik tüplere aktarılır ve üzerine 500 µl CTAB eklenir. Daha sonra 5 µl β -merkaptotanol eklenir ve vortekslenir. Ardından bir saat süreyle 65°C'de inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrasında tüpler 14000 rpm'de 20°C'de 10 dakika

boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant yeni tüplere aktarılır ve pelet atılır. Yeni tüplerin üzerine 750 µl 24:1 oranında kloroform:izoamil alkol eklenerek alt üst edilir. Tekrar 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüjden sonra tüplerde 3 faz görünür. En altta fenolik bileşenler, orta fazda bitki partikülleri ve en üstteki fazda ise DNA'yı içeren renksiz sulu faz bulunur. En üstteki sulu faz yeni tüplere aktararak üzerine 450 µl izopropanol eklenip 24 saat boyunca -20°C'de bekletilir. 24 saatin sonunda tüpler çıkarılıp 14000 rpm'de +4°C'de 10 dakika süresince santrifüj edilir. Santrifüjden sonra tüpün en dip kısmında pelet halinde DNA'nın görünmesi gerekir. Tüpte kalan izopropanol dökülüp tamamen uzaklaştırılır. Üzerine 500 µl %70'lik etil alkol eklenir ve DNA'nın yıkanması sağlanır. Yıkama işleminden sonra yeniden 14000 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edilir. Gerek görülürse bu işlem birkaç defa tekrarlanabilir. Son olarak tüpler kurutma kağıdı üzerinde yan yatırılarak etil alkolün uçup uzaklaşması beklenir. Kuruyan pelet üzerine de 50 µl TE tamponu eklenip DNA'nın çözünmesi sağlanır.

2.2.3. Modifiye edilmiş CTAB yöntemi

Kullanılan Kimyasallar:

1. STE (0,25 M sükroz, 0,03 M Tris, 0,05 M EDTA)
2. CTAB (1,4 M NaCl, 0,2 M EDTA, 100 mM Tris/HCl pH: 8,03)
3. PVP (%10)
4. β – merkaptotanol (%1)
5. Kloroform:izoamil alkol (24:1)
6. İzopropanol
7. Etil alkol
8. Molecular Grade Water

Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir; 1 g kuru yaprak havanda sıvı azot ile toz haline getirilene kadar ezilir. 2000 µl'lik tüplere aktarılır. Toz haline gelen örnek üzerine 1 ml STE tamponu eklenir ve vorteks ile homojen şekilde karıştırılır. Daha sonra 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılır. Ardından 600 µl CTAB tamponu, %10'luk PVP'den 200 µl ve %1'lik β – merkaptotanol'den ise 12 µl eklenir. Tüpler vorteks yardımıyla homojen hale getirilir ve bir saat süreyle 65° C'de inkübe edilir. Inkübasyon işlemi bitince örnekler 10.000 rpm, + 4° C'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst faz yeni

tüpe aktarılır ve pelet atılır. Üst fazla eşit hacimde olacak şekilde kloroform:izoamil alkol eklenir ve vortekslenir. 10.000 rpm, + 4°C'de on dakika santrifüj edildikten sonra üst faz tekrar yeni bir tüpe aktarılır. Üst fazın hacmi kadar soğuk izopropanol eklenir. 24 saat boyunca örnekler -20°C'de bekletilir. İzopropanol DNA molekülünün çökmesini sağlar. 24 saatin sonunda çıkarılan örnekler 14.000 rpm, + 4°C'de on dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra DNA pelet olarak tüpün dibinde görünür hale gelecektir. İzopropanol tamamen uzaklaştırılarak %70'lik EtOH ile DNA yıkanır. Etil alkolü uzaklaştırmak için 14.000 rpm, + 4°C'de 5 dakika santrifüj yapılır. Tüpler kurutma kağıdı üzerinde yan yatırılarak etil alkolün tamamen uçması sağlanır. Son olarak pelet üzerine molecular grade water eklenerek çözündürülür.

2.3. Elektroforez ve saflık tayini

İzole edilen DNA'ların elektrik akımıyla yürütülmesi sağlanır. Bunun için %1'lik agaroz jel hazırlanır. Hazırlanışı şu şekildedir; 1 g agaroz terazide tartılır ve behere konulur. Üzerine 100X Tris/EDTA tamponu eklenir ve mikrodalgada kaynatılır. Kaynatma işlemi

bitince 1 µl etidyum bromür eklenir. Etidyum bromür UV translimunator üzerinde DNA'nın görünür olmasını sağlar. 80 W'da 45 dakika boyunca elektroforezde koşturulur.

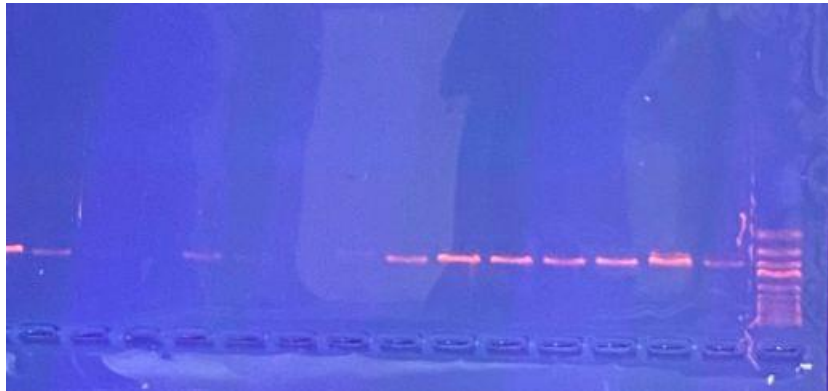
Elde edilen genomik DNA'nın saflık derecesini belirlemek için nanodrop cihazı ile 260 ve 280 nm'de absorbans değerleri alınır. Bu değerlerin A_{260} / A_{280} nm oranları hesaplanır.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Lamiaceae familyasına ait bitkilerin fenolik bileşen ve sekonder metabolit içeriklerinden dolayı araştırmacıların oldukça dikkatini çekmektedir. Ancak bu içeriklerinden dolayı moleküler çalışmaların yapılmasında da bazı zorluklar yaşanmaktadır. Moleküler çalışmaların başarılı olabilmesi için genomik DNA'nın izole edilebilmesi gerekmektedir. Lamiaceae familyasındaki fenolik bileşenler izolasyon aşamasında DNA'nın kırılmasına veya saf bir şekilde izole edilmesinde engel oluşturmaktadır.



Şekil 1. EZ-10 DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen gDNA'nın jel görüntüsü



Şekil 2. Klasik CTAB yöntemi ile izole edilen gDNA'nın jel görüntüsü



Şekil 3. Modifiye edilen CTAB yöntemi ile izole edilen gDNA'nın jel görüntüsü

Tablo 2. Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen gDNA'ların A₂₆₀ / A₂₈₀ oranları

	<i>Thymus cappadocicus</i>	<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pallasicus</i>	<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i>	<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>rosulans</i>	<i>Thymus leuchotrichus</i>	<i>Thymus convolutus</i>	<i>Thymus fallax</i>
EZ-10 Kit	0.872	0.564	0.652	0.924	0.854	0.451	0.554	0.745
CTAB	1.258	1.302	1.045	1.345	0.974	1.245	1.157	1.008
Mod. CTAB	1.924	1.851	1.801	1.840	1.785	1.914	1.648	1.715

Bu çalışmada Sivas ilinde yetişen Lamiaceae familyasına ait *Thymus* L. cinsine ait 8 takson kullanılmıştır. Bu taksonlar için 3 farklı izolasyon yöntemi denenmiştir. İlk olarak hazır izolasyon kiti kullanılmıştır ve izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Çalışmanın güvenilirliğini anlayabilmek için pozitif ve negatif kontrollerde dahil edilmiştir. Jel görüntüleri Şekil 1' de gösterilmiştir. Jelde pozitif kontrol dışında bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Nanodrop ölçümleri de ortamda bulunan protein fazlalığına dikkat çekmektedir. Bu yöntemde DNA'nın saflık değeri düşük olduğu için farklı bir yöntem denenmiştir.

Klasik CTAB yöntemi hazır kit kullanımına oranla daha fazla zaman ve uğraş gerektiren bir yöntemdir. Fakat kite göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Şekil 2' de zayıf ve silik bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantlar istenilen kalite ve miktarda DNA olmadığını gösterse de nanodrop ölçümleriyle de gözlemin doğruluğu kanıtlanmıştır. Bu yöntemde de protein kirliliği oldukça fazla olmasına rağmen kit kullanımına göre daha az olduğu

görülmektedir. Saf DNA eldesi için bu yöntemin de uygun olmadığı anlaşılmıştır.

Modifiye ettiğimiz CTAB yöntemi de daha uzun ve ağır kimyasallar içeren bir yöntemdir. Bu yöntemle izole edilen DNA'lar da %1'lik agaroz jelde koşturulup UV transilluminator ile görüntülenmiştir. Şekil 3' de görüldüğü gibi bütün türlerde başarılı bir izolasyon yapılmış olup herhangi bir kirliliğe rastlanmamıştır. Yapılan deneylerde STE işleminin iki defa yapılmasının fenolik bileşikler uzaklaştırmada daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca STE ile bitkilerde selülozun birikmesiyle oluşan ikincil hücre zarının parçalanması sağlanır. Her cins veya tür için izolasyon yöntemlerinde bazı değişiklikler yapılması gerekebilir. Çünkü her bitki içeriği birbirinden farklı bileşenler içermektedir. Bu yöntem zararlı kimyasal maddelerin kullanılmasını gerektiren ve uzun süren bir yöntem olmasına rağmen sonuçlar başarılı olmuştur.

Moleküler biyoloji çalışmalarında izolasyon en önemli aşamadır ve çalışmanın geri kalanını önemli ölçüde

etkilemektedir. İzolasyon sonrası yapılan PCR reaksiyonlarında DNA'nın miktarı ve kalitesi çalışmayı önemli oranda etkilemektedir. Şekil 3'de gösterildiği gibi agaroz jel görüntülerinde RNA veya sekonder metabolit kirlenmesi olmadığı görülmektedir. Bu da izolasyonu yapılan türlerin PCR çalışmaları için uygun olduğunu kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak uyguladığımız bu yöntemin *Thymus* L. türleri için iyi bir yöntem olduğu görülmüştür.

4. KAYNAKLAR

- Aneva I, Zhelev P, Bonchev G, Boycheva I, Simeonova S, Kancheva D (2022). DNA barcoding study of representative *Thymus* species in Bulgaria. *Plants* 11(3): 1-10.
- Demirpolat A (2017). Türkiye'de Yetişen Bazı *Scandix* L. (Apiaceae) Türleri Üzerinde Biyosistemik Araştırmalar. PhD, Fırat University, Elazığ, Turkey.
- Deniz G (2007). Türkiye'de Yetişen *Ziziphora* L. (Lamiaceae) Taksonlarının Moleküler Sistematigi. MSc, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1): 13-15.
- Drábková LZ (2014). DNA Extraction from Herbarium Specimens. *Molecular Plant Taxonomy* 1115:69-84.
- Hills PN, Staden JV (2002). An improved DNA extraction procedure for plant tissues with a high phenolic content. *South African Journal of Botany* 68(4):549-550.
- Maltas E, Vural HC, Yıldız S (2011). Extraction of genomic DNA from polysaccharide and phenolics rich *Ginkgo biloba*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(3):332-339.
- Sancar PY (2021). Çeşitli bitki taksonlarında bazı DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırmalı analizi. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi* 3(1):117-128.
- Şimşek Ö, Karaat FE, Serçe S, Kaçar YA (2008). Bazı meyve türlerinde DNA izolasyon yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi* 25(1): 59-69.
- Yıldız B, Tümen G, Demirkuş N, Adıgüzel N, Akyalçın H, Bahçecioğlu, Z (2004). Türkiye'de Yetişen *Thymus* L. (Lamiaceae) Türlerinin Revizyonu ve Türler Üzerinde Palinolojik ve Kimyasal Araştırmalar. TÜBİTAK 198T003 nolu Proje Raporu.