

## Böcek Dokularından DNA İzolasyonu Yöntemlerinin Kalite, Verim ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması

Murat GÜLER<sup>1</sup>, Filiz TOKGÖZ<sup>2</sup>, Ertan Mahir KORKMAZ<sup>1</sup>, Mahir BUDAK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, SİVAS

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Bölümü, SİVAS

\*e-mail: mbudak@cumhuriyet.edu.tr

**Öz:** Günümüzde moleküler biyoloji ve biyoinformatik alanındaki gelişmelere paralel olarak metagenomik, biyoteknoloji, tüm genom dizilemesi, genom evrimi gibi alanlarda çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Böcek türleri ile yapılan çalışmalarda ilk ve en önemli adım etkili bir DNA izolasyonu yönteminin kullanılmasıdır. Kitin yapılı bir dış iskelete sahip olan böceklerin çoğunun küçük canlılar olması DNA izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Yapılan bu çalışma ile *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767) türüne ait bireylerden dokuz farklı DNA izolasyon yöntemi ile total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri verim, saflık, maliyet, zaman ve PCR başarısı kriterleri altında değerlendirilmiştir. Maliyet ve kullanılan kimyasalların toksisitesi göz önüne alındığında ise tuzla çöktürme yönteminin böcek dokularından DNA izolasyonu için en uygun yöntem olduğu yorumlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** DNA İzolasyon Yöntemleri, Böcek Genomik DNA'sı, DNA Kalitesi, PCR, *Cephus pygmeus*

### Comparison of DNA Isolation Methods From Insect Tissues in Terms of Quality, Yield and Cost

**Abstract:** Today, there are many studies conducted in the areas such as metagenomics, biotechnology, whole genome sequencing, genome evolution, and so on parallel to the developments in molecular biology and bioinformatics in molecular biology and bioinformatics. The first and most important step in studies with insect species is the use of an effective DNA isolation method. Small body and external chitin skeleton of the insects cause difficulties in isolating the insect DNAs. In this study, nine different DNA isolation methods were applied to carry out total DNA isolation from the individuals belonging to the species *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767). The results were interpreted in terms of DNA yield, purity, cost, time and PCR performance criteria. When the cost and the toxicity of the used chemicals are taken into consideration, it is interpreted that the salting out method is the most suitable method for DNA isolation from insect tissues.

**Keywords:** DNA Isolation Protocols, Insect Genomic DNA, DNA Quality, PCR, *Cephus pygmeus*

#### 1. Giriş

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki baş döndürücü gelişmeler araştırmacılar için metagenomik, biyoteknoloji, tüm genom dizilemesi ve genom evrimi gibi alanlara farklı bir bakış açısı getirmiştir. Biyolojik çeşitliliğin önemli bir üyesi olan böcekler bu gelişmelere paralel olarak farklı

sorulara yanıt aranan DNA dizi bilgisi temelli sayısız çalışmanın konusu olmuştur. Özellikle DNA dizileme teknolojisinin gelişmesi ve dizileme maliyetlerinin göreceli olarak azalması bu tarz çalışmaların sayısını oldukça artırmıştır (Van Dijk ve ark., 2014). Son zamanlarda ise, yeni nesil DNA dizileme (NGS) olarak bilinen ve oldukça yüksek

kapasitede genom verisi üretebilen platformlar sayesinde, tek ya da birkaç DNA belirteci ile sınırlı kalan çalışmalar, yerini daha büyük veri setleri kullanılan çalışmalara bırakmıştır (Mardis, 2017). Günümüzde böceklerde DNA dizileri kullanılarak akrabalık ilişkileri ve evrim (Misof ve ark., 2014), böcek-bitki ve böcek-mikrop-(bitki) etkileşimi (Biere ve Bennett, 2013), karşılaştırmalı genomik (Rosenfeld ve ark., 2015), beslenme alışkanlıkları (Juen ve Traugott, 2005), genetik çeşitlilik, populasyon genetiği (Davey ve Blaxter, 2010), koruma biyolojisi (Kress ve ark., 2015), biyocoğrafya (Korkmaz ve ark., 2014), tarım zararlılarının biyolojik kontrolü (Furlong, 2015), vektör taşıyıcılarla savaş (Carlton ve ark., 2008) ve referans DNA kütüphaneleri ile türlerin moleküler teşhisleri (DNA barkodlama) (Hebert ve ark., 2003) gibi birçok alanda araştırmalar gerçekleştirilmektedir.

Tüm bu araştırmalarda başarılı bir yöntemsel aşamanın sürdürülebilmesi için ilk ve en önemli basamak etkin bir DNA izolasyonu yönteminin kullanılmasıdır. Etkin bir DNA izolasyonu, PCR, DNA dizileme (NGS ya da Sanger), klonlama ve hibridizasyon gibi aşamaların da başarılı bir şekilde yürütülebilmesini sağlayacaktır. Peki, başarılı bir DNA izolasyonunda ana kriter nedir ve farklı DNA izolasyon yöntemleri arasında seçim neye göre yapılır? Başarılı bir DNA izolasyonunun sağlanması için DNA molekülüne zarar vermeden hücrenin tüm diğer

makro-moleküllerinin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla böceklerden yaşamlarının farklı evrelerinde (erişkin, yumurta, larva ya da pupa) total genomik DNA izolasyonu gerçekleştirebilmek için çok sayıda yöntem ve kit geliştirilmiştir (Wingfield ve Klein, 2012; Asghar ve ark., 2015). Ancak, tercih edilen yöntem, izole edilen DNA'nın kalite ve miktarını doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada, standart olarak kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin modifiye edilmesi ile elde edilen dokuz farklı DNA izolasyon yöntemi verim, maliyet ve zaman açısından karşılaştırılmıştır. Ortalama büyüklüğü, tarım zararlısı olması ve geniş yayılış alanına sahip olması nedeniyle DNA izolasyonu karşılaştırmalarında, yaşam şekli ve tür çeşitliliği açısından ilk sıralarda yer alan Hymenoptera takımının bir üyesi olan *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767) (Symphyta: Cephidae) kullanılmıştır. *C. pygmeus* türü Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika'da geniş ve devamlı bir yayılış alanına sahiptir. Konak bitki olarak buğdaygilleri seçtiği için buğday sap-arısı olarak da bilinmektedir ve ekonomik olarak buğdaylarda zarara yol açmaktadır (Shanower, 2008). Erginlerinin vücut büyüklüğü 5-11 mm arasında değişmekte ve sarı-siyah abdomen renklenmesi sergilemektedir (Korkmaz ve ark., 2010).

## 2. Materyal ve Metot

Böcek dokularından DNA izolasyon yöntemlerinin verim, maliyet ve zaman

açısından karşılaştırılması amacıyla dokuz farklı yöntem kullanılmış olup, her yöntem için aynı lokaliteden toplanmış iki dişi ve iki erkek olmak üzere toplam 4 birey kullanılmıştır (Tuzla çöktürme yönteminde üç birey kullanılmıştır). Çalışma kapsamında kullanılan örnekler ait bilgiler Çizelge 1’de sunulmuştur. Örnek seçiminde en az 10 yıl olmak üzere eski tarihli ve alkolde bekletilen örnekler olmasına dikkat edilmiştir. Bu kapsamda 2001-2004 yılları arasında toplanmış, Cumhuriyet Üniversitesi Entomoloji Koleksiyonu’nda (ECCUS) yer alan ve -20 °C’de %100 etanol içerisinde saklanan örnekler kullanılmıştır. Örnekler önce alkol uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla filtreli tüpler kullanılarak santrifüj edilmiş ve yaklaşık yarım saat kurutma kağıdı üzerinde bekletilmiştir. Kurutulma sonrası örneklerin baş kısımları PCR inhibitörleri açısından yoğun oldukları için uzaklaştırılmış, kalan kısım ise hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Tartım işlemi sonrasında her bir bireye ait doku mikrosantrifüj tüpüne aktararak ezme işlemi ile mekanik olarak parçalanmıştır.

DNA izolasyonu için Chelex-100, fenol-kloroform, ısı şok, tuzla çöktürme, ticari kit yöntemler ve bu yöntemlerde çeşitli modifikasyonlar yapılarak oluşturulan toplam dokuz farklı yönteme başvurulmuştur (Çizelge 1). Bu yöntemlere ait uygulama basamakları aşağıda detaylı bir şekilde sunulmuştur. Her bir yöntem sonucunda izole edilen total genomik DNA’nın kalite ve miktar tayinleri 260, 280 ve

230 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin nanodrop cihazı (Maestrogen, 2000) kullanılarak ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Ayrıca, izole edilen DNA örneklerinin PCR uygulamalarındaki başarısının test edilebilmesi için çekirdek ve mitokondri genomlarına özgü fragmanların *in vitro* çoğaltılması uygulamasına başvurulmuştur. Bu amaçla böcek çalışmalarında barkod amaçlı kullanılan çekirdek genomuna ait ITS2 ve mitokondri genomuna ait COI gen fragmanları seçilmiştir. ITS2 fragmanının çoğaltılmasında Cas5p8sFt (5’-ATG AAC ATC GAC ATT TCG AAC GCA TAT-3’) ve Cas28SB1d (5’-TTC TTT TTC TTC GCT TAG TAA TAT GCT TAA-3’) primer çifti (Ji ve ark., 2003); COI gen bölgesinin çoğaltılmasında ise s1859 (5’-GGA ACI GGA TGA ACW GTT TAY CCI CC-3’) (Simon ve ark., 1994) ve HCOout (5’-GCT CCT ATT GAT ARW ACA TAR TGR AAA TG-3’) (Carpenter ve ark., 1999) primerleri tercih edilmiştir. PCR reaksiyonları 50 µl son hacimde hazırlanmış olup, reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl 10× reaksiyon tampon (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl), primerlerin her birinden 10 pmol, 0,2 mM her bir dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 100 ng kalıp DNA (son konsantrasyon 2 ng/µl) eklenmiştir. Reaksiyonlar BioRad T-100 PCR cihazında: 95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon adımı; 35 döngüden oluşan üç amplifikasyon adımı: (1) 94 °C’de 1 dakika, (2) primer çiftine özgün bağlanma (annealing) sıcaklığında 1 dakika ve (3) 72 °C’de 30

saniye; 72°C'de 5 dakika bir son uzatma basamağı koşulları altında gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri ve tüm PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde GeneRuler 100 bp Plus DNA

Ladder (Thermo Scientific, Katalog Numarası: SM0321) ile birlikte yürütülerek görüntülenmiş ve sonuçlar kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

**Çizelge 1.** DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırılmasında kullanılan örneklere ait lokalite bilgileri.

Kullanılan Yöntem	ECCUS NO	Toplam Birey	Enlem (N)	Boylam (E)	Toplanma Tarihi	Lokalite
Chelex-100	545	4	39,707219	37,032101	17.06.04	SİVAS
Chelex-100+Proteinaz K	646	4	39,633316	37,032991	23.05.02	SİVAS
Chelex-100+Alkol Çöktürme	572	4	39,683808	36,792156	01.06.01	SİVAS
Fenol-Kloroform	552	4	39,708535	36,650581	23.05.02	SİVAS
Isı Şok	619	4	39,835168	36,441772	07.06.02	SİVAS
Isı Şok+Chelex-100	453	4	40,164838	38,084192	29.05.02	SİVAS
Isı Şok+Chelex-100+Alkol Çöktürme	580	4	39,874702	37,730385	12.06.02	SİVAS
Tuzla Çöktürme	595	3	38,150757	34,874525	02.06.02	NIĞDE
KolonTabanlı Ticari Kit	526	4	39,582407	36,622085	28.05.02	SİVAS

**a) Chelex-100 yöntemi:** Adli materyallerden DNA izolasyonu için geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır (Walsh ve ark., 1991). Örnek üzerine 1.5 ml Tampon A (200 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) eklenmiştir. Vortekslenerek doku ile tamponun etkileşimi sağlanmıştır. 23640 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 1 ml Tampon B (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) eklenmiş, pelet süspansiyon haline getirilmiş ve 23.640 x g'de tekrar 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnek üzerine 100 µl dH<sub>2</sub>O ve 200 µl %10 (ağırlık/hacim) Chelex-100 çözeltisi eklenerek 56 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 8 dakika kaynatılan örnekler 23.640 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz, kalıntı doku

ve chelex-100 alınmadan dikkatli bir biçimde yeni tüpe aktarılmıştır.

**b) Chelex-100 + Proteinaz-K Yöntemi:** Walsh ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Chelex-100 yönteminden farklı olarak Tampon B (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) eklendikten sonra 10 µl proteinaz-K (20 mg/ml) ortama eklenerek gece boyunca 55 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda Chelex-100 yöntemindeki basamaklar takip edilmiştir.

**c) Chelex-100 + Alkol Çöktürme Yöntemi:** Walsh ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Chelex-100 yöntemi sonucunda elde edilen DNA çözeltisi içerisindeki olası inhibitör etkideki ajanların

uzaklaştırılması amacıyla nükleik asitlerin alkolle çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Chelex-100 yöntemi ile elde edilen çözeltinin üzerine 1/10 hacim 5 M NaCl ve 2 hacim soğuk %99'luk etanol eklenmiştir. Ardından, son hacimde 0.01 mM olacak şekilde MgCl<sub>2</sub> eklenerek +4 °C'de 28.500 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Alkol uzaklaştırılmış ve peletin üzerine 100 µl % 70'lik etanol eklenmiş, pelet yıkama işlemi sonrasında 4 °C'de 28.500 x g'de 6 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Alkol ortamdan uzaklaştırılarak peletin 50 µl 1×TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.

**d) Fenol Kloroform Yöntemi:**

Gemmell ve Akiyama (1996) tarafından optimize edilen yöntem esas alınmıştır. Mekanik ezme işlemi gerçekleştirilen örnek, 540 µl homojenizasyon tamponu (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) ve 60 µl %10'luk SDS ile süspansiyon edilmiştir. Son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Özütleme sonrası özütlere bir hacim fenol ve bir hacim kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek ve 13.000 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Üst faz üzerine bir hacim kloroform:izoamil alkol eklenerek 13.000 x g de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak aynı işlem bir kez daha

tekrarlanmıştır. Üst fazın üzerine 1/10 hacim 5 M NaCl ve 2 hacim soğuk mutlak etanol eklenmiştir. DNA'nın çöktürülmesi için 4 °C'de 28.500 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek alkol uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 100 µl %70'lik etanol eklenerek 4°C'de 28.500 x g'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak peletin 100 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.

**e) Isı Şok Yöntemi (HotSHOT):**

Truett ve ark. (2000) tarafından optimize edilen yöntem esas alınmıştır. Parçalanmış doku üzerine 50 µl Lizis Tamponu (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12) eklenerek 95 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yaklaşık 4-5 dakika buz üzerinde örnekler bekletilmiş ve 50 µl Nötralizasyon Tamponu (40 mM Tris-HCl, pH 5.0) eklenmiştir. Karışımın homojenize olması amacıyla vorteks ile karıştırma işleminden sonra, dokuyu çöktürmek amacıyla 10.000 x g'de kısa süreli santrifüjleme gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda kullanılmak üzere üst faz yeni tüpe alınmıştır.

**f) Isı Şok + Chelex-100 Yöntemi:**

Bu çalışma için optimize edilen yöntemde, ısı şok yönteminden farklı olarak nötralizasyon tamponu eklenmesinden sonra 100 µl dH<sub>2</sub>O ve 200 µl %10 (ağırlık/hacim) Chelex-100 çözeltisi ortama eklenmiştir ve örnekler 8 dakika kaynatıldıktan sonra üst faz yeni tüpe alınmıştır.

**g) Isı Şok + Chelex-100 + Alkol**

**Çöktürme Yöntemi:** Bu çalışma için optimize edilen yöntemde, ısı şok + Chelex-100

yönteminde elde edilen DNA'nın alkol ile yıkanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkol yıkaması sonrası elde edilen pelet 50 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

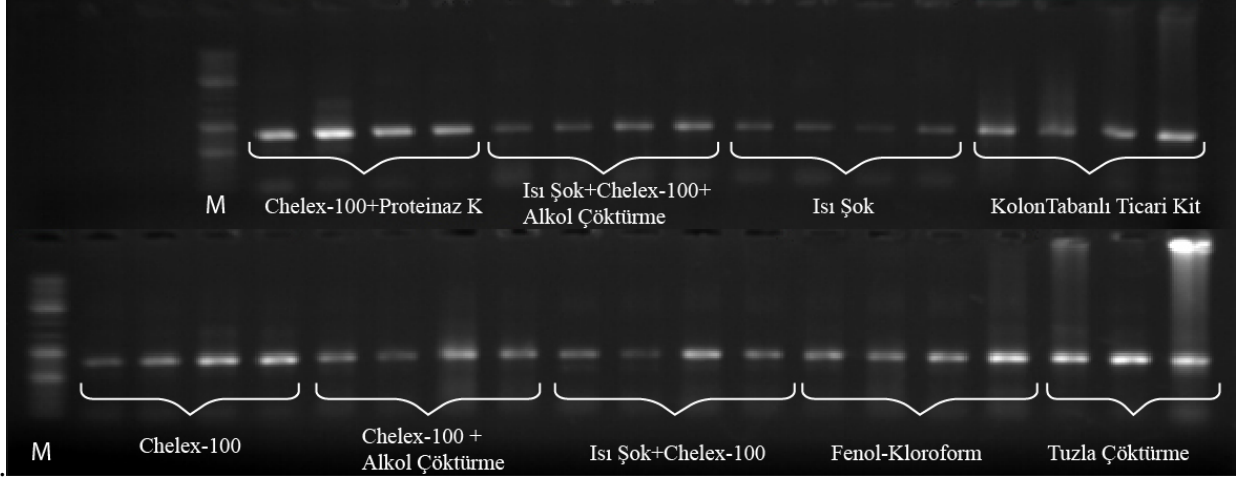
**h) Tuzla Çöktürme Yöntemi:** Aljanabi ve Martinez (1997) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak yöntem uygulanmıştır. Dokuların mekanik olarak parçalanmasından sonrasında 300 µl TNES tamponu (50 mM Tris, pH:7,5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,5% SDS) 100 µg/ml proteinaz-K ile birlikte eklenerek 55 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, örneklerin üzerine 85 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler 14.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Yeni bir tüpe alınan üst faz üzerine bir hacim %99'luk soğuk etanol eklenerek 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak 100 µl %70'lik etanol ile yıkama ve çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlandıktan sonra pelet 50 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

### **i) Kolon Tabanlı Ticari Kit**

**Kullanımı:** Bu amaçla Roche firması tarafından üretilen "High Pure PCR Template Preparation Kit" kullanılmıştır. Üreticinin önerdiği protokol uygulanarak izolasyon gerçekleştirilmiş olup, farklı olarak yalnızca liziz aşamasında gece boyunca inkübasyon basamağı tercih edilmiştir. Kolondan DNA'nın geri kazanımında ise 50 µl elüsyon tamponu kullanılmıştır.

### **3. Sonuçlar**

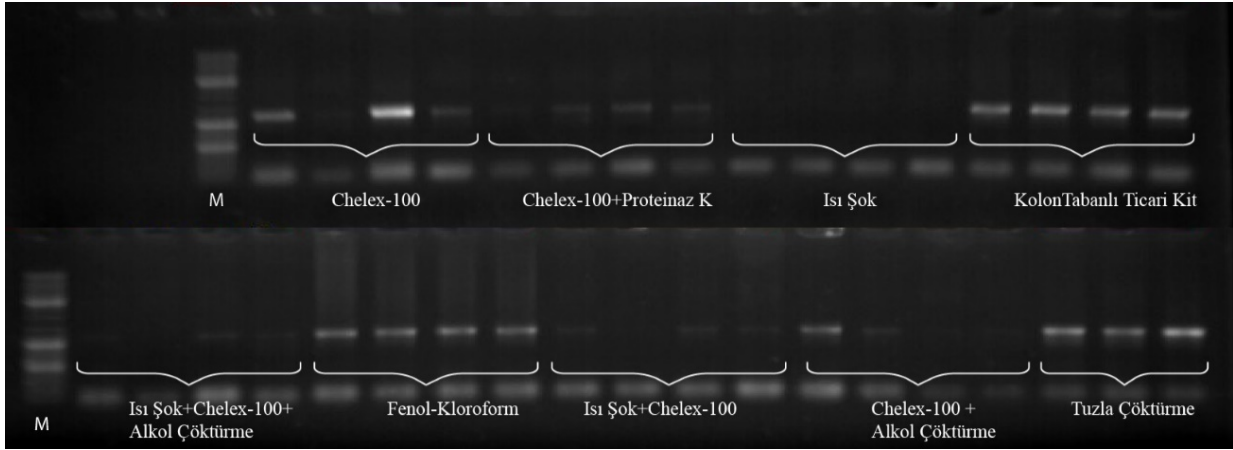
DNA izolasyon yöntemlerinin zaman, maliyet ve PCR verimi bakımından değerlendirilebilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda birim doku başına izole edilen DNA miktarı (µg/mg), A260/A280 ve A260/230 oranı, izolasyon için harcanan zaman, maliyet (\$) ve her iki gen bölgesi için PCR başarısı Çizelge 2'de özetlenmiştir. PCR başarıları açısından değerlendirmede agaroz jel görüntüleri kullanılarak hesaplama yapılmış olup, COI genine ait PCR ürünleri Şekil 1 ve ITS2 bölgesine ait PCR ürünleri ise Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. COI genine ait PCR ürünlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü gösterilmiştir.

Konsantrasyonu yeterli görülen (kit ile gerçekleştirilen PCR ürünlerine yakın parlaklık) ürünlerin başarısı kuvvetli, bu parlaklığın altında olan fakat çoğaltılan ürünler zayıf ve PCR ürünü sinyali içermeyenler başarısız olarak nitelendirilmiştir. PCR başarılarının yüzde değerlerinin hesaplanmasında ise başarılı tüm ürünlerin

(kuvvetli ve zayıf) toplam reaksiyon içindeki oranı kullanılmıştır. COI bölgesinin PCR uygulamalarıyla çoğaltılmasında bütün yöntemlerde başarı sağlanmıştır. Isı-şok yöntemi dışındaki tüm PCR ürünlerinin konsantrasyonları kuvvetli olarak nitelendirilmiş ve ısı-şok yönteminde kuvvetli-zayıf olarak sonuç alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 2. ITS2 bölgesine ait PCR ürünlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü gösterilmiştir.

ITS2 bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan tüm yöntemler birlikte değerlendirildiği zaman, toplamda %68.5 oranında PCR başarısı elde edilmiştir. Tuzla çöktürme, fenol-kloroform ve ticari kit

yöntemlerinde tam başarı sağlanırken (%100), yalnızca ısı şok yöntemi sonucunda PCR uygulamaları başarısız olmuştur (Şekil 2). Ancak ısı şok yönteminin modifiye edilmesiyle oluşturulan ısı-şok + chelex-100 (%75) ve ısı-

şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi sergilemiştir.  
yöntemlerinde PCR başarısı (%50) artış

**Çizelge 2.** DNA izolasyon yöntemlerinin verim, saflık, maliyet, zaman ve PCR başarısı açısından karşılaştırılması için kullanılan parametreler.

DNA İzolasyon Yöntemi	DNA Miktarı (µg/mg)	A260/A280	A260/A230	Maliyet (10 örnek – USD)	Harcanan Zaman (10 örnek için saat)	PCR Başarısı			
						COI (%)	Amplifiye olan ürünler	ITS2 (%)	Amplifiye olan ürünler
<b>Chelex-100</b>	20.13±2.87	1.29-1.43	1.00-0.77	3.97	2.5	100	Kuvvetli	75	Kuvvetli, Zayıf, Başarısız
<b>Chelex-100 + Proteinaz K</b>	7.72±1.59	1.06-1.23	0.67-0.94	3.99	19.5	100	Kuvvetli	75	Zayıf, Başarısız
<b>Chelex-100 + Alkol Çöktürme</b>	6.85±1.05	1.76-1.97	1.71-1.86	5.85	5.5	100	Kuvvetli	50	Zayıf, Başarısız
<b>Fenol-Kloroform</b>	11.03±1.18	1.63-1.92	1.75-2.02	4.81	19.5	100	Kuvvetli	100	Kuvvetli
<b>Isı Şok</b>	34.85±3.32	1.01-1.22	1.10-1.27	4.52	0.7	100	Kuvvetli, Zayıf	0	Başarısız
<b>Isı Şok + Chelex-100</b>	51.59±5.09	1.06-1.42	1.00-1.30	7.17	1.0	100	Kuvvetli	75	Zayıf, Başarısız
<b>Isı Şok + Chelex-100 + Alkol Çöktürme</b>	13.44±4.63	1.79-2.03	1.86-2.19	9.05	3.5	100	Kuvvetli	50	Zayıf, Başarısız
<b>Tuzla Çöktürme</b>	6.86±0.72	1.80-1.89	1.56-1.83	3.80	17.5	100	Kuvvetli	100	Kuvvetli
<b>Kolon Tabanlı Ticari Kit</b>	6.41±1.63	1.67-2.08	1.73-2.16	30.77	19.5	100	Kuvvetli	100	Kuvvetli



Birim doku başına izole edilen ortalama DNA miktarı, en çok ısı-şok + chelex-100 yöntemi kullanılarak (51.59 µg/mg) elde edilirken, en az ticari kit yöntemi kullanılarak (6.41 µg/mg) elde edilmiştir (Çizelge 2). İzole edilen DNA'nın saflık derecesini ölçmek için kullanılan 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin oranı 1.8'e yakın olan ölçümler chelex-100 + alkol çöktürmesi, fenol-kloroform, ısı-şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi, tuzla çöktürme ve ticari kit kullanılarak elde edilmiştir. Diğer yöntemlerde protein kontaminasyonuna işaret eden düşük A260/A280 oranları elde edilmiştir (Çizelge 2). Aynı zamanda ısı şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi ve ticari kit yöntemi ile elde edilen DNA örneklerinin bazılarında A260/A280 oranı 2'nin üzerinde hesaplanmıştır. İzole edilen DNA'nın saflığının kontrolü için bir ölçü olan A260/A230 oranı karbohidrat, fenolik bileşikler ve glikojen gibi kontaminasyonları tespit etmek için kullanılmakta olup bu değerlerin 2.0-2.2 arasında olması beklenmektedir. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda ısı-şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi ve ticari kit yöntemleri dışındaki yöntemlerde A260/A230 oranının 2.0-2.2 değerlerinin altında oranlara sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 2).

Başarılı DNA izolasyon yöntemleri için oldukça önemli iki parametre olan maliyet ve zaman için gerçekleştirilen

hesaplanmalarda izolasyon için kullanılan zaman açısından en az 0.7 saat ile ısı şok yöntemi ve en fazla 19.5 saat ile chelex-100 + proteinaz K, fenol-kloroform ve ticari kit yöntemi olduğu bulunmuştur (Çizelge 2). Maliyet bakımından tuzla çöktürme, chelex-100 ve ısı-şok yöntemlerinin ticaret kit yöntemine göre oldukça avantajlı olduğu belirlenmiştir.

#### 4. Tartışma

Bu çalışma böcek dokularından farklı DNA izolasyon yöntemlerinin verim, saflık, çekirdek ve mitokondri gen bölgelerinde PCR başarısı, maliyet ve harcanan zaman açısından karşılaştırılmasını hedeflemektedir. Özellikle, tüm parametreler bir bütün olarak değerlendirildiği zaman fenol-kloroform, tuzla çöktürme ve ticari kit yöntemleri ön plana çıkmaktadır (Çizelge 2, Şekil 1-2). Özellikle, tuzla çöktürme yöntemi tüm yöntemler arasında en avantajlı olarak öne çıkmaktadır. Ancak, kullanılan yöntemlerin ve seçilen parametrelerin tamamı ele alındığında diğer yöntemlerinde zaman, maliyet, kolay uygulama ve PCR başarısı gibi farklı açılardan başarılı olduğu yönler bulunmaktadır.

Chelex-100 polivalent metal iyonlarına yüksek afinite gösteren bir şelat ajanıdır. Doku ile birlikte kaynatılarak hücrelerin parçalanmasını ve DNA'nın serbest kalmasını sağlamaktadır (Walsh et

al., 1991). Özellikle tüp aktarma gibi aşamalar içermemesi kontaminasyon riskini oldukça düşürmekte, maliyet ve zaman açısından diğer yöntemlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Birim doku başına izole edilen ortalama  $20.13 \pm 2.87$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  DNA miktarı ile ısı şok ve ısı şok + chelex-100 yöntemlerinden sonra üçüncü sırada yer alması ile verim açısından başarılı bir yöntem olarak kabul edilebilir (Çizelge 2). Ancak, bu yöntem düşük absorbans değerleriyle ortamda kirlilik etkeni olarak makromoleküller barındırması açısından dezavantajlıdır. Chelex-100 yöntemi yüksek saflıkta bir DNA izolasyonu sunmasa da mitokondri genomuna ait COI geninin çoğaltılmasında oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (Şekil 1). Ancak, chelex-100 yönteminin çekirdek genomunu temsilen kullanılan ITS2 bölgesinin çoğaltılmasında COI geni kadar başarılı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2). Bu durum hücrelerin içerdiği mitokondri sayısı ile ribozomal rRNA genleri arasında yer alan ITS2 bölgelerinin kopya sayısı arasındaki olası farklılıktan kaynaklı olabilir. Ayrıca, ortamda yer alan inhibitörlerin PCR verimini düşürdüğü söylenebilir. Bu nedenlerle Chelex-100 yöntemi proteinazK enzimi uygulaması ve elde edilen üründen nükleik asitlerin çöktürülmesini amaçlayan chelex-100 + alkol çöktürmesi yöntemleri denenmiş olup, proteinazK uygulaması hem DNA konsantrasyonunda hem de

A260/A280 oranında önemli ölçüde iyileşmeye yol açmıştır (Çizelge 2). Chelex-100 + proteinazK yönteminde konsantrasyon düşmesi ve kirliliğin artması COI geni için PCR verimini düşürmezken, ITS2 bölgesi için PCR veriminde düşüşe neden olmuştur. Chelex-100 sonrasında alkol çöktürmesi protein nedenli kontaminasyonları büyük ölçüde gidermiş olup, yine COI bölgesi için PCR veriminde değişikliğe neden olmamıştır (Çizelge 2, Şekil 1). Ancak, ITS2 bölgesi için PCR verimi Chelex-100 yöntemine göre daha düşük orandadır. Wingfield ve Klein (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, maliyet ve izolasyon için harcanan zaman açısından bu çalışmada elde edilen veriler ile uyumlu, PCR başarısı açısından ise farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmada Chelex-100 PCR başarısı toplamda %87,5 (%100 mitokondriyal, %75 çekirdek) olarak bulunurken, Wingfield ve Klein (2012) tarafından %40 olarak bulunmuştur. Bu durumda chelex-100 yöntemi için oldukça basit, ekonomik ve göreceli kullanışlı bir yöntem olduğu söylenebilir ve bu nedenle böcek dokularından DNA izolasyonu için uygun bir yöntem olarak önerilebilir.

Isı şok yöntemi hücrelerin sıcak ve alkali ortamda parçalanması sonrasında ortamın pH'sının dengelenmesini kapsamaktadır. Yöntem bir saatten kısa sürede tamamlanmakta ve maliyeti oldukça düşüktür. Dokudan DNA kazanımı açısından

diğer yöntemlere göre yüksek avantajlı olan ısı şok yöntemi, DNA saflığı açısından düşük A260/A280 ve A260/A230 oranlarına sahiptir (Çizelge 2). Bu değerler ortamda çok çeşitli biyomoleküllerin neden olduğu kirliliğe işaret etmektedir. PCR başarısı açısından ise COI geni için başarılı, ancak diğer yöntemlere göre daha zayıf bantlar oluşturmaktadır (Şekil 1). ITS2 bölgesi için PCR uygulamalarında ise başarı elde edilememiştir (Şekil 2). Isı şok yöntemi ile Chelex-100 yönteminin hibrid bir uyarlaması olan ısı şok + Chelex-100 yöntemi hem COI geninin hem de ITS2 bölgesinin PCR başarısını artırmıştır (Şekil 1-2, Çizelge 2). Ayrıca kullanılan yöntemler arasında dokulardan en yüksek DNA geri kazanımını ısı şok + Chelex-100 yöntemi ile (ortalama  $51.59 \pm 5.09$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) başarmıştır. Ancak, bu yöntemde de DNA saflığı yeterli düzeyde olmadığı için elde edilen çözeltiler içerisindeki nükleik asitlerin çöktürülmesi ve kirliliğin giderilmesi için ısı şok + Chelex-100 + alkol çöktürmesi yöntemi denenmiştir. Bu yöntemle özellikle protein kaynaklı kirlilikler büyük oranda giderilmiş (Çizelge 2), yine de yeni bir basamağın sürece eklenmesi izole edilen DNA miktarını düşürdüğü için PCR veriminde iyileşme görülmemiştir. Isı şok yönteminin COI geni için PCR başarısı, maliyeti ve harcanan zaman açısından Gutiérrez-López (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları bu çalışmada elde edilen sonuçlara

benzerlik göstermiştir. Lopez ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ayrıca DNA dizi kalitelerini de değerlendirmişler ve ısı şok yönteminin ticari kitler ile gerçekleştirilen DNA izolasyonları ile çok benzer sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada fenol-kloroform yönteminin DNA dizileme kalitesini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Fenol-kloroform yöntemi birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılan bir DNA izolasyon yöntemi olmasına rağmen, oldukça toksik kimyasalların kullanımı nedeniyle dezavantajlı bir yöntemdir (Chen ve ark., 2010). Diğer ele alınan parametreler açısından ise çalışmada kullanılan en avantajlı yöntemlerden biri olarak görünmektedir (Çizelge 2, Şekil 1-2). Doku başına izole edilen DNA miktarı Chelex-100 ve ısı şok yöntemine göre düşük olmasına rağmen, izole edilen DNA'nın saflığı oldukça iyi düzeydedir. Ayrıca maliyet ve PCR başarısı açısından da başarılı bir yöntem olduğu söylenebilir.

Tuzla çöktürme yöntemi maliyet, izole edilen DNA'nın saflığı ve PCR başarısı açısından en uygun yöntem olarak görülmektedir (Çizelge 2, Şekil 1-2). Fenol-kloroform yöntemine göre kullanılan kimyasalların toksik olmaması, maliyet ve uygulama kolaylığı açısından avantajlara sahiptir. Tuzla çöktürme yöntemi ayrıca Chelex-100 ve ısı şok yöntemlerine göre DNA verimi açısından geride kalmış olsa da kalitesi yüksek ortamda bekletme ve

DNA'nın denatürasyonuna neden olan kaynatma gibi süreçler içermediği için izole edilen DNA hem kalitesi hem de saflık derecesi PCR, hibridizasyon ve klonlama gibi uygulamalar için uygundur. Tuzla çöktürme yöntemine alternatif olarak PCR başarısı açısından benzer sonuçlar veren silika-kolon tabanlı ticari kit bu çalışmada karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Üreticinin protokolünde inkübasyon zamanı gibi bazı basamaklar değiştirilerek uygulanan yöntem maliyet açısından tuzla çöktürme ve diğer yöntemlere göre oldukça pahalıdır. Ayrıca fenol-kloroform, Chelex-100 ve ısı şok yöntemleriyle karşılaştırıldığında izole edilen DNA miktarı kolondan geri kazanıma bağlı olarak oldukça düşük düzeydedir.

Sonuç olarak, böcekler oldukça çeşitli ve yer yüzünün hakim türleridir. Bu nedenle ekosistemde üstlendikleri rollere bağlı olarak, yalnızca temel bilimlerin değil biyoteknoloji, adli tıp, tarım, ziraat, tıp ve veterinerlik gibi uygulamalı bilimlerinde araştırma konuları içerisinde yer almaktadır. Günümüzde DNA barkodlama ile türlerin teşhisi, sessiz süreçlerde rol alan enzimleri kodlayan genlerin belirlenmesi, türlerin evrimsel tarihi, populasyonların genetik

yapısı, hastalık etkenlerinin izlenmesi ve hatta jeolojik olayların aydınlatılması araştırılmaktadır. Bu nedenle DNA dizi verisinin oluşturulmasında ilk adım olan DNA izolasyonunda, etkin ve kullanışlı bir yöntemin seçilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada dokuz farklı yöntemden PCR başarısı açısından karşılaştırmalar yapılmış ve bütün yöntemlerin mitokondriyal genoma ait bölgenin çoğaltımında başarılı olduğu, ancak çekirdek genoma ait bölgenin çoğaltımında ise tüm yöntemlerin başarılı sonuç vermediği tespit edilmiştir. Hem mitokondriyal hem de çekirdek genomuna ait bölgelerin PCR ile çoğaltımında ise fenol-kloroform, tuzla çöktürme ve kolon tabanlı ticari kit yöntemlerinin başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir. Maliyet ve kullanılan kimyasalların toksisitesi göz önüne alındığında ise tuzla çöktürme yönteminin böcek dokularından DNA izolasyonu için en uygun yöntem olduğu yorumlanmıştır.

**Teşekkür:** Bu çalışma kapsamında özel bir destek alınmamıştır. Gamze KOÇAK ve Zeliha GÜLER çalışmanın laboratuvar aşamalarında katkı sağlamışlardır.

## Kaynaklar

- Aljanabi SM, Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25: 4692–4693.
- Asghar U, Malik MF, Anwar F, Javed A, Raza A (2015). DNA Extraction from Insects by Using Different Techniques: A Review. *Advances in Entomology* 3: 132–138.
- Biere A, Bennett AE (2013). Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Functional Ecology* 27: 567–573.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli S V, Merino EF, Amedeo P (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757–763.
- Carpenter JM, Carpenter JM, Wheeler WC, Wheeler WC (1999). Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in *Hymenoptera*. *Zoologica*: 251–260.
- Chen H, Rangasamy M, Tan SY, Wang H, Siegfried BD (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* 5: e11963.
- Davey JL, Blaxter MW (2010). RADseq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9: 416–423.
- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* 30: 418–426.
- Furlong MJ (2015). Knowing your enemies: Integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests. *Insect Science* 22: 6–19.
- Gutiérrez-López R, Martínez-de la Puente J, Gangoso L, Soriguer RC, Figuerola J (2015). Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology* 40: 11–15.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 270 Suppl: S96–S99.
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585.
- Juen A, Traugott M (2005). Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: A case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia* 142: 344–352.
- Korkmaz EM, Budak M, Orgen SH, Bagda E, Gencer L, Ulgenturk S, Basibuyuk HH (2010). New records and a checklist of Cephidae (Hymenoptera: Insecta) of Turkey with a short

- biogeographical consideration. *Turkish Journal of Zoology* 34: 203–211.
- Korkmaz EM, Lunt DH, Çıplak B, Değerli N, Başbüyük HH (2014). The contribution of Anatolia to European phylogeography: the centre of origin of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Journal of biogeography* 41: 1793–1805.
- Kress WJ, García-Robledo C, Uriarte M, Erickson DL (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 30: 25–35.
- Mardis ER (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols* 12: 213–218.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346: 763–767.
- Rosenfeld J, Fook J, DeSalle R (2015). Insect genome content phylogeny and functional annotation of core insect genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 97: 224–232.
- Shanower TG (2008). History of biological control of wheat stem sawflies (Hymenoptera: Cephidae). In: Capinera J (Ed), *Encyclopedia of Entomology*, Springer, Netherlands, s. 1826–1829.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52–54.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506–513.
- Wingfield MJ, Klein H (2012). DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources* 12: 109–115.