

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BESİN HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

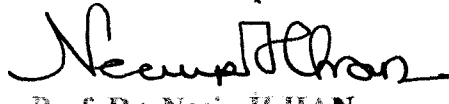
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (PCR)YÖNTEMİ İLE ET  
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

144 514

DOKTORA TEZİ

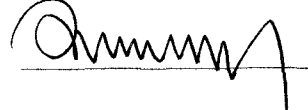
OSMAN İRFAN İLHAK  
ELAZIĞ-2004

ONAY SAYFASI

  
Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

  
Prof. Dr. Bahri PATİR

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali ARSLAN



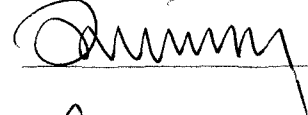
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

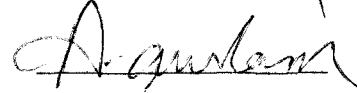
Prof. Dr. Ümit GÜRBÜZ



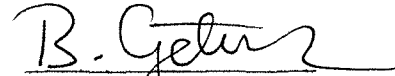
Prof. Dr. Bahri PATİR



Prof. Dr. Ali ARSLAN



Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA



Doç. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım dönemden itibaren gerek ders gerekse tez aşamasında zaman ve mekan sınırlaması olmaksızın desteğini esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ali ARSLAN'na ve hocam Prof. Dr. Bahri PATİR'a, tezimin ön çalışmasında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan Prof. Dr. Adile MUZ'a, yaptığım çalışmalarda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, kendisinden çok şey öğrendiğim Doç.Dr. Burhan ÇETİNKAYA'ya, laboratuvar aşamasında göstermiş oldukları yakından dolayı Doç. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a ve Dr. Hasan ÖNGÖR'e, çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Arş.Gör. Murat KARAHAN'a, yaptığım bütün çalışmalarda göstermiş olduğu ilgiden ve İngilizce konusundaki katkısından dolayı hocam Doç.Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU'na, çalışma arkadaşlarıma ve bu araştırmayı proje olarak kabul ederek maddi destek sağlayan FÜBAP Birimine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa

1. <b>Özet</b> .....	1
2. <b>Abstract</b> .....	3
3. <b>Giriş</b> .....	4
3. 1. Et Türlerinin Ayrımında Kullanılan Yöntemler .....	6
3. 1. 1. Duyusal Niteliklerine Göre Ayrım .....	6
3. 1. 2. Anatomik Özelliklerine Göre Ayrım .....	6
3. 1. 3. Kılın Histolojik Yapısına Göre Ayrım .....	6
3. 1. 4. Yağ Özelliklerine Göre Ayrım .....	7
3. 1. 5. Glikojen Miktarına Göre Ayrım .....	7
3. 1. 6. Immunolojik Yöntemlerle Ayrım .....	8
3. 1. 6. 1. Anafilaksi Denemesi .....	8
3. 1. 6. 2. Presipitasyon Yöntemi .....	9
3. 1. 6. 2. 1. Presipitasyon Halka Yöntemi (Uhlenhut Yöntemi) .....	9
3. 1. 6. 2. 2. Agar Jel İmmunodiffuzyon Yöntemi (AGİD), (Ouchterlony Yöntemi) ..	10
3. 1. 6. 3. İmmuno Assay Yöntemler .....	10
3. 1. 6. 4. Immunoelktroforezis .....	12
3. 1. 7. Proteine Dayalı Yöntemler .....	12
3. 1. 7. 1. Elektroforez .....	12
3. 1. 7. 2. İzoelektrofocusing (IEF) .....	13
3. 1. 7. 3. Kromatografik Yöntemler .....	14
3. 1. 8. Dokularda Genetik Materyalin Saptanması .....	14
3. 1. 8. 1. Deoksiribonükleik Asit'in (DNA) Makromoleküler Yapısı ve Önemi .....	14
3. 1. 8. 2. DNA Hibridizasyon Yöntemleri .....	16
3. 1. 8. 2. 1. Southern Blot Hibridizasyon .....	17

3. 1. 8. 2. 2. Dot Blot Hibridizasyon .....	17
3. 1. 8. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemi (PCR) .....	19
3. 1. 8. 3. 1. PCR'nin Çalışma Prensibi .....	19
3. 1. 8. 3. 2. Hedef DNA'nın Denaturasyonu .....	20
3. 1. 8. 3. 3. Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon) .....	21
3. 1. 8. 3. 4. Polimerizasyon (Sentez = Uzama) .....	23
3. 1. 8. 3. PCR Tekniği ile Et Türlerinin Tespiti .....	24
<b>4. Gereç ve Yöntem</b> .....	<b>28</b>
4. 1. Et Örneklerinin Sağlanması .....	28
4. 2. PCR Yönteminin Uygulanması .....	28
4. 2. 1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler .....	28
4. 2. 2. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması .....	29
4. 2. 2. 1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar .....	29
4. 2. 2. 2. PCR İşleminde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar .....	30
4. 2. 2. 3. Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar .....	32
4. 3. Etlerden DNA'nın Ekstrakte Edilmesi .....	33
4. 4. Et Karışımlarının Hazırlanması ve Karışım Halindeki Etlerden DNA Ekstraksiyonu .....	34
4. 5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	35
4. 6. Agaroz Jel Elektroforezi .....	36
4. 6. 1. Jelin Boyanması .....	36
<b>5. Bulgular</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Tartışma</b> .....	<b>52</b>
<b>7. Kaynaklar</b> .....	<b>58</b>
<b>8. Özgeçmiş</b> .....	<b>64</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

<b>Şekil 1:</b> DNA'nın Watson-Crick Modeli .....	15
<b>Şekil 2:</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Safhaları .....	22
<b>Şekil 3:</b> Amplifiye Edilen DNA Miktarının PCR Siklus Sayısı ile İlişkisi .....	23
<b>Şekil 4:</b> Et Türlerinden Ekstrakte Edilen DNA'ların Tür Spesifik Primerler ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	38
<b>Şekil 5:</b> Sığır ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	39
<b>Şekil 6:</b> Sığır ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	40
<b>Şekil 7:</b> Sığır ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	41
<b>Şekil 8:</b> Sığır ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	42
<b>Şekil 9:</b> Koyun ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	43
<b>Şekil 10:</b> Koyun ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	44

<b>Şekil 11:</b> Koyun ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	45
<b>Şekil 12:</b> Koyun ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	46
<b>Şekil 13:</b> Keçi ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	47
<b>Şekil 14:</b> Keçi ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	48
<b>Şekil 15:</b> Keçi ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	49
<b>Şekil 16:</b> Keçi ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri .....	50
<b>Şekil 17:</b> %0.1 Oranındaki Et Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz, Kedi, Köpek ve At DNA'larının Tür Spesifik Primerler ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri (35 Siklus PCR) .....	51

## 1.ÖZET

Et türlerinin ayırımında duysal niteliklere, anatomik farklılıklara, kılın histolojik yapısına, doku yağlarının özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan yöntemlerin yanısıra immunolojik, elektroforetik ve DNA hibridizasyon yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uzun zaman alması ve bir kısmının da güvenilir olmaması, gıda laboratuvarları için çok önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu bakımdan, bu yöntemlerde karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi için doğru sonuç veren, basit ve hızlı yöntemlerin kullanımı zorunlu hale gelmiştir.

Araştırmada at, köpek, kedi, sığır, koyun, domuz ve keçi etine ait spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemi ile etlerde tür tayini yapıldı. Her hayvan türü için, kullanılan primerlerin çapraz reaksiyon verip vermediği incelendi ve kullanılan primerlerin türe spesifik olduğu saptandıktan sonra sığır, koyun ve keçi etlerinin her birine %5, %2.5, %1, %0.5 ve %0.1 oranlarında ayrı ayrı domuz, at, kedi ve köpek etleri karıştırılarak tür tespiti yapıldı. Tür tespitinde at, köpek, kedi, sığır, koyun, domuz ve keçiye ait sırasıyla 439, 322, 274, 271, 225, 212 ve 157 bp'lik mitokondriyal DNA (mtDNA) parçaları çoğaltıldı. PCR işlemi; %5, %2.5, %1 ve %0.5 oranındaki karışımlar için 30 siklusta gerçekleştirildi. %0.1 oranındaki karışımlar için ise 35 siklusta yapıldı. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelle yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi takiben jeller ethidium bromide ile boyanarak UV transilluminator'de gözlemlendi.

Sonuç olarak, PCR yöntemi ile kolayca, kısa zamanda ve güvenilir olarak bütün et karışımlarında tür tespiti yapıldı. Böylece et türlerinin orijini tespit

edilerek halkın aldatılması engelleneceği gibi toplumun tüketmediği hayvan etleri diğer yöntemlere göre daha kolay, hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Et türleri, Orijin, mtDNA, PCR



## 2.ABSTRACT

Meat species can be determined by methods based on sensory attributes, anatomical differences, histological structure of hair, characteristics of adipose tissue, and glycogen content of muscle tissue as well as by immunological, electrophoretical, and hybridization methods. These methods are of concern for a food laboratory since they are time consuming and may not provide reliable results. There has been a need for a fast, simple, and accurate method due to the difficulties and disadvantages involve in methods mentioned above.

In this study, origin of meats from horse, dog, cat, bovine, sheep, porcine, and goat was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using species-specific primers. Confirming that the primers did not cross react between species, test mixtures of meat were prepared by adding 5%, 2.5, 1, 0.5 and 0.1 levels of pork, horse, cat or dog meats to each of beef, sheep and goat meat. Samples taken from these combinations were analysed by PCR for species determination. Mitochondrial DNA (mtDNA) fragments of 439, 322, 274, 271, 225, 212, and 157 bp for horse, dog, cat, bovine, sheep, porcine, and goat meats, respectively, were amplified. PCR were conducted at 30 cycles for mixtures at 5%, 2.5, 1, and 0.5 levels while at 35 cycles for mixture at 0.1% level. The PCR products were seperated by electrophoresis on 1.5% agarose gel and stained by ethidium bromide to visualize under UV light.

Are results indicated that meat species were accurately determined in all combinations in a shorter period of time by PCR. It is concluded that PCR can be useful for fast, easy, and reliable control of adulteration of consumers.

**Key Words:** Meat species, Origin, mtDNA, PCR

### 3. GİRİŞ

İnsan yaşamında, sağlıklı ve dengeli beslenme önemlidir. Beslenmede özellikle et ve et ürünlerinin kendine özgü önemli bir yeri vardır. Et yüksek biyolojik değeri ve içerdiği tat maddeleri açısından insan beslenmesinde ön sırada yer alan bir besin maddesidir. Bireysel farklılıklar dikkate alınarak günlük 0.75 g/kg düzeyinde protein alımı önerilmiştir. Günlük protein gereksiniminin ise yaklaşık %50'sinin hayvansal kökenli olması tavsiye edilmektedir. Artan dünya nüfusunun aksine kişi başına düşen protein miktarı giderek azalmaktadır (15,17,38,46,47).

Özellikle az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde hayvansal protein yetersizliğine bağlı olarak et ve ürünleri yüksek fiyatla satılmaktadır. Bu durum gelir düzeyi düşük tüketicilerin ucuz et ve ürünlerine olan taleplerini artırmaktadır. Bazı işletmeciler bunu bir fırsat bilip daha çok kar etmek amacıyla çok ucuz bir şekilde sağladıkları toplumun tüketmediği hayvan etlerini doğrudan veya et ürünlerine karıştırarak satışa sunabilmektedirler (49).

Toplumun tüketmediği hayvan etleri kullanılarak hile yapılmakta, buna bağlı olarak gıda kontrol hizmetleri zorlaşmakta ve halk sağlığı önemli ölçüde tehdit edilmektedir. Bu durum geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde daha sık yaşanmakta olup, ülkemizde de boyutları belli olmamakla birlikte bu gibi etlerin doğrudan veya ürüne dönüştürülerek satışa sunulduğu zaman zaman görsel ve yazılı basında vurgulanmaktadır (5-7,10). Örneğin, yakın tarihlerde belediye ekipleri tarafından kedi ve köpek iç organ ve gövde kısımlarının çöplüklerde bulunması, ayrıca piyasada domuz ve at etlerinin yakalanması veya üründe kullanılması, bu hayvan etlerinin ülkemizde de tüketime sunulduğu düşüncesini akla getirmektedir (6,7,49). Buna bağlı olarak türe özgü zoonoz ve zoonoz olmayan bir çok hastalık

yayılmakta, tüketici sağlığı riske edilmekte ve ekonomik açıdan önemli kayıplar olmaktadır (15,47,56,86).

Türk Gıda Mevzuatı'nda yer alan, gıdaların üretimi, tüketimi ve denetlenmesine dair kanun hükmündeki kararnamenin 1. maddesinde ‘‘halk sağlığını korumak üzere, gıda maddelerinin üretiminde kullanılan her türlü ham ve yardımcı maddeler, mamul ve yarı mamul gıda maddeleri ile yan ürünlerinin tespit edilmesi gerekir.’’ Yine aynı mevzuatın kırmızı et ve et ürünleri üretim tesislerinin kuruluş, açılış, çalışma ve denetleme usul ve esaslarına dair yönetmeliğin 12. maddesinde, mamul madde üretiminde ürünün bileşimine katılmasına izin verilenler haricinde herhangi bir maddenin ne amaçla olursa olsun kullanılmasının yasak olduğu belirtilmektedir (85).

Avrupa'da et muayenesi ile ilgili ilk işlemlere 8. yüzyılda rastlanmaktadır. Papa III. Gregor, at eti insanlarda hastalığa neden olduğu için tüketimini yasaklamıştır (47). Türkiye'de ise kırmızı et sanayiinin temeli 1952 Yılında kurulan Et ve Balık Kurumu (EBK) ile atılmıştır (38). Aradan geçen yaklaşık 52 yıllık sürede Ülkemiz de kaçak kesimlerin önüne geçilememiştir. Et endüstrisinde yapılan bu tür hileleri kesin olarak saptayacak pratik ve duyarlı yöntemlerin yeterince kullanılamaması nedeniyle bu sorunun daha ciddi boyutlara ulaştığı da bildirilmektedir (49).

Ülkemizde et türlerinin ayrımı elektroforetik yöntemler ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile yapılmaktadır (49,50). Ancak son yıllarda et türlerinin ayrımı daha duyarlı ve pratik olan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemi ile yapılmaya başlanmıştır (11,44,45,56,64,65,79). Ülkemizde ise yapılan literatür taramalarında bu konuda araştırma yapılmadığı görülmüştür.

### **3. 1. Et Türlerinin Ayrımında Kullanılan Yöntemler**

Et türlerinin belirlenmesinde aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin bazı dezavantajları mevcuttur. Bu yöntemler;

#### **3. 1. 1. Duyusal Niteliklerine Göre Ayrım**

Etler, karkas veya büyük parçalar halinde iken görünüş, renk ve koku gibi bazı duysal nitelikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. Fakat bu değerlerin subjektif olması, parçalanmış etlerde ve et ürünlerinde uygulanamaması, etlerin duysal özelliklerine göre ayrımını mümkün kılmamaktadır (15).

#### **3. 1. 2. Anatomik Özelliklerine Göre Ayrım**

Bu ayırım, karkas halinde ve bütün organların varlığında, kemik ve organlardaki anatomik farklılıklar esas alınarak yapılmaktadır (18). Fakat anatomik farklılıkların organ, karkas ve büyük et parçaları ile sınırlı olması nedeniyle parçalanmış, kıyılmış ve ürün haline getirilmiş etlerin ayrımı yapılamamaktadır. Anatomik farklılıkların daha çok kemiklerde ve iç organlarda bulunması, zoolojik yönden birbirine yakın hayvanların anatomik benzerlik göstermesi, evcil ve yabani hayvanlar hakkında yeterli anatomik bilgiye sahip olunmaması, uzman kişilere ihtiyaç göstermesi gibi faktörler etlerin anatomik olarak ayrımını sınırlı veya imkansız hale getirmiştir (15,46,49).

#### **3. 1. 3. Kılın Histolojik Yapısına Göre Ayrım**

Kıl, sırasıyla kök, gövde ve uç olmak üzere üç kısımdan meydana gelir. Kılın histolojik yapısı hayvan türüne göre değişmektedir. Hayvanlara ait kılların

ayırıcı tanısında cuticula tabakası çok önemli bir rol oynar. Çünkü bu tabaka farklı tür hayvanlarda farklı görünümündedir. Bunun yanı sıra gövdeyi oluşturan kabuk tabakasının ışığı kırma derecesinin türlere göre farklı olması tür tespiti için önemli bir özelliktir (46).

Bu yöntemle ayırım, karkas veya etlerin üzerinde bulunan kılların histolojik muayenesi ile yapılmaktadır (18). Ancak toplumun tüketmediği hayvan etlerini satan kişiler, bu etlerin üzerine eti tüketilen hayvanların kıllarını serpiştirebilir veya etin üzerinde kıl bulunmayabilir. Dolayısıyla etin üzerinde bulunan kıl, o etin elde edildiği hayvana ait olmayabilir. Bu nedenle bu yöntem de güvenilir değildir (15,49,50).

#### **3. 1. 4. Yağ Özelliklerine Göre Ayırım**

Daha çok doku yağlarının kimyasal özellikleri (donma ve erime noktaları, iyot, sabunlaşma, Reichert-Meissl sayıları, refraktometre indisleri, içermiş oldukları yağ asitlerinin miktar ve çeşitleri vb.) esas alınarak ayırım yapılmaktadır. Ancak bu analizlerin bütün ürünlerde uygulanamaması, aynı hayvanın değişik bölgelerinde bulunan yağların farklı özellikte olmaları ve analiz değerlerinin türlere göre çok yakınlık göstermesi nedeniyle tür ayırımı kesin olarak yapılamamaktadır. Ayrıca et ürünlerinde kullanılması muhtemel olan bitkisel yağların karıştırılmasıyla da hatalı sonuçlar alınmaktadır (15,18,49,50).

#### **3. 1. 5. Glikojen Miktarına Göre Ayırım**

Etlerdeki glikojen miktarı esas alınarak ayırım yapılabilmektedir. Ancak rigor mortisin oluşumu sırasında glikojenin laktik aside yıkımlanması, aynı tür

hayvanlarda kesim öncesi uygulanan işlemlere, postmortem dönemde karkasın muhafaza sıcaklığına ve karkasların asılma şekillerine bağlı olarak glikojen miktarının farklı bulunmasının yanı sıra, çeşitli katkı maddeleri ilave edilmiş ürünlerde glikojen miktarının güç saptanması gibi olumsuz özellikleri vardır (15).

### **3. 1. 6. Immunolojik Yöntemlerle Ayırım**

Deney hayvanlarına, hayvan türlerine ait proteinlerin parenteral olarak enjekte edilmesinden sonra bu maddelere karşı oluşan antikorların in vitro ortamda et antijenleriyle karşılaştırılması esasına dayanır (42). İlk kez 1900 yılında immunolojik yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmış ve genetik bakımdan birbirinden farklı hayvanlara ait çiğ etlerin ayırt edilebildikleri, buna karşın genetik bakımdan yakın olan hayvan türlerine ait etlerin çiğ de olsalar benzer antijenik niteliklere sahip olmalarından dolayı belirlenemedikleri, ayrıca ısı işlemi uygulanmış et ve et ürünlerinde antijenik yapının denaturasyonundan dolayı bu yöntemle türlerin güvenilir bir şekilde ayırt edilemeyecekleri bildirilmiştir (24,64). Yine bazı araştırmacılar (49,53), bu yöntemlerle genetik olarak birbirine yakın hayvan türlerinin etlerini tam olarak ayıramadıklarını belirtmişlerdir. Bu amaçla geliştirilen başlıca yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

#### **3. 1. 6. 1. Anafilaksi Denemesi**

Hayvan türlerine ait çeşitli antijenik maddeler (et ekstraktı, kan, kan serumu) deney hayvanlarına enjekte edilerek vücutlarında antikor oluşturulur. Deney hayvanlarına aynı yabancı bir protein belli aralıklarla iki kez enjekte edildiğinde, ikinci enjeksiyondan sonra anafilaksi belirtileri görülmektedir. İşte bu

prensibe dayanarak anafilaksi reaksiyonu ile etlerin teşhis edilebileceği ileri sürülmüştür (15,50).

### **3. 1. 6. 2. Presipitasyon Yöntemi**

#### **3. 1. 6. 2. 1. Presipitasyon Halka Yöntemi (Uhlenhut Yöntemi)**

Presipitasyon metodunun esası, deney tavşanlarına yabancı proteinlerin enjekte edilmesiyle kan serumlarında antijen olarak kullanılan bu proteinlere karşı antikorların oluşturulmasıdır (46).

Muayenesi yapılacak olan şüpheli et veya et ürününden ekstrakt hazırlanır. Hazırlanan bu ekstrakt, tavşanlara 1., 2. ve 3. günlerde sırasıyla 5, 10 ve 15 ml miktarında periton içine enjekte edilir ve son enjeksiyonu takiben 12. günde tavşanlardan aseptik koşullarda kan alınarak serumu (antiserum) çıkartılır .

Uhlenhut tüplerine 0.5 ml miktarında muayene edilecek ekstrakt konulur. Sonra antiserum içeren pipet tüpün dip kısmına daldırılarak yavaşça içerisindeki antiserum bırakılır. Yoğunluğu fazla olan antiserum alt kısımda kalır. Pipet dikkatlice tüpten çekilip dışarı alınır. Antijen ve antiserum homolog ise 15 dakika içerisinde iki sıvının temas yüzeyinde presipitasyon oluşur (46). Bu yöntemde birbirlerine yakın olan türlerin etleri ve %5'in altındaki farklı tür et karışımlarının kesin olarak saptanamadığı vurgulanmıştır (15,46).

### **3. 1. 6. 2. 2. Agar Jel İmmunodiffuzyon Yöntemi (AGİD), (Ouchterlony Yöntemi)**

Katılmış agarda karşılıklı ayrı ayrı çukurcuklar oluşturulur. Bu çukurcuklardan birine antijen (et ekstraktı) diğerine antikor (antiserum) konulur. Antijen ile antikor agar jel içerisinde birbirlerine doğru diffuze olur ve birleşme noktalarında presipitasyon oluşur. Sonuç 72 saat içinde alınmaktadır (3). Fakat bu yöntemde de birbirlerine yakın türler arasında çapraz reaksiyonların görülmesi, maliyetin yüksek olması ve deneylerin uzun zaman alması gibi olumsuz yönler bildirilmiştir (50,64).

İmmunolojik yöntemlerde, kesin sonuç için spesifik antiserumun olması, ısı işlemi uygulanmış ve soğukkanlı hayvan etleri için antiserum oluşturulamaması, çapraz reaksiyon oluşumu nedeniyle birbirlerine çok yakın türlerin ayırımının güç olması, çapraz reaksiyonların oluşumunu engellemek için spesifitesi yüksek antikor üretiminin pahalı olması, antiserum hazırlamanın uzun zaman alması, fazla miktarda antiserum kullanılması ve analizin bazen uzun zaman (72 saat) alması gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmektedir (46,50).

### **3. 1. 6. 3. İmmuno Assay Yöntemler**

Radio Immuno Assay (RIA) ve ELISA ile yapılmaktadır. RIA ve ELISA yalnızca antijen-antikor kompleksinin presipitasyonuna dayanan klasik immunolojik metodlar değildir (50). RIA, katı faz üzerindeki antijen-antikor kompleksine radyo izotop işaretli antikorların bağlanması ve gamma-counter cihazıyla ölçülmesi esasına dayanır. ELISA, katı faz üzerinde antijenin bazı determinantlarına spesifik antikorların, diğer determinant gruplarına da enzim

işaretili antikorların bağlanması ve substrat aracılığıyla enzim aktivite düzeyinin fotokolorimetre ile ölçülmesi prensibine dayanır (49). ELISA teşhis metodu olarak ilk kez 1971 yılında, et türlerinin tespit edilmesinde ise ilk olarak 1982 yılında kullanılmıştır (51).

Genetik bakımdan birbirine yakın olan et türleri (at eti içinde eşek, koyun eti içinde %0.1'lik keçi etini, sığır eti içinde %1'lik bufalo etinin saptanması), yağ oranı yüksek, farklı oranlarda değişik etleri içeren ürünlerdeki et türlerinin orijini ELISA ile yapılmıştır. Donmuş veya 80°C'de 60 dakika ısı işlemi uygulanmış ürünlerde de uygulanması nedeniyle diğer immunolojik ve elektroforetik yöntemlerden daha üstündür (15). Ancak ELISA'nın diğer yöntemlere karşı bu üstün özellikleri yanında, monoklonal antiserum kullanma zorunluluğu, antiserumların duyarlı ve monospesifik hale getirilmesinin pahalı ve uzun zaman alması, sistemi kurmanın pahalı oluşu gibi dezavantajları vardır (50).

Kang'ethe ve Gathuma (52), ısıya dayanıklı kas antijenleri için antiserum kullanarak otoklavlanmış etlerde tür ayrımını tespit etmişlerdir. Fakat bazı çapraz reaksiyonların olduğu belirtilmiştir (24). Yarışmalı ve indirek ELISA teknikleriyle çiğ ve tütülenmiş et türlerinin tespit edilebildiği, fakat pişirilmiş et ürünlerinde bu yöntemlerin duyarlılıklarının azaldığı, 115°C'nin üzerinde ısı işlemi görmüş etlerde sonuç alınmadığı bildirilmiştir (49). Yine türlere özgü protein izolasyonundaki güçlüklerin ELISA'nın yaygın olarak kullanılmasına engel teşkil ettiği belirtilmiştir (30).

### **3. 1. 6. 4. Immunoelktroforezis**

Antijenlerin, elektroforetik mobilitelerine göre ayrılarak homolog antikorla presipitasyon oluşturması ilkesine dayanır (15). Bu yöntemin Ouchterlony yönteminden daha hassas olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde numunenin alınmasından 36 saat sonra sonuç alınabildiği belirtilmiştir (3).

Bu yöntemin kullanımında, laboratuvarında bütün hayvan türlerine ait referans protein veya enzim bulundurulması zorunluluğu, birden fazla türü içeren ve %2'den düşük düzeyde et karıştırılmış örneklerde uygulanamaması, et ekstraktının hazırlanmasının güç olması, hızlı olmaması ve aynı hayvan türünün değişik kaslarında farklı elektroferogramların çıkması gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmiştir (48).

### **3. 1. 7. Proteine Dayalı Yöntemler**

#### **3. 1. 7. 1. Elektroforez**

Elektroforez, proteinlerin izoelektrik noktaları dışındaki pH'larda sahip oldukları net elektrik yüklerinde ya da molekül ağırlıklarındaki farklılıklardan yararlanarak, bir destek madde içerisinde uygulanan elektrik akımıyla farklı noktalarda toplanmaları esasına dayanan bir ayırıtırma yöntemidir (15,49,50).

Bu yöntemin, immunolojik yöntemlere göre daha net sonuç verdiği ve immunolojik reaksiyonlarda görülen çapraz reaksiyonların oluşmadığı, karıştırılmış ve parçalanmış et ürünlerinde, 100°C'de 30 dakika ısıl işlem uygulanmış etlerde de tür ayırımında kullanılabileceği belirtilmektedir (49). Fakat daha yüksek ısı işlemi uygulanmış et türlerinin ayırıt edilmesinde kesin sonuç

vermediği belirtilmiştir (41,64,90). Yine yöntemin pahalı ve zaman alıcı olması, protein seperasyonunun güç olması, bireysel faktörlere bağlı olarak bir hayvan türünde farklı elektroferogramların oluşması, her türe özgü referans enzim veya protein bulunma zorunluluğu, enzim araştırmalarında katılan et oranının düşük düzeylerde olması halinde tür tespitinin yapılamaması, ELISA ve RIA'da olduğu gibi yerleşik kurulu bir laboratuvara ve uzman personele gereksinim duyulması gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (50,70).

### **3. 1. 7. 2. İzoelektrofokusing ( IEF )**

Elektroforeze göre daha duyarlı, hızlı ve ucuz olup, bütün hayvan etlerinde, ısıtılmış, dondurulmuş etlerde, et karışımlarında ve ürünlerinde uygulanmaktadır.

pH'sı 2-11 arasında değişebilen bir destek maddesi (polyakrilamid jel vb.) içinde proteinlerin elektrik akımıyla net yüklerinin sıfır olduğu izoelektrik noktalarına gç etmeleridir. Böylece izoelektrik noktaları farklı proteinler değişik yerlerde toplanarak birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Bu yöntemle minimum %2 oranındaki karışımların saptanabildiği belirtilmektedir (49). Ancak, bu yöntem birbirleriyle yakın türlerin içerdikleri protein kompozisyonundaki farklılıkların bilinmesini gerektirdiği gibi (rneğin, koyun ve keçinin kas proteinleri arasındaki fark), aynı tür içinde, serum proteinleri ve beyin proteinleri ile elektroforez yapıldığında, bireyler arasında da farklılıkların olabileceği belirtilmiştir (56).

### **3. 1. 7. 3. Kromatografik Yöntemler**

Kaslardan filtre edilerek hazırlanan et ekstraktlarının kromatografide kullanılarak, et türlerinin identifikasyonunun yapılabildiği bildirilmiştir (49,50). Samy ve ark. (74), kas proteinlerinin yapısının türlere göre farklı olması nedeniyle likit kromatografide et türlerinin saptandığını ve her türe ait spesifik kromatogramların (kromatografik analiz sonucu elde edilen grafik) oluştuğunu bildirerek, bilinmeyen et karışımlarının türe spesifik standart kromatogramlarla karşılaştırılarak identifikasyonlarının yapılabildiğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, bu yöntemin yalnızca taze ve donmuş etler için uygulanabileceğini, ayrıca coğrafik, mevsimsel ve bireysel (yaş, cins, yetiştirme vb.) faktörlerin tür spesifik kromatogram profilini etkileyebileceğini belirtmişlerdir.

### **3. 1. 8. Dokularda Genetik Materyalin Saptanması Temeline Dayalı Yöntemler**

#### **3. 1. 8. 1. Deoksiribonükleik Asit'in (DNA) Makromoleküler Yapısı ve Önemi**

Nükleik asitler, 1869 yılında lenfosit hücrelerinde saptanmış, süre gelen çalışmalar neticesinde 1944 yılında DNA'nın genetik bilgiyi taşıyan molekül olduğu kanıtlanmıştır (83). Hücrelerdeki bütün biyolojik olayları yöneten, genetik bilgileri taşıyarak bunların nesillere aktarılmasında önemli fonksiyonları bulunan nükleik asitler (DNA ve RNA) hücrelerde bir merkezi jeneratör işlevi görmektedirler (14).

Watson ve Crick (93), 1953 yılında, DNA'nın çift iplikçikli ve sarmal yapıya sahip olduğunu saptamışlardır (Şekil 1).



Şekil 1. DNA' nın Watson-Crick Modeli (93)

Hücrelerde bütün biyolojik olayları yöneten, genetik bilgileri taşıyarak sonraki nesillere aktaran nükleik asitler; deoksiribonükleikasit (DNA) ve ribonükleikasitler (RNA) olarak ikiye ayrılır. Bu iki molekül, nükleik asitlerin birbirlerine eklenmesiyle meydana gelir. Yapılarındaki şeker ve fosfat üniteleri, fosfodiester bağları ile birbirine bağlanarak omurgayı oluştururlar. Bu omurgayı ise pirimidin ve pürin bazları birarada tutar. Pirimidin bazları sitozin (C), timin (T) ve urasil (U), pürin bazları adenin (A) ve guanin (G) dir. Bir iplikçikte

bulunan pirimidin bazlarına karşı diğer iplikçikte pürin bazları bulunur. Yani adeninin karşısında timin, sitozinin karşısında guanin bulunmaktadır (Şekil 1).

DNA'nın sarmal ve çift iplikçikli yapıda olması son derece önemlidir. Çünkü çift iplikçikli olmakla genetik bilgiler garanti altına alınmaktadır. Ayrıca DNA kendine bir replikasyon mekanizması kurarak, bir iplikçik diğerinin sentezi için kalıp ödevi görmektedir. Bir iplikçikte oluşan kopma ve zedelenmelerde sağlam olan karşı iplikçik kalıp olarak kullanılarak, kopan yerdeki bazların yerine polimeraz enzimi tarafından yenileri yerleştirilir (14,83).

Dört temel bazın (A,T,G,C) değişik sırada, yanyana ve karşılıklı dizilmesinden oluşan DNA iplikçikleri hücreler ve canlılar için çok önemli olan genetik bilgileri taşırlar ve bu bilgiler bazların diziliş sırası ile yakından ilgilidir. Farklı türlerin DNA'ları birbirlerinden farklıdır. Bu durum türler arasında genetik farklılıkları oluşturur (13,14,83).

### **3. 1. 8 . 2. DNA Hibridizasyon Yöntemleri**

Protein yapılarındaki farklılıklar, farklı dokuların farklı proteinleri içermeleri ve proteinlerin yüksek ısıda denature olmaları (22,24,36,70,90), et türlerinin ayırımında proteine dayalı yöntemlerin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (30,71). Bu bakımdan yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır (37). Bir grup araştırmacı (29-31,36,86,90,95), et türlerinin belirlenmesinde DNA hibridizasyon metodunu kullanmışlardır.

Hibridizasyon teknikleri doku, organ, hücre kültürü, ekskret, sekrete ait DNA'lardaki spesifik genlerin işaretli prob'larla (bilinen, kısa ve spesifik DNA

parçası) ortaya konulması esasına dayanır (14,26). Bu amaçla aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır;

### **3. 1. 8. 2. 1. Southern Blot Hibridizasyon**

İncelenecek örneklerdeki DNA'lar saf olarak elde edildikten sonra bir restriksiyon enzimi ile kesilerek çok sayıda büyüklü küçüklü DNA segmentleri (parçaları) haline getirilir. Bu segmentler, agaroz jel elektroforezde büyüklüklerine (büyükten küçüğe doğru) veya molekül ağırlıklarına göre bir seperasyona tabi tutulur. Agaroz jel üzerindeki DNA bantları nitrosellüloz membran üzerine transfer edilirler. Membran üzerine, burada aranması gereken DNA'nın, radioaktif maddeyle işaretli spesifik komplementeri olan (cDNA prob), tek iplikçikli kısa segmentleri konularak prob DNA ile membrandaki tek iplikçik DNA segmentlerinin birleşmesi sonucu DNA-DNA hibridizasyonu sağlanır. Sonra membran üzerine X-ışınlarına duyarlı bir film yerleştirilerek radioaktivitenin film üzerine etkimesi sağlanır. Radioaktif bölgeler siyah bantlar halinde ortaya çıkarlar (otoradiografi). Böylece kağıt üzerinde DNA-DNA hibridizasyon bölgeleri tespit edilir. Bu durum, DNA süspansiyonunda aranan türe ait DNA sekanslarının bulunduğunu ortaya koyar (13).

### **3. 1. 8. 2. 2. Dot Blot hibridizasyon**

Materyalden DNA ekstraksiyonu yapılır, DNA'lar konsantre edilir ve denaturasyona tabi tutulur. Sonra süspansiyondan bir damla nitrosellüloz kağıt üzerine damlatılır, denaturasyonu takiben ısıtılarak fikse edilir. Kağıt üzerine <sup>32</sup>P ile işaretli DNA probları konulur ve hibridizasyon sağlanır (13,31).

DNA hibridizasyon yöntemi, etlerin içerdikleri DNA'ya dayandığından immunolojik ve elektroforetik yöntemlerden çok daha duyarlıdır (30,31,95). Bu yöntem çiğ et ve et ürünlerinde olduğu kadar, ısı işlemi uygulanmış et ve et ürünlerinde de türlerin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (24,30).

Chikuni ve ark. (24), Dot-blot hibridizasyon yöntemiyle türlerin genomik DNA parçalarını ortaya koyarak belirli hayvan türlerinin etleri arasındaki ayrımı başarmışlardır. Benzer şekilde Wintero ve ark. (95), domuza ait spesifik DNA dizilerini kullanıp ısı işlemi görmemiş ürünlerde, sığır eti içerisine %0.5 oranında karıştırılmış domuz etini tespit etmişlerdir. Ebbehøj ve Thomsen (31), DNA hibridizasyon yöntemi kullanarak yaptıkları bir çalışmada sığır eti içerisine %2.5 oranında karıştırılmış koyun ve keçi etlerini rahatlıkla tespit edebildiklerini, fakat keçi-koyun eti karışımlarında %10'dan daha düşük oranları tespit edemediklerini belirtmişlerdir.

Bu yöntem çiğ et ve et ürünlerinde olduğu kadar, 120°C'de 10 dakika ısı işlemi uygulanmış et ve et ürünlerinde de türlerin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (30). Ancak hibridizasyon teknikleriyle et türlerinin ayırt edilmesinde, birbirleriyle yakın ilişkili tür etlerinin karıştırılması (örneğin, sığır-bufalo, koyun-keçi) ve bunların tespit edilmesi için kullanılan problemlerin spesifikitesiyle ilgili olarak bazı problemlerin ortaya çıktığı vurgulanmıştır (30,64). Ayrıca bu tekniğin çok pahalı, karmaşık ve zaman alıcı olduğu ileri sürülmüştür (62,67,73,80,95).

### **3. 1. 8. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Yöntemi**

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemi, aranan genetik materyalleri saptamak amacıyla gerçekleştirilen, birkaç saat gibi kısa bir zaman içerisinde, hedeflenen nükleik asidin (DNA) çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (27,32,33,36,55,80). PCR, ilk defa 1983 yılında uygulanmaya başlanmış olup, adli tıptan ekolojiye, teşhisten gıda kontrolüne kadar pek çok alanda kullanılmaktadır (2,20,23,27,80).

PCR'nin en önemli özelliği, özel bir DNA dizisini seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ek olarak DNA'nın analiz edilmesinde olanak sağlar (26,33). Çalışılan genetik materyal, çok az miktarda veya diğer farklı DNA' lar arasında da olsa çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirilerek kolayca identifiye edilebilir (14,27,33,67,95). Ayrıca PCR ile tek iplikli DNA ve "reverse transcription" işlemi vasıtasıyla kopya DNA'ya dönüştürülen RNA' ların amplifiye edilmesi de söz konusu olabilir (27,33).

#### **3. 1. 8. 3. 1. PCR'nin Çalışma Prensipleri**

PCR'nin başlangıç materyali, çoğaltılacak olan baz dizisine sahip hedef DNA'dır. Çoğaltılacak olan diziyi ayrıca izole etmeye gerek yoktur. Çünkü reaksiyonda kullanılacak olan primerler tarafından bu diziler tanımlanır. Primer, hedef DNA'yı tanımlayan tek iplikli küçük sentetik oligonükleotidlerdir (12,16,23,27,55,61,88). Primerler hedef olarak seçilmiş DNA'nın belirli bir bölgesine yerleşerek tamamlayıcı rol oynamasını sağlayacak spesifik dizilerden oluşur. Neticede hedef bölgenin uçlarına bağlanarak (annealing yada

hibridizasyon işlemi) çoğaltılacak olan DNA bölgesinin sınırlarını belirlerler. DNA dizileri 5' ve 3' olmak üzere 2 uca sahip olup polimerizasyon (DNA iplikçığıne baz eklenmesi) sürekli olarak 5'→3' yönüne doğru oluşur (16,27,33).

Reaksiyon karışımına katılacak primer konsantrasyonu çok önemlidir. Çok düşük primer konsantrasyonu, istenilen DNA dizisini ya çok az oluşturur yada hiç oluşturamaz. Çok yüksek primer konsantrasyonu da hedef olmayan (istenmeyen) DNA dizilerinin çoğalmasına yada primerlerin birbirlerine bağlanarak “primer dimer” adı verilen ve spesifik olmayan çoğalmalara yol açabilir (14,16,75,96).

Polimeraz zincir reaksiyonunda denaturasyon, hibridizasyon (annealing) ve sentez (uzama) olmak üzere üç basamak mevcuttur. Farklı ve kontrollü sıcaklık derecelerinde meydana gelen bu üç basamak bir siklusu oluşturur (Şekil 2,3). Bu işlem 25-30 defa tekrar edilerek, üzerinde çalışılan hedef DNA milyonlarca sayıda çoğaltılabilmektedir (14,16,20,26,33,39,84,89).

### **3. 1. 8. 3. 2. Hedef DNA'nın Denaturasyonu**

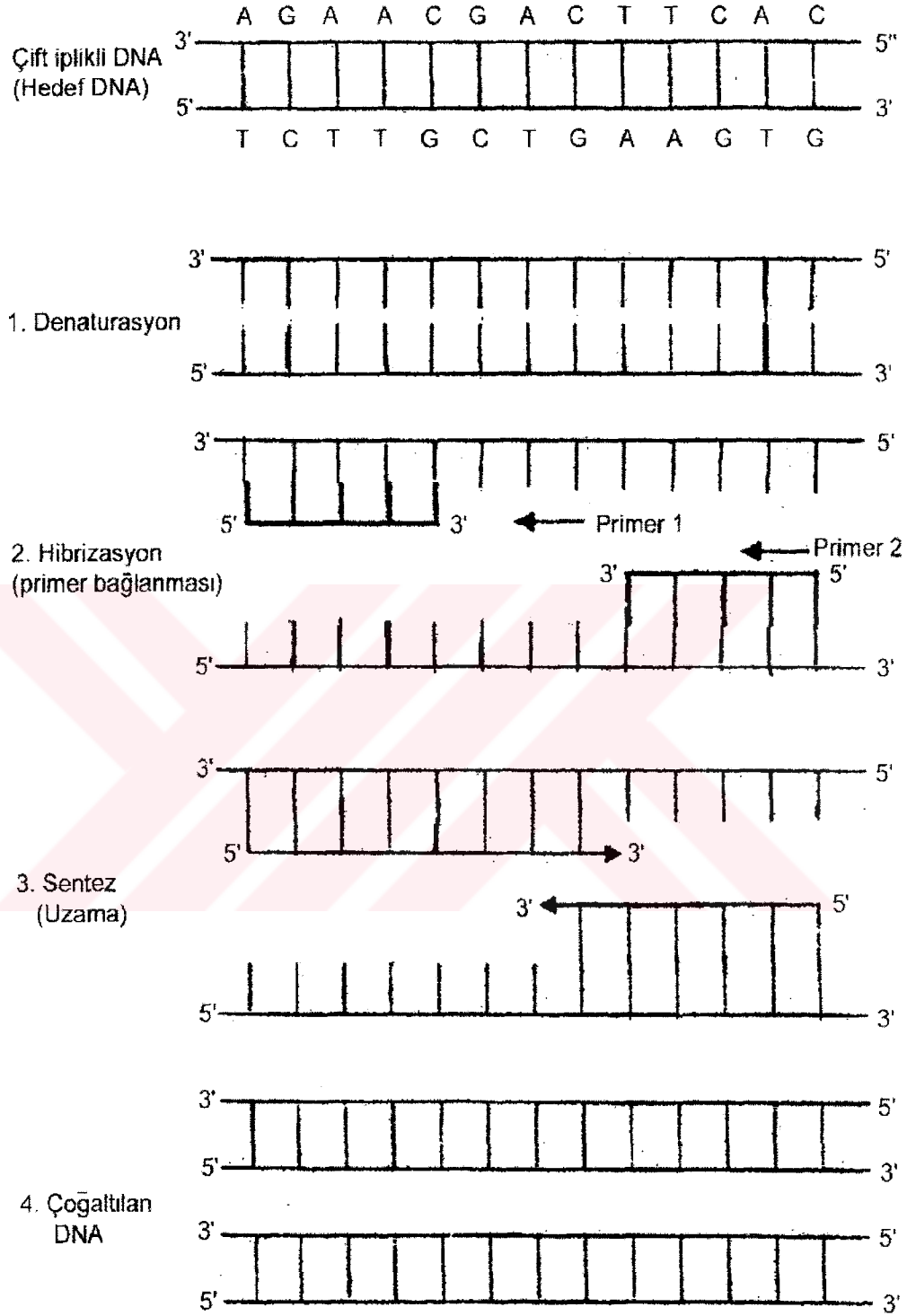
Gerekli materyaller, mikrosantrifüj tüplerine (eppendorf, vb.) konulduktan sonra, istenilen ısı derecelerine ayarlanmış olan thermal cycler'e (ısı döngü cihazı) yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 90-95°C'ye yükseltir ve bu ısıda hedef DNA denature edilir. Denaturasyon işlemi ile DNA ipliklerini birbirine bağlayan hidrojen bağları koparak çift iplikli hedef DNA (ds DNA)'dan, tek iplikli (ss DNA) DNA oluşturulur (Şekil 2). Hedef DNA'daki guanin ve sitozin miktarına göre denaturasyon için gerekli sıcaklık derecesi 95°C'den daha yüksek uygulanabilir. Çünkü guanin ve sitozin arasında 3 hidrojen bağı, adenin ve timin

arasında ise 2 hidrojen bağı bulunmaktadır. Yine sentez basamağının süresi, hedef DNA'nın uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir (14,26,27,39,87).

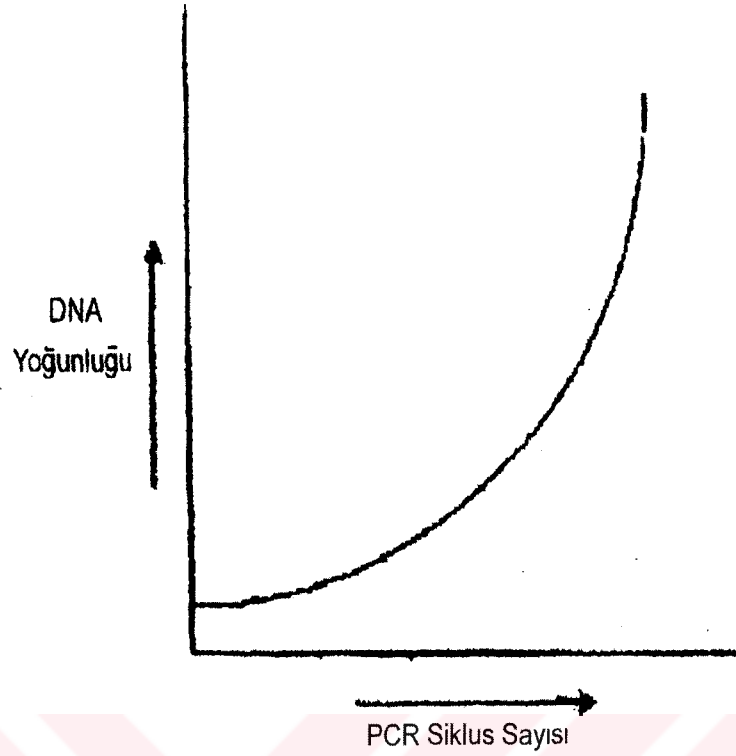
### **3. 1. 8. 3. 3. Primerlerin Bağlanması ( Hibridizasyon )**

Hibridizasyon basamağı, spesifik primerlerin tek iplikli DNA parçalarına uygun yerlerden bağlanmasıdır (27,33).

Denaturasyon için gerekli olan süre sona erdikten sonra tek iplikli nükleik asitler, primerler ve DNA polimeraz için kalıp işlevi görür. Oligonükleotid primerlerin, tamamlayıcı DNA molekülüne kaynaşmasına imkan vermek için, thermal cycler ısıyı 37 ile 65°C'ler arasına düşürür ve ortamda bulunan primerler hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanır (Şekil 2). Primerler DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'→ 3') bağlanırlar. Bu basamak için gerekli olan ısı ve süre, primerlerin nükleotid yapısına (guanin ve sitozin oranına), primerlerin uzunluğuna ve bunların PCR karışımındaki konsantrasyonlarına bağlı olarak değişir. En uygun hibridizasyonun 55-65°C'ler arasında olduğu belirtilmektedir. Yüksek ısının kullanılması yanlış nükleotidlerin primerlerin 3' ucuna bağlanmasını önler. Hibridizasyon ısısının düşük tutulduğu durumlarda ise spesifik olmayan küçük DNA parçacıklarının oluştuğu bildirilmiştir (14,20,26,27,33,39,61,69).



Şekil 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Safhaları (27).



**Şekil 3.** Amplifiye Edilen DNA Miktarının PCR Siklus Sayısı ile İlişkisi (27)

#### **3. 1. 8. 3. 4. Polimerizasyon (Sentez = Uzama)**

DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla hedef DNA sarmalının tamamlanması işlemidir. Primerler hedef DNA'daki spesifik sekanslara bağlandıktan sonra thermal cycler ısıyı 70-72°C'ye çıkararak tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan taq polimeraz enzimi 5'→3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanarak, primerlerin 3' dizisine nükleotidleri yerleştirir (Şekil 2) ve böylece hedef DNA dizisinin bir kopyası elde edilir. Bu periyodun sonunda sıcaklık yaklaşık 20 saniye süreyle 94°C'nin üzerine çıkarılır ve böylece orijinal iplik ve yeni sentez edilmiş tamamlayıcı iplik birbirinden ayrılır. Isıtma işlemi tek iplikli DNA'nın diğer sikluslarda kalıp işlevi görmesi, primerlerin bağlanması ve yeni

DNA ipliklerinin DNA polimeraz tarafından sentezlenmesi için 30-50 defa tekrarlanabilir (14,19,26,27,87).

PCR amplifikasyon işleminin etkinliğinde genel olarak dört temel faktör rol oynar. Birincisi, PCR reaksiyonundaki siklus sayısıdır. Her ne kadar hedef DNA'nın amplifiye edilecek miktarını siklus sayısı belirlese de DNA konsantrasyonu arttıkça, primer bağlanmasından ziyade polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan sarmalların birbirine bağlanmasının söz konusu olduğu ve buna bağlı olarak çok sayıda PCR sikluslarının, az sayıda siklusa oranla daha az etkili olacağı bildirilmiştir (Şekil 3). İkinci faktör, amplifiye edilecek hedef DNA miktarıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunda yüksek konsantrasyonda hedef DNA ( $>10^7$ ) ihtiva eden numuneler kullanıldığında düşük konsantrasyonlardakine ( $<10^4$ ) nazaran daha düşük düzeyde bir amplifikasyon elde edileceği belirtilmiştir (67,72,73). Üçüncü faktör, hedef DNA sekansının uzunluğudur. PCR'nin etkinliği ile sekans uzunluğu arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur. Dördüncü önemli faktör ise primer bağlanması ve hibridizasyon için kullanılan ısı ile ilgilidir. Hibridizasyon ısısı ile PCR'nin spesifitesi arasında pozitif bir korrelasyon mevcuttur. Yüksek ısıda PCR'de önemli bir problem olan yanlış hibridizasyonun oluşma ihtimali düşüktür (27).

### **3. 1. 8. 3. PCR Tekniği ile Et Türlerinin Tespiti**

Et ve et ürünlerinde tür ayrımının yapılabilmesi için duyuşal niteliklere, anatomik farklılıklara, kılın histolojik yapısına, doku yağlarının özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan çalışmaların yanısıra çeşitli immunolojik, elektroforetik ve hibridizasyon metodları denenmiştir (15,21,22,25,71,77,90,91).

Bu metodlarda karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi için doğru sonuç veren, basit ve hızlı yöntemlerin varlığı zorunlu hale gelmiştir (28,36,56,62,77).

Moleküler biyolojide son yıllarda kaydedilen hızlı gelişmeler, özellikle DNA'nın in vitro olarak çok kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun geliştirilmesi bitki, bakteri ve hayvan türlerinin tespit edilmesinde büyük kolaylık sağlamış ve başarıyla kullanılmıştır (1,2,16,34,35,54,58,59,63,66,76,78,81,82,86,94).

Et türlerinin tespit edilmesinde kullanılan DNA hibridizasyon yöntemine göre, tür spesifik hedef DNA'nın PCR ile çoğaltılmasının daha hassas ve hızlı bir teknik olduğu saptanmıştır (43,90).

Farklı türlerin DNA'ları birbirlerinden farklıdır. Bu durum türler arasında genetik farklılıkları oluşturur (14,40,83). PCR tekniğinde DNA'nın bu özelliklerinden yararlanılarak tür ayırımı yapılmaktadır. Bu amaçla PCR ile PCR tabanlı olan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleriyle et türlerinin ayırımı yapılmıştır (4,11,36,44,45,56,58,62-66,79,91).

Konuyla ilgili yapılan literatür taramalarında yurt dışında sınırlı sayıda kaynak bulunmasına karşın, ülkemizde bununla ilgili çalışmaya rastlanılamamıştır.

Koh ve ark. (56), RAPD yöntemiyle 10 farklı tür hayvan etini ayırt etmişlerdir. Iciar ve Ingrid (44), üç farklı 10 bazlık primer kullanarak değişik işlemlere tabi tutulmuş at, eşek, katır, domuz, Kanada geyiği, ren geyiği, kuzu, keçi ve kanguru etlerinde tür ayırımını yapmışlardır. Appa Rao ve ark. (11), RAPD

yöntemini kullanarak 14 farklı primer ile çiftlik hayvanlarında tür tayinini yapmışlardır. Lee ve Chang (58), ise yine RAPD yöntemiyle 2 farklı primer kullanarak 8 farklı hayvanda ve insanda tür tespitini başarmışlardır. İlhak ve Arslan (45), sığır, koyun, keçi ve yabani domuz etini RAPD yöntemi ile ayırt etmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (43,57,65,67), RFLP yöntemini kullanarak et ve et ürünlerinde tür tespitini yapmışlardır.

Meyer ve ark. (64), Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemiyle 121°C'de 10 dakika ısıtılmış et ürünlerinde %50, 20, 10, 5 ve 2 oranlarında domuz etini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar çiğ etlerde Ouchterlony metoduyla %2 ve %5'lik et karışımlarını tespit edemediklerini, ELISA ile 100°C'de 20 dakika ısı işlem uygulanmış et karışımlarında ancak %50 oranında karıştırılmış et türlerini tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (66), yaptıkları başka bir çalışmada da, et ürünlerine ilave edilmiş soya proteinini PCR yöntemiyle tespit etmişlerdir.

PCR yöntemi ile 80, 100 ve 120°C'de 30 dakika ısı işlemi uygulanmış kanatlı etlerinde (43), tür tayini yapılmıştır. Başka bir çalışmada (94), yine PCR yöntemiyle 26 farklı balık ve 17 farklı hayvan türü tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 100 ve 120°C'lerde 30 dakika ısı işlemi uygulanmış sığır, domuz, tavuk, koyun ve keçi etlerinde tür tayinini saptadıklarını, ancak 120°C'de 30 dakika ısı işlemi uygulanmış at etinde sonuç alamadıklarını bildirmişlerdir (62). Lockley ve Bardsley (60), RFLP yöntemiyle %10, 5 ve 1 oranlarında karıştırılmış tavuk ve hindi etlerini tespit etmişlerdir.

Bu çalışma, türe özgü spesifik primerler kullanılarak farklı türlerin et karışımlarında PCR ile et türünü saptamak ve özellikle karışım halindeki etlerde PCR'nin duyarlılığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır.



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4. 1. Et Örneklerinin Sağlanması

Çalışmada at, köpek, kedi, sığır, koyun, domuz ve keçi etleri kullanıldı. Et örnekleri, DNA ekstraksiyonu yapılınca kadar  $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Çalışma 3 tekrar yapıldı.

### 4. 2. PCR Yönteminin Uygulanması

#### 4. 2. 1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Agaroze jel elektroforez tankı (ThermoHybaid, HB 1214)
- Elektroforez güç kaynağı (Wealtec, Elite 300 plus)
- Film (Poloroid T 667, Black and White Print Film)
- Fotoğraf makinesi (Poloroid)
- Mikrosantrifüj (CLP, Model 3410)
- PCR Sprint (ThermoHybaid, England)
- Ultraviyole kaynağı (Spectroline, Model TC-312 E/F)

## 4. 2. 2. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması

### 4. 2. 2. 1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar

#### TNES solüsyonu

Tris : 2.42 g

NaCl : 8.76 g

EDTA- Na tuzu : 3.722 g

SDS : 2 g

Bu maddeler tartılarak 1000 ml'lik balon jöje içerisine konuldu ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

#### %10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

100 ml'lik balon jöjeye 10 g SDS konuldu ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

#### 6 M NaCl

100 ml'lik balon jöjeye 35,064 g NaCl konuldu ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

#### Fenol- kloroform- izoamilalkol (25:24:1)

AppliChem (Darmstadt, Germany) firmasından temin edildi.

### **3 M Sodyum asetat çözeltisi**

100 ml'lik balon jöjeye 26.424 g sodyum asetat konuldu ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### **%70 Alkol**

%96'luk etil alkolden 70 ml alınarak distile su ile 96 ml'ye tamamlandı.

## **4. 2. 2. 2. PCR İşleminde Kullanılan Tampon Ve Solüsyonlar**

### **Taq DNA Polimeraz**

**dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**

**PCR Tamponu (10x), pH: 8.3**

**MgCl<sub>2</sub> 25 mM**

**Mineral Yağ**

Promega (Madison, USA) firmasından temin edildi.

### **Primer**

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies, Inc, (Coralville, USA) firmasından temin edildi.

Sığır, koyun, keçi, at ve domuza ait spesifik primerler Tablo 1'de belirtilen kaynaklardan elde edildi. Köpek ve kediye ait mitokodriyal DNA dizileri ise (kedi için: accession number: NC\_001700, köpek için: accession number: NC\_002008) gen bankasından (8,9) temin edilerek spesifik primerleri tarafımızdan belirlendi.

Her bir hayvan türüne ait spesifik primer, 2.5 µl'sinde 20-25 pikomol (pmol) olacak şekilde steril distile su ile sulandırılarak PCR işlemi için -20°C'de muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 1'de gösterilmektedir.

**Tablo 1.** PCR yönteminde kullanılan tür spesifik primerler

Et türleri	Primerlerin baz dizilişi	Kaynak No
Sığır	5'- GCCATATACTCTCCTTGGTGACA- 3'	57
	5'- GTAGGCTTGGGAATAGTACGA- 3'	
Koyun	5'- TTAAAGACTGAGAGCATGATA- 3'	57
	5'- ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG- 3'	
Domuz	5'- GCCTAAATCTCCCCTCAATGGTA- 3'	57
	5'- ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG- 3'	
Kedi	5'- CATGCCTATCGAAACCTAACATAA- 3'	8
	5'- AAAGAAGCTGCAGGAGAGTGAGT- 3'	
Köpek	5'- GATGTGATCCGAGAAGGCACA- 3'	9
	5'- TTGTAATGAATAAGGCTTGAAG- 3'	
Keçi	5'- GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA- 3'	62
	5'- CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA- 3'	
At	5'- GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA- 3'	62
	5'- CTCAGATTCACCTCGACGAGGGTAGTA- 3'	

#### 4. 2. 2. 3. Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

##### **5x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) Tamponu**

Tris : 27.2 g

Borik asit : 13.6 g

EDTA : 2.8 g

Distile su : 500 ml

pH : 8.3

Hazırlanan stok TBE tamponu elektroforez işlemi sırasında 4 kat sulandırılarak kullanıldı.

##### **%1.5'lik Agaroz Jel**

0.75 g agaroz (Sigma) tartılarak 50 ml 1xTBE çözeltisine konuldu. Kaynar su banyosunda eritildikten sonra elektroforez kasetine döküldü.

##### **Jel Yükleme Tamponu**

Promega (Medison, USA) firmasından temin edildi.

##### **Ethidium Bromid Çözeltisi**

Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edildi.

10 mg/ml Ethidium bromid solüsyonundan 0.5 ml alınarak 10 ml'ye tamamlandı (0.5 mg/ml) ve koyu renkli bir şişede +4°C'de saklandı.

### 4. 3. Etlerden DNA'nın Ekstrakte Edilmesi

Et örneklerinden Koh ve ark. (56)'nın bildirdiği yöntem modifiye edilerek DNA ekstrakte edildi. Bu amaçla sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

1- Çalışmada kullanılan et türünün diğer hayvan türlerinin etleriyle kontamine edilmemesine özen gösterildi. Her hayvan türüne ait etten 0.5 g polypropilen tüpe alınarak üzerine 4 ml TNES solüsyonu ilave edildi.

2- Her tüpe 25 mg/ml hazırlanmış proteinaz K'dan 10 µl ve %10'luk SDS'den 50 µl ilave edilerek benmaride 58°C'de 8 saat bekletildi.

3- İnkübasyon sonunda 750 µl alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 250 µl 6 M NaCl ilave edilerek 11600 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.

4- Santrifüj sonunda 500 µl üst faz ayrı bir eppendorf tüpe aktarıldı, üzerine sırasıyla 25:24:1 oranlarında fenol-kloroform-izoamilalkol içeren solüsyondan 300 µl ilave edilerek vortekslendi ve 11600 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. DNA'nın bulunduğu üst faz sınır olan ara faza kadar alınarak başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı.

5- Ayrı tüpe alınan bu üst faza, elde edilecek olan DNA'yı daha saf bir hale getirmek için 300 µl kloroform ilave edildi. Kloroform protein, yağ, fenol ve fenolden kurtulan daha küçük parçaları ortamdan uzaklaştırır. Kloroform ilavesinden sonra tüpler vortekslendi ve 11600 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda yine üst faz dikkatlice alt fazdan sıvı aspire edilmeden çekildi ve ayrı bir tüpe aktarıldı. Daha saf bir DNA elde etmek için bu aşama bir kez daha tekrar edildi.

6- Ayrı bir tüpe alınan bu üst faz üzerine 400 µl saf etanol ve 40 µl 3 M Na-asetat ilave edilerek DNA'nın presipitasyonu için  $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 8 saat bekletildi.

Bunu takiben tüpler hemen santrifüje konuldu, 11600 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA'nın tortu halinde çökmesi sağlandı. Santrifüjden sonra tüplerin içindeki sıvı kısım dikkatlice boşaltıldı.

7- Tortu üzerine 400 µl %70'lik etil alkol ilave edildi. Yine 11600 x g'de 10 dakika santrifüj işlemi yapılarak DNA'dan Na-asetat uzaklaştırıldı. Santrifüjden çıkarılan tüplerin sıvı kısmı boşaltılarak dip kısımda sadece tortu bırakıldı.

8- Tüplerin ağzı 1-2 saat açık bırakıldı. Böylece tüp içerisinde kalmış olan alkol uçurularak tortu kurutuldu.

9- Kuruyan tortu üzerine 100 µl steril distile su ilave edilerek süspansiyon edildi. Böylece her hayvan türüne ait DNA elde edildi. Bu DNA'lar, primerlerin spesifite kontrolü için PCR işlemi yapılincaya kadar  $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### **4. 4. Et Karışımlarının Hazırlanması ve Karışım Halindeki Etlerden DNA Ekstraksiyonu**

Her bir hayvan türüne ait et kıyma haline getirildi. Toplam hacim 250 g olacak şekilde sığır, koyun ve keçi etlerine ayrı ayrı domuz, at, köpek ve kedi etleri sırasıyla %5, %2.5, %1, %0.5 ve %0.1 oranlarında ilave edildi. Karışımlar mikserde homojen hale getirilmeye çalışıldı. Sonra bu karışım içerisinde düşük oranlarda bulunan et türüne ait DNA'yı ekstrakte edebilme ihtimalini artırmak

için, her et karışımının beş değişik yerinden 2'şer g örnek alınarak her birine ayrı ayrı DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemi uygulandı.

Bu örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılırken 5. aşama hariç, etlerden DNA ekstraksiyonu bölümünde yapılan işlemler aynen uygulandı. 5. aşamada ise kloroformla temizleme bir kez tekrar edildi. Çünkü DNA'nın en fazla bu aşamada kayba uğradığı belirtilmektedir (36,56). Böylece karışım içerisinde çok düşük oranlarda bulunan etten DNA elde etme oranı artırıldı.

#### **4. 5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Her reaksiyon tüpüne 5 µl 10x PCR buffer, 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl 10 mM deoksिनुकлеотидтрифосфат (dNTP), 0.25 µl Taq DNA polimeraz, 20 pmol spesifik primer, 5 µl hedef DNA ve 26 µl steril distile su konuldu. Reaksiyon karışımının üzerine yüzeyi tamamen kapatacak şekilde bir damla mineral yağ konuldu. Böylece yüksek sıcaklıklarda karışımın buharlaşması önlenmiş oldu. Hazırlanan eppendorf tüpleri thermocycler cihazına yerleştirilip, 94°C'de 45 saniye, 58°C'de 45 saniye, 72°C'de 90 saniye bekletilerek toplam 30 siklуста PCR işlemi gerçekleştirildi. %0.1 oranındaki et karışımları için PCR işlemi 35 siklus uygulandı.

Çoğaltılan DNA segmentleri 15 µl miktarında %1.5'lik agaroz jele (Sigma) yüklenerek 100 voltta 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu.

#### **4. 6. Agaroz Jel Elektroforezi**

Elektroforez, agaroz veya poliakrilamid jele elektrik akımı uygulanıp negatif elektrik yüklü DNA veya DNA parçalarının nötral pH'da anoda doğru göçmesi esasına dayanır (83).

0.75 g agaroz 50 ml 1xTBE solüsyonuna ilave edilerek kaynar su banyosunda eritildi ve soğumaya yakın tarak takılmış elektroforez kasetine döküldü. Çözeltinin katılaşmasından sonra kalıptaki tarak çıkarılarak jel elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri yükleme tamponu ile karıştırıldı ve kuyucuklara konuldu.

Doğru akım sağlayan güç kaynağı ile elektrik akımı uygulanarak (100 volt, 44 amper) PCR ürünleri agaroz jel içerisinde büyüklüklerine göre yürütüldü.

##### **4. 6. 1. Jelin Boyanması**

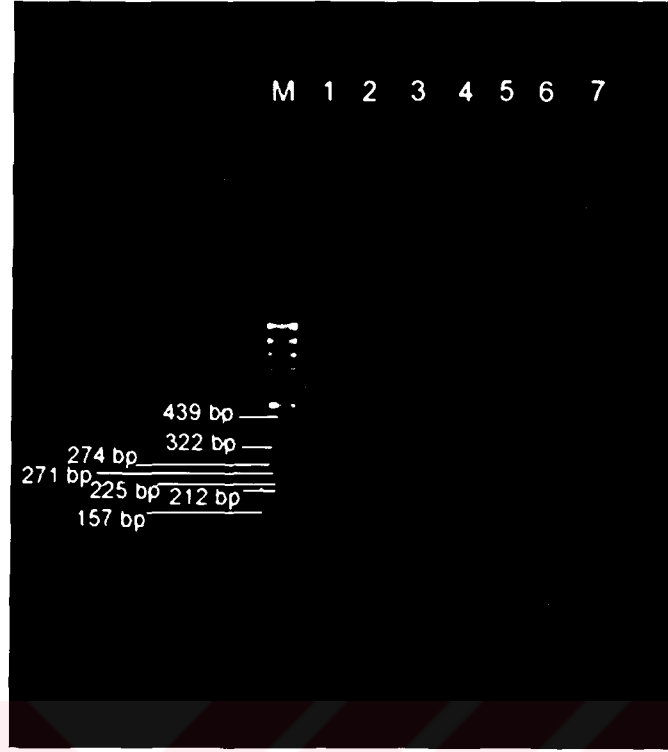
Elektroforez tankından çıkarılan jel, 300 ml distile su + 1 ml (0.5 mg/ml) ethidium bromid bulunan solüsyonda 30 dakika boyanarak DNA bantlarının UV transilluminatörde (312 nm) görünür hale gelmesi sağlandı ve fotoğrafları çekildi.

## 5. BULGULAR

Çalışmada kullanılan tüm hayvan türlerinden ve bunların farklı oranlardaki karışımlarından DNA elde edildi.

Çalışmada türler arasında kros reaksiyonların olup olmadığını tespit etmek amacıyla her hayvan türüne ait spesifik primerler ayrı ayrı uygulanarak agaroz jelde görüntüledi. Şekil 4'de görüldüğü gibi at, köpek, kedi, sığır, koyun, domuz ve keçiye ait sırasıyla 439, 322, 274, 271, 225, 212 ve 157 bp'lik mitokondriyal DNA parçası çoğaltıldı ve kullanılan primerlerin türe spesifik olduğu saptandı.

Toplam 30 siklus PCR işlemi sonunda Şekil 5-16'da görüldüğü gibi %5, %2.5, %1 ve %0.5 oranlarındaki farklı tür et karışımları agaroz jelde tespit edildi. %0.1 oranındaki farklı tür et karışımları ise 30 siklus PCR işlemi sonunda net olarak tespit edilemedi. Bu nedenle PCR siklus sayısı 30'dan 35'e çıkarılarak %0.1 oranındaki farklı tür et karışımları da tespit edildi (Şekil 17).



**Şekil 4.** Et Türlerinden Ekstrakte Edilen DNA'ların Tür Spesifik Primerler ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp),

1- at eti

2- köpek eti

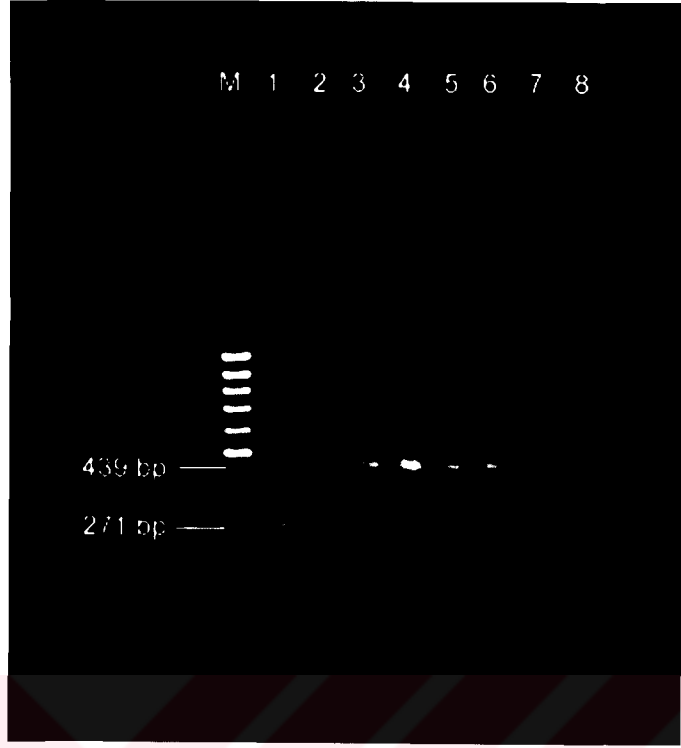
3- kedi eti

4- sığır eti

5- koyun eti

6- domuz eti

7- keçi eti



**Şekil 5.** Sığır ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 sığır eti

2- % 100 at eti

3- % 95 sığır eti + % 5 at eti

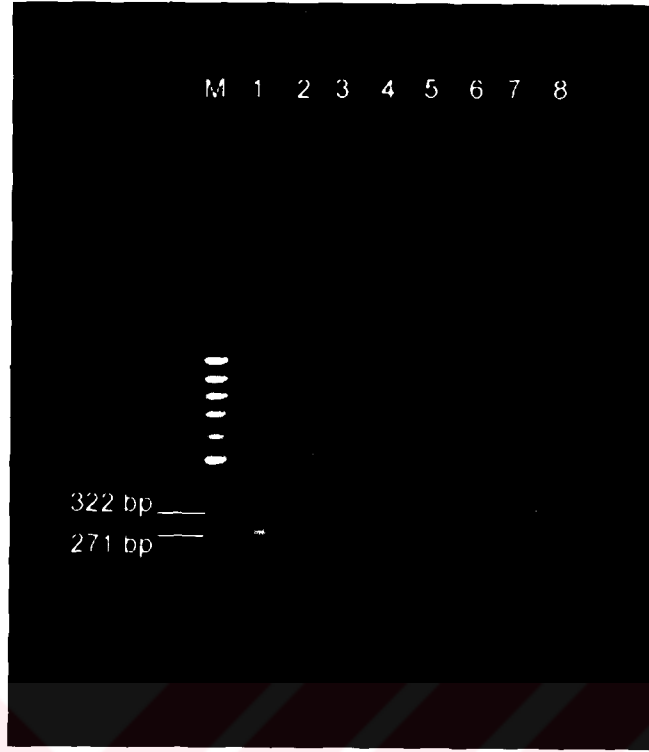
4- % 97.5 sığır eti + % 2.5 at eti

5- % 99 sığır eti + % 1 at eti

6- % 99.5 sığır eti + % 0.5 at eti

7- % 99.9 sığır eti + % 0.1 at eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 6.** Sığır ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 sığır eti

2- % 100 köpek eti

3- % 95 sığır eti + % 5 köpek eti

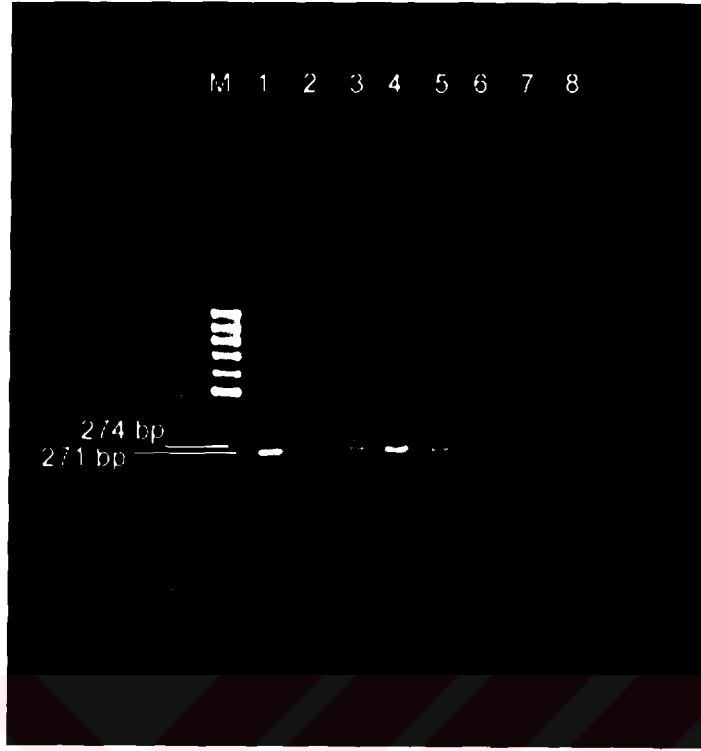
4- % 97.5 sığır eti + % 2.5 köpek eti

5- % 99 sığır eti + % 1 köpek eti

6- % 99.5 sığır eti + % 0.5 köpek eti

7- % 99.9 sığır eti + % 0.1 köpek eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 7.** Sığır ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 sığır eti

2- % 100 kedi eti

3- % 95 sığır eti + % 5 kedi eti

4- % 97.5 sığır eti + % 2.5 kedi eti

5- % 99 sığır eti + % 1 kedi eti

6- % 99.5 sığır eti + % 0.5 kedi eti

7- % 99.9 sığır eti + % 0.1 kedi eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 8.** Sığır ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 sığır eti

2- % 100 domuz eti

3- % 95 sığır eti + % 5 domuz eti

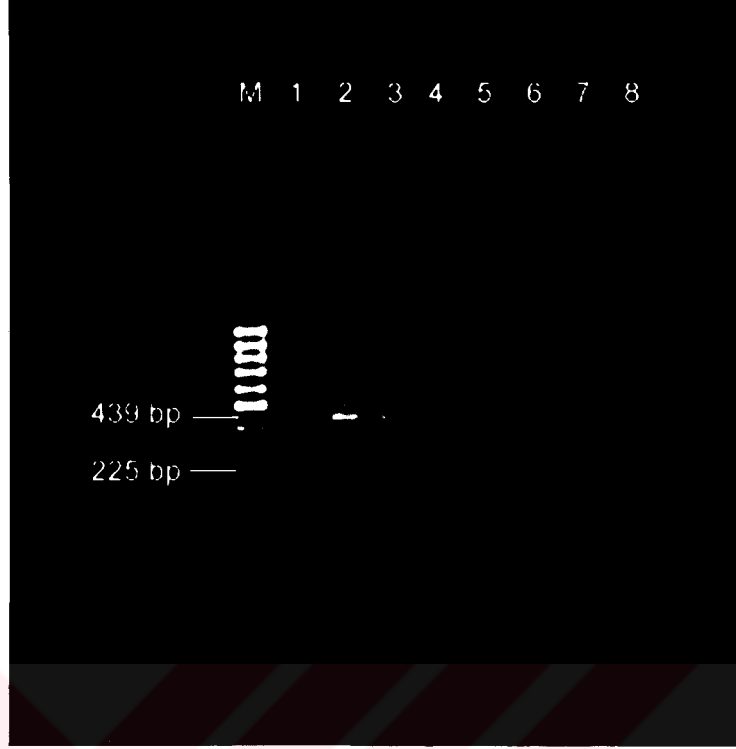
4- % 97.5 sığır eti + % 2.5 domuz eti

5- % 99 sığır eti + % 1 domuz eti

6- % 99.5 sığır eti + % 0.5 domuz eti

7- % 99.9 sığır eti + % 0.1 domuz eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 9.** Koyun ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 koyun eti

2- % 100 at eti

3- % 95 koyun eti + % 5 at eti

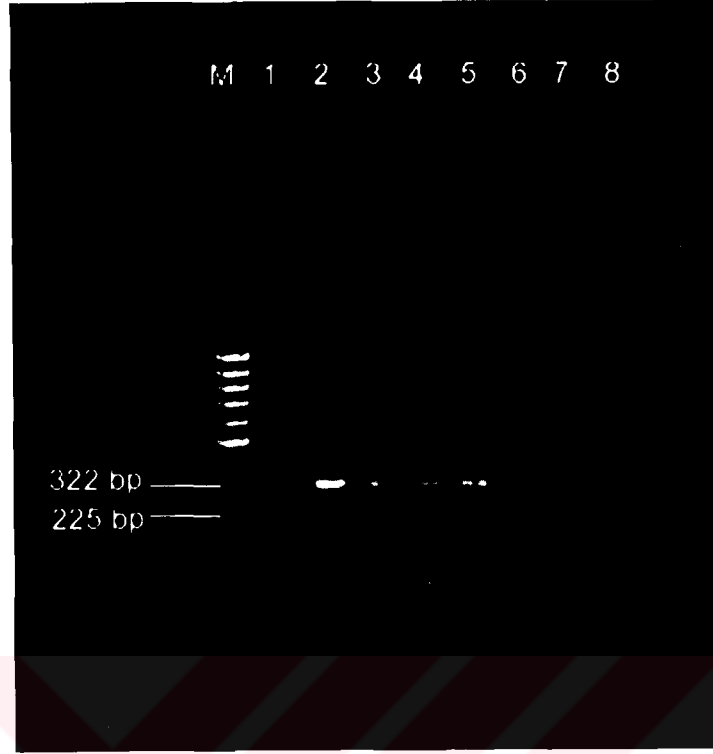
4- % 97.5 koyun eti + % 2.5 at eti

5- % 99 koyun eti + % 1 at eti

6- % 99.5 koyun eti + % 0.5 at eti

7- % 99.9 koyun eti + % 0.1 at eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 10.** Koyun ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 koyun eti

2- % 100 köpek eti

3- % 95 koyun eti + % 5 köpek eti

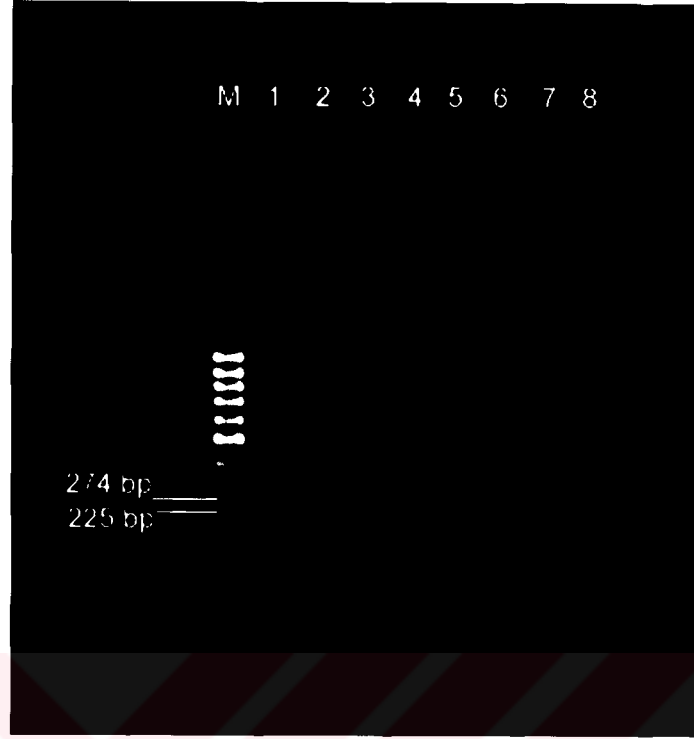
4- % 97.5 koyun eti + % 2.5 köpek eti

5- % 99 koyun eti + % 1 köpek eti

6- % 99.5 koyun eti + % 0.5 köpek eti

7- % 99.9 koyun eti + % 0.1 köpek eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 11.** Koyun ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 koyun eti

2- % 100 kedi eti

3- % 95 koyun eti + % 5 kedi eti

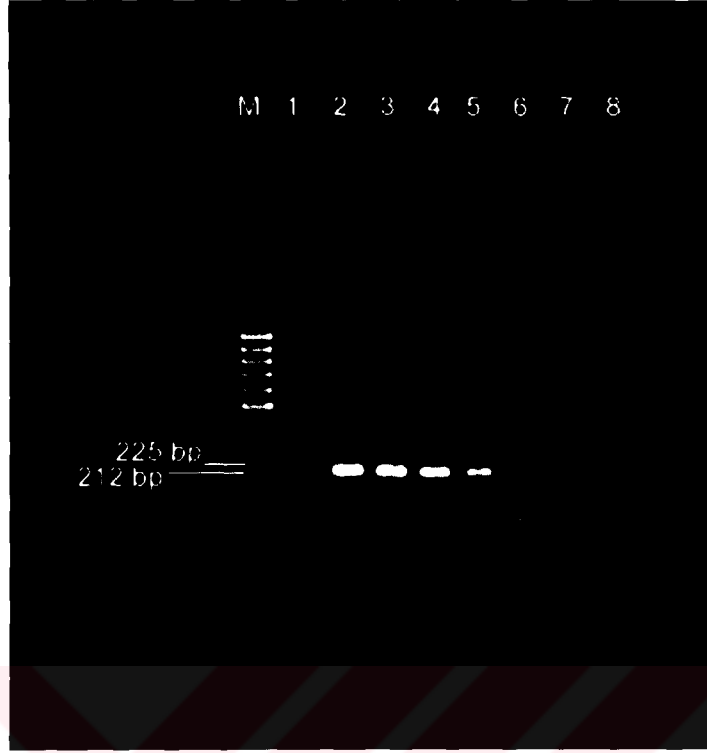
4- % 97.5 koyun eti + % 2.5 kedi eti

5- % 99 koyun eti + % 1 kedi eti

6- % 99.5 koyun eti + % 0.5 kedi eti

7- % 99.9 koyun eti + % 0.1 kedi eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 12.** Koyun ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 koyun eti

2- % 100 domuz eti

3- % 95 koyun eti + % 5 domuz eti

4- % 97.5 koyun eti + % 2.5 domuz eti

5- % 99 koyun eti + % 1 domuz eti

6- % 99.5 koyun eti + % 0.5 domuz eti

7- % 99.9 koyun eti + % 0.1 domuz eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 13.** Keçi ve At Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen At DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 keçi eti

2- % 100 at eti

3- % 95 keçi eti - % 5 at eti

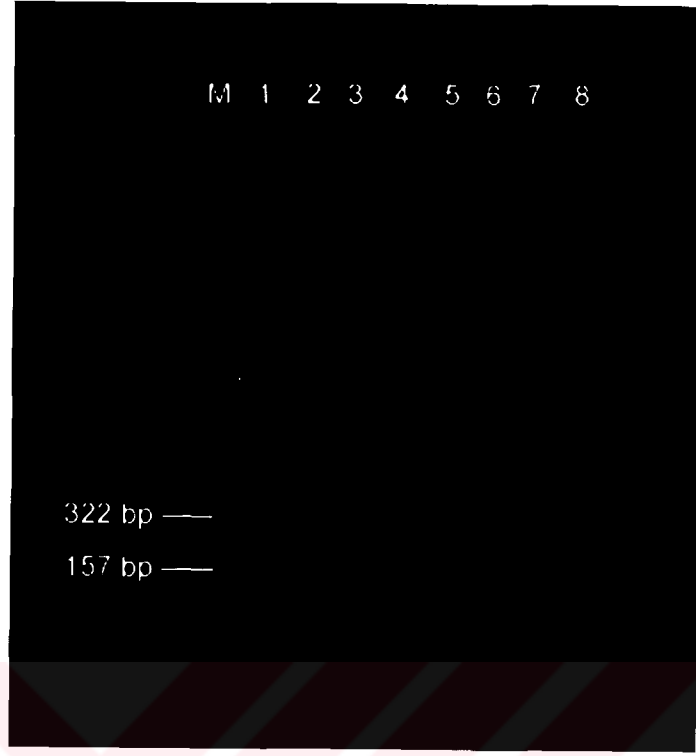
4- % 97.5 keçi eti + % 2.5 at eti

5- % 99 keçi eti + % 1 at eti

6- % 99.5 keçi eti + % 0.5 at eti

7- % 99.9 keçi eti + % 0.1 at eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 14.** Keçi ve Köpek Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Köpek DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 keçi eti

2- % 100 köpek eti

3- % 95 keçi eti + % 5 köpek eti

4- % 97.5 keçi eti + % 2.5 köpek eti

5- % 99 keçi eti + % 1 köpek eti

6- % 99.5 keçi eti + % 0.5 köpek eti

7- % 99.9 keçi eti + % 0.1 köpek eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 15.** Keçi ve Kedi Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Kedi DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroferezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 keçi eti

2- % 100 kedi eti

3- % 95 keçi eti + % 5 kedi eti

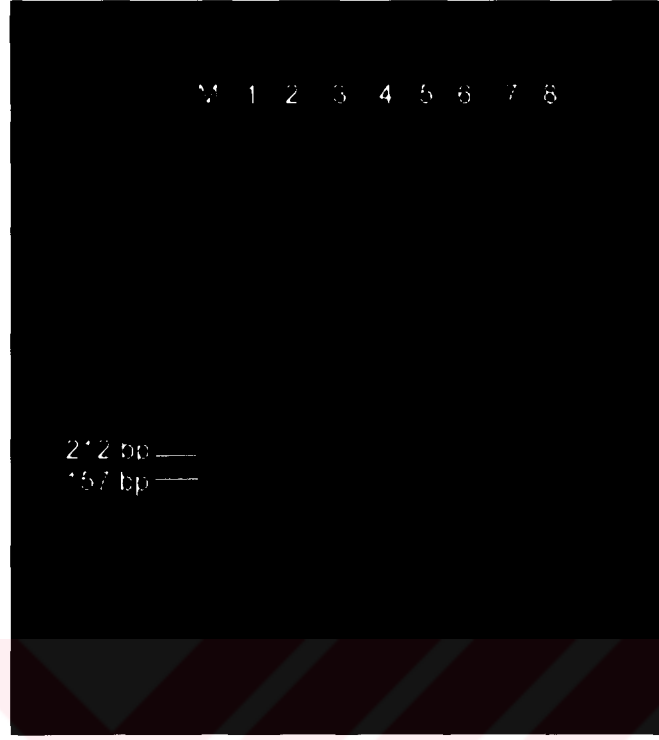
4- % 97.5 keçi eti + % 2.5 kedi eti

5- % 99 keçi eti + % 1 kedi eti

6- % 99.5 keçi eti + % 0.5 kedi eti

7- % 99.9 keçi eti + % 0.1 kedi eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 16.** Keçi ve Domuz Eti Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz DNA'sının Tür Spesifik Primer ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri

M- Marker (100 bp)

1- % 100 keçi eti

2- % 100 domuz eti

3- % 95 keçi eti + % 5 domuz eti

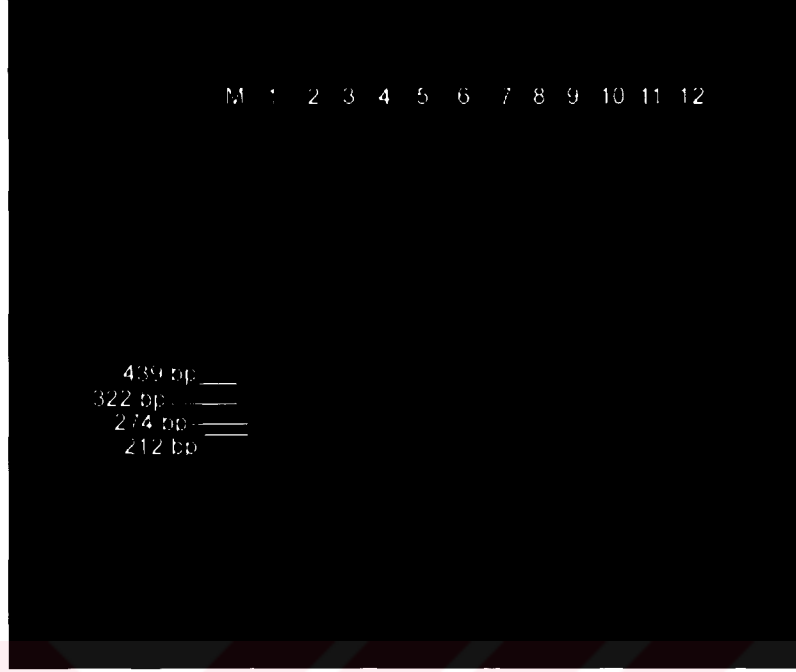
4- % 97.5 keçi eti + % 2.5 domuz eti

5- % 99 keçi eti + % 1 domuz eti

6- % 99.5 keçi eti + % 0.5 domuz eti

7- % 99.9 keçi eti + % 0.1 domuz eti

8- Distile su (negatif kontrol)



**Şekil 17.** %0.1 Oranındaki Et Karışımlarından Ekstrakte Edilen Domuz, Kedi, Köpek ve At DNA'larının Tür Spesifik Primerler ile Çoğaltılmasıyla Elde Edilen PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezdeki Görünümleri (35 Siklus PZR)

M- Marker (100 bp)

- 1- % 99.9 sığır eti + % 0.1 domuz eti
- 2- % 99.9 koyun eti + % 0.1 domuz eti
- 3- % 99.9 keçi eti + % 0.1 domuz eti
- 4- % 99.9 sığır eti + % 0.1 kedi eti
- 5- % 99.9 koyun eti + % 0.1 kedi eti
- 6- % 99.9 keçi eti + % 0.1 kedi eti
- 7- % 99.9 sığır eti + % 0.1 köpek eti
- 8- % 99.9 koyun eti + % 0.1 köpek eti
- 9- % 99.9 keçi eti + % 0.1 köpek eti
- 10- % 99.9 sığır eti + % 0.1 at eti
- 11- % 99.9 koyun eti + % 0.1 at eti
- 12- % 99.9 keçi eti + % 0.1 at eti

## 6. TARTIŞMA

Sağlık, etik ve ekonomik nedenlerden dolayı et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada PCR yöntemi ile et türlerinin ayırımı yapıldı ve PCR'nin duyarlılığı incelendi.

Ülkemizde et ve ürünlerinin orijininin belirlenmesinde son zamanlarda ELISA tekniği kullanılmaktadır. Kamber (49), yaptığı çalışmada materyal olarak içerisinde %15, %10, %5, %3 ve %1 oranlarında domuz ve at eti karıştırılarak hazırlanmış deneysel Türk fermente sucuklarında ELISA tekniğini kullanarak tür tayinini yapmış. %1'in altındaki karışımlarda ise numunelerin homojenizasyonlarının ve ekstraksiyonlarının çok önemli olduğunu bildirmiştir. Yine ısı işlem uygulanmamış ürünlerde, yabancı et karışımlarının tespitinde ELISA'nın hassas bir metot olmasına karşın, numune ekstraktlarının çok iyi hazırlanması ve kullanılan antikorların monospesifitesinin çok yüksek olması gerektiğini belirtmiştir.

DNA hibridizasyon yönteminde, etlerin içerdikleri genetik materyal esas alınmıştır (24,30,31,95). Bu yöntem çiğ et ve et ürünlerinde olduğu kadar, 120°C'de 10 dakika ısı işlemi uygulanmış et ve et ürünlerinde de türlerin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (30). Wintero ve ark. (95), et türlerinin tespitinde kullanılan immunodiffüzyon, immunoelektroforezis, izoelektrofokusing ve DNA hibridizasyon yöntemlerini karşılaştırmışlar, sonuçta DNA hibridizasyonunun diğer yöntemlere göre daha güvenilir ve duyarlı olduğunu fakat daha fazla zaman aldığını bildirmişlerdir. Ancak hibridizasyon teknikleriyle et türlerinin ayırt edilmesinde, birbirleriyle yakın olan türlerin etlerinin karıştırılması ve bunların tespit edilmesi için kullanılan problemlerin spesifitesiyle ilgili olarak bazı

problemlerin ortaya çıktığı vurgulanmıştır (30,64). Aynı zaman da bu tekniğin çok pahalı, karmaşık ve zaman alıcı olduğu ileri sürülmüştür (56,61,66).

Meyer ve ark. (65), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-PCR) yöntemini kullanarak sığır eti içerisine %20, %10, %5, %1 ve %0.5 oranlarında karıştırılmış domuz etini tespit etmişlerdir. 30 siklus PCR işleminden sonra %20, %10 ve %5'lik karışımların çok rahat tespit edildiğini, %1 ve %0.5'lik karışımların ise agaroz jelde tam belli olmadığını belirtmişlerdir. Bu örneklerde dubleks PCR yaptıklarında çok kolay bir şekilde saptandığını göstererek, gıdalarda et türlerinin orijininin tespit edilmesinde DNA'ya dayalı analiz yöntemlerinin kullanılmasının çok daha uygun olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaptıkları bir başka çalışmada da (66), nested-PCR yöntemiyle, çiğ domuz eti içerisine %0.01 oranında karıştırdıkları soya proteinini tespit etmişlerdir.

Meyer ve ark. (64), tarafından yapılan bir başka çalışmada, sığır eti içerisine %50, %20, %10, %5 ve %2 oranlarında domuz eti karıştırılmış ürünlere 121°C'de 10 dakika ısı işlemi uyguladıktan sonra örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve 35 siklus PCR işlemi sonunda kolaylıkla sığır eti içerisinde domuz etini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada deneysel olarak da PCR'nin hassasiyetini ölçmek için domuz ve sığır DNA'larını %1 (5 nanogram domuz DNA'sı 495 nanogram sığır DNA'sı) oranında karıştırarak PCR yapmışlar, 30 siklus PCR işlemi sonunda pozitif sonuç aldıklarını, aynı işlemi %0.5 ve 0.1 oranında karıştırarak tekrarladıklarında ise 30 siklusun yetersiz olduğunu, siklus sayısını 35'e çıkardıklarında ise sonuç alabildiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada

ticari olarak satılan immunolojik kitlerle çiğ etlerde %10'dan daha düşük oranlardaki domuz eti karışımlarını saptayamadıklarını belirtmişlerdir.

Partis ve ark. (68), RFLP-PCR yöntemiyle sığır etine %1 oranında karıştırılmış domuz etinin, Hopwood ve ark. (43) ise PCR yöntemiyle kuzu eti içerisine %1 oranında karıştırılmış tavuk etinin rahatlıkla tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Tokdemir (83), 15 adet kıl kökü dokusundan 5.22 mikrogram (5220 nanogram) DNA elde ettiğini belirtmiş, Meyer ve ark. (64) ise 5 nanogram DNA'yı 35 siklus sonunda jelde görüntülemişlerdir.

Deney sonuçları, Meyer ve ark. (64,65), Partis ve ark. (68), Hopwood ve ark.'nın (43) etlerde %1 ve %0.5 oranındaki karışımların rahatlıkla ayırt edilebileceği görüşünü desteklemektedir. Fakat %0.5 ve %0.1 oranlarındaki karışımların tespit edilmesinde karışımın homojenizasyonu ve DNA ekstraksiyonunun çok önemli olduğu belirtilebilir.

Düşük oranlarda karışımlar ekonomik bakımdan önemli olmayabilir. Ancak sağlık, dini ve etik bakımdan son derece önemlidir. Bu nedenle güvenilir, duyarlı ve pratik yöntemlere gerek duyulmaktadır. Özellikle çiğ etlerde klasik immunolojik metodların kullanılması yeterli görülsede, bu yöntemlerle birbirine yakın tür hayvan etlerinin ayırt edilememesi (41), %10'dan daha düşük oranlardaki karışımlar için yeterince hassas olmaması nedeniyle pratikte güvenli bir şekilde kullanılmamaktadır (49). Yine elektroforetik metodların ısı işlemi görmüş etlerde uygulanmaması, ELISA ile 100°C'de 20 dakika ısı işlemi görmüş etlerde %50'nin altındaki karışımların tespit edilememesi (64), pahalı ve zaman alıcı (24,36,69,80,95) olmaları bu yöntemlerin dezavantajlarıdır.

Bu araştırmada, karışım içerisinde düşük oranlarda bulunan et türünü tespit etme ihtimalini artırmak için, hazırlanan et karışımlarının her birinin farklı yerlerinden 2'şer g olmak üzere 5'er adet örnek alınarak, ayrı ayrı DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemi yapıldı. Çalışma süresince yapılan tekrarlarda %5, %2.5 ve %1 oranında hazırlanmış karışımlardan alınan her 5 örnekten de pozitif sonuç alındı. Ancak %0.5 oranında hazırlanmış karışımlardan alınan 5 örneğin en az 4'nde, %0.1 oranında hazırlanmış karışımlardan alınan 5 örneğin ise en az 3'nde bazen 4'nde pozitif sonuç alındı. Bu durumun hem karışım içerisinde aranan et oranının (%0.5, %0.1), hem de analize alınan örneğin çok düşük miktarlarda (2 g) olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Bu nedenle, rutin analizlerde karışım içerisinde çok düşük oranlarda olan et türünü tespit etmek için, iyi bir homojenizasyonunun yapılması, en az 2-3 örneğin analize alınması ve sonuçların birlikte değerlendirilmesinin daha doğru olacağı kanaatine varıldı.

Ayrıca, PCR yöntemi ile, hayvansal kökenli yemlerin (et-kemik unu) hazırlanmasında, hangi hayvan türüne ait etin kullanıldığı saptanabilir. Örneğin, ruminantların beslenmesinde kullanılan yemlerde, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)'e sebep olabilmesi nedeniyle ruminant kökenli yem maddelerinin kullanılması yasaklanmıştır (57). Ülkemizde ise, bu tür yem maddelerinin orijininin tespitinde kullanılacak herhangi bir analiz yöntemi bulunmamaktadır. Bu bakımdan hayvansal yemlerde kullanılan et-kemik ununun hangi hayvan türüne ait olduğu PCR ile saptanarak BSE gibi hastalıkların önüne geçilebilir. Ayrıca eti tüketilmeyen hayvan etlerinin kasaplık hayvan etlerine karıştırılması ve bu şekilde satışa sunulması sonucu tür spesifik zoonoz hastalıkların (rneğin; domuzda trişin, kızıl, tek turnaklılarda malleus gibi)

yayılması söz konusu olabilir. Bu gibi hastalıkların bazı bireylerde saptanması halinde, bireyin tükettiği çiğ veya pişmiş et ya da et ürünlerinde, et türü PCR yöntemiyle tespit edilerek hastalığın kaynağı ortaya çıkarılabilir.

Çalışmada, %0.5 oranındaki farklı tür et karışımlarında 30 siklus PCR işlemi sonunda tür tespiti yapıldı. %0.1 oranındaki farklı tür et karışımlarında ise 30 siklusta sonuç alınamadı. Fakat siklus sayısı 30'dan 35'e çıkarıldığında %0.1 oranındaki et karışımlarında da tür tespiti yapıldı. Böylece çok düşük oranlardaki farklı tür et karışımlarından şüphelenildiği durumlarda PCR siklus sayısının artırılmasının gerekli olduğu vurgulanabilir. Fakat 35 siklus PCR işlemi sonunda %0.1 oranındaki karışımların saptanabilmesi farklı tür hayvan etlerinin işlendiği işletmelerde, istenilmeden oluşan et kontaminasyonlarını kasıtlı olarak yapılmış gibi gösterebilir. Bununla birlikte eti tüketilmeyen veya tüketilmesi serbest olup üründe bulunması uygun olmayan tür hayvan etlerinin ürüne karıştırılma oranının genellikle %10-20 civarında olduğu tahmin edilir (49). Fakat karışım oranı ne miktarda olursa olsun sağlık, etik kurallar ve tüketicinin dini inançları bakımından kullanılacak metodun son derece duyarlı olması gerekmektedir. Bunun için de etlerin orjininin saptanmasında PCR yöntemi kullanılmasının daha doğru olacağı belirtilebilir. Ancak PCR'nin hassasiyetinden dolayı bu yöntemde tür tespiti yapılacak etin başka tür hayvan etleriyle kontamine edilmemesi gerekir. Örneğin ortak kullanılan bıçak, kıyma makinesi, parçalama sehпасı, kuter vb. alet ve malzemeler ile DNA kontaminasyonu olabilir. Bu gibi durumlarda analiz edilen et örneğine, farklı tür hayvan etleri karıştırılmış gibi bir sonuç alınabilir.

PCR' nin güvenilir, ekonomik, pratik olması, aynı anda çok sayıda örneğin analiz edilmesi, kısa sürede sonuç vermesi ve %0.1 oranındaki karışımların rutin

olarak saptanması gibi nedenlerden dolayı diğer yöntemlere göre daha üstün olduğu belirtilebilir. Bu bakımdan, iş gücü, zaman ve maddi açıdan da tasarruf sağlanmış olur.

Sonuç olarak bu yöntemle kısa sürede, ekonomik olarak %0.1 oranındaki farklı tür et karışımlarının saptanabileceği ve rutin analizlerde de rahatlıkla kullanılabilceği vurgulanabilir. Gelişmekte olan bir ülke olarak hızlı, duyarlı ve ekonomik olan bu yöntemin yaygınlaştırılıp, et türlerinin orijininin tespitinde kullanılması daha doğru olacaktır.



## 7. KAYNAKLAR

- 1- Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA Typing Applied to the Study of Cross-Contamination by *Listeria monocytogenes* in Processed Food Products. *J Food Protect* 64 (5): 716-720.
- 2- Akane A, Shiono H, Matsubara K, Nakamura H, Hasegawa M, Kagawa M. (1993) Purification of Forensic Specimens for the Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis. *J Forensic Sci* 38 (3): 691-701.
- 3- Allsup TN. (1987). A Comparison of the Agar Gel Immuno-diffusion (AGID) and Counter-immunoelectrophoresis (CIE) Tests for Species Identification of Imported red Meat and offal. *Meat Sci* 20: 119-128.
- 4- Alves E, Castellanos C, Oviló C, Silio L, Rodriguez C. (2002). Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Sci* 61: 157-162.
- 5- Anon. (2004). Erişim: (<http://www.dunyaonline.com>). Erişim tarihi: 23.01.2004.
- 6- Anon. (2004). Erişim: (<http://www.evrensel.net/01/01/21/ekonomi.html#2>). Erişim tarihi: 23.01.2004.
- 7- Anon. (2004). Erişim: (<http://haber.mynet.com/headline/detail.asp?no=21> ). Erişim tarihi: 22.01.2004.
- 8- Anon. (2003). Erişim: ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val= NC\\_001700](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val= NC_001700)). Erişim tarihi: 20.05.2003.
- 9- Anon. (2003). Erişim: ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val= NC\\_002008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val= NC_002008)). Erişim tarihi: 20.05.2003
- 10- Anon. (2003). Erişim: (<http://www.TarsusHaber.com>.) Yayın tarihi: 26.08.2003. Erişim tarihi: 23.01.2004.
- 11- Appa Rao KBC, Bhat KV, Totey SM. (1996). Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomol Eng* 13 (5): 135-138.
- 12- Arda M. (1993). *Biyoteknoloji, ( Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:1 Ankara.
- 13- Arda M. (1994) *Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No: 2, Ankara.
- 14- Arda M. (1995). *Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No: 3, Ankara.
- 15- Arslan A, Kök F. (2000). *Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Tezsiri No: 46, Elazığ.

- 16- Asim KB, Meena HM, Ronald MA. (1991). Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other methods and their Applications. *Biochem Mol Biol Int* 26 (3,4): 301-334.
- 17- Baysal A. (1990). Beslenme. Hacettepe Üniversitesi yayınları. A/61. 5. Baskı. Ankara.
- 18- Berkmen L. (1965). Et Muayenesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:179. Ders Kitabı:81. 3. Baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara.
- 19- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other method and their amplification. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 26 (4): 301- 334.
- 20- Bilgehan H. (1992). Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Şafak Matbaacılık. Ankara.
- 21- Brodmann PD, Moor D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Sci* 65: 599-607.
- 22- Buntjer JB, Lenstra JA. (1998). Mammalian Species Identification by Interspersed Repeat PCR Fingerprinting. *J Ind Microbiol Biot.* 21: 121- 127.
- 23- Caetano-Anolles G, Bassam JB, Gresshoff MP. (1991). DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers. *BIO/TECHNOLOGY* 9: 553-557.
- 24- Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T, Kato S. (1990). Species Identification of Cooked Meats by DNA Hybridization Assay. *Meat Sci* 27: 119- 128.
- 25- Comi G, Iacumuin L, Rantsiou K, Cantoni C, Cocolin L. (2004). Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control In Press.*
- 26- Çağlayan SH. (1991). Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Nükleik asitleri çoğaltma tekniği ve uygulama alanları. *Doğa- Tr. J. of Biology* 15: 9-21.
- 27- Çetinkaya B. (1998). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Temel Prensipler. Fırtına Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 12 (2): 149- 156.
- 28- Dalmaso A, Fontenella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. (2003). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes In Press.*
- 29- Della JH, Helen CP, Ian DL. (1997) Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chem* 60 (3): 437-442.
- 30- Ebbehøj FK, Thomsen DP. (1991). Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Sci* 30: 221- 234.
- 31- Ebbehøj FK, Thomsen DP. (1991). Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization. *Meat Sci* 30: 359- 366.
- 32- Elseth GD, Baumgardner KD. (1985). Principles of Modern Genetics. West Publishing Company. 1. Baskı. New York.

- 33- Erlich H A, Gelfand D. and Sninsky J J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.
- 34- Fabio C, Eliana M, Alberto P, Carlo C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. *Meat Sci* 61: 291-294.
- 35- Fach P, Dilasser F, Grout J, Tache J. (1999). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-based Test for Detecting *Salmonella* spp. in Food Samples: *Probetia salmonella* spp. *J Food Protect* 62 (12): 1387-1393.
- 36- Fairbrother SK, Hopwood JA, Lockley KA, Bardsley GR. (1998). Meat Speciation by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using an  $\alpha$ - Actin cDNA Probe. *Meat Sci* 50 (1): 105- 114.
- 37- Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Bhaskar S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci* 66: 551-556.
- 38- Gökalp HY, Kaya M, Zorba Ö. (1994). Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Yayın no. 786. Ziraat Fakültesi Yayın No. 320. Ders Kitapları Serisi No. 70. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi. Erzurum.
- 39- Göral G. (1996). Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji. Bakteri Genetiği. Bölüm: 5, S. 55- 59, 223. Hünkar ofset matbaacılık. İstanbul.
- 40- Gözükara EM. Biyokimya Ofset Repromat Ltd Şti. 1.Baskı. 1989. Ankara.
- 41- Hird H, Goodier R, Hill M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with *vistra green*. *Meat Sci* 65: 117-1123.
- 42- Hitchcock CHS, Crimes AA. (1985). Methodology for meat species identification: A review. *Meat Sci* 15: 215-224.
- 43- Hopwood JA, Fairbrother SK, Lockley KA, Bardsley GR. (1999). An actin gene- related polymerase chain reaction ( PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Sci* 53: 227- 231.
- 44- İciar M, İngrid MY. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res Int* 31 (6-7): 459-466.
- 45- İlhak İ, Arslan A. (2003). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemiyle Sığır, Koyun, Keçi ve Yabani Domuz Etinin Ayırt Edilmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 17 (1): 59-63.
- 46- İnal T. (1992). Besin Hijyeni. Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü. Final Ofset. İstanbul.
- 47- İnal T. (1995). Kesim Hayvanı ve Et Muayenesi. Saray kitapçevleri.
- 48- Janssen FW, Hagele GH, Buntjer JB, Lenstra JA. (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *J Ind Microbiol Biot* 21: 115-120.
- 49- Kamber U. (1993). Fermente Türk Sucuklarında Et Orjininin ELİSA ile Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara.

- 50- Kamber U. (1996). Et Türlerinin İdentifikasyonu. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi 67 (1): 34-40.
- 51- Kang'ethe EK, Jones SJ, Patterson RLS. (1982). Identification of the species origin of fresh meat using an ELISA procedure. Meat Sci 7 (3): 229-240.
- 52- Kang'ethe EK, Gathuma JM. (1987). Species Identification of Autoclaved Meat Samples Using Antisera to Thermostable Muscle Antigens in An Enzyme Immunoassay. Meat Sci 19: 265-270.
- 53- Kim H, Shelef LA. (1986). Characterization and Identification of Raw Beef, Porck Chicken and Turkey Meats by Electrophoretic Patterns of Their Sarcoplazmic Proteins. J Food Sci 51 (31): 731-735.
- 54- Kimura B, Kawasaki S, Fujii T, Kusunoki J, Itoh T, Flood J A. (1999). Evaluation of TagMan PCR Assay for Detecting Salmonella in Raw meat and Shrimp. J Food Protect 62 (4): 329-335.
- 55- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci 86: 6196-6200.
- 56- Koh MC, Lim CH, Chua SB, Chew ST, Phang STW. (1998). Random amplified Polymorphic DNA ( RAPD ) Fingerprints for Identification of Red Meat Animal Species. Meat Sci 48 (3/4): 275- 285.
- 57- Lahiff S, Glennon M, O'Brien L, Lyng J, Smith T, Maher M, Shilton N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). Mol Cell Probe 15: 27-35.
- 58- Lee CJ, Chang GJ. (1994). Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction ( RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. Forensic Sci Int 67: 103- 107.
- 59- Lin JS, Tsen HY. (1999). Development and Use of Polymerase Chain Reaction for the Spesific detection of Salmonella Typhimurium in Stool and Food Samples. J Food Protect 62 (10): 1103-1110.
- 60- Lockley AK, Bardsley RG. (2002) Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. Meat Sci 61: 163-168.
- 61- Matthews RC, Burnie JP. (1991). Handbook of Serodiagnosis in Infectious Diseases., Chapter 8, 1. St. Published Butterwort Heineman Ltd., London.
- 62- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Sci 51: 143- 148.
- 63- Meer DP, Eddinger TJ.(1996). Polymerase Chain Reaction for Detection of Male Tissue in Pork Products. Meat Sci 44 (4): 285-291.
- 64- Meyer R, Candrian U, Lüthy J. ( 1994). Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction. J AOAC Int 77 (3): 617- 622

- 65- Meyer R, Höfelein C, Lüthy J, Candrian U. (1995). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 78 (6): 1542-1551.
- 66- Meyer R, Chardonens F, Hübner P, Lüthy J. (1996). Polymerase Chain Reaction (PCR) in The Quality and Safety Assurance of Food: Detection of Soya in Processed Meat Products. *Z. Lebensm Unters Forsch* 203: 339- 344.
- 67- Mullis KB, and Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol* 155: 335-351.
- 68- Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J.(2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci* 54: 369-376.
- 69- Persing DH. (1991). Polymerase Chain Reaction : Trenches to Benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
- 70- Rodriguez MA, Garcia T, Gonzales I, Asensio L, Mayoral B, Lopez-Calleja I, Hernandez PE, Martin R. (2003). Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in *foie gras* products. *Meat Sci* 65: 1257-1263.
- 71- Saez R, Sanz Y, Toldra F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci* 66: 659-665.
- 72- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487- 491.
- 73- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ - Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230: 1350- 1354.
- 74- Samy HA, Woadrow CM, Philip GS. (1988). Liquid Chromatographic identification of meats. *J AOAC Int* 71 (2): 349-403.
- 75- Sanderson JD, Hermon-Taylor J. (1992). Mycobacterial diseases of gut: some impact from molecular biology. *Gut* 33: 145- 147.
- 76- Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaishi H, Takano S, Mannen H, Tsuji S. (2004). Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Sci* 67: 275-280.
- 77- Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S, McDowell D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14: 579-583.
- 78- Shearer AE, Strapp CM, Joerger RD. (2001). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based System for Detection of salmonella Enteritidis, Escherichia coli O157:H7, Listeria spp., and Listeria monocytogenes on Fresh Fruits and Vegetables. *J Food Protect* 64 (6): 788-795.

- 79- Sun YL, Lin CS. (2003). Establishment and Application of a Fluorescent Polymerase Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism PCR RFLP) Method for Identifying Porcine,Caprine, and Bovine Meats. *J Agric Food Chem* 62;51(7): 1771-1776.
- 80- Şeker E. (1999). Doktora Semineri, Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Prensipleri ve Kullanım Alanları, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
- 81- Tagliavini J, Bolchi A, Giovanni P, Ottonello S. (1993). Sex Determination on samples of Bovine Meat by Polymerase Chain Reaction. *J Food Sci* 58 (2): 237-238.
- 82- Tantillo G, Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C. (2001). Polymerase Chain Reaction for the Direct Detection of *Brucella* spp. in Milk and Cheese. *J Food Protect* 64 (2): 164-167.
- 83- Tokdemir M. (2001). DNA parmak iziyle kişi farklılıklarının gösterilmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Elazığ.
- 84- Tunçel G. (1993). Polimeraz zincir Reaksiyonu ile *Listeria monocytogenes*' lerin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*. Cilt: 11, sayı: 2: 37- 46.
- 85- Türk Gıda Mevzuatı. (1999). Ankara.
- 86- Verkaar ELC, Nijman IJ, Boutaga K, Lenstra JA. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci* 60: 365-369.
- 87- Virella G. (1997). *Microbiology Infectious Disease*. Çeviri yazarları; Serter D, Dereli D. ve Ertem E. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri. Tayf Ofset, Savaş Ciltevi.s. 93,275, İstanbul.
- 88- Yıldırım, Y. ( 1996). Et Endüstrisi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi. 4. Baskı. Erzurum.
- 89- Zeleny R, Schimmel H. (2002). Sexing of beef- a survey of possible methods. *Meat Sci* 60: 69-75.
- 90- Zhang G, Zheng M, Zhou Z, Ouyang H, Lu Qiang. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci* 51: 233-236.
- 91- Walker JA, Hughes DA, Anders BA, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. (2003). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* 316: 259-269.
- 92- Wan QH, Fang SG. (2003). Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Sci Int* 131: 75-78.
- 93- Watson JD, Crick FHC. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature magazine*: 171, 737.
- 94- Weder JKP, Rehbein H, Kaiser KP. (2001). On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *Eur Food Res Technol* 213:139-144.
- 95- Wintero AK, Thomsen PD, Davies W. (1990). A Comparison of DNA- Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci* 27: 75- 85.
- 96- White JT, Arnheim N, Erlich HA. (1989). The polymerase chain reaction. *Technical Focus* 5 (69): 185- 189.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1975 Yılında Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1994 yılında girdiğim Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 1999 yılında mezun oldum. Aynı yılın Eylül ayında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Programı, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı’nın açmış olduğu doktora programını kazandım. 2003 yılında F.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen bu görevi yürütmekteyim.

