



**ÖDEMİŞ (İZMİR) İLÇESİNDE KIRMIZI ET ÜRÜNLERİNİN
MENŞEİNİN DNA-BAZLI BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet ÇAYLALI

Danışman

Prof.Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Şubat 2025

Bu tez çalışması 23.FEN.BİL.38 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANSTEZİ

ÖDEMİŞ (İZMİR) İLÇESİNDE KIRMIZI ET ÜRÜNLERİNİN
MENŞEİNİN DNA-BAZLI BELİRLENMESİ

Mehmet ÇAYLALI

Danışman

Prof.Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Şubat 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Mehmet ÇAYLALI tarafından hazırlanan “**Ödemiş (İzmir) İlçesinde Kırmızı Et Ürünlerinin Menşeinin DNA-Bazlı Belirlenmesi**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 10/02/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nurahir BALTACI BOZKURT
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Bekir YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/02/2025

Mehmet ÇAYLALI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÖDEMiŞ (İZMİR) İLÇESİNDE KIRMIZI ET ÜRÜNLERİNİN MENŞEİNİN DNA-BAZLI BELİRLENMESİ

Mehmet ÇAYLALI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Et ve et ürünlerinin tür kökeninin tespit edilmesi, tüketicileri korumak için önemlidir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler, et türlerindeki taşıyıcı maddelerini tespit etmek ve miktarını belirlemek için geliştirilen güçlü tekniklerden biridir. Bu çalışmada, 13 Ağustos 2024 tarihinde Ödemiş (İzmir, Türkiye) ilçesinde kasaplardan alınan 3 adet kırmızı et ürünü sucukların menşeleri TaqMan qPCR yöntemi ile tespit amaçlanmıştır. Numunelerin DNA izolasyonu Eurofins GeneSpin DNA Isolation Kit (Freiburg, Germany) ile yapılmıştır. Araştırma örnekleri sığır, koyun ve tavuk türleri yönünden menşei bakışı için, aynı firmanın sığır, koyun ve tavuk türlerine özgü primer ve prob setleri ve TaqMan qPCR yöntemi ile ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda incelenen et ürünlerinin sığır ve koyun menşeli olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, tüm örneklerde tavuk özgü analizler negatif sonuçlanmıştır. Sığır ve koyun türlerine ait Cycle threshold (Ct) veri ortalamaları sırasıyla 13,25 ve 23,50 değerinde bulunmuştur. Çalışma sonuçları, Ödemiş (İzmir, Türkiye) ilçesinde et ürünlerinin etiketlerinde belirtildiği üzere, sığır ve koyun menşei bilgilerini doğrulamıştır. Ayrıca, halk sağlığını koruma kapsamında, et üretimi yapan işletmelere, yerel otoritelerin daha geniş ölçekli araştırma ve denetim yapması önerilmektedir.

2025, viii + 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: DNA, Kırmızı et, Ödemiş, Sucuk, TaqMan qPCR.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DNA-BASED IDENTIFICATION OF ORIGIN OF RED MEAT PRODUCTS IN ÖDEMiŞ (İZMİR) DISTRICT

Mehmet ÇAYLALI

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Determining the species origin of meat and meat products is important for protecting consumers. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) are powerful techniques developed to detect and quantify adulterants in meat species. In this study, it was aimed to determine the origins of three red meat products (sucuk) purchased from butchers in Ödemiş (İzmir, Turkey) on August 13, 2024, using the TaqMan qPCR method. DNA isolation of the samples was performed using the Eurofins GeneSpin DNA Isolation Kit (Freiburg, Germany). The research samples were analyzed separately for species origin concerning cattle, sheep, and chicken using species-specific primer and probe sets from the same company and the TaqMan qPCR method. As a result of the study, it was determined that the examined meat products were of cattle and sheep origin. However, all samples tested negative for chicken-specific analyses. The Cycle threshold (Ct) mean values for cattle and sheep species were found to be 13.25 and 23.50, respectively. The study results confirmed that the species origins of the meat products in Ödemiş (İzmir, Turkey) were consistent with the information stated on their labels. Additionally, within the scope of protecting public health, it is recommended that local authorities conduct broader-scale research and inspections on businesses engaged in meat production.

2025, viii + 36 pages

Keywords: DNA, Ödemiş, Red meat, Sucuk, TaqMan qPCR.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolay tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Mehmet Oğuz Öztürk, tez değerlendirme süresince yardımlarını esirgemeyen değerli tez savunma jüri üyelerime, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolay aileme teşekkür ederim.

Mehmet ÇAYLALI
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	2
2.1 Et Türü Tanımlama Yöntemleri.....	2
2.1.1 DNA Tabanlı Yöntemler.....	3
2.1.1.1 DNA Hibridizasyon Tekniği	3
2.1.2 PCR Yöntemleri İçin Farklı DNA Türleri	4
2.1.3 PZR Tabanlı Yöntemler	5
2.1.3.1 Multiplex PZR.....	5
2.1.3.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	6
2.1.3.3 Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR	6
2.1.3.4 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	7
2.1.4 PZR Ürünlerinin Dizileme Analizi	8
2.1.5 Protein Analizine Dayalı Yöntemler.....	8
2.1.5.1 Elektroforez	8
2.1.5.2 Kromatografi	9
2.1.5.3 Spektroskopi.....	10
2.1.5.4 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay Testi (ELISA)	10
2.1.5.5 Biyoçip	11
2.2 Et ve Et Ürünlerinin Menşei Tespiti Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar.....	11
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1 Materyal	16
3.2 Metot.....	16
3.2.1 Et Ürünlerinin Hazırlanması	16
3.2.2 DNA Ekstraksiyonu	16
3.2.3 DNA Konsantrasyonu Tayini.....	17

3.2.4 Hedef Gen ve Primerlerin Belirlenmesi	18
3.2.5 TaqMan qPCR Analizi	18
3.2.6 Primer ve Prob Setlerinin Özgünlük ve Hassasiyet Testleri	19
3.2.7 TaqMan qPCR Tekniği ile Kırmızı Et Ürünlerinden Tür Tayini.....	19
4. BULGULAR	20
4.1 TaqMan qPCR Probe Yöntemi ile Ct Değeri Tespiti	20
4.2 TaqMan qPCR Probe Yöntemi ile Özgünlük ve Tür Tespiti.....	21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	36



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
µM	Mikromolar
bç	Baz çifti
dH ₂ O	Distile su
G	Gram
H ₂ O	Su
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
Nm	Nanometre
°C	Santigrad derece
Tm	Erime sıcaklığı
V	Volt

Kısaltmalar

A	Ångström
BLAST	Temel Yerel Hizalama Aracı
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Komplemanter Deoksiribonükleik asit
Ct	Cycle Threshold
Cytb	mitokondriyal sitokrom b
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
dsDNA	Çift sarmal Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAM	Carboxyfluorescein
HEX	fluorescent quencher
ITS1	Internal transcribed spacer 1
LOD	Tespit Limiti (Limit Of Detection)
NCBI	National Center For Biotechnology Information
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Real-Time PZR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
ssDNA	Tek sarmal Deoksiribonükleik asit
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Et türü tanımlama için yöntemler.....	2
Şekil 2.2 Bir DNA dizisinin tespitinde yer alan adımlar.....	4
Şekil 2.3 TaqMan prob tespiti süreci: TaqMan problemleri primerlerin aşağı akış yönünde tek sarmallı cDNA'ya bağlanır. Uzatma sırasında polimeraz probu, floresan sinyalin tespit edilmesini sağlar.....	7
Şekil 3.1 Ödemiş (İzmir) ilçesinde 3 farklı kasaptan alınan kırmızı et ürünü sucuklar .	16
Şekil 4.1 Araştırma örneklerine ait sığır DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Sığır özgü FAM probu ile Cycle threshold (Ct) grafikleri.....	22
Şekil 4.2 Araştırma örneklerine ait koyun DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Koyun özgü FAM probu ile Cycle threshold (Ct) grafikleri.....	22
Şekil 4.3 Tavuk özgü FAM probuna ait tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Cycle threshold (Ct) grafikleri.	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 TaqMan qPCR mastermix içeriği.....	18
Çizelge 3.2 TaqMan qPcR termal döngü süreleri ve sıcaklıkları.....	18
Çizelge 4.1 Araştırma örneklerine ait sığır, koyun ve tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), Cycle threshold (Ct) verileri.	23
Çizelge 4.2 Araştırma örneklerine ait sığır DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), Sığır özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.....	24
Çizelge 4.3 Araştırma örneklerine ait koyun DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), koyun özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.	25
Çizelge 4.4 Araştırma örneklerine ait tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), tavuk özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.	26

1. GİRİŞ

Et, besin değeri yüksek gıda ürünlerinden biridir. Et fiyatının yüksek olması ve bulunabilirliğinin zaman geçtikçe azalması, bazı et üreticileri ve satıcılarını, et ve et ürünlerinde sahteciliğe yönlendirmektedir. Et endüstrisinde yaygın olarak görülen en yaygın ekonomik dolandırıcılıklardan biri, daha pahalı etin daha ucuz veya kalitesiz etle ikamesidir (Kumar vd. 2015).

Ekonomik kayıplar, sağlık etkileri ve dini inançlar gibi çeşitli nedenlerden dolayı, tüketiciler, kötü niyetli et sahteciliği uygulamalarından korunmalıdır. Et sahteciliği uygulamalarını tespit etmek ve et türlerinin tanımlanması için basit, doğru, kesin ve hassas yöntemlere ihtiyaç vardır (Meyer vd. 1994).

Et türlerinin menşei tanımlanması için anatomik, histolojik, biyokimyasal, spektrofotometrik, kromatografik, immünolojik ve enzim bağlı immünosorbent testleri (ELISA) gibi çok sayıda geleneksel yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları yüksek pişirme sıcaklıklarına maruz kalmış et ürünlerinin tür tanımlamasında yetersiz kalmaktadır (Guoli vd. 1999).

Son yıllarda moleküler yaklaşıma dayalı geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknikleri gibi DNA tabanlı yöntemler, diğer yöntemlerin sınırlamalarını aşabilecek daha iyi tanımlama çözümleri sunmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı DNA analiz yöntemleri, yoğun ısı işlemine tabi tutulmuş ve karmaşık bileşime sahip et ürünleri için bile, kullanılan hayvan türlerini hassas ve hızlı bir şekilde tespit edebilmektedir (Chikuni vd. 1994).

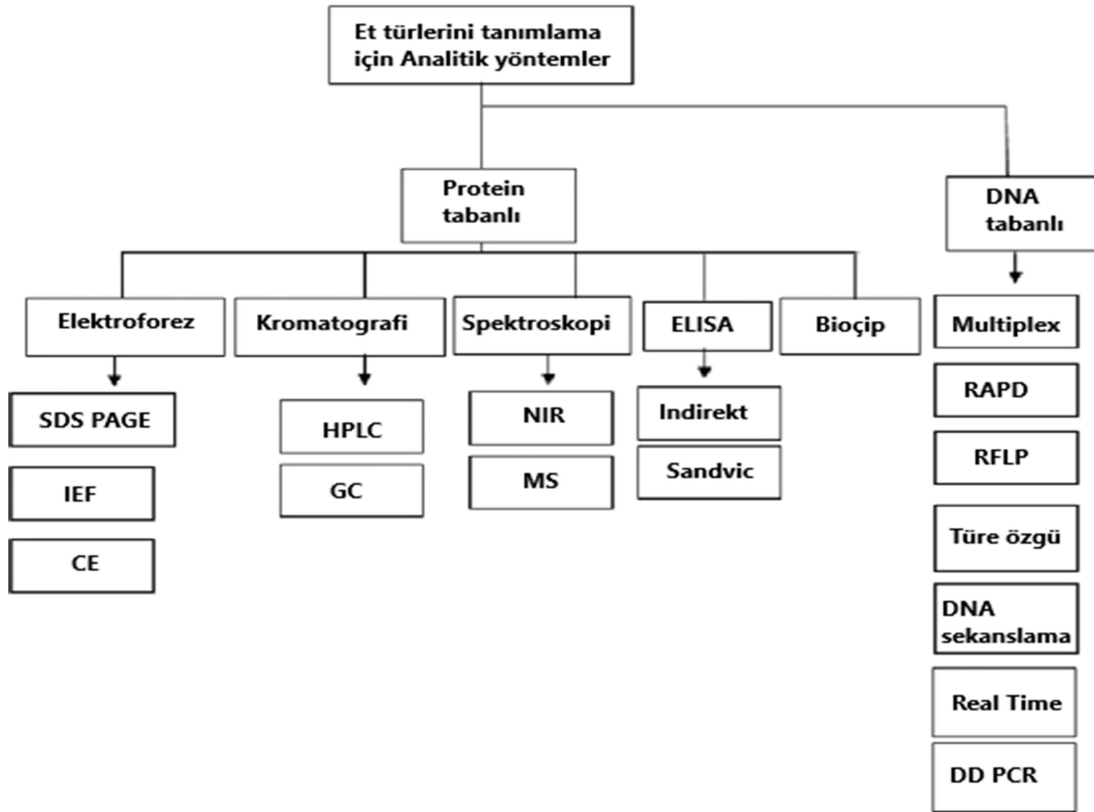
Bu çalışmada, Ödemiş (İzmir) ilçesindeki kasaplardan alınan 3 adet kırmızı et ürünü sucukların menşei TaqMan qPCR yöntemiyle sığır, koyun ve tavuk türleri üzerinden araştırılacaktır. Elde edilecek sonuçlarla, et ürünleri sucukların etiketinde beyan edilen menşei bilgileri ile analiz sonuçları karşılaştırılarak, et ürünü sucuklarda yanlış beyan veya tağşiş olup olmadığı belirlenecektir. Araştırma sonuçları Ödemiş'te satılan sucukların menşei hakkında güncel ve güvenilir bilgi verecektir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

Etin bir kısmının veya tamamının daha az değerli muadilleriyle değiştirilmesi veya eklenmesi, yabancı olarak yakalanan veya çiftlikte yetiştirilen hayvanlar söz konusu olduğunda hayvanların menşeinin yanlış beyan edilmesi ve hayvanların coğrafi menşeinin yanlış beyan edilmesi gibi tağşişler olması dikkat çekicidir. Et tağşişinin en yaygın nedeni ekonomik motivasyondur (Zhang vd. 2021).

2.1 Et Türü Tanımlama Yöntemleri

Gıda ürünlerindeki türlerin kökenini tespit etmek için önemli sayıda analitik yöntem geliştirilmiştir. Et türlerini tanımlamak için DNA ve Protein bazlı yöntemler kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Bunlardan ilki hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) içermektedir (Lockley ve Bardsley 2000). Protein bazlı yöntemler arasında kromatografi, spektroskopi, elektroforez ve immünoassayler bulunmaktadır (Nakyinsige vd. 2012).



Şekil 2.1 Et türü tanımlama için yöntemler (Alikord vd. 2018).

2.1.1 DNA Tabanlı Yöntemler

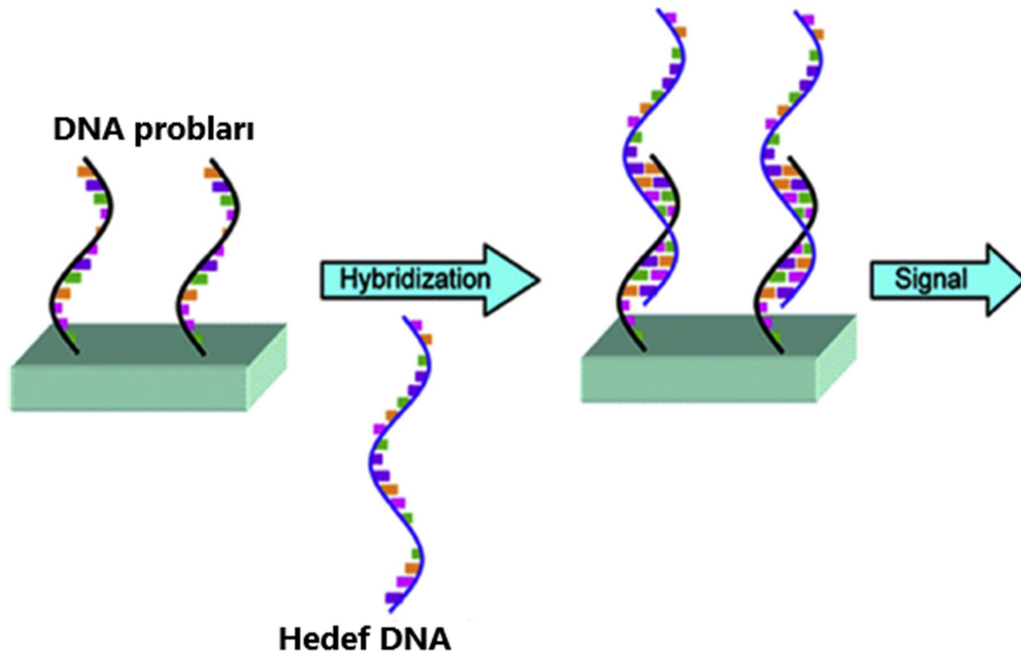
DNA'nın ısıya dayanıklılık gücü ve bir bireyin tüm hücrelerinde bulunması nedeniyle, DNA bazlı analizler tür ayırt etme ve tanımlama için tercih edilmektedir. DNA hibridizasyonu ve Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR), hileli gıda ürünlerinde et türlerinin belirlenmesine yardımcı olan iki ana DNA tabanlı moleküler tekniktir (Lockley ve Bardsley 2000).

2.1.1.1 DNA Hibridizasyon Tekniği

Yüksek sıcaklıklarda, doğal DNA denatürasyona uğrayarak çift sarmalın ayrılmasına ve kısa parçaların ve tek sarmallı DNA'ların oluşmasına neden olur. ss-DNA hibridizasyon çalışmalarında prob ve hedef olarak kullanılacak ve spesifik problemler sadece hedef DNA'nın spesifik nükleotid dizisini tanıyabilir. DNA hibridizasyonu, gerçek zamanlı PZR ve DNA mikro dizileri gibi teknikler kullanılarak tanımlanır. DNA mikroarray hibridizasyonunun hassasiyeti PZR'dan daha düşüktür, ayrıca numune çapraz kontaminasyonuna karşı daha az hassastır (Ballin vd. 2009).

DNA hibridizasyonunun tespiti, patojen tanımlama, genetik profileme ve tek nükleotid polimorfizmi de dahil olmak üzere biyoanalizlerde yapılan birçok çalışmanın merkezinde yer almaktadır. İlk olarak 1987 yılında (Baur vd. 1987) tarafından et türlerinin tanımlanması için kullanılmıştır (Dohno ve Nakatani 2011).

DNA biyosensörü ve DNA mikroarray, hızlı, yeniden kullanılabilir, sürekli, seçici ve hassas tespit yöntemlerine olanak tanıyan umut verici teknikler sunan en iyi özgün tespit sistemleridir. Hem DNA biyosensörleri hem de mikro diziler, tamamlayıcı tek sarmallı nükleik asit dizilerinin tercihli bağlanmasını kullanır. Bu yapı genellikle tek sarmallı bir DNA (ss-DNA) probunun hibridizasyon yoluyla tamamlayıcı hedef DNA dizisine bağlanmak üzere bir dönüştürücü yüzeyine immobilizasyonuna bağlıdır (Sassolas vd. 2008) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Bir DNA dizisinin tespitinde yer alan adımlar (Sassolas vd. 2008).

2.1.2 PCR Yöntemleri İçin Farklı DNA Türleri

Amaca bağlı olarak, PCR yöntemlerinde farklı DNA türleri kullanılır. Mitokondriyal DNA'nın PCR amplifikasyonu türlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her mitokondride çok sayıda mtDNA molekülü vardır. Bu da mt DNA'yı doğal olarak çoğaltılmış bir genetik varyasyon kaynağı haline getirir. mt DNA maternal olarak kalıtılır, böylece bir birey normalde sadece bir alele sahip olur ve böylece heterozigot genotiplerden kaynaklanan dizi belirsizlikleri genellikle önlenir (Hagelberg vd. 1999).

Mitokondriyal (mt) DNA, küçük (15-20 kb) dairesel bir moleküldür ve 22 tRNA, 2 rRNA ve 13 mRNA için kodlama yapan yaklaşık 37 genden oluşur. İntronlardan yoksundur, fakat küçük intergenik aralayıcılar vardır, hatta bazen okuma çerçeveleri üst üste çakışır (Lockley ve Bardsley 2000).

Genomik DNA, uydu, telomerik mikro uydu, mini uydu, transpozon, kısa serpiştirilmiş nükleer elementler (SINE) ve uzun serpiştirilmiş nükleer elementler (LINE) gibi tekrarlayan diziler içerir. Tekrarlayan diziler organizasyon, lokalizasyon ve bolluk açısından farklılık gösterir. SINE ve LINE genomun %10-15'ini kaplar, bu da bu

dizilere dayanan yöntemlerde gözlemlenen düşük yoğunluğun ana nedenidir. Sığır genomunun %7,1'ini kapladığı düşünülen 1,709 g/cm³ sığır uydu dizisinin amplifikasyonu PZR'da başarıyla kullanılmıştır. Bu da yaklaşık 0,0025 genomik kopyaya karşılık gelmektedir. Kopya sayısı sabit olduğu için farklı örneklerin genom/genom eşdeğerlerinin PZR ile ölçümü mümkündür (Walker vd. 2004).

2.1.3 PZR Tabanlı Yöntemler

Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR), özgün bir DNA dizisinin birkaç saat içinde birkaç milyon kat büyütülmesini sağlayan in vitro enzimatik bir yöntemdir. Mullis vd. (1986) tarafından icat edilen bu teknik, sadece moleküler biyologlar ve genetikçiler için değil aynı zamanda adli tıp ve gıda teknolojisi uzmanları için de yararlıdır (Kumar vd. 2015).

Günümüzde PZR testi, et ve et ürünlerinin tür kökeninin belirlenmesinde büyük bir popülerlik kazanmaktadır. Bu, daha az karmaşık ve hızlı güvenilir olması nedeniyle et ve et ürünlerinin kimlik doğrulaması için hassas, uygun maliyetli, kesin, özgün ve potansiyel olarak uygulanabilir bir tekniktir. PZR testleri aynı zamanda canlı hayvanlar ve bunlardan elde edilen ürünlerin izlenebilirlik sorunlarının çözülmesinde de faydalı olduğunu kanıtlamaktadır (Cunningham ve Meghen 2001).

Başarılı bir PZR amplifikasyonu için gerekli bileşenler şablon DNA, bir çift ileri ve geri oligonükleotid primer, dört çeşit deoksिनükleotid, termostabil bir DNA polimeraz enzimi ve reaksiyon tamponudur. PZR tekniği, gerekli amplifikasyon derecesine bağlı olarak denatürasyon, primer tavlama ve uzama adımlarını içerir (Chikuni vd. 1994).

2.1.3.1 Multiplex PZR

Multiplex PZR testi, tavuk eti, hindi eti, sığır eti, domuz eti, keçi eti, koyun eti, eşek eti ve at etinin tanımlanması için uygundur. Isıtılmış ve işlenmiş et ürünlerinde tespit limitinin %1 olduğu bildirilmiştir. Gnomik ve mitokondriyal DNA'yı hedefler ve PZR reaksiyonunda birden fazla et türünü eşzamanlı, kesin ve hızlı bir şekilde tanımlar. Çoklu tür tanımlamasında, her tür için farklı primer setleri kullanılır (Kumar vd. 2015).

2.1.3.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

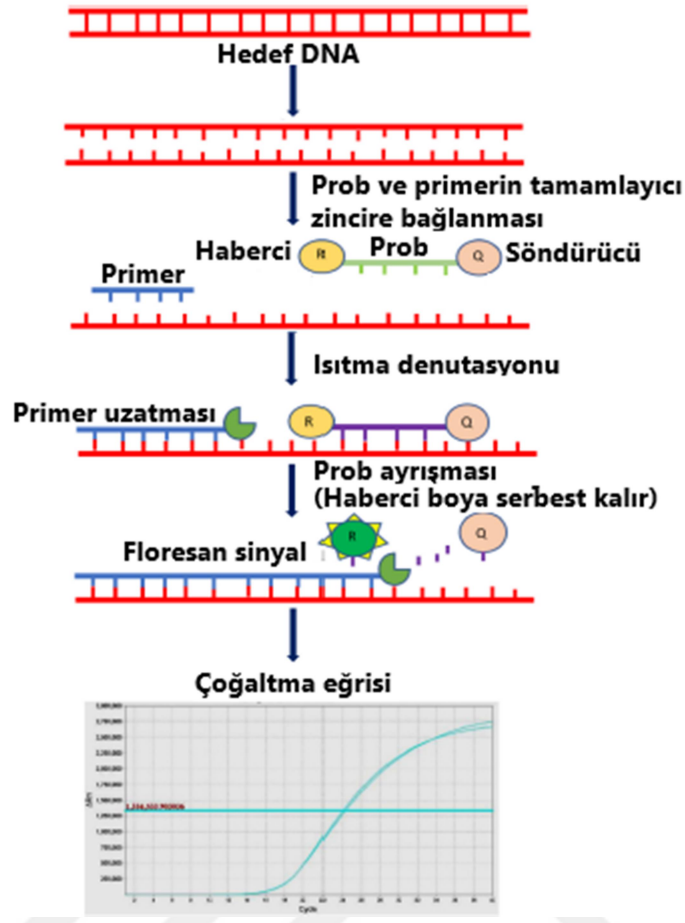
RFLP tekniği, PZR ampikonlarının restriksiyon enzimi sindirimine tabi tutulduğu ve jel elektroforezi ile her bir türe özgü desenler olarak görselleştirildiği türe özgü bir tekniktir. Türlerin RFLP analizi ile ayırt edilmesi, kullanılan restriksiyon enzimleri tarafından tanınan özgün restriksiyon bölgelerindeki farklılıklara dayanır. Farklı türler ve farklı ırklar gibi taksonlar arasında ayırım yapılmasını sağlar (Sun ve Lin 2003).

2.1.3.3 Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR

Gerçek zamanlı PZR, kantitatif PCR (qPZR) olarak da bilinir. Gerçek zamanlı PZR, amplifikasyon ürünlerinin üretiminin her amplifikasyon döngüsü sırasında doğrudan izlendiği bir süreçtir. Türlerinin rutin tespitinde ve miktar tayininde kullanılabilir. Bu teknik, hızlı olması, ham, ısıl işlem görmüş ve karışık numuneler için uygulanabilirliği, 0,1 pg'ye kadar hassasiyeti ve güvenilirliği ile bilinir. En çok kullanılan gerçek zamanlı PZR testleri, TaqManR ve SYBR Green teknolojileridir (Chen vd. 2010).

TaqMan yönteminde hem primerler hem de prob, şablon DNA üzerindeki tamamlayıcı bölgelerine tavlacak şekilde tasarlanır. Problar sırasıyla 5'-uç ve 3'-uçta floresan haberci boya ve söndürücü ile etiketlenir. Haberci boya, söndürücüye olan yakınlığı nedeniyle reaksiyona katılmadan önce genellikle floresan yaymaz. Prob, qPZR primerlerinin aşağı akışına bağlanmak üzere tasarlanmış özgün diziler içerir. Prob hibridize edildikten sonra, DNA polimeraz probun reporter ve quencher moleküllerinin yanından geçip onları ayrıştırdıkça floresan sinyal üretilir. Burada, DNA polimeraz primeri proba doğru uzatır. Polimerazın 5' nükleaz aktivitesi, uygun hedef sekansa hibridize olması halinde probu ayrıştırır ve raportör boyayı serbest bırakarak molekülün floresan sinyal yaymasını sağlar (Pinheiro vd. 2012), (Şekil 2.3).

SYBR Green, çift sarmallı DNA'nın minör oluşuna bağlanan bir boyadır. Floresan yoğunluğu çift sarmallı DNA miktarı ile orantılıdır. SYBR Green'in bir avantajı, PZR'dan sonra bir erime eğrisi oluşturulabilmesi ve tekli mutasyonların ve delesyonların tespit edilebilmesidir (Lopez-Andreo vd. 2006).



Şekil 2.3 TaqMan prob tespiti süreci: TaqMan problemleri primerlerin aşağı akış yönünde tek sarmallı cDNA'ya bağlanır. Uzatma sırasında polimeraz probu, floresan sinyalin tespiti edilmesini sağlar (Pinheiro vd. 2012).

2.1.3.4 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) analizi, kısa rastgele PZR primerlerinden yararlanır. Bu yöntem son derece ayırt edicidir. PZR reaksiyonunda birden fazla et türünün eş zamanlı olarak tanımlanması için basit, hızlı ve hassas bir yöntemdir. RAPD analizi, kısa rastgele PZR primerlerinden yararlanır ve bir dizi amplifiye ürün üretir. RAPD tekniği, karşılaştırma için referans materyalin mevcut olduğu ancak DNA dizisi hakkında çok az bilgi sahibi olduğu veya hiç bilgi sahibi olunmadığı durumlarda çok güçlü ve etkilidir. Bu nedenle RAPD sadece evcil hayvanlar için değil, aynı zamanda nadir türler için de geçerlidir. Çünkü DNA dizilimleri hakkında önceden bilgi sahibi olmak gerekmez. Ancak RAPD'nin tekrarlanabilirliğinin zayıf olduğu bilinmektedir (Rastogi vd. 2007, Saez vd. 2004).

2.1.4 PZR Ürünlerinin Dizileme Analizi

Dizileme (sekans) ile tanımlama, PZR ampliconlarını analiz etmenin en doğrudan ve geçerli yoludur. Genellikle jel elektroforezi ve gerçek zamanlı PZR ile elde edilen sonuçların ardından doğrulayıcı bir analiz olarak kullanılır. Dizileme tek tek PZR ampliconlarına kolayca uygulanabilir. Örneğin, sitokrom b ve 12S rRNA et türlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler belirteçlerdir (Iijima vd. 2006).

Hayvan türlerinin DNA dizilimi ile karakterize edilmesi, bilinen dizilerin mevcudiyetine bağlıdır. Yaygın hayvan türlerinden, ırklardan ve genetik varyasyonlardan çok sayıda sekans içeren veri tabanlarında (örneğin Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) çok sayıda bilgi mevcuttur. Dizileme, referans materyal bulunmasa bile bilinmeyen örneklerdeki türleri tanımlamak için kullanılabilir. Bunun için türlerin özgün bir DNA dizisine sahip olması yeterlidir. PZR ampliconlarından elde edilen diziler ve veritabanı karşılaştırması yoluyla tanımlama ile tür kimliğini belirlenir (Imaizumi vd. 2007).

2.1.5 Protein Analizine Dayalı Yöntemler

2.1.5.1 Elektroforez

Bu teknikte, et türlerinin tanımlanması için çözünebilir proteinler, özellikle sarkoplazmik proteinler kullanılır ve çiğ et üzerinde uygulanır (Hui ve Sherkat 2006).

Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE): Protein bantlarının moleküler boyutlarındaki farklılıklara dayanarak proteinleri karakteristik modellere ayırır. Bu yöntemin dezavantajları arasında düşük güvenilirlik, hassasiyet eksikliği, jellerin yorumlanmasındaki zorluklar ve ısıl işlem derecesi ve boyama teknikleri gibi faktörlerin etkileşimi yer almaktadır (Martinez vd. 2001).

İzoelektrik odaklama (IEF): İzoelektrik noktadaki (PI) farklılıklara dayanır. IEF yöntemi, çiğ ya da pişmiş etteki hayvan türlerinin belirlenmesinde de kullanılır ve SDS-

PAGE'den daha etkili olduğu öngörülür. Skarpeid vd. (1998), bu yöntemi kullanarak sığır, domuz ve hindi eti arasında ayırım yapmıştır.

Kapiler elektroforez (CE): Elektroforez ve kromatografi yöntemlerinin birleşiminden türetilmiş bir yöntemdir. Protein analizi için yeterince hassas bir yöntemdir. Ancak et tağışlarının belirlenmesi için rutin olarak kullanılacak kadar hassas değildir. Gerekli ekipman da pahalıdır ancak aynı tür içindeki ısıtılmamış etlerde tekrar tekrar kullanılabilir (Skarpeid vd. 1998).

2.1.5.2 Kromatografi

Kromatografi, et ürünlerindeki proteinlerin tanımlanması, belirlenmesi ve analiz edilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Kromatografi, karışık ve ısıtılmış et ürünlerinde kullanılabilme avantajına sahip olsa da, protein modellerinin yorumlanması oldukça zordur. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve kapiler elektroforez (CEP) gibi kromatografik yöntemlerin tümü et tanımlaması için rapor edilmiştir (Schonherr 2002).

Gaz Kromatografisi (GC): Verimli ürün analizi için, yağ analizindeki yağ asitleri gibi yüksek derecede uçucu olmaları gerekir, ancak amino asitler düşük uçuculuğa sahip olduklarından, GC ile doğrudan belirlenemezler (Tranchida vd. 2004).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC): Et tayini için geliştirilen HPLC yöntemlerinin çoğu, farklı etlerdeki protein, peptit ve/veya amino asit profillerinin farklılaştırılmasına dayanmaktadır. HPLC, GC'nin aksine rutin analizler için uygun olan, yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirliğine sahip bir yöntemdir (Chou vd. 2007) .

HPLC, bilinen hayvanın %0,5'ini veya daha azını tespit edebilen hayvana özgü histidin dipeptidleri, karnozin, anserin ve balenini tespit etmek için kullanılmıştır. HPLC yönteminin en büyük dezavantajı uzun ekstraksiyon ve analiz süreleri gerektirmesi, bu yöntemin yaygın kullanımını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (Chou vd. 2007) .

2.1.5.3 Spektroskopi

Spektroskopik yöntemler, numunelerdeki moleküller tarafından elektromanyetik spektrumun kesin dalga boylarında ışık emilimine dayanır. Et örneklerinin orta kızılötesi (2000-800 cm⁻¹), yakın kızılötesi (750-2498 nm) ve görünür (400-750 nm) yansıma spektrumlarını tür içeriğinin hem tanımlanması hem de miktarının belirlenmesi için kullanan spektroskopiler rapor edilmiştir (Jakes vd. 2015).

Kütle spektrometrisi (MS): Kütle spektrometresi (MS) teknikleri, gıda ürünlerindeki protein ve peptit analizlerinde hayati bir rol oynamaktadır. Kütle spektrometrisi (MS), yapısal tanımlama için büyük hassasiyete sahip güçlü bir araçtır. MS tespitleri yaygın olmasına rağmen, yüksek maliyetli bir prosedürdür ve et kaynaklarının etkili bir şekilde ayırt edilmesini sağlamak için çok fazla sinyal üretebilir (Zamora-Rojas vd. 2012).

2.1.5.4 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay Testi (ELISA)

Bu teknik ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında kullanılmaya başlanmıştır. Enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) hayvan proteinlerini tespit etmek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Antikorlar ve antijenler arasındaki etkileşime dayanır. İmmünoassay teknikleri, maliyetli, sofistike ekipman kullanımını ve analiz süresini azaltmak için tamamlayıcı yaklaşımlar sağlar (Alikord vd. 2018).

ELISA'nın avantajları arasında basitliği, yüksek hassasiyeti ve doğruluğu yer alır. Ayrıca etli gıdaların güvenliği ve etiketleme düzenlemeleri için numunelerin zorunlu kontrolü için etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Et türlerinin belirlenmesinde daha yaygın olarak kullanılan iki ELISA yöntemi İndirekt ELISA ve Sandviç ELISA'dır. Dolaylı ELISA, iki antikorun kullanıldığı bir yöntemdir. Bunlardan biri bir antijene bağlanırken, diğeri bir gösterge olarak ilkinde bağlanır (Garcia vd. 1994).

Sandviç ELISA ticari kitler için en yaygın kullanılan yöntemdir, çünkü ekstrakte edilen seyreltilmiş numune doğrudan plakaya eklenebilir. Sandviç ELISA'nın gelişmiş örneklerinde poliklonal bir antikor kullanılır. Çünkü her ikisini de yakalamak için

benzer bir poliklonal antikor kullanılır. Bu yöntemde iki monoklonal antikor kullanılıyorsa, iki önemli özellik olarak özgüllük ve afiniteye sahip olmaları gerekir. Birkaç ticari Sandviç ELISA kiti, glikoproteinlere dayalı pişmiş etleri tanımlamak için yapılandırılmıştır. Bu kitler kalitatif sonuçlar vermede daha hızlı ve ucuzdur (Giovannacci vd. 2004).

2.1.5.5 Biyoçip

Son on yılda nanoteknolojideki ilerlemeler, hücrelerin içinde biyomolekül ölçümleri ve analizleri yapmayı mümkün kılan biyoçiplerin geliştirilmesine yol açmıştır. Biyoçip, katı bir alt tabaka (silikon, soda camı, erimiş kuvars ve plastik gibi) üzerine yerleştirilen minyatür test alanlarından (mikro diziler olarak da adlandırılır) oluşan ve birçok biyokimyasal analizin aynı anda yapılmasına olanak tanıyan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Bodovitz vd. 2005).

2.2 Et ve Et Ürünlerinin Menşei Tespiti Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Bellagamba vd. (2006) 130°C'de (200 kPa) 40 dakika boyunca işlenen et ve kemik ununda sığır, koyun, keçi, domuz ve tavuğun kantitatif ve spesifik tespiti için bir TaqMan gerçek zamanlı PZR testi uygulamıştır.

Di Pinto vd. (2015) çalışmasında, herhangi bir tür ikamesi veya yanlış etiketlemeyi doğrulamak için mitokondriyal sitokrom b geni kalitatif PZR tanımlama sistemini kullanarak İtalyan pazarlarından ve süpermarketlerinden işlenmiş et ürünlerini araştırmıştır. Sonuçlar, et ürünleri arasında yüksek bir ikame oranını ortaya çıkarmış, %57'lik bir yanlış etiketleme oranını ve sonuç olarak etiketlerdeki göstergelerle önemli ölçüde uyumsuzluğu vurgulamış, bu da önemli gıda güvenliği ve tüketici koruma endişelerini gündeme getirmiştir.

Dooley vd. (2004), sığır, domuz, kuzu, tavuk ve hindi etlerinin tespiti için türe özgü gerçek zamanlı PZR (TaqMan) testleri geliştirmiştir. Testler, mitokondriyal sitokrom b (cytb) geninin küçük (amplikonlar <150 baz çifti) bölgeleri etrafında geliştirilmiştir. Tür

ayırımı, türe özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tespit amacıyla iki TaqMan probu geliştirilmiştir; birincisi memeli türlerine (sığır, kuzu ve domuz eti), ikincisi ise kanatlı türlerine (tavuk ve hindi) özgüdür. Normal son nokta TaqMan PZR koşulları uygulanmıştır. Testler çiğ et karışımlarından elde edilen DNA özütlerine uygulandığında, her bir türün %0,5 seviyesinde başka bir türe eklendiğinde tespit edilmesi mümkün olmuştur.

Frezza vd. (2008), ısıtılmış işlem görmüş materyalden çoğaltılabilen kısa türe özgü dizileri tespit etmek üzere gerçek zamanlı PZR ile büyükbaş, küçükbaş, domuz ve tavuk mitokondriyal DNA'sının kantifikasyonu için dört türe özgü prob tasarlamıştır. Domuz, tavuk, küçükbaş ve büyükbaş genomik DNA'sı için tespit limitleri sırasıyla 0.5, 0.5, 0.01 ve 0.05 ng olmuştur.

Girish vd. (2005), AN, HhaI, Apo I ve BspTI restriksiyon enzimleriyle sindirilen 456 bp mitokondriyal 12S rRNA gen parçasının amplifikasyonu yoluyla sığır eti, manda eti, koyun etinin tür tanımlaması için PZR-RFLP'yi başarıyla uygulamış ve yukarıdaki türlerin her birini tanımlayabilen ve ayırt edebilen bir model elde etmiştir.

Laube vd. (2007), Gerçek zamanlı PZR ile gıdalarda ticari olarak ilgili türlerin kantitatif tayini üzerine yaptığı çalışmada, tanımlanan örnekler TaqMan PZR kullanılarak sığır, domuz, kuzu, keçi, tavuk ve hindi oranı açısından incelenmiştir. Gıda ürünlerindeki toplam et oranına göre hayvan türlerinin oranını belirlemek için bir miktar belirleme yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR sistemlerinin benimsenmesi, işlenmiş et ürünlerinde ve konserve gıdalarda türlerin miktarı araştırılmıştır.

Lopez-Andreo vd. (2005), 0,03 ila 0,80 pg şablon DNA arasında değişen tespit sınırı ile karmaşık örneklerde sığır, domuz, kuzu, tavuk, hindi ve devekuşu DNA'sının tespiti için küçük oluk bağlayıcı problemler kullanan altı TaqMan PZR rapor etmiştir.

Mane vd. (2009), taze, işlenmiş ve otoklavlanmış et ve et ürünlerinden 442 bp DNA parçalarında mitokondriyal D-loop genine dayalı tasarlanmış primer çifti kullanarak, özgün kesim bölgesi için HaeIII ve Sau3AI enzimleri ile olumlu sonuç almıştır.

Matsunaga vd. (1999) tarafından, mitokondriyal sitokrom b geni yardımıyla keçi, tavuk, sığır, koyun, domuz ve atın tanımlanması için ortak ileri primer ve altı geri primer kullanarak, çeşitli sıcaklıklarda ısıtılmış otoklavlanmış et dahil olmak üzere taze ve pişmiş ette sırasıyla 157, 227, 274, 331, 398 ve 493 bp'lik PZR amplifiye DNA parçaları başarıyla elde edilmiştir.

Myers vd. (2003), Mitokondriyal DNA segmentinin PZR amplifikasyonu ve ardından restriksiyon enzim sistemi; mitokondriyal sitokrom b geni üzerine tasarlanmış primer çifti kullanılarak ve ardından restriksiyon enzimleriyle (AluI, RsaI, TaqI ve HinfI) domuz, sığır, yaban domuzu, manda, koyun, keçi, at, tavuk, hindi ve av etlerini tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır.

Murugaiah vd. (2009) sığır, domuz, manda, bildircin, tavuk, keçi, tavşan türlerinin tanımlanması ve helal kimlik doğrulaması için mitokondriyal genlerde PZR-RFLP geliştirmiştir. Bu altı etin sitokrom b geninden 359 bp'lik PZR ürünleri başarıyla elde edilmiştir. AluI, BsaJI, RsaI, MseI ve BstUI enzimleri etleri ayırt etmek için potansiyel restriksiyon endonükleazları olarak tanımlanmıştır. Etler arasında sitokrom b genindeki genetik farklılıklar PZR-RFLP ile başarılı bir şekilde doğrulanmıştır.

Imaizumi vd. (2007) ne göre, PZR amplifikasyonu ve korunmuş genlerin dizilenmesi ve bunların karşılaştırılması, et türlerinin tanımlanması için kesin tekniklerden biridir. DNA dizilimi ile hayvan türlerinin tanımlanması, bilinen dizilerin mevcudiyetine bağlıdır. Yaygın hayvan türleri, ırkları ve genetik varyasyonlarından çok sayıda sekans, NCBI gibi (örneğin Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanlarında mevcuttur. PZR ampikonlarından elde edilen dizilerin, veri tabanlarındaki referanslarıyla karşılaştırması yoluyla tür kimliğini belirleme yapılmaktadır.

Rodriguez vd. (2003), mitokondriyal 12S rRNA geni üzerine tasarlanmış ortak ileri primer ve türe özgü geri primerler kullanarak kaz ciğerinde kaz, katır ördeği, tavuk, hindi ve domuzu türlerini net bir şekilde tanımlamış ve yaklaşık %1 oranında taşıyıcı tespit etmiştir.

Rodríguez vd. (2005) tarafından, mitokondriyal 12S ribozomal RNA geninin (rRNA) amplifikasyonuna dayanan, domuz eti / sığır kası karışımlarında domuz eti miktarının belirlenmesi için gerçek zamanlı kantitatif PZR tekniği geliştirilmiştir. Hedef genin amplifikasyonunu izlemek için "domuza özgü" ve ayrıca "sığır DNA parçalarında hibridize olan dahili bir florojenik prob (TaqMan) kullanılmıştır. Sığır ve domuza özgü PCR ürünlerinin ilk tespit edildiği döngü sayısının (Ct) karşılaştırılması, domuz eti içeriği bilinen referans standartların kullanımıyla birlikte, karışık bir numunedeki domuz eti yüzdesinin belirlenmesine olanak tanımıştır.

Sun ve Lin (2003) mitokondriyal 12S rRNA genine dayalı primer çiftleri kullanarak floresan PZR-RFLP testini, pişmiş ve otoklavlanmış etlerde domuz ve sığır türlerinin tanımlanması için analitik ve kantitatif bir araç olarak uygulamıştır.

Walker vd. (2004) at, köpek, kedi, sıçan, hamster, kobay ve tavşan DNA'larının miktar tayini için 0,1 ila 0,1 pg DNA şablonu arasında değişen minimum etkili tespit seviyeleri ile SYBR Green tabanlı PZR testini başarıyla tasarlamış ve değerlendirmiştir.

Wang vd. (2020), et ürünlerinde koyun/keçi, sığır, tavuk, ördek ve domuzdan elde edilen bileşenlerin tespiti için yeni türe özgü nükleer DNA (nDNA) dizilerini kullanan bir multipleks PCR yöntemi geliştirmeyi amaçlamıştır. Sekans hizalama analizi 53 türe özgü nDNA'nın yüksek özgüllüğünü göstermiştir. Türler için özgü primerler, her bir türe özgü nDNA dizisinin özgün bölgesi üzerinde tasarlanmıştır. Dizilerin ve primerlerin özgüllüğü ve korunması, PZR reaksiyonu ve 0,5 ng'ye kadar tespit limiti ile sıralama ile doğrulanmıştır. Ardından, bir veya daha fazla hayvansal kaynaklı bileşen içeren çeşitli işlenmiş et ürünleri, tek bir reaksiyonda koyun/keçi (237 bp), sığır (223 bp), tavuk (192 bp), ördek (168 bp) ve domuzu (154 bp) eş zamanlı olarak tespit etmek için türe özgü bir multipleks PZR yöntemi geliştirilmiş ve optimize edilmiştir.

Xing vd. (2019), araştırmada 16S ribozomal RNA (16S rRNA) mitokondriyal geninin kısa bir segmentinin yeni nesil dizilimi gerçekleştirilmiştir. Yinelenen örnekler ve iki farklı veri tabanı çok benzer sonuçlar üretmiştir. Geliştirilen DNA metabarkodlama yaklaşımını kullanarak Çin'de satılan 27 et ve kümes hayvanı ürünündeki hayvan

türlerini belirlemek için bir pazar araştırması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, işlenmiş et ve kümes hayvanı ürünlerinde yanlış etiketlenmenin varlığına işaret etmiştir.

Yin vd. (2009), yak etinin sığır etiyle olası tağşişinin önlenmesi için, mitokondriyal 12S rRNA'geni dizisine dayalı olarak ve üç primer kullanılarak yak ve sığır etlerinin hızlı bir şekilde tanımlanması için amultiplex PZR tabanlı bir yaklaşım önermiştir. Üç primerin tek bir reaksiyon setiyle kombinatoriyal kullanımı sayesinde, sığır eti DNA'sından 290 ve 159 bp'lik iki parça çoğaltılırken, yak eti DNA'sından sadece 290 bp'lik bir parça elde edilmiştir. Test sonucu sığır eti için %0,1'lik bir tespit limiti ile çiğ ve ısıtılmış işlem görmüş yak/sığır ikili et karışımlarının analizinde başarılı bir amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Zhang vd. (2007), simpleks ve dupleks TaqMan gerçek zamanlı PZR sistemleri ile et, süt ve peynirdeki DNA'yı belirlemiştir. Çalışmada DNA et ve peynirden, Promega Wizard Magnetic kiti kullanılarak süttten izole edilmiş ve Qiagen silikon spin kolonları ile saflaştırılmıştır. Sığır kıymasından izole edilen yüksek kaliteli DNA, mitokondriyal cytb geni için sığıra özgü bir primer çifti ve FAM etiketli memeliye özgü bir cytb probu kullanılarak TaqMan gerçek zamanlı PZR testinde standart eğri yapımı için kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR testi 35 pg kadar küçük bir sığır DNA'sını kantitatif olarak tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

Ödemiş (İzmir) ilçesinde halk pazarındaki kasaplardan üç adet kırmızı et ürünü sucuklar alınmıştır. Et ürünleri soğuk zincir ortamında laboratuvara getirilmiş ve araştırma sürecine kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Ödemiş (İzmir) ilçesinde 3 farklı kasaptan alınan kırmızı et ürünü sucuklar.

3.2 Metot

3.2.1 Et Ürünlerinin Hazırlanması

Her bir numuneden yaklaşık 350 g et ürünü, homojen macunu elde etmek için ticari blender ile öğütmeye tabi tutulmuştur. Homojen edilmiş sucuk macunundan 0,2 g numune, 2 mL'lik eppendorf tüpüne alınmıştır. Kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için 2 mL'lik eppendorf tüpüne bir miktar PZR Grade su numunelerin yanına kapağı açık şekilde bırakılmıştır. Elde edilen ürün DNA analizinde kullanılmıştır (Pegels vd. 2011).

3.2.2 DNA Ekstraksiyonu

Et ürünlerinin DNA izolasyonu, ticari bir kit olan Eurofins GeneSpin DNA Isolation Kit ile üretici firmanın protokol önerileri takip edilerek yapılmıştır. Protokole göre;

- 1) 2 mL eppendorf tüpüne 0,2 mg örnek alınmış, üzerine 550 µL Lizis buffer ve 10 µL Proteinaz K eklenmiş ve vortekslenmiştir. Karışım 65 °C'de 3 saat inkübasyonda bırakılmıştır.
- 2) İnkübasyondan alınan numuneye 2 µL Ribonükleaz (RNase) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) Süpernatant elde etmek için eppendorflar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantın tamamı 2 µL'lik yeni bir eppendorfa alındı, üzerine süpernatant miktarı kadar Binding Buffer ve etanol eklenip bir dakika vortekslenmiştir. 2 µL'lik temiz kolon tüpüne filtre yerleştirilmiştir. Kolon tüpüne 700 µL'lik karışımın tamamı aktarılmış ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- 4) Kolon türündeki filtre yeni temiz bir kolon tüpüne yerleştirilmiş, üzerine 400 µL Wash Buffer 1 eklenmiş ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- 5) Filtre tekrar yeni bir temiz kolon tüpüne aktarılmış, Wash Buffer 2 ile toplam 900 µL olacak şekilde 2 defa yıkama yapılmış ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Filtre temiz boş bir kolona yerleştirildikten sonra 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve kapak açılarak oda koşullarında 30 dakika kurumaya bırakılmıştır.
- 6) Filtre 1.5 mL'lik eppendorf tüpe alınmış ve önceden 70⁰C'ye ısıtılmıştır. 100 µL ayrıştırma buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8)'dan DNA kolon filtresinin üzerine pipetlenmiş ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Eppendorf tüpte toplanan DNA'lar qPCR işleminde kullanılmıştır (Dooley vd. 2004).

3.2.3 DNA Konsantrasyonu Tayini

Et ürünlerinden izole edilen yaklaşık 200 mg DNA ekstraktlarının konsantrasyonları NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific) ile absorbans değerleri 260 nm'de ölçülmüş ve seyreltmeyle DNA yoğunluğu 40 ng/µL'ye ayarlanmıştır. Numunelerin saflığını doğrulamak için A260/A280 oranı dikkate alınmıştır (Kim vd. 2016).

3.2.4 Hedef Gen ve Primerlerin Belirlenmesi

Hedef gen olarak mitokondriyal sitokrom b (cytb) bölgesi çalışılmıştır. 18S rRNA korunmuş bölge olarak kullanılmıştır. Sığır, koyun ve tavuk eti DNA'sı için türlere özgü primerler kullanılmıştır. Sığır, koyun ve tavuk türlerine ait saf referans DNA'lar ile primerler ve 5'-carboxyfluorescein (FAM), 3'fluorescent quencher (HEX) floresan boya ile işaretlenmiş probalar Sia Analiz (İzmir, Türkiye) ve Analytik-Jena (Jena, Almanya) firmalarından temin edilmiştir (İnt. Kay. 1).

3.2.5 TaqMan qPCR Analizi

Çalışmada gerçek zamanlı TaqMan q-PCR yöntemi kullanılmıştır. Genomik DNA'ların TaqMan q-PCR işlemi için sığır, koyun ve tavuk türlerine özgün primerler ve Taq-Polimeraz içeren Innu DETECT Beef, Sheep, Chicken Assay Kit (Analytik-Jena, Almanya) ticari test kitleri kullanılmıştır. TaqMan q-PCR işlemleri genomik DNA'dan 40 ng, sığır, koyun ve tavuk primer ve probalarından 3 µM alınarak toplam 20 µL hacminde hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

TaqMan q-PCR işlemi Rotor Q (Qiagen, Almanya) ve (Eppendorf, Mastercycler ep Realplex2) cihazında 35 döngü üzerinden yürütüldükten sonra kırmızı, sarı, turkuaz, kahverengi, zeytin yeşili ve koyu yeşil kanallar üzerinden okuma yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 TaqMan qPCR mastermix içeriği (İnt. Kyn. 1).

Reaktifler	Miktar
2xMastermix	10 µL
Primer/Probe mix beef IC	3 µL
Internal kontrol	1 µL
Numune DNA'sı	5 µL
PCR Grade su	20 µL'ye tamamlanır.

Çizelge 3.2 TaqMan qPCR termal döngü süreleri ve sıcaklıkları (İnt. Kyn. 1).

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Bağlanma	65°C	10 saniye	35
Uzama	72°C	45 saniye	

3.2.6 Primer ve Prob Setlerinin Özgünlük ve Hassasiyet Testleri

Çalışmada, Analytik-Jena tarafından sığır, koyun ve tavuk türlerine özgü olarak tasarlanan primer ve prob setleri kullanılmıştır. Hassasiyet değeri için örneklerin DNA izolatları su ile seyreltilerek, DNA konsantrasyonu 0,1 ng/ 5µL değerine ayarlanmıştır. Her bir reaksiyon tüpüne 2 µL kalıp DNA eklenmiştir. TaqMan prob yöntemi kapsamında, türlere özgün primer-prob setleri ile dilüsyon özellikli numunelerin reaksiyon analizleri yapılmıştır. Dilüsyonlu numunelerin DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen döngü eşiği veya Cycle threshold (Ct) değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur (İnt. Kyn. 1).

3.2.7 TaqMan qPCR Tekniği ile Kırmızı Et Ürünlerinden Tür Tayini

Araştırma materyali olan sucuklardaki et ürünlerinin tür menşei için; sığır, koyun ve tavuk türlerine özgü primerler ve Taq-Polimeraz içeren Innu DETECT Beef, Sheep, Chicken Assay Kit (Analytik-Jena, Almanya) ticari test kitleri kullanılmıştır. Bu ticari test kitleri ve TaqMan qPCR prob tekniği ile sucuklardaki et ürünlerinin tür menşei belirlene çalışması sığır, koyun ve tavuk türleri üzerinden yapılmıştır (İnt. Kyn. 1).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Ödemiş (İzmir, Türkiye) ilçesinde kasaplardan 3 adet kırmızı et ürünü sucuk alınmıştır. Üreticiler sucukların sığır ve koyun etinden üretildiği belirtmiştir. Ön tanı kapsamında, sucuklardan tat ve koku analizi yapılmış ve bu ürünlerin sığır ve koyun etinden üretildiği öngörülmüştür. Daha sonra, araştırma konusu sucukların menşeyini tam ve doğru tanımlamak için nicel bir yöntem tercih edilmiştir. Bunun için TaqMan qPCR yöntemi ile sucuklardaki et ürünlerinin tür menşeyini belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bu yöntem kapsamında, DNA izolasyonu için, sucukların her birinden 350 g numune alınmıştır. Ticari bir kit olan Eurofins GeneSpin DNA Isolation Kit (Germany) ile numunelere ait et karışımlarından DNA izolasyonu yapılmıştır.

4.1 TaqMan qPCR Probe Yöntemi ile Ct Değeri Tespiti

İnceleme örneklerine ait nükleik asitlerin, TaqMan qPCR yöntemi ile türe özgü primer ve problarla pozitif sinyal vermesi sonucu oluşan Floresan Sinyalin arka plan sinyalini geçmesi için gereken döngü değeri “Cycle threshold” (Ct) veya döngü eşiği olarak bilinmektedir. Cycle threshold (Ct) değeri, inceleme materyalinde, hedeflenen ürünün bulunup bulunmadığını ve yoğunluk oranını anlamaya yarayan bir testir.

Örneklere ait DNA izolatlarının yoğunluklarını tanımlama için bir hassasiyet değeri belirleme çalışması yapılmıştır. Bunun için örneklere ait DNA izolasyonlarından 0.1 ng/5µL seviyesinde su dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlu numunelerin 0.1 ng/5µL DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen döngü eşiği (Cycle threshold-Ct) değerleri üzerinden analiz çalışmaları yapılmıştır.

Çalışma sürecinde üç adet kırmızı et ürünleri sığır, koyun ve tavuk türleri yönünden, her türe özgü primer ve prob setleri ve TaqMan qPCR yöntemi ile ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda et ürünlerinin Ct değerleri belirlenmiştir. Numunelerin tamamında sığır ve koyun türlerine ait Ct değerleri pozitif sonuç vermiştir. Sığır ve koyun türlerine ait ortalama Ct değerleri sırasıyla 13,25 ve 23,50 olarak hesaplanmıştır. Bu verilere göre, incelenen et ürünleri sucuklarda sığır et oranının daha fazla olduğu

belirlenmiştir. Buna karşın, tavuk özgü Ct analizleri tüm örneklerde negatif sonuçlanmıştır. Böylece ilgili et ürünlerinde tavuk et olgusunun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Analiz örneklerinin qPCR sonuçları kırmızı, sarı, turkuaz, kahverengi, zeytin yeşili ve koyu yeşil renkte gösterilmiştir. Analizler iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1-4.3).

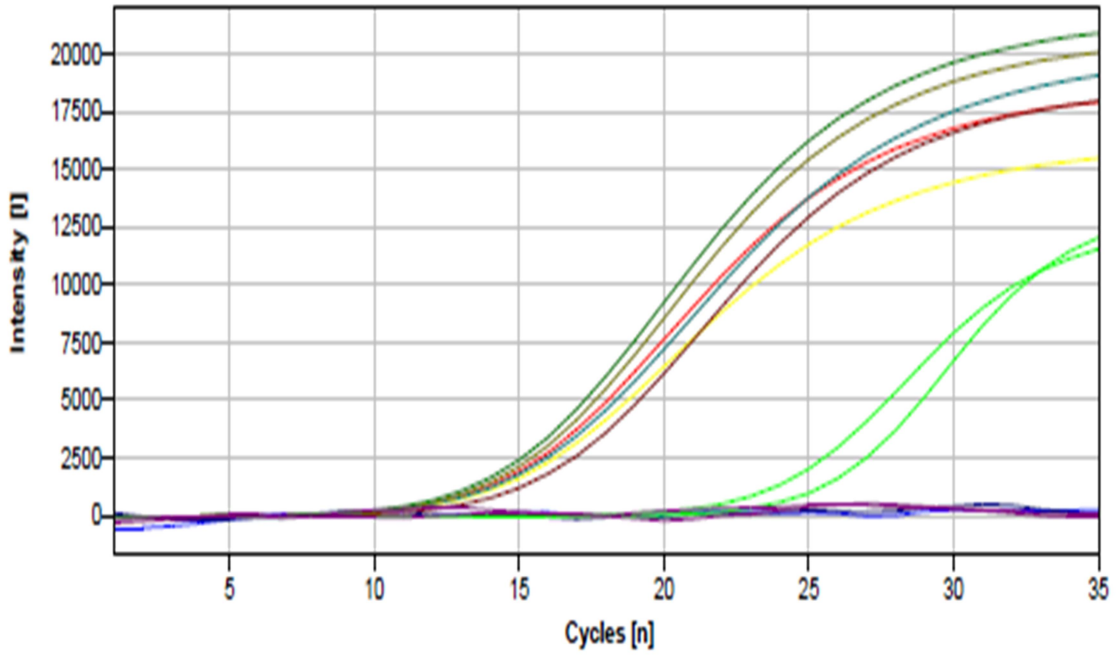
4.2 TaqMan qPCR Probe Yöntemi ile Özgünlük ve Tür Tespiti

Araştırma kapsamında, Ödemiş (İzmir) ilçesindeki kasaplardan alınan ve sığır ve koyun etinden üretildiği beyan edilen sucuk ürünlerden elde edilen DNA dan 10 ng kullanılarak %0,1 seviyesinde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Et ürünlerinin tür menşei için, Analytik-Jena patentli ticari test kitlerinin sığır, koyun ve tavuk türlerine ait saf referans DNA'larının yanısıra bu türlere özgü primerler 5'-carboxyfluorescein (FAM) ve 3'fluorescent quencher (HEX_3) floresan boyalarla işaretlenmiş prob setleri eşliğinde TaqMan qPCR yöntemiyle iki biyolojik tekrarlı analiz çalışması yapılmıştır.

Analiz sürecinde, sığır ve koyun türlerine özgü primerler ve memeliye özgü FAM probu kullanılarak elde edilen TaqMan qPCR grafikleri, analize tabi tutulan et ürünlerinin tamamında, sığır ve koyun türleri için pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.2-4.3/A3, B3, C3, D3, E3, F3). Buna karşın, incelenen üç et ürünlerinde tavuk özgü FAM probu kullanılarak elde edilen TaqMan qPCR analizinde pozitif bulguya rastlanılmamıştır (Çizelge 4.4/A3, B3, C3, D3, E3, F3). Fakat ticari kit standardı olarak işlev gören tavuk özgü FAM Pozitif Kontrol probu beklendiği üzere pozitif sinyal vermiştir (Çizelge 4.4/C4, D4). Bu verilerle, bahse konu et ürünlerinin sığır ve koyun eti menşei olduğu tespit edilmiştir.

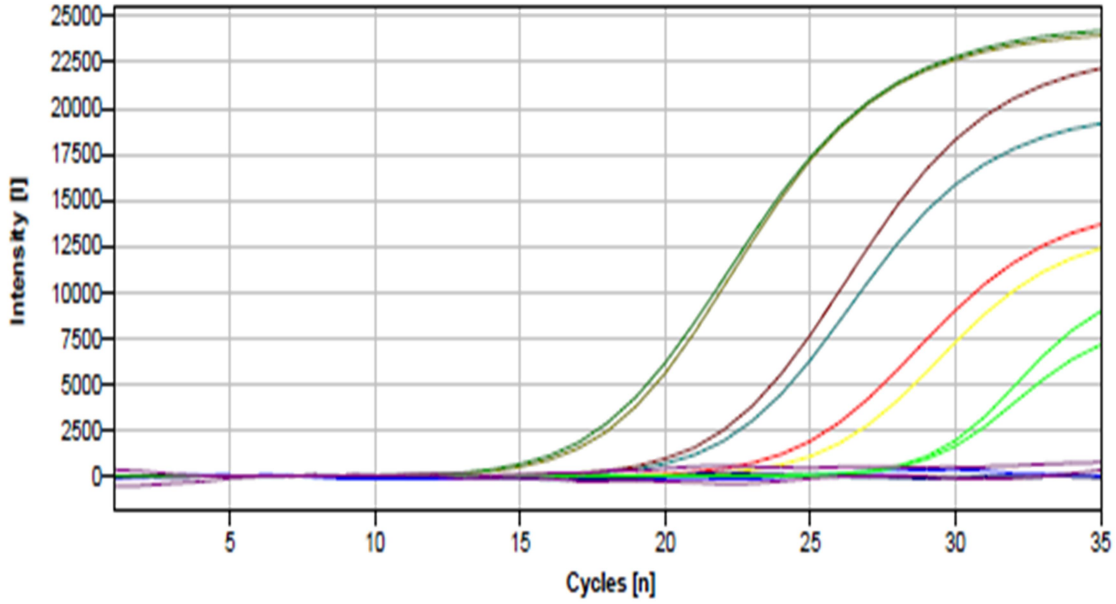
Çalışma sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği için, türlere özgü primer ve problarla TaqMan qPCR yöntemiyle, eş zamanlı olarak Analytik-Jena kit standartlı Pozitif Kontrol (PK) analizleri yapıldı ve pozitif sonuçlar alındı (Çizelge 4.2-4.4/C4, D4). Ayrıca yanlış negatif amplifikasyondan kaçınmak için; Ekstraksiyon negatif kontrol (ENK), Çevresel Kontrol (CK) ve Negatif Test Kontrol (NTC) ölçütleri kullanıldı ve beklendiği üzere tüm analizlerde negatif sonuçlar alındı (Çizelge 4.1-4.4/A4, B4, E4, G3, H3). Bu veriler, analiz sonuçlarının tam doğru ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

FAM



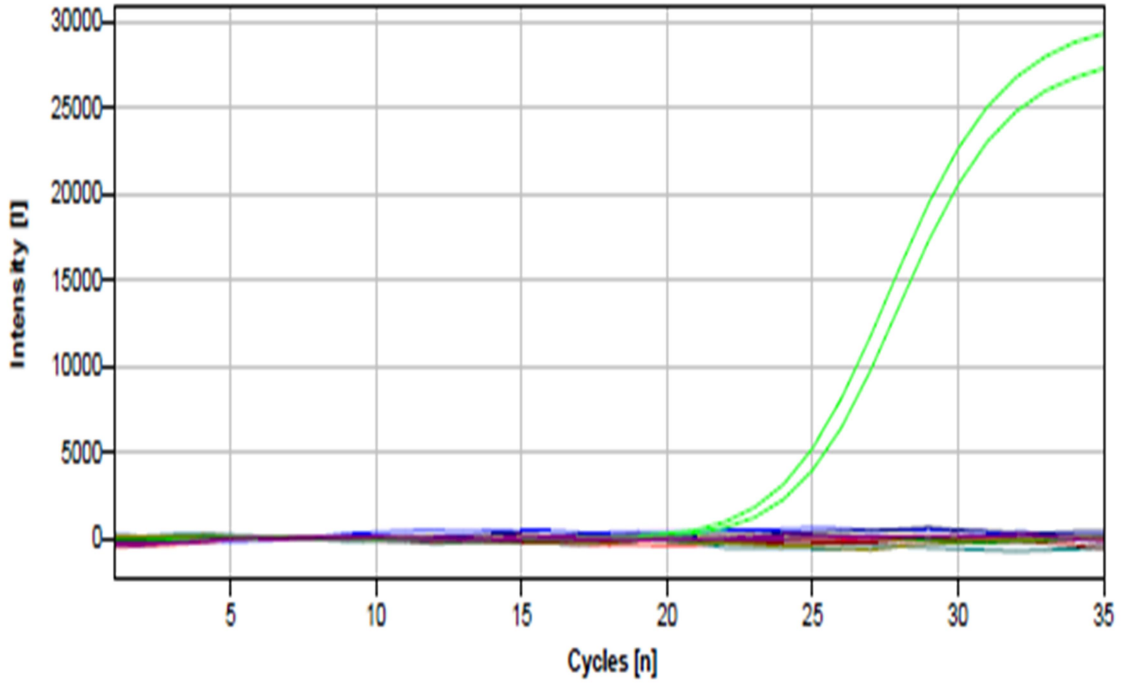
Şekil 4.1 Araştırma örneklerine ait sığır DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Sığır özgü FAM probu ile Cycle threshold (Ct) grafikleri.

FAM



Şekil 4.2 Araştırma örneklerine ait koyun DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Koyun özgü FAM probu ile Cycle threshold (Ct) grafikleri.

FAM



Şekil 4.3 Tavuk özgül FAM probuna ait tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR) Cycle threshold (Ct) grafikleri.

Çizelge 4.1 Araştırma örneklerine ait sığır, koyun ve tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), Cycle threshold (Ct) verileri.

Prob	Gen Cytb	Et Ürünü / Örnek No	Analiz No	C _T değerleri	Ortalama C _T değeri	Genel C _T değeri
FAM	Sığır	Sucuk /Odm-1	21950a	13,31	13,20	13,25
			21950b	13,09		
		Sucuk /Odm-2	21951a	13,45	13,96	
			21951b	14,47		
		Sucuk /Odm-3	21952a	13,12	12,96	
			21952b	12,80		
	Koyun	Sucuk /Odm-1	21950a	23,56	24,17	23,50
			21950b	24,78		
		Sucuk /Odm-2	21951a	20,64	20,35	
			21951b	20,07		
		Sucuk /Odm-3	21952a	16,17	15,95	
			21952b	15,73		
Tavuk	Sucuk /Odm-1	21950a	0,0	0,0	0,0	
		21950b	0,0			
	Sucuk /Odm-2	21951a	0,0	0,0		
		21951b	0,0			
	Sucuk /Odm-3	21952a	0,0	0,0		
		21952b	0,0			

Çizelge 4.2 Araştırma örneklerine ait sığır DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), Sığır özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.

Well		Sample name	Sample type	Dye	Gene	Ct
A1		21950a	U	HEX_3	IPC	No Ct
A1		21950a	U	FAM	SİĞİR	13,31
A2		ENK	U	HEX_3	IPC	20,78
A2		ENK	U	FAM	SİĞİR	No Ct
B1		21950b	U	HEX_3	IPC	No Ct
B1		21950b	U	FAM	SİĞİR	13,89
B2		CK	U	HEX_3	IPC	20,45
B2		CK	U	FAM	SİĞİR	No Ct
C1		21951a	U	HEX_3	IPC	No Ct
C1		21951a	U	FAM	SİĞİR	13,45
C2		PK	+	HEX_3	IPC	20,08
C2		PK	+	FAM	SİĞİR	23,29
D1		21951b	U	HEX_3	IPC	No Ct
D1		21951b	U	FAM	SİĞİR	14,47
D2		PK	+	HEX_3	IPC	20,15
D2		PK	+	FAM	SİĞİR	25,01
E1		21952a	U	HEX_3	IPC	No Ct
E1		21952a	U	FAM	SİĞİR	13,12
F1		21952b	U	HEX_3	IPC	No Ct
F1		21952b	U	FAM	SİĞİR	12,8
G1		NTC	N	HEX_3	IPC	20,54
G1		NTC	N	FAM	SİĞİR	No Ct
H1		NTC	N	HEX_3	IPC	20,72
H1		NTC	N	FAM	SİĞİR	No Ct

Çizelge 4.3 Araştırma örneklerine ait koyun DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), koyun özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.

Well		Sample name	Sample type	Dye	Gene	Ct
A5		21950a	U	HEX_3	IPC	21,44
A5		21950a	U	FAM	KOYUN	23,58
A8		ENK	U	HEX_3	IPC	21,04
A8		ENK	U	FAM	KOYUN	No Ct
B5		21950b	U	HEX_3	IPC	21,44
B5		21950b	U	FAM	KOYUN	24,78
B8		CK	U	HEX_3	IPC	21,69
B8		CK	U	FAM	KOYUN	No Ct
C5		21951a	U	HEX_3	IPC	21,4
C5		21951a	U	FAM	KOYUN	20,64
C8		PK	+	HEX_3	IPC	21,25
C8		PK	+	FAM	KOYUN	28,09
D5		21951b	U	HEX_3	IPC	21,24
D5		21951b	U	FAM	KOYUN	20,07
D8		PK	+	HEX_3	IPC	21,35
D8		PK	+	FAM	KOYUN	28,84
E5		21952a	U	HEX_3	IPC	22,01
E5		21952a	U	FAM	KOYUN	18,17
F5		21952b	U	HEX_3	IPC	No Ct
F5		21952b	U	FAM	KOYUN	15,73
G5		NTC	N	HEX_3	IPC	21,13
G5		NTC	N	FAM	KOYUN	No Ct
H5		NTC	N	HEX_3	IPC	20,91
H5		NTC	N	FAM	KOYUN	No Ct

Çizelge 4.4 Araştırma örneklerine ait tavuk DNA amplifikasyon ürünlerinin (PCR), tavuk özgü FAM ve HEX_3 (ITS) problemleri ile tür özgünlük testi sonuçları.

Well		Sample name	Sample type	Dye	Gene	Ct
A3		21050a	U	HEX_3	IPC	21,22
A3		21050a	U	FAM	TAVUK	No Ct
A4		ENK	U	HEX_3	IPC	20,65
A4		ENK	U	FAM	TAVUK	No Ct
B3		21050b	U	HEX_3	IPC	21,28
B3		21050b	U	FAM	TAVUK	No Ct
B4		CK	U	HEX_3	IPC	21,01
B4		CK	U	FAM	TAVUK	No Ct
C3		21051a	U	HEX_3	IPC	21,1
C3		21051a	U	FAM	TAVUK	No Ct
C4		PK	+	HEX_3	IPC	20,5
C4		PK	+	FAM	TAVUK	22,6
D3		21051b	U	HEX_3	IPC	20,7
D3		21051b	U	FAM	TAVUK	No Ct
D4		PK	+	HEX_3	IPC	20,62
D4		PK	+	FAM	TAVUK	22,04
E3		21052a	U	HEX_3	IPC	21,33
E3		21052a	U	FAM	TAVUK	No Ct
F3		21052b	U	HEX_3	IPC	21,42
F3		21052b	U	FAM	TAVUK	No Ct
G3		NTC	N	HEX_3	IPC	21,23
G3		NTC	N	FAM	TAVUK	No Ct
H3		NTC	N	HEX_3	IPC	21,09
H3		NTC	N	FAM	TAVUK	No Ct

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde et tağşişi vakaları arasında sosisler, burger köfteleri ve etli börekler gibi gıdalar yer almaktadır. Bunlar işlenmiş et ürünleridir ve ticari olarak raflarda mevcuttur. Orijinal fiziksel görünümleri büyük ölçüde değıştiğı için, laboratuvar testlerinin izlenmesi ve incelenmesi olmadan kökeninin bilinmesi neredeyse imkansızdır. Çeşitli işleme teknikleri et ürünlerinde hacim, görünüm, renk, doku, koku ve tat dahil olmak üzere ürünün pek çok duyuşal niteliklerini değıştirebilir, ve böylece et ürünlerinin fiziksel olarak ayırt edilmesini zorlaştırır (G'omez vd. 2020). Bu araştırmada, Ödemiş (İzmir) ilçesindeki ticari et ürünü satışı yapan kasaplardan alınan sucukların menşeleri DNA esaslı tanımlanmak üzere incelenmiştir.

Hayvansal proteine olan talebin artması ve tüketicilerin gıdanın bileşimi konusunda bilinçlenmesiyle birlikte, gıda kaynağının doğru bir şekilde tanımlanması zorunlu hale gelmiştir. Son yıllarda, et ürünlerinin tür tanımlaması için DNA tabanlı teknikler, diğer geleneksel tekniklerin yerini almıştır. DNA tabanlı yöntemlerin kullanılması, tespit özgüllüğünü ve tespit hassasiyetini artırmıştır. Et ürünlerinin menşeyini tanımlamak için hızlı, ucuz ve güvenilir tahlil yöntemlerinden biri TaqMan qPCR tekniğidir (Adenuga ve Montowska 2023). Bu çalışma kapsamında da, sucuk tipi et ürünlerinin menşeyini belirleme sürecinde TaqMan qPCR tekniğı uygulanmıştır.

Gerçek zamanlı qPCR tekniğı, hem özgüllük hem de duyarlılık açısından tür tanımlama konusunda çok güçlü bir tekniktir. Yöntemin özgüllüğü, birinci derece tasarlanmış primer ve probun özgüllüğü ile ilgilidir. Et ve et ürünlerinde PCR tekniğinin kullanıldığı önceki tür tanımlama çalışmalarında, türe özgü lokus bulundurması nedeniyle hedef bölge olarak genellikle mitokondriyal DNA seçilir. Mitokondriyal DNA üzerinde genel olarak, sitokrom b, D-loop, 12S rRNA ve 16S RNA genleri tür tanımlaması için kullanılır (Rodriguez vd. 2005). Mevcut bu çalışmada, Ödemiş (İzmir) ilçesindeki kasaplardan temin edilen ticari et ürünü sucukların menşeyleri tanımlanmak için sitokrom b gen lokusu için tasarlanmış olan türe özgü primerler kullanılmış ve başarılı sonuç alınmıştır. Çalışma sonucunda, et analizi yapılan sucukların sığır ve koyun eti menşeyli oldukları belirlenmiş, kanatlı et ürünü olgusuna ise rastlanılmamıştır.

TaqMan qPCR yöntemi ile araştırma örneklerine ait nükleik asit yükleri, düşük seviyelerde tespit edilebilmektedir. Rodriguez vd. (2005), mitokondriyal 12S rRNA üzerinden TaqMan prob sistemi kullanarak %0,1 (0,01 ng) nükleik asit miktarı ile tür tipini belirlemiştir. Chisholm vd. (2005), ticari ürünlerdeki at ve eşek türlerini sırasıyla 1 pg ve 25 pg seviyelerindeki nükleik asit miktarı ile tespit etmiştir. Mendoza-Romero vd. (2004), nükleer elementin 88 bp'lik parçalarını hedef alan bir gerçek zamanlı PZR tekniği ile sığır DNA'sını 10 fg ($=9.78 \times 10^5$ baz çifti) gibi düşük bir seviyede tespit etmiştir. Mevcut bu çalışmada, ticari kit içeriğindeki türlere özgü primer ve proplar (Analytik-Jena) eşliğinde TaqMan q-PCR yöntemiyle 0,01 ng seviyesinde nükleik asit miktarı ile tür menşei belirlenmiştir.

Döngü eşiği veya “Cycle threshold” (Ct), floresan sinyalinin, arka plan sinyalini aştığı ve dolayısıyla geçtiği termal döngü sayısıdır. Ct değeri, yüksek ya da düşük hedef nükleik asit yükünü ayırt etmeyi sağlayan semikantitatif bir değerdir. Ct değeri, örnek içindeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır (Rao vd. 2020). Ct değeri ne kadar düşüğe örnekteki hedef genetik materyalin miktarı o kadar yüksektir. Genellikle Ct değeri ≤ 33 olan sonuçlar pozitif olarak kabul edilmektedir (Demir-Önder vd. 2022). Mevcut bu araştırma kapsamında incelenen et ürünlerindeki sığır ve koyun türüne özgü Ct değerlerinin ortalamaları sırasıyla 13.25 ve 23.50 olarak hesaplanmıştır. Böylece elde edilen Ct değerleri < 33 sınır değerinin altında yer alarak, sonuçların güvenilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmada incelenen et ürünlerinde tavuk Ct değerinin negatif olması, inceleme materyali et ürünlerinin kırmızı et menşeli olduklarını göstermiştir.

Magleby vd. (2021), analiz ürünlerdeki nükleik asit yük değerlerini Ct < 25 “yüksek yük”, Ct=25-30 arasında “orta yük” ve Ct > 30 “düşük yük” olarak üç gruba ayırmıştır. Buna göre, Ödemiş (İzmir) ilçesindeki kasaplardan satın alınan ticari et ürünü sucuklardaki sığır Ct değeri yüksek yük niteliğinde iken, koyun Ct değeri, sığırdan daha düşük yük özelliğindedir. Bu veriler araştırma materyali et ürünlerinde sığır menşeinin daha fazla kullanıldığına işaret etmektedir. Buna göre, mevcut çalışmada elde edilen Ct < 25 “yüksek nükleik asit yük” değerleri, tür menşei analizi yapılan et ürünlerinin çoğunluğu sığır olmak üzere sığır ve koyun menşeli olduğunu güçlü bir şekilde desteklemiştir.

Sonuç olarak, bu araştırmada, Ödemiş (İzmir, Türkiye) ilçesindeki kasaplarda satılan ticari et ürünü sucukların etiketlerinde belirtildiği kapsamda, sığır ve koyun menşeli bigileri doğrulanmıştır. Dahası, bu çalışmada, standart özellikli analiz kitleleri yardımıyla, et ürünlerini meydana getiren her bir türün menşei, 0.01 ng gibi düşük yoğunlukta bile diğer türlerden kolaylıkla ayrıt edilebilmiştir. Ayrıca, halk sağlığını koruma kapsamında, et üretimi yapan işletmelerin güvenilirliğini iyileştirmek için, yerel otoritelerin daha geniş ölçekli araştırma ve denetim yapması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Adenuga B M, Montowska M, 2023, A systematic review of DNA-based methods in authentication of game and less common meat species, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22, 2112-2160.
- Alikord M, Momtaz H, Keramat J, Kadivar M, Rad A H, 2018, Species identification and animal authentication in meat products: a review, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 145-155.
- Ballin N Z, Vogensen F K, Karlsson A H, 2009, Species determination can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83, 165e174.
- Baur C, Teifel-Greding J, Liebhardt E, 1987, Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-Analyse, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 38, 172e174.
- Bellagamba F, Comincini S, Ferretti L, Valfre F, Moretti V M, 2006, Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals in animal meals and feedstuffs, *Journal of Food Protection*, 69(4), 891–896.
- Bodovitz S, Joos T, Bachmann J, 2005, Protein biochips: the calm before the storm, *Drug Discov Today* 4, 283–287.
- Chen S Y, Liu Y P, Yao Y G, 2010, Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12 S rRNA gene, *Journal of Genetics and Genomics*, 37, 763–769
- Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M, Monma M, 1994, Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats, *Meat Science*, 37, 337–345.
- Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H, 2005, The detection of horse and donkey using real-time PCR, *Meat Science*, 70, 727–732.
- Chou C C, Lin S P, Lee K M, Hsu C T, Vickroy T W, Zen J M, 2007, Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes, *Journal of Chromatography B*, 846, 230–239.
- Cunningham E P, Meghen, C M, 2001, Biological identification systems: Genetic markers, *Revue Scientifique et Technique*, 20, 491–499.

- Demir-Önder K, Seremet-Keskin A, Erman-Daloğlu A, Balcı U, Üser Ü, 2022, SARS-CoV-2 PCR Döngü Eşik (Ct) Değeri ile Klinik Seyir ve Mortalite İlişkisinin Değerlendirilmesi, *Klinik Dergisi*, 35, 126-132.
- Di Pinto A, Bottaro M, Bonerba E, Bozzo G, Ceci E, Marchetti P, vd., 2015, Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2479-2484.
- Dohno C, Nakatani K, 2011, Control of DNA hybridization by photoswitchable molecular glue, *Chemical Society Reviews*, 40, 5718e5729.
- Dooley J J, Paine K E, Garrett S D, Brown H M, 2004, Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays, *Meat Science*, 68, 431–438.
- Frezza, D, Giambra V, Chegiani F, Fontana C, Maccabiani G, Losio N, vd., 2008, Standard and light-cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feed, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 18–23.
- Gómez I, Janardhanan R, Ibanez F C, Beriain M J, 2020, The effects of processing and preservation technologies on meat quality: Sensory and Nutritional Aspects, *Foods*, 9, 1416.
- Garcia T, Martin R, Morales P, Haza A I, Gonzalez G A I, Sanz B, vd., 1994, Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 411–415.
- Giovannacci I, Guizard C, Carlier M, Duval V, Martin J L, Demeulemester C, 2004, Species identification of meat products by ELISA, *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 863–867.
- Girish P S, Anjaneyulu A S R, Viswas K N, Shivakumar B M, Anand M, Patel M, vd., 2005, Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Sci*, 70(1), 107–112.
- Guoli Z, Mingguang Z, Zhijiang Z, Hongsheng O, Qiang L, 1999, Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef, *Meat Science*, 51, 233–236.
- Hagelberg E, Goldman N, Lio P, Whelan S, Sciefenhovel W, Clegg J B, vd., 1999, Evidence of mitochondrial recombination in a human population of island

- Melanesia, Proceedings of the Royal Society of London, 266, 485–492.
- Hui Y H, Sherkat F, 2006, Department of Nutrition, Food and Exercise Sciences: Florida State University, 531–550.
- Iijima K A Z U, Suzuki K O J I, Ozaki K A Z U, Kuriyama H I D E, Kitagawa Y A S U, Yamashita H I R O, 2006, DNA analysis for identification of food-associated foreign substances, *Journal of Food Quality*, 29, 531–542.
- Imaizumi K, Akutsu T, Miyasaka S, Yoshino M, 2007, Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA, *International Journal of Legal Medicine*, 121, 184–191.
- Jakes W, Gerdova A, Defernez M, Watson A D, McCallum C, Limer E, vd., 2015, Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz ¹H NMR spectroscopy, *Food Chemistry*, 175, 1–9
- Kim M, Yoo I, Lee S Y, Hong Y, Kim H Y, 2016, Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region, *Food Chemistry*, 210, 102–106.
- Kumar A, Kumar R R, Sharma B D, Gokulakrishnan P, Mendiratta S K, Sharma D, 2015, Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1340-1351.
- Laube I, Zagon J, Broll H, 2007, Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR, *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 336–341.
- Lockley A K, Bardsley R G, 2000, DNA-based methods for food authentication, *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67–77.
- Lopez-Andreo M, Garrido-Pertierra A, Puyet A, 2006, Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7973–7978.
- Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto M I, Puyet A, 2005, Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.
- Magleby R, Westblade L F, Trzebucki A, vd., 2021, Impact of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load on risk of intubation and mortality among

- hospitalized patients with coronavirus disease 2019, *Clinical Infectious Diseases*, 73, e4197-e4205.
- Mane B G, Mendiratta S K, Tiwari A K, 2009, Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat products, *Food Chem*, 116(3), 806–810.
- Martinez I, Jakobsen Friis T, Seppola M, 2001, Requirements for the application of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analyses to product speciation, *Electrophoresis*, 22, 1526–1533 (2001).
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, vd., 1999, A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, *Meat Sci*, 51(2), 143–148.
- Mendoza-Romero L, Verkaar E L C, Savelkoul P H, Catsburg A, Aarts H J M, Buntjer J B, vd., 2004, Real-time PCR detection of ruminant DNA, *Journal of Food Protection*, 67(3), 550–554.
- Meyer R, Canadrian U, Luethy J, 1994, Detection of pork in heated meat products By The Polymerase Chain Reaction, *Journal of Aoac International*, 77, 617–622.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn R G, Erlich H, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(1), 63–273.
- Murugaiah C, Noor Z M, Mastakim M, Bilung L M, Selamat J, Radu S, 2009, Meat species identification and halal authentication analysis using mitochondrial DNA, *Meat Sci*, 83(1), 57–61.
- Myers M J, Yancy H F, Farrell D E, 2003, Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed, *Journal of Food Protection*, 66, 1085–1089.
- Nakyinsige K, Man Y B C, Sazili A Q, 2012, Halal authenticity issues in meat and meat products, *Meat Science*, 91, 207e214.
- Pegels N, González I, Martín I, Rojas M, Garcia T, Martin R, 2011, Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs, *Food Control*, 22, 1189–1196.
- Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, Herrmann J, Hindson B J, Bhat S, vd., 2012, Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA

- copy number quantification, *Journal of Analytical Chemistry*, 84, 1003–1011.
- Rao S N, Manissero D, Steele V R, vd., 2020, A systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19, *Infectious Diseases and Therapy*, 9, 573-586.
- Rastogi G, Dharne M S, Walujkar S, Kumar A, Patole M S, Shouche Y S, 2007, Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers, *Meat Sci*, 76(4), 666–674.
- Rodríguez M A, García T, González I, Hernández P E, Martín R, 2005, TaqMan real-time PCR for detection and quantitation of pork in meat mixtures, *Meat Science*, 70, 113–120.
- Rodríguez M A, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Mayoral B, Lopez-Calleja I, vd., 2003, Identification of goose, mule duck, chicken, turkey and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1524–1529.
- Rodríguez M A, García T, González I, Hernández P E, Martín R, 2005, TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures, *Meat Science*, 70(1), 113-120.
- Saez R, Sanz Y, Toldra F, 2004, PCR based techniques for rapid detection of animal species in meat products, *Meat Sci*, 66(30), 659–665.
- Sassolas A, Leca-Bouvier B D, Blum L J, 2008, DNA biosensors and microarrays, *Chemical Reviews*, 108, 109e139.
- Schonherr J, 2002, Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1945–1950.
- Skarpeid H J, Kraal K, Hildrum K I, 1998, Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles, *Electrophoresis*, 19, 3103–3109.
- Sun Y L, Lin C S, 2003, Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCRRFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1771–1776.
- Tranchida P Q, Dugo P, Dugo G, Mondello L, 2004, Comprehensive two-dimensional

- chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 1054, 3–16.
- Walker J A, Hughes D A, Hedges D J, Anders B A, Laborde M E, Shewale J, vd., 2004, Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements, *Genomics*, 83, 518–527.
- Wang W, Wang X, Zhang Q, Liu Z, Zhou X, Liu B, 2020, A multiplex PCR method for detection of five animal species in processed meat products using novel species-specific nuclear DNA sequences, *European Food Research and Technology*, 246, 1351-1360.
- Xing R R, Wang N, Hu R R, Zhang J K, Han J X, Chen Y, 2019, Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach, *Food Control*, 101, 173-179.
- Yin R H, Bai W L, Wang J M, Wu C D, Dou Q L, Yin R L, vd., 2009, Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique, *Meat Sci*, 83, 38–44.
- Zamora-Rojas E, Pérez-Marín D, Pedro-Sanz E D, Guerrero-Ginel J E, Garrido-Varo A, 2012, Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 114, 30–35
- Zhang C L, Fowler M R, Scott N W, Lawson G, Slater A, 2007, A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses, *Food control*, 18, 1149-1158.
- Zhang X, Armani A, Giusti A, Wen J, Fan S, Ying X, 2021, Molecular authentication of crocodile dried food products (meat and feet) and skin sold on the Chinese market: Implication for the European market in the light of the new legislation on reptile meat, *Food Control*, 124, 107884.

İnternet Kaynakları (İnt. Kyn.)

- 1) <https://www.analytik-jena.com/>,19.08.2024