

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’ DE SATIŞA SUNULAN BAZI GIDA ÜRÜNLERİNDE GENETİK
MODİFİYE MISIR BİLEŞENLERİNİN ARANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşe Işıl ÇAKMAK**

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

KASIM 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’ DE SATIŞA SUNULAN BAZI GIDA ÜRÜNLERİNDE GENETİK
MODİFİYE MISIR BİLEŞENLERİNİN ARANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşe Işıl ÇAKMAK
(506061511)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05 Ekim 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 21 Ekim 2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Dilek BOYACIOĞLU (İTÜ)
Yrd. Doç. Dr. Alper Tunga AKARSUBAŞI
(İTÜ)

KASIM 2010

Anneme, Kardeşime ve Stephen' a,

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanması aşamasında, pek çok insan katkısını ve desteğini benden esirgemedi ve bu zorlu yolculukta yanımda olduklarını hissettirdi. Ancak bu insanlar arasında, öncelikle bu konuyu araştırmam konusunda beni teşvik eden, cesaretlendiren ve yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK ve bu çalışmayı gerçekleştirmem için rehberliğini ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Alper Tunga AKARSUBAŞI en büyük paya sahip...

İkinci olarak, laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve teknik desteğiyle beni yalnız bırakmayan arkadaşım Mert KUMRU' ya ve yardımlarından dolayı Hilal EREN' e, Sefa ULUTAŞ'a, Halil KURT' a, Fahrettin HACZEYNİ' ye ve Mine GÜLTEKİN ÖZGÜVEN' e teşekkür ederim.

Son olarak, en büyük teşekkürlerimi, çalışmalarım süresince bana gösterdiği anlayıştan ötürü değerli amirim Eyüp İlçe Tarım Müdürü Sayın Rahim GEZER' e, desteklerinden ötürü çalışma arkadaşlarıma;

Her zaman bana güç veren Annem, Anneannem ve Kardeşime;

Beni zorluklar karşısında yılmamam konusunda sürekli teşvik eden sevgili dostum Gizem'e;

En son ve en önemlisi, çalışmalarım boyunca sabrı, desteği, gösterdiği anlayış ve sevgisi için sevgili Stephen'a sunuyorum.

Bu çalışma M.O.B.G.A.M. (İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)' de, Yrd. Doç. Dr. Alper Tunga AKARSUBAŞI' nın desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Kasım 2010

Ayşe Işıl ÇAKMAK
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	2
1.2 Hipotez.....	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Genetik Modifiye Organizmalar.....	5
2.2 GMO' ların Tarihsel Gelişimi ve Dünyadaki Durumu.....	6
2.3 GMO' lar ile GM Gıdalar Hakkındaki Yasal Düzenlemeler.....	7
2.3.1 Avrupa Birliği' ndeki yasal düzenlemeler.....	7
2.3.2 ABD' deki yasal düzenlemeler.....	8
2.3.3 Japonya' daki yasal düzenlemeler.....	8
2.3.4 Türkiye' deki yasal düzenlemeler.....	9
2.4 Genetik Modifikasyon Prosesi.....	11
2.4.1 Transgenin eklenmesi.....	11
2.5 Gıdalarda GMO' ların Tespit Edilmesi.....	12
2.5.1 Numunenin alınması.....	12
2.5.2 GMO testi için kullanılan referans materyaller.....	13
2.5.3 GMO için kullanılan tayin yöntemleri.....	14
2.5.3.1 Protein bazlı test metotları.....	14
2.5.3.2 DNA bazlı test metotları.....	17
2.5.3.3 Protein ve DNA bazlı metotların karşılaştırılması.....	21
2.6 PCR' ın çalışma prensibi.....	21
2.6.1 Tespit etme ve miktar belirleme limitleri.....	23
2.6.2 Numune hazırlama.....	24
2.6.3 Matrise özel etkiler ve DNA' nın ekstraksiyonu.....	24
2.6.4 DNA izolasyon metotları.....	25
2.6.5 PCR testleri.....	25
3. MATERYAL VE METOT.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.1.1 Örnekler.....	27
3.1.2 Primerler.....	28

3.1.3 Kullanılan ekipmanlar, kimyasallar ve çözelti ve tamponlar.....	30
3.2 Metot.....	30
3.2.1 Örnek hazırlama.....	30
3.2.2 DNA ekstraksiyonu(izolasyonu).....	30
3.2.2.1 CTAB ekstraksiyon metodu.....	30
3.2.2.2 GMO numune hazırlama kiti ile izolasyon.....	31
3.2.3 Agaroz jel elektroforez.....	33
3.2.4 Kalitatif PCR.....	35
3.2.5 Agaroz jel elektroforez.....	37
3.2.6 Real-time PCR.....	37
3.2.6.1 Real-time PCR için kullanılan ajanlar.....	38
3.2.6.2 PCR karışımlarının hazırlanması.....	38
3.2.7 Belli bazı GMO'ların PCR' la numunelerde aranması.....	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1 DNA Ekstraksiyonu.....	41
4.1.1 CTAB metodu ile DNA ekstraksiyonu.....	41
4.1.1.1 Bebek gıdaları için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları.....	41
4.1.1.2 Diğer gıdalar için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları.....	42
4.1.2 Test kiti ile DNA ekstraksiyonu.....	44
4.2 DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerin GDO' lu Olup Olmadığının Belirlenmesi.....	47
4.2.1 Örneklerin 35S promotör ve NOS terminatör ile taranması.....	47
4.2.2 Genetiği değiştirilmiş organizmalarda GMO çeşidi belirleme...	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	59
EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	73

KISALTMALAR

BM	: Birleşmiş Milletler
Bt	: Bacillus thuringiensis
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus
CE	: Capillary Electrophoresis
CTP	: Cell Transit Peptid
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EC	: European Commission
EFSA	: European Food Safety Authority
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EPA	: Environmental Protection Agency
EPSPS	: 5-enolpiruvil-shikimate-3-phosphate sentaz
FAO	: Food and Agriculture Organization of United Nations
FDA	: Food and Drug Administration
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GM	: Genetik Modifiye
GMO	: Genetik Modifiye Organizma
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IgE	: Immunoglobülin E
ILSI	: The International Life Sciences Institute
LOD	: Limit Of Detection
mRNA	: Messenger Ribo Nükleik Asit
NOS	: Nopalın sentaz
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RRS	: RoundupReadySoybean
Sh	: Streptomyces hygroscopicus
Sv	: Streptomyces viridochromogens
UK ACRE	: UK Advisory Committee on Releases into the Environment
WHO	: World Health Organization

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1: Farklı ülkelerin GM gıdaların etiketlenmesi uygulamaları.....	7
Çizelge 2. 2: GM ürünler tarafından üretilen rDNA tespit metotlarının karşılaştırılması	21
Çizelge 3. 1: Analiz edilen örnekler.....	27
Çizelge 3. 2: PCR’ da kullanılan primer dizilimleri.....	29
Çizelge 3. 3: Çalışmada kullanılan genetik modifiye mısır genlerinin DNA dizilerine göre PCR programları.....	36
Çizelge 3. 4: Real-time PCR reaksiyonu için karışım miktarları.....	39
Çizelge 3. 5: Real-time PCR cycle sonuçlarının değerlendirilmesi.....	40
Çizelge 4. 1: İzolasyon sonuçlarının ürünlere göre karşılaştırılması	46
Çizelge 4. 2: Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin NOS terminatör ve bitki geni varlığı için pik başlangıç döngü değerleri...	49
Çizelge 4. 3: Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin pik başlangıç döngü değerleri.....	50
Çizelge 4. 4: Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin 35S promotör ve bitki geni varlığı için pik başlangıç döngü değerleri.....	52
Çizelge 4. 5: 35S ve/veya NOS hedef dizilerinin tespit edildiği örnekler.....	54
Çizelge C.1: α -Amilaz çözeltisi.....	71
Çizelge C.2: CTAB ekstraksiyon tamponu (EN ISO 21571:2005).....	71
Çizelge C.3: CTAB çöktürme tamponu (EN ISO 21571:2005).....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 3: Yanal akış bandı testinin yanal olarak şematik anlatımı.....	16
Şekil 2. 4: GMO içeren ependorflara batırılmış test bantlarının dikey görünüşü; negatif ve pozitif test sonuçları	17
Şekil 2. 3: 35S promotör ve CTP dizisi arasında köprü kurmaları için seçilen iki set primeri kullanan nested PCR metodunun şematik gösterimi.....	19
Şekil 2. 4: PCR’ da DNA amplifikasyonunun prensibi.....	22
Şekil 2. 5: PCR’ ın sıcaklık/zaman diyagramı.....	22
Şekil 2. 6: Gıdada soya DNA’sının belirlenmesinde uygulanan stratejini şematik sunumu.....	23
Şekil 3. 5: Filtre tüpü ve toplama tüpünden oluşan takım.....	32
Şekil 3. 6: Çalışmada kullanılan jel elektroforez hücresi.....	34
Şekil 3. 7: Çalışmada kullanılan görüntüleme ve kayıt cihazı.....	34
Şekil 3. 8: Çalışmada kullanılan PCR cihazı.....	35
Şekil 3. 5: PCR’ da amplifikasyonun programlanması.....	35
Şekil 3. 6: Çalışmada kullanılan LightCycler® 480 II.....	37
Şekil 3. 7: Reaksiyonların gerçekleştiği kuyucuklar.....	39
Şekil 4. 5: Bebek gıdaları için CTAB’ la ekstraksiyon sonuçları.....	41
Şekil 4. 6: Diğer örnekler için CTAB’ la ekstraksiyon sonuçları a).....	42
Şekil 4. 7: Diğer örnekler için CTAB’ la ekstraksiyon sonuçları b).....	42
Şekil 4. 8: ZEO1/ZEO2 [329 bp].....	43
Şekil 4. 5: Cry03/Cry04 [211 bp].....	43
Şekil 4. 6: Ticari test kiti ile ekstraksiyon sonuçları.....	44
Şekil 4. 7: Ticari test kiti ile ekstraksiyon sonuçları.....	45
Şekil 4. 8: Jel görüntüsü	47
Şekil 4. 9: Çizelge 4.2’deki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ısıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.....	50
Şekil 4.10: Çizelge 4.2’ de pozitif sonuç veren numune pikleri.....	51
Şekil 4.11: Çizelge 4.4’teki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ısıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.....	52
Şekil 4.12: Çizelge 4.2’deki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ısıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.....	53
Şekil 4.13: PCR sonuçları a).....	55
Şekil 4.14: PCR sonuçları b).....	55

TÜRKİYE’ DE SATIŞA SUNULAN BAZI GIDA ÜRÜNLERİNDE GENETİK MODİFİYE MISIR BİLEŞENLERİNİN ARANMASI

ÖZET

Son zamanlarda durmadan yeni genetik modifiye bitki ve mahsullerin geliştiriliyor olması ve dünya üstünde genetik modifiye bitkilerin ekili olduğu alanların giderek artması, son on yılda genetik modifiye gıda ürünleri tüketiminin yükselen bir profil çizmesine neden olmaktadır. Diğer taraftan, bu ürünlerin artan tüketim miktarı ile birlikte hem bilim hem de tüketici çevresinde bu tip ürünlerin insan sağlığı üstünde muhtemel yan etkileri olabileceği endişesi ortaya çıkmakta; bu nedenle de bu konuyla ilgili araştırmalar bilimsel arenada büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde de bu tip ürünlerin yıllardır tüketildiği bilinci yeni oluşmakta ve diğer ülkelerde süregelen tartışmalar Türkiye’de de ortaya atılmaktadır. Diğer taraftan bu konu ülkemizde mevzuat bakımından da ele alınmış ve gerekli düzenlemelerin yapılması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmanın amacı, piyasadan toplanan gıda ürünlerinde genetik modifiye mısır içeriğinin kalitatif olarak belirlenmesidir. Bu amaçla, analizlenmek üzere, çeşitli büyük, orta ve küçük ölçekteki marketlerden özellikle içerisinde mısır türevleri olduğu etiketlerinde beyan edilmiş olan gıda ürünleri satın alınmıştır. Analiz edilen ürünler arasında bebek gıdaları (devam mamaları, ek besinler, vs.), konserve mısır, mısır nişastası ve mısır unu, mısır cipsleri, mısır gevrekleri, çeşitli toz tatlılar ve mısır çerezleri yer almaktadır. Primerlerin seçimi Avrupa Birliği’nin onayladığı mısıra ilişkin GMO listesi ile yurdumuzda girişine izin verilen GMO’ lar dikkate alınarak yapılmıştır. Ayrıca seçilmiş olan bu genler dünyada en yaygın olarak kullanıldığı literatür çalışmalarından tespit edilen genlerdir. Analizlerde ekstraksiyon metodu olarak, CTAB metodu ve ticari test kiti kullanılmış ve bu metotların verimleri karşılaştırılmıştır. DNA ekstraktları Real-time PCR da amplifikasyon işlemine tabi tutularak, mısıra özgü *zein geni* ile bitkisel gıdalarda GMO’ ların varlığını gösteren NOS terminatörü ve 35S promotörün varlığı taranmıştır. Ürünlerdeki genetik modifiye mısır bileşeninin varlığı kalitatif olarak ifade edilmiştir. Buna göre 51 üründen 8’ inin genetik modifiye mısır bileşeni içerdiği tespit edilmiştir. Son olarak ise genetik modifiye olduğu belirlenen örneklerde Bt11, Bt176, MON810 ve T25 mısır genlerinin varlığı aranmış ve örneklerde bu genler tespit edilmemiştir.

Bu çalışma Türkiye piyasasında sıkça tüketilen mevcut ürünler üzerinde yapılan bir tarama çalışması niteliğindedir.

SEARCHING FOR GENETICALLY MODIFIED MAIZE COMPONENTS IN SOME OF THE FOOD PRODUCTS WHICH ARE PUT ON THE MARKET IN TURKEY

SUMMARY

Development of newly genetically modified plants and crops and an ever-increasing amount of cultivated fields of genetically modified plants on the world are causing a rising profile of genetically modified food consumption within the last decade. On the other hand, with the increasing consumption amount of these products, concerns of possible side effects of these products on human health is emerging in the environment of scientists and consumers; for this reason issue-relevant researches have big importance in the scientific arena.

The consciousness of that we have been consuming these products for years is newly emerging in our country and discussions in this topic have been held in other countries and have recently come up in Turkey too. On the other hand, this issue was addressed with regard to regulations in our country and studies for preparing the necessary legislations are still proceeding.

The aim of this study is performing the qualitative detection of genetically modified maize content of food products which were gathered from the market. For this purpose, in order to analyze food products, especially stating that they contain maize derivatives on their labels, were bought from various big, medium and small scaled markets. Baby foods (follow-on formulas, supplementary foods, etc.), canned corn, corn starch and flour, corn crisps, corn flakes, miscellaneous powder desserts and snacks are taking place in the products which were analyzed. Selection of the primers was done according to GM maize list approved by the European Union and GMOs which are allowed to enter in our country. Furthermore, these selected genes are the genes which were determined as the most common genes, has been used in the literature studies. In the analyses, CTAB and commercial test kit were used as the extraction method and efficiencies of these methods were compared. By amplifying DNA extracts in Real-time PCR, the presence of maize-specific zein gene and the presence of NOS terminator and 35S promoter which are the indicators of GMOs in plant foods were scanned. The presence of genetically modified maize component in the products was expressed qualitatively. According to this, it is detected that, 8 of 51 products are including genetically modified maize components. Ultimately, presence of Bt11, Bt176, MON810 and T25 maize genes in the samples, which were detected as genetically modified, was scanned and those genes were not found in the samples.

This study has the feature of being a detection study over the present products which are consumed often in Turkey market.

1. GİRİŞ

Genetik modifiye organizmalar başta genetik mühendisliği olmak üzere değişik bilimsel teknikler kullanarak istenilen spesifik bir özelliğe sahip gen veya genlerin ilişkili veya ilişkili olmayan türlerden, bitki, hayvan ve mikroorganizmalara transfer edilerek kalıtsal olarak bir sonraki nesle aktarılmasıyla elde edilmektedir (Eede ve diğ., 2004; Japonya Gıda Güvenliği Komisyonu, 2004). Genetik modifikasyona duyulan ihtiyacı doğuran belli başlı bazı nedenler vardır; bunlar, iklimsel değişiklikler, tarımsal alanların yok edilmesi ve bilinçsiz tarımsal uygulamalar nedeniyle tarımsal alanların giderek azalması ve bunun sonucunda da yüksek verimli tarımsal ürünlere ihtiyaç duyulması ve yine buna bağlı olarak dünyanın bazı bölgelerinde açlığın giderek artması, insektisit, herbisit gibi kimyasalların çevreye olumsuz etkileri, dengesiz ve yetersiz beslenme nedeniyle besinsel değeri arttırılmış gıdalara ihtiyaç duyulması ve tarımsal ürünlerin bilinçsiz ilaçlanması nedeniyle kronik hastalıkların ve kanserin artması şeklinde sıralanabilir. Bu ihtiyaçlara yönelik olarak, bitkisel ürünlerin genetik modifikasyonu genellikle kalite, fonksiyon ve üretimlerine ilişkin değişiklikleri amaçlamaktadır (Pech ve diğ., 2005). Genetik modifiye bitkisel ürünlerin çoğu herbisit, virüs, haşere ve hastalıklara karşı bağışıklığa sahip olacak şekilde değişikliğe uğratılmıştır.

Transgenik bitkisel ürünler 1990'lı yılların ortasından itibaren ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. GDO'ların en çok üretildiği ülkeler ise ABD, Arjantin, Kanada ve Çin'dir. Başlıca genetik modifiye ürünler arasında soya fasulyesi, mısır, pamuk ve kanola yer almaktadır. GDO'lu ürünlerin tüketimi global olarak hızla artmaktadır (Williams ve diğ., 2005).

GMO'lu gıda ürünlerinin tüketimindeki artışla beraber çeşitli riskler ve endişeler de ortaya çıkmıştır. Gıda kalitesindeki değişiklikler, antibiyotiklere karşı vücudun direnç geliştirmesi, potansiyel alerjenite ve toksisite, diğer bitkilere istek dışı gen aktarımı, muhtemel yeni virüs ve toksin oluşumu, kontaminasyon yoluyla genetik zenginliğe tehdit oluşturulması, dinsel, kültürel, etik endişeler, etiketleme eksikliğine

ilişkin endişeler, organik ve geleneksel üretim yapanların endişeleri, konuyla ilgili tüketici ve üreticilerdeki bilgi eksikliğinin yaratabileceği sonuçlar, genin, bakteri veya memeli hücrelerine transferi bunların arasında sayılabilir. Diğer taraftan genetik mühendislikteki gelişmelerle her geçen gün yeni genetik modifiye ürünler geliştirilmektedir; bunların analizlenmesi, piyasa takibinin yapılması, muhtemel faydalarının ve risklerinin araştırılması ve elde edilen sonuçlarla tüketicilerin konu hakkında bilinç düzeyinin artırılması gereği ilerki çalışmaların rotasını belirlemektedir (Engeseth, 2000).

1.1 Tezin Amacı

Mısır, ülkemiz ekonomisi ve beslenme yönünden en önemli tarımsal ürünlerdendir ve günümüzde büyük oranda yurtdışından ithal edilmektedir. Ülkemizde hem taze, konserve ve dondurulmuş olarak, hem de işlenmiş ürün halinde (mısır unu, nişastası, mısır şurubu, cips, kahvaltılık gevrek, çerezler vs.) çeşitli şekillerde tüketilmekte, özellikle bebek mamaları olmak üzere kompleks gıdaların (toz tatlılar, bisküviler, atıştırmalıklar, vs.) ve proseslerin vazgeçilmez katkı maddelerinden biri olarak kullanılmaktadır. Mısır, farklı çeşitlerden değişik yöntemlerle işlenerek tüketiciye ulaştırılmaktadır.

Bu çalışmadaki amaç; Türkiye’de piyasada yaygın olarak satılan ve tüketilen mısır ve mısır ürünlerinin, ayrıca mısır türevlerinin katkı maddesi olarak kullanıldığı gıda ürünlerinde mısır kaynaklı genetik modifiye organizmaların var olup olmadığının belirlenmesi ve Türkiye’ de tüketimi popüler ya da yaygın olan belli başlı ürünler için bir piyasa taraması yapılmasıdır. Yapılan bu tarama çalışmasından, ülkemizde yaygın bir şekilde tüketilen mısır içerikli veya bileşenli ürün gruplarından hangilerinin genetik modifiye özellik taşıdığı hakkında yaklaşık olarak bir fikir sahip olunması, mısır içeren değişik gıda ürünleri için iki farklı DNA izolasyon yönteminin karşılaştırılması ve Türk Gıda Mevzuatı çerçevesinde ülkemize girmesine/yetiştirilmesine izin verilen belli başlı genetik modifiye organizmalardan MON810, Bt11, Bt176 ve T25 Starlink’in ürünlerimizde aranması ve literatüre bu konuyla ilgili bilgi sağlanması beklenmektedir. Böylece yeni yayınlanan ‘Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar Ve Ürünlerine Dair Yönetmelik’ e uyum aşamasına da katkıda bulunulabilecektir.

1.2 Hipotez

Çalışma sonucunda, mısır ve mısır türevi ürünlerde gerçekleştirilecek olan genetik modifiye organizma taramasında dünya literatüründe çalışılmış mısır örnekleri ile paralellik yakalanacağı, farklı yörelerde ve ülkelerde yetiştirilerek ülkemizde tüketime sunulan mısır ürünleri ve mısır türevlerinin katkı maddesi olarak kullanıldığı kompleks ürünlerde GMO'ların (genetik modifiye organizma) tespit edilebileceğine, sonuçlar birbirleriyle mukayese edildiğinde gıda ürünlerinin farklı Genetik Modifikasyon profillerine ve GMO türlerine sahip olabileceklerine yönelik sonuçlar beklenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Genetik Modifiye Organizmalar

Bir organizmanın modifiye edilmesi demek, o organizmaya ait genetik materyale ekleme ya da çıkarma yapılması veya genetik materyalin bir parçasının modifiye edilmesi demektir (Holst-Jensen, 2003).

Genetik modifiye organizmalar Cisgenesis veya Transgenesis proseslerinden biri kullanılarak, DNA'larına yapılan spesifik bazı değişiklikler sonucu oluşturulmaktadırlar. Bu teknikler, mutasyonla çoğalmaya (mutagenesis) göre daha kesin sonuçlar verirler. Mutagenesiste, organizmalar radyasyon veya kimyasallara maruz bırakılarak spesifik olmayan ancak stabil olan değişiklikler yaratılmaktadır. Diğer taraftan cisgenesisin geleneksel çoğaltmaya karşı avantajı, yeni tür bitkilerin daha hızlı ve ucuz üretilmesine ve istenmeyen kromozomların değil yalnızca seçilen faydalı genlerin transferine imkan vermesidir. Geleneksel üremede yeni bir kültür elde edebilmek için her biri aylar süren çoklu melezleme işlemi(backcross) yapılmak zorundadır. Cisgenesiste ise aynı sonuca çok kısa bir zamanda ulaşılabilir ancak genler sadece akraba organizmalar arasında transfer edilmektedir. Transgenesiste gıdaların genetik modifikasyonu bir veya daha fazla genin bitkinin alıcı genomuna in vitro olarak yerleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir ve ayrıca bütünsel genler akraba genotiplerden olduğu kadar akraba olmayan genotiplerden de elde edilebilmektedir. Bu iki metodun geleneksel yöntemle göre avantajları transfer edilecek genin kontrol edilebilmesi, trans-gen ekspresyonu seviyesi ve zamanının ayarlanabilmesi veya genlerin baskılanmasıyla oluşabilecek istenmeyen özelliklerin elimine edilebilmesi şeklinde sıralanabilir (Holst-Jensen, 2003). Genetik modifiye ürünler ise bağlanan yeni gen(lerin) kodladığı ilave özellikleri taşırlar; bu genellikle ilgili özelliği getiren ilave protein(lerin) çoğaltılmasıyla gerçekleştirilir (Ahmed, 2002).

2.2 GMO' ların Tarihsel Gelişimi ve Dünyadaki Durumu

Günümüzde tarımsal biyoteknoloji ürünlerinin çeşitliliği ve miktarı dünya piyasasında ortak bir artış göstermektedir. Bunun temel nedenleri, genetik modifiye gıdaların herbisitlere karşı dayanıklılık, hastalık ve haşerelere karşı dirençlilik ve geliştirilmiş besin içeriği gibi hem insan sağlığı yönünden hem de agronomik yönden gelişmiş olmalarıdır; sahip oldukları özelliklere göre GM ekinlerin dağılımı Şekil 2.2' de gösterilmiştir. Biyoteknoloji ile türetilen ekinlerin % 34'ü soya, % 16'sı pamuk, % 7 'si ise mısır üretimine karşılık gelmektedir (Williams ve diğ., 2005).

Son yıllarda pek çok çeşitte genetik modifiye tarım bitkileri üretilmiştir ve bunların pek çoğu ticari olarak farklı ülkelerin piyasalarında satışa sunulmuştur. Son on yılda biyoteknolojik mahsullerin ticarileştirilmesinde, bu mahsullerin küresel payı %13' lük sabit bir büyüme oranına ulaşmış, başka bir deyişle dünya üstündeki ekili alan büyüklüğü 102 milyon hektarı bulmuş (Zhu ve diğ., 2008) ve transgenik bitkilerin ekildiği ülkelerin sayısı 1996' dan 2005' e, 6' dan 21' e yükselmiştir. GM ekinler çoğunlukla ABD, Arjantin, Kanada, Brezilya ve Çin' de yetiştirilmektedir (Greiner ve Konietzny, 2008). Bununla beraber, GM bitkilerin ticarileştirilmesi dünya çapında biyogüvenlikle ilgili endişelerin artmasına sebep olmuştur (Margarit ve diğ., 2006; Mafra ve diğ., 2008); pek çok tüketici GMO' ların gıdalarda kullanılması konusunda endişe duymaktadır (Frewer ve diğ., 2004). Bu durumda GM gıdaların etiketlenmesi hususu daha önemli ve gerekli bir hal almıştır. Avrupa Birliği GM gıdaların etiketlenmesini ilk defa 1997 yılında ele almış ve bu konuda diğer ülkelere öncülük etmiştir (Cockburn, 2002).

Farklı ülkelerdeki etiketleme eşik değerleri ve uygulama prosedürleri farklı farklıdır; bazı ülkelerde GMO içeren ürünlerin GMO içeriğinin etikette belirtilmesi zorunlu iken Kanada gibi bazı ülkelerde gönüllü olarak uygulanmaktadır (Gruère, 2006). Avrupa Birliği' nde etiketleme eşik değeri % 0,9 iken (Url-1, 2010), Güney Kore' de % 3 (Url-2, 2010), Japonya' da % 5' tir (Url-3, 2010). Ülkeler arasında uygulamalardaki farklılıklara ilişkin veriler Çizelge 2.1' de belirtilmiştir. Çin' de 17 farklı gıda ürünü etiketlenmektedir; mısır tohumları, mısır yağı, domates tohumları,

soya yağı, kanola tohumları ve pamuk tohumları bu ürünlerdendir (Pan ve diğ., 2006).

Çizelge 2.1 : Farklı ülkelerin GM gıdaların etiketlenmesi uygulamaları (Url-1, Url-2, Url-3, Url-4, Url-5 ve Url-6, 2010).

Ülke	Etiketleme Zorunlu/Gönüllü	Etiketleme Son ürün bazlı/Proses bazlı	Etiketleme Tolerans Düzeyi (%)
AB Ülkeleri	Z	P	0.9
ABD	G	S	5
Japonya	Z-G	S	5
Kanada	G	S	5
Çin	Z	S	0
Yeni Zelanda	Z	S	1
Brezilya	Z	P	1
Avusturalya	Z	S	1
Kore	Z	S	3
Rusya	Z	P	1

2.3 GMO' lar ile GM Gıdalar Hakkındaki Yasal Düzenlemeler

Genetik modifiye organizma türevi bitkisel ürünlerin değerlendirilmesindeki genel strateji, pek çok ülkede apayrı bir gıda grubu olarak yasal düzenlemelerinin yapılmasıdır. Ortak bir temele rağmen düzenlemelerde farklılıklar gözlemlenmekte ve bu durum ticarete ülkeler ve uluslararası kuruluşlar arasında uzayıp giden tartışmalara sebep olmaktadır (World Trade Organisation, 2006).

GM ekinlere yönelik olarak yapılan risk değerlendirmeleri ve yönetmelik düzenlemeleri ileriye dönük olarak önlemler alınması temeline dayanmaktadır. GM ekinlerle ilgili olarak bunlardan üretilen gıdalar da dahil olmak üzere ilk uluslararası ve ulusal güvenlik değerlendirmesi ve yönetmelik hükümleri uzmanlar tarafından 1980'lerin ortalarında düzenlenmiştir (US OSTP, 1986). Bundan neredeyse on yıl sonra (1995) GM ekinlere ilk yasal onay verilmiştir (König ve diğ., 2004).

2.3.1 Avrupa Birliği' ndeki yasal düzenlemeler

Avrupa' da GM gıdalar ve yemler için (Regulation 1829/2003) farklı, (yeni geliştirilmiş bitkisel gıdalar ya da henüz Avrupa piyasasına sunulmamış bitkisel gıdalar da dahil olmak üzere) diğer yeni gıdalar için (Regulation 258/97) farklı yasal düzenlemeler oluşturulmuştur. 258/97 sayılı düzenleme yeni bitkisel gıdalar dahil bütün yeni gıdaların risk değerlendirme prosedürlerini tanımlamaktadır ancak 2004' ten bu yana GM türevi bitki ürünleri bu tanımların dışında bırakılmıştır. 258/97 sayılı

düzenleme altındaki risk değerlendirme prensibi karşılaştırmalı bir risk değerlendirmesidir; eğer karşılaştırma için geleneksel bir eşdeğer mevcut değilse, gerekli durumlarda yeni bitki ürününün tam bir toksikolojik ve besinsel değerlendirmesi yapılır (Kok ve diğ., 2008). 1829/2003 sayılı düzenleme gıda ve yem bileşenleri, katkı maddeleri veya enzimler dahil olmak üzere GM gıda ve yem için piyasa onayı için temel oluşturmaktadır (EC, 2003). Avrupa Komisyonu EFSA’ dan (Avrupa Gıda Güvenlik Otoritesi) GMO’ lar hakkında bilimsel tavsiyelerini ve üye ülkelerden de yorumlarını alır. Onaylama prosedürü karşılaştırmalı bir güvenlik sistemine dayanmaktadır, karşılaştımanın yapıldığı bitki (komparatör) tercihen doğrudan soy bitkiden veya genetik olarak yakın bir akrabadan seçilmektedir (Kok ve diğ., 2008).

2.3.2 ABD’ deki yasal düzenlemeler

Birleşik Devletler’in yasal sisteminde firmalar, bitkiye kazandırılan yeni özelliği hariç tutarak, yeni bir (GM) bitkinin eşdeğer kompozisyonda ve besin değerinde bir geleneksel özdeşinin olduğunu ispatlamak zorundadırlar. Pestisit etkisine sahip proteinlerin olduğu ekinler için EPA (Çevresel Koruma Ajansı) bu proteinleri güvenli olduğunun gösterilmesini talep etmektedir, ayrıca Federal Insektisit, Fungisit ve Rodentisit Kanununa göre de alerjik özellikler açısından diğer ekinler de Gıda İlaç ve Kozmetikler Kanunu uyarınca FDA’in danışmanlığında (gönüllü olarak) değerlendirilmektedir (Url-7, 2010). Aynı zamanda, firmalar geliştirdikleri yeni ekin türlerinin insan sağlığı üstünde oluşturabilecekleri riskler konusunda sorumludurlar (Kok ve diğ., 2008). 1992’de FDA GM ekinlerden türetilen gıda ve yemlerle ilgili özgün bir güvenlik endişesi ortaya çıkmadığını ve bunlarla ilgili düzenlemelerin de diğer bitkisel ürünler gibi yapılması gerektiği ifadesini yayınlamıştır (FDA, 1992). Geleneksel yolla üretildiği ifade edilen ürünlerin kompozisyonunda da kendi soylarından farklılıklar görülüyorsa, bu da araştırılması gereken konulardan biri içerisine girmektedir (Freese ve Schubert, 2004). Ancak geleneksel üretimle gelen yeni bitki türlerinde kasıtsız olabilecek etkiler veya güvenilirlikleri rutin bazda değerlendirilmemektedir. Bu açıdan Birleşik Devletler’ le Avrupa Birliği arasında bir farklılık yoktur.

2.3.3 Japonya’ daki yasal düzenlemeler

Japon Gıda Sanitasyon Kanunu GM gıdalar ve katkı maddeleri ile ilgili gereklilikleri belirtmektedir (JETRO, 2006). 2001’den bu yana GM gıdaların güvenlik değerlendirmesi Gıda Sanitasyon Kanunu ile zorunlu hale getirilmiştir. 2003’ te, GMO türevi gıdaların ve katkı maddelerinin “Genetik Modifiye Gıdaların Güvenlik Değerlendirilmesi Standardı” na göre değerlendirilmesi amacıyla Gıda Güvenlik Komisyonu kurulmuştur (Food Safety Commission of Japan, 2004). Ayrıca bu standart, analitik sonuçlar GMO türevi gıdaların güvenliğini ispat etmeye yetmiyorsa, hayvan deneylerinin yapılması gerektiğini ifade etmektedir. Geleneksel yolla üretilen bitkiler, kasıtsız oluşabilecek yan etkiler için rutin bazda değerlendirilmemektedir.

2.3.4 Türkiye’ deki yasal düzenlemeler

Ülkemizde ise gıda mevzuatının yayınlanması ve uygulanmasından sorumlu olan Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı’nın, 26.03.2010 tarih ve 27533 sayılı Resmi Gazete’ de yayınlanan 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu GMO’ların ülkeye kabulünde ve onaylanma sürecinde hangi prosedürlerin izleneceğini belirtmektedir.

Bu kanunu destekleyen “**Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik**” ise 13.08.2010 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe girmiştir (Url-8). Bu Yönetmelik kapsamına giren ürünlerle ilgili olarak; GDO ve ürünlerinin onay alınmaksızın piyasaya sürülmesi, GDO ve ürünlerinin, Kurul kararlarına aykırı olarak kullanılması veya kullandırılması, genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin Kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmaktadır. Ayrıca bu yeni yönetmelikle 26/10/2009 tarihli ve 27388 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik yürürlükten kaldırılmıştır.

Bu Yönetmelik kapsamında yer alan gıdaların Bakanlık tarafından belirlenen eşik değerin üzerinde; onaylanmış GDO'dan elde edilmiş olması veya onaylanmış GDO'dan elde edilmiş bileşen içermesi veya GDO içermesi veya GDO'dan oluşması durumunda Türk Gıda Kodeksinde yer alan gerekliliklere ilave olarak;

- (1) Etiketinde bileşen listesinin bulunması zorunlu olmayan gıdalar için “genetik yapısı değiştirilmiştir” veya “genetik yapısı değiştirilmiş ... dan üretilmiştir” ibaresi etiket üzerinde açıkça görülecek şekilde belirtilir.
- (2) Gıdanın birden fazla bileşen içermesi durumunda; “genetik yapısı değiştirilmiş” veya “genetik yapısı değiştirilmiş dan üretilmiştir” ibareleri bileşen listesinde parantez içinde ve söz konusu bileşenden hemen sonra gelecek şekilde aynı punto büyüklüğünde yer alır.
- (3) Bileşen listesinde grup adı ile belirtilen bileşen bulunan gıdalarda “genetik yapısı değiştirilmiş içerir” veya “ genetik yapısı değiştirilmiş dan üretilmiş içerir.” ibareleri grup adından hemen sonra gelecek şekilde parantez içinde aynı punto büyüklüğünde yer alır.
- (4) Dökme gıdaların etiketleri, tüketicinin görebileceği yerlerde bulundurulur veya gıda maddesi ile birlikte tüketiciye sunulur.
- (5) Bu Yönetmelik kapsamındaki gıdaların GDO'suz eşdeğer gıdalardan; bileşimi, beslenme etkileri veya beslenme değeri, kullanım amacı açısından farklılık gösterdiği durumlarda, bu hususların etiket üzerinde belirtilmesi, besin bileşeninde farklılık gösteren söz konusu gıdalarda, beslenme açısından etiketleme yapılması zorunludur.
- (6) Bu Yönetmelik kapsamındaki gıdaların GDO'suz eşdeğer gıdalardan farklı olması durumunda, tüketilmesi sonucunda sağlık riski oluşturabilecek tüketici gruplarına ait uyarılar etiket üzerinde belirtilir.
- (7) Bu Yönetmelik kapsamındaki gıdaların GDO'suz eşdeğerinin olmaması durumunda, söz konusu gıdanın doğası ve özelliklerine ait bilgiler Türk Gıda Kodeksinde belirtilen hükümlere uygun olarak etiket üzerinde belirtilir.
- (8) GDO'suz eşdeğer gıdaların etiketlerinde GDO içermediğini, GDO'dan oluşmadığını, GDO'dan elde edilmediğini ifade eden beyanlar yer alabilir.

ifadeleri yer almaktadır. Diğer taraftan, Türkiye’ de de geleneksel yolla üretilen bitkilerde kasıtsız olarak oluşabilecek yan etkiler için rutin bazda değerlendirme yapılmamaktadır.

2.4 Genetik Modifikasyon Prosesi

GMO genellikle gen teknolojisi ile genetik kompozisyonu değiştirilmiş yaşayan organizma olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem DNA izolasyonu, tanımlanan DNA’nın modifikasyonu ve hedef organizmanın genomuna DNA’nın transferinin birbirini takip etmesi sonucu GMO’nun oluşturulması şeklindedir. Bu proses *transformasyon olayı* olarak adlandırılır. Normalde yeni gen fonksiyonları GMO’ya yerleştirilir ancak geliştirilen yeni tekniklerle varolan ancak istenmeyen genler de saf dışı bırakılabilmektedir. GMO içindeki tipik bir gen yapısı en az üç elementten oluşmaktadır: (1) *promotör* (etkinleştirici) element: eklenen/değiştirilen genin okunmasında açma/kapama düğmesi olarak görev görür; (2) eklenen/değiştirilen gen: seçilmiş spesifik bir özelliği kodlar; (3) *terminatör* (sonlandırıcı) element: eklenen/değiştirilen genin okunmasının durdurmak için sinyal verir. Buna ek olarak, bir genin yapısı içinde pek çok diğer element de mevcut olabilir; bunların fonksiyonları genellikle genin işlevini kontrol etmek ve dengede tutmak, GMO içindeki ‘yapı’nın varlığını kanıtlamak veya yapıya ait çeşitli elementlerin biraraya gelmesini kolaylaştırmaktır. Bir genin stabil bir şekilde kalıtsal olabilmesi için organizmanın genomu (doğal genetik altyapısı) ile bütünleşmesi gereklidir (Miraglia ve diğ., 2004).

Dünya çapında otoriteler tarafından yüzden fazla gıda veya yem kullanımı onaylanmıştır ancak çoğu deney aşamasındadır. Bunların sadece sınırlı bir kısmı ticarileştirilmiştir ve dünya piyasasında çeşitli ürünlerin içinde bulunmaktadır. DNA dizileri hakkındaki detaylar genetik modifikasyonu geliştiren şirketin teknolojisini rakiplerinden saklamak amacıyla koruduğu gizliliğiyle alakalıdır. Diğer taraftan ilgili dizilerin verileri dahil bazı detaylar kamuya açık bazı veritabanlarında verilmektedir (Agbios, 2010; EMBL, 2010).

2.4.1 Transgenin eklenmesi

Çoğu durumda rekombinant DNA, bitki hücrelerine *Agrobacterium tumefaciens* kullanarak veya parçacık tabancası ile yerleştirilir. *Agrobacterium* suşları genellikle

DNA'nın hareketliliğini ve transfer fonksiyonlarını kodlayan bir vektör içerir. Ayrıca rekombinant DNA ile ayrı bir vektör de transfer ve transferi ayarlayan gen ürünleri için bölgenin tanınmasında görev alır. *Agrobacterium* kullanıldığında rastgele bir DNA'nın bitkiye transfer edilme riski nispeten düşüktür. Parçacık silahları gibi direkt transformasyon metodları bitkilere uygulandığında, bitki transformasyonunda kullanılan DNA'nın hazırlık aşamasında, herhangi bir bakteri kromozomundan veya diğer bir plasmid DNA'dan kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmelidir (Hellens ve Mullineaux, 2000).

2.5 Gıdalarda GMO'ların Tespit Edilmesi

2.5.1 Numunenin alınması

Bir lot içindeki GM maddelerin varlığının değerlendirilmesi, dünya çapında GMO'nun kabul görüp görmediğinin ve yasal farklılıkların göz önünde bulundurulmasını gerektirmektedir. Ham maddedeki GMO miktarının tayini, 'tanısal zincir'deki (numune alma, alt numunelerin alımı ve analiz) çeşitli değişkenlere bağlı olarak hatalara açıktır (Miraglia ve diğ., 2004). Hammaddelerin ve gıda bileşenlerinin içindeki GMO'ların test edilmesinde heterojenlikten doğabilecek problemleri engellemek için hem numune büyüklüğü hem de numune alma prosedürleri büyük önem taşımaktadır (Ahmed, 2002; Miraglia ve diğ., 2004). Numune alma planı istatistiksel olarak yığını temsil eden numune alımını sağlamalıdır ve numune ölçüsü yeterli hassasiyete imkan verecek miktarda olmalıdır çünkü küçük numune ölçüsüyle istatistiksel anlam elde edilebilmesi zordur. Ham numune (veya tohum) ince toz halinde öğütülerek iyice karıştırılır. Ardından protein veya DNA, takip eden analizde kullanılmak üzere ekstrakte edilir. Son olarak, optimum numune alım stratejisi hassasiyet ile maliyet ve güvenilirlik arasındaki dengeden oluşur. Ayrıca testin doğruluğunu sağlamak için dünya çapında kabul görmüş bir planın (örn., BM'in Codex Alimentarius'u) uygulanması tercih edilir (Ahmed, 2002).

Çoğu Avrupa ülkesi mikotoksinlerin analiz metodolojisinde kullanılan numune alma uygulamasını GMO'lar için kullanılabilecek geçici bir temel olarak kullanmaktadır. Direktif 98/53 gıdalardaki belli kontaminantların analizi ve bunlardan numune alınması için önerilen ilk direktif olmakla beraber hala GMO'lar için de kullanılmaktadır (EC, 1998).

Genellikle numune alma stratejilerinde analit/gıdanın doğası ve analitin yığın içindeki dağılımı gibi pek çok parametre hesaba katılmalıdır. Pek az kuruluş, GMO türevi maddeden numune alınması konusunda yaşanan probleme yönelik yaklaşım göstermiştir. Yığın halindeki ürünler için numune alma planı tanımlanırken, lot ölçüsü ve homojenlik, kabul edilen riskler (toleranslar) ve uyarlanan test metotları gibi ana parametreler istatistiksel olarak hesaba katılmalıdır.

Sonuç olarak, şu anki pek çok numune alım planı yığın ürünler için geçerlidir, yalnızca bazıları özellikle GMO'ları işaret etmektedir (Miraglia ve diğ., 2004).

2.5.2 GMO testi için kullanılan referans materyaller

Referans maddeler pek çok amaca hizmet ederler: Spesifik metotlar için kalibrasyon amaçlı veya çeşitli metotlar için referans matris olarak kullanılmaktadırlar ve çeşitli performans kriterlerini karşılamak için de üretilmektedirler. GDO'lar açısından ise, referans maddeler onaylanmış referans maddeler olarak adlandırılmaktadırlar (Holst-Jensen, 2003).

Pozitif ve negatif kontrol amacıyla kullanılan uygun referans materyaller, analitik prosedürün doğruluğunun kanıtlanması ve metot ve laboratuvar performanslarının değerlendirilmesi için gereken temeli oluşturur. Referans materyal analitik metotlardan bağımsız olmalı ve hammaddeye ya da nihai ürünlerden daha ziyade temel gıda bileşenlerine odaklanmalıdır.

Her bir GMO spesifik bir referans materyali gerektirir. Tahıl taneleri, değiştirilmiş DNA veya protein açılımları referans materyal olarak kullanılabilirler. Eğer tahıl taneleri referans olarak kullanılıyorsa, gerçek hayattaki test materyalinin orijinaline uygun karşılığa sahip olmalıdır; örn., matris etkisi ve yoğunluk, gerçeğiyle benzer olmalı, uzun vadede kalitesi tutarlı ve numune homojenliğini, GMO içeriğini ve stabilitesini karşılayabiliyor olmalıdır.

Günümüzde çok az sayıda ticari sertifikalı referans materyal mevcuttur çünkü referans materyallerin kullanılabilirliği, fikri mülkiyet hakları ve maliyetler nedeniyle oldukça kısıtlıdır ve ayrıca Avrupa Birliği'nin onay vermediği hiç bir referans maddesi kullanılamamaktadır (Miraglia ve diğ., 2004).

2.5.3 GMO için kullanılan tayin yöntemleri

GM ürünler kendilerine bağlanan yeni gen(ler)in kodladığı ilave özellikleri taşırlar; bu, genellikle ilgili özelliği getiren ilave protein(ler)in üretilmesiyle meydana gelir. GM mahsullerin türevi olan hammaddeler ya da işlenmiş ürünler analiz edildiğinde bağlanan yeni DNA ya da genetik materyel tarafından kodlanan yeni proteinler tespit edilebilmektedir. Buna yönelik olarak hem kalitatif hem de kantitatif metotlar mevcuttur (Ahmed, 2002).

2.5.3.1 Protein bazlı test metotları

Hedef analit biliniyorsa, kompleks matrisler içindeki pek çok proteinin kalitatif ve kantitatif tayininde antikorlu immunoassay teknolojilerini kullanmak ideal bir yöntemdir. Test için ihtiyaç duyulan miktara, tespit sisteminin spesifikliğine (örn., tüm proteine veya spesifik bir peptit dizisine karşılık gelen antikorlar), ilgili uygulamaya, test için harcanan zamana ve paraya bağlı olarak hem tek klonlu(oldukça spesifik) hem de çok klonlu antikorlar kullanılabilir. Antikorlu immunoassaylerde iki format kullanılmaktadır: bunlardan ilki, dedektör ve analitin yakalama antikorlarına bağlanmak için yarıştıkları rekabetçi bir test, ikincisi ise analitin yakalama antikoru ve detektör antikoru arasında sıkıştırıldığı (çift antikorlu sandviç testi) iki taraflı bir testtir. Bunlardan ikincisi daha tercih edilir bir testtir. Hem Western Blot hem de ELISA teknikleri Monsanto' nun genetik modifiye Roundup Ready soya fasulyesinin protein ürünlerinin analizlenmesinde kullanılmaktadır (Ahmed, 2002).

Western blot tekniği

Western blot tekniği SDS-PAGE' de elektroforezlenen protein numunesinin nitroselüloz membran üstüne elektro-transfer edildiği analitik bir metottur. SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) ise büyüklük, şekil veya isoelektrik noktalarına göre ayırtmada kullanılmaktadır. Western blottingle kombine edildiğinde ise verilen proteinin varlığının ve/veya relatif çokluğunun belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Jelin yoğunluğu monomer konsantrasyonuna bağlı olarak farklı olabilir; sabit yoğunluğa sahip olabileceği gibi dereceli(değişken) de olabilir. Elektroforez elektrik

akımı uygulanması yoluyla proteinlerin matriks boyunca göç ettirilmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir, bunu için proteinler önce denature edilip sonra da sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi bir deterjana maruz bırakılmaktadır. Bileşenler molekül ağırlıklarına göre ayrılmakta, bu da şeritler halinde gözlemlenmektedir. Bundan sonra artık proteinler nitroselüloz membrana transfer edilmektedir. Transfer işlemi SDS-PAGE' le aynı prensibe dayanmaktadır, tek fark akımın jele ve proteinlere 90 derecede uygulanmasıdır. Proteinler membrana bağlanıp ayrıştığında ise membran bloke edilir. Bundaki amaç membran ve antikorlar arasında istenmeyen protein etkileşimlerini önlemektir. Bu ise membranın bovine serum albumin (BSA) çözeltisi veya yağsız kuru süt(NFDM) içine konarak gerçekleştirilmektedir. Sonraki aşamada nitroselüloz önce ilgili proteine spesifik olan antikorla, sonra da ilk antikora spesifik ikinci bir antikorla inkübe edilmektedir.

İkinci antikor enzime kovalent olarak bağlanmakta ve kromojenik substrat varlığında renk reaksiyonuna neden olmaktadır. Böylece istenen proteinin moleküler ağırlığı ve miktarı kompleks bir karışım içinden seçilebilmektedir.

Bu metod rutin analizlerden çok araştırma uygulamaları için daha uygundur. Western blotun tespit limiti tohumlar için % 0.25 ve ısıtılmış ürünler için % 1 arasında değişmektedir (Ahmed, 2002).

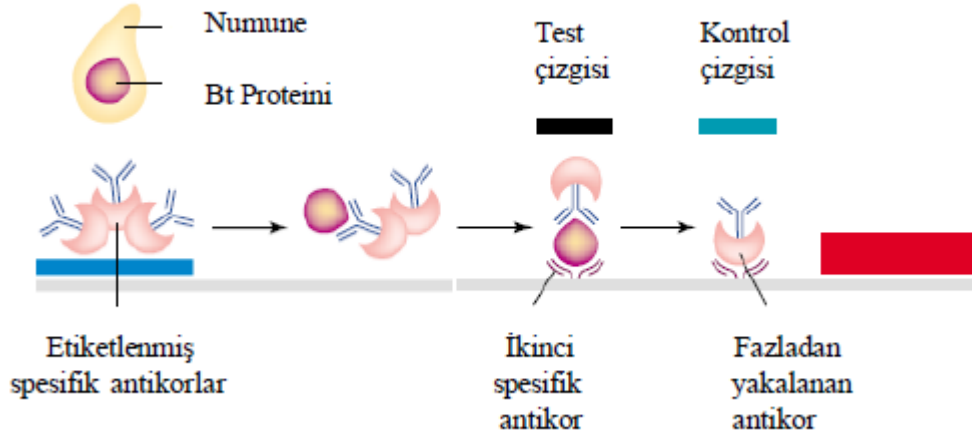
ELISA yöntemi

ELISA testinin birden fazla formatı kabul görmektedir: mikrokuyucuklu (antijen kaplı) plaka (veya bant) formatı ve kaplamalı tüp formatı. Çıkarılabilir bantlara sahip 8-12 kuyucuktan oluşan, antikorla kaplı mikrokuyucuklar çok hassas kantitatif sonuçlar vermektedir, ekonomiktirler, yüksek verimliliğe sahiptirler ve büyük hacimli kantitatif laboratuvar analizleri için idealdirler, proteini denature etmezler.

Plaka testi için tipik analiz süresi 90 dakikadır ve optik plaka okuyucu numunelerdeki konsantrasyon seviyelerini belirlemektedir. Kaplamalı tüp formatı ise saha testleri için uygundur; test süresi 15-30 dakikadır ve tüpler hem görsel hem de optik tüp okuyucu ile okunabilir, sonuçlar kantitatifdir. Test içinde herhangi bir kantitatif standart olmadığı için gıdaların içindeki GMO'ların bileşen seviyesinde varlığına dair ekstra bir bilgi elde edilememektedir (Ahmed, 2002).

Yanal akış bandı yöntemi

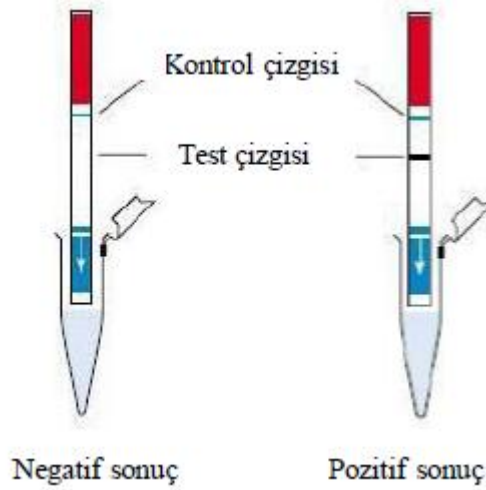
ELISA testinin başka bir versiyonudur, mikro titrasyon kuyucukları yerine yanal akış bant teknolojisini geliştirmek amacıyla bantlar kullanılmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Yanal akış bandı testinin yanal olarak şematik anlatımı (Ahmed, 2002).

Eksprese proteinle hareketsizleştirilmiş spesifik antikor çifti bir renk reaktifiyle çift oluşturur ve bir nitroselüloz bandıyla birleştirilirler. Bu bant, genetiği değiştirilmiş proteinin barındığı, bitki dokusunun ekstraktını içeren plastik bir eppendorf viyaline konduğunda antikor ve renk reaktifi çiftinin oluşturduğu bir antikor sandviçinin oluşmasına neden olur. Bu renkli sandviç, gözenekli bir membran boyunca bandın diğer ucunu takip eder. Gözenekli membranın iki tane yakalama ucu vardır: birisi genetiği değiştirilmiş protein sandviçi için, diğeri ise renk reaktifiyle çift oluşturan işlem görmemiş spesifik antikorlar içindir.

Membran üstünde yalnızca bir çizgi (kontrol) olması negatif numuneyi, iki çizgi olması ise pozitif sonucu işaret eder (Şekil 2.2). Yanal akış bandı 5-10 dakika içinde sonuç verir, ekonomiktir, ve gıda zincirinin erken aşamalarında ilk tarama metodu olarak kullanımı uygundur. Bu bantlar ticari olarak, mısır bitkisi, tohum ve tanelerindeki CryI(Ab), soya fasulyesi, kanola, pamuk ve şeker pancarındaki CP4 EPSPS proteininde olduğu gibi haşerelere karşı koruyucu etkisi olan ve *Bacillus thuringiensis* tarafından ekspreslenen endotoksinleri belirlemek için geliştirilmiştir.



Şekil 2.2: GMO içeren ependorflara batırılmış test bantlarının dikey görünüşü; negatif ve pozitif test sonuçları (Ahmed, 2002).

Ticari olarak alınabilecek yanal akış bantları çok az sayıda biyoteknolojik protein üreten GM ürünü için mevcuttur. Diğer taraftan, geliştirilen çoklu proteinleri de tespit edebilme kabiliyetine sahiptirler. Yakın bir gelecekte, antikor teknolojisindeki ilerlemeler ve gelişmiş cihazlar vasıtasıyla immunoassay testlerinin daha da gelişmesi beklenmektedir.

Diğer immunoassay formatları

Mikroplaka ELISA ve yanal akış bantlarına ek olarak kullanılan diğer immunoassay formatlarında katı destek yüzeyi gibi manyetik parçacıklar kullanılmaktadır. Manyetik parçacıklar yakalayıcı antikorlarla kaplanmakta, reaksiyon test tüpünde gerçekleştirilmektedir. Reaktantlarla bağlanan parçacıklar çözeltideki bağlanmamış reaktantlardan bir mıknatıs yoluyla ayrılmaktadırlar. Bu formatın avantajı parçacıkların üstün kinetikleridir çünkü parçacıklar reaksiyon çözeltileri içinde serbestçe hareket ederler ve homojenlikleri sayesinde sonucun kesinliğini arttırırlar. Antikor metotları ile enstrümental tekniklerin kombinasyonundan oluşan bazı gelişmeler de gerçekleştirilmektedir. Örneğin, hedef moleküllere bağlanan antikorların biosensörlerle izlendiği çalışmalar yapılmıştır (Brett ve diğ., 1999).

2.5.3.2 DNA bazlı test metotları

GM gıdalar için DNA'yı tespit etme metotları DNA'nın iki ipliğinin bir dizi içinde spesifik bir şekilde hibritleri oluşturan spiral çifti şeklinde birbirini tamamlamasına bağlıdır. Bir bitkiye aktarılan DNA'nın içerdiği farklı elementler DNA'nın

fonksiyonlarını belirler. Tipik olarak bu elementler bir *promotör*(etkinleştirici) dizi, yapısal gen ve bir durdurucu gen dizisidir (Miraglia, 2004).

DNA-temelli tespit metotlarıyla ilgili pek çok yayın yapılmıştır (Deisingh ve Badrie, 2005; Passamano ve Pighini, 2006; Marmioli ve diğ., 2008).

Agaroz jel elektroforez

Bu teknik DNA'nın miktarı ve büyüklüğünün tahminlenmesine imkan vermektedir. Çoğaltılan DNA'nın kimliği daha ileri aşamalarla doğrulanabilir; DNA dizilemesi veya sınırlayıcı enzimlerin DNA'yı sindirmesini takiben yapılacak parça analizi bu aşamalardandır. Jel elektroforezi normalde PCR'la çoğaltılan DNA'nın kalitatif olarak tespitinde kullanılmaktadır (Miraglia, 2004).

Southern blot

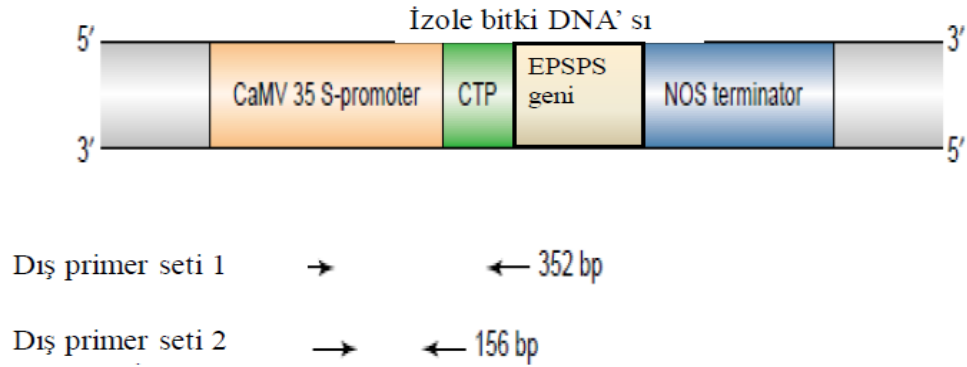
Bu yöntem izole edilen DNA' nın nitroselüloz veya naylon membranlar üstünde sabitlenerek, GMO' ya has, çift iplikli, işaretlenmiş nükleik asit problemlerinin ölçülmesi ve hibritleşmenin radyografi, florometri veya kemilüminesans yoluyla tespit edilmesinden oluşur. İzole edilen DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve belirli sayı ve uzunlukta DNA parçaları oluşturulur. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılan bu parçalar önce yüksek pH ile denatüre edilip blot yöntemi ile nitroselüloz filtre üzerine geçirilir. ³²P (ya da başka bir radyoaktif olmayan nükleotit analogu) ile işaretli denatüre edilmiş ve incelenecek bölgeye özgü prob, filtre üzerinde tutulan parçalar ile uygun koşullar sağlanarak melezlenir. Sonra filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilir (Ahmed, 2002).

Kalitatif PCR

Standart bir PCR testinde iki primer çifti kullanılır, bunlar: (1) ileri, anlamlı (sense) veya 5'→3', ve (2) ters, ters-anlamlı (anti-sense) veya or 3'→5' şeklinde ifade edilirler. Bu primerler ilgili dizinin zıt iplikçiklerinde hibritleşmeyi düzenlerler ve 2-3 termal basamaklı tekrarlı döngülerden oluşan seriler yoluyla primerler arasındaki dizileri milyonlarca kez çoğaltırlar. Çoğaltılan parçalar çoğaltılan DNA'yı büyüklüğe göre ayırtmak için agaroz jel elektroforezden geçirilir. Diğer taraftan HPLC ve CE (capillary electrophoresis) gibi farklı ayırıştırma yöntemleri de kullanılmaktadır. Pek çok gıda bileşeni (soya, buğday, kanola, patates, pirinç, mısır, kereviz ve domates) PCR kullanarak analiz edilmiştir (Yamaguchi ve diğ., 2003; Abdullah ve diğ., 2006;

Kakihara ve diğ., 2007; Moriuchi ve diğ., 2007; Turci ve diğ., 2010; Wu ve diğ., 2010). Ölçüm oranını etkileyen en kritik aşamalar DNA' nın ekstraksiyonu ve pürifikasyonudur. Ekstraksiyonun yapılmasında günümüzde pek çok metot kullanılmaktadır ancak bunların ikisi yaygındır: (1) CTAB gıda numunesinin deterjan cetiltrimetilammonyum bromür varlığında inkübe edilmesi metodu; (2) Wizard DNA-bağlayıcı silika reçinelerin kullanıldığı metottur. Her iki metot da kabul edilemez şekilde DNA degradasyonuna sebebiyet vermeden tatmin edici oranda DNA izolasyonunu sağlar ve maliyetleri de düşüktür. Gıdaların içindeki bileşenler (örn., proteinler, yağlar, polisakkaritler, polifenoller, kakao ekstraktları ve karamelize şeker) DNA polimerazını inhibe edebilirler ve başarılı bir PCR analizi için gereken minimum ortalama kritik DNA ölçüsü ~400 bp' dir (Ahmed, 2002).

PCR sonuçlarını doğrulamak için farklı metotlar kullanılabilir: (1) çoğaltılmış ürünün sınırlayıcı endonükleaz sindirimi yoluyla spesifik ayrıştırılması; (2) hedef diziyeye spesifik bir DNA probu ile hibritleşme, (3) PCR ürününün doğrudan diziliminin belirlenmesi ve (4) içinde iki set primer çiftinin özellikle çoğaltılan hedef diziyeye bağlandığı nested PCR (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: 35S promotör dizisi ve petunyadan türetilen CTP dizisi arasında köprü kurlmaları için seçilen iki set primeri kullanan nested PCR metodunun şematik gösterimi. İki aşamalı bir yaklaşımdır: daha içte bulunan set dıştaki seti takip ederek reaksiyonun seçiciliği ve hassasiyetini iyileştirir. İncelenen ürün tipine (soya yemeği, proteini, lesitini, yağı veya işlenmiş farklı ürünleri gibi) ve test edilen porsiyon büyüklüğüne bağlı olarak mevcut DNA'nın tespit limiti % 0.01 ile 0.1 arasında değişim göstermektedir. *Kısaltmalar: CaMV: cauliflower mozaik virüs; CTP: cell transit peptit; EPSPS: 5-enolpiruvil-shikimate-3-phosphate sentaz; NOS: nopalın sentaz (Ahmed, 2002).

Bu tekniğin dezavantajı, çoğaltılan DNA'nın fazla sayıda işleme ve pipetle ölçüme maruz kalmasıdır, bu durum da kontaminasyon riskini arttırmaktadır. Ayrıca bu tip bir analizin standart bir procedure dönüştürülmesi de oldukça güçtür.

Kantitatif end-point PCR

GMO'ların gıdalarda kantitatif analizinin yapılması çok önemlidir çünkü AB'nde GMO'ların etiketlemede maksimum limitleri mevcuttur. Hedef DNA ve dahili DNA standardı beraber amplifiye ediliyorlarsa PCR'dan kantitatif sonuç elde edilir. (QC)-PCR gibi kantitatif-kompetitif sistemlerde, hem dahili standart hem de hedef DNA eş zamanlı olarak etkilendikleri için PCR inhibitörleri derhal fark edilirler. (QC)-PCR'ın dört aşaması vardır: (1) standart ve hedef DNA'ların aynı test tüpü içinde birlikte amplifikasyonu; (2) agaroz jel elektroforez ya da etidyum bromürle jelin boyanması gibi uygun bir metotla ürünlerin ayrıştırılması; (3) jelin yoğunluğa göre ölçülmesi; ve (4) hedef ve standart DNA'ların bağıl miktarlarının regresyon analizi ile tahminlenmesi. QC-PCR'daki standart ve hedef DNA'lar arasındaki rekabet tespitteki hassasiyet kaybına neden olmaktadır (Ahmed, 2002).

Kantitatif real-time PCR

Günümüzde real-time PCR en yaygın olarak kullanılan GMO miktar belirleme teknolojisidir. PCR süresince sentezlenen ürün miktarı, spesifik amplifikasyonun sonucunda oluşan ışıma (floresans) sinyalinin tespiti yoluyla real-time içinde ölçülür. Real-time PCR özel termal çevrimleri ve genellikle spesifik bazı floresan problemlerin (spesifik olmayan floresanslar DNA bağlayıcı floresan boya kullanılmasıyla tespit edilebilmektedir; örn., SYBR Yeşili) eklenmesini gerektirmektedir. Miktar belirleme PCR reaksiyonunun (log-linear faz) logaritmik fazında gerçekleşmektedir. Sentezlenen DNA'nın miktarına bağlı olarak floresan ışığı yayan çeşitli türlerde floresan problemler mevcuttur. Hedefe özel problemlerin kullanımı analizin kesinlik derecesini artırır. Real-time PCR'ın avantajı, doğrulama aşamasında kontaminasyon riskini arttıran, viallerin kapaklarının tekrar açılması işlemine gerek duyulmamasıdır (Miraglia, 2004).

2.5.3.3 Protein ve DNA bazlı metotların karşılaştırılması

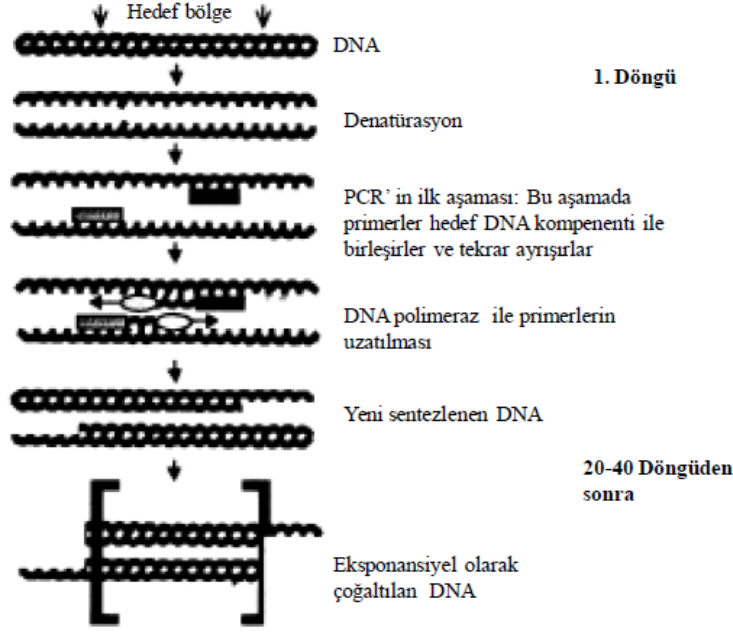
Protein ve DNA bazlı metotların mukayesesi Çizelge 2.2 üstünde gösterilmektedir:

Çizelge 2.5:GM ürünler tarafından üretilen rDNA (rekombinant DNA) tespit metotlarının karşılaştırılması (Ahmed, 2002).

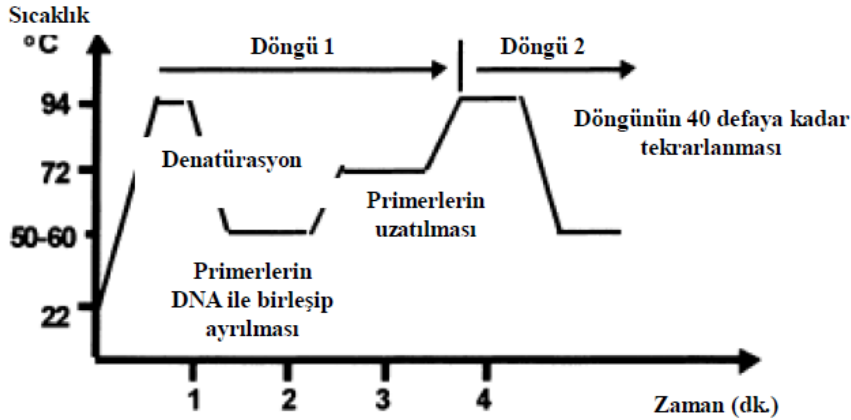
Parametre	Protein-bazlı				DNA-bazlı		
	Western blot	ELISA	Yanal akış bandı	Southern blot	Kalitatif PCR	QC-PCR	Real-time PCR
Kullanım Kolaylığı	Zor	Orta	Basit	Zor	Zor	Zor	Zor
Özel ekipmana Olan ihtiyaç	Var	Var	Yok	Var	Var	Var	Var
Hassasiyet	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta	Çok yüksek	Yüksek	Yüksek
Devam süresi	2 gün	30-90 dk	10 dk	6 saat	1.5 gün	2 gün	1 gün
Maliyet/örnek (\$)	150	5	2	150	250	350	450
Kantitatif Sonuç alma	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet
Saha analizi İçin uygun	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Çalıştırıldığı Mekan	Akademik lab.	Test tesisi	Saha testi	Akademik lab.	Test tesisi	Test tesisi	Test tesisi

2.6 PCR' ın çalışma prensibi

Genomik DNA parçaları, hedef DNA' yı tamamlayan diziye sahip kısa oligonükleotit primerlerin bu DNA' yı sentezlediği koşullar altında çoğaltılabilirler. Bu reaksiyon ısıya dirençli enzim (Taq DNA polimeraz) ve deoksिनükleotitlerin eklenmesiyle sentez test tüpleri içinde gerçekleştirilir. Reaksiyonun tekrarlı döngüsü spesifik dizilerin birkaç hedef DNA molekülünden çoğaltılmasını sağlar (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5).



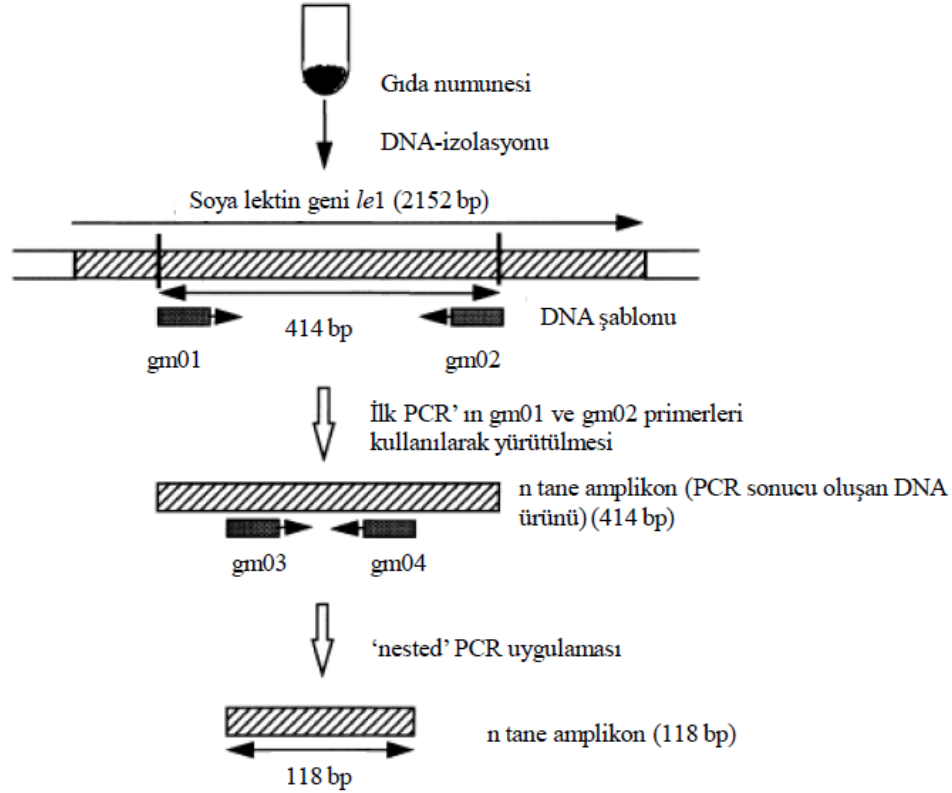
Şekil 2.4: PCR’ da DNA amplifikasyonunun prensibi. (Meyer, 1999).



Şekil 2.5: PCR’ ın sıcaklık/zaman diyagramı (Meyer, 1999).

Kullanım için en az iki primer hesaba katılır. Eğer hedef bir genin veya DNA parçasının nükleotid dizisi bilinen spesifik primerlerse sentezlenebilirler. DNA et ve bitkilerden, hammaddelerden ve türevlerinden ya da uygun ekstraksiyon metotları kullanarak çeşitli gıdalardan izole edilebilir. Daha sonra da birkaç μL ’ si PCR’ da amplifikasyona sokulur ve amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezle analiz edilir. Ardından, sınırlayıcı endonükleaz yardımıyla veya ayrık PCR-ürünlerinin membranlara transferini (Southern blot) takiben hedef diziyeye has DNA probu ile hibridizasyonu vasıtasıyla amplifikasyon ürünlerinin spesifik ayrışmaları gerçekleştirilir ve bu sayede PCR ürünlerinin doğrulanması sağlanır. Buna alternatif

olarak, direkt dizileme ya da nested-PCR testleri ile de PCR ürünlerinin doğrulanması yapılabilir. DNA'nın belirlenmesinde izlenen yol Şekil 2.6' de gösterilmektedir (Meyer, 1999).



Şekil 2.6: Gıdada soya DNA'sının belirlenmesinde uygulanan stratejini şematik sunumu. DNA uygun ekstraksiyon metotlarıyla izole dildikten sonra PCR analizine sokuluyor. PCR analizinde soya le1 genine spesifik iki primerin yönelmesiyle, tanımlı 414 bp ölçüsündeki parça çoğaltılıyor. İlk amplikon 118 bp'lık parçanın bir çift dahili primerler çoğaltıldığı ikinci PCR'da DNA şablonu olarak kullanılıyor (Meyer, 1999).

2.6.1 Tespit etme ve miktar belirleme limitleri

Tespit (limit of detection=LOD) ve miktar belirleme (limit of quantification=LOQ) limitleri tespit ve miktar belirleme sonuçlarının güvenilirliği için gerekli olan en düşük miktarlardır. Bu tanımlar çok basit gibi görünmekle beraber, aslında hiç de basit değildir, çünkü kalitatif ve kantitatif tespit limitleri metoda-özgüdür ve aynı zamanda analizlenen numuneye de bağlıdır. Saf ve işlenmemiş materyallerin analitik limitlerinin yayınlanması yaygın bir durumdur. Diğer taraftan, yağ, hidrolize nişasta, rafine şeker ve şuruplar, fermente (örn., soya sosu) veya ekşi (örn., domates salçası) ürünlerde eser miktarda ya da yüksek oranda bozunmuş DNA bulunmaktadır (Miraglia ve diğ., 2004).

2.6.2 Numune hazırlama

DNA analizinde numunelerin homojenliğinin sağlanması kritik noktalardan birisidir. Hammaddlerden ve işlenmiş gıdalardan alınan numunler mantıklı ve uygulanabilir olmalıdır. İsveç Gıda El Kitabında numunelerin homojenizasyonunda kullanılması gereken metotların tanımlanmasında soya ürünleri örnek olarak kullanılmıştır. 50 g soya fasulyesi (çekirdek veya tane) veya 30 g kuru numune (gevrek, un) sırasıyla 100 veya 60 ml steril suyla 20 saate kadar inkübe edilmelidir, daha sonra blenderda homojenize edilmelidir. 30 g'lık nemli ürünler (tofu, sosis) ise doğrudan homojenize edilmelidir; sıvı ürünler ise tartılmadan önce mutlaka çalkalanmalıdır. Numuneler arasında çapraz kontaminasyonun önlenmesi için tek kullanımlık malzemelerin ve dezenfektan solisyonların kullanılması önerilmektedir. Tozlanma ile çapraz kontaminasyonun önlenmesi için numune hazırlama alanlarının fiziksel olarak ayrı tutulması gerekmektedir (Meyer, 1999).

2.6.3 Matrise özel etkiler ve DNA' nın ekstraksiyonu

Eğer ekstrakte edilen DNA PCR analizi için yeterli kalitedeyse, söz gelimi parça uzunluğu ve inhibitör faktörlerin bulunmaması açısından, bu durumda, teoride matristen gelen tek etki ekstrakte edilen DNA' nın miktarıyla ilintilidir. Ortamda DNA konsantrasyonunun düşük olması herhangi bir DNA' nın az sayıdaki kopyasının mevcut olduğu anlamına gelmektedir ve bunun pratikte yaratacağı etki LOD/LOQ(tespit limiti/miktar tayini limiti) üstünde olacaktır. Ancak bu durum yalnızca numune homojense ve bütün parçacıklardan ekstrakte edilen DNA aynı verimliliğe sahipse geçerlidir. Bu nedenle iyi bir tespit sınırı ve miktar tayini sınırı elde edebilmek için yüksek dizilimli bir DNA konsantrasyonu tercih edilmelidir. DNA içindeki safsızlıklar PCR'ın yanlış sonuç vermesine neden olabilir. Büyük oranda bozulmuş olan DNA kopyalanamayabilir çünkü başarılı bir PCR için bozulmamış hedef DNA kopyaları gereklidir (Miraglia, 2004).

Gerçekten de her doku tipi ve bitki türünün kimyasal kompozisyonu birbirinden tamamen farklıdır ve birbirine benzemeyen ekstraksiyon ve pürifikasyon verimine sahiptirler. PCR amplifikasyon verimi açıkça kullanılan ekstraksiyon metoduna bağlıdır. Partikül büyüklüğü de ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkileyen unsurlardandır (Prokisch ve diğ., 2001). Buna ek olarak, ekstrakte edilen DNA' nın

kesin miktar tayini ve kalite ölçümün olduğu kadar ekstraksiyon metodunun doğrulanmasının da uygun olması çok önemlidir (Holst-Jensen, 2003).

2.6.4 DNA izolasyon metotları

Hali hazırda, iki DNA izolasyon metodu favori durumdadır ve soya fasulyesi, mısır gibi pek çok hammaddede ve lesitin ve işlenmiş gıdalar gibi hammadde türevlerinde kullanılmaktadırlar. Bahsedilen ilk metot, bitki dokuları için kullanılan *klasik* protokole dayanan CTAB' dır. Gıda numuneleri deterjan CTAB (hekzadesiltrimetilamonyum bromür) varlığında inkübe ediliirler, ardından da kloroform ile ekstrakte edilerek DNA isopropanol ile çöktürülür.

Diğer metot olan Wizard ise enzimatik (proteinaz K) ve kimyasal işlemlerden sonra gıda numunesinden elde edilen çözeltiden DNA'yı doğrudan arıtmak için DNA-bağlayıcı silika reçine kullanmaktadır. Lesitin gibi DNA' nın çok düşük konsantrasyonlarda olduğu matrislerden DNA izolasyonunda verimi arttırmak için, 100 mg'lık numuneden yapılacak ekstraksiyonun beş kere tekrarlanması önerilmektedir. Ekstrakte edilen DNA biraraya toplanarak yeniden arıtılır.

PCR analizleri için DNA hazırlamadaki iki önemli nokta izole edilen DNA' nın saflığı ve verimidir. İşlenmiş gıdalardan ekstrakte edilen DNA yüksek oranda parçalanmıştır (parça büyüklüğü 400 bp'den küçüktür) ve protein, yağ ve polisakkaritlerden arıtılmalıdır.

Polisakkaritler, polifenolikler (taninler) ve diğer ikincil bileşenler çikolata gibi bazı gıdaların matrisleri için en büyük problemi yaratırlar çünkü bu bileşenlerin DNA' dan ayrılması zordur ve proteinler ve nükleik asitlerle geri dönüşümsüz olarak etkileşime girebilirler (Meyer, 1999).

2.6.5 PCR testleri

GMO' ların tespit edilmesinde günümüzde çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Primerler iki komşu genetik elementin sınırları üstünde köprü oluşturan (promotörler, yapısal genler, terminatörler), yeni eklenen DNA dizilerini hedef almak ya da spesifik olarak değiştirilen gen dizisini, belli bazı düzenleyici elementleri veya marker genleri tespit etmek üzere tasarlanırlar. Farklı genetik elementler için farklı primer setlerin kombinasyon halinde kullanılması ve çoğaltılabilen DNA' nın varlığının kanıtlanması için kontrol deneyleri yapılması

PCR için ön koşullardır. Spesifik primerlerin tasarlanmasında hedef genin spesifik dizisi ya da eklenen DNA bilinmelidir ve ilgili GMO ve negatif kontrol (GMO olmayan referans madde) ulaşılabilir olmalıdır.

Roundup Ready Soya fasulyesi için pek çok ürüne-spesifik tespit tanımlanmıştır (Monsanto). Eğer ürüne spesifik testler mevcut değilse en az üç genetik elemente (P-35S, nos 30 and nptII) yönelik tespit analizi de yapılabilir (Meyer, 1999).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Örnekler

Analiz edilen farklı markalardaki İstanbul’ da bulunan ve çeşitli ölçeklerdeki marka olmuş hipermarketlerden ve yerel marketlerden temin edilmiştir. Çalışmada, etiketlerinde mısır içerdiği beyan edilen tüm farklı ürün çeşitlerinin temsil edilmesine özen gösterilmiştir. Ürün markaları bilinmekle birlikte, tez içerisinde açıklanmamıştır. Özelliklerine göre analiz edilen ürünler Çizelge 3.1’ de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1: Analiz edilen örnekler.

Ürünler	Analiz Edilen Marka/Ürün Çeşidi Sayısı	Ürünlerin Genel Özellikleri
Bebek gıdaları	11	Toz mamalar, toz ek besinler, kavanoz ek besinler ve devam sütleri
Mısır unları	8	Herbiri farklı firmalar tarafından üretilmiş, gramajlar: 250g-1 kg
Mısır nişastası	5	Farklı firmalarca üretilmiş 250g’lık paketlerdeki ürünler
Mısır gevrekleri	3	Sade ve farklı aromalı çeşitler
Mısır çerezleri	6	Türkiye’ de üretilmiş ve ithal edilmiş farklı aroma ve özelliklerde
Konserve mısır	7	Cam kavanoz ve teneke kutuda tane ve bebek mısır konserveleri
Hazır toz çorbalar	3	4-5 kişilik tüketime hazır çorbalar
Toz tatlılar	3	4-5 kişilik tüketime hazır tatlılar
Ekstrüde mısırlı yiyecekler	2	Farklı firmalarca üretilen diyet yiyecekleri
Tane mısır	1	Organik mısır
Yem	2	Negatif kontrol amaçlı öğütülmüş halde

3.1.2 Primerler

Analizlerde kullanılacak primerler Iontek (İstanbul-Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Primerlerin seçimi Avrupa Birliği'nin onayladığı mısır ile ilişkin GMO listesi ile yurdumuzda girişine izin verilen GMO' lar dikkate alınarak yapılmıştır. Sentezlenen primerler German Federal Food Act-Food Analysis, Article 35 içinde yer alan ve Bt176, Bt11, MON810 ve T25'in PCR metodu ile tespitine yönelik olan 'Official Collection of Test Methods (2002)' dikkate alınarak sentezletilmiştir (Greiner ve diğ., 2005). Amplikon uzunlukları da yine aynı metoda göre elirlenmiştir. Mısır genine özgü ZEO1 ve ZEO2 primerleri ise Cardarelli ve diğ.(2005)' nin yaptıkları çalışma dikkate alınarak sentezlenmiştir.

Primer dizileri ve özellikleri Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2: PCR’ da kullanılan primer dizilimleri.

Sıra	Primer	Hedef	Primer dizisi	Amplikon Uzunluğu (bp)	Referans
1	Cry03	Bt176 (spesifik)	maize 5’- CTCTCGCCGTTTCATGTCCGT -3’	211	Official Collection of Test Methods (2002)
2	Cry04	Bt176 (spesifik)	maize 5’- GGTCAGGCTCAGGCTGATGT -3’	211	Official Collection of Test Methods (2002)
3	IVS2-2	Bt11 maize (spesifik)	5’- CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT -3’	189	Official Collection of Test Methods (2002)
4	PAT-B	Bt11 maize (spesifik)	5’- GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT -3’	189	Official Collection of Test Methods (2002)
5	VW01	MON810 (spesifik)	5’- TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG -3’	178	Official Collection of Test Methods (2002)
6	VW03	MON810 (spesifik)	5’- TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG -3’	178	Official Collection of Test Methods (2002)
7	T25-F7	T25 maize (spesifik)	5’- ATGGTGGATGGCATGATGTTG -3’	209	Official Collection of Test Methods (2002)
8	T25- R3	T25 maize (spesifik)	5’- TGAGCGAAACCCTATAAGAACCC -3’	209	Official Collection of Test Methods (2002)
9	ZEO1	Mısır öz geni	5’- TGCTTGCAATTGTTGCTCTCCTAG -3’	329	Cardarelli ve diğ.(2005)
10	ZEO2	Mısır öz geni	5’- GTCGCAGTGACATTGTGGCAT -3’	329	Cardarelli ve diğ.(2005)

3.1.3 Kullanılan ekipmanlar, kimyasallar ve çözelti ve tamponlar

Kullanılan kimyasallar, tamponlar ve tedarikçiler EK A, EK B ve EK C’ de belirtilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Örnek hazırlama

Örnek hazırlama British Standard BS EN ISO 21571:2005’ deki talimatlara uygun olarak yapılmıştır. Standarttaki talimatlar aşağıda aşama aşama detaylandırılmıştır. Katı haldeki numuneler önce öğütülerek iyice harmanlanmıştır. Numune tartımları genellikle 100-300 mg aralığındadır. Bebek devam sütü gibi sıvı ürünlerden numune almadan önce ürün iyice çalkalanmıştır. Numuneler arasında kontaminasyon olmaması için kullanılan ekipmanlar temizlenmiş ve steril olarak çalışılmıştır.

3.2.2 DNA ekstraksiyonu(izolasyonu)

DNA izolasyonu için iki farklı ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Bunlardan ilki “home-made/kitsiz” bir yöntem olan CTAB ekstraksiyon metodu (ISO 21571:2005’ e uygun olarak), diğeri ise ticari bir GMO Tarama Kiti’ (Biotecon Diagnostics)dir. Ticari kitlerin maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle kitin kullanılacağı numuneler CTAB ekstraksiyon metodu ile tahminlenmiştir.

3.2.2.1 CTAB ekstraksiyon metodu

CTAB metodunun tercih edilme sebebi, polisakkaritleri ve polifenolik bileşikleri uzaklaştırma kabiliyetidir. Günümüzdeki pek çok laboratuvar da bu ekstraksiyon tekniğini kullanmaktadır.

Ekstraksiyon

Homojenize edilmiş ürünlerden matris türlerine göre ortalama 200-300 mg numune steril tüplere tartılmıştır. 65°C’ ye ön ısıtılmış CTAB ekstraksiyon tamponundan içinde numunelerin olduğu her bir tüpe 1.5 mL eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Gereken numunelere biraz daha CTAB ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Sonraki aşamada tüplere 10 µL α -amilaz çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. 30 dakika boyunca 65°C’ de (ara sıra karıştırmak kaydıyla) inkübe edilmiş, bu süre sonunda her bir tüpe 10 µL proteinaz-K çözeltisi eklenerek, tüpler hafifçe karıştırılmıştır ve

yine 30 dak boyunca 65°C’ de (ara sıra karıştırarak) inkübasyon uygulanmıştır. Ardından tüpler 12 000 g hızda 10 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant (üstte yüzen kısım) yeni tüplere aktarılarak üstlerine 1 hacme karşılık 0,7 hacim kloroform eklenmiş ve tüpler iyice karıştırılmıştır.

Tüpler 12 000 g hızda 15 dak santrifüj edilmiş, üstte yüzen faz (sulu) yeni tüplere transfer edilmiştir.

CTAB-çöktürme

Tüplere 2 hacim CTAB çöktürme tamponu eklenerek, tüpler karıştırma olmaksızın oda sıcaklığında 60 dak inkübe edilmiştir. Ardından tüpler 12 000 g hızda 15 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, çöken DNA 350 µL NaCl çözeltisi eklenerek çözülmüştür. Sonraki aşamada tüplere kloroform eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 12 000 g hızda 10 dak’ lık santrifüjün ardından sulu faz yeni tüplere aktarılmıştır.

DNA-çöktürme

Tüplere 0,6 hacim izopropanol eklenerek tüpler alt üst edilerek hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında 20 dak boyunca bekletilmiştir. Süpernatantın atılmasından sonra tüplere 500 µL etanol çözeltisi (%70) eklenmiş ve birkaç kere tüpler alt üst edilmiştir. Bu aşama CTAB’ in uzaklaştırıldığı kritik aşamadır. 12 000 g hızda 10 dak’ lık santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Pellet kurutulmuş ve 100 µL suda yeniden çözülerek, analizde kullanılacağı zamana kadar tüpler -20 °C’ de saklanmıştır.

3.2.2.2 GMO numune hazırlama kiti ile izolasyon

Bu ticari kitle, ekstraksiyonun gerçekleştirilmesinde kitin temin edildiği firmanın kitle beraber verdiği prosedür aşamaları sırasıyla uygulanmıştır. Bu aşamalar sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

Homojenize edilmiş 200 mg numuneler 2 mL’lik tüplere tartılmış ve her bir tüpe Ekstraksiyon tamponundan 1’ er mL eklenmiştir. 30 san. süre ile tüpler vorteklenmiş ve 80 °C’ de 30 dak boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca 2-3 kere tüpler alt üst edilmiş, eğer numune ekstraksiyon tamponunu tamamen absorbe ettiyse biraz daha tampon ilave edilmiştir.

- a) Tüplere 12,000 g hızda 10 dak boyunca santrifüj uygulanmıştır.
- b) Yeni 2 mL' lik tüplere Bağlayıcı tampondan 400 µL koyulmuş, santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatant kısımlar (600 µL) bağlayıcı tamponun olduğu tüplere transfer edilmiş ve pipetleme yoluyla tüpler hafifçe karıştırılmıştır.
- c) Sonraki basamakta tüplere 80 µL Proteinaz-K çözeltisi eklenerek 72 °C' de 10 dak boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- d) Bu aşamada tüplere 200' er µL izopropanol eklenmiş ve tüpler pipetle iyice karıştırılmıştır.
- e) Kit içinden çıkan filtre tüpü ve toplama tüpü üst üste koyularak tüp toplama sistemi oluşturulur. Tüpteki karışımlardan 650 ' şer µL alınarak tüplerin filtre kısmına bırakılmış ve mikrosantrifüjde 5,000 g hızda 1 dak boyunca santrifüj yapılmıştır.



Şekil 3.1 : Filtre tüpü ve toplama tüpünden oluşan takım.

- f) Filtreden geçerek toplama tüplerinde biriken kısım atılarak tüplerde kalan karışımlar da filtre tüplerine aktarılmış santrifüj ve filtreden geçen kısımların atıldığı aşamalar tekrarlanmıştır.

g) Filtreden geçen kısım atılarak, 'h' aşaması tekrarlanmıştır.

h) Filtreden geçen kısım atılmış ve kalan Yıkama Tamponunu da uzaklaştırmak için 13,000 g hızda 1 dak boyunca santrifüj yapılmıştır.

i) Filtre tüpleri 1,5 mL'lik temiz reaksiyon tüplerine yerleştirilerek, içlerine 70 °C' ye ön ısıtılmış Elüsyon Tamponu (50 µL) konulmuştur. 15-25 °C' de 5 dak. lık inkübasyonun ardından, 5,000 g hızda 1 dak boyunca santrifüj yapılmıştır.

j) Böylece numunelere ait DNA' lar mikrosantrifüj tüplerinde toplanmıştır.

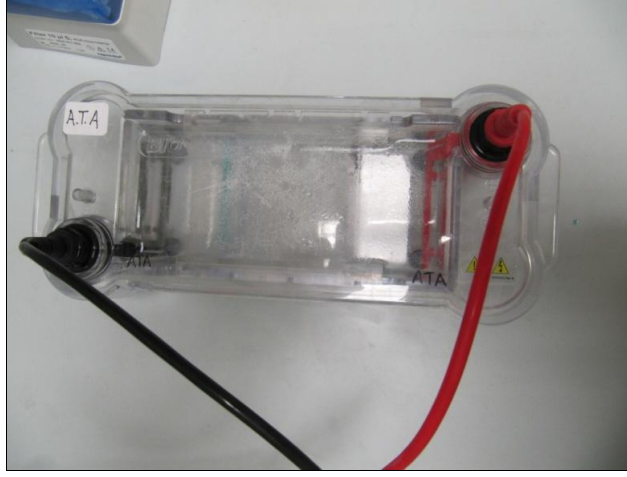
k) Analizde kullanılacağı zamana kadar tüpler -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.3 Agaroz jel elektroforez

Bu aşamada ekstraksiyon sonucunu görmek için ekstraktlara agaroz jel elektroforez uygulanmıştır. Buradaki amaç, elde edilen görüntülere göre, mısır DNA' sının kabul edilebilir düzeyde/düzgün bir şekilde ekstrakte edildiği örneklerin belirlenmesi ve böylelikle PCR' da amplifiye edilecek örneklerle karar verilmesidir.

Diğer taraftan, her iki ekstraksiyon metodunun da uygulandığı aynı örneklerle ait DNA' ların görüntüleri mukayese edilerek, bu iki metodun performanslarının karşılaştırılması, ekstrakte edilen DNA'nın kalitesinde ve miktarında farklılık yaratıp yaratmadıklarının gözlemlenmesi ve CTAB gibi home-made bir ekstraksiyon metodu ile yapılan izolasyonun başarısının da sağlanmasının yapılması amaçlanmıştır.

Ekstrakte edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde, ekstrakte edilen DNA (4 µL), 2 µL yükleme boyasıyla karıştırılarak jele yüklenmiş, ilerlemenin gözlemlenebilmesi için jele 2,5 µL de marker yüklenmiştir. DNA izolatları % 1'lik agaroz jel üstünde, 110 V' luk sabit voltajda 20 dak boyunca, etidyum bromür (1.2 µL) içeren TAE tamponu içinde ayrılmıştır. Elde edilen ekstraktların elektroforez sonuçlarına bakılarak PCR' da amplifiye edilip edilmeyeceklerine karar verilmiştir.



Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan jel elektroforez hücresi (BIORAD mini sub cell GT).

Görüntüleme UV-transilluminatör içinde yapılmış ve görüntüler BIORAD GELDOC kamera ve dokümantasyon sistemiyle kaydedilmiştir.



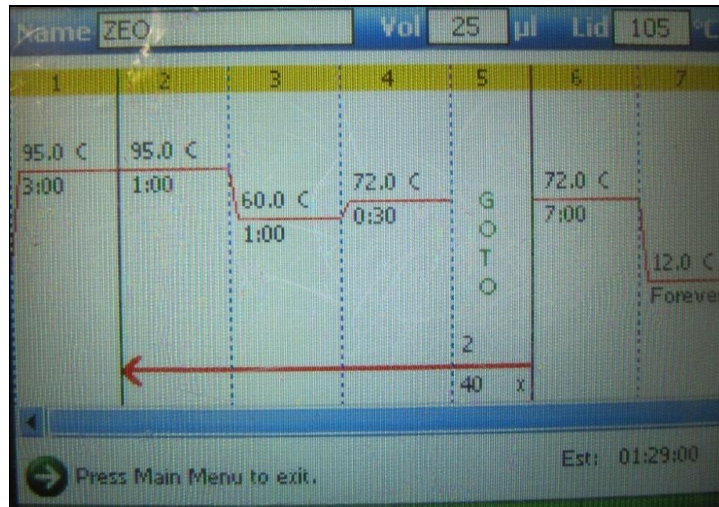
Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan görüntüleme ve kayıt cihazı (BIORAD).

3.2.4 Kalitatif PCR

PCR’ da amplifikasyon 0.2 mL’ lik tüplerde 1.0 μ L DNA preparatı içeren 25 μ L’lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Buna göre PCR öncesi yapılan hazırlık aşamasında her bir tüp içine 17,75 μ L PCR suyu, 2,5 μ L tampon, 0,5 μ L forward primeri, 0,5 μ L reverse primeri, 2,5 μ L dNTP (deoksinükleotidtriphosphate) bazı, 0,25 μ L Taq polimeraz enzimi ve 1 μ L de ekstrakte edilen DNA koyularak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.



Şekil 3.4: Çalışmada kullanılan PCR cihazı (BIORAD C1000 thermal cycler).



Şekil 3.5: PCR’ da amplifikasyonun programlanması.

Primerlere ait PCR programları Çizelge 3.3’ deki gibi cihaza yüklenerek amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezde analiz edilene kadar -20 °C’ de bekletilmiştir.

Çizelge 3. 3: Çalışmada kullanılan genetik modifiye mısır genlerinin DNA dizilerine göre PCR programları (Greiner ve diğ., 2005; Greiner ve Konietzny, 2008).

	GMO3/	Cry03/	IVS2-2/	VW01/	T25-F7/	ZEO1/
	GMO3	Cry04	PAT-B	VW03	T25-R3	ZEO2
Başlangıç denaturasyonu	10 dak, 95 °C	10 dak, 95 °C	10 dak, 95 °C	10 dak, 95 °C	10 dak, 95 °C	3 dak, 95 °C
Döngü sayısı	35	40	40	40	40	40
Denaturasyon	30 sn., 95 °C	30 sn., 95 °C	30 sn., 95 °C	30 sn., 95 °C	30 sn., 95 °C	60 sn., 95 °C
Annealing*	30 sn., 60 °C	30 sn., 64 °C	30 sn., 64 °C	30 sn., 64 °C	30 sn., 64 °C	60 sn., 64 °C
Uzama	25 sn., 72 °C	30 sn., 72 °C	30 sn., 72 °C	30 sn., 72 °C	30 sn., 72 °C	60 sn., 72 °C
Son uzama	7 dak, 72 °C	7 dak, 72 °C	7 dak, 72 °C	7 dak, 72 °C	7 dak, 72 °C	7 dak, 72 °C

* Annealing, primerların ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşme ve tekrar ayrışması olayı.

3.2.5 Agaroz jel elektroforez

İkinci bir elektroforez PCR ürünlerine yapılmıştır. Bunun amacı ise elde edilen PCR ürünlerinin ampikon uzunluklarını yüklenen marker ile karşılaştırılarak doğrulamaktır.

3.2.6 Real-time PCR

Real-time PCR, analizlerde kullanılan LightCycler®480 II cihazına göre tasarlanmış olan FoodProof GMO Kit protokolündeki talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Hem CTAB hem de ticari kitle başarılı bir şekilde ekstrakte edilebilen DNA' lar için Real-time PCR uygulanmıştır.



Şekil 3.6: Çalışmada kullanılan LightCycler® 480 II.

Ayrıca transgenik tarımsal bitkilerin çoğunun *Cauliflower Mosaic Virüs*'ünden transfer edilen 35S promotör ve/veya *Agrobacterium*' dan transfer edilen NOS terminatörü içermesi nedeniyle bu genetik elementler genel GMO taramasında hedef gen dizileri olarak kullanılmaktadırlar (Greiner ve diğ., 2005; Official Collection of Test Methods, 2001). FoodProof GMO Kiti de test edilen numunelerdeki terminatör ve promotör kısımlarının taranmasında kullanılmaktadır.

Kitin içindeki materyallerin muhafazasında kitteki talimatlara aynen uyulmuştur. Ayrıca tüm deneylerde olduğu gibi çapraz kontaminasyonu önlemek için;

- Kit sıvıları laboratuardaki diğer sıvılardan ve kimyasallarda ayrı saklanmıştır,
- Steril laboratuvar alet ve ekipmanları kullanılmıştır,
- Deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında eldiven giyilerek çalışılmıştır,
- Numuneler ve analiz kimyasalları arasında çapraz kontaminasyonu önlemek için steril pipet uçları kullanılmıştır,
- DNA ekstraksiyon, PCR kurma ve PCR aşamaları birbirinden ayrı odalarda yapılmıştır,
- Kitin ekstraksiyon ve PCR kimyasalları ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.2.6.1 Real-time PCR için kullanılan ajanlar

a) Pozitif Kontrol:

Numunelerle birlikte her zaman 35S/NOS PCR'ı için bir adet, bitki geni PCR' ı için bir adet pozitif kontrol PCR' da çalışılmıştır. Böylece PCR' dan (cihazdan) kaynaklanan herhangi bir hatanın olup olmadığı anlaşılmaktadır.

b) Negatif Kontrol:

Numunelerle birlikte her zaman 35S/NOS PCR'ı için bir adet, bitki geni PCR' ı için bir adet negatif kontrol PCR' da çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak DNA template'i PCR kalitesindeki suyla yer değiştirilerek hazırlanır. Negatif kontrolün kullanılmasının nedeni ise reaksiyon saflığını gözlemlemek ve çapraz kontaminasyon olup olmadığını anlamaktır.

3.2.6.2 PCR karışımlarının hazırlanması

Kit protokolüne göre reaksiyon hacmi 20 µL olarak hazırlanmıştır. 35S/NOS-PCR' ı ile Bitki-PCR' ı kitte bulunan Master karışımlarla ayrı ayrı kurulmuştur. Önce -20 °C' de stoklanan sıvılar çözülerek çok kısa bir süreliğine hızla santrifüj edilmiş ve sonra da pipet yardımıyla dikkatle karıştırılmıştır.

0.5 mL’lik reaksiyon tüplerine PCR karışımları aşağıdaki gibi hazırlanarak, pipet yardımıyla yavaşça ve iyice karıştırılmıştır. Aşağıda verilen hacimler tek bir reaksiyon içindir. Örnek sayısı ile çarpılarak çoğaltılır.

Çizelge 3. 4: Real-time PCR reaksiyonu için karışım miktarları.

Bileşen	Hacim
Foodproof 35S/NOS Master Mix veya Foodproof Plant Gene Master Mix	13 µL
Foodproof GMO Screening Enzim Çözeltisi	1 µL
Foodproof GMO Screening Boya Çözeltisi *	1 µL*
Toplam hacim	15 µL (14 µL)

* Opsiyoneldir fakat daha iyi bir görüntüleme için tavsiye edilmektedir.

Bu karışım pipetle yavaşça ve iyice karıştırılmıştır. PCR miksten her kuyucuğa 15 µL pipetle paylaştırılmış, ve her bir kuyucuğa analiz edilmek istenen DNA örneklerinden 5’ er µL eklenmiştir.

Yine içinde PCR miksinin bulunduğu iki kuyucuk (15 µL) içerisine DNA numuneleri yerine pozitif kontrolden 5’ er µL eklenmiştir. Aynı işlem negatif kontrol için de yapılmıştır. Kuyucukların olduğu plaka sızdırmaz optik folyo ile sarılarak PCR’ a sokmadan önce 1,500 g hızda 30 san boyunca santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.7: Reaksiyonların gerçekleştiği kuyucuklar.

Kit içinde NOS ve 35S bölgelerini hedefleyen farklı problemlerin bulunduğu karışımlar (35S/NOS Master Mix) amplifikasyonu sonucunda bu iki bölgenin herhangi birinin ya da ikisinin de bulunduğunu kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır.

Bu amaca yönelik olarak real-time PCR sonuçları cihazdaki (610 ve 660/670 olmak üzere) iki kanalda incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde incelenen nm aralıkları Çizelge 3.5’ te gösterilmektedir.

Çizelge 3. 5: Real-time PCR cycle sonuçlarının değerlendirilmesi.

Kanal 610’ daki pozitif sonuç Foodproof plant gene master mix içindeki	Kanal 610’ daki pozitif sonuç Foodproof 35S/NOS master mix içindeki	Kanal 660/670’ deki pozitif sonuç Foodproof 35S/NOS master mix içindeki
Bitki geninin varlığını göstermektedir	NOS-terminatörün varlığını göstermektedir	35S-promotörün varlığını göstermektedir

3.2.7 Belli bazı GMO’ların PCR’ la numunelerde aranması

Bu aşamada MON 810, Bt 11, Bt 176 ve T25 Starlink GMO’larının GDO’lu olduğu Real-time PCR’ la tespit edilen numunelerde var olup olmadığı analiz edilmiştir. Bunun için Bölüm 3.2.4’ te belirtilen prosedürler takip edilmiş, Çizelge 3.2’ deki primerler kullanılmıştır.

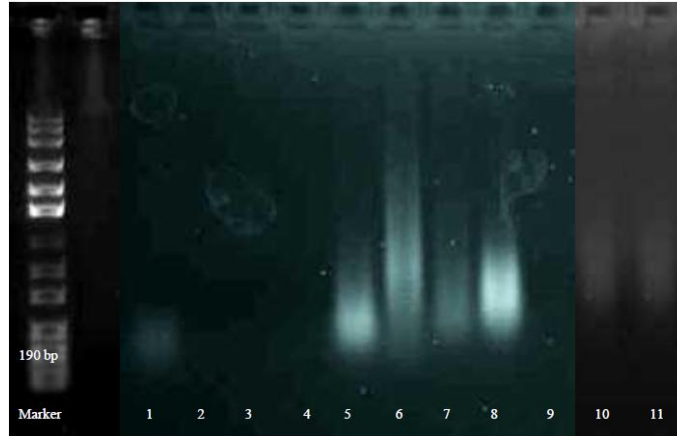
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 DNA Ekstraksiyonu

4.1.1 CTAB metodu ile DNA ekstraksiyonu

4.1.1.1 Bebek gıdaları için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları

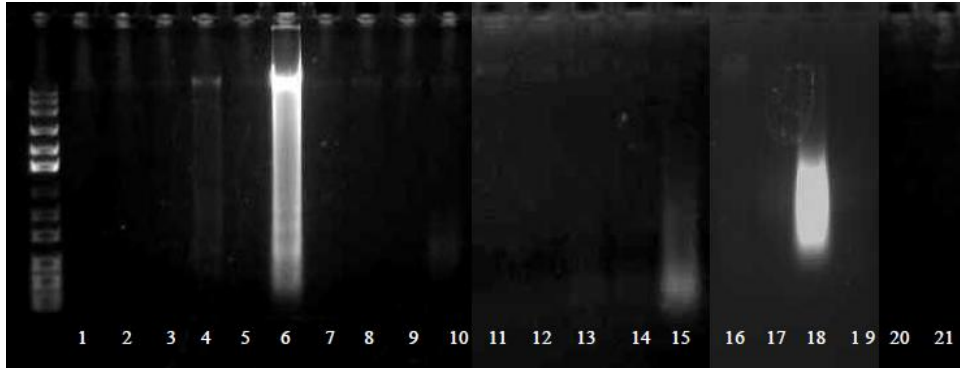
Çeşitli süpermarketlerden satın alınan bebek gıdalarının DNA izolasyonu CTAB metodu kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonunun jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Bebek gıdalarından çok az miktarda DNA elde edilmiş olup, CTAB metodu ile bu örneklerden çok olumlu sonuçlar alınamamış, ya degrade olmuş DNA elde edilmiş ya da DNA elde edilememiştir. Ayrıca, bu örneklerin PCR sonuçlarına göre de amplifiye olmaya yetecek kadar mısır DNA' sının ekstrakte edilemediği görülmüştür. Bunun olası nedeni mısır bileşenlerinin, DNA ekstraksiyonuna yetecek miktarlarda, örneklerde bulunmaması ve bazı ürünler için yüksek ısıl işlemin uygulanmasıdır. Cardarelli ve diğ.'nin (2005) yaptığı çalışmada da benzer ürünlerden DNA ekstrakte edilememiştir.



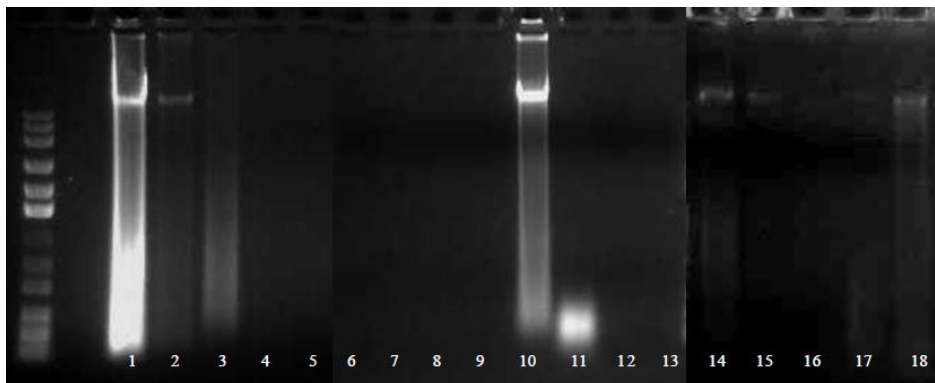
Şekil 4.1: Bebek gıdaları için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları: 1, 2, 3 ve 4 no' lu örnekler hazır karışım gıdalar, 5, 6, 7, 8, 10 ve 11 no'lu örnekler toz ek gıdalar, 9 no'lu örnek devam sütü.

4.1.1.2 Diğer gıdalar için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları

DNA izolasyonunun jel görüntüleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. CTAB metodu ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarında izole edilebilen DNA verimi oldukça düşüktür. Elde edilen en iyi DNA sonuçları ise en az prosese maruz kalmış olan mısır unu örneklerinden elde edilebilmiştir. Buna göre, Margarit ve diğ.nin (2006) farklı mısır örnekleri için yaptıkları çalışmayla benzerlik gözlenmiş, bu çalışmada da ancak ezilmiş mısır taneleri, pişirilmemiş polenta gibi prosese girmemiş ürünlerden ancak DNA izole edilebilmiş, mısır gevreği, mısırozü yağı, mısır şurubu gibi ileri derecede prosese tabii tutulmuş ürünlerden amplifiye edilebilir ya da mısır DNA'sı olduğu tespit edilebilen DNA izole edilememiştir.

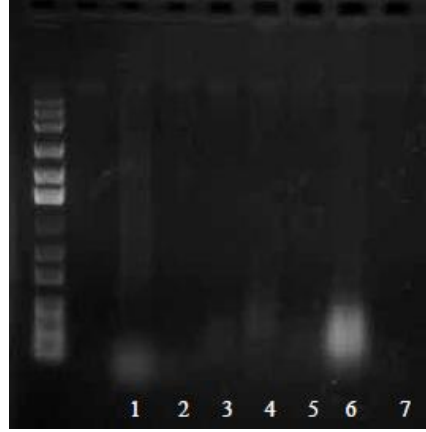


Şekil 4.2: Diğer örnekler için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları a): 1-Yem, 2 ve 4 hazır çorba, 3, 6, 11, 18- mısır unu, 5, 16-kavrulmuş mısır çerezi, 7, 12, 19-mısır nişastası, 8, 9, 10, 17-toz pudingler, 13, 14, 15-konserve mısır, 20-mısır gevreği, 21-Taco mısır çerezi.

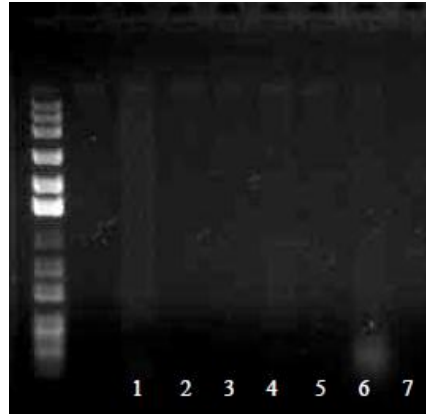


Şekil 4.3: Diğer örnekler için CTAB' la ekstraksiyon sonuçları b): 1,10,11,14,15- Mısır unu, 2- mısır gevreği, 3, 4, 5- mısır nişastası, 6, 7- ekstrüde mısırlı diyet ürünler, 8-patlamış mısır, 9- hazır çorba, 12, 13- bebek mısır konserveleri, 16-mısır gevreği, 17- tortilla cipsi, 18- konserve mısır.

Agaroz jel elektroforez sonuçlarından sonra izole edilen DNA' nın mısır genine ait olup olmadığını kontrol etmek için bazı örnekler için PCR denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerden bir tanesinde, altı örnekten oluşan bir grup (3 mısır unu, 2 mısır çerezi ve 1 Bakanlık numunesi) seçilmiş, PCR bu örnekler için hem ZEO1/ZEO2 primer çifti (mısır geni), hem de Cry03/Cry04 primer çifti (Bt 176 geni) ile uygulanmıştır. Ancak iyi sonuçlar elde edilememiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Diğer PCR denemeleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.4: ZEO1/ZEO2 [329 bp]: 1, 4, 5-Mısır unu, 2, 3- mısır çerezi 6-Bakanlık numunesi 7- negatif kontrol.



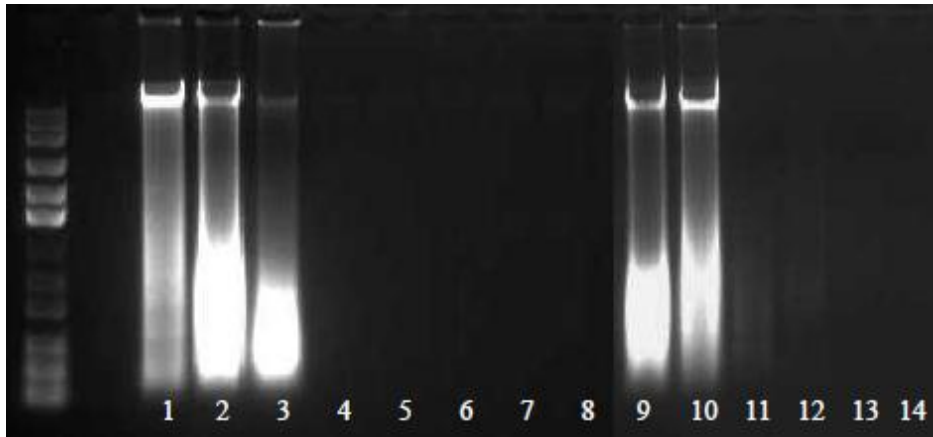
Şekil 4.5: Cry03/Cry04 [211 bp]: 1, 4, 5-Mısır unu, 2, 3- mısır çerezi 6-Bakanlık numunesi 7- negatif kontrol.

Buna neden olarak, bazı örneklerde bulunan mısır miktarının amplifiye etmeye yetecek düzeyde olmaması, analiz edilen çoğu ürünün ileri derecede prosesten geçen ürünler olmaları nedeniyle DNA'larının degrade olması, tespit edilmek istenen DNA birimlerinin CTAB metodu ile ekstraksiyon sırasında daha küçük parçalara ayrılması ya da Greiner ve diğ. nin (2005) yaptıkları çalışmada belirttikleri gibi CTAB

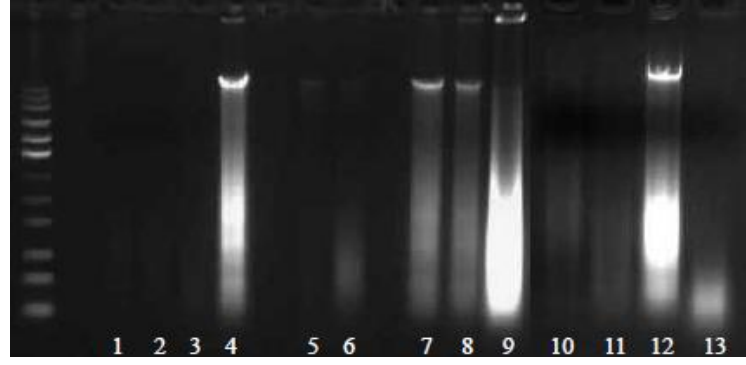
metodunu ile izole edilebilen DNA'nın saflığının düşük olması gösterilebilir. Cardarelli ve diğ. nin (2005) farklı gıdalarda yaptıkları çalışmada konserve mısır ve çorbalardan amplifiye edilebilen DNA ekstrakte edilememiştir.

4.1.2 Test kiti ile DNA ekstraksiyonu

CTAB metodu ile DNA izolasyonunun yapıldığı numunelerden 27' sinde ayrıca Test Kiti ile izolasyon çalışması da yapılmıştır. Buradaki amaç ekstraksiyon metotlarının performans ve sonuçlarda farklılık yaratıp yaratmadıklarını gözlemlemektir. Test kitiyle yapılan izolasyon daha etkin sonuçlar vermiş, mısır unu numunelerinden daha fazla miktarda DNA izole edebilmiştir. Miktar ölçümünde zaman zaman Qubit cihazı kullanılmıştır. Diğer taraftan izolasyonun sağlandığı ürünler incelendiğinde DNA ekstraksiyonunda en başarılı sonuçların yine mısır unu örneklerinden sağlandığı görülmüştür. Ekstraksiyon sonuçlarını gösteren jel görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 ile gösterilmektedir.



Şekil 4.6: Ticari test kiti ile ekstraksiyon sonuçları a) 1,2,10 -Mısır unu, 3,4- ekstrüde mısırlı diyet ürünü, 5- hazır çorba, 6,7-bebek mısır konservesi, 8-patlamış mısır, 9- tane mısır, 11-mısır gevreği, 12,13,14- mısır nişastası.



Şekil 4.7: Ticari test kiti ile ekstraksiyon sonuçları b) 1,2,3 – Konserve mısır, 4,7,8,12 – mısır unu, 5- mısır çerezi, 6-Taco mısır çerezi, 8- patlamış mısır, 9- Bakanlık numunesi, 10 – bebek ek gıdası, 11-Taco cips, 13 - mısır gevreği.

Test kiti ile mısır unu numunelerinin haricinde, bazı mısır çerezlerinden ve gevreklerinden parçacıklar halinde az da olsa DNA ekstrakte edilebilmiştir. Konserve mısırdan her iki yöntemle de DNA izole edilememiştir. Bunun sebebi ise DNA'nın 92 °C civarında denature olmasıdır. Çünkü konserve işlemi 92 °C' den daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Diğer taraftan, cips, bebek gıdası, ürünlerinden degrade olmuş DNA elde edilmiş ya da DNA elde edilememiştir. Bu sonuçların, konuyla ilgili yapılmış olan diğer çalışmaların verileriyle örtüştüğü ve ayrıca ham materyalin(mısır) işlenme aşamaları arttıkça izole edilen DNA konsantrasyonu/kalitesinin de giderek azaldığı görülmüştür, bu durum Margarit ve diğ. nin (2006) yaptığı çalışmanın sonucuyla uyum göstermektedir. Buna ek olarak, Sanhoty ve diğ. nin (2002) yaptığı çalışmada, Mısır'da değişik marketlerden toplanan gıda ürünlerinde genetiği değiştirilmiş mısır ve soyanın belirlenmesi amaçlanmış, DNA izolasyonu sonrasında işlenmiş ürünlerden elde edilen DNA konsantrasyonu, tohumlardan elde edilen DNA konsantrasyonundan daha düşük bulunmuştur. İşlenmiş ürünlerdeki DNA konsantrasyonunun yok denecek kadar az bulunmasına neden olarak, bu ürünlerin pişirilme esnasında yüksek sıcaklığa maruz kalmaları ve dolayısıyla DNA'ların yüksek sıcaklıkta degrade olması gösterilmiştir. Greiner ve diğ. nin (2005) çalışma sonuçlarına göre gıdaların depolanma sıcaklıkları da DNA konsantrasyonuna etki etmektedir.

Bu çalışmada, ticari olarak temin edilen test kiti CTAB metoduna göre DNA izolasyonunda daha başarılı olmuştur. Bu sonuca ilişkin olarak örneklerin ekstraksiyonunda kullanılan metotların(CTAB ve ticari test kiti) ekstraksiyondaki

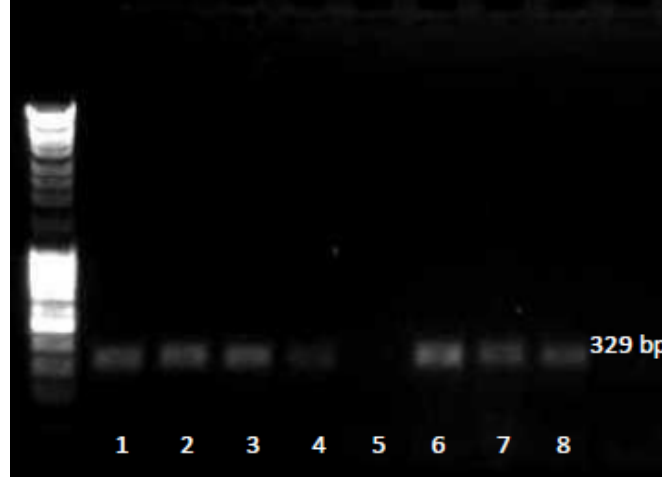
başarıları Çizelge 4.1’ de gösterilmektedir. Elde edilen bu sonuçlar çeşitli çalışmaların sonuçlarıyla örtüşmektedir (Vijayakumar ve diğ., 2009; Mafra ve diğ., 2008; Smith ve Maxwell, 2007). Ayrıca Moriuchi ve diğ.(2007)’ nin RRS soyanın tespit edilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada analiz edilen örneklerde başarılı tespitler yapılmış ancak fabrika üretimi gıdalarda çok başarılı sonuçlar elde edilememektedir yorumu getirilmiştir.

Çizelge 4. 9: İzolasyon sonuçlarının ürünlere göre karşılaştırılması.

Ürün	Ticari Test Kiti	CTAB
Mısır unu	+	+
Mısır nişastası	-	-
Bebek gıdaları	-	-
Mısır gevrekleri	+	-
Mısır cipsleri	-	-
Çerezler	+	-
Ekstrüde mısırlı diyet ürünleri	+	-
Toz çorbalar ve tatlılar	-	-
Konserve mısır	-	-
Yemler	+	+
Tane mısır	+	+

Diğer taraftan bazı araştırmacıların gıda materyallerinde yapmış oldukları DNA izolasyonlarında pozitif sonuç almalarındaki nedenin farklı izolasyon kiti ve/veya farklı gıda materyalleri kullanmaları olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada DNA örneklerden izole edildikten sonra yine izolasyonun net olarak gözlenebildiği örnekler başta olmak üzere, bazı denemeler yapılmış ve *Zein geninin* (mısır geni) varlığını kontrol etmek için PCR’ da amplifikasyon işlemi uygulanmıştır. Amplifikasyon sonrasında yapılmış olan jel görüntüsünde (Şekil 4.8) 5 no’lu örnek hariç diğer örneklerde zein geni için beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir. Dolayısıyla zein geni bulunan gıda örneklerinin içeriğinde mısır bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8: Jel görüntüsü: 1,2,3,6,7–mısır unu, 4- mısır gevreği, 5-mısır nişastası, 8-tane mısır.

4.2 DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerin GDO' lu Olup Olmadığının

Belirlenmesi

4.2.1 Örneklerin 35S promotör ve NOS terminatör ile Taranması

DNA'ları izole edilen ve mısır içeren işlenmiş ürünlerde GDO varlığının belirlenmesi için GDO belirlemede ilk adımı oluşturan 35S promotör ve NOS terminatör taraması yapılmıştır. Bu aşamada LightCycler Real-time PCR kullanılmıştır. Taramada cihaza ait protokol takip edilmiş olup, CTAB ve ticari test kiti ile başarılı bir şekilde izolasyonun gerçekleştirildiği örnekler kullanılmıştır. Ayrıca DNA'sı hem CTAB hem de ticari test kiti ile izole edilmiş örnekler de aynı anda PCR' a sokularak izolasyon metotlarının karşılaştırılmasına imkan yaratılmıştır.

PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye başlanmıştır. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CP - eşik cycle/döngü) hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılı olduğundan, değerlendirmede CP_{Bitki} ve $CP_{35S/NOS}$ değerlerine bakılmıştır. LightCycler sisteminde; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar kullanılmış ve amlifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmüştür. PCR' da 35S ve NOS bölgelerine özel probler kullanılması, örnek DNA dizilerinde 35S ve NOS varlığının kalitatif olarak belirlenmesinin temel prensibini oluşturmuştur.

Bir örneğin mısır geni taşıdığını anlamak için CP_{Bitki} değerine, 35S/NOS kontrolü için de $CP_{35S/NOS}$ değerine bakılmıştır. Bu değerlerin grafik standart eğrisinin üstünde değerler olması pozitif sonuç anlamına gelmektedir.

Aşağıdaki çizelgelerde farklı tarihlerde gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre örneklerin DNA'larına ait pik eşik döngü değerleri (CP) verilmiştir.

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 incelendiğinde örnek adlarının üs değerlerinde çeşitli sembol/rakamlar görülmektedir. Aynı örnek adı ve aynı üs rakamına/sembolüne sahip ürünler aynı ürünlerdir anlamına gelmektedir. Aynı örnek adı ve farklı üs rakamı/sembolü ise farklı bir markanın aynı tür örneği anlamına gelmektedir. Buna göre 1 ve 3, 2 ve 4, 11 ve 14 örnek çiftleri aslında aynı örneklerle ait çiftler olup ancak DNA'larının ekstraksiyon metodu farklıdır. Buna göre 1 ve 3 no'lu örneklerle ait sonuçlar karşılaştırıldığında her iki ekstraksiyon metodu ile de mısıra özgü *zein geni* tespit edilebilmiş ancak genetik modifikasyonun göstergesi olan 35Spromotör/NOS terminatör söz konusu olduğunda test kitiyle izole edilen DNA'da 35S/NOS tespit edilebilmişken CTAB metodu ile ekstraksiyonda tespit edilememiştir.

Aynı durum 2 ve 4 no'lu örnekler için de geçerlidir. Bu durumun, CTAB metodu ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen DNA'nın kalitesinin test kitleriyle elde edilen DNA kalitesine göre daha düşük olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca daha önce de belirtildiği gibi, izolasyon tekniklerinin karşılaştırıldığı diğer çalışmalardan Mafra ve diğ. (2008)'nin yaptığı çalışmada Nucleospin ve Genespin kitleri ile CTAB ekstraksiyon metodu karşılaştırılmış, ticari kitlerle en iyi DNA verimi elde edilirken, CTAB en kötü sonucu vermiştir. Buna ek olarak, Smith ve Maxwell (2007)'in yaptıkları çalışmada ise Qiagen, Nucleospin test kitleri ile Kingfisher, CTAB ve Wizard izolasyon metodları karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda izole edilen DNA'nın kalitesi açısından en iyiden en kötüye sıralama Qiagen, Nucleospin, Kingfisher, CTAB ve Wizard şeklinde olmuştur. İncelenen bu çalışmaların sonucunda, doğru ticari test kitlerinin CTAB metoduna göre çok daha başarılı sonuçlar verdiği ifade edilmektedir. Bu açıdan, bu tez çalışmasında da literatürdeki çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4. 10 Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin NOS terminatör ve bitki geni varlığı için pik başlangıç döngü değerleri(CP).

No	Örnek	Pozisyon 35S/NOS	CP _{NOS} (498-610 nm)	Pozisyon Bitki geni	CP _{Bitki}	İzolasyon Metodu
1	Tane mısır ¹	A1	10.51	A3	14.80	Test kiti
2	Mısır unu ²	B1	29.63	B3	13.92	Test kiti
3	Tane mısır ¹	C1	-	C3	18.01	CTAB
4	Mısır unu ²	D1	-	D3	15.89	CTAB
5	Mısır unu ³	E1	34.09	E3	14.58	Test kiti
6	Mısır unu ⁴	F1	38.37	F3	15.22	Test kiti
7	Mısır unu ⁵	G1	5.00	G3	15.80	Test kiti
8	Yem	H1	-	H3	27.25	Test kiti
9	Mısır unu ⁶	A2	-	A4	22.73	CTAB
10	Mısır pat.diyet ür.	B2	10.60	B4	19.65	CTAB
11	Hazır çorba*	C2	-	C4	17.54	CTAB
12	Mısır unu ⁷	D2	-	D4	17.60	Test kiti
13	Mısır unu ⁸	E2	-	E4	20.83	Test kiti
14	Hazır çorba*	F2	-	F4	17.53	Test kiti
15	Pozitif kontrol	G2	28.08	G4	29.74	-
16	Negatif kontrol	H2	-	H4	-	-

Çizelge 4.2’ deki CP35S/NOS değerleri incelendiğinde 1,2,5,6,7 ve 10 no’lu örneklerin genetik modifiye mısır içeren ürünlere ait DNA’ lar olduğu düşünülmektedir. Ancak kesin karara floresans - CP eğrileri analizinden sonra varılmıştır. Burada yararlanılan prensip, Real-time PCR’ ın çalışma prensibidir:

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Buradan yola çıkarak, çift zincirli DNA’ya bağlandıkları zaman floresans veren boyalar (örneğin bu çalışmada olduğu gibi, cyber green) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı floresans miktarı ile ölçülmüştür. Grafiklerdeki eğrilerde gözlemlenen düşüşün nedeni ise, çift zincirli DNA’ nın denatüre olmaya başlayınca boyanın serbest kalması ve bu nedenle ölçülen floresans miktarının düşmeye başlamasıdır.

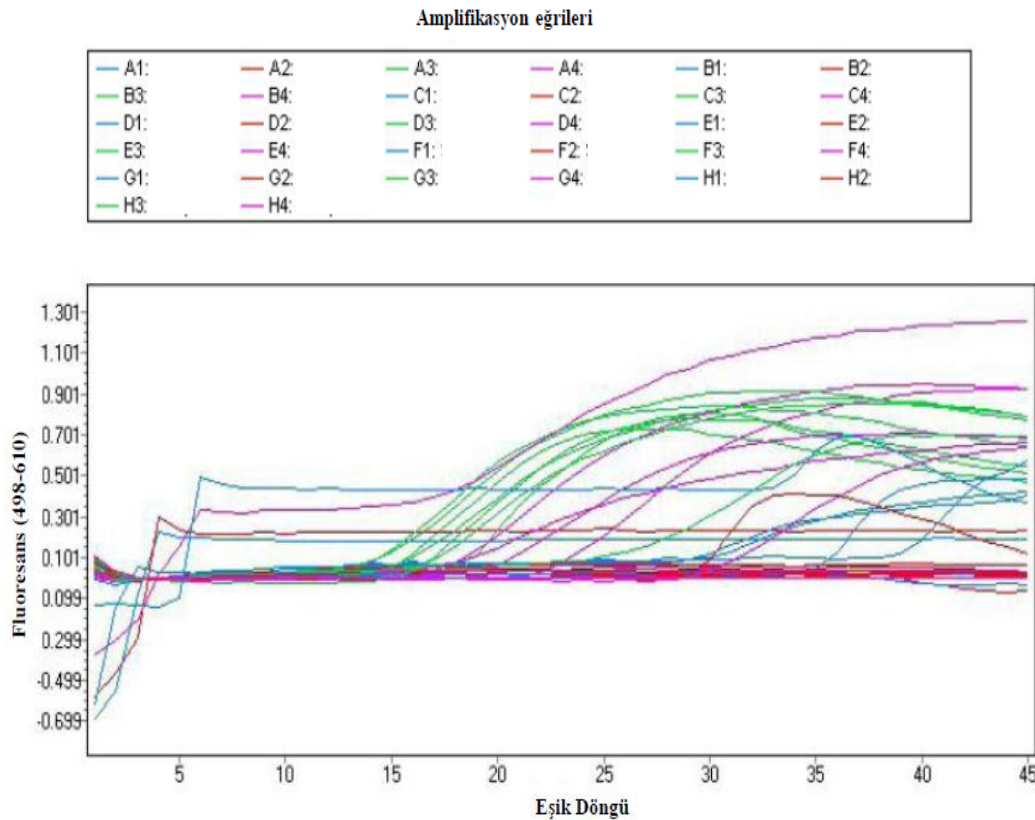
Çizelge 4.3’ e göre, üç örnekten yalnızca 1 no’ lu örneğe ait DNA diziliminin genetik modifiye mısır DNA’ larından biri olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’ teki rakamsal değerlerin grafiklerle birlikte yorumlanması ayrı ayrı yapılmıştır.

Çizelge 4. 11 Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin pik başlangıç döngü değerleri(CP).

No	Örnek	Örnek kodu 35S/NOS	CP _{35S/NOS}	Örnek kodu Bitki geni	CP _{Bitki}	İzolasyon Metodu
1	Mısır unu ⁹	A5	34.79	A6	15.88	CTAB
2	Mısır unu ¹⁰	B5	-	B6	18.89	CTAB
3	Dond. mısır	C5	-	C6	21.23	CTAB
4	Pozitif kontrol	D5	27.08	D6	29.93	-
5	Negatif kontrol	E5	-	E5	-	-

Hatalı pozitiflerin de oluşması olasılığına karşılık, Çizelge 4.2’deki rakamsal değerleri doğru değerlendirebilmek için ek olarak, floresans-CP grafiklerindeki CP başlangıç değerlerine (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) bakılmıştır.

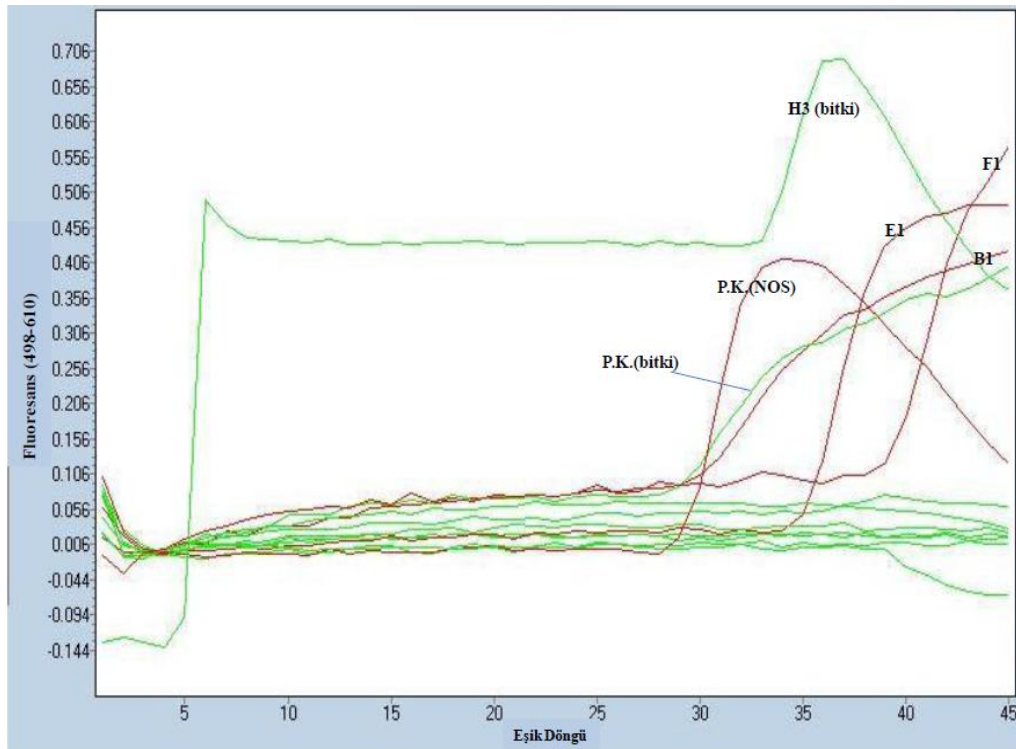


Şekil 4.9: Çizelge 4.2’deki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ışıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.

Şekil 4.9’ daki grafik, 498-610 aralığındaki floresans ışıma değerlerini ve her bir örneğe ait eşik döngü CP değerini göstermektedir. 498-610 aralığındaki eğriler iki farklı durumun göstergesidir. Birincisi örneklerden izole edilen mısır genine ait eşik

döngü değeri, ikincisi ise eğer varsa örnek DNA' larının yapısındaki NOS terminatörün eşik döngü değeri.

Buna ek olarak, test tüplerindeki sıralamaya göre, Örnek kodu 35S/NOS' taki örneklerle ait eğriler Pozitif kontrole benzer bir pik yükselişi sergiliyorsa bu örneklerde NOS terminatör bulunuyor sonucuna varılmıştır. Yani bu örnek genetik modifiye bir ürünü temsil etmektedir. Şekil 4.9' daki eğriler içinden pozitif sonucu ifade edenler cihaz ekranında seçilerek daha anlaşılır bir hale getirilmiştir. Bu haliyle elde edilen grafik Şekil 4.10' da gösterilmektedir.



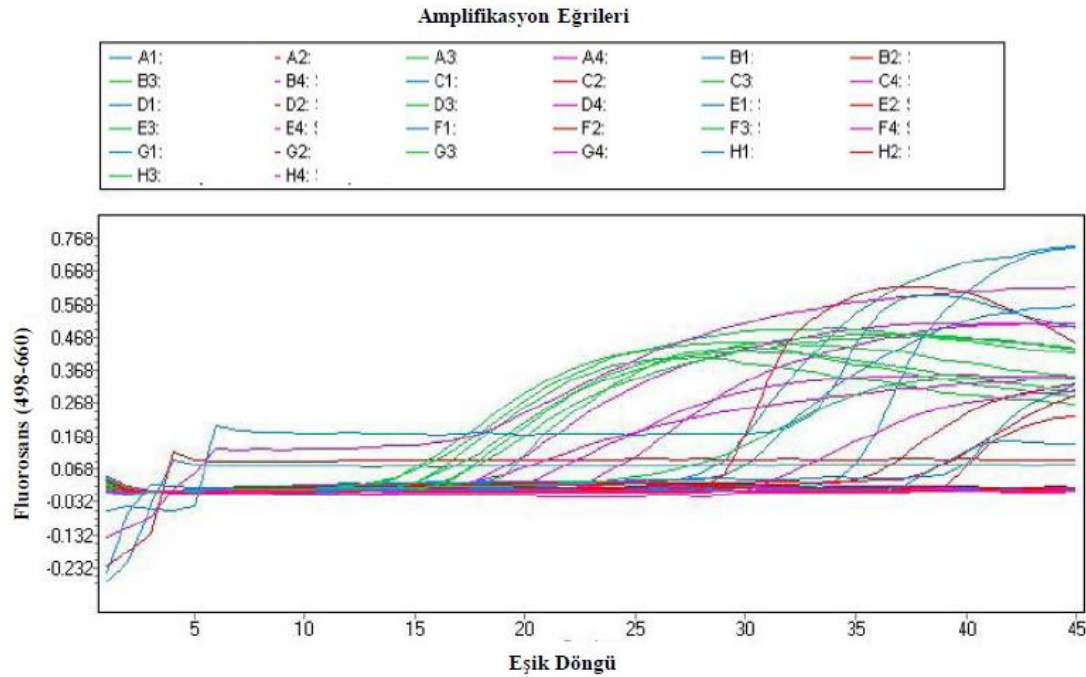
Şekil 4.10: Çizelge 4.2' de pozitif sonuç veren numune pikleri.

NOS terminatör varlığının kontrol edildiği analizde Çizelge 4.2' de A1, B1, E1, F1, G1 ve B2 örneklerinin standart eğrinin üstünde pozitif bir sonuç veriyor olmalarına rağmen, Floresans-CP grafiği eğrileri incelendiğinde A1, G1 ve B2' nin yanlış pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Bu durumda yalnızca B1, E1 ve F1 kod no'lu örneklerde NOS terminatör bulunmaktadır ve bu örneklerin tamamı mısır unu numunelerine ait DNA' lardır.

Çizelge 4. 12: Real-time PCR’ da amplifiye edilen DNA örneklerinin 35S promotör ve bitki geni varlığı için pik başlangıç döngü değerleri(CP).

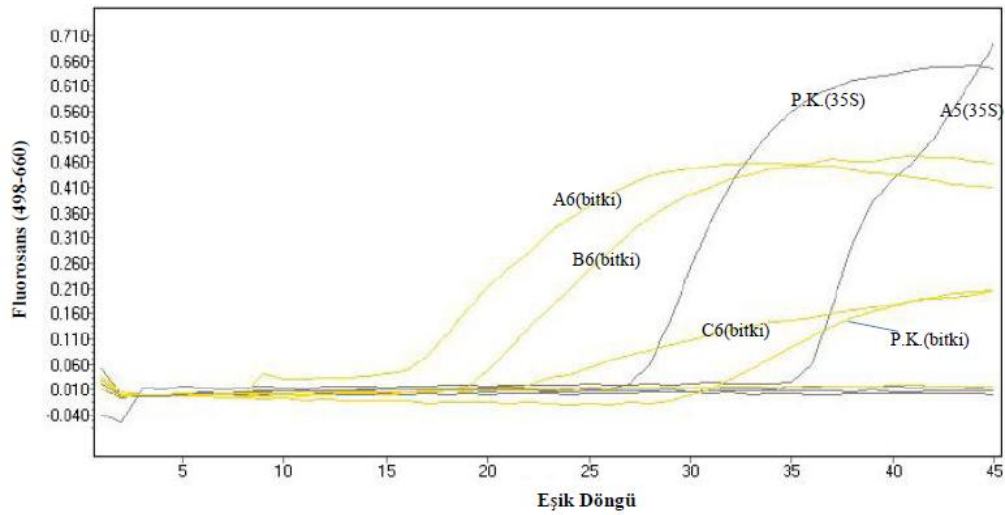
	Örnek	Pozisyon 35S/NOS	CP _{35S} (498-660 nm)	Pozisyon Bitki geni	CP _{Bitki}	İzolasyon Metodu
1	Tane mısır ¹	A1	10.50	A3	14.85	Test kiti
2	Mısır unu ²	B1	29.05	B3	13.83	Test kiti
3	Tane mısır ¹	C1	-	C3	18.14	CTAB
4	Mısır unu ²	D1	28.16	D3	15.96	CTAB
5	Mısır unu ³	E1	33.93	E3	14.58	Test kiti
6	Mısır unu ⁴	F1	38.48	F3	15.34	Test kiti
7	Mısır unu ⁵	G1	35.96	G3	15.79	Test kiti
8	Yem	H1	-	H3	27.57	Test kiti
9	Mısır unu ⁶	A2	37.64	A4	22.70	CTAB
10	Mısır pat.diyet ür.	B2	10.60	B4	19.73	CTAB
11	Hazır çorba*	C2	-	C4	17.55	CTAB
12	Mısır unu ⁷	D2	35.02	D4	17.64	Test kiti
13	Mısır unu ⁸	E2	37.49	E4	20.81	Test kiti
14	Hazır çorba*	F2	-	F4	17.28	Test kiti
15	Pozitif kontrol	G2	27.91	G4	29.87	-
16	Negatif kontrol	H2	-	H4	-	-

Hatalı pozitiflerin de oluşması olasılığına karşılık, yine Florosans-CP grafiği eğrileri analzi dikkate alınmıştır.



Şekil 4.11: Çizelge 4.4’teki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ışıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.

Şekil 4.11' deki grafik, 498-660 aralığındaki floresans ışıma değerlerini ve her bir örneğe ait eşik döngü CP değerini göstermektedir. 498-660 aralığındaki eğriler de iki farklı durumun göstergesidir: Bunlardan birincisi örneklerde bulunan mısır genine ait eşik döngü değeri, ikincisi ise örneklerde eğer varsa, 35S promotörün eşik döngü değeridir. Değerlendirme NOS terminatör için yapılan değerlendirmeye aynı şekilde yapılmıştır. Buna göre çizelgedeki rakamsal değerlerle eğrilerdeki CP başlangıç değerlerinin örtüştüğü örnekler A2, B1, D1, D2, E1, E2 ve F1 pozisyon no' lu örneklerdir. Bu örneklerin tamamı farklı marka mısır unlarından izole edilen DNA'lardır. Bunlardan B1, E1 ve F1 örneklerinde hem 35S promotör hem de NOS terminatör tespit edilmiştir. Bunlardan A2, D1, D2 ve E2 no' lu örneklerde NOS terminatör bulunmazken, 35S promotör tespit edilebilmiştir. Zaten herhangi birisinin tespiti o örneğin GMO olduğunu kanıtlamaya yeterli olmaktadır. Diğer taraftan C1, C2, F2 ve H1 no' lu örneklerde 35S promotör ve NOS terminatör tespit edilmemiştir. Bu nedenle bu örnekler genetik modifiye organizma DNA' sı değildir şeklinde yorumlanabilir. Bu örnekler ise sırasıyla tane mısır, hazır çorba ve yem numunelerine aittir. Çizelge 4.2' de NOS terminatör değerleri ve Çizelge 4.4' te 35S promotör değerleri verilen örneklerin yedisinin genetik modifiye olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.3' teki diğer numuneler için ise CP_{NOS} ve CP_{35S} değerleri birbirine çok yakın çıkmış olup, örneklere ait 35S pikleri Şekil 4.12' de gösterilmektedir.



Şekil 4.12: Çizelge 4.2'deki rakamsal değerlere ait amplifikasyon eğrileri, ışıma değerleri ve eşik döngü (CP) değerleri.

Önceki örneklerle aynı şekilde yapılan analizler sonucunda A5 pozisyon no' lu örneğin GM olduğu tespit edilmiştir. Bu örnek yine mısır unundan izole edilmiş bir örnektir. Bu örnekte de hem 35S promotör hem de NOS terminatör tespit edilmiştir. İki farklı tarihte gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre 35S ve/veya NOS hedef dizilerinin belirlendiği örnekler kodlarıyla birlikte Çizelge 4.5' te gösterilmektedir.

Çizelge 4. 5: 35S ve/veya NOS hedef dizilerinin tespit edildiği örnekler.

Örnek türü	Örnek kodu	35S	NOS
Mısır unu	A2	+	-
Mısır unu	A5	+	+
Mısır unu	B1	+	+
Mısır unu	D1	+	-
Mısır unu	D2	+	-
Mısır unu	E1	+	+
Mısır unu	E2	+	-
Mısır unu	F1	+	+

Elde edilen tüm sonuçlar birleştirildiğinde analiz edilen toplam 51 örnekten sekizinin genetik modifiye olduğu kesin olarak tespit edilmiştir. Bu örneklerin tamamı analiz edilen tüm örnekler içinde en az prosese tabii tutulmuş ürünler olan mısır unlarından elde edilen DNA' lardan oluşmaktadır.

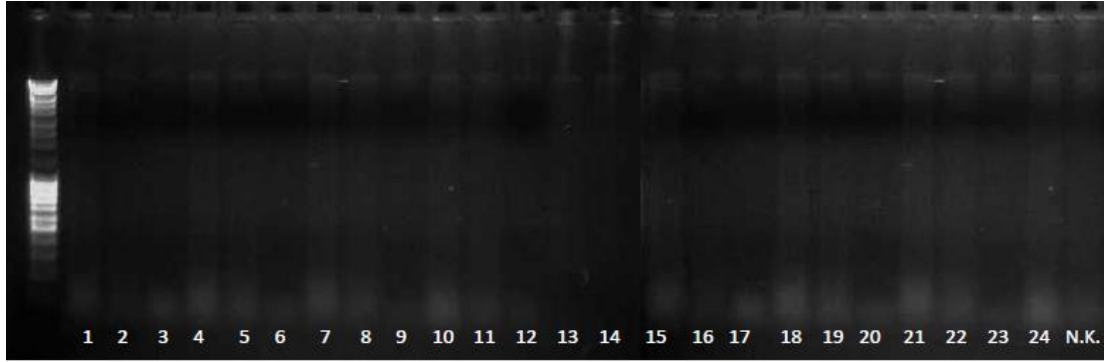
Greiner ve Konietzny(2008)' nin 2000-2005 yılları arasında Brezilya' da ticari olarak satılan gıda ürünlerinde yaptıkları taramada da Bt11, MON 810, Bt176 ve T25 mısır genleri aranmış, buna göre 2000 yılında 100 üründen sekizinde, 2001' de dokuzunda, 2002' de 6'sında, 2003' te dokuzunda, 2004' te sekizinde ve 2005' te ise onbirinde GMO tespit edilmiştir. Mısır unu, ülkeye özgü pastacılık ürünleri, mısır gevrekleri, tortilla cipsleri, polenta, mısır nişastası, bebek gıdaları, tatlılar ve çorbalar ve koçan mısırlar test edilen ürünler içinde yer almıştır. GMO'ların tespit edilebildiği ürünler mısır unları, polenta, bazı mısır gevrekleri ve bazı pastacılık ürünleri olmuştur.

Yine Greiner ve diğ. (2005)' nin 2000 yılında Brezilya' da 100 ürün üstünde yaptıkları çalışmada pastacılık ürünlerinde, unlarda, polentada ve tortilla cipslerinde MON810 ve Bt11 tespit edilebilmiştir.

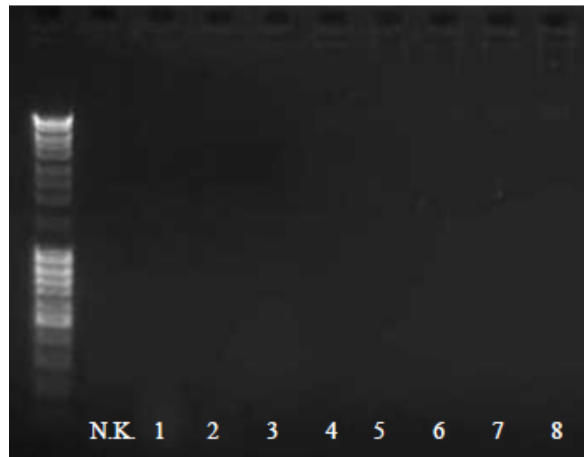
GMO' ların tespit edilebildiği ürünler açısından bu çalışma literatürle paralellik göstermektedir.

4.2.2 Genetiği değiştirilmiş organizmalarda GMO çeşidi belirleme

Tarama analizlerinde pozitif sonuç veren gıda örneklerinde, hem böceklere karşı dirençlilik hem de herbisite toleranslılık özelliği gösteren Bt11, mısır kurduna dirençlilik geni olan MON810, zararlılara karşı dirençliliği sağlayan Bt 176 ve T25 Starlink' in varlığını belirlemek amacıyla primer çiftleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Uygun döngü koşulları ve reaksiyon koşulları sağlandıktan sonra yapılan PCR sonucunda örneklerde beklenen amplifikasyon görülmemiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13: PCR sonuçları a): 1-8 Bt11'in arandığı mısır unu örnekleri, 9-16 MON810'un arandığı örnekler, 17-24 Bt176' nın arandığı örnekler, N.K. negatif kontrol.



Şekil 4.14: PCR sonuçları b): N.K. negatif kontrol, 1-8 T25 Starlink' in arandığı mısır unu örnekleri.

Margarit ve diğ.nin (2006) Arjantin’de yaptıkları piyasa taramasında 32 adet mısır içeren gıda ve yem ürünü analiz edilmiştir. DNA’lar CTAB metodu ile izole edilmiş, geleneksel PCR’ la yapılan tespit sonucunda 8 üründe Bt mısır geni bulunduğu görülmüştür.

Dinon ve diğ.nin 2008’ de yaptıkları yayın 2005-2007 yılların arasında Brezilya’ da yaptıkları tarama çalışmasının sonuçlarını vermektedir. Buna göre, 81 adet mısır türevi ürün piyasadan toplanmış, ürünlerde MON 810 geni aranmıştır. Bu çalışmada DNA CTAB ile izole edilmiş, nested-PCR ve ardında agaroz jel elektroforezle gerçekleştirilen analizler sonucunda tüm numunelerde zein geni tespit edilebilmiş ancak hiçbirinde MON 810 tespit edilememiştir.

Bu tez çalışmasında ise, GMO’ lu oldukları Real-time PCR’ la tespit edilen örneklerde, spesifik genlere yönelik yapılan taramada belirgin bir sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeni olarak, test edilen örneklerde, aranan dört spesifik genin değil de, Avrupa Birliği’nin kullanımına onay verdiği diğer 18 genden birinin ya da birkaçının bulunuyor olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, amplifikasyonda bu genlere ait Standart pozitif kontrol kullanılmadığından, jel görüntülerinden tam bir sonuç çıkarımı yapılamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, çeşitli ölçeklerdeki değişik süpermarketlerden toplanan gıda materyallerinde genetiği değiştirilmiş organizmaların varlığının ve türlerinin belirlenmesi için kalitatif olarak analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda gıda ürünlerinin sekizinin genetik modifiye mısır bileşeni içerdiği belirlenmiştir. Analizlerin ilk aşaması olarak gıda materyallerinde, 2 farklı metot (CTAB metodu ve Biotecon test kit) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu iki metot, DNA miktar ve kalitesine göre karşılaştırılmıştır. Buna göre, gıda örneklerinin izolasyonunda CTAB metodu ile istenilen kalitede DNA elde edilememiştir. Gıda materyallerin DNA izolasyonunda test kiti ile daha başarılı olunmuştur. CTAB metodunun nispeten daha zayıf sonuçlar vermesinin nedeni ise çok uzun süren ve farklı işlemler içeren aşamalardan oluşması, pek çok defa tüpler arası transfer yapılması nedeniyle DNA kayıplarının olabilmektedir. Genel olarak, yeterli miktarda ve/veya kalitede DNA elde edilememesinin nedeninin ise gıdaların yüksek sıcaklığa ve diğer proseslere maruz kalmaları ve bundan dolayı DNA yapılarının bozulmuş olduğu düşünülmektedir. Test edilen örneklerde proses derecesi ne kadar düşükse ekstrakte edilebilen DNA miktarı ve kalitesi de o kadar yüksek olmuştur. Ayrıca ürünlerin içerdikleri mısır bileşeni miktarı ne kadar düşükse ekstraksiyon sonucu elde edilebilen DNA miktarı da o kadar az olmuştur. İzolasyona sonucuna etki ettiği düşünülen diğer bir faktör ise gıdaların sahip oldukları farklı matrislerdir. Farklı firmaların aynı ürünü birbirlerinden farklı ürettikleri düşünülürse izolasyonun başarısının tek bir etkene bağlanamayacağı yorumu yapılabilir. Bahsedilen bu sebeplerden dolayı bebek gıdalarından, konservelerden ve cipslerden mısır geni elde edilemediği düşünülmektedir. En iyi sonuç ise mısır unlarında elde edilmiştir. Bu açıdan, DNA izolasyonu neticeleri bakımından literatürle paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Analizlerinin ikinci aşamasında ise Real-time PCR' da mısır genine özgü olan *zein geni* ile 35S promotör ve NOS terminatörün varlığının taraması eş zamanlı olarak yapılmıştır. Analiz sonunda Real-time PCR' da amplifikasyona sokulan bütün örneklerin *zein* genini taşıdığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu örneğin mısır içerdiğinin sağlaması yapılmıştır. Taranan örneklerin sekizinde ise 35S promotör ve/veya NOS terminatör varlığı tespit edilmiştir. Böylece bu örneklerin GDO içerdiği belirlenmiştir.

Son aşamada ise real-time PCR' da genetik modifiye olduğu belirlenen örnekler için MON810, Bt176, Bt11 ve T25 genlerine ait primerler kullanılarak bu çeşitlerin belirlenmesi amacıyla PCR' da bir amplifikasyon daha yapılmıştır. Ancak yapılan jel sonucunda bu genlere ait görüntü elde edilememiştir. Örneklerde, aranan GMO' ların değil de başka genetik modifiye organizmaların bulunuyor olması ve yüksek maliyetleri nedeniyle bu genleri hedefleyen primerlerin hepsinin temin edilememesi buna neden olarak düşünülmektedir.

Hızla yeni genetik modifiye organizmaların geliştirilmesi ve bunların kullanımının ve tüketiminin dünyada onaylanması nedeniyle yeni, hızlı ve güvenilir sonuçların elde edileceği tekniklerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. İleriki çalışmaların farklı proses ve matrislere oluşan bu farklılıkların daha iyi anlaşılmasında etkili olacağı düşünülmektedir.

Avrupa Birliği' ne uyum çerçevesinde yayımlanan Biyogüvenlik yasası, yönetmelik ve talimatlar doğrultusunda, yüzde 0.9'u geçen GDO içeren gıdaların etiketlenme zorunluluğu vardır. Bu konuda gerek üreticinin bilgi düzeyinin artırılması gerekse tüketicilerin bilinçli tüketiminin gerçekleştirilmesi için genetiği değiştirilmiş organizmaların ve bunları ham madde olarak bulunduran işlenmiş gıdaların kantitatif analizleri yapılmalı ve bu gıdalar gereğince etiketlenmelidir. Ayrıca ithal olarak ülkemize gelen tohumlar da düzenli olarak GDO testinden geçirilmeli, gıda güvenliği ve çevrenin korunumu açısından etkileri incelenmeli ve istenmeden oluşabilecek etkiler de denetlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Abdullah T., Radu S., Hassan Z., Hashim J.K.,** 2006. Detection of Genetically Modified Soy in Processed Foods Sold Commercially in MALAYSIA by PCR-based Method, *Food Chemistry*, **98**, pp. 575–579.
- Ahmed F.E.,** 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. **20**, no.5, pp. 215-223.
- Agbios,** 2010. GM Database, Agbios, Merrickville; from <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowForm>, alındığı tarih 02.05.2010.
- Brett, G.M., Chambers S.J., Huang L., Morgan M.R.A.,** 1999. Design and Development of Immunoassays for Detection of Proteins, *Food Control*, **10**, pp. 401–406.
- British Standard BS EN ISO 21571: 2005,** Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction: Preparation of PCR-quality DNA using the CTAB-based DNA extraction methods, **A.3**, p. 24-29, Copyright British Standards.
- Cardarelli P., Branquinho M.R., Ferreira R.T.B., da Cruz F.P., Gemal A.L.,** 2005. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience, *Food Control*, **16**, pp. 859–866.
- Cockburn A.,** 2002. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach, *Journal of Biotechnology*, **98**, p. 79–106.
- Deisingh A.K., Badrie N.,** 2005. Detection Approaches for Genetically Modified Organisms in Foods, *Food Research International*, **38**, pp. 639–649.
- Dinon A.Z., de Melo J.E., Arisi E.C.M.,** 2008. Monitoring of MON810 genetically modified maize in foods in Brazil from 2005 to 2007, *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**, pp. 515– 518.
- Eede G. V. D., Aarts H., Buhk H.-J., Corthier G., Flint H.J., Hammes W., Jacobsen B., Midtvedt T., Vossen J. v. d., Wright A. v., Wackernagel W., Wilcks A.,** 2004. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants, *Food and Chemical Toxicology*, **42**, pp. 1127–1156.
- EMBL,** 2010. EMBL Nucleotide Sequence Database. European Bioinformatics Institute, Cambridge; from <http://www.ebi.ac.uk/embl/>, alındığı tarih 16.01.2010.
- Engeseth N. J.,** 2000. Food Toxicology: Safety of Genetically Engineered Foods, **4**, Safety Concerns with Technologies and Resultant Foods, CRC Press LLC.

- European Commission (EC)**, 1998. Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, *Official Journal of the European Communities* **L201**, pp. 93–101, from http://europa.eu.int/eurlex/pri/en/oj/dat/1998/l_201/l_20119980717en00930101.pdf.
- European Commission (EC)**, 2003. Regulation (EG) Nr. 1829/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 with regard to genetically modified foods and feed. Official Journal of the European Union dd. 18.10.2003, L268/1–23.
- FDA (US Food and Drug Administration)**, 1992. Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties. Federal Register, May 29.
- Food Safety Commission of Japan**, 2004. Standards for the Safety Assessment of Genetically Modified Foods (Seed Plants), *Final decision on January 29, 2004*, from http://www.fsc.go.jp/english/standardsforriskassessment/gm_kijun_english.pdf.
- Freese, W. and Schubert, D.**, 2004. Safety Testing and Regulation of Genetically Engineered Foods, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **21**, pp. 299–324.
- Frewer L., Lassen J., Kettlitz B., Scholderer J., Beekman V. and Berdal K. G.**, 2004. Societal Aspects of Genetically Modified Foods, *Food and Chemical Toxicology*, **42**, pp. 1181–1193.
- Greiner R., Konietzny U., Villavicencio A.L.C.H.**, 2005. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods, *Food Control*, **16**, pp. 753–759.
- Greiner R. and Konietzny U.**, 2008. Presence of Genetically Modified Maize and Soy in Food Products Sold Commercially in Brazil from 2000 to 2005, *Food Control*, **19**, pp. 499–505.
- Gruère G.P.**, 2006. A Preliminary Comparison of the Retail Level Effects of Genetically Modified Food Labelling Policies in Canada and France, *Food Policy*, **31**, pp. 148–161.
- Hellens, R., Mullineaux, P.**, 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti-vectors. *Trends in Plant Science*, **5**, pp. 446–451.
- Holst-Jensen A.**, 2003. Advanced DNA-based detection techniques for genetically modified food, in *Food Authenticity and Traceability*, **27**, p. 1-20, Woodhead Publishing Limited, CRC Press LLC.
- Japan The Food Safety Commission**, 2004. Standards for the Safety Assessment of Genetically Modified Foods (Seeds), pp.1-15, Final decision on January 29, 2004, from <http://www.fsc.go.jp>
- JETRO-Japan External Trade Organization**, 2006. Food Sanitation Law in Japan, Law no. 233, 1947 and Last amendment Law no.87, 2005, from <http://www.jetro.go.jp/en/market/regulations/pdf/food-e.pdf>.

- Kakihara Y., Matsufuji H., Chino M., Yamagata K.,** 2007. Detection of Recombinant DNA of Genetically Modified (GM) Soybeans in Heat-treated GM Soybeans and Commercial Natto, *Food Control*, **18**, p. 1289–1294.
- Kok E.J., Keijer J., Kleter G.A. and Kuiper H.A.,** 2008. Comparative Safety Assessment of Plant-Derived Foods, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **50**, p. 98–113.
- König A., Cockburn A., Crevel R.W.R., Debruyne E., Grafstroem R., Hammerling U., Kimber I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburg A.A.C.M., Penninks A.H., Poulsen M., Schauzu M., Wal J.M.,** 2004. Assessment of the Safety of Foods Derived from Genetically Modified (GM) Crops, *Food and Chemical Toxicology*, **42**, p. 1047–1088.
- Mafra I., Silva S. A., Moreira E. J. M. O., Ferreira da Silva C. S., Beatriz M. and Oliveira P.P.,** 2008. Comparative Study of DNA Extraction Methods for Soybean Derived Food Products, *Food Control*, **19**, p. 1183–1190.
- Margarit E., Reggiardo M. I., Vallejos R. H. and Permingeat H. R.,** 2006. Detection of BT Transgenic Maize in Foodstuffs, *Food Research International*, **39**, p. 250–255.
- Marmiroli N., Maestri E., Gulli M., Malcevski A., Peano C., Bordon R., De Bellis G.,** 2008. Methods for Detection of GMOs in Food and Feed, *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, p. 369–384.
- Meyer R.,** 1999. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food, *Food Control*, **10**, p. 391–399.
- Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E.J., Marvin H.J.P., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J.P.P.F., Zagon J.,** 2004. Detection and Traceability of Genetically Modified Organisms in the Food Production Chain, *Food and Chemical Toxicology* **42**, p. 1157–1180.
- Moriuchi R., Monma K., Sagi N., Uno N., Kamata K.,** 2007. Applicability of Quantitative PCR to Soy Processed Foods Containing Roundup Ready Soy, *Food Control*, **18**, p. 191–195.
- Pan A., Yang L., Xu S., Yin C., Zhang K., Wang Z. and Zhang D.,** 2006. Event-specific Qualitative and Quantitative PCR Detection of MON863 Maize Based upon the 30-Transgene Integration Sequence, *Journal of Cereal Science*, **43**, p. 250–257.
- Passamano M. and Pighini M.,** 2006. QCM DNA-sensor for GMOs Detection, *Sensors and Actuators*, **B 118**, p. 177–181.
- Pech J. C., Bernadac A., Bouzayen M. and Latché A.,** 2005. Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality: Use of Genetic Engineering to Control Ripening, Reduce Spoilage, and Maintain Quality of Fruits and Vegetables, **13**, p. 398–425, Taylor & Francis Group, LLC.

- Prokisch, J., Zeleny, R., Trapmann, S., Le Guern, L., Schimmel, H., Kramer, G.N., Pauwels, J.,** 2001. Estimation of the Minimum Uncertainty of DNA Concentration in a GMO Containing Maize Sample Candidate Certified Reference Material, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **370**, p. 935–939.
- Sanhoty, R. E., Broll, H., Grohmann, L., Linke, B., Spiegelberg, A., Bogl, K. W., and Zagon, J.,** 2002. Genetically Modified Maize and Soybean on the Egyptian Food Market. *Nahrung/Food*, 46:5, p 360-363.
- Smith D.S., Maxwell P.W.,** 2007. Use of Quantitative PCR to Evaluate Several Methods for Extracting DNA from Corn Flour and Cornstarch, *Food Control*, **18**, p. 236–242.
- Turci M., Sardaro M.L.S., Visioli G., Maestri E., Marmiroli M., Marmiroli N.,** 2010. Evaluation of DNA Extraction Procedures for Traceability of Various Tomato Products, *Food Control*, **21**, p. 143–149.
- Url-1** <http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index_en.htm>, alındığı tarih 05.02.2010.
- Url-2** <<http://www.agnet.org/library/eb/527/>>, alındığı tarih 28.04.2010.
- Url-3** <<http://usinfo.state.gov/journals/ites/1005/ijee/regulation.htm>>, alındığı tarih 11.04.2010.
- Url-4** <<http://www.foodstandards.gov.au/scienceandeducation/factsheets/factsheets2000/labellinggenetically29.cfm>>, alındığı tarih 21.04.2010.
- Url-5** <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/novnou/voletie.shtml>> alındığı tarih 21.04.2010.
- Url-6** <<http://www.nishoren.org/en/?p=150>>, alındığı tarih 21.04.2010.
- Url-7** <<http://www.fda.gov/Food/Biotechnology/default.htm>>, alındığı tarih 21.04.2010
- Url-8** <www.kkgm.gov.tr/mev/yonetmelik.html>, alındığı tarih 12.09.2010
- US OSTP,** 1986. Coordinated framework for regulation of biotechnology, Federal Register 51, 23302–23350, from <http://www.bio.org/foodag/background/regulations.asp>.
- Vijayakumar K.R., Martin A., Gowda L.R., Prakash V.,** 2009. Detection of Genetically Modified Soya and Maize: Impact of Heat Processing, *Food Chemistry*, **117**, p. 514–521.
- Williams K.M., Trucksess M. W., Raybourne R. B., Orlandi P. A., Levy D., Lampel K. A. and Westphal C. D.,** 2005. Determination of Food Allergens and Genetically Modified Components, *Methods of Analysis of Food Components and Additives*, **11**, p. 1-26, Taylor & Francis Group, LLC.
- World Trade Organisation,** 2006. European Communities—Measures affecting the approval and marketing of biotech products, *Reports of the Panel*, WT/DS291/R, WT/DS292/R, WT/DS293/R, Geneva, Switzerland.

- Wu G., Wu Y., Nie S., Zhang L., Xiao L., Cao Y., Lu C.,** 2010. Real-time PCR Method for Detection of the Transgenic Rice Event TT51-1, *Food Chemistry*, **119**, p. 417–422.
- Yamaguchi H., Sasaki K., Umetsu H., Kamada H.,** 2003. Two Detection Methods of Genetically Modified Maize and the State of Its Import into Japan, *Food Control*, **14**, p. 201–206.
- Zhu H., Zhao X., Jia J., Sun J. and Zhao K.,** 2008. A Specific Qualitative and Real-Time PCR Detection Of MON863 Maize Based on the 50-Transgene Integration Sequence, *Journal of Cereal Science*, **48**, p. 592–597.

EKLER

- EK A :** Laboratuvar Ekipmanları
- EK B :** Kimyasallar
- EK C :** Çözeltiler ve Tamponlar

EK A

Laboratuar Ekipmanları

Elektroforez Sistemi

Florometre

Güç kaynağı

Jel Dokümantasyon Sistemi

Kuru Isıtma Bloğu

Manyetik karıştırıcı, ısıtıcı

Mikrodalga fırın

Otoklav

PCR Thermocycler

pH metre

Pipetler

Real-time PCR

Saf su sistemleri

Santrifüjler

Soğutucular

Su Banyosu

Teraziler

Vorteks

BIORAD mini sub cell GT

Invitrogen, Qubit

BIORAD power pac 300

BIORAD GELDOC

BIO TDB 100, BIOSAN

Heidolph MR hei-standard

Vestel MD17

TOMY SX-700E

BIORAD C1000 thermal cycler

Mettler Toledo MP220

Eppendorf 2.5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl

Roche-LightCycler® 480 II

USF Elga UHQ-PS-MK3, Elga

Sigma 1-14

Whirlpool +4°C, -20°C, Vestel -20°C

Memmert

Precisa BJ610, OHAUS pioneer

Heidolph reax top

EK B

Kimyasallar

Agaroz	Sigma-Aldrich
α-Amilaz	Inter Lab
Etil alkol saf	Sigma-Aldrich
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich
EDTA disodyum tuzu	Sigma-Aldrich
Hekzadesil-trimetil-amonyum-bromür (CTAB)	Sigma-Aldrich
HCl (% 37)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Proteinaz-K	Biotecon
Kloroform	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Reidel-de Haën
Tris(hidroksimetil)-aminometan	Sigma-Aldrich
Primerler	Iontek
GDO Tarama Kiti	Biotecon

EK C

Çözeltiler ve Tamponlar

Çizelge C. 4: α -Amilaz çözeltisi.

$c(\alpha\text{-amilaz})$	10 mg/ml
Otoklavlanmamalı. + 4 °C' de saklanmalı	

Çizelge C. 5 CTAB ekstraksiyon tamponu (EN ISO 21571:2005).

$\rho(\text{CTAB})$	20 g/l
$c(\text{NaCl})$	1,4 mol/l
$c(\text{Tris})$	0,1 mol/l
$c(\text{Na}_2\text{EDTA})$	0,02 mol/l

pH HCl veya NaOH ile 8,0' e ayarlanmalı.

Çizelge C. 6 CTAB çöktürme tamponu (EN ISO 21571:2005).

$\rho(\text{CTAB})$	5 g/l
$c(\text{NaCl})$	0,04 mol/l