

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**İŞLENMİŞ SIĞIR ETİ ÜRÜNLERİNDE ÇOKLU GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) YÖNTEMİ İLE TEK
TIRNAKLI HAYVAN ETİNİN BELİRLENMESİ İÇİN METOT
GELİŞTİRİLMESİ**

Sevda GÖKBORA
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**İŞLENMİŞ SIĞIR ETİ ÜRÜNLERİNDE ÇOKLU GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) YÖNTEMİ İLE TEK
TIRNAKLI HAYVAN ETİNİN BELİRLENMESİ İÇİN METOT
GELİŞTİRİLMESİ**

Sevda GÖKBORA
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İŞLENMİŞ SIĞIR ETİ ÜRÜNLERİNDE ÇOKLU GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) YÖNTEMİ İLE TEK
TIRNAKLI HAYVAN ETİNİN BELİRLENMESİ İÇİN METOT
GELİŞTİRİLMESİ**

Sevda GÖKBORA
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2017-2406 nolu yüksek lisans tez projesi ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İŞLENMİŞ SIĞIR ETİ ÜRÜNLERİNDE ÇOKLU GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) YÖNTEMİ İLE TEK
TIRNAKLI HAYVAN ETİNİN BELİRLENMESİ İÇİN METOT
GELİŞTİRİLMESİ**

Sevda GÖKBORA
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez .././2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

ÖZET

İŞLENMİŞ SIĞIR ETİ ÜRÜNLERİNDE ÇOKLU GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) YÖNTEMİ İLE TEK TIRNAKLI HAYVAN ETİNİN BELİRLENMESİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ

Sevda GÖKBORA

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Haziran 2018, 63 sayfa

Et, özellikle esansiyel aminoasitler, zengin vitamin, mineral ve yağ içeriği ile birlikte insan beslenmesindeki en önemli temel gıda maddelerinden birisidir. Dünya nüfusunun giderek artması ile birlikte, gıda maddelerine ve dolayısıyla et ve et ürünlerine olan talep giderek artmaktadır. Dünyada nüfus artışının en hızlı olduğu ülkelerden biri olan Türkiye’de de sağlıklı ve dengeli beslenmenin sağlanabilmesi için kırmızı et tüketimi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde et ürünlerinde en sık karşılaşılan problem tağşiş ve orijinalliktir.

2000-2015 yılları arasında Türkiye, İrlanda ve Meksika’yı da kapsayan dünyanın çeşitli bölgelerinde et ürünlerinde yüksek oranda yanlış etiketleme vakaları rapor edilmiştir. Farklı hayvan türlerine ait etler sucuk, salam, sosis ve köfte gibi ürünlere katıldıklarında tüketiciler tarafından algılanması zordur. Etlerin başka etlerle karıştırılıp tüketime sunulması gıda güvenilirliği konusunda halkı endişelendiren konuların başında gelmektedir. Et ürünlerinde kullanılan et türlerinin tanımlanması ve etiketin doğrulanması, ekonomik sebepler, din ve sağlıkla ilgili faktörler ve haksız rekabetin önlenmesi açısından önemlidir.

Yapılan bu çalışmada at ve eşek mitochondri sitokrom b (cytb) genine spesifik primerler kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile hem tür tayini hem de miktar analizine olanak sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Referans olarak sığır eti içinde bilinen miktarlarda at ve eşek eti bulunan üçlü et karışımları hazırlanmış ve DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA dilüsyon serilerinin kalıp olarak kullanıldığı at ve eşek primerleri ile tekli, ikili ve üçlü reaksiyonlar hazırlanmış ve %0,05 ile %50 aralığında yüksek lineer korelasyon değerine ve reaksiyon verimliliğine sahip kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Ayrıca, at ve eşek eti için önceden doğrulanmış bir metotla analiz edilen 40 adet işlenmiş et örneği, geliştirilen kantifikasyon yöntemi ile yeniden analiz edilmiştir. Örneklerin 15’i at ve eşek eti için pozitif sonuç veren örneklerdir. Nicel yöntem, işlenmiş et ürünlerinde at ve eşek etini % 1-50 seviyesinde belirleyebilmiştir. Sonuçlar, ülkemizde teftişlerin ve güvenilir analiz yöntemlerinin önemini bir kez daha göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, ülkemizde denetimlerin ve güvenilir analiz yöntemlerinin ne kadar önemli olduğunu bir kez daha göstermiştir.

Sonuç olarak, işlenmiş sığır etine karıştırılması muhtemel at ve eşek etlerinin tespiti için, kolay, hızlı, güvenilir ve kantitatif bir GZ-PZR yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca, yüzde % 0,3 oranında tespit, %1 oranında miktar tayini yapılabildiğinden gerçek bir tağşiş mi yoksa metottan kaynaklı yanlış pozitif sonuç mu olduğu konusunda bu yöntem ile doğru sonuç elde edilebilmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: At eti, Eşek eti, Et tür tayini, Kantitatif GZ-PZR, Tağşiş, TaqMan prob, Tek tırnaklı eti

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL TIME PCR ASSAY FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF EQUINE MEAT IN PROCESSED BOVINE MEAT PRODUCTS

Sevda GÖKBORA

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN

June 2018, 63 pages

Meat is one of the most important foodstuffs in human nutrition, especially in terms of its highly rich content of essential amino acids, vitamins, minerals and fat. With the gradual increase of the world population, the demand for foodstuffs and therefore meat and meat products is also steadily increasing. As one of the countries with the fastest growing population in the world, Turkey, too, the consumption of red meat is of utmost importance in order to ensure a healthy and balanced diet. Today, the most common problem in meat products is adulteration and originality.

In various regions of the world including Turkey , Ireland and Mexico, a high rate of mislabeling cases of meat products have been reported between 2000-2015. For customers, it is difficult to perceive the meat of different animal species when they are mixed in products such as sausage, salami, and meatballs. The fact that meat is mixed with other meats and presented for consumption is one of the issues that worries the public about food adulteration. Identification of the meat source in meat products and verification of the label are important in terms of economic reasons, religion and health related factors as well as the frauds.

In this study, a method has been developed which allows both species identification and quantitative analysis by using Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) method using specific primers for horse and donkey mitochondrial cytochrome b (cytb) gene. As a reference, triple meat mixtures containing horse and donkey meat were prepared in known quantities in bovine meat and DNA isolations were performed. Single, double and triple reactions were prepared with horse and donkey primers in which DNA dilution series were used as template, and the calibration curves with high linear correlation value and reaction efficiency between 0.05% and 50% were obtained. Furthermore, forty processed meat samples which already analyzed for horse and donkey meat by a validated method were re-analyzed by the quantification method developed. Fifteen out of forty samples were positive for horse and donkey meat. The quantitative method was able to determine the horse and donkey meat at the level of 1- 50% in a processed meat. The results have once again shown the importance of inspections and reliable methods of analysis in our country.

As a result, an easy, fast, reliable and quantitative Real-Time PCR method has been developed for the detection of possible horse and donkey meats. In addition, with value of 0.3% and 1% of LoD and LoQ, respectively, it is possible to obtain correct results with this method as to whether it is a real adulteration or a false positive result due to the used method.

KEYWORDS: Horse meat, Donkey meat, Meat species identification, Quantitative Real-Time PCR, Adulteration, TaqMan prob, Equine meat

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

ÖNSÖZ

Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendirdiği, sonsuz desteği için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez jüri üyelerim Sayın Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK hocalarıma destekleyici ve yönlendirici katkılarından dolayı saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Labarotuvaramı kullanmama izin veren, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN hocama ve Ar. Gör. Hilal Şule TOSUN'a, yol göstericiliği ve anlayışı için birim şefim Dr. Ayşe Gümüş KARACA'ya, iş arkadaşlarım Nihan HANAY KOCA'ya, Üzeyir KÖŞEDAŞI'na ve Hasan Ender YAZICI'ya çalışmalarımın her adımında yanımda olan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşım Semiramis YILMAZ'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca anlayışları, destekleri ve dostlukları için çalışma arkadaşlarım Dr. Aysun ÖZÇELİK'e, Ar. Gör. Fatma ERSÖZ CANLI'ya ve Gürkan YILMAZ'a teşekkür ederim.

Ve her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim dostlarım Eda ÖNEL'e, Selda SERT'e ve aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
AKADEMİK BEYAN.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Dünya Geneline Et Ürünlerinde Tağşiş Yaygınlığı.....	4
2.2. Türkiye’de Et ürünleri Denetim Mevzuatı ve Düzenlemeler.....	6
2.3. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No 2012/74).....	7
2.4. Tür Tayini için Kullanılan Yöntemler.....	8
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Klasik ve Gerçek Zamanlı.....	10
2.5.1. GZ-PZR çalışma prensibi.....	12
2.5.2. GZ-PZR'nin reaksiyon kimyası.....	13
2.5.3. Çift sarmal DNA'ya bağlanan boyalar.....	13
2.5.4. Floresan etiketli primer ve prob tabanlı sistemler.....	14
2.5.5. Çoklu GZ- PZR analizi.....	16
2.5.6. Çoklu analizlerde primer ve prob tasarımı.....	19
2.6. Mutlak Miktar Tayini: Standart Eğri Metodu.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Etlerin ve Örneklerin Temini.....	22
3.2. DNA İzolasyonu.....	22

3.3. DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	22
3.4. Referans DNA Dilüsyon Serileri ve Validasyon Et Karışımlarının Hazırlanması	23
3.5. Hedef gen ve primerlerin belirlenmesi ve sentezi.....	24
3.6. Klasik PZR.....	25
3.7. Gerçek Zamanlı PZR (GZ-PZR).....	26
3.8. Agaroz jel elektroforezi	28
3.9. GZ-PZR metot optimizasyonu: Reaksiyon veriminin tespit edilmesi	28
3.10. Miktar Analizi: Kantifikasyon Eğrisinin Çizilmesi	30
3.11. Kantifikasyon eğrisinin lineer regresyon analizi	31
3.12. Standart Eğrinin Güven Aralığı ve Tahmin Aralığı Limitleri	32
3.13. Tespit (LOD) ve Ölçüm (LOQ) Limiti	33
3.14. Kesinlik ve Doğruluk Değerleri.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Et Türlerinden DNA İzolasyonu	35
4.2. Primerlerin spesifikliğin klasik PZR yöntemi ile kontrolü.....	35
4.3. Primerlerin qPCR reaksiyon verimliliğinin belirlenmesi	36
4.3.1. Tekli GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimliliği.....	37
4.3.1.1. At primer ve prob setinin tekli reaksiyon verimliliği.....	37
4.3.1.2. Eşek primerinin bağlanma sıcaklığının optimize edilmesi	39
4.3.1.3. 18S primer ve prob setinin tekli reaksiyon verimliliği	41
4.3.2. İkili GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimliliği.....	43
4.3.2.1. At primer ve prob setinin ikili reaksiyon verimliliği	43
4.3.2.2. Eşek primer ve prob setinin ikili reaksiyon verimliliği	45
4.3.3. Üçlü GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimlilikleri	46
4.4 Kantifikasyon grafikleri ve istatistiksel analizleri	49

4.5. Örneklerin Analizi	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR	59
7. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "İşlenmiş Sığır Eti Ürünlerinde Çoklu Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) Yöntemi ile Tek Tırnaklı Hayvan Etinin Tespiti ve Miktar Analizi İçin Metot Geliştirilmesi" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

29/07/2018

Sevda GÖKBORA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°	: derece
bç	: baz çifti
C	: celcius
Ct	: eşik döngü
E	: verim
r	: pearson korelasyon katsayısı
R ²	: korelasyon katsayısı
Tm	: erime sıcaklığı
%	: yüzde
w/w	: ağırlıkça
°C	: santigrat
Δ	: delta
M	: eğim
B	: standart eğri
E	: reaksiyon verimliliği

Kısaltmalar

AGID	: Agar-Gel Immunodiffusion (Agar Jel İmmunodifüzyon Testi)
A-DDS	: At DNA Dilüsyon Serisi
AE-DDS	: At Eşek DNA Dilüsyon Serisi
Blast	: Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	: Komplementer DNA
CI	: Güven Aralığı (Confidence İnterval)
S-DDS	: Sığır DNA Dilüsyon Serisi
SAE-DDS	: Sığır At Eşek DNA Dilüsyon Serisi

DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
E-DDS	: Eşek DNA Dilüsyon Serisi
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	: İleri (forward)
FSAI	: İrlanda Gıda Güvenliği Otoritesi (Food Safety Authority of Ireland)
GGBS	:Gıda Güvenliği Bilgi Sistemi
GZ-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
KHK	: Kanun Hükümünde Kararname
LCD-array	:Düşük Maliyetli Yoğunluk Dizisi (Low Cost Density Array)
LOD	: Tespit Limiti (Limit Of Detection)
LOQ	: Miktar Tayin Limiti (Limit Of Quantification)
NCBI	: National Center For Biotechnology Information
PI	: Tahmin Aralığı (Prediction Interval)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: Geri (primer)
rRNA	: Ribozomal RNA
SH	: Standart Hata
SS	: Standart Sapma
TAE	: Tris-asetat
VK	: Varyasyon Katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda hedef bölgenin çoğalma prensibi.....	11
Şekil 2.2. GZ-PZR analizinde ölçülen floresanın, döngü sayısına karşılık amplifikasyon grafiği	12
Şekil 2.3. TaqMan prob sisteminin çalışma prensibi	14
Şekil 2.4. Florofor haberci boyaların dalga boyları ve uygun söndürücüleri.....	15
Şekil 2.5. . RotorGeneQ cihazının optik sisteminin illüstrasyon.....	16
Şekil 2.6. .Çalışmada kullanılan boyaların ve Rotor Gene Q cihazındaki filtrelerin Uyarılma (---) ve emisyon (—) dalga boyları.....	18
Şekil 3.1. Çalışmanın akış grafiği.....	21
Şekil 3.2. ..Metodun optimizasyonu için standart eğri oluşturulması... ..	29
Şekil 3.3. Standart eğrinin güven (CI) ve tahmin aralıklarının (PI) grafiksel olarak ifadesi	33
Şekil 4.1. Et türlerinden izole edilen genomik DNA'ların %1 agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.2. Türe özgü primerlerin spesifikliğinin kontrolü (%4'lük agaroz görüntüsü)	36
Şekil 4.3 At primer ve prob setinin At DNA Dilüsyon Serisi ile gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu	38
Şekil 4.4. At primer ve prob setinin A-DDS (%100, %32, %10, %3.2, %1.0, %0.32, %0.1) ile tekli GZ-PZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.5. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 60°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu	39
Şekil 4.6. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 55°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu	40
Şekil 4.7. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 45°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu	40
Şekil 4.8. 18S primer ve prob setinin A-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal)	41
Şekil 4.9. 18S primer ve prob setinin S-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal)	42

Şekil 4.10. 18S primer ve prob setinin E-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal)	42
Şekil 4.11. At ve 18S primer ve prob setlerinin A-DDS ile ikili reaksiyon verimliliği analizi sonucu (A) At primerleri amplifikasyon grafiği (Sarı Kanal)	44
Şekil 4.12. Eşek ve 18S primer ve prob setlerinin E-DDS ile ikili reaksiyon verimliliği analizi sonucu	45
Şekil 4.13. Primer ve prob setlerinin AE-DDS (at ve eşek DNA'larının her birinden %16, %5, %1,6, %0,5, %0,16 ve %0,05 içeren) ile üçlü reaksiyon verimliliği analizi sonucu	47
Şekil 4.14. Primer ve prob setlerinin SAE-DDS (%16, %5, %1,6, %0,5, %0,16, %0,05'er at ve eşek DNA'sı içeren sığır DNA'sı) üçlü reaksiyonu amplifikasyon ve standart eğri grafikleri	48
Şekil 4.15. SAE-DDS (%16, %5, %1,6, %0,5, %0,16, %0,05'er at ve eşek DNA'sı içeren sığır DNA'sı) üçlü reaksiyonu sonucu 18S primer seti ile amplifikasyon grafiği	49
Şekil 4.16. Validasyon Et Karışımlarının (%50, %25, %10, %2,5, %1, %0,5, %0,1 ve %0,05'er at ve eşek eti içeren sığır eti) üçlü reaksiyonu sonucu elde edilen verilerden çizdirilen At Kantifikasyon Grafiği	49
Şekil 4.17. Validasyon Et Karışımlarının (%50, %25, %10, %2,5, %1, %0,5, %0,1 ve %0,05'er at ve eşek eti içeren sığır eti) üçlü reaksiyonu sonucu elde edilen verilerden çizdirilen Eşek Kantifikasyon Grafiği.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Et tür tayininde kullanılan metotlar	9
Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan haberci-söndürücü boya kombinasyonları	15
Çizelge 2.3. Rotor Gene Q cihazında bulunan kanallar ve kullanılabilir boya kombinasyonları	18
Çizelge 3.1. Tekli (at, eşek ya da sığır) DNA Dilüsyon Serilerinin hazırlanışı.....	23
Çizelge 3.2. İkili (at ve eşek) DNA Dilüsyon Serisinin hazırlanışı	23
Çizelge 3.3. Üçlü DNA Dilüsyon Serisinin (SAE-DDS) hazırlanışı.....	24
Çizelge 3.4. Validasyon Karışım Serisinin hazırlanışı	24
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler ve problemlerin sekansları, amplicon büyüklükleri ve problemleri işaretlemekte kullanılan haberci ve söndürücü boya kombinasyonları	25
Çizelge 3.6. HotStarTaq Master Mix ile hazırlanan PZR reaksiyon içeriği	26
Çizelge.3.7. PZR amplifikasyon protokolü.....	26
Çizelge 3.8. QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix Kit ile hazırlanan tekli ve ikili GZ-PZR içeriği	27
Çizelge 3.9. Tekli ve ikili GZ-PZR amplifikasyon protokolü	27
Çizelge 3.10. Üçlü GZ-PZR içeriği	27
Çizelge 3.11. Üçlü GZ-PZR amplifikasyon protokolü	28
Çizelge 3.12. Microsoft Excel DOT işlevi ile elde edilen değerler ve tanımları.....	32
Çizelge 3.13. Güven Aralığı (CI) ve Tahmin Aralığının (PI) alt ve üst değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formüller, Excel işlevleri ve tanımları	32
Çizelge 4.1. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile tekli reaksiyonlarının farklı sıcaklıklardaki verimlilik değerleri	41
Çizelge 4.2. 18S primer ve prob setinin At, Sığır ve Eşek Dilüsyon Serileri ile tekli reaksiyonlarının verimlilik değerleri.....	43
Çizelge 4.3. Üçlü validasyon et karışımlarının üçlü reaksiyonunun at ve 18S primerleri Ct değerleri ve At Kantifikasyon Grafiği için hesaplanan verileri	48
Çizelge 4.4. Üçlü validasyon et karışımlarının üçlü reaksiyonunun eşek ve 18S primerleri Ct değerleri ve Eşek Kantifikasyon Grafiği için hesaplanan verileri.....	50
Çizelge 4.5. At ve eşek kantifikasyon grafiklerinin verim, LOD ve LOQ değerleri.....	52

Çizelge 4.6. Piyasa örneklerinin (40 adet) at, eşek ve 18S primerleri ile üçlü reaksiyon sonuçları.....	53
--	----

1. GİRİŞ

Et, evcil geviş getirenler, kanatlılar, tavşan ve domuzdan elde edilen insan tüketimine uygun tüm parçaları ifade etmektedir (Anonim 1). Özellikle vücut tarafından sentezlenemeyen elzem aminoasitleri bünyesinde bol miktarda içermesi, ek olarak Fe, P, Zn, Cu gibi mineral maddeler ile B12 gibi vitaminler ve yağ içermesi nedeniyle, beslenme açısından büyük önem taşımaktadır (Günşen vd. 2006).

Ülkemizde ve dünyada et sektöründeki en büyük problemlerden biri taşıma ve et ürünlerinin orijinalliğinin bozulmasıdır. Pahalı etlerin daha ucuz etlerle karıştırılması et endüstrisinde yaygın hale gelmiş ve hem sağlıkla hem de inançla ilgili endişeleri de beraberinde getirmiştir. Yapısal benzerlikleri nedeniyle sığır ve koyun etlerine domuz, at ve eşek gibi hayvanların etleri karıştırılabilmektedir. Benzer pigmentasyona sahip et türleri işlenmiş et ürünlerinde kullanıldıklarında tüketici tarafından teşhis edilmesi mümkün olmamaktadır. Halk sağlığının korunmasının yanısıra, dini inanışlar doğrultusunda tüketicilerin aldatılmasının ve ekonomik yönden haksız rekabetin önüne geçilmesi amacıyla uzun yıllardan beri tüketime sunulan et ve et ürünlerinin hangi hayvan etinden yapıldığının belirlenmesi bilim insanlarının başlıca araştırma konularından biri olmuştur (Ekici ve Akyüz 2003).

Tüketicilerin aldatılmasının önlenmesi amacıyla gıdaların kontrolünde, hassas, hızlı sonuç veren, basit, rutin kullanımlara uygun, duyarlılığı yüksek, güvenilir ve aynı zamanda düşük maliyetli yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasına gereksinim giderek artmaktadır. Et ve et ürünlerinin ayırımında duyu niteliklere, anatomik farklılıklara, histolojik özelliklerine, doku ve yağların özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan yöntemlerin yanı sıra immünojenik, elektroforetik ve serolojik metotlar kullanılmaktadır. Bununla birlikte son zamanlarda et tür tayininde DNA'ya dayalı tekniklerin kullanımı önemli hale gelmiştir. Türe özgü primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi basit, hızlı, spesifik ve duyarlı bir analitik yöntemdir ve hatta işlenmiş gıdalarda bile uygulanabilmesi açısından öne çıkmayı başarmıştır (İlhak ve Arslan 2007).

İşlenmiş ve işlenmemiş et ürünlerinde tür tayini yapılabilmesi için ülkemizde ve dünyada birçok çalışma yapılmıştır. Kesmen ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışmada türe spesifik primerler kullanılarak klasik PZR yöntemiyle ikili et karışımlarından hazırladıkları pişmiş sosiste domuz, at ve eşek eti tayini yapılmış ve türlerin %0.1 seviyesinde tayinini gerçekleştirebilmişlerdir (Kesmen vd. 2007). Yine aynı grup sığır ve koyun etlerine at, eşek ve domuz etlerinden ilave ederek hazırlanan ikili et karışımlarından elde ettikleri sucukta %0.1 seviyesinin klasik PZR yöntemiyle tayin edilebileceğini göstermişlerdir (Kesmen vd. 2010). Et türlerinin kalitatif analizinde başarılı bir şekilde kullanılabilen klasik PZR yönteminin kantitatif analiz için yeterli olmadığı bilinmektedir. Bu yüzden hem dünyada hem de ülkemizde et tür tayini ve miktarı konusunda yapılan çalışmalarda kalitatif ve kantitatif analizlerin birlikte yapılabildiği gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) yöntemi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Dooley vd. 2004; Eugster vd. 2008; Fajardo vd. 2008; Soares vd. 2013). Bu yöntemde hedef genin amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyal ölçülerek PZR sonrasında ilave bir işleme gerek duyulmaksızın sonuç alınabilmektedir.

GZ-PZR'de kullanılan floresan temelli metotlar temel olarak iki kategoriye ayrılmaktadır: Probu sistemler (TaqMan vb.) ve DNA'nın içine girerek ışımaya yapan interkalatör boyaların (Sybr green vb.) kullanıldığı sistemler. İnterkalatör boyalar, ortamda bulunan çift sarmal DNA'ya bağlanırlar ve ışımaya yaparlar. Yeni sentezlenen DNA miktarı arttıkça bu bağlanmanın sonucu olarak floresan ışımaya da artar. Sybr green gibi interkalatör boyaların kullanıldığı metotlar probu metotlara göre daha ucuz ve daha hızlı olup tasarımları ve optimizasyonları daha kolay gerçekleştirilebilmektedir. Fakat, Sybr green boyası, ortamdaki bütün çift sarmal DNA'lara bağlanacağı için spesifik olmayan DNA'lar da ışımaya yapar ve bu nedenle miktar analizi yapılması zorlaşır.

Sekansa özel TaqMan gibi problemlerin kullanıldığı sistemlerde ise PZR reaksiyonunda çoğaltılmak istenen amplikona spesifik İleri (F) ve Geri (R) primer çiftine ek olarak uçlarında floresan işaretleyiciler taşıyan, sekansa özel üçüncü bir primer (prob) bulunmaktadır. Bu üçüncü primerin 5' ucunda haberci 3' ucunda ise söndürücü boyalar vardır. Spesifik PZR ürününün çoğalması, amplifikasyon reaksiyonu boyunca probun çoğalacak bölgeye bağlanması ve akabinde o bölgeden koparak ışımaya yapması ile ölçülür. TaqMan prob sistemi hedef DNA'ya spesifik olmasından dolayı çok iyi sonuçlar vermektedir. TaqMan prob kullanarak sığır, koyun, keçi, tavuk, hindi, domuz, at, eşek gibi türlerin etlerinin hem kalitatif hem de kantitatif analizlerinin yapılabileceğini gösteren çalışmalar hem ülkemizde hem de dünyada mevcuttur (Laube vd. 2003; Dooley vd. 2004; Kesmen vd. 2009).

Tüketiciler satın aldıkları ürünün doğru bir şekilde etiketlenmiş olmasını isterler. Yahudilik ve İslam gibi dinler domuz etinin tüketimini tamamen yasaklar ve tüketiciler % 100 sığır eti olduğu beyan edilen bir ürünü alırken bu bilginin doğru olduğundan ve domuz eti içermediğinden emin olmalıdır. Et kıyma haline getirilip karıştırıldığında hangi türe ait olduğunu belirleyici bir özellik taşımaz. Bu nedenle tür tespiti için PZR gibi DNA tabanlı metotların kullanılması önemlidir.

Bu çalışmanın gerekçesi, özellikle son yıllarda içinde Türkiye'nin de olduğu İrlanda ve Meksika gibi ülkelerde birçok taşıyıcı olayı ile karşılaşılması ve piyasa kontrollerinin daha sıkı hale gelmiş olmasıdır. Odak noktası gıda güvenliğinin sağlanması olan bu kontrollerde, özellikle işlenmiş ürünlerde türlerinin kalitatif ve kantitatif analizini güvenilir ve hızlı bir şekilde gerçekleştirecek ek metotlara gereksinim artmıştır.

Bu çalışmanın genel hedefi, işlenmiş sığır eti ürünlerinde tek tırnaklı (at ve eşek) hayvan türlerinin kalitatif ve kantitatif analizini gıda güvenliği laboratuvarlarında yapabilecek güvenilir ve hızlı bir çoklu GZ-PZR metodu geliştirmektir. Bu hedefe iki özel hedef gerçekleştirilerek ulaşılmıştır:

- I. Referans DNA ve et karışım örnekleri hazırlanarak at ve eşek DNA'sına spesifik primer ve problemlerle GZ-PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve metodun validasyon verileri elde edilmiştir.
- II. Özel bir laboratuvarın analiz ettiği, at ve eşek eti bakımından negatif veya pozitif olduğu bilinen 40 adet örneğin geliştirilen metotla analizi yapılmış ve laboratuvarın analiz sonuçları ile karşılaştırmaları yapılmıştır.

Bu çalışmanın önemi denetim veya özel laboratuvarlarda halihazırda var/yok şeklinde yapılan et tür tayini analizlerine miktar analizini de dahil ederek bir adım ileri taşımak ve böylelikle ürünün etiketinde bildirilmemiş bir türün varlığı tespit edildiğine çapraz kontaminasyon mu yoksa bilinçli bir tağşiş mi olduğunun yorumlanmasına olanak sağlamaktır. Ayrıca test edilecek olan piyasa ürünlerindeki tağşişlerin miktarlarını belirlenmesinin et sektöründeki hileli ürün yaygınlığının ve boyutlarının anlaşılmasına, devletin gıda kontrol ve güvenliği politikalarının etkinliğinin ve gerekliliğinin farkına varılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Dünya Geneline Et Ürünlerinde Tağşiş Yaygınlığı

Son yıllarda Avrupa'da sığır eti etiketi ile piyasaya sürülen işlenmiş et ürünlerinde at eti tespit edilmesi ile gündeme gelen konu, İrlanda'da yerel bir sorun olarak başlamış, denetimlerin devam etmesi ile Nestle ve Ikea gibi dev firmalara sıçramış ve firmaların ürünlerini piyasadan toplatmaları ile uluslararası bir hal almıştır (Anonim 1). İrlanda Gıda Güvenliği Otoritesi (FSAI), 2013 Ocak ayında sığır eti olarak etiketlenmiş et ürünlerinde domuz ve at eti tespit etti. %100 sığır olarak etiketlenen 27 burger köftesinin 10 tanesinde (%37) at, 23 tanesinde (%85) domuz DNA'sı pozitif sonuç verdi (FSAI 2013). Hammaddeler analiz edildiğinde ise bazı partilerde at DNA'sı bulaşıklığı rapor edildi. Bir ay içerisinde FSAI, %100 sığır eti olarak bildirilen lazanya ürünlerinin %100 at etinden yapıldığını doğruladı. Bu, İngiltere'de "Horsegate Skandalı" olarak adlandırılan olaylar zincirini beraberinde getirdi. Bu tür sahtekârlıkların ortaya çıkması, üretimde sahtekârlık ve gıdaların etiketlenmesi ile ilgili kanun ve yönetmeliklerin gözden geçirilmesi, kontrollerin artırılması ve sıkılaştırılması konularını bir kez daha karar organlarının gündemine taşımıştır.

İngiltere'de 2013 yılında 68 ilköğretim okulunda verilen yemeklerde at DNA'sı tespit edilmiştir (Jacobs 2013). Ebeveynler ve okul yetkilileri bu ürünlerin% 100 sığır eti olduğunu düşünüyorlardı ve bu sözde sığır eti ürünlerinin çoğu İslami okullara dağıtılmıştı. Yine 2013'te, Güney Afrika'da, kıyma, köfte, şarküteri ürünü dahil olmak üzere 139 işlenmiş etin etiket bilgisi kontrolü için analizleri yapılmış ve 95 örneğin (% 68) etikette yer almayan hayvan türlerini içerdiği tespit edilmiştir (Cawthorn, Steinman and Hoffman 2013). DNA temelli bir metot olan LCD-array (Low Cost Density Array) ile analiz edilen örneklerde 14 farklı hayvan eti türü (sığır, manda, domuz, koyun, keçi, at, eşek, tavşan, tavuk, hindi, kaz ve iki ördek çeşidi) tespit edilmiştir. Sonuçlar ayrıca PZR ile doğrulanmış ve en yaygın bildirilmemiş türlerin domuz ve tavuk olduğu bildirilmiştir. Bu tür tağşişlerin nedenlerinin başında ekonomik fayda elde etmeye çalışmak gelmektedir. Olası başka bir neden ise aynı ekipmanın farklı et türleri için kullanılması ve uygun olmayan temizleme teknikleri nedeni ile önceki üretimlerden çapraz bulaşma gerçekleşmesidir. Tağşişin en fazla yapıldığı ürünlerin sosis, burger köftesi ve şarküteri ürünleri olması ise kıyma şeklindeki sığır etinin içerisine karıştırılacak olan farklı bir türün duyuşal olarak fark edilmesinin çok zor olmasıdır (Cawthorn, Steinman ve Hoffman 2013).

Meksika'da yayınlanan 2000 yılında bir çalışmada, %100 sığır ve geleneksel Meksika sosisi olarak etiketlenen 40 et ürünü, sığır, domuz, at ve kümes hayvanlarının tespiti için AGID (agar-jel immüno difüzyon) ile analiz edilmiştir (Flores-Munguia vd. 2000). Test edilen 40 et örneğinin 14 tanesinde (% 35) beyan edilmemiş türler için pozitif sonuç elde edildi. 23 hamburger örneğinin 9'u beyan dışı at eti ve 17 Meksika sosisi örneğinin 5'inde at ve domuz eti için tespit edilmiştir (Flores-Munguia vd. 2000).

Ülkemizde yapılan denetimlerde de üzerinde %100 sığır eti etiketi bulunduğu halde yapılan analizler sonucu bazı sucuk, salam ve sosislerde kanatlı hayvan etlerine rastlanmıştır (Anonim 2). Yine en çok karşılaşılan bir başka durum ise sığır etinden yapıldığı iddia edilen sucuklarda at ve eşek gibi tek tırnaklı hayvan etlerinin tespit edilmiş olmasıdır (Anonim 3). Yapılan denetimler sonucu tağşiş yaptığı kesinleşen

firmalar Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının resmi sitesinden ilan edilmektedir. En son, 1 Eylül 2016 tarihinde Bakanlık tarafından yapılan açıklamada 135 parti sığır eti ürününde tek tırnaklı eti, kanatlı eti, sakatat ve soya tespit edildiği bildirilmiştir.

İstanbul'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada, Özpınar ve diğerleri (2013) sosis, köfte, salam ve kıyma gibi et ürünlerinden 73 adet et ürünü analiz edilmiştir. GZ-PZR ve LCD-Array ile analiz edilen örneklerin %53,4'ünün (73 örnekten 39'unda) beyan dışı et içerdiğini göstermiştir. Beyan dışı türün en fazla tespit edildiği ürünler köfte, ardından kıyma, salam ve sosis idi. Tespit edilen türler tavuk, hindi ve koyun olup hiçbirinde at ya da domuz DNA'sı tespit edilmedi. 2006 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise, %100 sığır eti olarak etiketlenmiş fermente edilmiş 100 çeşit et ürününde, beyan dışı kümes hayvan eti tespit edilmiştir. % 100 sığır eti olarak etiketlenmiş çiğ etlerde ise at ve geyik DNA'ları rapor edilmiştir (Özpınar vd. 2013a).

410 adet et ve et ürününün analiz edildiği bir çalışmada örneklerin tamamında sığır eti, % 20'sinde tavuk eti ve % 4,3'ünde at eti tespit edilmiştir. Bu veriler örneklerin % 16,3'ünün etiket bilgileri ile uyumlu olmadığını ve %19,2'sinin hileli olduğunu göstermektedir (Günşen vd. 2006). İzmir'de yapılan başka bir çalışmada ise 116 et ve et ürünü içinde 3 üründe domuz eti, 2 üründe at eti ve 1 üründe de sığır/domuz eti karışımı tespit etmişler ve ürünlerin %15,5'inin hileli olduğunu belirtmişlerdir (Türkyılmaz ve Irmak 2008). Türkyılmaz vd. 2009 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada ELISA metodu ile inceledikleri 121 örneğin 4 tanesinde (%2,5) tek tırnaklı, 2 tanesinde (%1,7) ise domuz eti tespit etmişlerdir (Türkyılmaz vd. 2009).

Mersin ve Adana piyasasından toplanan 140 adet et ve et ürününde (45 adet et, 45 adet kıyma, 20 adet fermente sucuk, 30 adet hamburger köfte) ELISA ve AGID metotları kullanılarak domuz ve at eti varlığı araştırılmış, incelenen 140 örneğin 4'ünde (%2,9) at eti tespit edilmiştir (Yalçın ve Alkan 2012).

Son yıllarda İstanbul'da yapılan çalışmalardan birinde tüketime sunulan 500 adet çiğ et ürününde (kıyma, lahmacun iç malzemesi ve kebab), 9 farklı türe (sığır, koyun, domuz, at, eşek, tavuk, kedi, köpek, hamamböceği, fare ve sinek) ait DNA örnekleri GZ-PZR yöntemi ile araştırılmış ve 52 örnekte sığır dışında koyun, tavuk ve at kalıntılarına rastlanılmıştır (Cerit vd. 2015).

Keyvan vd. (2017)'nin, Ankara'da satılan sucuk, salam ve sosislerdeki et türlerini PZR yöntemi ile araştırdıkları bir çalışmada, 37 sucuk örneğin 5 tanesinde (%13,5) kanatlı, 1 tanesinde (%2,7) kanatlı ve tek tırnaklı eti tespit etmişler, 32 salam örneğinin 7 tanesinde (%21,8) ve 33 sosis örneğinin 2 tanesinde (%6,1) kanatlı eti bulmuşlardır. Etiket bilgileri ile karşılaştırıldığında 15 adet (%14,7) örneğin etikette belirtilmeyen farklı hayvan türlerine ait etlerden üretildiği saptanmıştır (Keyvan, Kul ve Tansel 2017).

Edirne, Tekirdağ ve İstanbul piyasasından toplanan %100 sığır eti olduğu beyan edilen tost, hamburger ve pizzaların içerisinde sığır, kanatlı, domuz ve at eti aramasının ELISA metodu ile yapıldığı bir çalışmada 155 gıda örneği incelenmiş ve 2 tost örneğinde at eti tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerin %33'ünde tavuk eti tespit edilmiş, hiçbir örnekte domuz etine rastlanmamıştır. Bu çalışmada sonuç olarak araştırılan

illerde satışa sunulan söz konusu her üç gıdadan birinde taşıdığı tespit edilmiştir (Atalay vd. 2016).

2.2. Türkiye’de Et ürünleri Denetim Mevzuatı ve Düzenlemeler

Türkiye’de son yıllarda, AB’ye uyum çerçevesinde gıda güvenliği ile ilgili mevzuat çalışmaları hızlanmıştır. Bunlar, 1997 yılında çıkarılan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ve buna istinaden et ve et ürünlerine yönelik çıkarılan Tebliğler, 2004 tarihinde yürürlüğe giren 5179 sayılı Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun ve 2010 yılında çıkarılan Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu’dur. Bu yasal düzenlemelerin temel amacı; gıda güvenliğinin, üretici ve tüketici menfaatleriyle halk sağlığının ve çevrenin korunmasını sağlamaktır. Türkiye’de, AB’ye uyum çerçevesinde hayvancılık sektörü, et ve et ürünleri sanayinde gıda güvenliği ile ilgili mevzuatın çıkarılması önemli bir adım olarak görülmektedir (Anonim 4; Anonim 5; Atlı vd. 2010)

5179 sayılı Kanun, ilk yayımlandığı yıllarda Türkiye’deki gıda otoritelerince 560 sayılı KHK’dan çok farklı bulunmamıştır. Öztan ve Kahraman (2005), yeni Kanun’un 560 sayılı KHK’ya göre yalnızca yetkilerin tek elde topladığını, Türk gıda mevzuatının AB gıda mevzuatı ile entegrasyonu konusunda pek bir yenilik getirmediğini ifade etmiştir. Ancak, devamında gelen süreçte, yeni Kanun’a dayanılarak yayımlanan pek çok Tebliğ, Yönetmelik, Talimat vb. düzenlemeler, ileride oluşturulacak olan Gıda Yasası’nın adeta bir ön hazırlığı olmuştur. Bununla birlikte Kanun’un yayımlandığı yıllarda başlamış olan “Eşleştirme Projesi” Türkiye’de gıda güvenliği konusunda önemli ilerleme sağlamıştır. “Eşleştirme Projesi”, Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ile Almanya Gıda, Tarım ve Tüketiciyi Koruma Federal Bakanlığı Tüketiciyi Koruma ve Gıda Güvenliği Federal Ofisi ve Litvanya Cumhuriyeti Gıda ve Veteriner Hizmetleri ile ortaklaşa yürütülen “Türkiye’deki Gıda Güvenliği ve Kontrolü Sisteminin Yeniden Yapılandırılması ve Güçlendirilmesi Avrupa Birliği Eşleştirme” projesidir. Projenin amacı; mevcut Türk Gıda Kanunu’nun 178/2002 numaralı Konsey Tüzüğü ile uyumu, değişimi ve gıda kontrol sisteminin verimli ve etkili uygulanmasının sağlanması amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın kapasitesinin güçlendirilmesidir. AB’den mali destek alan proje, “Gıda Güvenliği ve Kontrolü” ve “Ulusal Gıda Referans Laboratuvarının Kurulması” başlıklı iki alt proje bileşeni olarak Nisan 2006 tarihinden itibaren 18 ay süreyle yürütülmüştür.

2013 yılında tamamlanan proje ile denetimin en önemli kolu olan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlükleri’nde metot birlikteliği ve standardizasyonu sağlamak, yeni analiz metotları geliştirmek, laboratuvarlar arası karşılaştırma testleri ve yeterlilik testleri düzenlemek, halk sağlığını korumaya yönelik çalışmalara katılmak ve bu konuda ilgili kurum ve kuruluşlarla işbirliği yapmak amacıyla Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü kurulmuştur. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın ismi, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı olarak değiştirilerek yeniden yapılandırmaya gidilmiştir. Gıda denetim, ithalat, ihracat numunelerinin laboratuvar analiz sonuçları ve denetim bilgilerinin yer aldığı bir veritabanı olan Gıda Güvenliği Bilgi Sistemi (GGBS)’nin kullanımına başlanmıştır (Anonim 6).

Türkiye’de gıda güvenliğini denetleyen otorite konumunda bulunan Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın yanı sıra Sağlık Bakanlığı, İl Özel İdareleri ve Belediyeler de denetim yapma yetkisine sahiptirler (Anonim 7).

2.3. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No 2012/74)

Et ve et ürünlerindeki taklit ve tağşiş olaylarını önlemek amacıyla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2009 itibariyle denetimleri arttırmış ve 1 Mart 2013’te yürürlüğe giren “Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği”ni 15 Aralık 2012 tarihinde resmi gazetede yayımlamıştır. Bu tebliğ ile taklit ve tağşişe neden olan birçok nokta yasaklanmıştır. Ambalaj tasarımından içerik bilgilerine, kullanılan katkı maddelerinden ürün ismine varıncaya kadar her noktayı açıklayan tebliğe göre büyükbaş (sığır, manda ve deve) ve küçükbaş (koyun ve keçi) hayvanlardan elde edilen kırmızı etler birbirleri ile karıştırılabilir. Bu ürünlerin ancak kendi aralarında karıştırılabileceği ifade edilmiştir. Koyun eti ile sığır eti ya da kanatlı etleri birbiriyle karıştırılabilir. Bu iki durum dışında farklı hayvan türlerine ait etler birbiriyle karıştırılamaz. Ancak sadece üretim teknolojisi gereği kanatlı eti ürünlerine kırmızı et veya yağı karıştırılabilir. Ayrıca, ürünlerin içinde kemik, kıkırdak ve sakatat kullanımı yasaklanmış, sakatatın ancak tek başına “sakatat” ismiyle satılabileceği belirtilmiştir. Et ürünlerinde, kanatlı et, yalnızca salam, sosis ve jambonda kullanılabilir, fermente sucuk, ısıtılmış sucuk ve pastırma gibi ürünlerde ise yalnızca kırmızı et kullanılabilir.

Soya, soya unu, et aroması, dışarıdan et proteini ve hayvansal kaynaklı olmayan protein kullanımı da yasak kapsamına alınanlar arasındadır. Üründe istenen et proteini oranları uygun kalitede et kullanılarak sağlanacak olup et proteini miktarı etikette mutlaka ifade edilecektir.

Tür ismiyle birlikte ve türü yansıtabilecek ambalaj tasarımı ile sunulacak olan ürünlerde %100 ifadesi kullanılması, tüketiciyi yanıltıcı tasarımlar ve isimlendirmeler yapılması da getirilen yasaklar arasındadır.

Bu tebliğle, yürürlükten kalkan "Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği"nin (Tebliğ No: 2006/31) 4. maddesinde yer alan ve "diğer kasaplık hayvanlar" olarak tanımlanan domuz, yaban domuzu, at ve tavşan türleri bu tebliğde tanımlanmamıştır. “Et ve Et Ürünleri Tebliği”nde bu hayvanlarla ilgili bir tanımlama yapılmaması ya da atıfta bulunulmaması ve önceki tebliğin yürürlükten kalkmış olması; domuz, yaban domuzu eti ve at etinin kasaplık hayvan kategorisinden kalktığı ve yasaklandığı anlamına gelmektedir.

Piyasadaki ürünlerin Gıda Kodeksine uygunluğunun tespiti ve ürünün etiketinde bildirilen bilgilerin kontrolü için kontrol laboratuvarlarının işlenmiş et ürünlerinde etlerin türlerini ve miktarlarını tespit etmesi zorunlu hale gelmiştir.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2012 yılından bu yana “5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu” ve bu Kanun kapsamında hazırlanan, “Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelik” gereğince; laboratuvar sonucuyla taklit veya tağşiş yapıldığı kesinleşen gıdaları üreten/ithal eden; kişilerin hayatını ve sağlığını tehlikeye düşürecek şekilde bozulmuş, değiştirilmiş

gıdaları üreten ve/veya satan firmanın adı, ürün adı, markası, parti ve/veya seri numarasını içeren bilgiler kamuoyunun bilgisine sunulmaktadır. Böylece ilk kamuoyu duyurusunun yapıldığı 2012 yılından bu yana 769 firmaya ait 1605 parti ürün tüketicilerin bilgisine arz edilmiştir (Anonim 8).

2.4. Tür Tayini için Kullanılan Yöntemler

Et tür tayini için ette bulunan proteinlerin ya da DNA'nın tespitine dayanan teknikler kullanılmaktadır. Proteine dayalı teknikler, elektroforetik, kromatografik ve immünojenik (Asensio vd. 2008) teknikler olup işlenmemiş et ürünlerine uygulandıklarında yüksek hassasiyet gibi avantajları olmakla birlikte işlem görmüş etlere uygulandıklarında aynı sonuçlar proteinlerin ısı, yüksek basınç ve diğer işlem teknolojilerinden kaynaklı degradasyonuna bağlı olarak alınamamaktadır. Bununla birlikte ELISA ve AGID gibi proteine dayalı teknikler DNA temelli testlerle aynı hassasiyete sahip değildir. Örneğin, en düşük tespit limiti bazı ELISA testlerinde %2-10 arasında iken PZR analizlerinde bu oran %0,1'e kadar düşmektedir (Özpınar *et al.* 2013). LCD ya da DNA Mikroçip testleri ise %0,1 hassasiyete sahip olmakla birlikte bu testlerde arka plan gürültüsü yüksek olduğundan yanlış pozitif sonuçlar elde etme riski yüksek olmaktadır (Yosef, Al-Julaifi and A.M.A 2014). Dolayısıyla proteine dayalı tekniklerin özellikle işlenmiş et ürünlerinde et tür tayininde kullanılması çok tercih edilmemektedir. Proteinlerle kıyaslandığında DNA molekülünün sıcaklık ve basınç işlemlerine dayanıklı olması ve her hücre tipinde DNA'nın bulunması işlenmiş gıdalarda DNA analizini mümkün kılmaktadır (Mafra, Ferreira ve Oliveira 2008).

Çizelge 2.1'de Kane (2015) tarafından yapılan et tür tayininde kullanılan metotların karşılaştırmalı olarak bir özeti verilmektedir. Metotlar karşılaştırmalı olarak düşünüldüğünde hayvan türü tespitinde PZR temelli testlerin sektör standardı olarak kabul edildiği söylenebilir.

Çizelge 2.1. Et tür tayininde kullanılan metotlar (Kane 2015)

Analiz Metodu	Tahmini fiyat	Analiz süresi	Anatajları ve Dezavantajları	Referans
ELISA	Değişken olmakla birlikte ortalama \$3,90	Min 2 s	Avantaj: Hızlı, çığ ve pişmiş etlerin tespitinde etkili, zaman tasarruflu Dezavantaj: Karışık et örneklerinde en düşük tespit limiti %2-10. Kontaminasyon kaynaklı yanlış pozitif sonuç verme riski yüksek	(Hsieh vd. 2005; Ayaz, Ayaz ve Erol 2006)
AGID	Değişken olmakla birlikte ortalama \$1,33	Min. 24 s	Avantaj: Uygulaması kolay ve ekonomik. Dezavantaj: Çok değişken hassasiyet (örn: koyun ve hindiyi tam olarak ayıramıyor). Kontaminasyon kaynaklı yanlış pozitif sonuç verme riski yüksek	(Hsieh vd. 2005)
DNA Barkotlama	Sekans başına \$2,00	24-48 s	Avantaj: Tanımlamanın kolaylığı açısından korunmuş gen bölgeleri hedeflenerek universal primerlerin kullanılması Dezavantaj: Türlerin veribankasında tanımlanmış olması gerekir.	(Hebert vd.2003)
Türe özgü PZR	\$1,80	-2,5 s	Avantaj: Aynı andan birden fazla tür tespitinin yapılabilmesi, yüksek spesifite, hassasiyet ve kesinlik değerleri, %0,1 tespit limiti Dezavantaj: Kontaminasyondan kaynaklı yanlış pozitif riski	(Cawthorn, Steinman ve Hoffman 2013)
GZ-PZR	\$2,20	-1,5-2 h	Avantaj: Klazik PZR'den daha hızlı sonuç. Otomasyona elverişli. %0,1 tespit limiti ile aynı anda birden fazla türün tespiti. Miktar tayinine olanak sağlaması. Dezavantaj: Maliyetinin yüksek olması	(Özpinar vd. 2013)
LCD array	\$3,00	45 dk (PZR süresi dahil değil)	Avantaj: Kolay örnek hazırlığı, aynı anda birden fazla türün tespiti, yüksek hassasiyet (%0,1 tespit limiti). Dezavantaj: Miktar tayini yapılamaması, arkaplan gürültüsünün yüksek olmasından dolayı hatalı okuma yapma riski	(Cawthorn, Steinman ve Hoffman 2013; Yosef, Al-Julaifi ve A.M. 2014)

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Klasik ve Gerçek Zamanlı

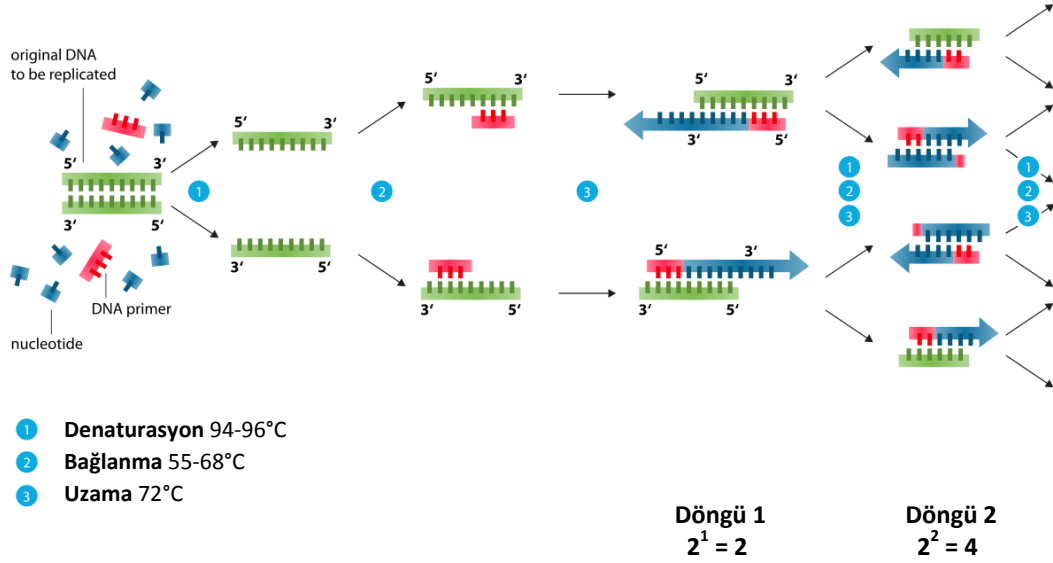
Son zamanlarda et tür tayininde DNA'ya dayalı tekniklerin kullanımı önemli hale gelmiştir. Şubat 2013 tarihinde Avrupa'da ortaya çıkan at eti skandalı üzerine Brüksel'de gerçekleştirilen toplantı sonrası Avrupa Birliği Sağlık Komisyonu üyesi Tonio Borg, Avrupa Birliği üyesi ülkelerde et ürünlerinin analizlerinin yalnızca DNA'ya dayalı metotlarla gerçekleştirileceği açıklamasını yapmıştır (Anonim 9).

PZR moleküler biyolojide kullanılan en önemli ve güçlü tekniklerden biridir. PZR ile DNA ya da cDNA (komplementer DNA)'dan istenen gen bölgeleri milyonları bulan sayılarda kopyalanabilir ya da çoğaltılabilir (Şekil 2.1). Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olanlar çoğaltılmak istenen bölgeye göre tasarlanmış ileri (F) ve geri (R) primerler, termostabil DNA polimeraz enzimi ve termal döngü cihazıdır.

PZR'de her döngüde tekrarlanan 3 ana basamak vardır. Reaksiyonlar genellikle 30-40 döngü aralığında gerçekleştirilir.

1. Denatürasyon: Yüksek sıcaklıkta çift sarmal DNA "erir" ve tek iplik haline gelir. Bu basamak genellikle DNA polimerazın dayanabileceği en yüksek sıcaklık olan 95°C'de gerçekleştirilir.
2. Bağlanma: Bağlanma basamağında birbirini tamamlayan sekanslar hibridize olma şansı yakalarlar. Bu aşamanın primerlerin erime sıcaklığına (T_m) uygun olarak seçilmesi gerekir (primerlerin T_m değerlerinin 5°C aşağısı)
3. Uzama: 70-72°C'de DNA polimerazın aktivitesi optimumdur ve primer uzaması 100 baz/saniye hızında gerçekleşir. GZ-PZR'de genellikle çoğalacak olan ampikon kısa olduğundan bu aşama genellikle 60°C'deki bağlanma aşaması ile birleştirilir.

İşlenmiş ve işlenmemiş et ürünlerinde tür tayini için ülkemizde ve dünyada PZR metodu ile birçok çalışma yapılmıştır. Kesmen ve diğerleri (2007) tarafından yapılan bir çalışmada türe spesifik primerler kullanılarak klasik PZR yöntemiyle ikili et karışımlarından (sığır ya da kuzu etlerine at, eşek ve domuz etlerinden %0,0, %0,1, %0,5, %1,0 ve %5,0 karıştırılarak) hazırladıkları pişmiş sosiste domuz, at ve eşek eti tayini yapılmaya çalışılmış ve %0,1 seviyesinde bile karıştırılmış et türleri tayin edilebilmiştir (Kesmen, Sahin ve Yetim 2007). Yine aynı grup sığır ve koyun etlerine at, eşek ve domuz etlerinden her biri %0,0, %0,1, %0,5, %1,0 ve %5,0 seviyelerinde ilave edilerek hazırlanan ikili et karışımlarından elde ettikleri sucukta %0,1 seviyesinde bile et türlerinin klasik PZR yöntemiyle tayin edilebileceğini göstermişlerdir (Yetim vd. 2010).



Şekil 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda hedef bölgenin çoğalma prensibi (Anonymous 1)

Et türlerinin tespit edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilen klasik PZR yöntemin miktar analizi (kantitatif analiz) için yeterli olmadığı bilinmektedir. PZR teorik olarak hedef bölgeyi üstel bir şekilde çoğaltmaktadır. Yani her döngüde hedef bölgenin sayısı teorik olarak iki katına çıkar (Şekil 2.1). PZR metodu reaksiyonu sonunda oluşan ürünün miktarı ve döngü sayısı bilinirse hedef bölgenin başlangıçtaki miktarı, bilinen bir standartla karşılaştırılarak hesaplanabilir fikri ile GZ-PZR metodunu geliştirilmiştir. Klasik PZR'de, çoğaltılan sekansın tespiti tüm döngüler tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen jel elektroforez analizi ile mümkün olmaktadır. GZ-PZR'de ise hedef bölgenin amplifikasyonu her döngüde ölçülmektedir. Reaksiyonun üstel faza geçiş anının tespit edilebilmesi hedef bölgenin başlangıç miktarını yüksek bir doğruluk ve hassasiyetle, geniş bir dinamik aralıkta hesaplayabilme imkanı vermektedir. Böylelikle klasik PZR çoğunlukla spesifik DNA bölgelerinin çoğaltılması ve dizilenmesi, klonlama çalışmaları ve diğer moleküler biyoloji tekniklerinde kullanılırken et türlerinin kalitatif tespiti (var/yok analizi) ve miktar tayini (kantitatif analiz) konusunda yapılan çalışmalarda GZ-PZR yöntemi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Eugster vd. 2008; Soares vd. 2013). GZ-PZR'ın klasik PZR'ye göre avantajları maddeler halinde şu şekilde özetlenebilir:

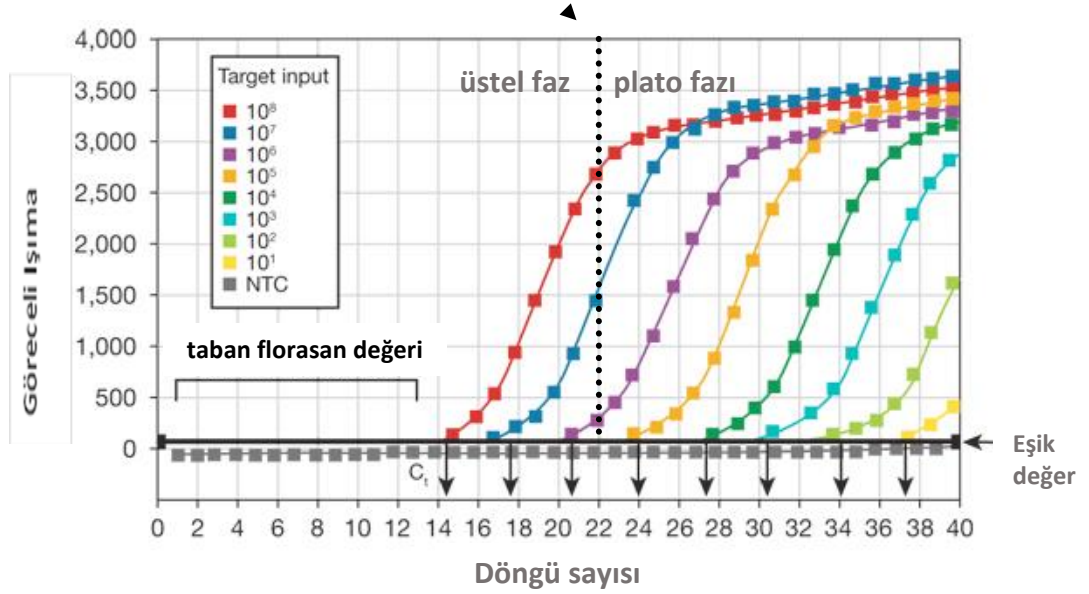
(1) Hedef bölgenin başlangıç materyaldeki miktarının ya da kopya sayısını hesaplamaya olanak sağlaması,

(2) Reaksiyon sonrasında jel elektroforezi gibi ek analizlere gerek kalmadan verilerin değerlendirilebilmesi, böylelikle deney süresinin kısalması ve yüksek sayıda örneğin analiz edilebilmesi ,

(3) Reaksiyonları ve veri analizleri kapalı tüp içerisinde gerçekleştiğinden düşük kontaminasyon riski, kontrol için amplifikasyon sonrası herhangi başka bir analize gerek kalmaması.

2.5.1. GZ-PZR çalışma prensibi

GZ-PZR'nin nasıl çalıştığının anlaşılabilmesi için örnek bir amplifikasyon eğrisi üzerinden açıklama yapılabilir. Reaksiyon boyunca floresan ışımadaki değişim, termal döngü ve floresan bölgede tarama yapabilme özelliklerini birleştiren cihazlar tarafından ölçülmektedir. Reaksiyon boyunca kaydedilen verilerden, floresan ışımaya miktarının döngü sayısına karşı çizilen grafikten bir amplifikasyon grafiği elde edilir ve bu grafik PZR süresince biriken ürünü temsil eder (Şekil 2.2). Bu grafikte x eksenini döngü sayısını, y eksenini ise PZR sırasında tüpün içinde oluşan ampikon miktarı ile doğru orantılı bir şekilde artan floresan sinyali göstermektedir.



Şekil 2.2. GZ-PZR analizinde ölçülen floresanın, döngü sayısına karşılık amplifikasyon grafiği (Anonymous 2)

GZ-PZR amplifikasyon grafiği 2 fazdan oluşur: üstel faz ve akabinde yer alan plato fazı. Üstel faz süresince PZR ürününün miktarı her döngüde ikiye katlanır. Bununla birlikte reaksiyon ilerledikçe, reaksiyon bileşenleri tükenir, bir ya da daha fazla bileşen kısıtlı hale gelir. Bu noktada reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer (Şekil 2.2, kırmızı renkli eğri, 22-40 döngüleri arası).

Reaksiyonun ilk döngülerinde floresan değeri taban değerinin altında kalır. Bu aşamada ürün üstel olarak biriktiği halde artan floresan miktarı tespit edilemez (Şekil 2.2., 0-14 döngüleri arası). Zamanla ortamda tespit edilebilir miktarda floresan ışımaya yapacak kadar ürün birikir. Bu nokta, eşik döngü olarak adlandırdığımız C_t değeridir. C_t değeri üstel fazda henüz hiçbir bileşen kısıtlı değil iken tespit edildiğinden, hedef sekansın reaksiyonun başlangıcındaki miktarını hesaplamak mümkün olabilmektedir.

C_t değerini, amplifikasyon reaksiyonunun başlangıcında var olan hedef bölgenin miktarı belirler. Amplifikasyon sırasında çoğalacak olan bölgenin miktarı çoksa taban değerinin üzerinde floresan sinyal verecek kadar ürünün birikmesi için göreceli olarak daha az döngü gerekecektir. Bu nedenle reaksiyon düşük (ya da erken) C_t değerine sahip olacaktır. Bunun tersi olarak, eğer reaksiyonun başında hedef bölgenin miktarı

çok azsa, taban değerinin üzerinde floresan sinyali için daha fazla döngüye ihtiyaç olacaktır. Bu nedenle reaksiyon yüksek (ya da geç) Ct değerine sahip olur. Ct değeri ve hedef bölgenin miktarı arasındaki bu ilişki GZ-PZR'nin kantitatif olma özelliğinin temelini oluşturur. Şekil 2.2.'de bu ilişki açıkça görülmektedir.

2.5.2. GZ-PZR'nin reaksiyon kimyası

Bir GZ-PZR metodu geliştirilirken en önemli aşama hedef sekansın çoğalmasının hangi kimya ile takip edilecek olduğudur. Farklı floresan kimyaları mevcut olmakla birlikte genel olarak iki başlık altında toplanabilirler: (1) çift-sarmal DNA'ya bağlanan boyalar (Sybr green I) ve (2) boyalı ve sekansa spesifik oligonükleotid primer ve/veya problemler (TaqMan, molecular beacons, Eclipse problemler, Scorpion vb.). GZ-PZR reaksiyonlarında en yaygın kullanılan kimyasallarlar Sybr green I ve TaqMan Hidroliz problemleridir.

Metotta hangi kimyasalının kullanılacağı reaksiyonun nasıl (tekli ya da çoklu) gerçekleştirileceğine ve maliyet önceliklerine bağlıdır. Genel olarak az örnek analizi gerektiren tekli deneylerde DNA'ya bağlanan boyalar tercih edilir çünkü deney dizaynı daha kolay, deneyin kurulumu daha hızlı ve başlangıç maliyeti daha düşüktür. Bununla birlikte, çok örnek analizi gerektiren deneyler için floresan etiketli primer ve problemlerin kullanılması tercih edilir çünkü yüksek başlangıç maliyeti gerçekleştirilecek olan çok fazla deneye bölüştürüldüğünde düşecektir. Ayrıca bu sistemle çoklu reaksiyonlar gerçekleştirilebilir ve böylelikle deney süresi kısaltılabilir. Çoklu reaksiyonlarda floresan boyalı primer ve problemlerin kullanılması zorunludur çünkü DNA'ya bağlanan boyalar sekansa spesifik değildir. Bu nedenle kantitatif çoklu reaksiyonlarda kullanılamazlar.

2.5.3. Çift sarmal DNA'ya bağlanan boyalar

GZ-PZR reaksiyonlarında en yaygın olarak kullanılan boya Sybr green I boyasıdır. Bu tip boyalar ortamda bulunan çift sarmal DNA'ya bağlanırlar. Reaksiyon çözeltisi içinde serbest halde iken çok az ışımaya yapan Sybr green I boyasının floresan ışımaya, yeni sentezlenen DNA sekanslarına bağlandıkça 1000 kat kadar artar. Bu nedenle reaksiyonda meydana gelen toplam ışımaya ortamda varolan çift sarmal DNA miktarı ile doğru orantılıdır, hedef bölge çoğaldıkça ışımaya artar.

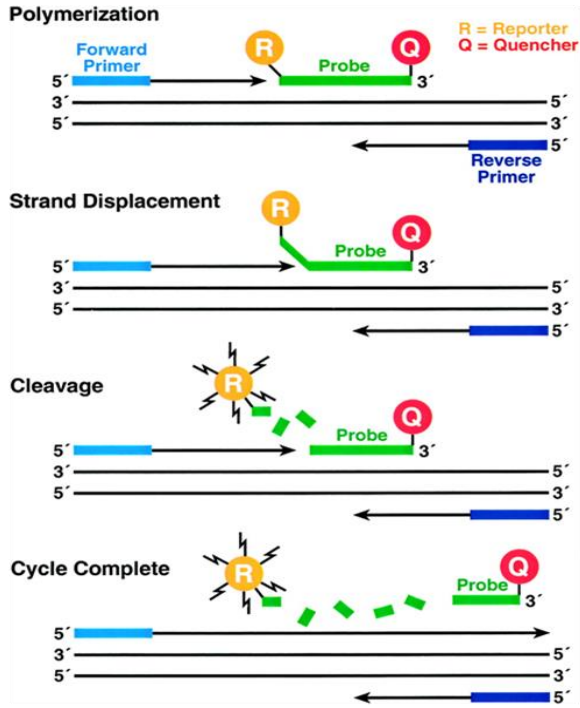
Çift sarmal DNA'ya bağlanan boyaları kullanmanın en önemli avantajları deney dizaynının kolay olması (yalnızca ileri ve geri primerlere ihtiyaç vardır, prob dizaynı yapmaya gerek yok), düşük başlangıç maliyeti ve amplifikasyondan sonra spesifikitenin erime eğrisi analizi ile kontrol edilebilmesidir. Erime eğrisi analizi farklı reaksiyon ürünlerinin tespiti için kullanılır. Amplifikasyonun tamamlanmasından sonra sıcaklık çok yavaş bir şekilde küçük aralıklarla artırılır ve her aşamadan floresan sinyali kaydedilir. Sıcaklık arttıkça DNA erir (çift sarmal yapısı bozulur, tek iplik haline gelir) ve floresan ışımaya düşer. Sıcaklığa karşı floresan ışımadaki değişimin birinci türevinin negatif değerine çizilen grafik ile her bir amplikon için spesifik olan erime sıcaklığı (T_m) değeri tespit edilmiş olur. T_m değeri, çift iplik DNA'nın %50'sinin tek iplik halinde olduğu sıcaklık değeridir. Erime eğrisinde pik veren sıcaklık değeri, reaksiyon sonucu oluşan amplikona özgü karakteristik bir değerdir. Erime eğrisinden birden fazla

pik olması, reaksiyon sırasında spesifik olmayan fragmentlerin de (primer-dimer vb.) çoğaldığını gösterir (López-Andreo, Garrido-Pertierra ve Puyet 2006).

Sybr green metodunun çeşitli hayvan eti türlerinin ve miktarının hem işlenmiş hem de işlenmemiş et ürünlerinde tayini için başarılı şekilde sonuç verdiği çalışmalar literatürde mevcuttur (López-Andreo, Garrido-Pertierra ve Puyet 2006; Fajardo vd. 2008; Soares vd. 2013). Bununla birlikte Sybr green metodunun en önemli dezavantajı, her ne kadar erime analizi ile ürün spesifitesi kontrol edilse de spesifik olmayan bir fragmentin çoğalması durumunda boya ortamdaki bütün çift sarmal DNA'lara bağlanacağı ve dolayısı ile toplam ışımaya miktarı artacağı için doğru, tekrarlanabilir ve hassas bir miktar analizinin yapılması zorlaşacaktır. Ayrıca bu tür boyalar ile çoklu reaksiyonların tasarlanması mümkün değildir. Birden fazla gen araştırma konusu olduğunda her bir gen için ayrı tüplerde paralel reaksiyonlar kurmak gerekir.

2.5.4. Floresan etiketli primer ve prob tabanlı sistemler

Ticari olarak birçok floresan boyalı primer ve prob tabanlı sistem bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanı deqkırımızyasyon probu olarak da bilinen TaqMan prob sistemidir. Bu tür sistemlerde primerler ya da hedefe spesifik oligonükleotid proplar haberci bir boya ile etiketlenir ve çoğu sistemde bu proplar ortamda hedefin bulunmadığı durumlarda ışımaya yapmayacak şekilde tasarlanır. Bir ucu haberci boya ile etiketlenmiş oligonükleotidin ışımaya yapmaması, diğer ucunun söndürücü boya ile etiketlenmesi ile mümkün olur. Prob hedef bölgeye bağlandığında haberci ve söndürücü boyalar Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile birbirlerinden ayrılırlar ve ışımaya gerçekleşir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. TaqMan prob sisteminin çalışma prensibi (Anonymous 2)

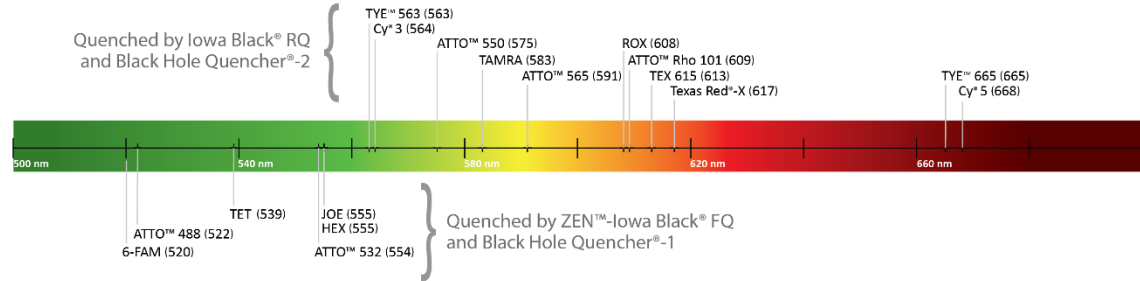
GZ-PZR metotlarında, floresan etiketli primer ve proplar, DNA'ya bağlanan boyalara göre 2 önemli avantaja sahiptirler: (1) spesifik olarak hedef sekansı tespit ederler ve spesifik olmayan ürünlerin oluşması miktar analizinin doğruluğunu etkilemez (2) Çoklu reaksiyonların tasarlanmasına olanak sağlarlar.

TaqMan sisteminde sekans-spesifik primer çifti ile birlikte ayrıca TaqMan prob olarak adlandırılan sekans-spesifik floresan etiketli bir oligonükleotid daha bulunur. TaqMan prob primerlerin çoğalttığı bölgeye spesifik olarak bağlanan üçüncü bir primerdir. Bu primerin 5' ucunda haberci, 3' ucunda ise söndürücü boya vardır. Prob çözelti içinde serbest halde iken haberci boya söndürücü boya ile çok yakın olduğundan ışımaya yapamaz. Şekil 2.3'de gösterildiği gibi amplifikasyon reaksiyonunun bağlanma ve uzama basamağında prob hedef bölgeye bağlanır ve Taq polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi önüne gelen probu parçalarken haberci boyayı serbest bırakır. Sonuç olarak haberci söndürücü boyadan uzaklaşır ve hedef bölgenin çoğalma hızına orantılı olarak floresan sinyalde artış kaydedilir. Yaygın olarak kullanılan haberci ve söndürücü boya çiftlerine fluorescein (FAM, yeşil floresan yayar) ve Black Hole Quencher 1 (BHQ1) çifti örnek verilebilir. Birbirleri ile uyumlu diğer haberci-söndürücü çiftler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan haberci-söndürücü boya kombinasyonları (*DABCYL mekanik bir söndürücüdür ve molecular beacons için uygundur **TAMRA söndürücü olarak tavsiye edilmez fakat tek-renkli FAM deneylerinde kullanılabilir)

Haberci	Uygun söndürücü
FAM (fluorescein)	BHQ1, DABCYL*, TAMRA**
JOE	BHQ1
Cy5	BHQ2, BHQ3
TET	BHQ1, DABCYL*
HEX	BHQ1, BHQ2, DABCYL*
TAMRA	BHQ2, DABCYL*
Texas Kırmızı	BHQ2, BHQ3, DABCYL*
ROX	BHQ2, BHQ3, DABCYL*

Şekil 2.4'de haberci ve söndürücü boyalar dalga boyları ile birlikte gösterilmektedir. Kullanılmak istenen florofora uygun söndürücü boya seçimi için bu tür şekillerden yararlanılabilir.

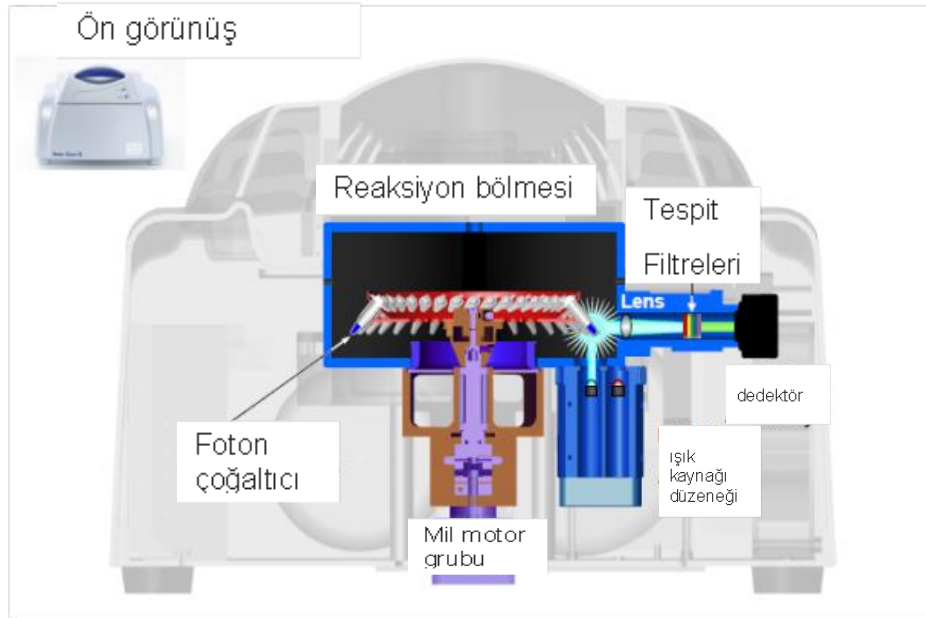


Şekil 2.4. Florofor haberci boya ve uygun söndürücü boya dalga boyları ve uygun söndürücüleri (Prediger 2015).

Gerçek zamanlı PCR cihazlarının birçok farklı modeli mevcuttur. Her model floresan boyaları uyarmak için bir eksitasyon kaynağına ve floresan emisyonları algılamak için bir dedektöre sahip olmalıdır. Ayrıca, cihazda thermal döngüleyici bulunmalıdır. Şekil 2.5'de çalışmada kullanılan Rotor Gene Q cihazının optik sistemi gösterilmektedir.

Rotor Gene Q, 6 eksitasyon kaynağı seçeneği ve kısa, sabit bir optik yolla birleştirilmiş 6 tespit filtresi ile çoklu reaksiyonlar için kullanılmak üzere geliştirilmiş bir cihazdır.

Reaksiyon tüpünün içindeki örnekler haznenin altından ışık yayan diyot (LED) ile uyarılır. Enerji tüpün tabanındaki ince duvarlarından nakledilir. Yayılan floresanlık reaksiyon haznesinin yan tarafındaki emisyon filtrelerinden geçer bir foton çoğaltıcı tarafından toplanır. Sabit optik yol her örnek için tutarlı bir uyarılma sağlar, yani ROX gibi pasif bir iç referans boyası kullanılmasına gerek yoktur.



Şekil 2.5. Rotor Gene Q cihazının optik sisteminin illüstrasyonu. Işık kaynağı ve Dedektör filtreleri (Anonymous 3)

2.5.5. Çoklu GZ- PZR analizi

Çoklu reaksiyon, aynı tüpün içerisinde birden fazla hedefin analiz edildiği bir GZ-PZR tekniğidir. Her bir hedef belirli bir boya ile, yani hedefe spesifik primer çifti ve floresan etiketli proba ayırt edilir. Çoklu PZR kalitatif ve kantitatif sonuçlar elde etmek için kullanılabilir. Başarılı bir kantitatif sonuç için, tüm dizilerin yeterli sinyal üretmesi gerekir. Tekli reaksiyon tek bir genetik sekansı çoğaltmak için tasarlanmışken ikili reaksiyon iki genetik sekansı çoğaltmak için tasarlanmış bir testtir. En yaygın kullanılan çoklu reaksiyon ikili reaksiyondur. İkili reaksiyon genellikle hedef geni ve normalleştirici geni aynı reaksiyonda çoğaltmak için kullanılır.

Teorik olarak, aynı reaksiyonda çoğaltılabilecek hedeflerin sayısı mevcut spektral kullanılabilen özellikleri farklı boyaların sayısı ve GZ-PZR cihazının kanal sayısı ile sınırlıdır. Bununla birlikte, deneysel kısıtlamalar da vardır: Bir reaksiyondaki farklı primer çiftleri ve/veya problemleri birbirleriyle etkileşime girmemelidir. Ayrıca bu primerler ve problemler dNTP ve termostabil DNA polimeraz gibi mevcut PCR bileşenlerini paylaşmak zorundadır (Anonymous 2).

Çoklu bir metodun optimizasyonu çok zaman alıcı olduğu halde çeşitli avantajlar sağlamaktadır:

- Daha az değişkenlik, daha fazla tutarlılık,
- Daha az reaktif kullanımı, daha az maliyet,
- Daha fazla örnek analizi,

Örneğin, analiz tek bir hedeften oluşuyorsa, reaksiyonu bir hedef ve bir kontrol (normalleştirici) bölgeyi çoğaltacak şekilde ikili olarak kurmak analiz edilecek örnek sayısını artıracak, ihtiyaç duyulan örnek miktarını ve kullanılan reaktif kullanımını 2 kat azaltacaktır.

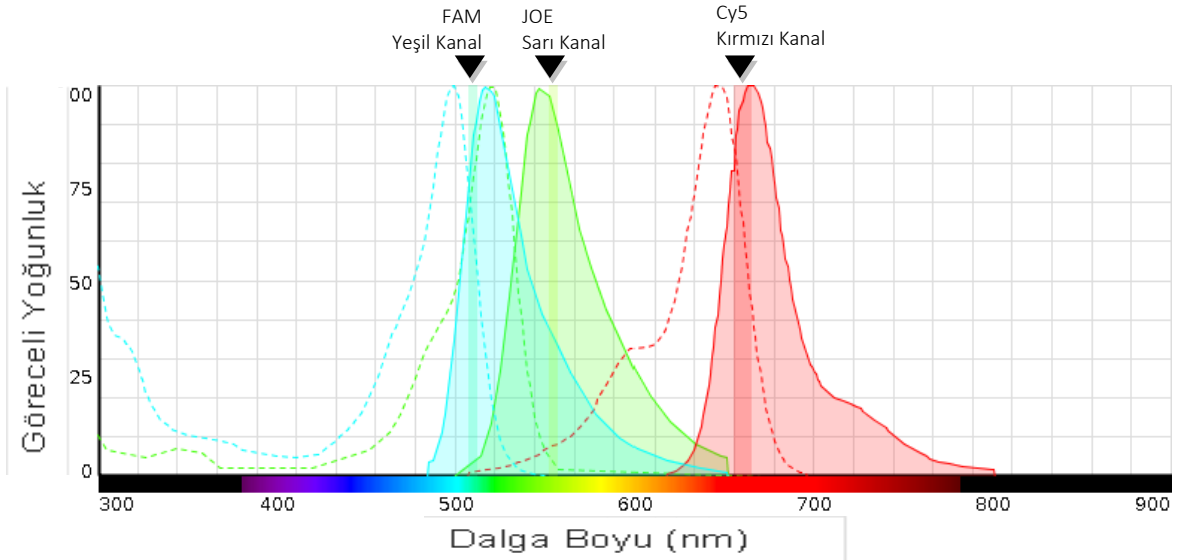
Çoklu reaksiyonun en önemli avantajlarından bir diğeri ise pipetlemeden kaynaklanan hataları en aza indirmesidir. Hedef bölgeler ve kontrol bölgesi aynı tüp içerisinde aynı örnekte çoğaltılacağından, herhangi bir pipetleme hatası her bir bölgeyi aynı derecede etkileyecektir. Bu hassasiyet avantajından faydalanabilmek için, paraleller (teknik replika) arasındaki sapmayı hesaplamadan önce her bir tüpten elde edilen hedef bölge verisinin kontrol bölge verisi ile normalize edilmesi gerekir.

Çoklu reaksiyonlarda her bir hedef için farklı bir raportör boya gereklidir. Seçilen boyalar, hedef bölgeler aynı tüpte çoğalırken yeterince ışığa yapabilmeli ve hassas bir şekilde cihaz tarafından tespit edilebilmelidir. Çalışmadaki analizlerin gerçekleştirildiği Rotor Gene Q cihazından bulunan dedeksiyon kanalları ve uygun boyalar Çizelge 2.3'de verilmiştir. Çalışmada üçlü olarak gerçekleştirilecek çoklu reaksiyonda kullanılacak olan kanal ve boyalar bu çizelgeye göre Yeşil (FAM), Sarı (JOE) ve Kırmızı (Cy5) olarak seçilmiştir.

Çizelge 2.3. Rotor Gene Q cihazında bulunan kanallar ve kullanılabilir boyalar (Anonymous 3)

Kanallar	Eksitasyon (nm)	Emisyon (nm)	Uygun boyalar
Blue	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Yeşil	470±10	510±5	FAM®, SYBR® Yeşil I, Fluorescein, EvaYeşil®, Alexa Fluor 488
Sarı	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Sarı®
Orange	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Kırmızı 610, Cy®3.5, Texas Kırmızı®, Alexa Fluor 568
Kırmızı	625±10	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Kırmızı640, Alexa Fluor 633
Crimson	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Kırmızı705, Alexa Fluor 680
HRM	460±20	510±5	Sybr green I, SYTO®9, LC Yeşil®, LC Yeşil Plus+, EvaYeşil

Çalışmada sığır eti ürünlerinde analiz edilmek istenen bölge sayısı 2 hedef sekans (at ve eşek) ve 1 içsel kontrol sekansı (18S rRNA) olduğundan reaksiyonlar üçlü olacak şekilde tasarlanmıştır. Analiz edilen bölgelerin tespit edilmesi için tasarlanan problemlerde kullanılan boyalar ve okuma yapılan dedeksiyon kanalları Şekil 2.6'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Çalışmada kullanılan boyaların ve Rotor Gene Q cihazındaki filtrelerin Uyarılma (---) ve emisyon (—) dalga boyları (lifetechnologies.com/spectraviewer)

2.5.6. Çoklu analizlerde primer ve prob tasarımı

Çoklu analizlerde primer ve prob tasarımı tartışmasız en kritik faktördür. Reaksiyon karmaşıklığı arttıkça, primerler ve problemlerin dimerize olma olasılığı artacak ve ayrıca reaksiyon bileşenleri için rekabet bir veya daha fazla hedefin amplifikasyonunu sınırlayacaktır. Aşağıdaki faktörler, rekabet etkilerini en aza indirirken performansı maksimize etmek açısından önemlidir:

- Amplikonları kısa tutmak. Amplifikasyon 60 bp ila 150 bp arasında bir bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlamak reaksiyon verimliliğini arttıracaktır.
- Tm değerleri birbirine yakın primerler tasarlamak. Tüm primer ve problemlerin aynı tüpün içerisinde bir bağlanma sıcaklığında çalışacağı unutulmamalıdır.
- Primer ve problemlerin hedef bölgeye olan spesifitesini kontrol etmek için BLAST araması gerçekleştirmek.
- Primer ve problemlerin dimer oluşturma eğilimlerini kontrol etmek için Primer Dizayn Programları kullanmak (BIO-RAD Laboratories 2006).

2.6. Mutlak Miktar Tayini: Standart Eğri Metodu

GZ-PZR'de elde edilen verilerin analiz edilmesi deneyin en önemli basamağıdır. Seçilecek olan kantifikasyon yöntemi deneyin amaçlarına bağlıdır.

- Mutlak miktar analizi, hedef bölgenin gerçek kopya sayısını (ya da miktarını) belirler. Bu yöntem çok dikkatli bir planlama ve doğruluk değeri yüksek bir standart eğri gerektirir.
- Karşılaştırmalı miktar analizleri de dikkatli planlama gerektirmekle birlikte, miktarı tam kopya sayısı yerine relatif olarak ifade eder. Çoğunlukla gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılan ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak adlandırılan bu yöntemde bir genin ekspresyon seviyesi kalibratör ya da başka bir test örneği ile karşılaştırma yapılarak kat değişimi şeklinde hesaplanır. Bu teknikte örneğin kesin kopya numarası değil kalibratör örnekle karşılaştırıldığında kaç kat değiştiği tespit edilir (Livak ve Schmittgen 2001).

Bu çalışmamızda hedeflenen, sığır eti ürünlerinde olması muhtemel at ve eşek eti miktarının belirlenmesi olduğundan, içeriği bilinen et karışımlarından elde edilen standart eğrinin referans olarak kullanıldığı mutlak miktar tayini yöntemi kullanılmıştır.

Mutlak miktar tayini, araştırılan hedefin miktarının (kopya sayısının ya da % miktarının) belirlenmesi gereken durumlarda tercih edilen gerçek zamanlı PZR analizidir. Mutlak kantifikasyon için konsantrasyonu bilinen hedefin birkaç basamak seri dilüsyonu gerçekleştirilir, gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılır ve elde edilen veriler, hedef konsantrasyonun Ct değerlerine karşı grafiği çizilerek standart eğri elde edilir. Daha sonra bilinmeyen örneğin Ct değeri bu standart ile karşılaştırılarak kopya sayısı ya da yüzde miktarı belirlenmiş olur.

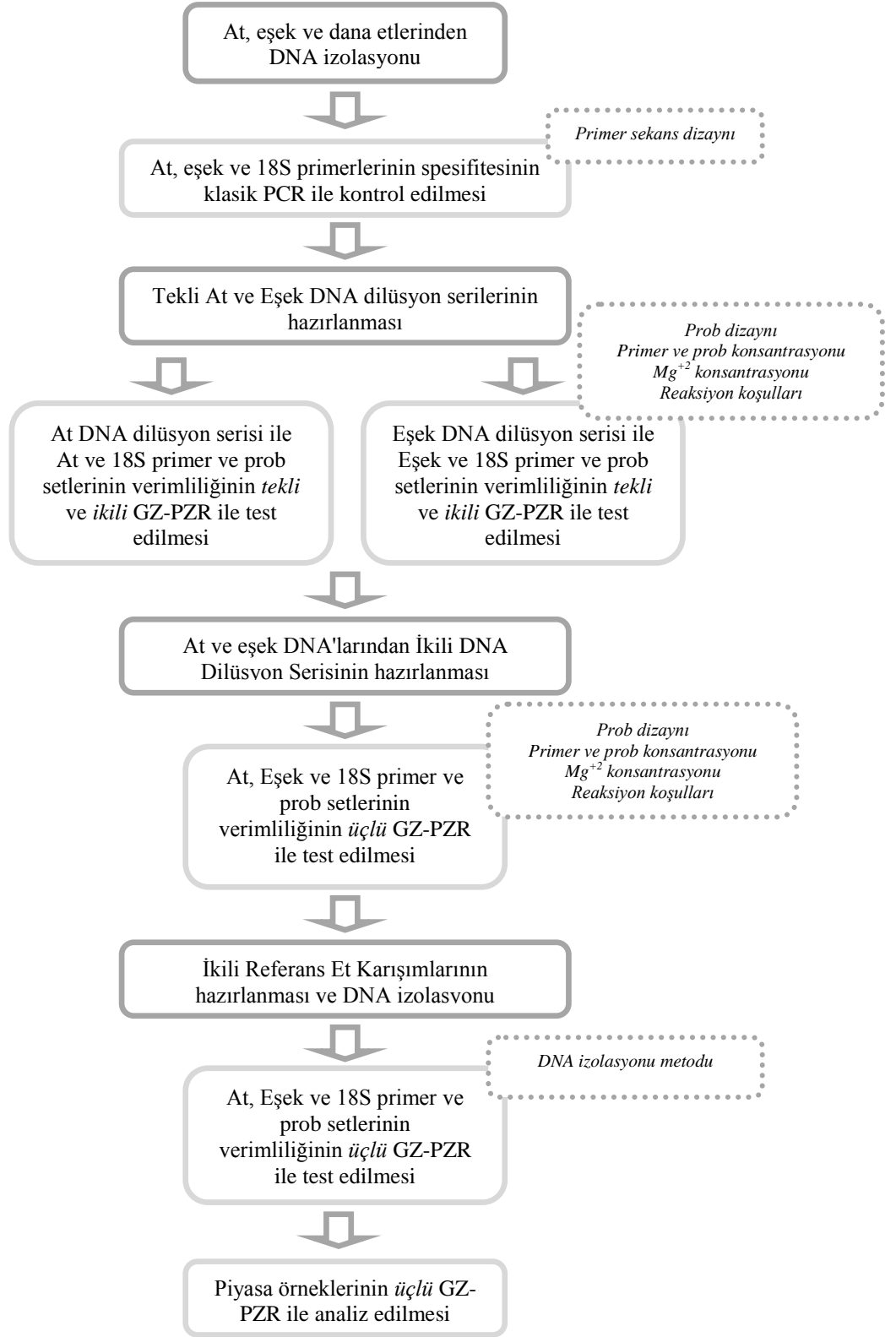
Mutlak miktar tayininde dikkat edilmesi gereken önemli basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Standart eğri oluşturmak için dilüsyon serisi hazırlanırken ve reaksiyon kurulurken pipetleme doğruluğu çok önemlidir. Çünkü gerçek zamanlı PZR duyarlılığı, hedef bölge ile birlikte çok ufak insan hatalarını da çoğaltır. Her bir reaksiyon tüpüne aynı miktarda DNA'nın girdiğinden emin olunması imkansız olsa da, analize bir kontrol bölgenin dahil edilmesi ile reaksiyonlar arasındaki farklılıklar en aza indirilebilir. Hedef bölge için elde edilen sonuçların kontrol bölgenin sonuçları ile normalize edilmesi ile birlikte genomik DNA ekstraksiyonundan, pipetlemeden ve reaksiyonlardaki amplifikasyon verimlerinden kaynaklanan varyasyonların kontrolü sağlanabilir.

2. Hedef genin ve kontrol genin amplifikasyon verimlerinin birbirlerine çok yakın olması önemlidir. Analiz öncesinde analiz edilecek olan genlere ve normalleştirici gene ait primer ve primer ve problemlerin amplifikasyon validasyonlarının yapılması gerekir.

3. Standart eğriyi oluşturacak noktaların miktar aralığının, test örneklerinde karşılaşılabilecek miktarların hepsini kaplıyor olması gerekir. Örneğin bilinmeyen test örnekleri 10 kopya içerebilecek ise standart eğrinin en düşük konsantrasyonu 100 olmamalıdır.

3. MATERYAL VE METOT



Şekil 3.1. Çalışmanın akış grafiği. Noktalı çerçeve içerisinde belirtilen konular, ilgili basamakta optimizasyon için göz önünde bulundurulmuş hususlardır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Etlerin ve Örneklerin Temini

Referans DNA ve validasyon et karışımlarının hazırlanmasında kullanılan sığır eti yerel bir besiciden, at eti Ankara İl Gıda Kontrol Müdürlüğünden, eşek eti ise Ankara Bala Çiftliğinden temin edilmiştir.

Çalışmanın sonunda analiz edilen, ana malzemesi sığır olduğu belirtilen kavurma, köfte, pide içi, kebab, salam, sucuk gibi ürünler özel bir laboratuvarında daha önce analizi gerçekleştirilen örnekler arasından seçildi. Alınan bu örnekler karıştırıcı yardımıyla homojen bir şekilde ayrı ayrı kıyılarak DNA'ları izole edildi. Bütün örnekler ve DNA'lar çalışma boyunca -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan bütün et ürünlerinin DNA'ları Qiagen Blood&Tissue kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak izole edilmiştir. Uygulanan yöntem kısaca şu şekilde özetlenebilir. Homojenize edilmiş örnekten 25 mg tartılarak içinde 5 mm çapında paslanmaz çelikten yapılmış bilye bulunan 2 ml'lik vidalı tüplere konulur. Bu tüpün içine 180 µL ATL tamponu eklenir ve tüpler 2x24 tissue lyser adaptörüne yerleştirildikten sonra 15 Hz hızında 20 sn süresince kırma işlemine tabii tutulur. Daha sonra tüplerin içindeki çelik bilyeler alınır ve aynı tüplere 20 µL proteinase K solüsyonu eklenir. Tüpler kısa bir süre vorteksledikten sonra thermomikserde karıştırıcı fonksiyonu açık olarak 56 °C'de 3 saat boyunca örnekler tamamen parçalanana kadar inkübe edilir. Tüpler 15 sn. vortexlenir, 200 µL AL tamponu eklenir ve tekrar vortexlenir. Etanol'den (%96-100) 200 µL eklenerek iyice karıştırılır ve karışımın süzüntüsü DNeasy mini spin kolona yüklenir. 8000 devir/dk hızında 1 dakika santrifüjlenen örnekler kolondan geçmiş olurlar. Kolon yeni bir 2 ml'lik tüpe alınarak, 500 µL AW1 tamponu eklenir ve 8000 devir/dk'de 1 dakika santrifüjlenir. Kolondan geçen süzüntü tüpü ile birlikte atılır ve kolon yeni bir 2 ml tüpe alınır. 500 µL AW2 tamponu eklenir ve 14.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj yapılır. Kolon 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alındıktan sonra 200 µL AE tamponu eklenerek, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir ve sonrasında 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüjlenir. Bu aşamadan sonra DNA izole edilmiş olur. (Anonymous 4)

DNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforezi ile 40 dakikada 120 Volt altında analiz edilmiştir.

3.3. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Genomik DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, CA, ABD) ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protokolde belirtilen oranlarda toplam 200 µl içinde hazırlanan Qubit tamponu/boya/örnek karışımının okumaları ve konsantrasyon hesaplamaları Qubit 2.0 Florometre cihazında (Invitrogen, CA, ABD) yapılmıştır.

3.4. Referans DNA Dilüsyon Serileri ve Validasyon Et Karışımlarının Hazırlanması

Öncelikle sığır, eşek, at etlerinden izole edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları ölçülmüş ve her biri 5 ng/μl konsantrasyonunda olacak şekilde nükleaz-ari su ile seyreltilmiştir.

Tekli DNA Dilüsyon Serilerinin hazırlanması için at ve eşek genomik DNA'sının (5 ng/μl) yarı-logaritmik basamaklara dilüsyonu nükleaz-ari su ile Çizelge 3.1'de verildiği şekilde yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Tekli (at, eşek ya da sığır) DNA Dilüsyon Serilerinin hazırlanışı

Tüp no	%At, %Eşek ya da %Sığır	Hazırlanışı	Toplam DNA* (ng/20 μl)
1	100	5 ng/μl at ya da eşek DNA'sı	10
2	32	32 μl tüp 1 + 68 μl su	3,2
3	10	10 μl tüp 1 + 90 μl su	1
4	3,2	10 μl tüp 2 + 90 μl su	0,32
5	1	10 μl tüp 3 + 90 μl su	0,1
6	0,32	10 μl tüp 4 + 90 μl su	0,032
7	0,1	10 μl tüp 5 + 90 μl su	0,01

Hedef DNA değerleri, yalnızca at ya da eşek DNA'sı (5 ng/μl) içeren 1 nolu tüp %100 kabul edilerek verilmiştir. Dilüsyonlar nükleaz-ari su kullanılarak yapılmıştır.

*Toplam DNA değeri, 20 μl hazırlanan reaksiyon karışımına eklenen 2 μl DNA ile tüpe giren toplam DNA miktarını verir.

İkili DNA Dilüsyon Serisi (AE-DDS) at ve eşek etinden izole edilen genomik DNA'ların (5 ng/μl) eşit oranda karıştırılması ve nükleaz-ari su ile yarı-logaritmik basamaklara seri dilüsyonlarının yapılması ile Çizelge 3.2'de verildiği şekilde elde edilmiştir.

Çizelge 3.2. İkili (at ve eşek) DNA Dilüsyon Serisinin (AE-DDS) hazırlanışı

Tüp no	%At	%Eşek	Hazırlanışı	Toplam DNA* (ng/20 μl)
1	50	50	100 μl eşek (5 ng/μl) + 100 μl at (5 ng/μl)	10
2	16	16	32 μl tüp 1 + 68 μl su	3,2
3	5	5	10 μl tüp 1 + 90 μl su	1
4	1,6	1,6	10 μl tüp 2 + 90 μl su	0,32
5	0,5	0,5	10 μl tüp 3 + 90 μl su	0,1
6	0,16	0,16	10 μl tüp 4 + 90 μl su	0,032
7	0,05	0,05	10 μl tüp 5 + 90 μl su	0,01

*Toplam DNA değeri, 20 μl hazırlanan reaksiyon karışımına eklenen 2 μl DNA ile tüpe giren toplam DNA miktarını verir.

Üçlü DNA Dilüsyon Serisi (SAE-DDS) at ve eşek etinden izole edilen genomik DNA'ların (5 ng/μl) eşit oranda karıştırılması ve sığır DNA'sı (5 ng/μl) ile yarı-logaritmik basamaklara seri dilüsyonlarının yapılması ile Çizelge 3.3'de verildiği şekilde elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. Üçlü DNA Dilüsyon Serisinin (SAE-DDS) hazırlanışı

Tüp no	%At	%Eşek	%Sığır	Hazırlanışı	Toplam DNA* (ng/2 µl)
1	50	50	0	100 µl eşek (5 ng/µl) + 100 µl at (5 ng/µl)	10
2	16	16	68	32 µl tüp 1 + 68 µl sığır (5 ng/µl)	10
3	5	5	90	10 µl tüp 1 + 90 µl sığır (5 ng/µl)	10
4	1,6	1,6	96,8	10 µl tüp 2 + 90 µl sığır (5 ng/µl)	10
5	0,5	0,5	99	10 µl tüp 3 + 90 µl sığır (5 ng/µl)	10
6	0,16	0,16	99,68	10 µl tüp 4 + 90 µl sığır (5 ng/µl)	10
7	0,05	0,05	99,9	10 µl tüp 5 + 90 µl sığır (5 ng/µl)	10

Dilüsyonlar 5 ng/µl konsantrasyonundaki sığır DNA'sı kullanılarak yapılmıştır.

*Toplam DNA değeri, 20 µl hazırlanan reaksiyon karışımına eklenen 2 µl DNA ile tüpe giren toplam DNA miktarını verir.

Üçlü Et Karışım Serisi (Validasyon Karışım Serisi) için at ve eşek etlerinden ağırlıkça eşit oranda karıştırılarak önce %50'lik karışım hazırlanmıştır. Daha sonra bu ilk karışım Çizelge 3.4'de verildiği oranlarda sığır eti ile karıştırılarak %0,05, %0,1, %0,5, %1, %2,5, %10, %25 ve %50 (w/w) oranlarında at ve eşek eti içeren sığır eti serisi elde edilmiştir. Karışımlar toplamda 100 gr olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışımlardan genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Nükleaz-ari su ile 5 ng/µl konsantrasyonuna seyreltmeleri yapılarak -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.4. Validasyon Karışım Serisinin hazırlanışı

Karışım no	%At	%Eşek	%Sığır	Hazırlanışı	Toplam DNA* (ng/20 µl)
1	50	50	0	100 gr eşek eti + 100 gr at eti	10
2	25	25	50	50 gr Karışım 1 + 50 gr sığır eti	10
3	10	10	80	20 gr Karışım 1 + 80 gr sığır eti	10
4	2,5	2,5	75	10 gr Karışım 2 + 90 gr sığır eti	10
5	1	1	98	10 gr Karışım 3 + 90 gr sığır eti	10
6	0,5	0,5	99	20 gr Karışım 4 + 80 gr sığır eti	10
7	0,1	0,1	99,8	10 gr Karışım 5 + 90 gr sığır eti	10
8	0,05	0,05	99,9	10 gr Karışım 6 + 90 gr sığır eti	10

*Toplam DNA değeri, 20 µl hazırlanan reaksiyon karışımına eklenen 2 µl DNA ile tüpe giren toplam DNA miktarını verir.

Aynı zamanda çapraz reaksiyon kontrolü (negatif kontrol) olarak kullanılmak üzere tavuk, koyun, keçi, domuz etlerinden DNA izolasyonları yapılmış ve 5 ng/µl konsantrasyonuna nükleaz-ari su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.5. Hedef Gen ve Primerlerin Belirlenmesi ve Sentezi

İşlenmiş et ürünlerinde kalitatif ve kantitatif analiz yapmak DNA degradesyonundan dolayı zorlaşmaktadır. Etlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde genellikle mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) ait genler kullanılmaktadır. Kalitatif analizlerde mtDNA kullanmanın yüksek mutasyon hızı, düşük tespit limiti ve çoğu hücrenin birden fazla mtDNA kopyasına sahip olması gibi avantajları vardır. Aynı şekilde kantitatif analizler için de mtDNA'nın düşük tespit limiti bilinen en önemli

avantajıdır (Ballin 2010). Bazı et karışımlarında hayvan eti türlerinin analizi için 12S rRNA (Rodriguez vd, 2005), sitokrom b (cytb) (Hird vd. 2004; Dooley vd. 2004; Chisholm vd. 2005), 16S rRNA (Sawyer vd. 2003), ND2 ve ND5 (Kesmen vd.2009; Kesmen vd. 2012) gibi mtDNA genlerinin GZ-PZR metodunda kullanıldığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Bu nedenlerle bu çalışmamızda mitokondriyal bir gen olan cyt-b geni tür tespitinde hedef bölge olarak seçilmiştir.

Literatürden edindiğimiz bilgiler ışığında çalışmamızda hedef gen olarak mitokondriyal sitokrom b (cytb) geni seçilmiştir. 18S rRNA geninin bütün ökaryotlarda korunmuş bölgesi ise internal kontrol (İçsel kontrol/dahili kontrol) olarak kullanılmıştır. Bu genleri çoğaltmak için uygun primerler literatür araştırması sonucu bulunmuş (Çizelge 3.5) ve NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veritabanı kullanılarak seçilen primerlerin bizim hedefimizdeki türlere ait olup olmadığı kontrol edilmiştir. Yapılan bu analiz sonucunda primerler, hedef organizmalar için maksimum benzerlik göstermiştir. Probların floresan boyalarla işaretlenmesi Rotor Gene 6000 el kitabındaki tavsiyelere göre belirlenmiştir.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler ve probların sekansları, amplicon büyüklükleri ve probları işaretlemekte kullanılan haberci ve söndürücü boya.

Primer	Hedef gen	Sekans (5'-3')	Amplicon büyüklüğü	Referans
DCytb-F DCytb-R DProbe	Sığır- Cytb	CCCGATTCTTCGCTTCCAT CTACGCTGAGGAAATTCCTGTTG	119 bç	(Tanabe vd. 2007)
ACytb-F ACytb-R AProbe	At- Cytb	CCA GAA TGG TAC TTC CTG TTT GC TAG AGA GGA TTA GGG CTA ATA CGC JOE- ACGCCATCCTACGCTCCATCCCA -BHQ1 (Sarı Kanal))	85 bç	(Köppel vd. 2009)
ECytb-F ECytb-R EProbe	Eşek- Cytb	GGTGTATTAGCCCTTATCCTTTCCATCT CATGTTAGTGTAGTAAGTCTGCTACTAAGAGTCAGAAC FAM-GCACTCATCCCTACACAC-BHQ1 (Yeşil Kanal)	80 bç	(Chisholm vd. 2005)
18S-F 18S-R 18Probe	18S rRNA	TGGTGCCAGCAGCCGC TCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCA Cy5-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BHQ2 (Kırmızı Kanal)	77 bç	(Pegels vd. 2011)

Primerler ve problar MacroGen (Seul, Kore) ve Sentegen (Ankara, Türkiye) firmalarına sentezletirilmiştir. Liyofilize olarak elimize ulaşan ürünler önce sentez raporunda belirtildiği miktarda (100 µM) TE tamponu (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) ile karıştırılmış ve 10'ar µl bölünerek, ışık almayacak şekilde -20°C'de muhafaza edilmişlerdir. Reaksiyon hazırlanacağı zaman, 10 µl primer ve prob üzerine 90 µl nükleaz-ari su eklenerek son konsantrasyon 10 µM değerine getirilmiştir.

3.6. Klasik PZR

Çizelge 3.4'de verilen primer çiftlerinin spesifitesinin kontrolü, her bir çiftin sığır, at, eşek ve negatif kontrollere ait genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı klasik PZR ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin %4'lük agaroz jelde yürütülerek analiz edilmesi ile türe özgü primerlerin, diğer türe ait DNA'larda herhangi bir ürün verip vermediği kontrol edilmiştir.

PZR reaksiyonları, HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Almanya) kiti kullanılarak ve kit protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Toplam 25 µl hacminde hazırlanan reaksiyon içeriği Çizelge 3.6'deki gibidir:

Çizelge 3.6. HotStarTaq Master Mix ile hazırlanan PZR reaksiyon içeriği

Reaksiyon karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
2XHotStarTaq Master Mix	12,5 µl	2,5 U HotStarTaq DNA Polimeraz 1XPZR Tampon 200 µM dNTP (herbirinden)
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Geri Primer (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Nükleaz ari su	10,5 µl	
DNA	1 µl	5-10 ng
Toplam	25 µl	

PZR reaksiyonu Tprofessional Thermocycler (Biometra, Almanya) cihazında Çizelge 3.7'teki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Çizelge.3.7. PZR amplifikasyon protokolü

Aşamalar	Koşullar	
Aktivasyon basamağı	15 dk	95°C
Amplifikasyon basamağı		
<i>Denaturasyon</i>	1 dk	94°C
<i>Bağlanma</i>	1 dk	65°C
<i>Uzama</i>	1 dk	72°C
Nihai uzama	10 dk	72°C

Bu basamak 35 kez tekrarlanır

PZR sonunda elde edilen ürünler, 1XTAE tamponu ile (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA) hazırlanan %4'lük agaroz jelde 120 Volt altında 120 dakika yürütülerek UV jel görüntüleme kutusunda (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmişlerdir.

3.7. Gerçek Zamanlı PZR (GZ-PZR)

GZ-PZR reaksiyonları için QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix Kit (Qiagen AG GmbH, Almanya) ve RealQ Plus 2xMaster Mix for Probe without ROX (Ampliqon, Danimarka) kullanılmış ve reaksiyonlar kit protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar, ikili ve üçlü olarak, DNA'dan 10 ng, primer çiftlerinin ve problemlerin her birinden 0,2-0,5 µM içerecek şekilde toplam 20 µl hacminde aşağıdaki Çizelge 3.8 ve 3.10'da belirtildiği gibi hazırlanmıştır (Anonymous 6)

Çizelge 3.8. QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix Kit ile hazırlanan tekli ve ikili GZ-PZR içeriği

Reaksiyon karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
2xQuanTitect MM	12,5 µl	1x 5,5 mM Mg ⁺²
İleri Primer1 (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
Geri Primer1 (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
Probe1 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
İleri Primer2 (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
Geri Primer2 (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
Probe2 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Nükleaz ari su	1,5 µl	
Kalıp DNA	2 µl	10 ng
Toplam	20 µl	

İkili GZ-PZR reaksiyonu Rotor Q (Qiagen, Almanya) cihazında Çizelge 3.9'daki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.9. Tekli ve ikili GZ-PZR amplifikasyon protokolü

Aşamalar	Koşullar	
Aktivasyon basamağı	15 dk	95°C
Amplifikasyon basamağı		
<i>Denaturasyon</i>	60 sn	94°C
<i>Bağlanma ve Uzama</i>	60 sn	55°C
		x45 Yeşil, Kırmızı ve Sarı kanallarında okuma yapıldı

Çizelge 3.10. Üçlü GZ-PZR içeriği

Reaksiyon karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
2xQuanTitect MM	12,5 µl	1x 5,5 mM Mg ⁺²
İleri Primer1 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Geri Primer1 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Probe1 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
İleri Primer2 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Geri Primer2 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Probe2 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
İleri Primer3 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Geri Primer3 (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Nükleaz ari su	1,9 µl	
DNA (5 ng/µl)	2 µl	10 ng
Toplam	20 µl	

Üçlü GZ-PZR reaksiyonu Rotor Q (Qiagen, Almanya) cihazında Çizelge 3.11'deki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.11. Üçlü GZ-PZR amplifikasyon protokolü

Aşamalar	Koşullar		
Aktivasyon basamağı	15 dk	95°C	
Amplifikasyon basamağı			
<i>Denaturasyon</i>	60 sn	94°C	x45 Yeşil, Kırmızı ve Sarı kanallarında okuma yapıldı
<i>Bağlanma ve Uzama</i>	90 sn	55°C	

Her reaksiyon 3 paralel olarak hazırlanmıştır. Her seferinde, çapraz bulaşma kontrolü olarak kalıp DNA'nın eklenmediği NTC (no template control) ve anti-tür DNA'larının eklendiği NC (negatif kontrol) reaksiyonları da hazırlanmıştır.

3.8. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin ve genomik DNA'ların doğrulaması agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Agaroz'un (SeaChem, Lonza, ME, ABD) 4 gr tartılarak 100 ml 1xTAE tamponunda (Tris/asetat/EDTA, 40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA) mikrodalgada ısıtılarak çözündürülmesi ile hazırlanan jelle, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 2 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Henüz katılaşmadan jel kasetine dökülen ve tarakları yerleştirilen jel katılaştıktan sonra 6x yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklenmiş, 1x TAE tamponu içerisinde 120 V akımda 60-120 dakika yürütülmüştür. Jelde boyutlarına göre farklı hızda ilerleyen DNA parçaları böylelikle birbirlerinden ayrılmış ve DNA'ya bağlanan etidyum bromürün UV ışınları altında ışımaya yapması sayesinde UV jel görüntüleme kutusunda (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmişlerdir.

DNA standardı olarak GeneRuler 1 kb Plus ve Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) markırları kullanılmıştır. DNA standardı, 6x jel yükleme boyası ve steril ultra saf su ile 1:10 seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiş ve kuyucuklara 5 µl olarak yüklenmiştir.

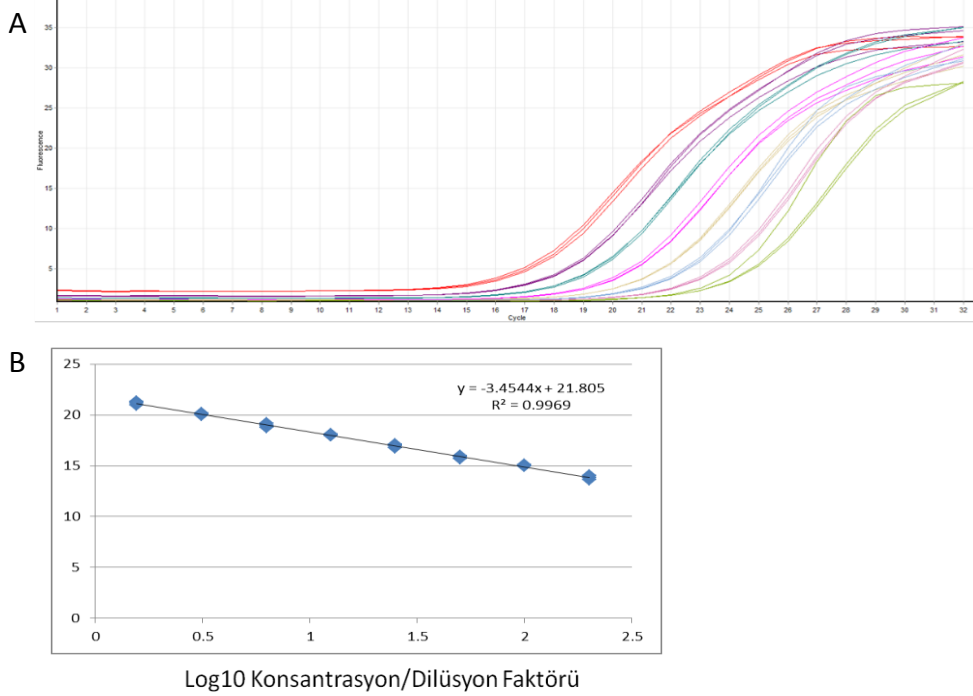
3.9. GZ-PZR Metot Optimizasyonu: Reaksiyon Veriminin Tespit Edilmesi

GZ-PZR'de kantifikasyon, reaksiyonun başlangıçtaki hedef bölgenin miktarı ve amplifikasyon sırasında elde edilen Ct değeri arasındaki ilişki üzerinden gerçekleştirildiğinden, doğruluğu yüksek ve tekrarlanabilir analizler gerçekleştirebilmek için metodun optimum şartlara sahip olduğunun ispatlanması gerekir. Optimize edilmiş bir metodun başlıca özellikleri aşağıdaki gibidir:

- Doğrusal bir standart eğri ($R^2 > 0,98$)
- Yüksek amplifikasyon verimliliği (%90-%110)
- Paralel reaksiyonlar arasında tutarlılık

GZ-PZR metodunun optimizasyonu için öncelikle DNA dilüsyon serisi ile bir dizi reaksiyon yürütüp standart eğri elde etmek gerekir. Optimizasyon reaksiyonlarında kullanılacak olan kalıp DNA, çoğaltılması hedeflenen sekansı bilinen miktarlarda içermelidir (örn. genomik DNA ise ng olarak, plazmid ise kopya sayısı olarak). Reaksiyon sonrasında hedef bölgenin başlangıç miktarının (ya da dilüsyon faktörünün)

logaritmasına karşı her dilüsyonun amplifikasyonundan elde edilen Ct değerlerine karşı çizdirilen grafik ile standart eğri elde edilir. Lineer regresyon doğrusunun denkleminde elde edilen Pearson korelasyon katsayısı (r) ve belirleme katsayısı (R^2) değerlerinden metodun değerlendirilmesi yapılır (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Metodun optimizasyonu için standart eğri oluşturulması. A) Dilüsyon serisinin amplifikasyon eğrisi; B) Ct değerine karşı kalıp DNA miktarlarının logaritmasına çizilen standart eğri (Regresyon doğrusunun denklemi grafiğin üzerinde gösterilmiştir)

Dilüsyon serisinin, ideal olarak Şekil 3.2.A'da gösterildiği gibi aralıkları aynı olan amplifikasyon eğrileri vermesi gerekir. Her döngüde tam bir ikiye katlanmanın gerçekleşmesi durumunda, floresan eğrilerinin aralığı $2^n = \text{Dilüsyon Faktörü}$ denkleminde elde edilebilir (n, eğrilerin C_t değerleri arasındaki fark). Örneği, kalıp DNA'nın 10'ar kat seyreltilerek hazırlandığı dilüsyon serisinde $2^n = 10$ olacağından C_t değerleri arasındaki fark $n = 3,32$ olacaktır. Eşit aralıklı amplifikasyon eğrilerinin elde edildiği reaksiyonun standart eğrisi Şekil 3.2.B'de gösterildiği şekilde doğrusal olacaktır. Lineer regresyon doğrusunun denklemi ve r değeri standart eğri grafiğinin üzerinde gösterilmiştir.

Standart eğrinin r ya da R^2 değeri deneysel verilerin regresyon doğrusuna ne kadar iyi oturduğunu, yani verilerin ne kadar doğrusal olduğunu ifade eder. Doğrusallık, deneydeki paralel reaksiyonların arasındaki farklılığı ve amplifikasyon verimliliğinin farklı konsantrasyonlarda aynı olup olmadığını gösterir. Replikaların C_t değerleri arasındaki farkın büyük olması r ve R^2 değerlerini düşürür. Doğruluğu yüksek ve tekrarlanabilir bir reaksiyonun r değeri $>0,990$ ya da R^2 değeri $>0,980$ olmalıdır.

Amplifikasyon verimi (E) standart eğrinin eğiminden, (3.1) bağıntısından hesaplanır.

$$E = 10^{-1/\text{eğim}} - 1 \quad (3.1)$$

Üstel fazda PZR ürününün her bir döngüde tam olarak ikiye katlandığını varsayarsak her bir döngüde amplikonun miktarı 2 katına çıkacak ve reaksiyon verimi 1 olacaktır. Yukarıdaki formül kullanılarak $1 = 10^{-1/\text{eğim}} - 1$ eşitliğinden ideal şartlarda standart eğrinin eğimi -3,32 olarak hesaplanır. İdeal eğim değerinin amplifikasyon eğrileri arasındaki ideal uzaklıkla aynı değerde olduğu görülmektedir.

Amplifikasyon verimi genellikle yüzde (%) olarak ifade edilir ve bu değer her döngüde çoğaltılan hedef bölge oranını verir. Verim değerini yüzde değerine çevirmek için (3.2) bağıntısı kullanılır.

$$\% \text{ Verim} = E \times \% 100 \quad (3.2)$$

İdeal bir reaksiyonda $\% \text{ Verim} = (2 - 1) \times \% 100 = \% 100$ olacaktır.

Şekil 2.6.'deki örnekten verim hesaplaması yapacak olursak:

$$E = 10^{-(1/-3,436)} - 1 = 0,954$$

$$\% \text{ Verim} = 0,954 \times \% 100 = \% 95,4$$

Her döngü sonunda amplikon sayısı 1,954 kat artmış ya da hedef bölgenin %95,4'ü çoğaltılmış anlamına gelmektedir.

Verimin %100'e yakın olması metodun güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu gösterir. Pratikte kabul edilebilir reaksiyon verim aralığı %90-110'dır. Düşük reaksiyon verimleri zayıf primer tasarımından ya da reaksiyon koşullarının (bağlanma sıcaklığı, primer konsantrasyonu vb.) optimum olmamasından kaynaklanabilir. Reaksiyon veriminin >%100 olması dilüsyon serisindeki pipetleme hatasını ya da spesifik olmayan amplikon oluşumunu (primer dimer oluşumu vb.) gösterir. Bununla birlikte inhibitörün varlığı da reaksiyon verimini yükseltir. Bu nedenle yüksek konsantrasyona sahip örnekler daha fazla inhibitör içereceğın Ct değerlerindeki kayma düşük konsantrasyonlu örneklerden daha fazla olacaktır. Sonuç olarak standart eğrinin eğiminin mutlak değeri düşer ve hesaplanan verim değeri yükselir. Bu nedenle metot optimizasyonu yapılırken inhibisyona sebep olmayacak optimum DNA konsantrasyonunun belirlenmesi de çok önemlidir.

3.10. Miktar Analizi: Kantifikasyon Eğrisinin Çizilmesi

GZ-PZR sonuçlarının güvenilir sonuçlar vermesi için kalibrasyon eğrisinin normalizasyonu yapılmış değerlerle çizilmesi önemlidir. Böylelikle DNA ekstraksiyonundan, amplifikasyon verimliliğindeki değişikliklerden ve pipetlemeden kaynaklanan farklılıklar kontrol altına alınmış olur. Deney dizaynında iç kontrolün bulunması (bu çalışmada 18S rRNA kontrol olarak kullanılmıştır), türe özgü primerlerin amplifikasyon farklılıklarının, hedef bölgenin farklı miktarlarda bulunmasından mı yoksa diğer faktörlerden mi (DNA deşğırmızıasyonu, inhibisyon, örneklerden elde edilen DNA'ların kalite ve miktarlarındaki farklılıklar gibi) kaynaklandığının anlaşılmasını sağlar. Özellikle işlenmiş et ürünlerinin et dışında bileşenlere sahip olduğu

(özellikle bitkisel kaynaklı) ve maruz kaldıkları farklı işlemlerin DNA kalite ve miktarını etkilediği ve bu durumun hedef bölgenin amplifikasyonu üzerinde doğrudan etki edeceği unutulmamalıdır. İç kontrolün kullanılması bu değişkenlerin kontrol altında tutulmasını sağlar. Bu nedenle, kantifikasyonun yapılabilmesi için normalize edilmiş Ct değerlerinin (ΔCt) hedef konsantrasyon değerlerinin (%) logaritmasına karşı çizdirilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Her bir hedef için ΔCt değerleri (3.3) bağıntısından elde edilmiştir.

$$Ct_{\text{hedef(at/eşek)}} - Ct_{\text{kontrol(18S)}} = \Delta Ct_{\text{norm.hedef}} \quad (3.3)$$

$Ct_{\text{hedef(at/eşek)}}$ ve $Ct_{\text{kontrol(18S)}}$ değerleri sırasıyla üçlü validasyon et karışımlarının türe spesifik ve 18S primerleri ve problemleri ile gerçekleştirilen üçlü reaksiyonlar sonucunda elde edilen Ct değerleridir.

At, eşek ve 18S primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyonların Ct değerleri Rotor Gene Q 2.0.3 (Qiagen, Almanya) yazılımı tarafından yapılan kantifikasyon analizi sonucu raporlanan verilerdir. Daha sonraki tüm işlemler (grafiğin çizdirilmesi ve istatistiksel analiz) Microsoft Office 2007 Excel yazılımında gerçekleştirilmiştir.

3.11. Kantifikasyon Eğrisinin Lineer Regresyon Analizi

At ve eşek etinin kantifikasyonu için 2 ayrı kantifikasyon eğrisi çizdirilmiş ve lineer regresyon yöntemi ile eğrilerin bilinmeyen örneklerdeki at ve eşek miktarının tespit edilmesinde kullanılabilirliğinin analizi yapılmıştır.

Rotor Gene Q yazılımında yapılan kantifikasyon analizinde çizdirilen standart eğrilerde, hedef Ct değerlerinin kontrol Ct değerleri ile normalizasyonu yapılmadığından, cihazın yazılımı yalnızca eşik değerlerinin otomatik olarak belirlenmesi ve Ct değerlerin edilmesinde kullanılmıştır. Daha sonra, (3.3) bağıntısına göre at ve eşek Ct değerlerinden ayrı ayrı 18S Ct değerinin çıkarılması ile ΔCt değerleri elde edilmiştir. Validasyon et karışımlarının % At ve Eşek konsantrasyonlarının logaritması alınarak ΔCt değerlerine karşı grafikleri Excel'de çizdirilmiştir. Grafiğin eğilim çizgisi formülünden standart eğrinin eğimi elde edilmiş ve bu değerden (3.1) ve (3.2) bağıntıları kullanılarak verim elde edilmiştir.

Daha sonra DOT işlevi kullanılarak, "en küçük kareler" yöntemine göre doğrunun istatistiği hesaplanmış ve ardından doğruyu tanımlayan dizi elde edilmiştir. Bir mikrodizin işlevi olan DOT ile elde edilen değerler ve tanımları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Microsoft Excel DOT işlevi ile elde edilen değerler ve tanımları

DOT (bilinen_y'ler,[bilinen_x'ler];DOĞRU;DOĞRU) eğilim çizgisi denklemi $y = mx + b$	
1	m eğilim çizgisi eğimi
2	b eğilim çizgisi y eksenini kesim noktası
3	$ss(m)$ eğim için standart sapma değeri
4	$ss(b)$ b sabiti için ss değeri
5	R^2 benzerlik katsayısı
6	$ss(y)$ y değerleri için ss değeri
7	F gözlenen değer
8	sd serbestlik derecesi
9	$ss(reg)$ regresyon karelerinin toplamı
10	$ss(resid)$ kareleri toplamının artışı

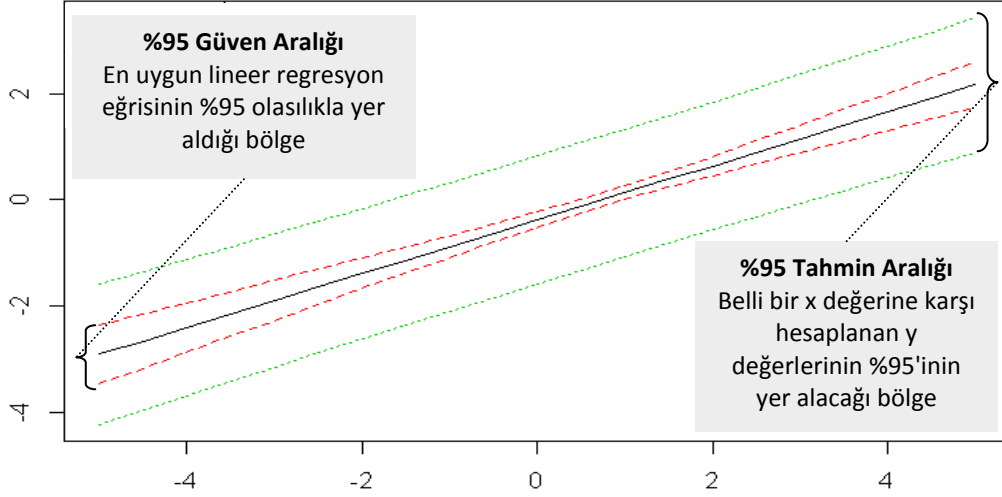
3.12. Standart Eğrinin Güven Aralığı ve Tahmin Aralığı Limitleri

Çizelge 3.12'de verilen dizide yer alan değerler kullanılarak %95 Güven Aralığı (confidence interval, CI) ve %95 Tahmin Aralığının (prediction interval, PI) alt ve üst sınırları hesaplanmış ve standart eğri üzerinde gösterilmiştir. CI ve PI alt ve üst değerlerini bulmak için kullanılan formüller ve veriler, tanımları ile birlikte Çizelge 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.13. Güven Aralığı (CI) ve Tahmin Aralığının (PI) alt ve üst değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formüller, Excel işlevleri ve tanımları

Veri	Tanım, formül ve işlevi
n	Veri sayısı BAĞ_DEĞ_SAY(değer1;[değer2];...)
Xm	X değerlerinin ortalaması ORTALAMA(sayı1;[sayı2];...)
SS(xx)	X değerlerinin sapmalarının karelerinin toplamı SAPKARE(sayı1, [sayı2], ...)
t ₉₅	t dağılımının 2 kuyruklu tersi TTERS(olasılık,serb_derecesi)
SH	Standart hata $SH = \sqrt{\frac{ss(resid)}{sd}}$
Güven Aralığı alt ve üst sınır	$X = Y \mp t_{95} \times SH \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X - Xm)^2}{SS(xx)}}$
Tahmin Aralığı alt ve üst sınır	$X = Y \mp t_{95} \times SH \times \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X - Xm)^2}{SS(xx)}}$

Tüm değerler hesaplandıktan ve grafiğe döküldükten sonra Şekil 3.3'e benzer bir grafik elde edilmiştir. At ve eşek için ayrı çizdirilen kantifikasyon grafiklerinin miktar tayininde kullanılabilirliğine, elde edilen grafiklerin ve istatistiksel verilerin değerlendirilmesi ile karar verilmiştir.



Şekil 3.3. Standart eğrinin güven (CI) ve tahmin aralıklarının (PI) grafiksel olarak ifadesi (Leininger 2013).

3.13. Tespit (LOD) ve Ölçüm (LOQ) Limiti

Metodun en düşük tespit limiti (LOD), en düşük ölçüm limiti (LOQ), linearite, verimlilik ve tekrarlanabilirlik değerleri bir metodun uygunluğunun ve kapasitesinin değerlendirilmesi için belirlenmesi gereken önemli kriterlerdir.

Bir analiznin tespit limiti (LOD) pozitif örneklerin % 95'inin tespit edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Başka bir deyişle, LOD konsantrasyonlarında hedef içeren bir örnek grubu içinde, başarısız reaksiyon oranı % 5'ten fazla olmamalıdır (Bustin vd. 2009). LOQ ise örneğin içindeki hedef bölgenin miktarının hesaplanabildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır.

LOQ ve LOD değerleri, at ve eşek etlerinin bilinen oranlarda sığır eti ile karıştırılması ile hazırlanan üçlü validasyon et karışımlarının DNA'ları ile gerçekleştirilen GZ-PZR sonucu ile belirlenmiştir. Referans et karışımlarından elde edilen DNA'ların at, eşek ve 18S primer ve problemleri ile analizleri gerçekleştirilmiştir. 3 paralelli gerçekleştirilen analizler sonucunda LOD ve LOQ, standart eğrinin eğimi (m) ve y değerlerinin standart sapması (ss(y)) değerlerinden (3.4) ve (3.5) bağıntıları kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times (ss(y)/m) \quad (3.4)$$

$$LOQ = 10 \times (ss(y)/m) \quad (3.5)$$

ss(y) ve m değerleri, ΔCt değerlerinin $\log_{10}(\% \text{ konsantrasyon})$ değerlerine karşı çizdirilen standart eğrinin Excel DOT işlevinden elde edilen (Çizelge 3.12) istatistiki değerleridir.

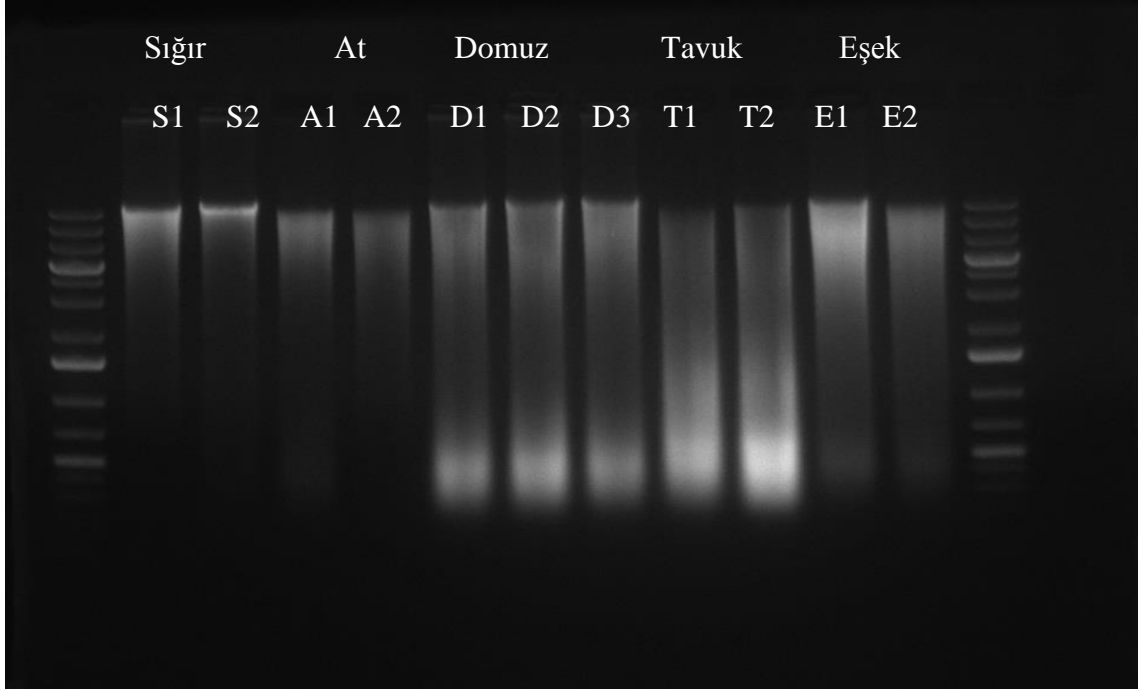
3.14. Kesinlik ve Doğruluk Değerleri

Metodun kesinlik değeri, validasyon et karışımı DNA'ları ile gerçekleştirilen reaksiyonların relatif standart sapmaları hesaplanarak belirlenmiştir. Referans et örneklerinden izole edilen DNA'lar ile 3 tekerrürlü analiz gerçekleştirilmiştir. Her bir tür için varyasyon katsayılarının (relatif standart sapmaların) ortalaması alınmış ve bu değerler her bir tür için ayrı kesinlik değerleri olmuştur. Bu analizler sonucunda elde edilen ortalama değerler ile gerçek değerler arasındaki sapmadan ise metodun doğruluk değeri elde edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Et Türlerinden DNA İzolasyonu

Sığır, at, eşek, domuz ve tavuk etlerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Konsantrasyonları ölçüldükten sonra her bir kuyucuğa 1 µl DNA yüklenmiş, %1 agaroz jelde yürütülerek kaliteleri kontrol edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Et türlerinden izole edilen genomik DNA'ların %1 agaroz jel görüntüsü.

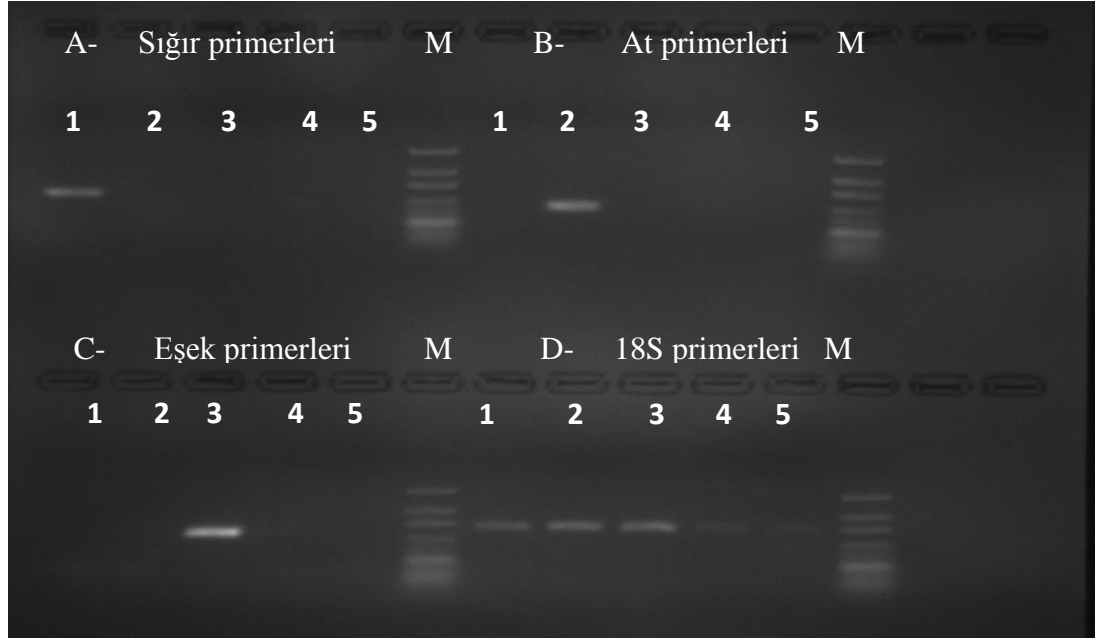
(S1: sığır DNA'sı, 240 ng/µl; S2: sığır DNA'sı, 107 ng/µl; A1: at DNA'sı, 220 ng/µl; A2: at DNA'sı, 100 ng/µl; D1: domuz DNA'sı, 1250 ng/µl; D2: domuz DNA'sı, 1130 ng/µl; D3: domuz DNA'sı, 500 ng/µl; T1: tavuk DNA'sı, 1150 ng/µl; T2: tavuk DNA'sı, 1275 ng/µl; E1: eşek DNA'sı, 635 ng/µl; E2: eşek DNA'sı, 385 ng/µl)

Genomik DNA'ların jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüden, sığır, eşek ve at DNA'larının bozulmadıkları ve ölçülen konsantrasyon değerlerinin birbirleri ile karşılaştırıldıklarında tutarlı olduğu belirlenmiştir.

4.2. Primerlerin Spesifikliğin Klasik PZR Yöntemi ile Kontrolü

Literatürden aldığımız sığır, at ve eşek türlerine özgü primerlerin spesifikliği klasik PZR yöntemi ile kontrol edilmiştir. PZR amplifikasyonunda kalıp olarak izole ettiğimiz sığır, at ve eşek DNA'ları kullanılmıştır. Ayrıca yine laboratuvarında izole ettiğimiz koyun, keçi, tavuk, domuz, mısır ve soya DNA'larından oluşan bir karışım hazırlanarak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PZR sonucunda kullanılan primerlerin istenildiği gibi sadece özgü oldukları türde pozitif sonuç verdiği diğer DNA'larla çapraz reaksiyona girmediği görülmüştür (Şekil 4.2). Bunun dışında PZR reaksiyonunda bütün DNA'larda pozitif sonuç vererek reaksiyonun doğruluğunu kontrol etmemizi sağlayan

18SrRNA primerleri kullanılarak da PZR yapılmış ve istenen sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Türe özgü primerlerin spesifikliğinin kontrolü (%4'lük agaroz görüntüsü). 1.Sığır, 2.At, 3.Eşek, 4.Negatif kontrol, 5.No template kontrol, M.DNA standardı. A) Sığır primerlerinin çapraz kontrolü. B) At primerlerinin çapraz kontrolü, C) Eşek primerlerinin çapraz kontrolü., D) 18SrRNA primerlerinin çapraz kontrolü.

4.3. Primerlerin QPCR Reaksiyon Verimliliğinin Belirlenmesi

Klasik PCR ile karşılaştırıldığında GZ-PZR'nin en başta gelen avantajı kantitatif ölçüm yapılabilmesine olanak vermesidir. Kantitatif analizlerde internal bir kontrolün kullanılması özellikle analiz edilecek olan örneklerin kompleks yapıya sahip işlenmiş ürünler olduğu durumlarda çok önemlidir. Bu çalışmada mitokondriye ait sitokrom b geninde bulunan ~80 çn bir metot geliştirilmiştir. İçsel kontrol olarak ise tüm ökaryotik hücrelerde çoğalan nükleer 18S rRNA genine ait 119 bç uzunluğundaki bir bölgenin amplifikasyonu hedeflenmiştir.

Çalışmada kullanılan primerlerin klasik PZR ile özgüllüğü kontrol edildikten sonra her birinin GZ-PZR amplifikasyon verimlilikleri, tekli, ikili ve üçlü DNA Dilüsyon Serileri ile tekli, ikili ve üçlü kurulan reaksiyonlarla belirlenmiştir.

PZR reaksiyon verimliliği, PZR reaksiyonu sırasında amplikonun çoğalma hızının yüzde olarak ifade edilmiş şeklidir. PZR reaksiyonunun verimliliğinin %100 (ya da 1) olması, amplikonun miktarının her bir döngüde miktar olarak 2 katı kadar çoğaldığı anlamına gelir.

GZ-PZR reaksiyonlarında reaksiyon verimliliğini belirlemek için standart eğriden faydalanılmıştır. Standart eğri, Ct değerlerinin DNA konsantrasyonunun logaritma değerlerine karşı çizilerek elde edilmiş, verimliliğin hesaplanması için ise (3.1) ve (3.2) bağıntıları kullanılmıştır. Her bir primer ve prob setinin reaksiyon

verimliliğinin belirlenebilmesi için ata ait primer ve prob setinin At DNA Dilüsyon Serisi (A-DDS) ile, eşek primer ve prob serisinin Eşek DNA Dilüsyon Serisi (E-DDS) ile, 18S primer ve prob setinin hem at hem eşek hem de Sığır DNA Dilüsyon Serileri (S-DDS) ile tekli, ikili ve üçlü reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda çizdirilen standart eğrilerden reaksiyon verimlilik değerleri elde edilmiştir. Reaksiyon veriminin %90-%110 (0.9-1.1) arasında, R^2 değerinin ≥ 0.98 olduğu şartlarda analizlere devam edilmiştir. Ayrıca, DNA inhibisyonu kontrolü yapılmış, standart eğrinin lineer aralığının ortalarına denk gelen konsantrasyon değerleri ile deneylere devam edilmiştir.

DNA Dilüsyon Serilerinin 18S, at ve eşek primer ve prob setleri ile tekli, ikili ve üçlü reaksiyonlarından elde edilen reaksiyon verimlilik bulguları aşağıda verilmiştir.

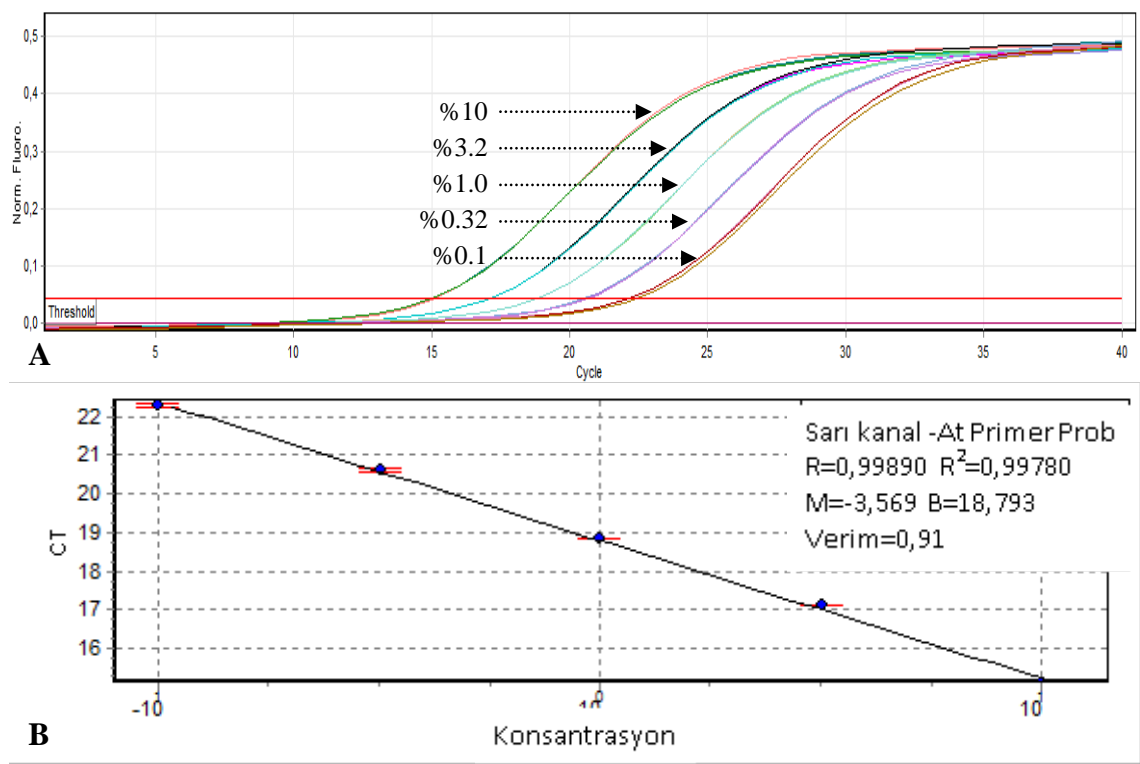
4.3.1. Tekli GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimliliği

Her bir primer ve prob setinin tekli reaksiyon verimlilikleri, at primer-prob setinin A-DDS ile, eşek primer-prob setinin E-DDS ile, 18S primer-prob setinin A-DDS, E-DDS ve S-DDS ile tekli reaksiyonları sonucunda belirlenmiştir. Eşek probu haberci olarak 5'-FAM, söndürücü olarak 3'-BHQ1 boya ile etiketlenmiş olup floresan ışması Yeşil Kanalda, at probu haberci 5'-JOE ve söndürücü 3'-BHQ1 boya ile etiketlenmiş olup ışması Sarı Kanalda, 18S probu ise haberci 5'-Cy5 ve söndürücü 3'-BHQ2 boya ile etiketlenmiş olup ışması Kırmızı Kanalda kaydedilmiştir.

4.3.1.1. At primer ve prob setinin tekli reaksiyon verimliliği

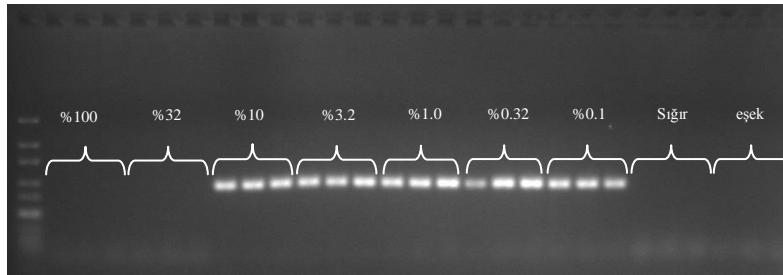
A-DDS'nin (%32, %10, %3,2, %1, %0,32 ve %0,1) At primer ve prob (5'-JOE ve 3'-BHQ1) seti ile tekli GZ-PZR reaksiyonları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da verildiği şekilde 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak sığır, domuz, tavuk ve eşek DNA'ları kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu 5 noktadan bir standart eğri elde edilmiştir. Yazılım tarafından verimlilik, eğim ve R^2 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.3).

Cihazın yazılımı tarafından eşik değeri otomatik olarak belirlenmiş ve her bir reaksiyonun Ct değeri tespit edilmiştir. Ct değerlerine karşı konsantrasyonun logaritması grafiği çizilerek standart eğri elde edilmiştir (Şekil 4.3.B). At primer ve prob setinin A-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği (0,91 ya da %91) ve R^2 (0,99) değerleri olması gereken aralıklarda elde edilmiştir.



Şekil 4.3. At primer ve prob setinin At DNA Dilüsyon Serisi ile gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu, (konsantrasyona karşı Ct). (A) amplifikasyon grafiği (Sarı Kanal); (B) Standart eğri (E: reaksiyon verimliliği, M: eğim, R^2 : benzerlik katsayısı)

Reaksiyon ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi ile primerlerin özgüllüğü kontrol edilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi yalnızca spesifik olarak hedeflenen fragmentin amplifikasyonu gerçekleşmiş ve böylelikle, negatif kontrollerde ürün oluşumunun yok denecek kadar az olması ile birlikte at primer ve prob setinin at etine spesifik olduğu gösterilmiştir.



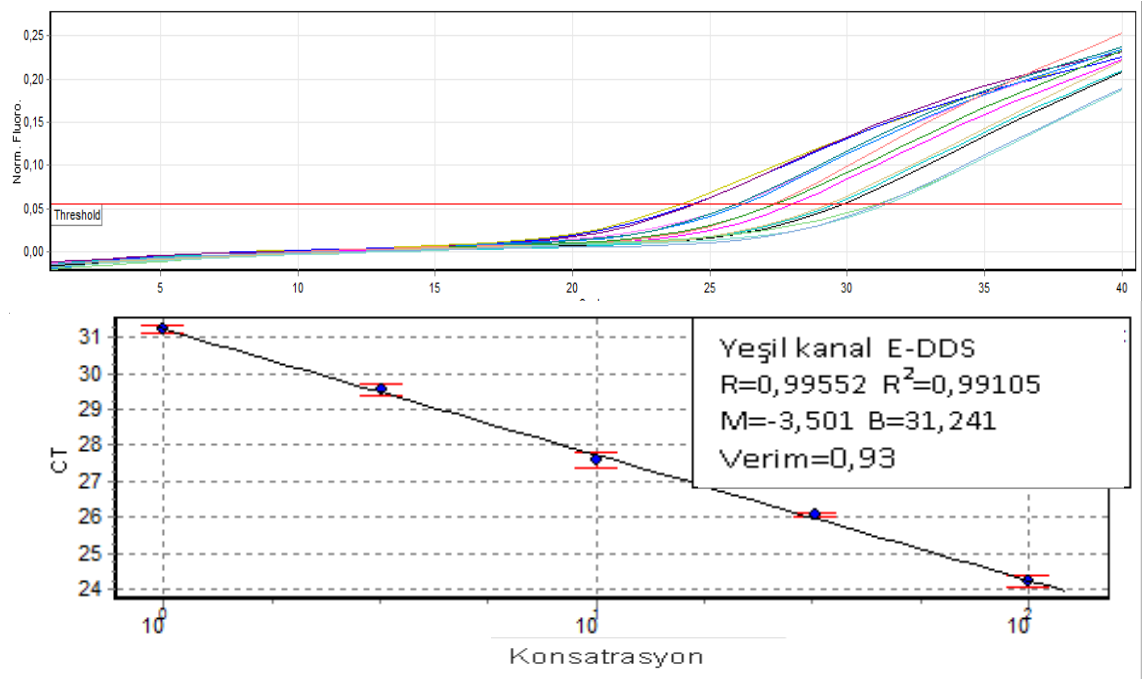
Şekil 4.4. At primer ve prob setinin A-DDS (%100, %32, %10, %3.2, %1.0, %0.32, %0.1) ile tekli GZ-PZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jel görüntüsü. Sığır, eşek genomik DNA'ları negatif kontrol

A-DDS'nin ilk iki konsantrasyonla (%100 ve %32) gerçekleştirilen reaksiyonlarında floresan ışığa gerçekleşmemiştir (Şekil 4.3.A). Agaroz jel görüntüsü de (Şekil 4.4) bu reaksiyon tüplerinde ürün oluşmadığını göstermiştir. Reaksiyon tüpüne

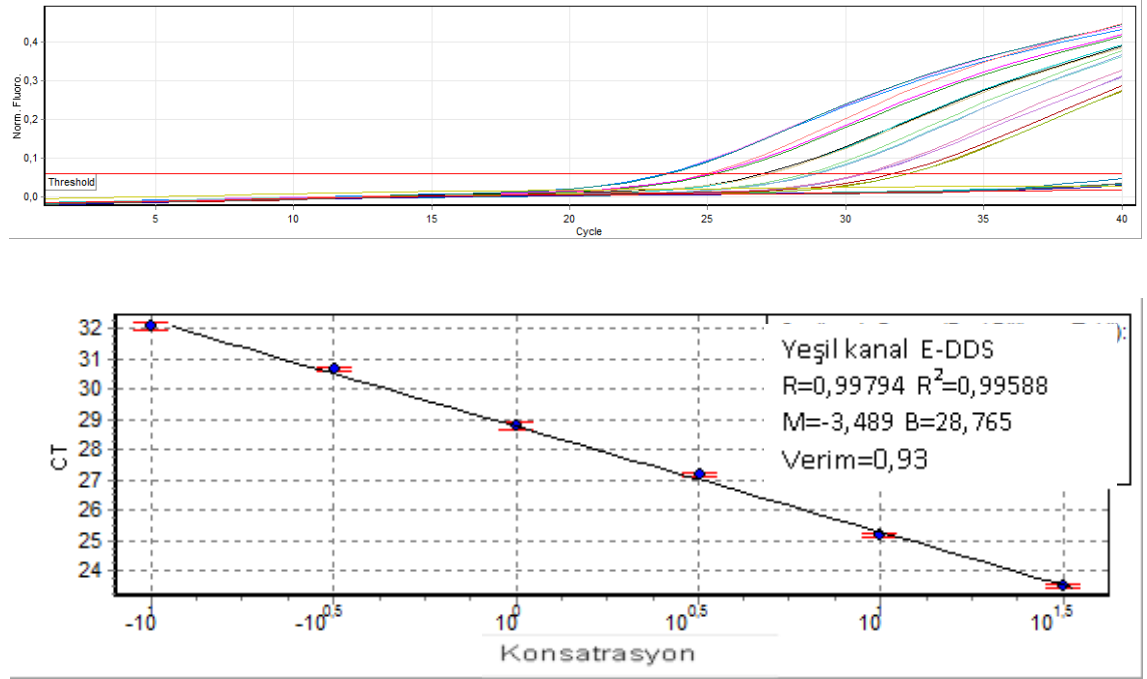
giren DNA miktarı %100 konsantrasyonu için 100 ng, %32 konsantrasyonu için 32 ng DNA'ya tekabül etmektedir. Reaksiyon 10 ng genomik DNA'ya tekabül eden %10 konsantrasyonunda çalışmıştır. Böylelikle 20 µl reaksiyon için 10 ng üzeri DNA'nın reaksiyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Daha sonraki deneylerde her bir reaksiyon maksimum 10 ng minimum 0.1 ng DNA ile gerçekleştirilmiştir.

4.3.1.2. Eşek primerinin bağlanma sıcaklığının optimize edilmesi

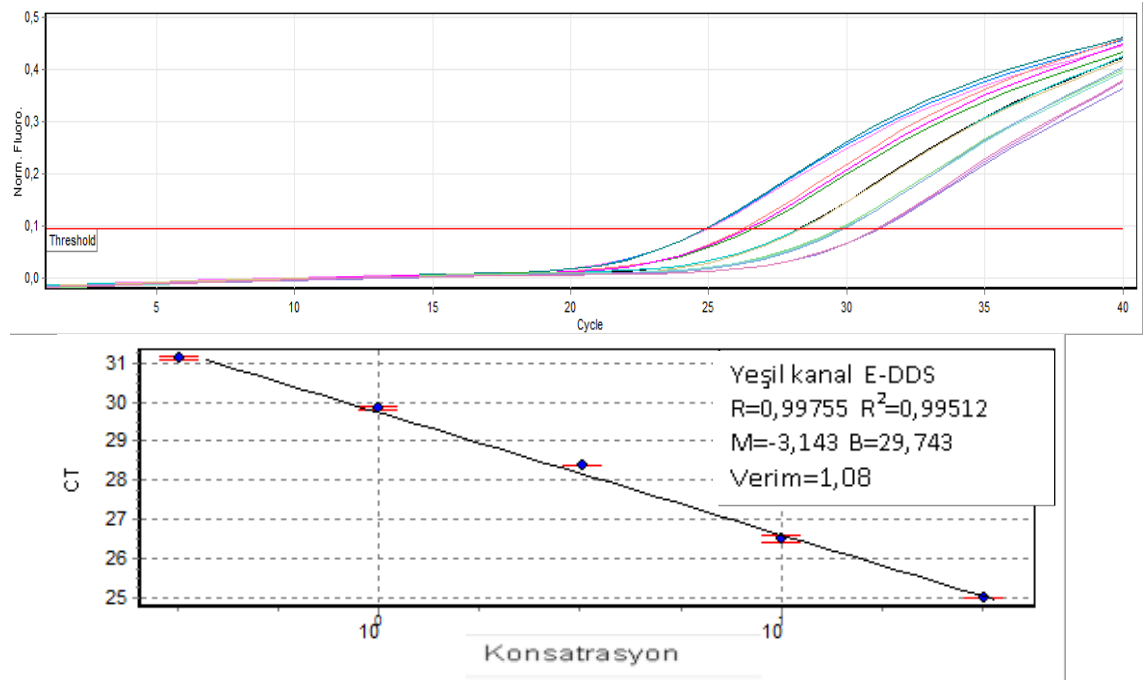
E-DDS'nin eşek primer ve prob seti ile tekli GZ-PZR reaksiyonları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da verildiği şekilde 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda 3 farklı bağlanma/uzama sıcaklığı uygulanarak sıcaklığın reaksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Her bir sıcaklık için bir standart eğri elde edilmiştir. Yazılım tarafından verimlilik, eğim ve R^2 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.5. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 60°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu. (A) E-DDS ile eşek primerlerinin amplifikasyon grafiği, Yeşil Kanal; (B) Standart eğri (E: reaksiyon verimliliği, M: eğim, R^2 : korelasyon katsayısı)



Şekil 4.6. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 55°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu. (A) E-DDS ile eşek primerlerinin amplifikasyon grafiği, Yeşil Kanal; (B) Standart eğri (E: reaksiyon verimliliği, M: eğim, R^2 : korelasyon katsayısı)



Şekil 4.7. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile 45°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen tekli GZ-PZR reaksiyon verimliliği analizi sonucu. (A) E-DDS ile eşek primerlerinin amplifikasyon grafiği, Yeşil Kanal; (B) Standart eğri (E: reaksiyon verimliliği, M: eğim, R^2 : korelasyon katsayısı)

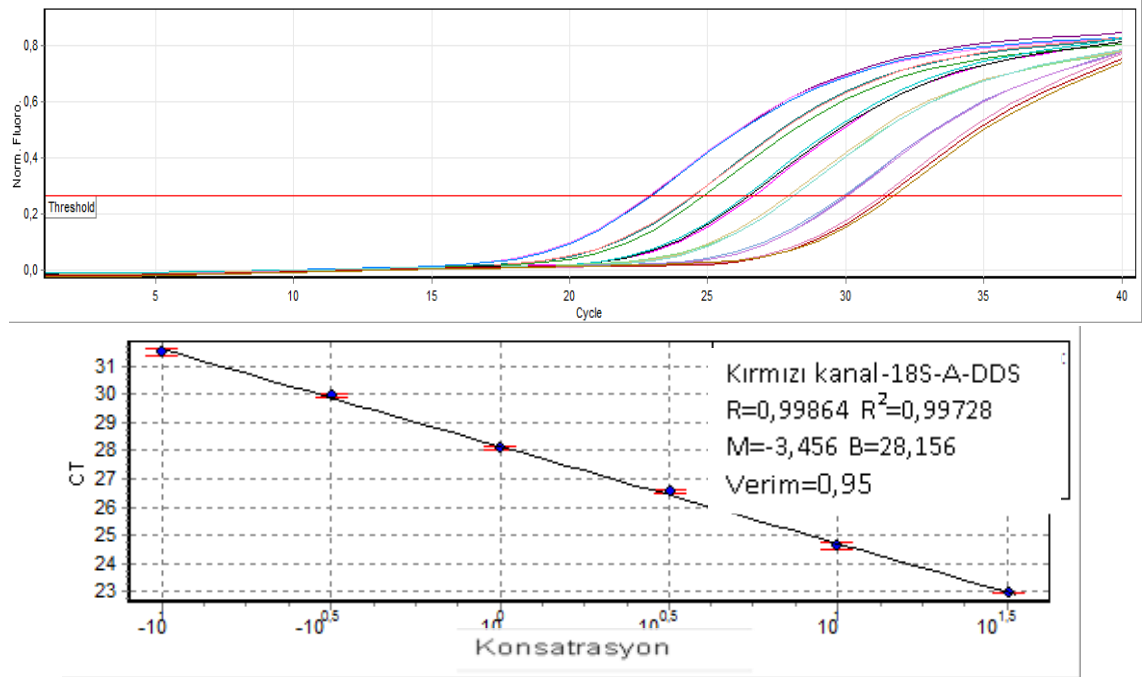
Çizelge 4.1'de eşek primer ve setinin 3 farklı bağlanma sıcaklığındaki reaksiyon verimliliği ve R^2 değerleri karşılaştırılmıştır. Bağlanma sıcaklığının verimlilik değerlerinde bariz bir fark yaratmadığından analizlere 55 °C bağlanma sıcaklığı ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1. Eşek primer ve prob setinin E-DDS ile tekli reaksiyonlarının farklı sıcaklıklardaki verimlilik değerleri

Bağlanma/Uzama sıcaklığı	Reaksiyon verimliliği	R^2
60 °C	%93	0,99
55 °C	%93	0,99
45 °C	%108	0,99

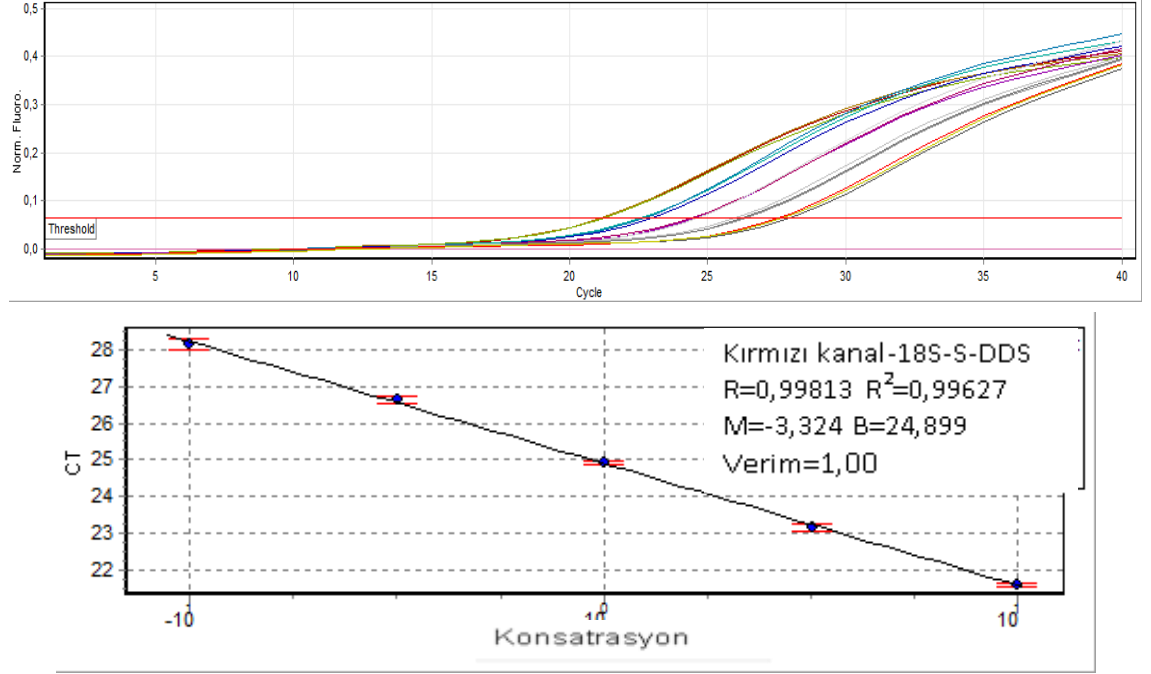
4.3.1.3. 18S primer ve prob setinin tekli reaksiyon verimliliği

İçsel kontrol olarak kullanılan 18S primer ve prob setinin, at, eşek ve sığır DDS'lerinin her biri ile tekli GZ-PZR reaksiyonları gerçekleştirilerek reaksiyon verimlilikleri ayrı ayrı hesaplanmıştır (Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10). Her bir reaksiyon sonucunda 5 noktadan standart eğri elde edilmiştir. Yazılım tarafından verimlilik, eğim ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

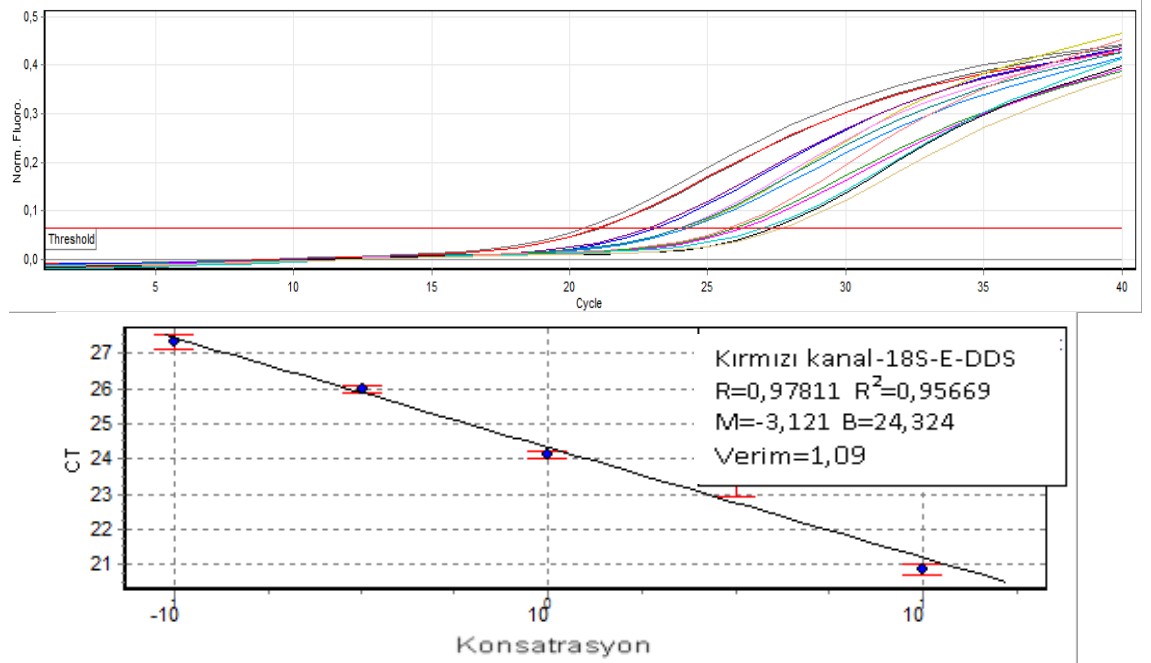


Şekil 4.8. 18S primer ve prob setinin A-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal).

18S primerlerinin A-DDS ile tekli GZ-PZR reaksiyonu sonucunda, reaksiyon verimliliği (0,95 ya da %95), R^2 değerleri (0,99) olması gereken aralıklarda elde edilmiştir.



Şekil 4.9. 18S primer ve prob setinin S-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal)



Şekil 4.10. 18S primer ve prob setinin E-DDS ile tekli reaksiyon verimliliği analizi sonucu (Kırmızı Kanal)

Her üç türün DNA'sı (at, eşek ve sığır) ile gerçekleştirilen tekli GZ-PZR sonrası 18S primer ve prob seti reaksiyon verim yeterlilik şartlarını Çizelge 4.2'de görüleceği üzere sağlamış bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. 18S primer ve prob setinin At, Sığır ve Eşek Dilüsyon Serileri ile tekli reaksiyonlarının verimlilik değerleri

18S primer/prob	Reaksiyon verimliliği	R ²
At Dilüsyon Serisi	% 95	0,99
Sığır Dilüsyon Serisi	% 100	0,99
Eşek Dilüsyon Serisi	% 109	0,96

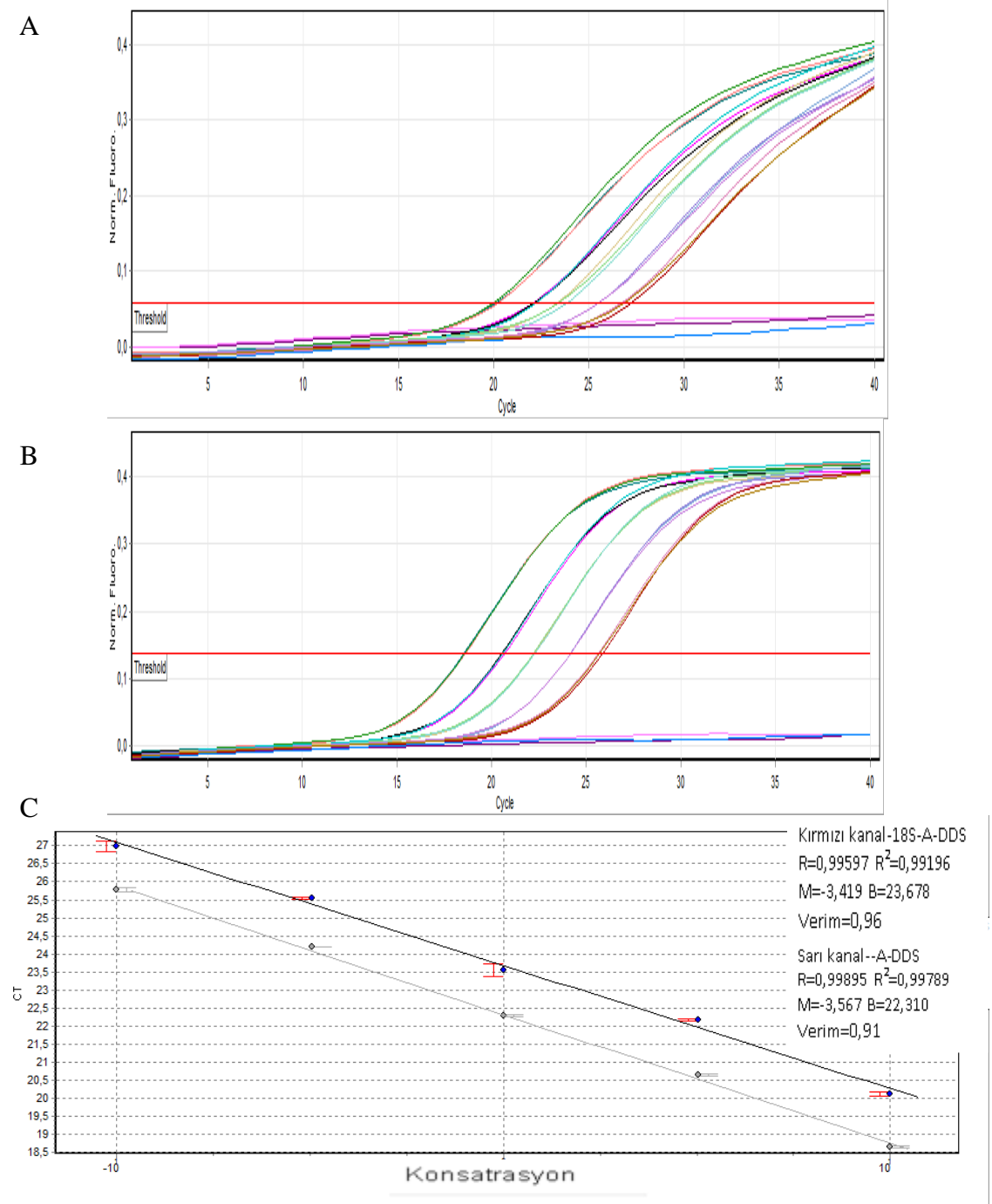
Her üç türde de verimlilik değerlerinin %90-110 aralığında, R² değerinin 0,99 olması, 18S primer ve prob setinin bu metot için uygun bir kontrol olduğunu göstermiştir.

4.3.2. İkili GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimliliği

Herbir primer ve prob setinin ikili reaksiyon verimlilikleri, at ve 18S primer-prob setlerinin A-DDS ile, eşek ve 18S primer-prob setlerinin E-DDS ile ikili reaksiyonları sonucunda belirlenmiştir.

4.3.2.1. At primer ve prob setinin ikili reaksiyon verimliliği

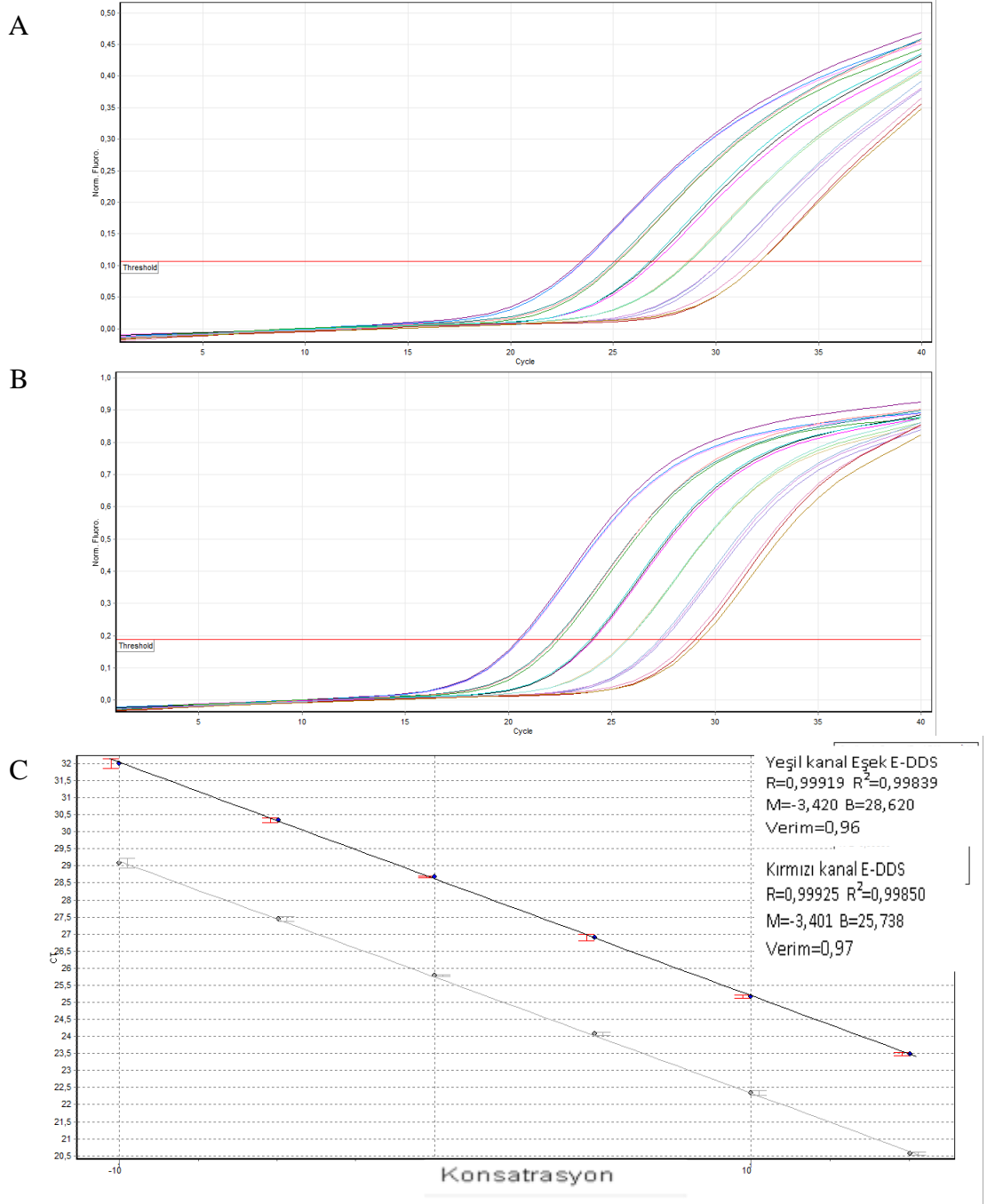
At ve 18S primerlerinin A-DDS ile ikili GZ-PZR reaksiyonu sonucunda, reaksiyon verimlilikleri sırası ile %96 ve %91, R² değerleri ise 0,99 olarak gereken aralıklarda elde edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. At ve 18S primer ve prob setlerinin A-DDS ile ikili reaksiyon verimliliği analizi sonucu (A) At primerleri amplifikasyon grafiği (Sarı Kanal) (B) 18S primerleri amplifikasyon grafiği (Kırmızı Kanal) (C) At ve 18S standart eğrileri

4.3.2.2. Eşek primer ve prob setinin ikili reaksiyon verimliliği

Eşek ve 18S primerlerinin E-DDS ile ikili GZ-PZR reaksiyonu sonucunda çizilen 6 noktalı standart eğriden, reaksiyon verimlilikleri sırası ile %96 ve %97, R^2 değerleri ise 0,99 olarak gereken aralıklarda elde edilmiştir (Şekil 4.12).

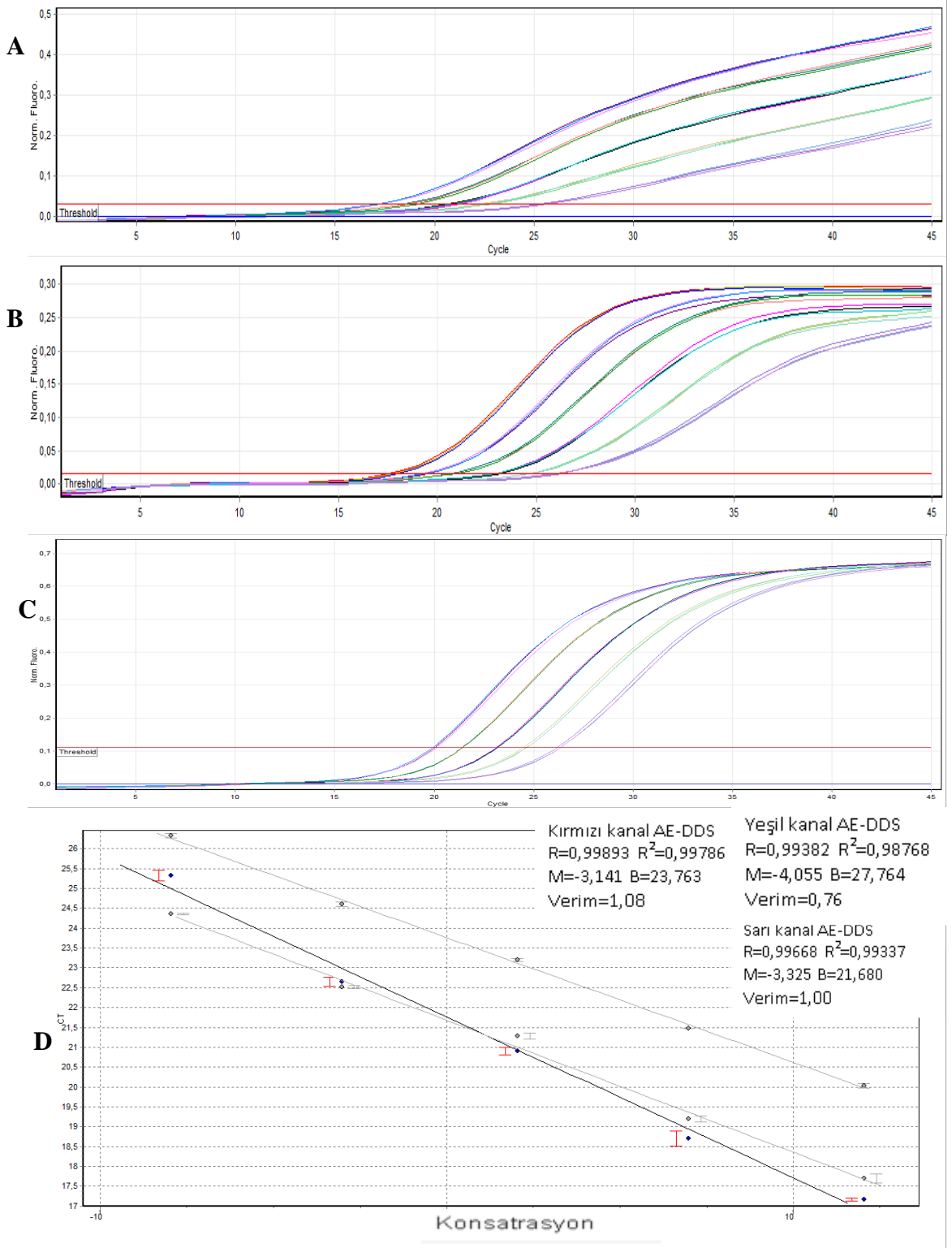


Şekil 4.12. Eşek ve 18S primer ve prob setlerinin E-DDS ile ikili reaksiyon verimliliği analizi sonucu (A) Eşek primerleri amplifikasyon grafiği (Yeşil Kanal) (B) 18S primerleri ile amplifikasyon grafiği (Kırmızı Kanal) (C) Eşek ve 18S standart eğrileri

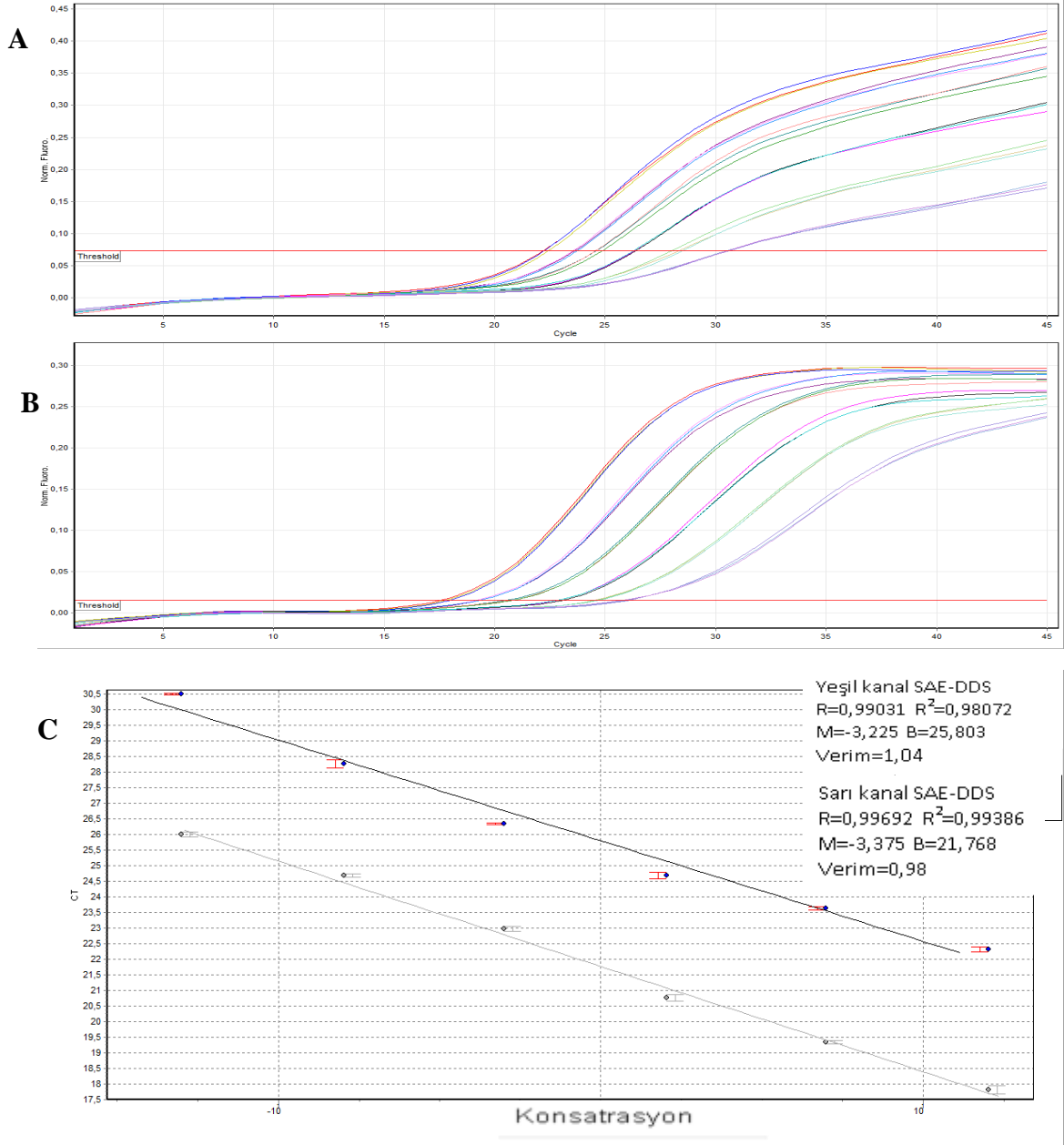
4.3.3. Üçlü GZ-PZR reaksiyonlarında primer prob setlerin verimlilikleri

Eşek, at ve 18S primerlerinin AE-DDS (at ve eşek DNA'ları 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra seri dilüsyonları yapılmıştır, Çizelge 3.2) ile üçlü GZ-PZR reaksiyonu sonucunda, reaksiyon verimlilikleri ve R^2 değerleri eşek için %76 ve 0,99 at için %100 ve 0,99 ve 18S için %108 ve 0,99 olarak elde edilmiştir. Standart eğrilerini gösteren Şekil 4.13.D'de açıkça görüldüğü üzere eşek primerlerine ait standart eğri, at ve 18S eğrilerinden çok farklı bir eğime dolayısı ile farklı verimlilik değerine sahip çıkmıştır. Bu sorunun giderilmesi için primer ve prob konsantrasyonlarında ayarlama yapılarak üçlü reaksiyon tekrarlanmıştır.

Çoklu reaksiyonlarda aynı türün içerisinde birden fazla ampikon çoğaldığından her bir primer çifti reaktifler için yarış içinde olacaktır. Reaksiyona giren genetik materyalde, hedef bölgelerden birinin miktarının diğerlerinden daha fazla olması o bölgenin daha fazla çoğalıp, daha az miktardaki bölgeler için reaktifleri kısıtlamasına neden olmaktadır. Çoğaltılmak istenen eşek bölgesinin reaksiyon içeriğinde 18S'e göre daha az olması, verimliliğinin düşük kalmasına neden olabilir düşüncesi ile primer konsantrasyonlarının değiştirildiği yeni bir reaksiyon kurulmuştur. Primer ve problemlerin her birinin reaksiyon içeriğindeki son konsantrasyonları 18S için 0,15 μ M, at için 0,2 μ M ve eşek için 0,25 μ M olacak şekilde Üçlü DNA Dilüsyon Serisinde (SAE-DDS) (at ve eşek DNA'ları 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra seri dilüsyonları sığır DNA'sı ile yapılmıştır) reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. Primer ve prob setlerinin AE-DDS (at ve eşek DNA'larının her birinden %16, %5, %1,6, %0,5, %0,16 ve %0,05 içeren) ile üçlü reaksiyon verimliliği analizi sonucu (A) Eşek primerleri amplifikasyon grafiği (Yeşil Kanal) (B) At primerleri amplifikasyon grafiği (Sarı Kanal) (C) 18S primerleri amplifikasyon grafiği (Kırmızı Kanal) (D) Standart eğri

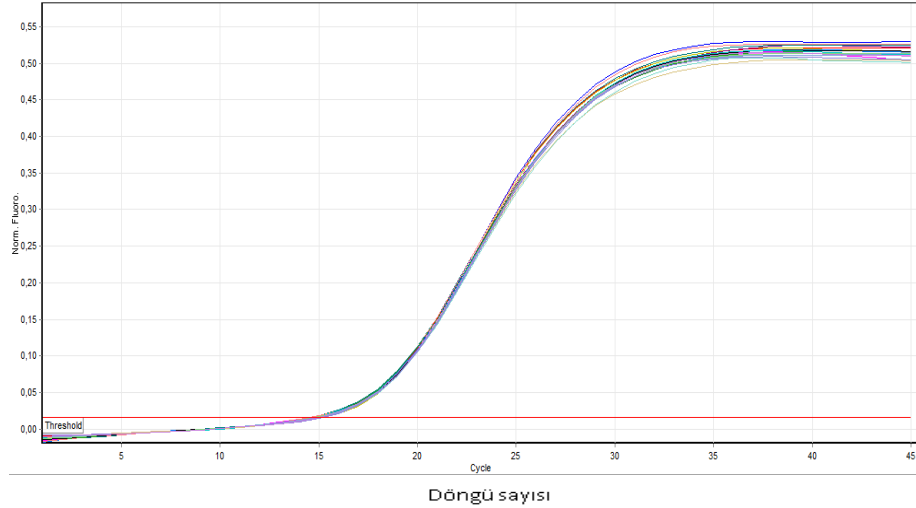


Şekil 4.14. Primer ve prob setlerinin SAE-DDS (%16, %5, %1,6, %0,5, %0,16, %0,05'er at ve eşek DNA'sı içeren sığır DNA'sı) üçlü reaksiyonu amplifikasyon ve standart eğri grafikleri (A) Eşek primer amplifikasyon grafiği (Yeşil Kanal) (B) At primer amplifikasyon grafiği (Sarı Kanal) (C) Standart eğri

Optimize edilen primer ve prob konsantrasyonları ile eşek primer setinin reaksiyon verimliliği %76'dan %104'e düzeltilmiştir (Şekil 4.14). At primer setinin verimlilik ve R^2 değerleri ise yine istenen aralıkta elde edilmiştir (%98 ve 0,99) (Şekil 4.14). Daha sonraki analizlere optimizasyonu yapılmış primer ve prob konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

SAE-DDS ile üçlü reaksiyon sonucunda elde edilen 18S primer setinin amplifikasyon grafiği Şekil 4.15'deki gibidir. Tekli (A-DDS, E-DDS) ve ikili AE-

DDS'lerden farklı olarak, üçlü SAE-DDS hazırlanırken at ve eşek DNA karışımı su ile değil sığır DNA'sı ile seyreltildiğinden her bir noktadaki DNA konsantrasyonu 5 ng/μl'dir. Her bir reaksiyon tüpüne 2 μl kalıp DNA eklenmesi ile, her bir reaksiyon tüpündeki DNA konsantrasyonu at ve eşek DNA'sı gibi azalmayıp 10 ng olarak sabit kalmıştır. Her üç türde de çoğalması beklenen 18S primer setinin tüm noktadaki Ct değerinin aynı çıkması, tüplere eklenen DNA miktarının eşit olduğunu, dilüsyon serilerinin hazırlanmasından ya da reaksiyonun kurulmasından kaynaklanan pipetleme hatalarının en az seviyede tutulduğunu göstermiştir.



Şekil 4.15. SAE-DDS (%16, %5, %1,6, %0,5, %0,16, %0,05'er at ve eşek DNA'sı içeren sığır DNA'sı) üçlü reaksiyonu sonucu 18S primer seti ile amplifikasyon grafiği.

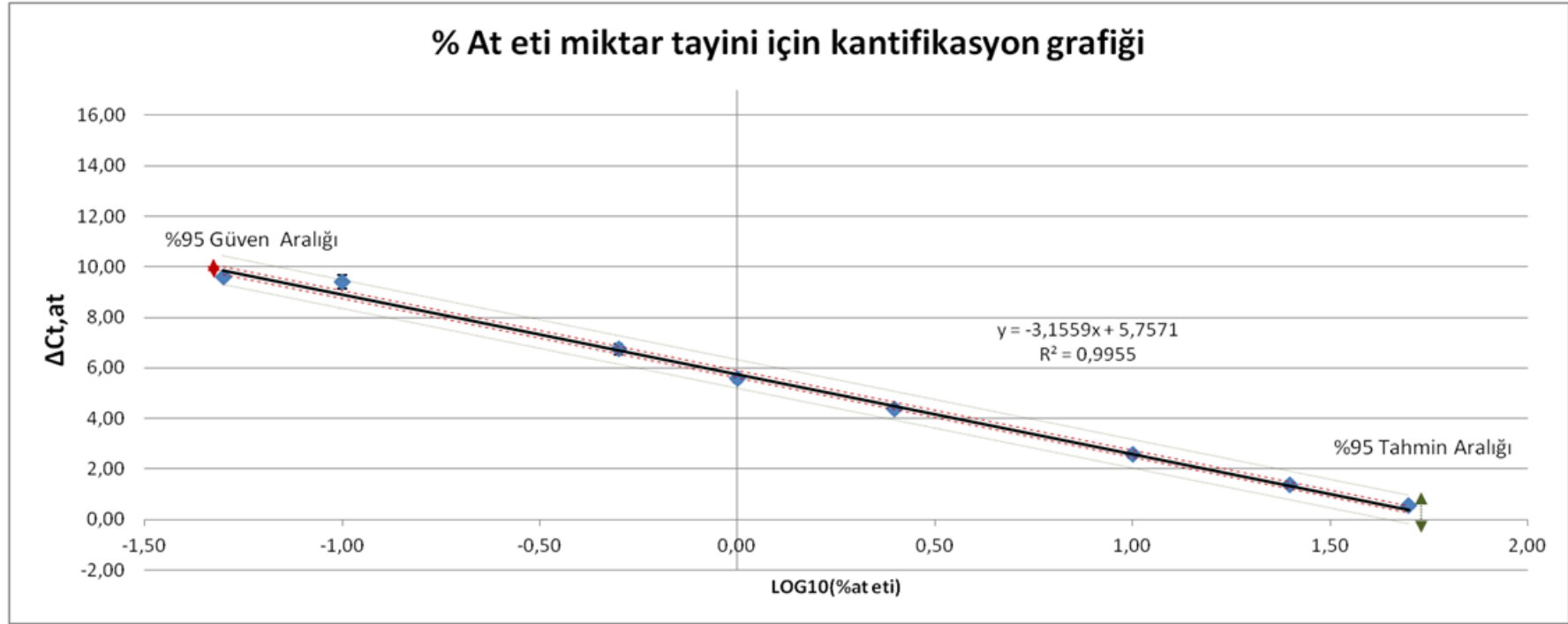
4.4 Kantifikasyon Grafikleri ve İstatistiksel Analizleri

At, eşek ve 18 S primerlerinin, DNA Dilüsyon Serileri ile tekli, ikili ve üçlü gerçekleştirilen reaksiyonları sonucunda reaksiyon verimlilikleri her üç primer seti içinde olması gereken %90-110 aralığında elde edilmiştir. Ayrıca tüm reaksiyonlarda R^2 değeri $>0,98$ olarak bulunmuştur. Primer/prob konsantrasyonları ve reaksiyon bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılan reaksiyonun miktar analizindeki performansını ölçmek için, üçlü reaksiyonlar bir kez de Validasyon Et Karışımlarından izole edilen DNA'lar ile tekrarlanmıştır. Miktar tayini, normalizasyonları yapılmış Ct değerleri ile çizdirilen standart eğrinin kullanıldığı mutlak kantifikasyon metoduna göre Microsoft Excel programında gerçekleştirilmiştir.

Bilinen miktarlarda at ve eşek eti içeren üçlü validasyon örneklerinin türe özgü ve 18S primerleri ile üçlü olarak 3 paralelli gerçekleştirilen reaksiyonları sonucunda at ve eşek türleri için 2 ayrı kantifikasyon eğrisi çizdirilmiş, eğrilerin Excel doğrusal tahmin (DOT) işlevi ile istatistiksel verileri elde edilerek LOD, LOQ, kesinlik ve doğruluk değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3 ve 4.4). Ayrıca %95 güven ve tahmin aralıklarının alt ve üst sınırları belirlenerek grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.16 ve 4.17).

Çizelge 4.3. Üçlü validasyon et karışımlarının üçlü reaksiyonunun at ve 18S primerleri Ct değerleri ve At Kantifikasyon Grafiği için hesaplanan verileri

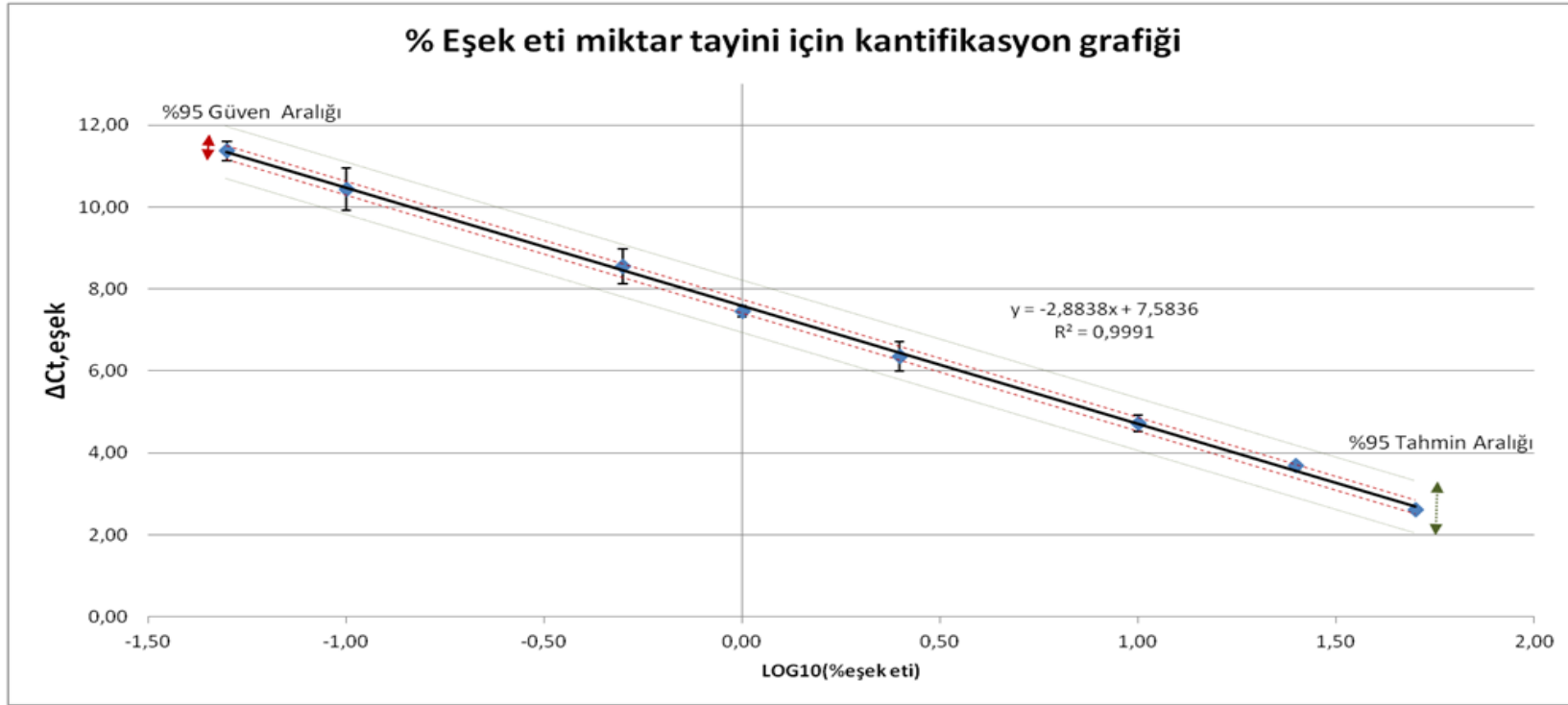
%At	Ct, At	Ct 18S	Log10 %At	Δ Ct	ort. Δ Ct	Std sapma Δ Ct	Hesap. Δ Ct	%95 Güven Aralığı		%95 Tahmin Aralığı		Hesap. %At	ort. %At	ss %At	% VK
								alt	üst	alt	üst				
50	18,53	17,94	1,70	0,59	0,53	0,07	0,40	0,20	0,59	-0,18	0,97	43,38	45,36	2,18	5%
50	18,60	18,06	1,70	0,54			0,40					44,99			
50	18,45	17,99	1,70	0,46			0,40					47,70			
25	18,27	16,98	1,40	1,29	1,34	0,09	1,35	1,18	1,51	0,78	1,91	26,03	25,19	1,62	6%
25	18,41	17,13	1,40	1,28			1,35					26,22			
25	18,4	16,96	1,40	1,44			1,35					23,33			
10	19,66	17,23	1,00	2,43	2,56	0,11	2,60	2,46	2,74	2,05	3,16	11,33	10,33	0,87	8%
10	19,57	16,93	1,00	2,64			2,60					9,72			
10	19,48	16,87	1,00	2,61			2,60					9,94			
2,5	21,49	17,02	0,40	4,47	4,37	0,08	4,50	4,39	4,61	3,95	5,05	2,56	2,75	0,17	6%
2,5	21,25	16,92	0,40	4,33			4,50					2,83			
2,5	21,22	16,9	0,40	4,32			4,50					2,85			
1	22,79	17,17	0,00	5,62	5,58	0,15	5,76	5,64	5,87	5,21	6,31	1,11	1,15	0,13	11%
1	22,81	17,4	0,00	5,41			5,76					1,29			
1	22,89	17,19	0,00	5,7			5,76					1,04			
0,5	23,92	16,95	-0,30	6,97	6,73	0,22	6,71	6,58	6,83	6,15	7,26	0,41	0,50	0,08	16%
0,5	23,74	17,21	-0,30	6,53			6,71					0,57			
0,5	23,65	16,96	-0,30	6,69			6,71					0,51			
0,1	25,96	16,88	-1,00	9,08	9,39	0,27	8,91	8,74	9,09	8,35	9,48	0,09	0,07	0,01	21%
0,1	25,57	15,99	-1,00	9,58			8,91					0,06			
0,1	26,01	16,5	-1,00	9,51			8,91					0,06			
0,05	26,38	16,82	-1,30	9,56	9,59	0,06	9,86	9,66	10,06	9,29	10,44	0,06	0,06	0,00	5%
0,05	26,44	16,9	-1,30	9,54			9,86					0,06			
0,05	26,52	16,86	-1,30	9,66			9,86					0,06			



Şekil 4.16. Validasyon Et Karışımlarının (%50, %25, %10, %2,5, %1, %0,5, %0,1 ve %0,05'er at ve eşek eti içeren sığır eti) üçlü reaksiyonu sonucu elde edilen verilerden çizdirilen At Kantifikasyon Grafiği

Çizelge 4.4. Üçlü validasyon et karışımlarının üçlü reaksiyonunun eşek ve 18S primerleri Ct değerleri ve Eşek Kantifikasyon Grafiği için hesaplanan verileri

%Eşek	Ct, Eşek	Ct 18S	Log10 %Eşek	Δ Ct	ort. Δ Ct	Std sap. Δ Ct	Hesap. Δ Ct	%95 Güven Aralığı		%95 Tahmin Aralığı		Hesap. %Eşek	ort. %Eşek	ss %Eşek	% VK
								alt	üst	alt	üst				
50	24,4	21,74	1,70	2,66	2,61	0,06	2,68	2,46	2,90	2,03	3,34	50,97	53,22	2,34	4%
50	24,44	21,83	1,70	2,61			2,68					53,05			
50	24,3	21,75	1,70	2,55			2,68					55,65			
25	24,62	20,87	1,40	3,75	3,69	0,08	3,55	3,36	3,74	2,91	4,20	21,35	22,48	1,41	6%
25	24,68	20,97	1,40	3,71			3,55					22,04			
25	24,39	20,79	1,40	3,6			3,55					24,06			
10	25,89	21,01	1,00	4,88	4,72	0,21	4,70	4,54	4,86	4,07	5,33	8,66	9,90	1,69	17%
10	25,66	20,86	1,00	4,8			4,70					9,23			
10	25,12	20,63	1,00	4,49			4,70					11,82			
2,5	27,57	21	0,40	6,57	6,36	0,36	6,44	6,31	6,56	5,81	7,06	2,25	2,69	0,60	22%
2,5	26,9	20,84	0,40	6,06			6,44					3,38			
2,5	27,34	20,88	0,40	6,46			6,44					2,45			
1	28,72	21,15	0,00	7,57	7,46	0,13	7,58	7,45	7,71	6,96	8,21	1,01	1,11	0,09	8%
1	28,56	21,18	0,00	7,38			7,58					1,18			
1	28,66	21,24	0,00	7,42			7,58					1,14			
0,5	30,02	21,14	-0,30	8,88	8,56	0,42	8,45	8,31	8,59	7,82	9,08	0,36	0,47	0,11	23%
0,5	29,52	21,24	-0,30	8,28			8,45					0,57			
0,5	29,64	21,11	-0,30	8,53			8,45					0,47			
0,1	32,03	21,08	-1,00	10,95	10,44	0,52	10,47	10,27	10,66	9,82	11,11	0,07	0,11	0,03	31%
0,1	30,74	20,53	-1,00	10,21			10,47					0,12			
0,1	31,63	21,47	-1,00	10,16			10,47					0,13			
0,05	31,87	21,04	-1,30	10,83	11,37	0,23	11,34	11,11	11,56	10,68	11,99	0,07	0,05	0,02	46%
0,05	32,25	21,09	-1,30	11,16			11,34					0,06			
0,05	33,2	21,08	-1,30	12,12			11,34					0,03			



Şekil 4.17. Validasyon Et Karışımlarının (%50, %25, %10, %2,5, %1, %0,5, %0,1 ve %0,05'er at ve eşek eti içeren sığır eti) üçlü reaksiyonu sonucu elde edilen verilerden çizdirilen Eşek Kantifikasyon Grafiği

At ve eşek kantifikasyon grafiklerinin güven ve tahmin aralıklarının, LOQ, LOD değerlerinin hesaplanması için gerekli olan istatistiksel veriler Çizelge 4.5'de verilmiştir. Değerlerin tanımları ve hesaplamada kullanılan formüller Çizelge 3.12 ve 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. At ve eşek kantifikasyon grafiklerinin verim, LOD ve LOQ değerleri

Değer	At	Eşek
m	-3,156	-2,884
$ss(m)$	0,052	0,059
b	5,757	7,584
$ss(b)$	0,054	0,062
R^2	0,994	0,991
$ss(y)$	0,260	0,295
F	3694	2383
sd	22	22
$ss(reg)$	249	208
$ss(resid)$	1,483	1,920
n	24	24
Xm	0,237	0,237
$SS(xx)$	25,0	25,0
t_{95}	2,1	2,1
SH	0,260	0,295
Verim	%107	%122
LOD	%0,3	%0,3
LOQ	%0,8	%1,0

At ve eşek kantifikasyon eğrilerinin reaksiyon verimi (3.1) ve (3.2) bağıntılarından hesaplanmış ve at için %107, eşek için %122 bulunmuştur. At eğrisinin verimi kabul edilebilir %90-110 aralığında çıkmışken, eşek eğrisinin verimi kabul edilebilir üst sınırdan daha yüksek çıkmıştır. Verimin %100'den daha yüksek çıkması, eğrinin eğiminin olması gerekenden daha az olması anlamına gelir. Bu durum da reaksiyon koşulları (primer dimer oluşumu vb) ya da DNA ekstraksiyonundan kaynaklı (inhibisyon, ekstraksiyon veriminin düşük olması vb) bir soruna işaret etmektedir.

Metodun LOD ve LOQ değerleri (3.4) ve (3.5) bağıntıları kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.5'de yer alan $ss(y)$ (y değerlerinin standart sapması) değerinin m (standart eğrinin eğimi) değerine bölünmesi ile edilen oranın 3,3 katı LOD, 10 katı ise LOQ olarak kabul edilir. Metodun en düşük tespit limiti olan LOD hem at hem eşek için %0,3 olarak hesaplanırken, miktarın hesaplanabildiği en düşük limit olan LOQ, at için %0,8, eşek için ise %1,0 olarak bulunmuştur.

Metodun kesinlik değeri olan varyasyon katsayısı ise, Çizelge 4.3 ve 4.4'de %VK sütununda yer alan değerlerin ortalaması alındığında at için %10, eşek için ise %20 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, bu metot ile sığır eti içine %0,8-%50 aralığında karıştırılmış olan at eti miktarının %10 sapma ile, %1,0-%50 aralığında karıştırılmış olan eşek eti miktarının ise %20 sapma ile hesaplanabileceğini göstermektedir.

4.5. Örneklerin Analizi

Önce DNA Dilüsyon Serileri ile daha sonra Validasyon Et Karışımı ile validasyonu yapılan metodun kontrolü, özel bir laboratuvarında yapılan var/yok analizlerinin sonucunda örneklerin 25 tanesinin negatif, 15 tanesinin ise pozitif olduğu bilinmektedir. Pozitif örnekler, 5 tanesi at pozitif, 5 tanesi eşek pozitif ve 5 tanesi at ve eşek pozitif olarak seçilmiştir. Reaksiyonlar 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiş, Rotor Gene Q yazılımında Sarı ve Yeşil kanallarının kantifikasyon analizinden elde edilen Ct değerlerinden 18S Ct değerleri çıkarılarak Δ Ct değerleri elde edilmiştir. Elde edilen Δ Ct değerleri at miktarı için Şekil 4.16 ve eşek miktarı için 4.17'deki Kantifikasyon Grafiğinin formülünde ($y=mx+b$) y yerine koyularak % at ve eşek eti oranları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.6'da özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. Piyasa örneklerinin (40 adet) at, eşek ve 18S primerleri ile üçlü reaksiyon sonuçları

Örnek No	Ürünün tanımı	GZ-PZR Sonuçları							
		Tipi	at / eşek \pm / \pm	% Eşek eti			%At eti		
				Miktar	ss	%VK	Miktar	ss	%VK
1	Köfte	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
2	Köfte	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
3	Urfa kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
4	Külbastı	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
5	Kıyma	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
6	Mantı içi	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
7	Parça et	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
8	Adana kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
9	Lahmacun harcı	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
10	İçli köfte harcı	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
11	Döner	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
12	Köfte	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
13	Kıyma	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
14	Urfa kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
15	Köfte	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
16	Urfa kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
17	Döner kıyma	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
18	Salam	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
19	Adana kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
20	Çiğ kırmızı et	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
21	Köfte	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
22	Parça et	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
23	Adana kebab	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
24	Döner	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		
25	Sucuk	- / -	T.E.	---	-	T.E.	---		

T.E.=Tespit Edilemedi

Çizelge 4.6'nın devamı. Piyasa örneklerinin (40 adet) at, eşek ve 18S primerleri ile üçlü reaksiyon sonuçları

Örnek No	Ürünün tanımı	GZ-PZR Sonuçları							
		Tipi	At / Eşek ± / ±	% Eşek eti			%At eti		
				Miktar	ss	%VK	Miktar	ss	%VK
26	Sığır KıymaHarcı		+ / -	0,28	0,06		80,3	6,71	%8
27	Lahmacun Harcı		+ / -	0,27	0,11		66,1	4,43	%7
28	Lahmacun Harcı		+ / -	0,21	0,06		43,9	1,13	%3
29	Adana Kebap		+ / -	0,08	0,02		52,4	2,51	%5
30	Parça Et		+ / -	0,11	0,02		33,0	4,38	%13
31	Sucuk		- / +	20,2	1,40	%7	0,1	0,03	
32	Pide Harcı		- / +	20,3	0,61	%3	0,1	0,02	
33	Lahmacun Harcı		- / +	14,4	1,49	%10	0,0	0,01	
34	Adana Kebap		- / +	12,8	0,85	%7	0,0	0,02	
35	Lahmacun Harcı		- / +	16,4	0,89	%5	0,1	0,02	
36	Sucuk		+ / +	7,2	0,24	%3	4,5	0,15	%3
37	Sucuk		+ / +	5,6	0,54	%10	2,7	1,51	%57
38	Salam		+ / +	4,6	0,36	%8	2,0	0,24	%12
39	Sosis		+ / +	6,2	0,79	%13	1,9	0,78	%41
40	Pide Harcı		+ / +	6,0	1,11	%19	1,4	1,12	%81

Piyasa örneklerinin analizi sonucunda alınan sonuçlar özel laboratuvarın sonuçları ile tutarlı bulunmuştur. At ve eşek negatif olduğu bilinen 25 örnekte ne at ne de eşek kanalında herhangi bir amplifikasyon gözlenmezken kontrol 18S kanalında beklediği üzere tüm örnekler amplifikasyon vermiştir.

At ve/veya eşek pozitif olduğu bilinen örneklerde miktar tayini yapılmıştır. At pozitif olan 5 örnekte at eti >%50'nin üzerinde hesaplanmış, at negatif olduğu bilinen 5 örnekte miktarlar LOQ değerinin (%0,8) altında kalmıştır. At ve eşek pozitif olan 5 örnekte ise at eti miktarı %1,4-%4,5 arasında tespit edilmiştir.

Eşek pozitif olduğu bilinen 5 örnekte eşek miktarları %13-20 arasında hesaplanırken negatif olan örneklerde tespit edilen miktar eşek LOQ değerinin (%1) altında kalmıştır. At ve eşek pozitif olan örneklerde ise eşek eti %5-7 arasında hesaplanmıştır.

Tüm sonuçlara bakıldığında metodun yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar vermediği, özel laboratuvarda valide metotlarla elde edilen sonuçlarla tutarlı sonuçlar elde edildiği söylenebilir.

5. TARTIŞMA

Üreticiler arasındaki haksız rekabetin önlenmesi, tüketicilerin aldıkları ürünlerin ihtivasi konusunda kesin ve doğru bilgiye sahip olmak istemeleri ve tüketici sağlığının korunması açısından, özellikle işlenmiş gıda ürünlerinde kullanılan malzemelerin ne olduğunun tespit edilebilmesi gün geçtikçe daha çok önem kazanmaktadır.

Son yıllarda, et ürünlerinde kullanılan etlerin orijinin tespiti açısından DNA-temelli metotlara başvurulmaktadır. Özellikle PCR tekniği, basit, hızlı, spesifik, hassas ve işlenmiş ürünlerin kompleks yapılarında bile türlerin tanımlanmasına olanak vermesi açısından en çok kullanılan tekniktir. Kantitatif tayinler için GZ-PZR temelli metotlar kullanılmaktadır. GZ-PZR'da kullanılan floresan temelli metotlar temel olarak iki kategoriye ayrılmaktadır: Prob (TaqMan vb.) ve DNA'nın içine girerek ışımaya yapan boyalar (interkalatör boya). Probu metotlar, *SYBR Green* interkalatör boyaların kullanıldığı metotlara göre daha spesifik sonuçlar vermesi ve çoklu reaksiyon dizaynına uygun olması açısından daha hızlı olup, kısa süremizde çok yüksek sayıda örneğin analizine olanak sağlamaktadır.

TaqMan prob sistemi hedef DNA'ya spesifik olmasından dolayı çok iyi sonuçlar vermektedir. Ayrıca çoklu reaksiyona olanak sağladığından şu an varolan cihazlarda 7'ye kadar türün tespiti aynı reaksiyonda yapılabilmektedir (Köppel, Zimmerli ve Breitenmoser 2009). Bu özelliği ile yüksek sayıda örneğin analiz edilebilmesi ve çoklu miktar tayinine olanak vermesi reaksiyon başına düşen maliyeti düşürmektedir. *TaqMan prob* kullanarak sığır, koyun, keçi, tavuk, hindi, domuz, at, eşek gibi türlerin etlerinin hem kalitatif hem de kantitatif analizlerinin yapılabileceğini gösteren çalışmalar hem ülkemizde hem de dünyada mevcuttur (Laube *et al.* 2003; Dooley *et al.* 2004; Kesmen *et al.* 2009, 2012).

Literatüre baktığımızda mtDNA genlerini kullanarak RT-PCR TaqMan yöntemiyle işlenmiş et ürünlerinde tekli ve çoklu kalitatif ve kantitatif analizler yapılabildiğini görmekteyiz. Örneğin, Kesmen ve ark. çiğ ve pişmiş et ürünlerinde TaqMan prob kullanılarak at, eşek ve domuz etini tekli reaksiyonlarla ayrı ayrı tespit etmişlerdir (Kesmen vd, 2009). 2012 ve 2013 yılında yaptıkları çalışmalarda ise çiğ ve pişmiş et ürünlerinde tavuk, hindi ve martı türlerini yine tekli GZ-PZR tekniği ile tayin etmişlerdir (Kesmen vd, 2012 ve 2013). 2014 yılında çiğ ve pişmiş et ürünlerinde eşek ve domuz türlerinin tespiti için ikili GZ-PZR tekniği geliştirmişlerdir (Kesmen vd, 2014).

Bu çalışma ile sığır eti ürünlerinde tek tırnaklı eti karıştırılması ile gerçekleştirilecek hilenin kantitatif tespiti için, hassas, spesifik, hızlı ve güvenilir bir PZR metodu geliştirmek hedeflenmiştir. Bu amaç ile, TaqMan problemleri kullanılarak at, eşek ve kontrol olarak 18S primerleri ile üçlü olarak gerçekleştirilecek çoklu GZ-PZR metodu tasarlanmıştır. Referans DNA dilüsyonları ve validasyon et karışımları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda metodun validasyon parametreleri elde edilmiştir. Kantifikasyon yapılırken standart eğri metodu (mutlak kantifikasyon) kullanılmıştır.

Geliştirilen metot ile sığır etine karıştırılmış olan tek tırnaklı hayvan etlerinin %0,05 - %50 dinamik lineer aralığında, %90-122 PZR verimlilikleri ve ortalama at için

%10, eşek için %20 hata payı ile (yüksek doğruluk değerleri) kantitatif olarak tespiti yapılmıştır. Çalışmamız kapsamında, metodun validasyon parametreleri belirlendikten sonra, piyasadadan elde edilen ve at ve eşek içeriği bilinen 40 örneğe bu çalışmada geliştirilen metod uygulanmış ve il kontrol laboratuvarında elde edilen var/yok analizlerinin sonuçları ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Negatif olması gereken 25 örnekte at ve eşek eti tespit edilmezken, pozitif olduğu bilinen 15 örnekte at ve eşek etinin tespiti yapılmış ve miktar analizleri gerçekleştirilmiştir.

Eşek pozitif örneklerde tespit edilen eşek eti miktarları LOQ değeri olan %1'in üzerinde %5-20 arasında hesaplanmıştır. Bu miktarlar metodun kantifikasyon aralığında olup varyasyon katsayısı ortalama %8'dir.

At pozitif örneklerde ise durum daha farklı bulunmuştur. Yalnızca at pozitif olan 5 örneğin 3'ünde at eti miktarı %50'nin üzerinde %6 gibi çok düşük bir varyasyon katsayısı ile hesaplanmıştır. Diğer 2 örneğin at eti miktarları ise %44 (%3 VK) ve %33 (%13 VK) olarak hesaplanmıştır. At ve eşek pozitif olduğu bildirilen örneklerde ise at eti %4,5'un altında tespit edilmiş olup varyasyon katsayıları çok yüksek bulunmuştur.

At eti ve eşek eti pozitif çıkan örneklerin arasındaki farkı görmek açısından miktar analizlerinin yapılmasının önemli olduğu söylenebilir. At pozitif çıkan örneklerin %50'den daha yüksek miktarda at eti içerdiğinin hesaplanması, eşek etinde ise miktarın %20'lerin altında kalması, at etinin piyasada daha fazla bulunduğunu ve sığır etine karıştırmanın ötesinde tamamen sığır eti yerine kullanılıyor olmasının mümkün olduğunu göstermiştir. At ve eşek pozitif örneklerde ise miktarların az çıkması, özellikle at eti miktarının çok düşük olup varyasyon katsayılarının çok yüksek olması ile, üreticinin her iki et türünü aynı anda kullanmasından ziyade, bir tanesinin bulaşıklıktan dolayı pozitif sonuç verdiği düşünülebilir.

TaqMan prob ile geliştirilen kantitatif GZ-PCR metodu, hassas, spesifik, doğruluk değeri yüksek olması gibi avantajlara sahip olmasının yanı sıra, geliştirilmeye ve iyileştirilmeye açık bir metottur. Üçlü olarak tasarlanan bu metodun, kullanılacak olan cihazın olanak verdiği ölçüde 7'ye kadar daha fazla hedefi çoğaltacak şekilde tasarlanarak geliştirilebilir ve bir örnek için harcanan zaman ve reaksiyon hacmi açısından çok daha avantajlı hale gelebilir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma sığır eti ürünlerinde at ve eşek eti varlığının tek bir reaksiyonla tespit edilmesi ve miktarının hesaplanmasını mümkün kılan üçlü bir GZ-PZR metodu geliştirilmiştir. Referans DNA dilüsyon serileri ve validasyon et örnekleri ile metodun optimizasyonu yapılmıştır. Özel bir laboratuvarında analizi yapılan örneklerden seçilen ve sonucu bilinen 40 adet piyasa örneğinin geliştirilen metot ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler laboratuvarlarda elde edilen var/yok verileri ile paralellik göstermiştir. Ayrıca örneklerde varlığı tespit edilen at ve eşek etlerinin miktar analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- Metodun at eti miktar analizi için reaksiyon verimi %107, LOD değeri %0,3 ve LOQ değeri %0,8 olarak hesaplanmıştır.
- Eşek eti için ise reaksiyon verimi %122, LOD %0,3 ve LOQ %1 olarak hesaplanmıştır.
- At ve eşek negatif olduğu bilinen örneklerde bu metot ile de negatif sonuç alınmıştır. At ve eşek kanallarında herhangi bir floresan ışımaya tespit edilmemiştir.
- At pozitif olduğu bilinen 5 örnekte 3'ünde %50 ve üzerinde (%6 VK) at eti tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların metodun validasyonu yapılan aralığının üzerinde olması bu örneklerin %100 at eti olma ihtimalini ortaya çıkarmıştır.
- Eşek pozitif olduğu bilinen 5 örnekte de eşek etinin miktarı %12-20 arasında (%6 VK) tespit edilmiştir. Düşük varyasyon katsayısı ve miktarların çalışma aralığında olması dolayısı ile güvenilir olan bu sonuçlardan hareketle bu ürünlerde eşek etinin sığır etine bilinçli olarak karıştırıldığı söylenebilir.
- At ve eşek pozitif olduğu bilinen örneklerde ise eşek eti %10 varyasyon ile %5-8 arasında, at eti ise çok daha yüksek varyasyonla (ort. %39) %1,5-4,5 arasında tespit edilmiştir. Bu sonuçtan at pozitif sonucunun bulaşıklıkla kaynaklandığı sonucu çıkarılabilir.
- Bu çalışma sonucunda geliştirilen üçlü GZ-PZR metodu ile yapılan piyasa örneklerinin analizinde, valide var/yok metotları ile aynı sonuçların alınması, artı olarak at ve eşek etinin miktarlarını düşük varyasyonla hesaplanabilmesi, et piyasasındaki taşıyıcı durumun yorumlanabilmesini sağlamıştır.

7. KAYNAKLAR

- Anonim 1: <https://www.nytimes.com/2013/02/26/world/europe/ikea-recalls-its-meatballs-horse-meat-is-detected.html> [Son erişim tarihi:13.06.2018]
- Anonim 2: <http://www.tarim.gov.tr/tr/basin-odasi/basin-aciklamalari/item/564-taklit-ta-gsis.html> [Son erişim tarihi:13.06.2018]
- Anonim 3: https://www.ntv.com.tr/dunya/helal-gidadan-domuz-eti-cikti,-6DR8dxppEGoggMvbhnntA?_ref=infinite [Son erişim tarihi:13.06.2018]
- Anonim 4: T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Gıda Güvenliği Komisyon Çalışma Belgesi. II. Tarım Şurası. Ankara 2004.
- Anonim 5: T.C. Devlet Planlama Teşkilatı. Dokuzuncu Kalkınma Planı 2007-2013. Gıda Güvenliği, Bitki ve Hayvan Sağlığı Özel İhtisas Komisyonu Raporu. Ankara, 2007.
- Anonim 6: Gıda Hattı Dergisi. Ankara. Sayı:10, 2010.
- Anonim 7: AB Gıda Güvenliği Anlayışı ve Türkiye’de Gıda Güvenliği. Avrupa İşletmeler Ağı. İstanbul. Eylül, 2011. http://www.aiaistanbul.org/files/bilgibankasi/yayinlarimiz/ab_gida_guvenligi.pdf [Son erişim tarihi:13.06.2018]
- Anonim 8: <https://www.sozcu.com.tr/2018/saglik/gida-tarim-ve-hayvancilik-bakanligi-173-hileli-urunu-acikladi-2306165/> [Son erişim tarihi: 23.05.2018]
- Anonim 9: https://www.bbc.com/turkce/haberler/2013/02/130214_horsemeat [Son erişim tarihi: 23.05.2018]
- Anonim 11: Türk Gıda Kodeksi. Taze Et, Hazırlanmış Et ve Hazırlanmış Et Karışımları Tebliği. Tebliğ No: 2000/5. Resmi Gazete Tarihi: 10.02.2000
- Anonymous 1: https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/Polymerase_chain_reaction.svg_.png [Son erişim tarihi: 20.05.2018].
- Anonymous 2: BIO-RAD Laboratories. Applications Guide table of contents Table of Contents. 2006:2–4.
- Anonymous 3: Rotor Gene Q Manual-Quagen ABD.2012:3-4
- Anonymous 4: DNeasy® Blood & Tissue Handbook.2006:25
- Anonymous 5: NCBI BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch [Son erişim tarihi: 20.05.2018].
- Anonymous 6: Qiagen. 2009. QuantiTect ® Reverse Transcription Handbook. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f0de5533-3dd1-4835->

8820-1f5c088dd800&lang=en [Son erişim tarihi: 23.07.2018]

- Asensio L., González I., García T. et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 2008;**19**:1–8.
- Atalay S., Kök S. ve Avcıbaşı Y. 2016. Et ürünlerinde farklı hayvan türlerinin ELISA tekniği ile tespit edilmesi. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 05-07 Ekim 2016, Edirne.
- Atlı A., Hayoğlu İ., Koçak C., Özer B. ve Soyer A. 2010. Gıda sanayiinin hammadde gereksinimi ve yeterliliği. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi. Bildiriler (II): 1097-1112. 11-15 Ocak, Ankara.
- Ayaz Y., Ayaz N.D., Erol I. Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Muscle Foods* 2006;**17**:214–20.
- Cawthorn D.M., Steinman H.A., Hoffman L.C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control* 2013;**32**:440–9.
- Cerit H., Dumen E., Sezgin F.H. et al. PCR Assay for Identification of Animal Species in Different Ready to Eat Raw Meat Samples. *KAFKAS Univ Vet Fak Derg* 2015;**21**:777–9.
- Dooley J.J., Paine K.E., Garrett S.D. et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci* 2004;**68**:431–8.
- Ekici K., Akyüz N. Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *YYÜ Vet Fak Derg* 2003;**14**:78–82.
- Eugster A., Ruf J., Rentsch J. et al. Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: Results of an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol* 2008;**227**:17–20.
- Fajardo V., González I., Martín I. et al. Real-time PCR for detection and quantification of kırmızı deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci* 2008;**79**:289–98.
- Flores-Munguia M.E., Bermudez-Almada M.C., Vazquez-Moreno L. a Research Note: Detection of Adulteration in Processed Traditional Meat Products. *J Muscle Foods* 2000;**11**:319–25.
- FSAI. FSAI survey finds horse DNA in some beef burger products. Dublin, Ireland: FSAI; 2013 [Accessed 2014 December 12, 2014] Available from: http://www.fsai.ie/news_centre/press_releases/horseDNA15012013.html.
- Hebert PDN., Cywinska A., Ball SL. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci* 2003;**270**:313–21.
- Hsieh H.M., Tsai C.C., Tsai L.C. et al. Species identification of meat products using the cytochrome b gene. *Forensic Sci J* 2005;**4**:29–36.

- Ilhak O.I., Arslan A. Identification of meat species by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. *Turkish J Vet Anim Sci* 2007;**31**:159–63.
- Jacobs B. 2013. Horsemeat found in halal burgers at Lancashire schools. http://www.lancashiretelegraph.co.uk/news/10251765.Horsemeat_found_in_halal_burgers_at_Lancashire_schools/ [son erişim tarihi 13.06.2018]
- Kane D. 2016. Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the U . S . Commercial Market Using DNA- Based Methods. 2015. *Food Control* 2016; **63**:267.
- Kesmen Z., Gulluce A., Sahin F. et al. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci* 2009;**82**:444–9.
- Kesmen Z., Sahin F., Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Sci* 2007;**77**:649–53.
- Kesmen Z., Yetiman A.E., Şahin F. et al. Detection of Chicken and Turkey Meat in Meat Mixtures by Using Real-Time PCR Assays. *J Food Sci* 2012;**77**:1–7.
- Keyvan E., Kul I., Tansel U. Identification of meat species in different types of meat products by PCR. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2017;**64**:261–6.
- Köppel R., Zimmerli F., Breitenmoser A. Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *Eur Food Res Technol* 2009;**230**:125–33.
- Laube I., Spiegelberg A., Butschke A., Zagon J., Schauzu M., Kroh L., Broll H. 2003. Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 2003: 111–8.
- Leininger, T. 2013. Simple Linear Regression. <http://www2.stat.duke.edu/~tj13/s101/slides/unit6lec3H.pdf> [Son erişim tarihi: 23.07.2018].
- Livak K.J., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001;**25**:402–8.
- López-Andreo M., Garrido-Pertierra A., Puyet A. Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *J Agric Food Chem* 2006;**54**:7973–8.
- Mafra I., Ferreira I., Oliveira M. Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol* 2008;**227**:649–65.
- Günşen, U., Ovalı, B. B., Coşkun, Y. 2006. Et Ürünlerinde Bazı Anabolizan Madde

- Kalıntı Varlığının Elisa Tekniği ile Belirlenmesi. II. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi.
- Özpinar, H., Tezmen, G., Gökçe, I. et al. Detection of animal species in some meat and meat products by comparatively using DNA microarray and real time PCR methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013;**19**, DOI: 10.9775/kvfd.2012.7616.
- Öztan A., Kahraman, N. 2005. Gıda Mevzuatı ve Avrupa Birliği Entegrasyonu. Gıda Mühendisliği 4. Kongresi (s. 1-10), Ankara.
- Pegels N., González I., Martín I. et al. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control* 2011;**22**:1189–96.
- Prediger E. 2015. qPCR Probes—selecting the best reporter dye and quencher. *Integrated DNA Technologies* (<https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/qpcr-probes-selecting-the-best-reporter-dye-and-quencher>).
- Soares S., Amaral J.S., Oliveira MBPP et al. A Sybr green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Sci* 2013;**94**:115–20.
- Tanabe S., Hase M., Yano T. et al. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;**71**:3131–5.
- Türkyılmaz Ö., Irmak H., 2008. Et ve et ürünlerinde ELISA tekniği ile türlerin tespiti. *Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg*,**30**, 27-31.
- Türkyılmaz Ö., Kafa B., İzan Y., Sava Ş., 2009. Çiğ et ve et ürünlerinde AGID yöntemi ile türlerin tespiti. *Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg*, **31**, 15-20.
- Yalçın H. Et ve Et Ürünlerinde At ve Domuz Eti Varlığının Uhlenhuth Presipitasyon Halka , Agar Gel Immuno Diffuzyon ve Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay Metotları ile Araştırılması Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6615 Investigation of the Presence of Hors. 2012;**18**:923–7.
- Yetim H. Engineering F. Identification of different meat species used in sucuk production by pcr assay. *Gıda* 2010;**35**:81–7.
- Yosef T.A., Al-Julaifi M.Z., A.M. A-R. Food Forensics: Using DNA-Based Technology for the Detection of Animal Species in Meat Products. *Nat Sci* 2014;**12**:82–90.

ÖZGEÇMİŞ

Sevda KAÇMAZ

sevda.kacmaz@tarim.gov.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Lisans 2002-2007	Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
---------------------	--

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Teknik Personel 2013-Halen	Antalya Gıda Kontrol Laboratuar Müdürlüğü-Biyoteknoloji Birimi
Denetmen 2009-2013	Korkuteli İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü