

Özet

Son yıllarda et ve et ürünlerinde tür tespiti amacıyla real-time PCR tekniğinin kullanılabilirliği birçok araştırmacı tarafından test edilmiş ve oldukça umut verici sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada da çiğ ve ısıtılmış et karışımlarında eşek ve domuz türlerine ait etlerin tespitinde kullanılmak üzere TaqMan real-time PCR metodu geliştirilmiş, söz konusu türlerin hem çiğ ve hem de ısıtılmış örneklerde %0.001 seviyesine kadar başarı ile tespit edilebileceği görülmüştür. Mitokondrial DNA üzerinde at, eşek ve domuz türlerine spesifik (sırasıyla 83 ve 115 baz çifti uzunluğunda fragment üreten) olarak dizayn edilen oligonükleotid primer ve prob setleri kullanılarak hazırlanan bu çiğ ve ısıtılmış örneklerden alınan örneklerde real-time PCR TaqMan prob yöntemi ile kalitatif ve kantitatif tür tayini yapılmıştır.

Giriş

Et endüstrisinde bazı üreticilerin düşük kaliteli veya eti yenilmeyen hayvanlara ait etleri çeşitli et ürünlerine işleyerek tüketime sunması, tüketicilerde sağlık, ekonomik, din ve kültürel değerler açısından bir takım problemlere neden olabilmektedir. Son yıllarda DNA'ya dayalı tekniklerin, tür tespiti çalışmalarında öne çıktığı görülmektedir. Özellikle nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif olarak sonuç verebilen real-time PCR yöntemi et ürünlerinde tür belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikle hedef genin amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyal ölçülerek PCR sonrasında ilave bir işleme gerek duyulmaksızın sonuç alınabilmektedir. Floresans ışık yapan PCR ürünlerinin tespitinde kullanılan prensibe bağlı olarak farklı real-time PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu teknikle PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgün problemlardan yararlanılmaktadır. Oligonükleotid problemler kullanıldığı pek çok real-time PCR tekniği mevcut olmakla birlikte TaqMan probe yöntemi, tür tayini çalışmalarında daha fazla tercih edilmektedir.

Materyal ve Metot

1. Mitokondrial DNA üzerinde eşek ve domuz türlerine spesifik primer ve TaqMan problemler dizayn edilmiştir.
2. Eşek ve domuz türlerine ait etler farklı seviyelerde sığır etine karıştırılmıştır.
2. Karışımlar, 120°C'de 30 dk otoklavda ve 200°C'de 30 dk etüvde ısıtılma tabi tutulmuştur.

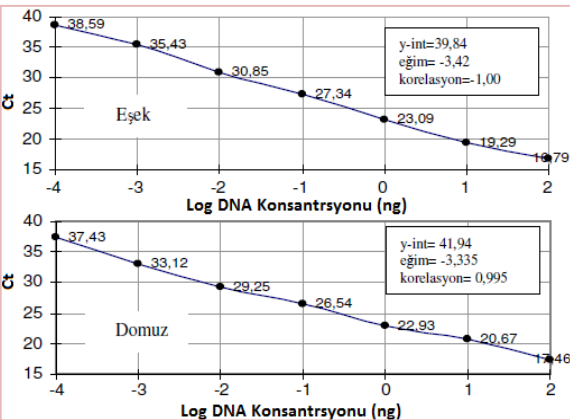
3- DNA izolasyonu

- 4- Reaksiyon miksinin hazırlanması
 - Hedef DNA
 - Reaksiyon bufferı
 - Nükleotidler (dNTPs)
 - Primer ve problemler
 - Taq polimeraz

5- Real-time PCR reaksiyonu

6- Real-time deteksiyon

BULGULAR



Şekil 1. Hedef türlere ait DNA'ların 0.0001 ng'dan 100 ng'a kadar olan konsantrasyonlarının logaritmik değerlerine karşılık elde edilen Ct değerleri

Tablo 1. Et karışımlarının TaqMan yöntemi ile analiz sonuçları

Hedef Türler	DNA Konsantrasyonu (%)	C _T Değerleri		
		Çiğ	120°C'de 30 dk ısıtılmış	200°C'de 30 dk ısıtılmış
Eşek	0.001	31.20	31.70	28.78
	0.01	29.29	32.78	28.43
	0.1	25.95	29.75	26.12
	1	22.29	27.52	22.57
	10	19.64	24.24	19.51
Domuz	0.001	34.97	36.08	31.79
	0.01	31.99	37.82	31.01
	0.1	28.56	35.11	28.21
	1	25.41	31.28	25.11
	10	21.27	27.67	21.91

Sonuç

Spesifite testi sonucunda, eşek ve domuz türlerine spesifik primer ve prob setlerinin test edilen diğer 7 türle hiç bir çapraz reaksiyon vermediği tespit edilmiştir.

Hassasiyet testi sonucunda hedef türler 0.001 ng seviyesine kadar tespit edilmiş, elde edilen standart kurvelerden korelasyon katsayıları eşek ve domuz türleri için sırayla -1.00 ve 0.995, eğim ise -3.42 ve -3.335 olarak belirlenmiştir.

Hazırlanan çiğ ve ısıtılmış örneklerde TaqMan prob yöntemi ile yapılan kalitatif ve kantitatif tür tayini sonucunda domuz ve eşek türlerinin ve ısıtılmış örneklerde %0.001 seviyesine kadar başarı ile tespit edilebileceği görülmüştür.

Kaynaklar

- Zhang C.L., Fowler M.R., Scott N.W., Lawson G., Slater A. A TaqMan realtime PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. Food Control 18 (2007) 1149–1158.
- Rodriguez M.A., Garcia T., Gonzalez I., Hernandez P. E., Martin R. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. Meat Science 70 (2005) 113–120.
- Kesmen Z., Güllüce A., Sahin F., Yetim H., Identification of Meat Species by TaqMan - Based Real-Time PCR Assay, Meat Science doi: 10.1016/j.meatsci. (2009) 02.01945.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction Mol Aspects Med 2006;27:95-125.