



## Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Yöntemiyle Kanatlı Etlerinde Tür Tayini

**O. İrfan İLHAK**  
**Ali ARSLAN**

Fırat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Besin Hijyeni ve Teknolojisi  
Anabilim Dalı  
Elazığ-TÜRKİYE

Bu çalışmada, 9 adet kanatlı etinde (tavuk, hindi, martı, devekuşu, ördek, kaz, bıldırcın, keklik ve karga) Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA yöntemi kullanılarak tür tayini yapıldı.

Çalışmada, Guanin-Sitozin oranları %50 ile %80 arasında değişen, 12 adet 10 bazlık primer kullanıldı. Kanatlı türleri, Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA profilleri karşılaştırılarak ayırt edildi.

Sonuç olarak, kullanılan bazı primerlerin kanatlı etlerinde tür tayini için uygun olduğu bazılarının ise uygun olmadığı tespit edildi. Çalışmanın sonuçları, Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA yöntemiyle kanatlı etlerinde tür tayini için uygun primerlerin kullanılması gerektiğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Rastgele çoğaltılmış DNA, Kanatlı etleri, Tür tespiti.

### Identification Of Poultry Meat Species By Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique

In this study, meats of 9 poultry species (chicken, turkey, gull, ostrich, duck, goose, quail, partridge, and crow) were identified by random amplified polymorphic DNA (RAPD) method using 12 different 10 bp-nucleotide primers with guanine and cytosine (GC) contents, ranging from 50-80%. In general, the species were differentiated by comparing RAPD fingerprinting of the species.

However, some primers used were not suitable for identification of poultry meats while the some primers were suitable. Therefore, the results indicated that identification of poultry meat species by RAPD technique requires use of suitable primers.

**Key Words:** RAPD, Poultry meats, Identification

### Giriş

Artan dünya nüfusunun aksine hayvansal kökenli protein yetersizliği giderek artmaktadır. Hayvansal protein yetersizliğine bağlı olarak et ve et ürünleri yüksek fiyatla satılmaktadır. Buna bağlı olarak gelir düzeyi düşük tüketicilerin ucuz et ve ürünlerine olan istemleri artmaktadır. Bazı kişiler bunu fırsat bilip daha çok para kazanmak amacıyla çok ucuz bir şekilde sağladıkları toplumun tüketmediği hayvan etlerini doğrudan veya et ürünlerine karıştırarak satışa sunarlar (1).

Kırmızı et türlerinin ayırımında duyuşal niteliklere, anatomik farklılıklara, kılın histolojik farklılığına, doku yağlarının özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan yöntemlerin yanı sıra immunolojik, elektroforetik ve DNA hibridizasyon yöntemleri de kullanılmaktadır (2-5). Ancak, morfolojik ve duyuşal özelliklere göre, kanatlı etlerinde tür ayırımının yapılmasının çok güç olduğu belirtmişlerdir (6). Bunun yanı sıra, immunolojik, elektroforetik ve DNA hibridizasyon yöntemlerinde karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle de, kanatlı et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi için doğru sonuç veren, basit ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesinin zorunlu hale geldiğini vurgulamışlardır.

Son yıllarda, Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) yönteminin geliştirilmesi bitki, bakteri ve hayvan türlerinin orijininin tespit edilmesinde büyük kolaylık sağlamış ve başarıyla kullanılmıştır (7-10). PZR ile PZR tabanlı olan Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA =RAPD) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleriyle et türlerinin ayırımı yapılmıştır (11-13).

Bu çalışmada, RAPD yöntemiyle, farklı GC oranlarına sahip primerler kullanılarak kanatlı etlerinde tür tespiti yapıldı. Ayrıca, RAPD yönteminin rutin bir analiz yöntemi olarak, kanatlı etlerinde tür tespiti için kullanılabilme durumu değerlendirildi.

**Geliş Tarihi :** 31.05.2007  
**Kabul Tarihi :** 04.09.2007

### Yazışma Adresi Correspondence

**O. İrfan İLHAK**  
Fırat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Besin Hijyeni ve Teknolojisi  
Anabilim Dalı  
23199 Elazığ-TÜRKİYE

oilhak@firat.edu.tr

## Gereç ve Yöntem

Et Örnekleri: Çalışmada tavuk, hindi, martı, deve kuşu, ördek, kaz, bıldırcın, keklik ve karga kas dokusu kullanıldı. DNA Ekstraksiyonu: Kas dokularından DNA ekstraksiyonu Arslan ve ark. (14) bildirdiği yöntemle gerçekleştirildi.

Primerler: Çalışmada Tablo 1'de verilen primerler kullanıldı. Primerler Integrated DNA Technologies, Inc, (Coralville, USA) firmasından temin edildi. M- 100 bp DNA markers (Fermentas), 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- deve kuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bıldırcın, 8- keklik, 9- karga.

**Tablo 1. Kanatlı et türlerinin RAPD analizi için kullanılan primerler.**

Primer	GC içeriği (%)	Sekans (5' - 3')
1	50	ATC TGA GGA G
2	50	GGA TGT TAC C
3	60	CCA TCG ACG T
4	60	AGG GAA CGA G
5	60	CCA CAG CAG T
6	60	AGC GTC ACT G
7	70	ACG ACC CAC G
8	70	GAG ATC CGC G
9	70	GCG ATC CCC A
10	70	AGT CGG GTG G
11	80	CGC CCT GGT C
12	80	TGA CCC GCC C

RAPD-PZR ve Agaroz Jel Elektroforezi: RAPD-PZR işlemi, touchdown thermocycler (Hybaid, Middlesex, England) cihazı ile yapıldı. Toplam hacmi 50 µl olacak şekilde eppendorf tüpe 5 µl 10xPCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, %0.1 Triton X-100), 7.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP), 2 U Tag DNA polimeraz (Promega, Madison, USA), 2.5 µl 20-25 pmol 10 nt-primer ve 5 µl hedef DNA konuldu. Hazırlanan eppendorf tüpleri thermocycler cihazına yerleştirilip 94°C'de 1 dakika, 36°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika bekletilerek toplam 45 siklusta PZR işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 2: Kullanılan primerlerin kanatlı et türlerine göre uygunlukları.**

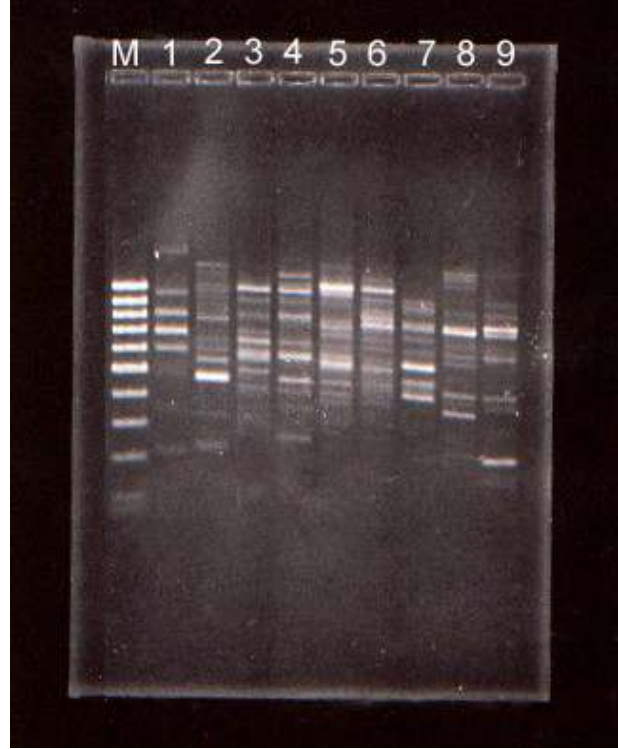
Meat species	Primer no											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tavuk	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Hindi	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Martı	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Devekuşu	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Ördek	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Kaz	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Bıldırcın	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Keklik	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Karga	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ = En az 2 adet, belirgin DNA bandı oluşturan

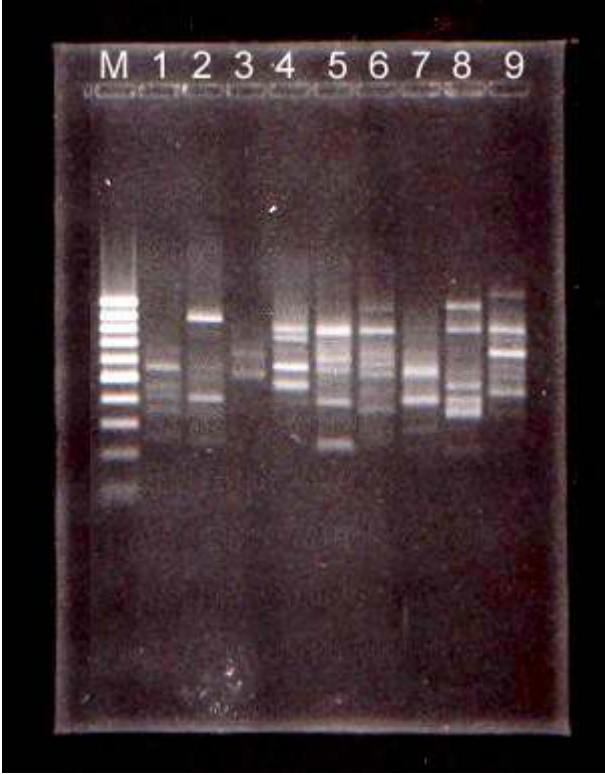
- = 2 adetten daha az DNA bandı oluşturan

Çoğaltılan DNA segmentleri %1.5' lik agaroz jelle (Sigma) yüklenerek 2 saat 100 voltta elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi takiben jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile boyanarak UV transilluminator'de gözlemlendi ve fotoğrafı çekildi. Çalışma 3 kez tekrar edildi.

RAPD Profillerinin Değerlendirilmesi: Her tür için elde edilen RAPD profillerinin değerlendirilmesi Koh ve ark. (8) bildirdiği şekilde yapıldı. Her bir tür için en az 2 adet DNA bandı oluşturan primerler pozitif (+), 2 adetten az DNA bandı oluşturan primerler negatif (-) olarak değerlendirildi (tablo 2).



**Şekil 1. Kanatlı etlerinde primer 8 (%70 GC) ile elde edilen RAPD profili**



**Şekil 2. Kanatlı etlerinde primer 9 (%70 GC) ile elde edilen RAPD profili**

#### Bulgular

Her tür için elde edilen RAPD profillerinden bazı örnekler gösterildi. Primerlerin değerlendirilmesi Tablo 2'de verildi. Genel olarak %50, %60 ve %70 GC içeren primerler %80 GC içeren primerlerden daha iyi sonuçlar verdi.

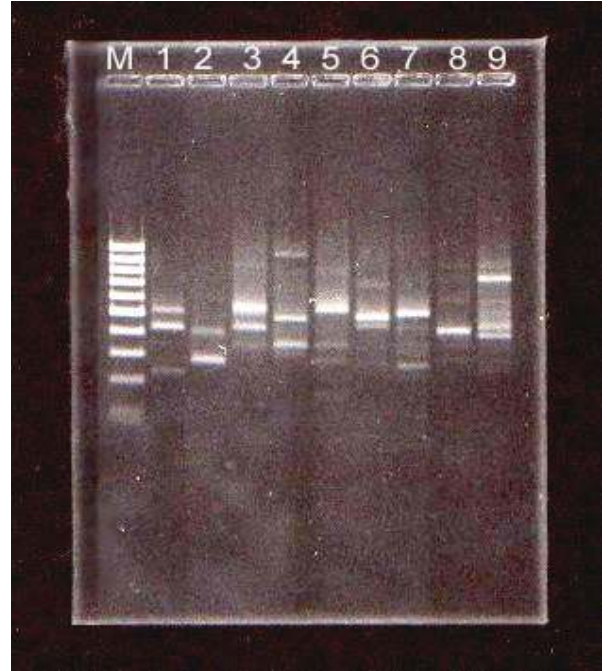
GC oranı %50 olan primer 1 (Şekil 5) ve primer 2 (Tablo 2) tüm kanatlı türlerinde birbirinden farklı RAPD profilleri gösterdi.

GC oranı %60 olan primerlerden primer 3 hariç, diğer primerler (primer 4, 5 ve 6) çalışmada kullanılan kanatlı etlerinde nispeten ayırt edici RAPD profilleri gösterdiler. Primer 3 sadece deve kuşu ve karga'nın DNA'sında RAPD profili oluşturdu, diğer tür kanatlıların DNA'sından RAPD profili oluşturmadı (Tablo 2). Primer 4 deve kuşunda sadece 1 bant RAPD profili oluşturdu, bunun yanı sıra hindi ve martı eti için oluşturduğu RAPD profili incelendiğinde, 2 tür arasında ayırt edici bir farklılık oluşturmadığı görüldü (Şekil 3). Primer 5 tavuk ve kaz DNA'sında RAPD profili oluşturmadı (Tablo 2). Primer 6 ise çalışmada kullanılan tüm kanatlı türleri için birbirinden farklı RAPD profilleri oluşturdu (Şekil 4).

GC oranı %70 olan primerler (primer 7, 8, 9 ve 10) tüm kanatlı türlerinde RAPD profili oluşturdu ( Şekil 1 ve 2). Fakat primer 8 (Şekil 1) ve 10, ördek ile kaz eti arasında belirgin bir farklılık oluşturmadı.



**Şekil 3. Kanatlı etlerinde primer 4 (%60 GC) ile elde edilen RAPD profili M- 100 bp DNA markers (Fermentas), 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- deve kuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bildircin, 8- keklik, 9- karga.**

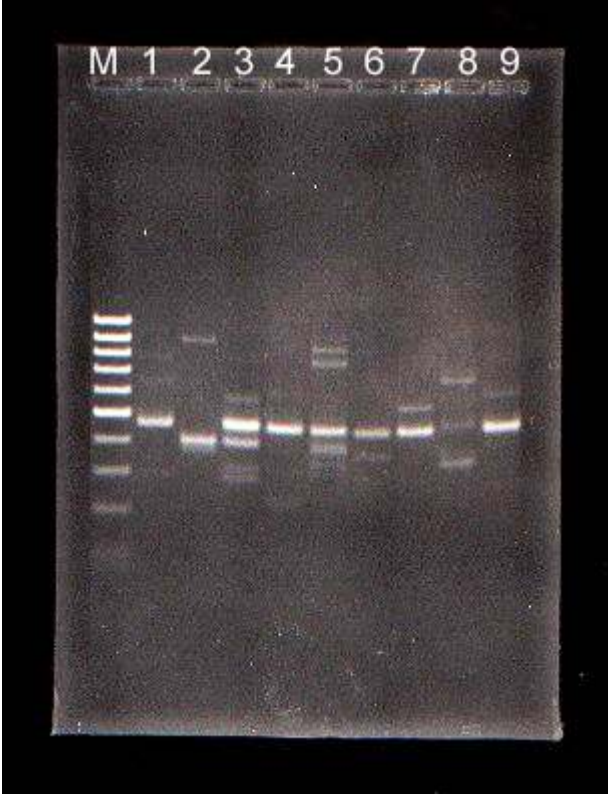


**Şekil 4. Kanatlı etlerinde primer 6 (%60 GC) ile elde edilen RAPD profili**

**M- 100 bp DNA markers (Fermentas), 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- deve kuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bildircin, 8- keklik, 9- karga.**



GC oranı %80 olan primer 11 kaz eti hariç çalışmada kullanılan diğer türler için RAPD profili oluşturmadı (Table 2). Primer 12 ise hindi, martı, deve kuşu ve bıldırcın eti için RAPD profili oluşturdu. Fakat hindi ve bıldırcın için oluşturduğu RAPD profilleri arasında belirgin bir farklılık ortaya koymadı.



**Şekil 5. Kanatlı etlerinde primer 1 (%50 GC) ile elde edilen RAPD profili**

**M- 100 bp DNA markers (Fermentas), 1- tavuk, 2- hindi, 3- martı, 4- deve kuşu, 5- ördek, 6- kaz, 7- bıldırcın, 8- keklik, 9- karga.**

#### Tartışma

Koh ve ark. (8), RAPD yöntemiyle alınan sonuçların kullanılan primere göre çok çeşitli olacağını bildirmişlerdir. Bazı primerlerin, genomda farklılıkların bulunduğu bölgeleri çoğaltamamasından dolayı, biri birine yakın türler arasında aynı RAPD profillerini verebileceği, bazı primerlerin ise genoma uygunluk gösterememesinden dolayı RAPD profili oluşturmayacağını belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar da (7,12,15), primerde bulunan bir bazın değiştirilmesinin, hedef DNA'da farklı bölgelerin çoğaltılmasına, dolayısıyla

#### Kaynaklar

1. İlhak İ, Arslan A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) yöntemiyle sığır, koyun, keçi ve yabani domuz etinin ayırt edilmesi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi 2003; 17: 59-63.

çok farklı bir RAPD profili elde edilmesine neden olacağını bildirmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da, kullanılan her primer için farklı bir RAPD profili elde edildiği, bazı primerlerin tür ayırımı için yetersiz kaldığı, bazılarının ise tür ayırımı için uygun olmadığı görüldü.

RAPD yönteminde elde edilen RAPD profillerinin, PZR mixinde bulunan  $MgCl_2$  miktarı ve hedef DNA konsantrasyonundan, primer bağlanma sıcaklığından, primerdeki baz sayısından ve dizilişlerinden etkilendiği bildirilmiştir (7). Yaptığımız bu çalışmada da, aynı kanatlının aynı kas dokusundan DNA ekstrakte edilmesine, aynı marka ve aynı konsantrasyonda agaroz jel ve PZR mixi, aynı miktarda hedef DNA ve primer ile aynı PZR prosedürü kullanılmasına rağmen, tekrarlar esnasında RAPD profilleri arasında küçük değişiklikler gözlemlendi (bir tekrarda bazı bantlar çok belirgin iken, diğer tekrarda az belirgin olması gibi). Bu gibi durumlarda ekstrakte edilen DNA bir miktar daha steril distile suyla sulandırıldığında (100  $\mu$ l yerine 300  $\mu$ l), RAPD profilleri arasında gözlenen farklılığın ortadan kalktığı görüldü. Bu gibi problemlerle karşılaşılmasının sebebi, ekstraksiyon esnasında hedef DNA'nın yeterince saf olarak elde edilememesine veya çok yoğun elde edilmesine bağlanabilir.

RAPD yönteminin başlıca avantajları, spesifik PZR ve RFLP yöntemlerindeki gibi her hayvan için türe spesifik primerin kullanılmasına ve her hayvan türü için ayrı bir PZR işlemine gerek duyulmamasıdır (7-8). Ayrıca türlerin DNA dizilişlerinin bilinmesine de gerek yoktur (12). Bu avantajlar sayesinde RAPD yöntemiyle et türlerinin tespiti daha kısa sürede ve daha ucuz olarak yapılmaktadır (16-17). Dezavantajları olarak, farklı primerler ile farklı sonuçlar alınması (8) ve aynı tür içerisinde, tekrarlar arasında küçük varyasyonlar çıkabilmesi dolayısıyla, kullanılan hedef DNA miktarının ve RAPD yönteminin tam olarak standardize edilmesi gerektiği vurgulanabilir. Aksi takdirde, laboratuvarlar arasında alınan sonuçlar tartışılabilir. Ayrıca, RAPD metodu karışım halindeki farklı tür hayvan etlerinin orijinlerinin saptanmasında kullanışlı olmayabilir (14).

Sonuç olarak, kanatlı hayvan etlerinin tür tespitinde, GC oranı %70 olan primerler GC oranı %50, %60 ve %80 olan primerlerden daha iyi sonuçlar verdi. Fakat, daha fazla sayıda primerin denenerek en uygun primer/primerlerin tespit edilmesi yerinde olacaktır.

Özetle, tür tespitinde kullanılan diğer metotlarla karşılaştırıldığında, RAPD yöntemiyle kanatlı etlerinde tür tayini daha kolay, daha ucuz ve hızlı olabilir. Fakat, tam olarak standardize edilmediği takdirde, yukarıda bahsedilen dezavantajlarından dolayı her zaman güvenilir bir metot olmayabilir.

2. Kang'ethe EK, Jones SJ, Patterson RLS. Identification of the species origin of fresh meat using an ELISA procedure. Meat Sci 1982; 7: 229-240.

3. Allsup TN. A comparison of the agar gel immuno-diffusion (AGID) and counter-immunoelectrophoresis (CIE) tests for species identification of imported red meat and offal. *Meat Sci* 1987; 20: 119-128.
4. Wintero AK, Thomsen PD, Davies W. A comparison of DNA- hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Sci* 1990; 27: 75-85.
5. Ebbehoj FK, Thomsen DP. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci* 1991; 30: 221-234.
6. Hird H, Goodier R, Hill M. Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. *Meat Sci* 2003; 65: 1117-1123.
7. Lee CJ, Chang GJ. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci Int* 1994; 67: 103-107.
8. Koh MC, Lim CH, Chua SB, Chew ST, Phang STW. Random Amplified Polymorphic DNA ( RAPD ) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Sci* 1998; 48: 275-285.
9. Zhang G, Zheng M, Zhou Z, Ouyang H, Lu Q. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci* 1999; 51: 233-236.
10. Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci* 2000; 54: 369-376.
11. Meyer R, Höfelein C, Lüthy J, Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 1995; 78: 1542-1551.
12. Martinez I, Yman MI. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res Int* 1998; 31: 459-466.
13. Saez R, Sanz Y, Toldra F. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci* 2004; 66: 659-665.
14. Arslan A, İlhak I, Calicioglu M, Karahan M. Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J Muscle Foods* 2005; 16: 37-45.
15. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 6531-6535.
16. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura YA. Quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* 1999; 51: 143-148.
17. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 7213-7218.