

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) YÖNTEMİYLE SIĞIR, KOYUN, KEÇİ VE YABANI DOMUZ ETİNİN AYIRT EDİLMESİ

İrfan İLHAK

Ali ARSLAN

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

Geliş Tarihi: 27.09.2002

Identification of Cattle, Sheep, Goat and Wild Pig Meats by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique

Summary

Development of methods for determining the species of origin in fresh and processed meat product that are simpler, faster and more accurate has become a necessity due to difficulties and some disadvantages of the existing methods used for this purpose (anatomical differences, sensory analysis, chemical properties of fat tissue, histological differences, protein based-tests, serological tests). Polymerase Chain Reaction (PCR) is one of the most significant developments occurate in molecular biology in recent years. This technique enables amplification of DNA in vitro in a short period of time facilitating determination of species of plant, bacteria or animals.

In the present study, a PCR-based Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was used a 10-base primer (CGCCCTGGTC). Origin of meats from cattle, sheep, goat and wild swine was determined accurately by this method using a PCR procedure of 45 cycles, each of which was programmed as 1 min at 94°C, 1 min at 37°C and 2 min at 72°C.

Key Words: RAPD, meat species, identification

Özet

Et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerde (anatomik farklılıklar, duyu analizler, doku yağlarının kimyasal özellikleri, histolojik farklılıklar, proteine dayalı testler ve serolojik testler) karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle doğru sonuç veren, basit ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi zorunluluk arz etmektedir. Son yıllarda moleküler biyolojide meydana gelen hızlı gelişmeler, özellikle DNA'nın in vitro olarak kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) yönteminin geliştirilmesiyle bitki, bakteri ve hayvan türlerinin orijini kesin olarak saptanmaktadır.

Bu çalışmada, PZR tabanlı Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yöntemiyle CGCCCTGGTC dizilimine sahip 10 bazlık primer kullanılmıştır. PZR işlemi 94°C'de 1 dakika, 37°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika olmak üzere toplam 45 siklusta gerçekleştirilerek sığır, koyun, keçi ve yabani domuz eti ayırt edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: RAPD, et türleri, ayırımı

Giriş

Et biyolojik değeri, vitaminler, fosfor ve demir bakımından insan beslenmesinde ön sırada yer alan bir besin maddesidir (9,12,13). 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 (2).

Toplumun tüketmediği hayvan etleri veya ürünlerinin tüketime sunulmasıyla aşağıdaki sorunlar gündeme gelmektedir (2,14).

- Bu etler, kaliteli ve eti tüketilen hayvan etleri adı altında satışa sunulurken tüketici aldatılmaktadır.
- Din ve etik düşünceler esas alınmadan değişik tür hayvan etlerinin tüketime sunulması ve tüketicinin aldatılması.
- Bazı etler veya ürünlerinin bazı insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olması.
- Toplumun etini tüketmediği hayvanlar kaçak kesildikleri için bu etlerle çeşitli hastalıklar

yayılmakta, hatta kesimi yapan kişilere türe özgü hastalıklar bulaşmaktadır.

Et ve türlerinin ayrımında duyuşsal niteliklere, anatomik farklılıklara, kılın histolojik farklılığına, doku yağlarının özelliklerine ve etlerdeki glikojen miktarına dayanan yöntemlerin yanısıra immunolojik, elektroforetik ve hibridizasyon yöntemleri de kullanılmaktadır (3,4,7).

Kong'ethe ve Ganthuma (4), ısıya dayanıklı kas antijenleri için antiserum kullanarak otoklavlanmış etlerde tür ayrımını tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar bu yöntemde bazı kross reaksiyonların olduğunu belirtmişlerdir.

Yarışmalı ve indirek ELISA teknikleriyle çiğ ve tütülenmiş etlerde tür tespitinin mümkün olabileceği fakat pişirilmiş et ürünlerinde bu yöntemlerin duyarlılıklarının azaldığı ve 115°C'nin üzerinde ısı işlemi görmüş etlerde sonuç alınmadığı ifade edilmiştir (14). Yine türlere özgü protein izolasyonundaki güçlükler ELISA ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat, poliakrilamid jel elektroforez)'in yaygın olarak kullanılmasına engel teşkil etmektedir (7).

Çiğ etlerde tür ayrımı, elektroforetik metotla yapılabilmektedir, pratikte bu metotun kullanılması ucuz ve uygulaması kolaydır (3). Fakat yüksek ısı işlemi uygulanmış et türlerinin ayırt edilmesinde kesin sonuç vermediği belirtilmiştir (19).

İzoelektroforesing hızlı ve ucuz bir yöntem olup bu yöntemde birbirleriyle yakın türlerin içerdikleri protein kompozisyonundaki farklılıkların (örneğin, koyun ve keçinin kas proteinleri arasındaki fark) bilinmesi gerekir. Ayrıca bu yöntemde serum ve beyin proteinleri ile elektroforez yapıldığında, aynı tür içinde ayrı bireylerde de farklılıkların olabileceği bildirilmiştir (15).

Elektroforetik tekniklerin kullanımında, laboratuvarında bütün hayvan türlerine ait referans protein veya enzim bulundurulması zorunluluğu, birden fazla ve %2'den düşük düzeyde et karıştırılmış örneklerde uygulanamaması, et ekstraktının hazırlanmasının güç olması, hızlı olmaması ve aynı hayvan türünün değişik kaslarında farklı elektroferogramların çıkması gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmiştir (14).

DNA hibridizasyon yönteminde, etlerin içerdikleri DNA esas alındığı için immunolojik ve elektroforetik yöntemlerden çok daha duyarlıdır (7,8). Bu yöntem çiğ et ve et ürünlerinde olduğu kadar, 120°C'de 10 dakika ısı işlemi uygulanmış et ve et ürünlerinde de türlerin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (7). Ancak hibridizasyon teknikleriyle, genetik olarak birbirine yakın, örneğin birbirine

karıştırılmış sığır ve bufalo etlerinin tespit edilmesi için kullanılan problemlerin spesifitesiyle ilgili olarak bazı problemlerin ortaya çıktığı (7,20), aynı zamanda bu tekniğin çok pahalı, karmaşık ve zaman alıcı olduğu ileri sürülmüştür (18,19).

Bu yöntemlerde karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi için doğru sonuç veren, basit ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (18).

Moleküler biyolojide son yıllarda kaydedilen hızlı gelişmeler, özellikle DNA'nın in vitro olarak çok kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (Polymerase Chain Reaction=PCR) geliştirilmesi bitki, bakteri ve hayvan türlerinin orijininin tespit edilmesinde büyük kolaylık sağlamış ve başarıyla kullanılmıştır (5,6,16,21). DNA iplikçikleri, dört temel bazın (Adenin, Timin, Guanin, Sitozin) değişik sırada yan yana ve karşılıklı dizilmesinden oluşur, bunlar canlılar için çok önemli olan genetik bilgileri taşırlar ve bu bilgiler bazların diziliş sırası ile yakından ilgilidir. Aynı türün DNA kompozisyonu birbirinin aynıdır, sabittir ve değişmez. Farklı türlerin DNA'ları birbirine uymaz. Bu durum türler arasında genetik farklılıkları oluşturur (1,10). PZR tekniğinde, DNA'nın bu özelliklerinden yararlanılarak tür ayrımı yapılmaktadır. Bu amaçla PZR ile PZR tabanlı olan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleriyle et türlerinin ayrımı yapılmıştır (15,16,18,19,20,22).

RAPD, kullanılan kısa oligonükleotid primerlerin hedef DNA dizisinde birden fazla yere bağlanarak bu bölgeleri çoğaltması ve çoğaltılan segmentlerin jel elektroforezde yürütülmesi işlemidir. Jel elektroforezde oluşan DNA bantları karşılaştırılarak türlerin ayrımı yapılmaktadır. Bu yöntem bitki, bakteri ve hayvan türlerinin tespitinde başarıyla kullanılmaktadır (24).

DNA molekülleri ısı işlem, tütüleme, salamura, kurutulmuş vb. gibi işlemlere tabi tutulmuş et ve ürünlerinde önemli veya önemsiz oranda genellikle daha küçük boyutlara parçalanırlar. Bu gibi durumlarda etin türünü tespit etmek için küçük parçalara ayrılmış DNA'yı kullanmak gerekir. Böyle durumlarda RAPD'nin spesifik PZR'ye göre daha elverişli olduğu vurgulanmıştır (17).

Yapılan literatür taramalarında konuyla ilgili yeterli sayıda çalışmaya rastlanılmamıştır. Koh ve ark. (15), RAPD yöntemiyle 10 farklı tür hayvan etini ayırt etmişlerdir. Iciar ve Ingrid (17), üç farklı 10 bazlık primer kullanarak değişik işlemlere tabi tutulmuş at, eşek, katır, domuz, Kanada geyiği, ren

geyiği, kuzu, keçi ve kanguru etlerinde tür ayrımı üzerinde çalışmışlardır. Meyer ve ark.(20), RFLP yöntemiyle et ürünlerinde tür tayinini, aynı araştırmacılar (19), Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) yöntemiyle de 121°C'de 10 dakika ısıtılmış et ürünlerinde domuz etini tespit etmişlerdir. Partis ve ark. (22), RFLP yöntemiyle 22 farklı tür hayvan etini saptamışlardır.

Yine PZR ile 80, 100 ve 120°C'de 30 dakika ısıtılmış işlem uygulanmış kanatlı etlerinde (11), 100 ve 120°C'de 30 dakika ısıtılmış işlem uygulanmış sığır, domuz, koyun, keçi, tavuk ve at etlerinde tür tayini yapılmıştır (18).

Bu çalışma, RAPD olarak bilinen rastgele çoğaltılmış DNA yöntemi ile sığır, koyun, keçi ve yabani domuz etinde tür ayrımını tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan koyun, keçi ve sığır etleri Elazığ Günet mezbahanesinden; yabani domuz eti ise Elazığ ili Palu ilçesinde avcılar tarafından vurulan yabani domuzdan sağlanarak DNA ekstraksiyonu için -20°C'de muhafaza edilmiştir. Yabani domuz etinin seçilmesinin nedeni, bölgede son yıllarda sayılarının artması ve etlerinin zaman zaman pazara sunulmasına dair duyuların alınmasından kaynaklanmaktadır.

DNA Ekstraksiyonu

Et örneklerinden Koh ve ark. (15)'nin bildirdiği ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek DNA izole edildi. Örneklerden yaklaşık 1 g alınarak 15 ml'lik polypropilen tüplere konuldu ve üzerine 4 ml TNES solusyonu (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, %0.2 SDS) eklenerek homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 750 µl alınarak 1.5 ml'lik ayrı bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 10 µl proteinaz K (200 mg/ml) ve 50 µl %10 SDS ilave edilerek kuvvetlice çalkalandı ve 56°C'ye ayarlı çalkalamalı benmaride 1 gece bekletildi. Daha sonra süspansiyona 6 M NaCl'den 250 µl ilave edilerek 11.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst sıvıdan 500 µl ayrı bir eppendorf tüpüne aktararak üzerine 300 µl fenol=kloroform=izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı ve 12.000 rpm'de 12 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan 400 µl alınarak üzerine 400 µl kloroform eklendi, karıştırma işleminden sonra tekrar santrifüj edildi. Üst sıvıdan 300 µl ayrı bir eppendorf tüpüne alındı üzerine -20°C'lik absolut ethanoldan 300 µl ve 30 µl sodyum asetat ilave edilerek vortekslenildi, DNA'nın çökmesi için 2 saat -80°C'de bekletildi. 13.000

rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alındı. Tortunun üzerine 300 µl %70'lik alkol eklendi ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonra alkol boşaltılarak, tortunun kuruması için tüpün ağzı 30 dakika açık bekletildi. Dipte kalan kuru tortu yeteri miktarda steril distile su ile sulandırılarak PZR için hedef DNA olarak kullanıldı.

PZR

PZR işlemi, touchdown thermocycler (Hybaid, Middlesex, England) cihazı ile yapıldı. Toplam hacmi 50 µl olacak şekilde eppendorf tüpüne 5 µl 10xPCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, %0.1 Triton®X-100), 5 µl 25 mM MgCl₂, 250 µM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP), 2 U Tag DNA polimeraz (Promega, Madison, USA), 1 µM primer ve 5 µl hedef DNA konuldu. Çalışmada CGCCCTGGTC (Integrated DNA Technologies, Inc.) dizilişine sahip 10 bazlık primer kullanıldı (15). Hazırlanan eppendorf tüpleri thermocycler cihazına yerleştirilip, 95°C'de 5 dakika denaturasyonu müteakip sırasıyla 94°C'de 1 dakika, 37°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika bekletilerek toplam 45 siklusta PZR işlemi gerçekleştirildi.

Çoğaltılan DNA segmentleri %1.5' lik agaroz jele (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.

Bulgular

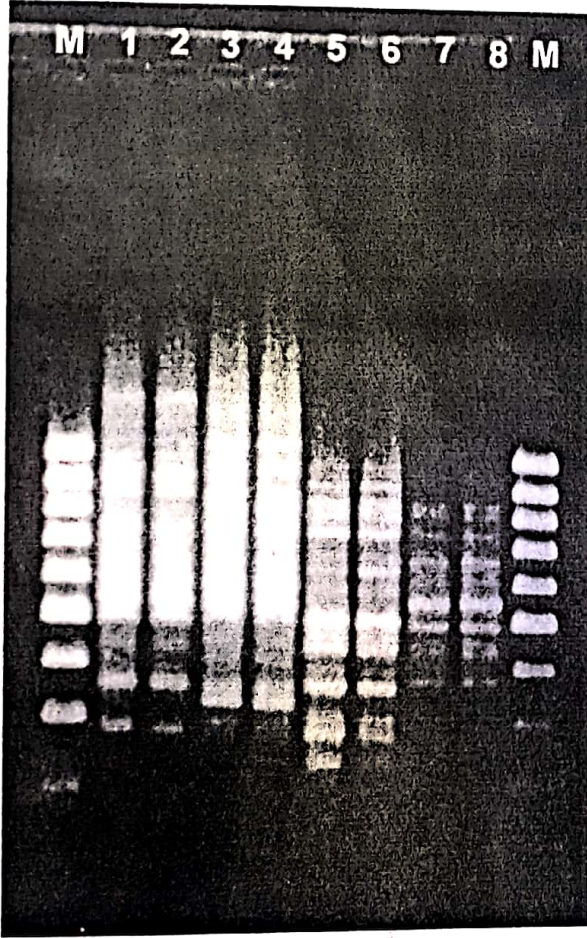
10 bazlık oligonükleotid primer kullanılarak elde edilen bantlar birbirleriyle karşılaştırıldığında sığır, koyun, keçi ve yabani domuz eti arasındaki RAPD profillerinin birbirlerinden farklı olduğu ve ayırt edilebildiği görülmüştür (Şekil 1).

Tartışma

Bu çalışmada, 10 bazlık primer (CGCCCTGGTC) ve tek bir PZR programı kullanılarak sığır, koyun, keçi ve yabani domuz eti ayırt edilmiştir (Şekil 1).

RAPD yönteminde kullanılan primere göre, gerek tür içinde gerekse türler arasında farklı bantlar elde edileceği için bu yöntemde çok çeşitli sonuçlar alınmaktadır (15). Farklılık primerdeki baz diziliminden kaynaklanır. Değişik baz dizilişleriyle (primerler) hedef DNA'nın değişik kısımları çoğaltılarak tamamen farklı RAPD profil sonuçları alındığı belirtilmiştir (15,25). Her hayvan türünde ayrı bir primer kullanılması halinde farklı sonuçlar alınmaktadır. Bu nedenle kullanılacak primer, orijini

saptanacak etlerde sonuç verebilecek baz dizilimine sahip olmalı ve bütün hayvan türlerinde de aynı primer kullanılmalıdır (15). Kullanılan ortak primer ile ayırt edilmek istenen hayvan türlerinin genetik farklılıkları rahatlıkla ortaya konulmaktadır.



Şekil 1. Et türlerinin jel elektroforezdeki RAPD sonuçları (M-marker, 1-2 keçi, 3-4 koyun, 5-6 yabani domuz, 7-8 sığır)

Elde edilecek DNA bantlarının sayısı kullanılacak primere göre değişir. Hatta kullanılan bazı

Kaynaklar

1. Arda M. Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No: 3, Ankara, 1995.
2. Arslan A, Kök F. Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Teksiri No: 46. Elazığ, 2000.
3. Buntjer JB, Lenstra JA. Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 1998; 21: 121-127.
4. Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T, and Kato S. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. Meat Science 1990; 27: 119-128.
5. Colombo F, Marchisio E, Pizzini A, and Cantoni C. Identification of the goose species (Anser anser) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. Meat Science 2002; 61: 291-294.
6. Çetinkaya B. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temel prensipler. FÜ Sağlık Bil Derg 1998; 12: 149-156.

primerlerle hiç bir DNA bandı elde edilmeyebilir. Türlerin tespitinde daha net bir sonuç alabilmek için az miktarda veya tek bir DNA bandı oluşturan primerlerin kullanılması önerilmektedir (17). Nitekim, Koh ve ark.(15), RAPD yöntemiyle hayvan türlerinin ayırımı üzerine yaptıkları çalışmada, 80 farklı 10 bazlık oligonükleotid primer kullanarak en uygun primeri bulmaya çalışmışlardır. Çalışma neticesinde bazı primerlerin RAPD yöntemi için uygun olmadığı ortaya çıkmıştır. Aynı araştırmacılar (15), CGCCCTGGTC baz dizilimine sahip primer ile yabani domuz, evcil domuz, at, bufalo, sığır, geyik, köpek, kedi, tavşan ve kanguru etini ayırt etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da aynı primerin sığır ve yabani domuzla ilaveten koyun ve keçi etinin ayırt edilmesinde de kullanılacağı ortaya konulmuştur.

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. Ayrıca türlerin DNA dizilişlerinin bilinmesine de gerek yoktur. Bu avantajlar sayesinde RAPD yöntemiyle et türlerinin tespiti daha kısa sürede ve daha ucuz olarak yapılmaktadır. Dezavantajı ise, karışım halindeki farklı tür hayvan etlerinin orijinlerinin saptanamamasıdır (17,18).

Sağlık, etik ve ekonomik nedenlerden dolayı et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Et türlerinin orijininin tespit edilmesinde kullanılan diğer yöntemlerin uzun zaman alması, güvenilir olmaması veya duyarlılıklarının az olması, gıda laboratuvarları için çok önemli bir sorun oluşturmuştur.

Sonuç olarak, PZR tabanlı RAPD yöntemiyle CGCCCTGGTC baz dizilişine sahip 10 bazlık primer kullanılarak sığır, koyun, keçi ve yabani domuz eti kesin olarak, kısa zamanda ve kolay bir şekilde ayırt edilmiştir.

7. Ebbehøj FK, Thomsen DP. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science* 1991; 30: 221-234.
8. Ebbehøj FK, Thomsen DP. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Science* 1991; 30: 359-366.
9. Gökalp HY, Kaya M, Zorba Ö. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Ziraat Fakültesi Yayın No.320. Ders Serisi No.70. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi. Erzurum,1994.
10. Gözükar EM. Biyokimya. 1. baskı. Ankara. Ofset Repromat Ltd Şti, 1989.
11. Hopwood JA, Fairbrother SK, Lockley KA, and Bardsley GR. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science* 1999; 53: 227-231.
12. İnal T. Besin Hijyeni. İstanbul. Final Ofset, 1992.
13. İnal T. Kesim Hayvanı ve Et Muayenesi. İzmir. Saray Kitapevleri, 1995.
14. Kamber U. Fermente Türk Sucuklarında Et Orjininin ELİSA ile Belirlenmesi. (Doktora Tezi) Ankara. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
15. Koh MC, Lim CH, Chua SB, Chew ST, and Phang STW. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science* 1998; 48: 275-285.
16. Lee CJ, Chang GJ. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Science International* 1994; 67: 103-107.
17. Iciar M, and Ingrid MY. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International* 1998; 31: 459-466.
18. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, and Shinmura YA. Quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 1999; 51: 143-148.
19. Rolf M, Urs C, and Jürg L. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International* 1994; 77: 617- 622.
20. Rolf M, Christiane H, Jürg L, and Urs C. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 1995; 78: 1542-1551.
21. Rolf M, Florence C, Philipp H, and Jürg L. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch* 1996; 203: 339-344.
22. Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, and Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 2000; 54: 369-376.
23. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
24. Welsh J, and McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-7218.
25. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.