T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞANLIURFA İLİ'NDE TÜKETİME SUNULAN SAKATATLARDA MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ORİJİN TESPİTİ

Özlem DURĞUN

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞANLIURFA İLİ'NDE TÜKETİME SUNULAN SAKATATLARDA MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ORİJİN TESPİTİ

Özlem DURĞUN

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Dr. Öğr. Üyesi Selahattin KİRAZ danışmanlığında, Özlem DURĞUN'un hazırladığı ''**Şanlıurfa İli'nde Tüketime Sunulan Sakatatlarda Moleküler Teknikler ile Orijin Tespiti**" konulu bu çalışma 12/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Selahattin KİRAZ …….

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hasan KOYUN …….

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gonca ÖZMEN ÖZBAKIR …….

Bu Tezin Zootekni Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 17181

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
3. MATERYAL ve YÖNTEM 22
3.1. Materyal 22
3.2. Moleküler Çalışmalar 22
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu 22
3.2.2. DNA agaroz jel elektroforezi 23
3.3. Primer tasarımı 24
3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 28
3.5. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) 29
3.5.1. Restriksiyon kesim haritasının oluşturulması 29
3.5.2. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi 32
3.5.3.RFLP için agaroz jel elektroforezi 33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 34
4.1. Moleküler Analiz Sonuçları 34
4.1.1. DNA izolasyonu 34
4.1.2. PCR sonuçları 36
4.1.3. PCR-RFLP sonuçları 41
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 51

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİ'NDE TÜKETİME SUNULAN SAKATATLARDA MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ORİJİN TESPİTİ

Özlem DURĞUN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Selahattin KİRAZ
Yıl: 2019, Sayfa: 51

Bu çalışmada; Şanlıurfa ili'nde yaygın olarak tüketime sunulan ve farklı işletmelerden toplanan sakatat (ciğer, yürek, dalak) örneklerinde, PCR-RFLP metodu ile orijin tespiti yapılmıştır. Şanlıurfa ilinde bulunan 36 işletmeden rasgele toplanan sakatat örneklerinden DNA izole edilmiştir. Mitokondriyal 12S ribozomal RNA ve CYTB gen bölgeleri için primer çiftleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primer çiftleriyle, koyunlarda 916 bç, sığırlarda 371 bç, tavuk ve hindide 419 bç'lik bölgeler çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile kesilmiştir. Koyunlarda (12S rRNA geni), çoğaltılan 916 bç'lik bölge *Hae*III enzimi ile 805. baz noktasından kesildiğinde 805 ve 111 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Sığırlarda (CYTB geni), çoğaltılan 371 bç'lik bölge *Hae*III enzimi ile 243. baz noktasından kesildiğinde 243 bç ve 128 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Böylece, sakatatlardan 20 adet ciğer örneğinde 12 adet koyun, 7 adet sığır türü tespit edilmiştir. Geriye kalan 1 adet ciğer örneğinde ise koyun, sığır, hindi ve tavuk türleri tespit edilmemiştir. Yürek örneklerinde (8 adet); 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılmıştır. Dalak örneklerinde (8 adet) ise 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılabilmiştir. Bununla birlikte tüm sakatatlarda tavuk ve hindi türü tespit edilmemiştir. Muhtemelen belirlenemeyen türün moleküler tekniklerden kaynaklandığı söylenebilir. Sonuç olarak, son zamanlarda yaygın bir şekilde görülen gıda tağşişine yönelik girişimlerde, tüketici haklarının ve sağlığının korunması, haksız rekabetin önlenmesi gibi konularda sakatatlarda orijin tespitinin yapılması, dolayısıyla bu çalışmalar kapsamında özellikle kolay, ucuz, ekonomik ve hızlı olmasından dolayı moleküler yöntemlerin kullanılmasının yararlı olabileceği söylenebilir. Bununla beraber et ve et ürünlerinin yoğun olarak tüketildiği bölgelerde gıda güvenliği açısından tüketici hakları bakımından gıda tağşişine yönelik test ve kontrol birimlerinin oluşturulması tüketici hakları ve gıda güvenliği açısından yararlı olacağı söylenebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Orijin tespiti, mtDNA, 12S rRNA, CYTB geni, PCR-RFLP

ABSTRACT

MSc Thesis

Özlem DURĞUN

Harran University
DETERMINATION OF ORIGIN WITH MOLECULAR TECHNIQUES IN OFFALS PRESENTED TO CONSUMER IN ŞANLIURFA

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Selahattin KİRAZ
Year: 2019, Page: 51

In this study; origin has been determined by means of PCR-RFLP method in samples of offal (liver, ticker, spleen) collected from different enterprises in Şanlıurfa province. DNA has been isolated offal samples collected from different 36 enterprises in Şanlıurfa province. Mitochondrial 12S has been designed as primer pairs for ribosomal RNA (12S rRNA) and CYTB genes. 916 bp in sheep, 371 bp in cattle, 419 bp in chicken and turkey have been replicated with the designed primer pairs. PCR products were then cut with the *Hae*III enzyme. The 805 and 111 bp fragments were obtained when the amplified 916 bp region got digested with *Hae*III in sheep genome (12S rRNA gene). Similarly, the 243 bp and 128 bp fragments were obtained when the 371 bp region of cattle gene (CYTB) was cut with *Hae*III. Thus, twelve sheep and seven cattle samples were spotted out of 20 liver samples. There were not any PCR amplifications detected in sheep, cattle, turkey and chicken species in the remaining one liver sample although there were detections in one sheep and seven cattle in the heart samples (8 pieces). There was also detected in one sheep and seven cattle species in spleen samples (8 pieces). However, there were no any PCR yields in chicken and turkey species in all offal. It could be probably said that the unspecified species were resulted from molecular techniques. As a result, it could be said that determination of the origin of the offal, as for the protection of consumer rights and health and prevention of unfair competition, use of molecular methods might be beneficial within the scope of the these kinds of researches for recent adulterated food and processing. Since, it is easy to apply, cheap to develop, and fast to get results. In addition to all, it could be said that it is beneficial to establish test and control units for food adulteration in terms of food safety and consumer rights in the areas where meat and meat products are heavily consumed.

KEY WORDS: Origin detection, mtDNA, 12S rRNA, CYTB gene, PCR-RFLP

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması ve devam ettirilmesi aşamalarında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım olan hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selahattin KİRAZ' a çok teşekkür ederim. Çalışmalar yaptığımız zamanlarda ve bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayfer BOZKURT KİRAZ' a teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışma esnasında bana yardımcı olan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda yardımlarını esirgemeyen ve sabır göstermeye çalışan aileme çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca bu çalışmaya maddi destek sağlayan HÜBAK'a, teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Şanlıurfa yöresi isotu ve çiğköftesi 5
Şekil 1.2. Ciğer kebabı ve patlıcan kebabı 5
Şekil 3.1. Tez çalışmaları için Blast uygulamaları 25
Şekil 3.2. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Ovis aries*, 12S rRNA) 30
Şekil 3.3. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Bous taurus*, CYTB) 30
Şekil 3.4. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Meleagris gallopavo*, 12S rRNA) 31
Şekil 3.5. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Gallus gallus*, 12S rRNA) 31
Şekil 4.1. Yürek DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 01-08 nolu örnekler) 34
Şekil 4.2. Dalak DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 09-16 nolu örnekler)..... 35
Şekil 4.3. Ciğer DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 17-26 nolu örnekler) 35
Şekil 4.4. Ciğer DNA jel görüntüsü devamı (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 27-36 nolu örnekler) 36
Şekil 4.5. Yürek örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü 37
Şekil 4.6. Yürek örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 02-08 nolu örnekler) 37
Şekil 4.7. Dalak örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, Fermatas S0357; 09 nolu örnek). 38
Şekil 4.8. Dalak örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) CYTB PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357;10-16 nolu örnekler) 38
Şekil 4.9. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 17-24 nolu örnekler)..... 39
Şekil 4.10. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü devamı (M: Ladder 100 bp, Fermatas S0357; 25-26-28 nolu örnekler)..... 39
Şekil 4.11. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü devamı (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 36 nolu örnek)..... 40
Şekil 4.12. Ciğer örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 27, 29, 30, 31 nolu örnekler..... 40
Şekil 4.13. Ciğer örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü devamı 41
Şekil 4.14. Yürek örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü (M: Ladder 50 bp, Fermatas S0357;*Hae*III) (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 32, 33,34 nolu örnekler) ..... .42
Şekil 4.15. Dalak örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü (M: Ladder 50 bp, FermatasS0357;*Hae*III)..... 42
Şekil 4. 16. Ciğer örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü (M: Ladder bp, FermatasS0357;*Hae*III)..... 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. Türlere ait referans dizi erişim kodları 26
Çizelge 3. 2. *Ovis aries* 12S rRNA geni: 958 bç, (PCR ürünü:916 bç) 26
Çizelge 3. 3. *Bos taurus* CYTB geni: 1140bç, (PCR ürünü: 371 bç) 26
Çizelge 3. 4. *Meleagris gallopavo* (1.140 bç) ve *Gallus gallus* (973 bç) 12S rRNA geni (PCR ürünü:419 bç) 27
Çizelge 3. 5. Tasarlanan primer çiftleri 27
Çizelge 3. 6. PCR karışımı 28
Çizelge 3. 7. 12S rRNA PCR amplifikasyon şartları 28
Çizelge 3. 8. CYTB PCR amplifikasyon şartları 28
Çizelge 3. 9. 12S rRNA ve CYTB gen bölgelerinde kullanılan enzimler, tanıma bölgeleri ve beklenen fragment boyları 32
Çizelge 3. 10. PCR-RFLP karışımı 32

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
bp	Baz Çifti
C	Sitozin
CYTB	Sitokrom b geni
12S rRNA	12S ribozomal RNA geni
dH2O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
dNTP	Deosinükleotid Trifosfat
EDTA	Ethylendinitrilotetrasetat
Et-Br	Etidium Bromür
G	Guanin
g	Gram
G-C	Guanin-Sitozin
HCL	Hidroklorik Asit
Hd	Haplotip Farklılğı
HG	Haplogrup
K2P	Kimura 2 Parametre Model
kb	Kilobaz
Lt	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mmol	Mikromol
NaCl	Sodyum Klorür
O	Ovis
pmol	Pikomol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
T	Timin
TBE	Tris Borik Asit Edta
TE	Tris Edta
Tm	Erime Sıcaklığı
U	Ünite
ug	Mikrogram
ul	Mikrolite
UV	Ultraviyole
V	Volt
W	Ağırlık

1. GİRİŞ

İnsanoğlu yaşamı boyunca sağlıklı ve refah içerisinde yaşamayı ön planda tutmuştur. İnsan refahının ilk koşulu insan vücudunun tüm ihtiyaçlarına cevap veren sağlıklı, dengeli ve aynı zamanda kaliteli beslenmedir. Beslenme içerisinde et ve et ürünleri önemli bir yere sahiptir (Göğüş, 1986).

Et; içerdiği yüksek protein oranı, vitaminler ve mineral maddeler bakımından insan beslenmesinde bitkisel kökenli gıdalara nazaran, önemli bir gıda maddesidir. Ayrıca, doyuruculuğu ve içerdiği aroma maddeleri sebebiyle de toplumun büyük bir kesimi tarafından sevilerek tüketilmektedir (Büyükünal ve Kahraman, 2004).

Günümüzde ülkelerin gelişmişlik düzeyleri kişi başına tüketilen hayvansal protein miktarları ve et tüketimi ile de değerlendirilmektedir. Türkiye yıllardır dünyada gıda üretimi yönünden kendi kendine yeten birkaç ülkeden biri olarak gösterilmiştir; fakat dengeli ve yeterli beslenme açısından olaya yaklaşıldığında özellikle hayvansal gıdalar bakımından, yeterli olmadığı belirtilmiştir (Büyükünal ve Kahraman, 2004).

OECD verilerine göre; Dünya geneline bakıldığında Türkiye sığır eti tüketiminde %1.4, koyun eti tüketiminde %2.54, kanatlı eti tüketiminde %1.4'lük bir paya sahiptir. Türkiye'de 945 bin ton sığır eti, 369 bin koyun eti ve 1.6 milyon ton kanatlı eti olmak üzere toplamda 2.9 milyon et tüketilmektedir. Bu değer yıllar ile doğrusal bir artış göstermektedir. Ülkemiz et tüketiminde büyük bir payı %55 ile tavuk eti, ardından %32 ile sığır eti yer almaktadır (OECD, 2016).

Türkiye'de son yıllarda sakatat tüketiminde artış görülmektedir. Genel olarak sakatatlar vitamin A, B1, B2, B2, B6, B12, niasin ve sodyum, potasyum, fosfor, demir, selenyum gibi birçok vitamin ve mineral açısından oldukça zengin içeriğe sahip olmaları, lezzetli ve aromatik olmaları kırmızı ete oranla daha az yağ içermeleri ve enerjilerinin daha düşük olması ve yine kırmızı ve beyaz ete oranla daha uygun

fiyatlı olmaları tercih sebebi olmaktadır. Türkiye'de genellikle en çok tercih edilen sakatat türleri sırasıyla; ciğer, yürek, dalak, işkembe, kokoreç, kelle-paça, şırdan ve paçadır (Anonim, 2018).

Tağşiş; gıda ürünlerinde ucuz maliyetli katkı maddeleriyle, orijini ve türü bilinmeyen ürünlerle tüketiciyi aldatmaya yönelik yapılan girişimlerdir. Gıda ürünlerinde tağşiş birçok farklı şekilde yapılabilmektedir. Bunlara; gıda maddesinde olması gereken miktardan daha fazla katkı maddesi kullanılması, kaliteli ürünlerin maliyeti düşürecek şekilde daha kalitesiz ürünler ile birlikte karıştırılarak satışa sunulması, ürünün etiketi üzerinde belirtilmeyen maddelerin eklenmesi, gıdalarda boya maddeleri kullanılarak gıdanın olduğundan daha değerli gösterilmesi örnek verilebilir.

Et ve et ürünlerinin insan sağlığı bakımından önemli bir yer tutması, artan insan nüfusuna paralel olarak et ihtiyacının da artmasına sebep olmuştur. Bu durum, et fiyatlarının artmasına ve et ürünlerinde tağşiş girişimlerine zemin hazırlamıştır. Kimi üreticiler, gelir düzeyi düşük olan tüketicinin et ihtiyacını fırsat bilerek, farklı türlerden elde edilmiş farklı kalitedeki etleri karıştırıp bunu etiket üzerinde belirtmeksizin insan sağlığını, inanç ve kültür değerlerini hiçe sayarak haksız bir çıkar sağlama yoluna girmişlerdir. Tüketici hak ve sağlığını korunmak amacıyla Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne göre ürünün hazırlanmasında kullanılan kasaplık hayvan türü veya isimleri etikette belirtilmelidir. Ürünlerde kırmızı et ve beyaz etin birbiriyle karıştırılmamış olması gerekmektedir. Ayrıca ithal ürünlerde, dini inanç gereğince kullanıma uygun olmayan hayvanlardan elde edilen et ve et ürünlerinin tespit edilmesi gerekmektedir (Zekioğlu ve ark., 2014).

Özellikle et ürünlerine dayalı gıda ürünlerinde farklı et türlerinin kullanımına ilişkin hilelerin saptanabilmesi amacıyla hızlı ve güvenilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Etin kaynağını ya da herhangi bir tağşiş yapılıp yapılmadığını tespit etmek için bazı biyokimyasal metodlar (ELİSA) ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler yöntemler (RAPD-PCR, PCR-RFLP, AFLP vb.) kullanılmaktadır. Biyokimyasal metotlardan

olan ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), antikor-antijen ilişkisinden yararlanılarak, antijene spesifik bağlanabilen bir enzimin aktivitesinin incelenebildiği bir metotdur (Zekioğlu ve ark., 2014).

Son yıllarda popüler olarak kullanılan moleküler teknikler; genetik yapının tespiti, genetik haritaların hazırlanmasında ve genomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. AFLP (Amlified Fragment Length Polymorphism) Vos ve ark. (1995) tarafından geliştirilen bir tekniktir. Genomik DNA kesme enzimleri ile daha küçük parçalara bölünür. Kısa primerler tasarlanarak bu parçalardan (adapter) PCR ile ön amplifikasyon yapılır. Daha sonra, bu ön amplifkasyon ürünlerinden, uzun primer kombinasyonları tasarlanır ve tekrar PCR ile çoğaltılır. Elde edilen PCR ürünleri jelde görüntülenerek değerlendirilir (Kiraz ve ark., 2007). RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA), ise kısa oligonükteotidler (10 bp) tasarlanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile rastgele çoğaltılmış DNA fragmentleri elde edilebilen genetik analiz yöntemlerinden biridir. (Williams ve ark., 1990).

Mikrosatelitler (SSR: Simple Sequence Repeats); kısa ardışık tekrarlanan dizinler olup genomda bulunan polimorf lokuslardır. Dizi Analizi (Sekans) Teknikleri ise nükleotid baz dizilimlerinin belirlenmesinde ve DNA dizi analizleri veya sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde kullanılan bir tekniktir. Moleküler tekniklerden olan SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişimleridir.

PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) metodu ile, PCR ile çoğaltılan ilgili PCR ürünlerinin kesme enzimleri ile kesilip, kesme profili çıkartılır. Daha sonra bundan yararlanılarak da tür tespiti yapılır. Laboratuvarda fazla altyapı istemeyen kolay, ucuz ve uygulanabilen bir tekniktir.

Ökaryotik hücrelerin organeli olan mitokondriler, silindir veya küresel şeklinde, hareketli yapılardır. Hücrelerin enerji (ATP) ihtiyaçlarına bağlı olarak mitokondrilerin hücredeki sayı (2-10 adet) ve toplanma bölgeleri değişir. Ökaryotik hücrelerin nükleusunda bulunan DNA'ya (nDNA) ayrıca çok az miktarda

sitoplazmik DNA'ya da rastlanmaktadır. Bu sitoplazmik DNA'lar bitkilerin kloroplastlarında (cpDNA) ve hayvanların mitokondrilerinde (mtDNA), bulunmakta olup halkasal ve çift sarmal yapıdadır (Hiendleder ve ark., 1998).

Ökaryotik hücrede tipik bir mitokondriyal genom; protein kodlayan 13 bölge (ATPaz kompleksi 6 ve 8 altbirimleri, sitokrom c oksidaz kompleksi I, II ve III altbirimleri, NADH dehidrogenez 1, 2, 3, 4, 4L, 5 ve 6 ile CYTB), kontrol bölgesi (D-loop), 22 Trna bölgesi (60-75 bç) ve 2 ribosomal RNA (16S rRNA, 12S rRNA) bölgelerinden oluşmaktadır (Parma ve ark., 2003; Hiendleder ve ark., 1998;).

mtDNA; popülasyonların tanımlanması, popülasyonlar arasındaki gen akışı seviyelerinin tahmin edilmesi, popülasyonların biyocoğrafik dağılımlarının belirlenmesi, popülasyonların ve türlerin orijinlerinin belirlenmesi, alttür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi, anneye ait kalıtım modellerinin izlenmesi, popülasyonlar içi/arası genetik varyasyonların hesaplanması, popülasyonların genetik farklılık veya benzerliklerinden yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespiti gibi çalışmalarda moleküler belirteç (özellikle Sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgeleri) olarak kullanılmaktadır (Naderi ve ark., 2007; Meadows ve ark. 2007).

Şanlıurfa, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yer almaktadır. İnsanlık tarihinde çok önemli bir yere sahip olan Şanlıurfa, buğday tarımının ilk yapıldığı yer olarak kabul edilmektedir. Neolotik döneme ait, yerleşik hayata geçilip 12.000 yıl önce medeniyetin başlangıcı kabul edilen, 2011 yılında UNESCO tarafından Dünya Miras Geçici Listesine, 2018 yılında ise kalıcı listeye alınan Göbeklitepe, Harran Üniversitesi ve Balıklıgöl Şanlıurfa için önemli bir bölgesel potansiyele sahiptir. Uygarlık tarihinin yanı sıra mutfak kültüründe de önemli bir yere sahiptir. Urfa biberi (İsot), kebaplar (patlıcan kebabı, urfa sade vb.) çiğköfte ve özellikle sakatatlar (ciğer, yürek, dalak) Şanlıurfa gastronomi ve mutfak sanatı bakımından çok önemli bir yere sahiptir. Sakatatlar turizm potansiyeli bakımından da önemlidir. Şanlıurfa turizm potansiyeli gözetildiğinde Şanlıurfadaki turistik yerleri gezme yanında en çok sakatat (ciğer, yürek, dalak) tüketiminin tercih edildiği gözlemlenmiştir.

Yaptığımız görüşmede ; Şanlıurfa'da günlük sakatat tüketiminin yaklaşık 3 ton olduğunu ve bu sakatat türleri arasında en çok ciğer türünün tercih edildiği ayrıca Ramazan aylarında ise Şanlıurfa'da en çok rağbet gören ciğer türünün iftardan sahura kadar günlük 5-6 ton tüketildiği belirtilmiştir (kişisel görüşme Şanlıurfa Kasaplar Odası Başkanı: Abbas Tumbul). Şanlıurfa'da sakatatların sevilerek tüketilmesindeki en önemli özellik Urfa isotuyla terbiye edilmesidir.



Şekil 1.1. Şanlıurfa yöresel isotu ve çiğköftesi



Şekil 1.2. Ciğer Kebabı ve Patlıcan Kebabı

Bu çalışmada; Şanlıurfa ilinde yaygın olarak tüketime sunulan ve farklı işletmelerden toplanan sakatat (ciğer, yürek, dalak) örneklerinde, PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) metodu ile orijin tespitinin yapılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kocher ve ark. (1989), yaptıkları bu çalışmada korunmuş bölgelere yönelik standart bir primerler seti ile, memeliler, kuşlar, amfibiler, balıklar ve bazı omurgasızlar dahil olmak üzere 100'den fazla hayvan türünden mtDNA'nın homolog bölümlerini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonunu kullanmışlardır. CYTB geninin bir seğmentindeki amino asit replasmanı, memelilerde ve kuşlarda balıklardan daha hızlı olduğunu ve replasman paterni CYTB için yapısal hipoteze uyğun olduğunu belirtmişlerdir. Bu primerlerin beklenmedik genişlikte taksonomik kullanımı filogenetik ve popülasyon araştırmaları için fırsatlar sunacağı kanısına varmışlardır.

Cespedes ve ark. (1998), bu çalışmada Sitokrom *b* geninin korunmuş bir bölgesinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin restriksiyona bölgesi analizi, taban (Solea solea), Avrupa plaice (*Pleuronectes platessa*), pisi balığı (*Platichthys flesus*) ve *Greenland halibut'un* spesifik tanımlanmasında kullanılmışlardır. Bu çalışmanın bir parçası olarak özel olarak tasarlanmış bir primer ile birlikte evrensel bir primer kullanarak CYTB geninin PCR amplifikasyonu, analiz edilen tüm türlerde bir 201 bp fragment üretiğini görmüşlerdir. PCR ürünlerinin *Sau3Al, BsmAl, Rsa*l ve *Mn*/l endonükleazlarla kesimi, ve ardından kesilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi, analiz edilen her bir türün doğrudan tanımlanmasını sağlayan spesifik profiller verdiklerini belirtmişlerdir.

Matsunaga ve ark. (1999), bu çalışmada Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ürünler için hammadde olarak altı etin (sığır, domuz, tavuk, koyun, keçi ve at) tanımlanması için uygulamışlardır. Yedi primerin uygun oranlarda karıştırılmasıyla, türe özgü DNA fragmentleri sadece bir multipleks PCR ile tanımlanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Mitokondriyal CYTB geninde korunmuş bir DNA dizisi üzerinde bir ileri primer ve her bir tür için türe özgü DNA dizileri üzerinde geri primerler tasarlamışlardır. PCR primerleri, altı etten farklı uzunluktaki fragmentleri vermek üzere tasarlamışlardır. Ürünler, sırasıyla keçi, tavuk, sığır, koyun, domuz ve at

etlerinden alınan 157, 227, 274, 331, 398 ve 439 bp'lik türlere özgü DNA fragmentleri göstermişler. PCR ürünlerinin elektroforezi ile tanımlamışlardır. Sığır, domuz, tavuk, koyun ve keçi parçaları, 100 veya 120 °C'de ısıtılmış etten 30 dakika boyunca amplifiye etmişlerdir ancak at DNA fragmentleri 120 °C örneğinden tespit edememişlerdir.

Asensio'daki ve ark. (2000), bu çalışmada 12S rRNA geninin korunmuş bir bölgesinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin restriksiyon bölgesi analizi, Nil levrek (Lates niloticus), orfoz (Epinephelus guaza) ve iskorpit hanisi (Polyprion americanus) balıklarının spesifik tanımlaması için kullanmışlardır. Kas örneklerinden izole edilen DNA'nın çoğaltılması, mitokondriyal 12S rRNA geninden 436 bp'lik bir bölgeyi çevreleyen bir dizi primer kullanarak gerçekleştirmişlerdir. PCR ürünlerinin *Rsa*I ve *Sau96*I endonükleazları ile kesmişlerdir, ardından kesilmiş PCR ürünlerini agaroz jel elektroforezinde görüntülemişlerdir. Böylelikle analiz edilen her bir türün doğrudan tanımlanmasını sağlayan spesifik profiller verdiğini belirtmişlerdir.

Girish ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada etin kökeninin belirlenmesi için mitokondriyal 12S rRNA geninin PCR-RFLP yöntemi ile Sığır eti, manda eti, koyun eti ve chevon'un tür tanımlaması için PCR-RFLP uygulamışlardır. PCR amplifikasyonu, bu türlerin her birinde bir 456 bp'lik fragmentler vermiştir. Amplikonlar, *Alu*I, *Hha*I, *Apo*I ve *BspT*I kesme enzimleri ile kesilmiş ve yukarıdaki türlerin her birini tanımlayabilen ve ayırt edebilen bir model ortaya çıkarmışlardır. Bu teknik, et karışımları/etleri ile tatmin edici sonuçlar vermediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, tutarlı sonuçlar ile hem taze hem de işlenmiş et örnekleri ile tekrar gözlemişlerdir.

Günşen ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada İstanbul ve Bursa bölgesindeki farklı satış noktalarından 2004-2005 yılı içerisinde rastlantısal örnekleme yoluyla sağlanan 410 et ve et ürününü (125 sucuk, 75 salam, 65 hazır kıyma, 60 sosis, 50 sucuk hamuru, 35 köfte hamuru) ELISA tekniğiyle analiz etmişlerdir. Analiz edilen 410 örneğin hepsinde (%100) sığır eti, 85 (%20.7) tavuk eti ve 14 adedinde (%4.3) at

eti tespit etmişlerdir. İncelenen 410 örneğe ait etiket bilgilerinin, (%16.3) 67 örnek için etiket üzerinde belirtilen bilgiler ile uyumsuz olduğunu göstererek, toplam (%19.2) 79 adet örneğin hileli olduğunun sonucuna varmışlardır.

Yetim ve ark. (2006), yapmış oldukları bu çalışmada at, eşek ve domuz türlerine spesifik sırasıyla; 153 bç, 145 bç ve 227 bç uzunluğunda primerler tasarlamışlardır. Bu oligonükleotid primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda, her bir tür 0.01 ng DNA seviyesinde ve diğer türlerle çapraz reaksiyon olmaksızın tespit etmişlerdir. Sonuçta, geliştirilen PCR tekniği kullanılarak Kayseri ve Erzurum piyasasından toplanan taze ve işlenmiş toplam 40 et ürününü test etmişlerdir ve ürünlerin hiçbirinin domuz, at ve eşek türlerine ait etler içermediğini tespit etmişlerdir. Ancak haksız rekabetin önlemesi ve tüketici haklarının korunması amacıyla et ve et ürünlerinin sürekli ve düzenli bir şekilde kontrollerinin yapılması gerektiği ve dolayısıyla bu çalışma kapsamında domuz, at ve eşek türlerine ait etlerin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilen spesifik PCR tekniğinin ülkemiz gıda kontrol laboratuvarlarının bu konudaki ihtiyacını gidereceği rutin bir kontrol metodu olabileceği sonucuna varılmışlardır.

Özdemir (2006), yaptığı çalışmada, Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Anadolu Kırmızısı, Yerli Kara ve Bozırk yerli sığır ırkları mtDNA'larının, yüksek değişim hızına sahip tüm D-loop bölgesi ile korunmuş ND5 bölgesinin 1100 bç'lik kısmı PCR-RFLP, yine tüm Dloop bölgesi DNA dizi analizi metoduyla incelemeye almışlardır. 910 bazlık D-loop bölgesinde toplam 17 tanıma bölgesine sahip olan %8'lik kısmı tarayabilen RE'lerden, *Hae*III , *Hpa*II, *Alu*I, *Ava*II, *ApaI, Dra*I, enzimleri polimorfik yapı sergilediğini ve popülasyon genelinde 19 haplotip tespit etmiştir. İncelenen ND5 bölgesinde toplam 25 tanıma bölgesine sahip % 10'luk kısmı tarayabilen RE'lerden, *Bgl*II, *Alu*I, *Ssp*I ve *Hae*III enzimleri polimorfik yapı sergilemiş ve popülasyon genelinde 6 haplotip elde etmişlerdir. D-loop ve ND5 bölgesine uygulanan kümeleme analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiğini belirtmiştir. İncelenen D-loop dizilimi üzerinde 26 farklı bölgede toplamda 68 nükleotid farklılığı gözlemlemiştir. Bu gözlemlemede görülen farklılıkların 5'ini transversiyon, 47'sini transisyon, ile 16'sını insersiyon oluşturduğunu ayrıca

delesyon'a ise hiç rastlanmadığını belirtmiştir. Genetik yapı değerleri; haplotip sayısı 17, haplotip çeşitliliği 0.993, , nükleotid çeşitliliği 0,00478 ve eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması 4,275 olarak elde etmiştir. Ayrıca NCBI'de mevcut tüm D-loop ile 240 bç kısmi dizilimine sahip ırkların analize dahil edilmesi ile çeşitli ırklara ait filogenetik yapıyı ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan ırklarda popülasyonlar arası ve popülasyon içi genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Fajardo ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada Kızıl geyik (*Cervus elaphus*), adas geyiği (Dama hasarı), karaca (*Capreolus capreolus*), koyun (*Ovis aries*) sığır (*Bos taurus*) ve keçi (*Capra hircus*) türlerinden alınan etlerin tanımlanmasında PCR-RFLP tekniğini uygulanmışlardır. PCR amplifikasyonu, mitokondriyal 12S rRNA geninden yaklaşık 712 baz çiftli korunmuş bir bölgeyi çevreleyen bir dizi primer kullanmışlardır. Bu türlerin tanımlanması için *Mse*I, *Mbo*II, *Bsl* ve *Apo*I endonükleazları seçmişleridir. Amplikonlar seçilen enzimlerle kesildiğinde elde edilen kesme profilleri, mevcut çalışmada analiz edilen tüm yerli av hayvanlarının türlerini kesin olarak tanımlanmasına olanak sağladığını belirtmişlerdir.

Jong-Keun ve ark. (2007), yaptıkları bu çalışmada sığır, domuz, koyun dahil olmak üzere hayvansal et türlerinin kökeninin tanımlanması için mitokondriyal DNA (mtDNA) 12S rRNA geninde PCR-RFLP tekniğini kullanmışlardır. Keçi, at, geyik, tavuk, ördek ve hindi. PCR-RFLP tekniği kullanılarak hayvansal türlerin geninde yüksek oranda korunan bölgenin amplifikasyonu için mt 12S rRNA geninin nükleotit sekanslarına dayanarak spesifik bir primer çifti tasarlamışlardır. Et örneklerinden mt DNA izole etmişlerdir, ardından spesifik primerlerle PCR kullanılarak DNA amplifikasyonu yapmışlardır. PCR çoğaltması, bu hayvan etlerinin her birinde yaklaşık 455 bp'lik bir fragman üretmiştir. Kıvrım türlerini ayırt etmek için, PCR amplikonları, ayrı RFLP profilleri üreten, sırasıyla restriksiyon endonükleazları *Tsp*5091 ve *Mbo*I ile kesmişlerdir. *Tsp*5091 ile kesilen DNA profilleri, memeli et türlerinde ve kümes hayvanı et türlerinde *Mbo*I ile kesilen DNA profillerinin açık şekilde ayırt edilmesine izin verilmiştir. Bu nedenle, mt 12S rRNA geninin PCR-

RFLP profilleri, işlenmemiş et ürünlerinin yanı sıra çiğ etlerdeki ham maddelerin kaynağını belirlemek için çok yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

İlhak ve Arslan (2007), yaptıkları çalışmada at, kedi, köpek, sığır, koyun, keçi ve domuz etlerine ait spesifik primerler kullanarak PCR tekniği ile etlerde tür tespiti yapmışlardır. Koyun keçi ve sığır etlerinin her birine % 0.1, % 0.5, % 1, % 2.5, ve % 5 oranlarında ayrı ayrı at, kedi, köpek ve domuz etleri karşılaştırılarak tür tespiti yapmışlardır. Tür tespitinde, kedi, kopek, at, koyun, keçi, sığır ve domuza ait sırasıyla 439, 322, 274, 271, 225, 212 ve 157 bp'lik mitokondriyal DNA (mtDNA) parçalarını çoğaltmışlardır. PCR işlemini; % 5, % 2.5, % 1 ve % 0.5 oranındaki et karışımları için 30, ise % 1 oranındaki et karışımlarında ise 35 siklusta yapmışlardır. Sonuç olarak, PCR yöntemiyle hızlı kolay ve güvenilir bir şekilde bütün et karışımlarında tür tespiti yaptıklarını belirtmişlerdir. Böylece et türlerinin orijini tespit ederek halkın aldatılmasının engellenebileceği gibi toplumun tüketmediği hayvan etleri diğer tekniklere nazaran kolay, hızlı ve daha güvenilir bir şekilde saptanabileceğini belirtmişlerdir.

Ong ve ark. (2007), bu çalışmada domuz, inek ve tavuk olmak üzere üç et türü arasında ayrım yapan ve ayırt eden bir ayırıcı tanı koymak için mitokondriyal CYTB bölgesini kullanarak PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) üç kesme enzimi kullanmışlardır. DNA, çiğ domuz (*Sus scrofa domesticus*), tavuk (*Gallus gallus*) ve inek (*Bos taurus*) gibi tek bir hayvanın etini ve farklı oranlarda iki hayvan türünün karışık örneklerini içeren örneklerden ekstrakte etmişlerdir Bu tekniğin, belirli bir karışık ette 0.25 mg'lik bir bileşenden elde edilen düşük seviyeli hedef DNA'nın varlığını tespit etmede son derece güvenilir olduğu kanıtlamışlardır. CYTB bölgesini oldukça korunmuş ve sonuç olarak diyagnostik çalışmalar için iyi bir moleküler belirteç olarak ortaya çıkarmışlardır. Bu nedenle, bu teknik, gıda ürünlerindeki farklı hayvan türlerinin tanımlanması için gıda doğrulaması için uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Tanabe ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada domuz DNA'sını saptamak için bir PCR yöntemini kulanmışlardır. Yüksek hassasiyetle domuzun spesifik tespiti için domuz sitokromunu kodlayan genin tespit edilmesi için primer çifti tasarlamışlardır. Çoğaltılan DNA fragmanını (130 bp), domuz DNA'sından spesifik olarak tespit etmişlerdir. Sığır, tavuk, koyun ve at gibi diğer türlerle hiçbir amplifikasyon meydana gelmediğini gözlemlemişlerdir. Ticari gıda ürünlerinin araştırılması için geliştirilen PCR yöntemi kullanıldığında, domuz eti içeren bileşenlerde domuz DNA'sı açıkça tespit etmişlerdir. Bu yöntemle domuz eti ve sebze böreği tespit edilebileceğini kanıtlamışlardır. Bu yöntemin hızlı, spesifik ve hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Grupta ve ark. (2008), bu araştırmada Hint geyik türlerinin farklılaşması için 12S rRNA gen dizisini tanımlamak için PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) yöntemini geliştirmişlerdir. Mitokondriyal 12S rRNA geninin, lekeli geyik, domuz geyiği, havlayan geyik, sika geyiği, misk geyiği ve sambar geyiği genomik DNA'sından amplifikasyonu için üniversal primerler kullanılmışlardır.lekeli geyik, domuz geyiği ve Himalaya misk geyiğinin PCR ürünlerini klonlanlamışlardır. Hint geyik türleri arasında, mitokondriyal 12S rRNA geninde % 90'dan fazla benzerlik gözlemlemişlerdir. Yukarıdaki geyik türlerinin sekanslarını, Lasergene (DNA star Inc., Madison, WI, ABD) yardımıyla sınırlandırmışlardır. Bu geyik türlerinin PCR amplikonu, bir türe özgü RFLP paterni gösteren *Rsa*1, *Dde*1, *Bsr*1 ve *BstSF*1 endonükleazlarıyla kesme enzimlerine tabi tutmuşlardır. Bu teknikniğin, çeşitli biyomalzemeler kullanarak geyik türlerinin tanımlanması için güvenilir ve etkili bir araç sağlayacağını belirtmişlerdir.

Jonker ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada işlenmiş et ürünlerinin tanımlanması için gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirilmiş ve değerlendirmişlerdir. DNA hibridizasyonu ve gerçek zamanlı PCR kullanılarak 150'den fazla et örneğini incelemişlerdir. Sığır eti, domuz eti, at eti, koyun eti, tavuk ve hindi eti içeren test karışımlarında bu türlerin % 0.05 seviyesine kadar tanımlanması mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Döngü sayısını ayarlayarak, bu türlerin % 0.01 kadar düşük seviyelerini tespit etmek mümkün olduğunu

göstermişlerdir. Hindi eti tahlilinde saf at eti (250 ng DNA) dışında bu türler arasında çapraz reaktivite bulamamışlardır. Geyik, karaca, devekuşu, kanguru, keçi, yerli ördek, yeşilbaş, kaz, güvercin, gine tavuğu, bıldırcın ve sülün çapraz reaktivitesi de araştırmışlardır ve bu türlerin reaksiyonda 250 ng kadar yüksek olduğu bulmuşlardır. Flakon, sırasıyla tavuk ve sığır eti tayininde 125 ng geyik DNA'sından daha yüksek ve 50 ng'lık güvercin DNA'sından daha büyük miktarlarda (yanlış) pozitif sinyallere neden olmamıştır. Sonuç olarak bir karşılaştırması, DNA hibridizasyonuna kıyasla gerçek zamanlı prosedürün daha iyi bir performans gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Murugaiah ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada PCR-RFLP yöntemini kulanarak sığır, domuz, manda, bıldırcın, tavuk ve keçi türlerini tanımlamayı amaçlamışlardır. Bu türler için 359 bp'lik PCR ürünlerini CYTB geninden başarıyla elde etmişlerdir bu türleri ayırt etmek için *Alu*I, *BsaJ*I, *Rsa*I, *Mse*I ve *BstU*I kesme enzimlerini kullanmışlardır ve böylelikle türler arasındaki CYTB genindeki genetik farklılıklar PCR-RFLP ile başarıyla elde etmişlerdir.

Haunshi ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada tavuk, ördek, güvercin ve domuz türlerinin tanımlanması için PCR tekniği kullanmışlardır. Mitokondriyal dizileri kullanarak türe özgü primerler tasarlanmışlardır. Bu primer boyutlarını ördek, güvercin ve domuz için sırasıyla; 256 bp, 292 bp, 401 bp ve 835 bp olarak belirlemişlerdir. Tür spesifik PCR ürünleri, amplifiye edilen ürünün spesifitesini doğrulamak için dizilmişlerdir. Bu işaretleyiciler daha sonra sığır eti, koyun eti, domuz eti, tavşan, tavuk, ördek, hindi ve güvercin eti ile kontrol ederek çapraz amplifikasyon için test etmişlerdir. Bu çalışmada geliştirilen DNA belirteçleri, tavuk, ördek ve güvercin, taze ve pişmiş domuz eti, pişmiş ve otoklavlanmış et türlerini tanımlamaya yardımcı olacağını belirtmişlerdir. RAPD, PCR-RFLP ve tür tanımlamasının sıralama yöntemi gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında basit, ekonomik ve hızlı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (2010), bu çalışmada, yeni elde edilen 17 dizide mitokondriyal 12S rRNA gen dizisi değişimini (~440 bp) 62 cins ve 17 diziyi temsil eden 90 yayınlanmış sığır, yak, manda, keçi ve domuz dizisini analiz ederek türlere özgü

varyasyonları belirlemişlerdir. Tanımlanan türe özgü varyasyonlara dayanarak, çiğ et / doku numuneleri ve PCR-RFLP yöntemi kullanılarak türlerin doğrulanması için iki endonükleaz, (*Alu*I ve *Bfa*I) seçmişlerdir. Keçi ve domuz, *Alu*I enzimini kullanılarak tanımlamışlardır. Sığır, yak ve bufalo ise *Bfa*I enzimini kullanarak tespit etmişlerdir. Sonuçlar doğrultusunda, birkaç yak sarsıntılı ürünün yak et yerine sığır eti kullanılarak ticari sahtekarlığa neden olabileceğini göstermişlerdir.

Wang ve ark. (2010), yaptıkları bu çalışmada ekonomik açıdan önemli olan 12 türü ayırt etmek için terminal kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmini (T-RFLP) yöntem geliştirilmişlerdir. Kısmi 12S rRNA geni, çift floresan etiketli primerler ile çoğaltmışlardır. Amplifiye edilmiş fragmanları iki endonükleaz ile kesmişlerdir ve sadece etiketli primer içeren terminal kısıtlama fragmanı, kılcal elektroforez sistemi ABI3100 üzerinde tespit etmişlerdir. *A1u*I ve *Tru*9I, farklı türlerde farklı boyutlarda terminal parçaları oluşturmuştur. Domuz ve bufalo, *Alu*I enziminin 30 terminal parçası ile ayrılabileceğini, at, hindi, keçi, koyun, geyik ve sığır türlerinin ise 50 terminal parça ile ayrılabileceğini belirtmişlerdir. Köpek, tavuk, mersin balığı ve somon balığı nihayet *Alu*I enziminin 50 terminal parçası ve 30 -Term9 sindiriminin terminal parça ile ayrılabileceğini belirtmişlerdir. Sonuçların T-RFLP yönteminin hayvan türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması için potansiyel uygulanabilirliğini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Yalçın ve Alkan (2012), bu çalışmada, Adana ve Mersin piyasalarından toplanan 140 adet et ve et ürününde (45 adet kıyma, 45 adet et, 20 adet sucuk, 30 adet hamburger köfte) Uhlenhuth presipitasyon halka, ELISA ve AGID yöntemleri kullanılarak at ve domuz eti varlığını araştırmışlardır. İncelenen 140 örneğin 4'ünde at eti tespit etmişlerdir. Analizde kullanılan metotlarla aynı örnekleri at eti bakımından pozitif bulmuşlardır. Örneklerde domuz etine rastlanmadığını belirtmişlerdir. Yurt içi gıda denetiminin ve yurt dışından gelen ithal etlerin kontrol noktalarının ve kontrol edilen örnek sayısının arttırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Geng ve ark., (2012), yaptıkları çalışmada keçi, kaşmir, ve koyun yünü örneklerinin tanımlanmasında mitokondriyal 12S rRNA geninin PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) analizinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Yaklaşık 440 bp olan mitokondriyal 12S rRNA geninin spesifik fragmanları, PCR kullanılarak elde etmişlerdir. PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleazlar ile *BspT*I ve *Hinf*I, türe özgü RFLP paternleri ortaya çıkarmışlardır. Bu tekniğin karışık örneklere uygulanması, 8:1 oranında birbirinden keçi, kaşmir ve koyun yünü tanımlanabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, bu teknik, karışımın oranı 9:1'den fazla olduğunda yalnızca bir türü tespit edebileceğini belirttiler. PCR-RFLP tekniğinin, keçi kaşmir ve koyun yününün kesin tanımlanmasında potansiyel değere sahip olduğu göstermişlerdir.

Haider ve ark. (2012), bu çalışmada inek, tavuk, hindi, koyun, domuz, manda, deve ve eşeğin çiğ et örneklerinin türlerinin belirlenmesi için mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim 1 (COI) geninin bir kısmının PCR-RFLP tekniği kullanarak tespit etmeye çalışmışlar. PCR, tüm türlerde 710 bp' lik kısmı çoğaltmışlardır. Kesme Enzimleri (*Ava*II, *Hind*II, *Taq*I, *Rsa*I, *Hpa*II, *Xba*I ve *Tru*1I) kullanarak belirlemişlerdir Örnekler arasında farklı seviyelerde polimorfizm tespit edememişlerdir. Sadece *Hpa*II kesme enzimi kullanılarak ortaya çıkarılan COI varyasyonunun seviyesi, hedeflenen tüm türleri kesin olarak ayırt edebilen, kolaylıkla analiz edilebilen türlere özgü kısıtlama profilleri oluşturmak için yeterli bulmuşlardır. Moleküler düzeyde et kökeninin belirlenmesi için daha önce yayınlanan raporlarla karşılaştırıldığında, gıda kontrol laboratuvarlarında etlerin rutin tanımlanması için çok daha ucuz ve hızlı olduğunu belirtmişlerdir.

Siddappa ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada Tragulidae familyasına ait fare geyiğinin (*Moschiola indica*) mitokondriyal 12S rRNA gen sekansı, türlerin tanımlanmasında kullanımını amaçlamışlardır. Genomik DNA, saç foliküllerinden izole etmişler ve mitokondriyal 12S rRNA geni, evrensel primerler kullanılarak çoğaltmışlardır. Lasergene'deki (DNAstar Inc., Madison, WI, ABD) kesme haritalaması, fare geyiği mitokondriyal 12S rRNA gen dizisinin, *RsaI, DdeI, BsrI* ve *BstSF*I kullanılarak PCR-RFLP'deki diğer geyik türlerinden ayırt edilebildiğini

ortaya koymuşlardır. Tahmin edilen desen yardımıyla, fare geyiği çeşitli biyomateryallerden genomik DNA kullanılarak tanımlanabilir, böylece yaban hayatında adli tıpta ve türlerin korunmasında moleküler yardım sağlanabileceğini belirtmişlerdir.

Özpınar ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada İstanbul ilinin farklı ilçelerinde yer alan mağazalarda, et satış pazarlarında ve halk pazarlarında satılan et ve et ürünlerinin toplam 73 adet örneği Chipron LCD Array Analizi kullanılarak etiket üzerinde bildirilen hayvan türlerinin tespiti için analiz etmişlerdir. Sonuç olarak 39 örnek (% 53.4) yanlış etiketlendiğini göstermişlerdir. Rasgele seçilen on bir örnek Iontek Fluorion Meat Species Kit ve FDS Algılama Sistemi tarafından düzeltmişlerdir. Bu nedenle, DNA Mikroarray ve Real Time PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçların birbiriyle aynı olduğu (%100) ve et ve et ürünlerindeki hayvan türlerinin tespiti için her iki yöntemin de yaygınlaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Ulca ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada hayvansal türlerin tanımlanması için ticari olarak temin edilebilen PCR kitlerinin performans özellikleri belirlenmişlerdir. Farklı seviyelerde domuz eti içeren kıyılmış et ürünleri otantik sığır, tavuk ve hindi eti ile hazırlamışlardır. Bu et ürünleri 20 dakika 200 °C'de pişirdikten sonra ham halde analiz etmişlerdir. Hem ham hem de pişmiş etler için, PCR kiti hayvan türlerini doğru bir şekilde tanımlanabileceği ve % 0.1'in altında bir seviyede domuz ilavesini güvenilir bir şekilde tespit etmişlerdir. Salam, sosis, köfte, kuru baharatlı dana ve döner kebap gibi 42 adet işlenmiş et ürünü araştırılmıştır. Domuz eti varlığı için otuz altı örnek negatifti (% 0.1) ve dördü de domuz eti olarak doğru şekilde belirlemişlerdir. Bir sucuk örneği % 5 sığır eti DNA'sı olarak belirlenmiş ancak tespit edilmemiştir. % 100 sığır eti olarak etiketlenmiş bir köfte örneğinin tavuk içerdiğini tespit etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada sığır, manda, keçi, koyun gibi yaygın besi hayvanları türünün tanımlanması için mitokondriyal CYTB genini hedefleyen PCR-RFLP tekniği geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Sığır, manda keçi,

koyun ve domuz türlerinden yerel piyasalardan ve mezbahalardan 50 gr'lık et örnekleri aseptik koşullar altında toplanmış, buz kutusunda laboratuvara getirilip ileri bir kullanıma kadar -20 °C'de saklanmıştır. Hedeflenen bölgeler *Alu*I ve *taq*I enzimleri ile kesip jelde görüntülemişlerdir. Uygulanan bu tekniğin sığır / manda ve koyun / keçi gibi yakından ilişkili türlerin farklılaşması için yararlı bir araç olacağı sonucuna varmışlardır.

Karabasanava ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada domuzun otantik tanımlanması için oldukça spesifik bir PCR testi olduğunu açıklamışlardır. Domuzdan (*Sus scrofa*) türetilen dokuların doğru şekilde saptanması için 712 baz çiftli (bp) benzersiz bir amplikon veren, domuz mitokondriyal yer değiştirmeyi (D-loop) hedef alan yeni tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. PCR analizinin uygunluğu ham (n = 20), pişirilmiş (60, 80 ve 100 °C), otoklavlanmış (121 °C) ve mikro-fırın işlenmiş domuzda doğrulamışlardır. Eşsiz domuz spesifik PCR kullanılarak diğer türlerdeki domuzların tespiti hassasiyeti % 0.1 olarak belirlemişlerdir. Domuz DNA'sının tespit limiti (LOD) 10 pg (pik gram) olarak bulmuşlardır. Bu teknik, ham, işlenmiş ve karıştırılmış domuz eti ve ürünlerin gıda ile ilgili uyuşmazlıklarla ilgili anlaşmazlıkların veya adli tespit koşullarının doğrulanması için kullanılabilir olduğunu belirlemişlerdir.

Kitpipit ve ark. (2014), yaptıkları bu çalışmada DNA ekstraksiyonu olmaksızın doğrudan PCR - DNA amplifikasyonu ilk defa, altı yaygın olarak tüketilen 6 et türünün hızlı ve ekonomik eş zamanlı tanımlanması için başarıyla geliştirmişler ve tam olarak doğrulamışlardır. Bunu başarmak için, altı türe özgü primerler önceki raporlardan seçmişler ve yeni mitokondriyal sitokrom *b* (CYTB), sitokrom oksidaz I (COI) ve 12S rRNA geninden yeni tasarlamışlardır. Deney, 100, 119, 133, 155, 253 ve 311 PCR ürünlerini oluşturmuşlardır. Sırasıyla domuz eti, kuzu eti / koyun eti, tavuk, devekuşu eti, at eti ve sığır eti için Doğrulama, testin güçlü, hızlı, ekonomik, tekrarlanabilir, spesifik ve 12,500 mitokondriyal kopyaya (7 fg'ye eşit) kadar hassas olduğunu göstermişlerdir Yüksek oranda bozulmuş ve işlenmiş gıda örnekleri de dahil olmak üzere çeşitli çiğ et ve ürünlerle birlikte kullanılabilir olduğunu

belirlemişlerdir. Bu önerilen yöntem tüketiciler, gıda endüstrisi ve kolluk kuvvetleri için çok faydalı olacağını belirtmişlerdir.

Mane ve ark. (2014), bu çalışmayı et türlerinin kökeninin tanımlanması amacıyla yapmışlardır ve PCR-RFLP tekniğini kullanmışlardır. Mitokondriyal 16S rRNA genine dayanan kendinden tasarlanmış evrensel primer çifti, ekstrakte edilmiş sığır eti, manda eti, koyun eti, chevon ve domuz eti DNA'sından hedeflenen 497 bp DNA fragmanlarının PCR amplifikasyonu için kullanmışlardır. Hedeflenen DNA parçaları, ısıl işlem görmüş et ve et ürünlerinde bile başarılı bir şekilde yükseltebilmişlerdir. İstenen DNA fragmanları, dizilerin restriksiyon haritalarının analizi, yani *Bgl*II, *Hinc*II ve *Hinf*I'*e* dayanarak, seçilen bir karakterizasyon bandı ile sonuçlanan seçilmiş restriksiyon enzimleri ile kesmişlerdir. Oluşturulan karakteristik bantlama deseni, et ve et ürünlerinde mevcut olan et türlerinin tanımlanması veya farklılaştırılması için yeterince bilgilendirici olduğunu düşünmüşlerdir. İşlenmiş et ve et ürünlerini ısıda bile tekrarlanabilir bulmuşlardır. Ancak, sonuçları tatmin edici bulmamışlardır.

Eaqub ve ark. (2015), yaptıkları bu çalışmada ilk defa burada, tek bir test platformunda İslami gıdalarda yasaklanan beş et türünün doğru tanımlanması için bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu deneyi tarif etmişlerdir. 172, 163, 141, 129 ve 108'i çoğaltmak için mitokondriyal ND5, ATPaz 6 ve sitokrom *b* genlerini hedef alan beş çift tür spesifik primerler tasarlamışlardır. Sırasıyla kedi, köpek, domuz, maymun ve sıçan etlerinden elde edilen DNA fragmanları ile tüm PCR ürünleri, jel görüntülerinde ve elektro kromatogramlarda tanımlanmışlardır. 15 önemli ete ve balığa ve 5 bitki türüne karşı türlere özgü kontrol, çapraz tür amplifikasyonu tespit edememişlerdir. Model ve ticari köftelerdeki hedef türlerin taranması, proses gıdalarında hedef türlerin tespit edilmesine yönelik uygulamasını yansıtmışlardır. Analizleri, ham haller altında 0.01-0.02 ng DNA'yı ve köfte formülasyonunda % 1 şüpheli etleri tespit etmek üzere test etmişlerdir.

Saikia ve ark.(2015) , bu çalışmada PCR-RFLP kullanarak koyun ve keçi etlerinin ayrıştırılması için bir yöntem geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Doku örnekleri, her türün on hayvanından rastgele toplamışlardır ve mitokondriyal DNA ekstraksiyonu için kullanmışlardır. Evrensel primer kullanılarak 600 bp'lik 16S rRNA geninin PCR çoğaltılmasını yapmışlardır. RFLP çalışmaları, amplikonları, restriksiyon enzimleri kullanarak kesilmişlerdir. *Alu*I ve *Hha*I. 16S rRNA geninin amplikonları, *Hha*I tarafından 460 bp ve 140 bp fragmanlarına parçalanırken, çoğaltılmış koyun geni, her biri 360 bp ve 240 bp'lik iki fragman halinde *Alu*I enzimi ile kesilmiştir. 16S rRNA'nın ortaya çıkan bu RFLP desenin, koyun ve keçi türlerinin etini kolayca tanımlayabileceğini ve ayırt edebileceğini belirtmişlerdir.

Bo ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada sığır, domuz eti, koyun eti veya bıldırcından elde edilen et ürünlerinde tavuk, ördek ve kaz DNA'sını eş zamanlı olarak saptamak için bir multipleks PCR yöntemi geliştirmişlerdir. PCR primerleri, her bir kuş türünün mitokondriyal genlerinin dizisine dayanarak tasarlamışlardır ve amplikon boyutları sırasıyla tavuk, ördek ve kaz için 131, 283 ve 387 bpdir. Metot, sığır eti, koyun eti, domuz eti veya bıldırcından izole edilen DNA ile çapraz tepkimeye girmemiş ve 0.05 olarak hedeflenen bir hedef DNA içeriğinde üretilen ürünler içermediğini veya toplam et ağırlığının % 1'i olan bir hedef et içeriği olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, bu yöntemle 24 ticari et örneğinin taranması, altı, iki ve bir numunenin sırasıyla tavuk, ördek veya her ikisi ile kontamine olduğunu, bunun da ticari et ürünlerinde tavuk, ördek ve kaz DNA'sının eş zamanlı olarak tanımlanması için yararlı olabileceğini belirlemişlerdir.

Kiraz ve Ağar (2016), bu çalışmada İvesi koyunlarının mitokondriyal 16S ribozomal RNA gen polimorfizmi, PCR-RFLP yöntemini kullanarak çalışmışlardır. Şanlıurfa'daki İvesi koyunlarından genomik DNA izole etmişlerdir. Mitokondriyal 16S ribozomal RNA geninin bir kısmını amplifiye etmişlerdir. Amplifiye edilen fragment 1470 bp uzunluluğundadır. PCR ürünleri, *DdeI, DraI, Sau3AI, HinfI, Hae* III, kesme enzimleri ile kesmişlerdir ve bu enzimlerin kesim paternleri belirlemişlerdir. *Dde*I *Sau3A*I *ve Hinf*I kesimleri iki farklı patern gösterdiğini belirtmişlerdir (A ve B). PCR-RFLP analizi ile toplam 4 birleşik haplotip sayısı tespit

edilmiş olup, populasyonda haplotip farklılık 0.578 olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

Kim ve ark. (2016), işlenmiş et ürünlerindeki domuzların kantitatif tespiti için mitokondriyal D-loop bölgesini kullanan TaqMan gerçek zamanlı PCR testi geliştirmişlerdir. Yeni tasarlanan primerler ve prob, spesifik olmayan hayvan türleri ile herhangi bir çapraz reaktivite olmaksızın spesifik olarak domuzları güçlendirmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR testinin tespit sınırı 0.1 idi. sığır eti ve tavuk eti karışımlarında ısıl işlem görmüş domuz eti ve % 0.1 (a - a) domuz eti. Kantitatif gerçek zamanlı PCR testi, jerkies, pres jambonları, sosisler, hamburger köftesi ve biftek, ızgara kısa kaburga köftesi ve külçe gibi 22 ticari işlenmiş et ürününde domuz eti içeriğinin analiz edilmesi için uygulamışlardır. Geliştirilen gerçek zamanlı PCR yöntemi, domuz etinin etiketlerinde kullanıldığını ilan eden çeşitli işlenmiş et ürünlerinde domuz etini tespit edebilmişlerdir. Domuz eti kullanılmadığını beyan eden tüm işlenmiş et ürünleri, testte olumsuz bir sonuç göstermiştir. Bu çalışmada geliştirmiş oldukları yöntem, ticari işlenmiş et ürünlerinde domuz eti miktarının belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllük olduğunu göstermişlerdir.

Han ve ark. (2017), bu çalışmada ticari sosislerde etin kökeninin türlerini tanımlamak için mitokondriyal DNA (mtDNA) için amplifikasyon paternleri kullanılarak hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Perakende pazarlardan kırk ticari sosis satın almış ve mtDNA analizine tabi tutmuşlardır. Et kaynağı DNA'sını yükseltmek için iki mtDNA markeri kullanmışlardır. PCR koşullarını optimize etmek için, primer tavlama sıcaklıklarını belirlemek üzere PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve asgari miktarda DNA çözeltisini kontrol etmek ve çapraz reaksiyonu incelemek için gerçek zamanlı PCR yapmışlardır. Jeli üzerinde, PCR moleküllerinin, işlenmiş sosislerde et kaynağının belirlenmesinde DNA moleküllerinin yararlı olabileceğini düşündürdüğü gözlemlemişlerdir. DNA dizilerinin benzerlik araştırması, ürün etiketlerinde tarif edildiği gibi domuz, tavuk ve balıktan olduklarını göstermişlerdir. Gerçek zamanlı PCR sonuçları, PCR ürünlerinin domuz, tavuk ve işlenmiş balıketi DNA'sında 10 fg (0.01 pg) / concentl konsantrasyonlarının üzerinde gözlemlendiğini göstermişlerdir. Çapraz türlerde

anlamlı bir çoğalma bulamamışlardır. mtDNA markörlerini kullanan bu PCR bazlı moleküler yöntem, sosis üretiminde kullanılan et kaynaklarını tespit etmek ve tanımlamak için moleküler kanıt sağlayarak gıda güvenliği ve izlenebilirlik amaçları için yararlı bilgiler sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Amaral ve ark. (2017), bu çalışmada, işlenmiş et ürünlerinde domuz eti ölçümü için yeni ve çok hassas Evagreen gerçek zamanlı PCR sistemini geliştirmeyi ve doğrulamayı amaçlamışlardır. ΔCt yöntemine dayanan normalize edilmiş bir deney başarılı bir şekilde geliştirilmiş ve optimize edilmiş olup, ham ve termal olarak işlenmiş olarak sırasıyla % 0.0001 ve % 0.01 (a-a) seviyelerinde domuz etinin saptanmasına ve miktarının belirlenmesine olanak sağlamıştır. Yöntem, yeterli et hassasiyet, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik parametreleri sergileyen kör et karışımları kullanılarak etkin bir şekilde doğrulanmıştır.

Al-Kahtanive ark. (2017), yaptıkları çalışmada hem geleneksel PCR hem de gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) kullanılarak et karışımlarında domuz DNA'sı tespit etmişlerdir. Sığır eti, tavuk, deve, tavşan, keçi ve koyun eti içeren sığır eti karışımları (% 0, % 1, % 5, % 10 ve % 20) ve 75 ticari gıda ürünü, konvansiyonel ve RT-Domuz DNA'sının varlığını belirlemek için PCR tekniği kullanmışlardır. Karışımlardaki domuz DNA'sı için belirleme limitleri sırasıyla 0.22, 0.047, 0.048, 0.0000037, 0.015 ng/ul bulmuştur. Konvansiyonel PCR'den farklı olarak, domuz eti DNA konsantrasyonlarında, işlenmiş dokuz gıda örneğinde tavuk sosisleri (2), tavuklu öğle yemeği (2), hindi köfteli, yumuşak nuga ile sütlü çikolata, jöle kek ve şekerler, RT-PCR tespit edilen domuz eti DNA'sı 0.0001 ng / µl veya daha az olabileceğini belirlemişlerdir.

Gökçek ve ark. (2017), bu çalışmayı Ege Denizinde gözlemlenen bazı istiridye örnekleriyle, yerli istiridye türlerinden biri olan *Ostrea edulis* örnekleri arasındaki genetik farklılık tespitinin, RAPD-PCR tekniği yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Denizlerimizin yaygın türlerinden olan Ostrea genusundan morfolojik olarak farklı olduğu gözlemlenen ve *Crassostr*ea genusuna ait özellikler içeren istiridye bireyleriyle, yerli türden 8 adet RAPD profili kullanılarak genetik olarak

ayırt etmişlerdir. Toplamda 343 bant elde etmişlerdir. Polimorfizm oranı *Crassostrea* cinsine ait olan örneklerde daha yüksek oranda bulmuşlardır. Ele aldıkları lokuslardan 6 tanesinin ayrım gücünün yüksek çıktığını göstermişlerdir. İstilacı türe ait 11, yerli türe ait 5 olmak üzere toplamda 16 adet türe özgü diagnostik bant elde etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma materyalini Şanlıurfa ilinde bulunan 36 farklı işletmeden rasgele toplanılan ciğer, yürek ve dalak örnekleri oluşturmuştur. Örnekler özel kilitli poşetlere konularak, etiketlendirilmiştir. Daha sonra, içerisinde buz kasetlerinin de bulunduğu termos içerisinde laboratuvara ulaştırılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalar Harran Üniversitesinin Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Laboratuvara ulaştırılan doku örnekleri tüplere konulup homojenizatörden geçildikten sonra DNA izolasyonu gerçekleşene kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Dokudan DNA izolasyon kiti (Thermo, GeneJET Whole Tissu Genomic DNA Purification Mini Kit #K0781) kullanılarak DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerini görüntülemek için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır.

DNA İzolasyon protokolü:

1. Edtalı tüplerde bulunan doku örnekleri eldiven takılarak ve birbiriyle bulaşmasını önlemek maksadıyla her örnekte eldiven değiştirildi.
2. Kolon bulunduran 2 ml'lik tüplere Column preparation Solution'dan tam olarak 500 µl ilave edilerek 12000 g'de 1 dk santrifüj edildikten daha sonra alt kısımdaki döküldü.
3. Yeni bir tüp içerisine 20 µl proteinaz K, sonra 200 µl örnek ile 20 µl oranında RNase aktarıldıktan sonra 2 dk bekletildi.
4. Tüp içine Lysis Solution'dan 200 µl ilave edilerek 15 sn vorteks yapıldıktan daha sonra 55 ºC'de 10 dk inkübe edildi.

5. Bu aşamada ise tüp içine 200 µl etanol (%99) koyularak 5-10 sn vortekslenip ve içerik kolon içermekte olan tüplere döküldükten sonra 6500 g'de 1 dk santrifüj edilip daha sonra alt kısımdakiler dikkatli bir şekilde döküldü.
6. Bir sonrası aşama için tüpün içine 500 µl prewash solution ilave edilerek 6500 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt kısım yavaş bir şekilde döküldü.
7. Sonra ise tüp içine 500 µl wash solution konularak 12000 g'de 3 dk tekrar santrifüj edildi.
8. Kolonlar yeni tüplerin içine konularak 200 µl elution solution ilave edilerek 5 dk dinlendirilip ve 6500 g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Tüpün içindeki kolon atılıp alt kısımda kalan sıvıdaki DNA'nın olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde görüntülenir ve izole edilen DNA'dan moleküler çalışmalarda yararlanmak amacıyla derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.2. DNA agaroz jel elektroforezi

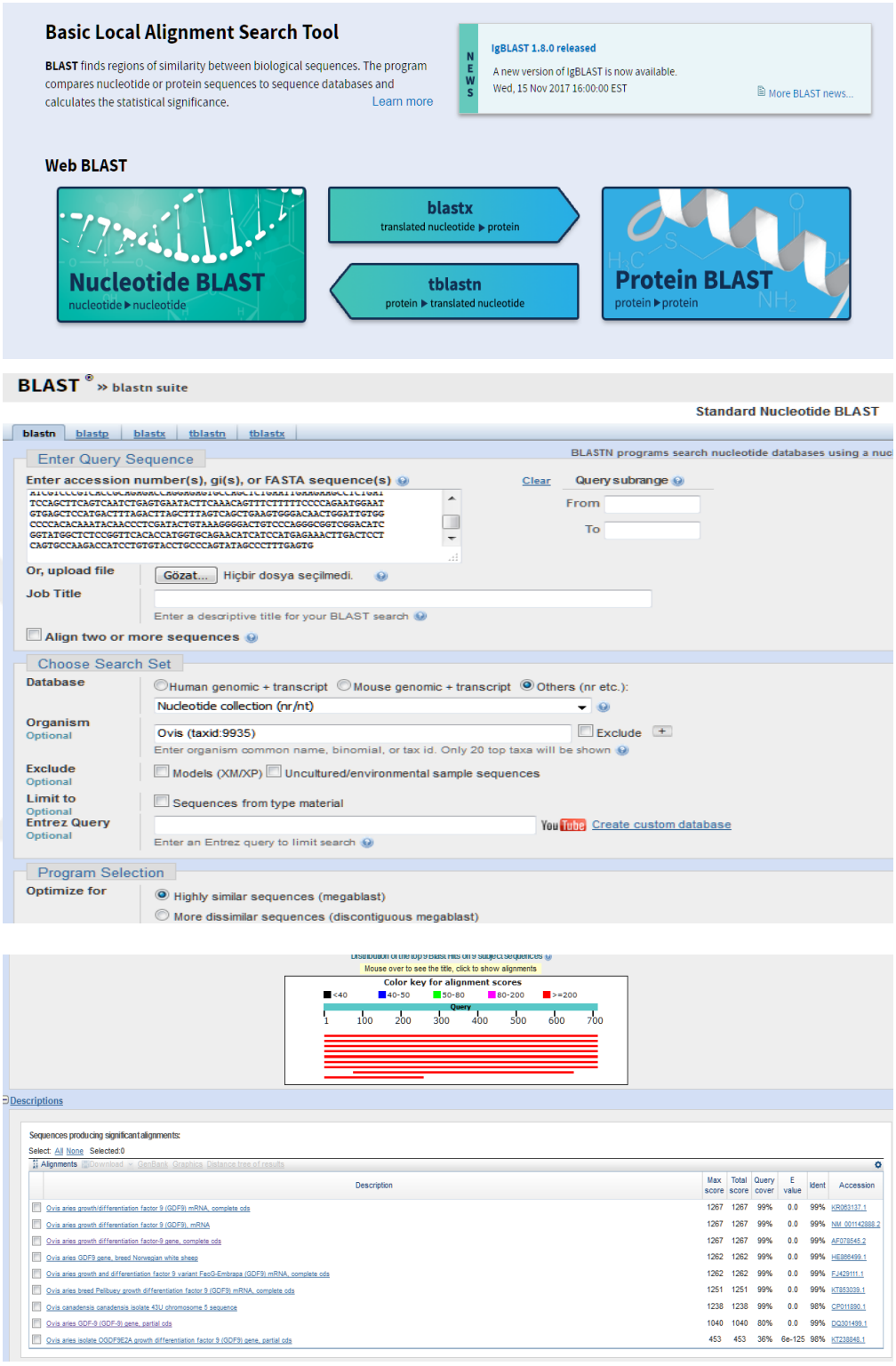
Hassas terazide 0.600 g agaroz dikkatli bir şekilde tartılıp, içerisinde 60 ml 1XTBE çözeltisi bulunan erlenmayer içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde eritilmiştir. Mikrodalga fırından çıkarılan agaroz jel soğuduktan sonra hızlı bir şekilde küvet içerisine boşaltılarak taraklar yerleştirilip jelin kalıp haline gelmesi beklenmiştir. Daha sonra ise içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankının içine küvet yerleştirilerek, tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Jel kuyularının ilk sıralarına molekül ağırlık markeri yüklenmiştir. Markerlar DNA için 1 kb ladder, PCR için ise 100 bp'lık ladder kullanıldı (Fermatas S0357). Diğer kuyulara ise 4 µl DNA örnekleri 1 µl yükleme tamponu (%40 sükroz, 100 mM ETDA, pH: 8.0, % 0.25 bromofenol mavisi) yüklenmiştir (PCR ürünleri 5 µl + 1 µl yükleme tamponu). Yüklemeden az zaman sonra güç kaynağında (Biolab), jelin bulunduğu tanka 90 V akım verilerek jeller 35-40 dk yürütülmüştür. Sonrasında jeli, etidyum bromür (0,5 g/ml) bulunan ortam içine eklenerek 10-15 dakika bekletip DNA'lar boyanmaya bırakıldı. Boyanan jel, ultraviyole ışın ile DNA'ların olup olmadıkları görüntülenebilmiş ve fotoğrafı çekilerek bilgisayar ortamında değerlendirilmiştir.

3.3. Primer Tasarımı

Koyun, tavuk ve hindi DNA örneklerinde mitokondriyal 12S rRNA, sığır DNA örneklerinde ise CYTB gen bölgelerini çoğaltmak için ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerlerin tasarlanması gerekmektedir. Bunun için; ilk olarak Gen Bankası internet portalı aracılığıla (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), evcil sığır (*Bos taurus*), evcil koyun (*Ovis aries*), evcil tavuk (*Gallus gallus*) ve evcil hindi (*Meleagris*) komple mitokondriyal genom nucleotide olarak arama yapıldı. Daha sonra bu türlerin referans dizi bilgileri (RefSeq) elde edildi.

Çizelge 1.1. Türlere ait referans dizi erişim kodları

Türler	mtDNA için referans dizi erişim kodları
Evcil Koyun (*Ovis aries*)	nc_001941
Evcil Sığır (*Bos taurus*)	nc_ 006853
Evcil Tavuk (*Gallus gallus*)	nc_001323
Evcil Hindi *(Meleagris gallopavo*)	nc_010195



Şekil 3.1. Tez çalışmaları için BLAST uygulamaları

Koyun, tavuk ve hindi türleri için 12S rRNA, sığır türü için CYTB gen bölgelerine ait primerler PCR amplifikasyonu için tasarlandı. Şu kriterler göz önünde bulundurularak primerler tasarlanmıştır: Primer uzunlukları 20-25 bç arasında olmalıdır. Erime sıcaklığı (Tm) 55-60 ºC olmalıdır. GC içeriği % 40-60 olmalıdır. Tasarlanan primer çiftlerinin Mw ağırlıkları birbirine yakın olmalıdır. Koyun, tavuk ve hindi türleri için 12S rRNA gen bölgesine ait ve sığır türü için ise CYTB gen bölgesine ait toplam gen dizileri ve çoğaltılmak istenen PCR ürünlerinin boyları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Ovis aries* 12S rRNA geni : 958 bç, (PCR ürünü:916 bç)

>NC_001941.1:69-1026 *Ovis aries* mitochondrion, complete genome

TATAGGTTTGGTCCCAGCCTTCCTGTTAACTTTCAATAGACTTATACATGCAAGCATCCACGCCCCGG
TGAGTAACGCCCTTCGAATCACACAGGACTAAAAGGAGCAGGTATCAAGCACACACTCTTGTAGCTCA
CAACGCCTTGCTTAACCACACCCCCACGGGAGACAGCAGTAACAAAAATTAAGCCATAAACGAAAGTT
TGACTAAGTCATATTGACCAGGGTTGGTAAATCTCGTGCCAGCCACCGCGGTCATACGATTGACCCAA
GCTAACAGGAGTACGGCGTAAAGCGTGTTAAAGCATCATACTAAATAGAGTTAAATTTTAATTAAACT
GTAAAAAGCCATAATTATAACAAAAATAAATGACGAAAGTAACCCTACAATAGCTGATACACCATAGC
TAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAATTATAAAAACAAA
ATTATTCGCCAGAGTACTACCGCAACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCT
AGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATAT
ACCGCCATCTTCAGCAAACCCTAAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACATAAAGACGTTA
GGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAAGAAAATTTAATACGA
AAGCCATTATGAAATTAATAGCCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAA
TCAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTAAATATGATATACTTAAACCTAT
TTACATATATCAACCACACGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGG
ATAA

Çizelge 3.3. *Bos Taurus* CYTB geni : 1140 bç ,(PCR ürünü:371 bç)

> NC_006853.1: 14514-15653 *Bos taurus* mitochondrion, complete genome

ATGACTAACATTCGAAAGTCCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAATGCATTCATCGACCTTCCAGC
CCCATCAAACATTTCATCATGATGAAATTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCTGCCTAATCCTACAAATCC
TCACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCATTCTCCTCTGTTACCCAT
ATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTT
TATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGAGGCTTATATTACGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAA
ATATTGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGTAATAGCCACAGCATTTATAGGATACGTCCTACCATGAGGA
CAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATACATCGGCACAAA
TTTAGTCGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAGCAACCCTTACCCGATTCTTCGCTTTCC
ATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCCTCCACGAAACAGGC
TCCAACAACCCAACAGGAATTTCCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTCCACCCCTACTATACCATTAA
GGACATCTTAGGGGCCCTCTTACTAATTCTAGCTCTAATACTACTAGTACTATTCGCACCCGACCTCC
TCGGAGACCCAGATAACTACACCCCAGCCAATCCACTCAACACACCCCCTCACATCAAACCCGAGTGA
TACTTCTTATTTGCATACGCAATCTTACGATCAATCCCCAACAAACTAGGAGGAGTACTAGCCCTAGC
CTTCTCTATCCTAATTCTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCCAAACAACGAAGCATAATATTCC
GACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGACCTATTGACACTCACATGAATTGGAGGA
CAACCAGTCGAACACCCATATATCACCATCGGACAACTAGCATCTGTCCTATACTTTCTCCTCATCCT
AGTGCTAATACCAACGGCCGGCACAATCGAAAACAAATTACTAAAATGAAGA

Çizelge 4.4. *Meleagris gallopavo* (1.140 bç) ve *Gallus gallus* (973 bç) 12S rRNA , (PCR ürünü:419 bç)

>NC_010195.2:68-1040 Meleagris gallopavo mitochondrion,complete genome

AAAAGACTTAGTCCTAACCTTACTATTGATTTTTGCTAGACATATACATGCAAGTATCCGCATGCCAG
TGAAAATGCCCTAACCCCTTAAGAAAAGAATAAAGGAGCAGGTATCAGGCACACTCTAATGTAGCCCA
AGACGCCTTGCTTGAGCCACACCCCCACGGGTATTCAGCAGTAATTAACCTTAAGCAATAAGTGTAAA
CTTGACTTAGCCATAGCAACTTTAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGCCACCGCGGTCATACAAGAAAC
CCAAATCAATAGCCATCCGGCGTAAAGAGTGGTCACATGCTATCTATACCAATTAAGATCAAAGTGTA
ACTAAGCTGTCATAAGCCCAAGATTCACCTAAGCCCAGCCTAAAAAATGATCTTAACTTAACGATCAA
TTTAAAGCCACGAAAGCCAGGGCACAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTGGCCCTAAATCTTG
ATACTAATATACTCACGTATCCGCCTGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGC
GGTGCCCTAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAATCCACGATCCACCCAACCACCTCT
TGCCAACACAGCCTACATACCGCCGTCGCCAGCCCACCTAAAATGAAAGATCAATAGTGAGCTCAATA
GTCCCCACTAACAAGACAGGTCAAGGTATAGCCCATGAGGTGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTAACA
TAGAACAGACGAAAAAGGGCGTGAAACTCGCCCTTGGAAGGAGGATTTAGCAGTAAAGTAAGACCATA
CTTCTCTTAAGCCTACTTAAAGACGGCCCTGGGGCACGTACATACCGCCCGTCACCCTCCTCACAAGC
TATCAATTTCAATAAATAATACCCAACCCTAGCTAAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCGTAC
CGGAAGGTGCGCTTAGACTAC

> NC_001323.1: 1297-2272 Gallus gallus mitochondrion,complete genome

AAAAGACTTAGTCCTAACCTTTCTATTGGTTTTTGCTAGACATATACATGCAAGTATCCGCATCCCAG
TGAAAATGCCCCCAAACCTTTCTTCCCAAGCAAAAGGAGCAGGTATCAGGCACACTCAGCAGTAGCCC
AAGACGCCTTGCTTAAGCCACACCCCCACGGGTACTCAGCAGTAATTAACCTTAAGCAATAAGTGTAA
ACTTGACTTAGCCATAGCAACCCAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGCCACCGCGGTCATACAAGAAAC
CCAAATCAATAGCTACCCGGCGTAAAGAGTGGCCACATGTTATCTGCACCAGCTAAGATTAAAATGCA
ACCAAGCTGTCATAAGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCAAATCCATCTTAGCCTCAACGATTAAT
TTTAACCCACGAAAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCCTAAATCTAGA
TACCTCCCATCACACATGTATCCGCCTGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGG
CGGTGCCCCAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCACGATTCACCCAACCACCCC
TTGCCAGCACAGCCTACATACCGCCGTCGCCAGCCCACCTCTAATGAAAGAACAACAGTGAGCTCAAT
AGCCCCTCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTATAGCCTATGGGGTGGGAGAAATGGGCTACATTTTCTAA
CATAGAACAAACGAAAAAGGATGTGAAACCCGCCCTTAGAAGGAGGATTTAGCAGTAAAGTGAGATCA
TACCCCCTAAGCTCACTTTAAGACGGCTCTGAGGCACGTACATACCGCCCGTCACCCTCTTCACAAGC
CATCAACATCAATAAATATATACTTCCCCTCCCGGCTAAAGACGAGGCAAGTCGTAACAAGGTAAGTG
TACCGGAAGGTGCACTTAGACTAC

Çizelge 5.5. Tasarlanan primer çiftleri

Primerler	**5'→ 3' Sequence**	**Len**	**Location**	**Mw**	**Tm(ºC)**
OVS12S(F)	GCCTTCCTGTTAACTTTCAATAG	23	17-39	6965	59.69
OVS12S(R)	GCTTACCTTGTTACGACTTGT	22	911-932	6472	59.33
BOSCYTB(F)	CAGCAATCCCATACATCGGCA	21	452-472	6344	58.7
BOSCYTB (R)	GAAGTATCACTCGGGTTTGATG	22	801-822	6805	55.6
MG12S(F)	GGAGCAGGTATCAGGCACACT	21	103-123	6480	59.9
MG12S(R)	GTTTGTGCTCGTAGTTCTCAG	21	501-521	6434	54.7

Tasarlanan primer çiftleri ticari bir firmadan (Sigma) temin edilerek PCR amplifikasyonu için kullanılabilir hale getirilmiştir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Koyun, tavuk ve hindi türlerinin 12S rRNA, sığır türünün ise CYTB gen bölgesinin PCR tekniğiyle çoğaltılmasında kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

PCR şartları Çizelge 3.7 ve 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 6.6. PCR karışımı

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
Kalıp DNA	40-50 ng/µl	1.5µl
İleri primer (F)	20 pmol/µl	1.0 µl
Geri Primer (R)	20 pmol/µl	1.0 µl
ExPrime Taq Premix(2x)		5 µl
dH_2O		16.5µl
Toplam		25.0 µl

Çizelge 7.7. 12S rRNA PCR amplifikasyon şartları

Döngü işlemi	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
Ön denaturasyon	95	1	4 dakika
Denatürasyon	94		45 saniye
Yapışma (T_m)	56	33	60saniye
Sentez	72		1.5 dakika
Son uzama	72	1	5 dakika
Bekleme	4	∞	∞

Çizelge 8.8. CYTB PCR amplifikasyon şartları

Döngü işlemi	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
Ön denaturasyon	95	1	4 dakika
Denatürasyon	94		45 saniye
Yapışma (T_m)	55	34	60saniye
Sentez	72		1.5 dakika
Son uzama	72	1	5 dakika
Bekleme	4	∞	∞

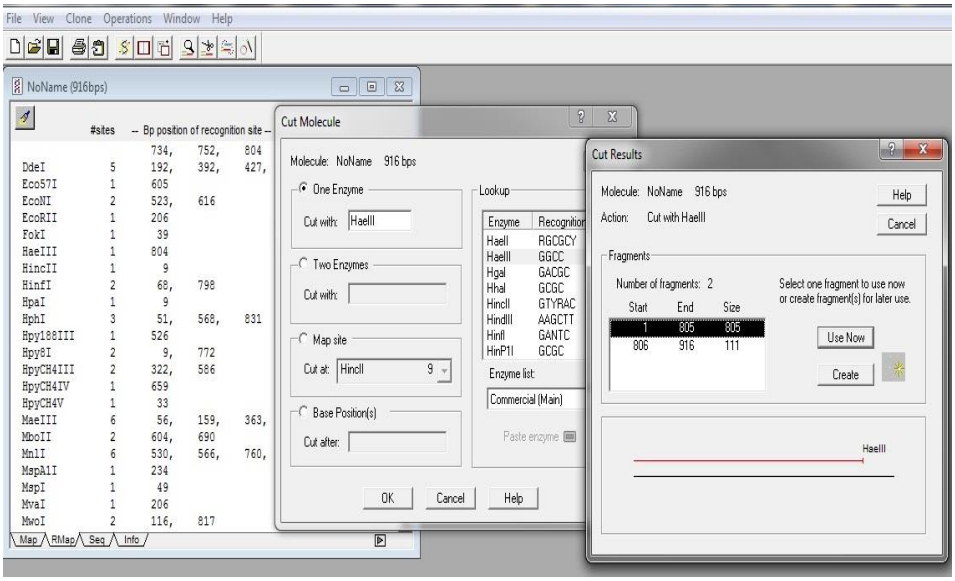
Yapılan bu bileşenler belirtilen oranlarda buz üzerinde 0.2 ml'lik PCR ependorf tüpler içerisinde hazırlandıktan sonra, PCR şartları çok önceden ayarlanmış PCR cihazına (Boeco) konulmuştur. Belirtilen PCR bileşen ve PCR amplifikasyon

şartları genel olup, örneklere göre modifiye edilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünlerini görüntülemede %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. PCR jelinin yürütülmesi amacıyla 100 bp'lik ladder (Fermentas) marker olarak kullanılmıştır.

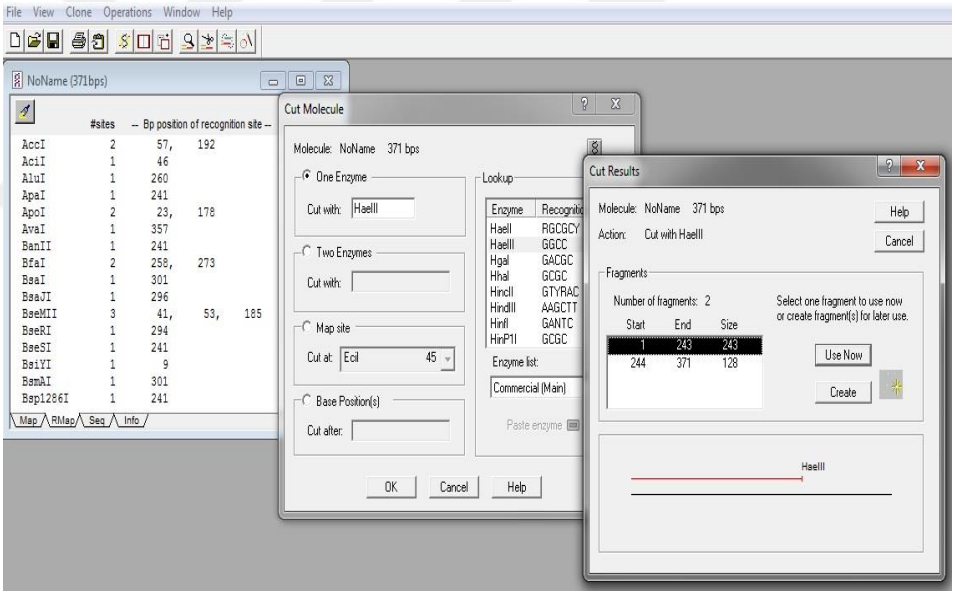
3.5. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism)

3.5.1. Restriksiyon kesim haritasının oluşturulması

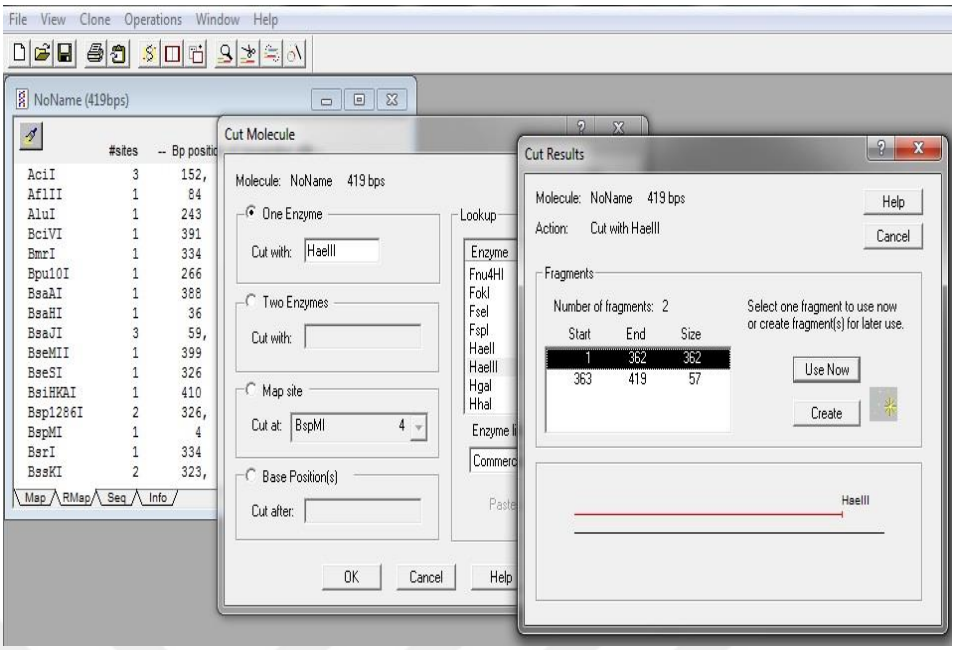
Dizi üzerinde mevcut restriksiyon endonükleaz (RE) kesim yerlerinin tespit edilmesi ve hangi enzimlerin kullanılacağına karar verebilmek için RE'lerin kesim haritasının çıkartılması gerekmektedir. Clone manager 5 programı, ilgili dizinin çeşitli restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profilleri sanal olarak bize sunmaktadır. Clone manager 5 proğramından elde edilen bilgiler doğrultusunda; koyunun 12S rRNA gen bölgesi için *Alu*I, *Hae*III , *Hpa*I, *Dde*I, *Ahd*I, *Pac*I, *Rsa*I, *Taq*I ve *Fok*I enzimleri, sığır'ın CYTB bölgesi için; *AluI*, *Hae*III, *AvaI*, *BsaI*, *MwoI*, *Rsa*I, *Stu*I, *Hinf*I, *Stu*I ve *Taq*I enzimlerinin seçilen bölgelere uygun olduğu görüldü. Fakat elimizde mevcut olan *Hae*III enzimini sığır, koyun, tavuk ve hindi primerlerinde kullanabilmek için, clone manager 5 programında 12S rRNA ve CYTB gen bölgesi için uygunluğu gözlemlendi. Uygunluğu gözlemlenen *Hae*III enziminin laboratuvarda kullanılmasına karar verildi.



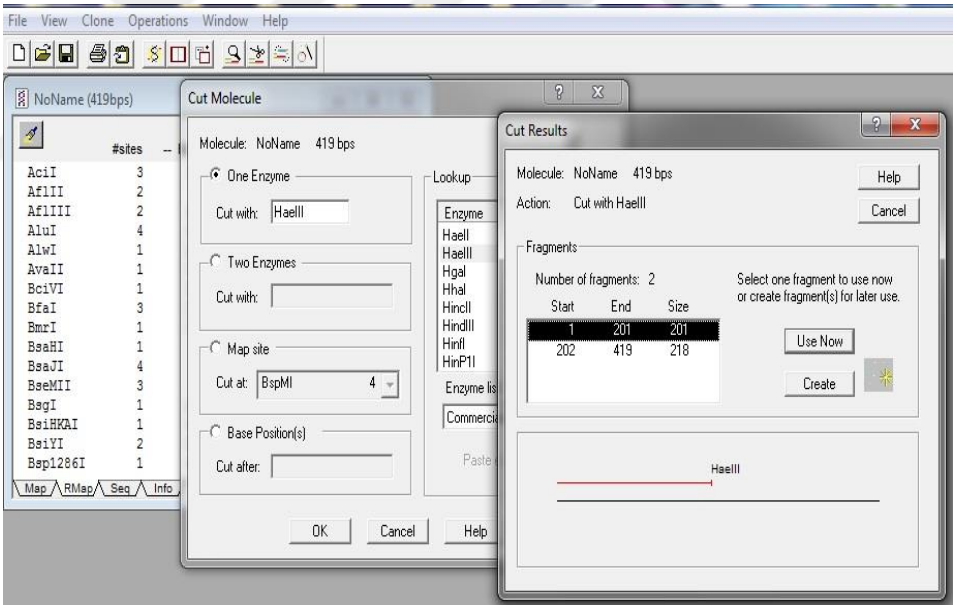
Şekil 3.3. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Ovis aries*, 12S rRNA**)**



Şekil 3.4. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Bos taurus*, CYTB geni)



Şekil 3.5. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Meleagris gallopavo*, 12S rRNA)



Şekil 3.6. Clone manager ile restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP profili (*Gallus gallus*, 12S rRNA)

Çizelge 9.9. 12S rRNA ve CYTB gen bölgelerinde kullanılan enzimler, tanıma bölgeleri ve beklenen fragment boyları

Tür	RE	Tanıma Bölgesi (5′⟶3′)	Dizideki Kesim Yerleri (bç)	Fragment Boyları (bç)
Koyun (12S rRNA)	*Hae*III	GG▼CC	805	805, 111
Sığır (CYTB geni)	*Hae*III	GG▼CC	243	243, 128
Tavuk (12S rRNA)	*Hae*III	GG▼CC	201	362, 57
Hindi (12S rRNA)	*Hae*III	GG▼CC	362	201,218

3.5.2. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi

PCR-RFLP karışımı Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 10.10. PCR-RFLP karışımı

Bileşenler	Miktar
Restriksiyon Enzimi (*Hae*III)	1.5µl
Buffer	3 µl
PCR ürünü	3µl
dH_2O	7.5µl
Toplam	15 µl

Yapılan bu bileşenlerin hepsi belirtilmiş oranlarda buz üzerinde 0.2 ml'lik PCR ependorf tüpler içerisine aktarıldıktan sonra sıcaklığı 37 ºC'ye ayarlanan su banyosu cihazı içerisine yerleştirildi. Örnekler 37 ºC'de bir gece bekletildi. *Hae*III enzimi; *ovis aries* 12S rRNA dizi üzerinde 805. baz noktasından kesimi ile, 805 ve 111 bç uzunluğunda bantlar vermesi beklenmektedir. Aynı enzim; *Bos taurus* CYTB gen dizisi üzerinde 243. baz noktasından kesimi ile, 243 ve 128 bç uzunluğunda bantlar vermesi beklenmektedir.

3.5.3 RFLP İçin agaroz jel elektroforezi

Hassas terazide 1.200 g agaroz dikkatli bir şekilde tartılıp, içerisinde 60 ml 1XTBE çözeltisi bulunan erlenmayer içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde eritildi. Mikro dalga fırından çıkarılan agaroz jel soğuduktan sonra hızlı bir şekilde küvet içerisine boşaltılarak taraklar yerleştirilip jelin kalıp haline gelmesi beklenildi. Daha sonra ise içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankının içine küvet yerleştirilerek, tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel kuyularının ilk sıralarına molekül ağırlık markeri yüklendi. DNA fragmentlerinin boyutunu doğru olarak hesaplayabilmek için 50 bp'lık ladder kullanıldı (Fermatas S0357). Diğer kuyulara ise 5 µl RE örnekleri 1 µl yükleme tamponu (%40 sükroz, 100 mM ETDA, pH: 8.0, %0.25 bromofenol mavisi,) yüklenmiştir. Yüklemeden az zaman sonra güç kaynağında (Biolab), jelin bulunduğu tanka 90 V akım verilerek jeller 60-70 dk yürütüldü. Sonrasında jeli, etidyum bromür (0,5 ìg/ml) bulunan ortam içine eklenerek 10-15 dakika bekletip RE'leri boyanmaya bırakıldı elektroforez işlemi gerçekleştirilen jel alınarak UV ışığı altında incelendi ve fotoğrafı alındı. Fotoğrafı alınan jel üzerinde ilgili enzimin kestiği fragment uzunlukları, kesim yerlerinin gözlenen ve beklenen bant sayısı ile büyüklükleri kullanılan standart marker (50 bp) yardımıyla belirlendi.

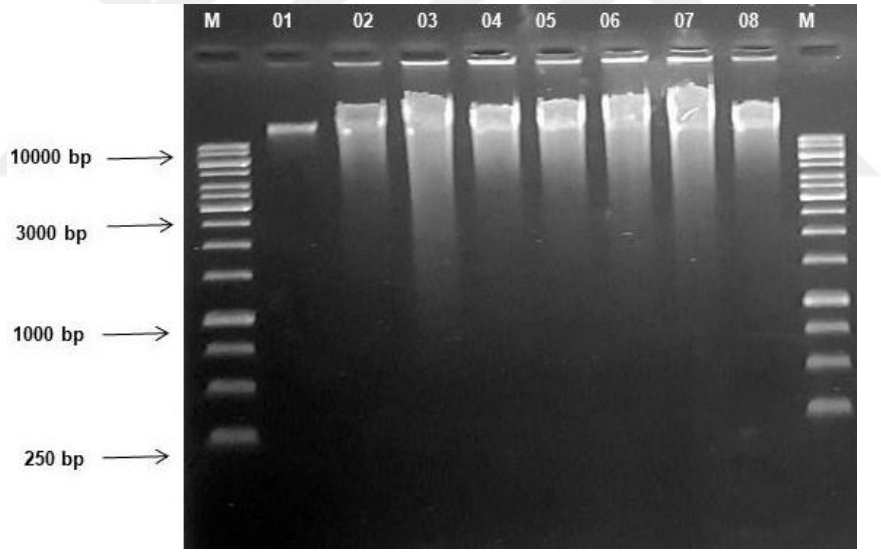
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

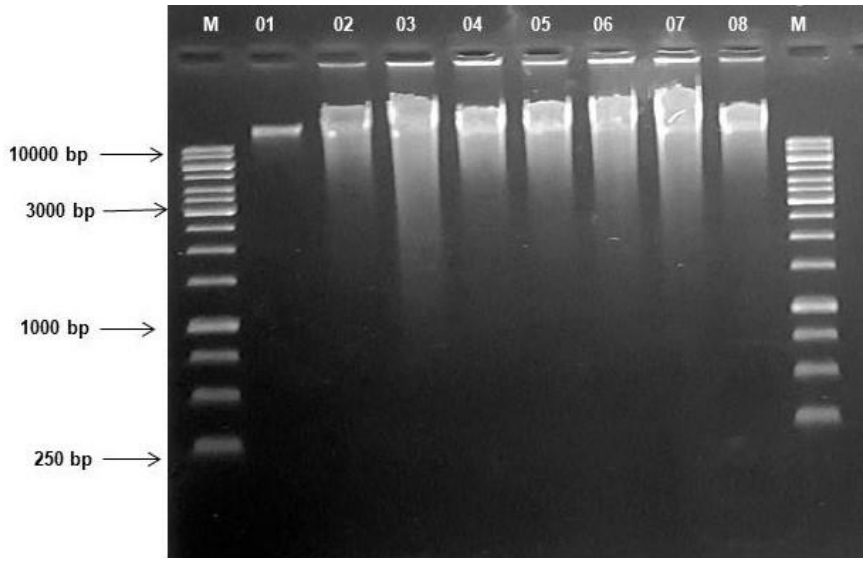
4.1.1. DNA izolasyonu

Şanlıurfa yöresindeki işletmelerden alınan ciğer, dalak, yürek örneklerinden DNA izole edilmiştir. Daha sonra izole edilmiş olan DNA'lar % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. DNA'ların agaroz jel görüntüsü sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de 8 adet örnekten 01 nolu örnekte orta; 02-08 nolu örnek de ise yoğun DNA konsantrasyonu olduğu görülmektedir.

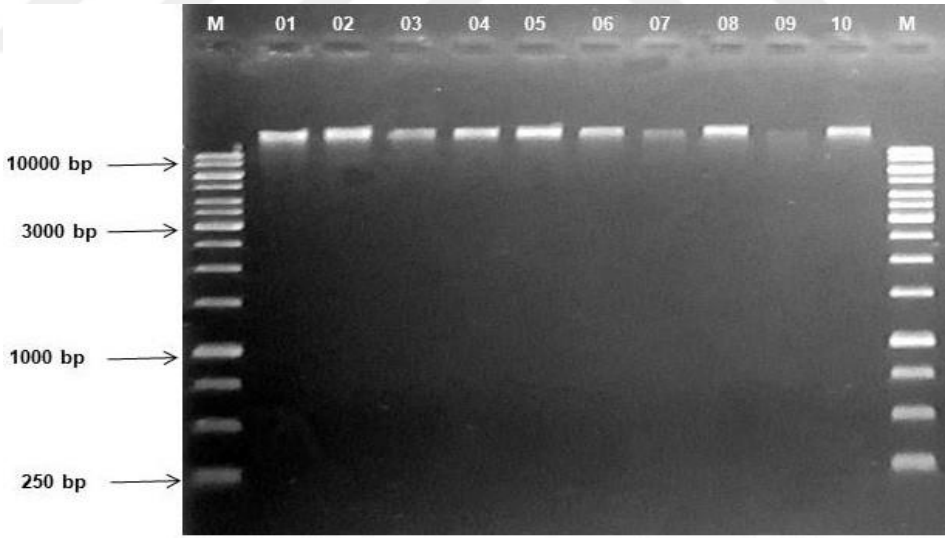


Şekil 1.1. Yürek DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 01-08 nolu örnekler)



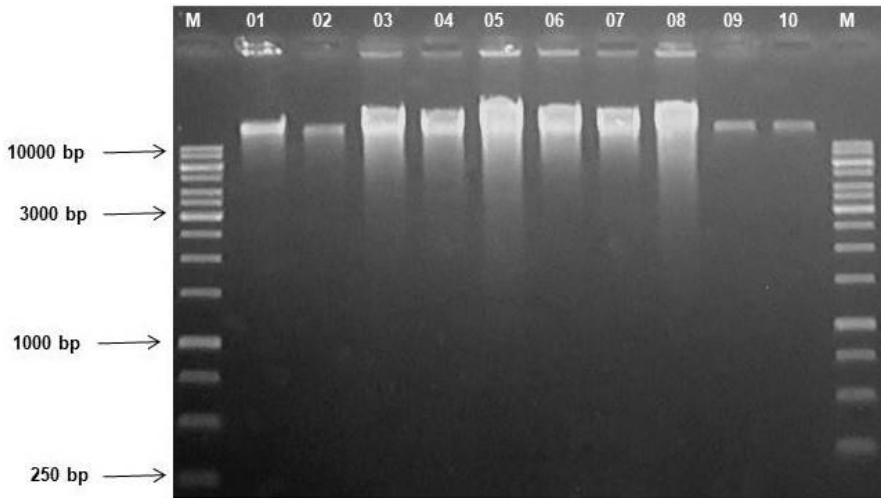
Şekil 2.2. Dalak DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 09-16 nolu örnekler)

Şekil 4.3'te 10 adet örnekten 01, 02, 04, 05, 06, 08 ve 10 nolu örneklerde yoğun; 07, 08 ve 09 nolu örnekler de ise zayıf DNA konsantrasyonu olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3. Ciğer DNA jel görüntüsü (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 17-26 nolu örnekler)

Şekil 4.4'te 01 nolu örnek orta; 03, 04, 05, 06, 07, 08 nolu örnekler yoğun; 02, 09 ve 10 nolu örnekler de ise zayıf DNA konsantrasyonu olduğu görülmektedir.

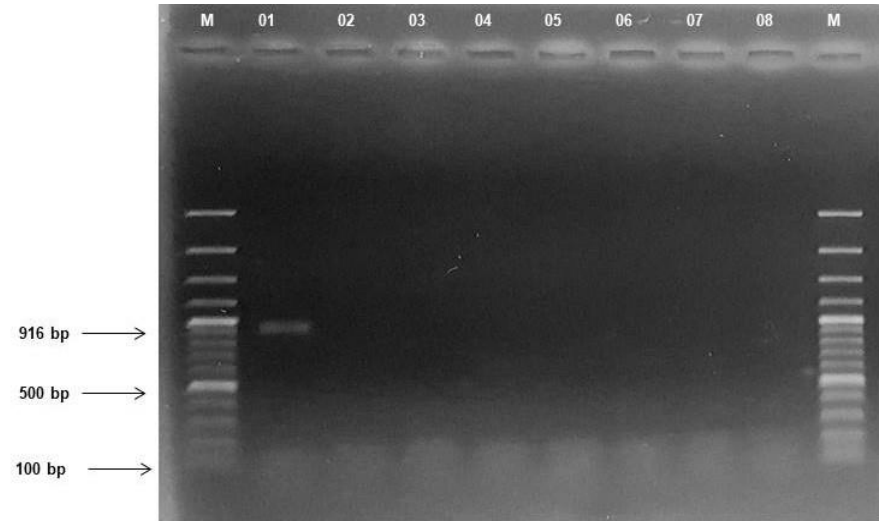


Şekil 4.4. Ciğer DNA jel görüntüsü devamı (M: Ladder 1 kb, FermatasS0357; 27-36 nolu örnekler)

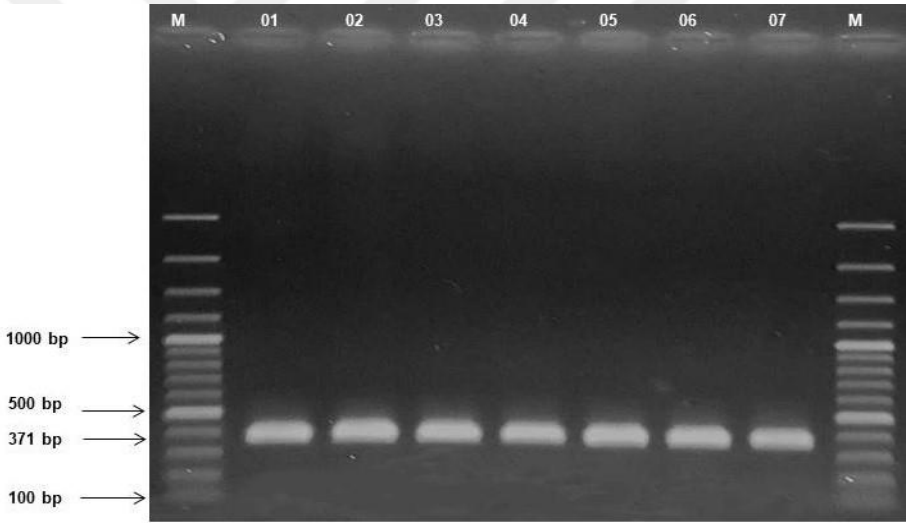
4.1.2. PCR sonuçları

İzole edilmiş DNA doku örneklerinden koyun 12S rRNA ve sığır CYTB gen bölgeleri için tasarlanan primer çiftleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Evcil koyunda (*Ovis aries*) 12S rRNA geni 958 bç uzunluğundadır, tasarlanan OVS12S (F) ve OVS12S (R) primerleri ile 12S rRNA geninin 916 bç'lik kısmı, evcil sığırda (*Bos taurus*) ise CYTB genini 1140 bç uzunluğundadır, tasarlanan BOSCYTB (F) ve BOSCYTB (R) primerleri ile CYTB geninin 371 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. Sonuçlar %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

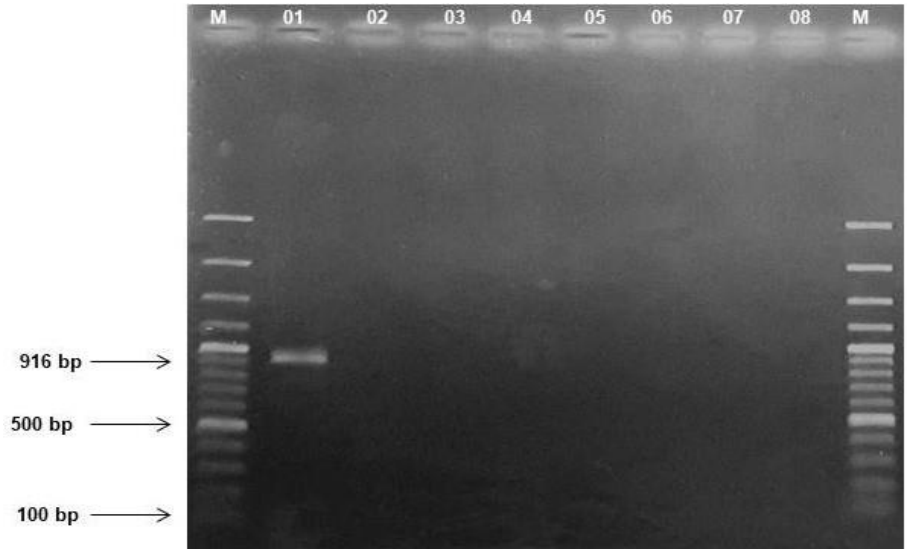
Yürek, dalak ve ciğer türlerine ait PCR jel görüntüleri sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



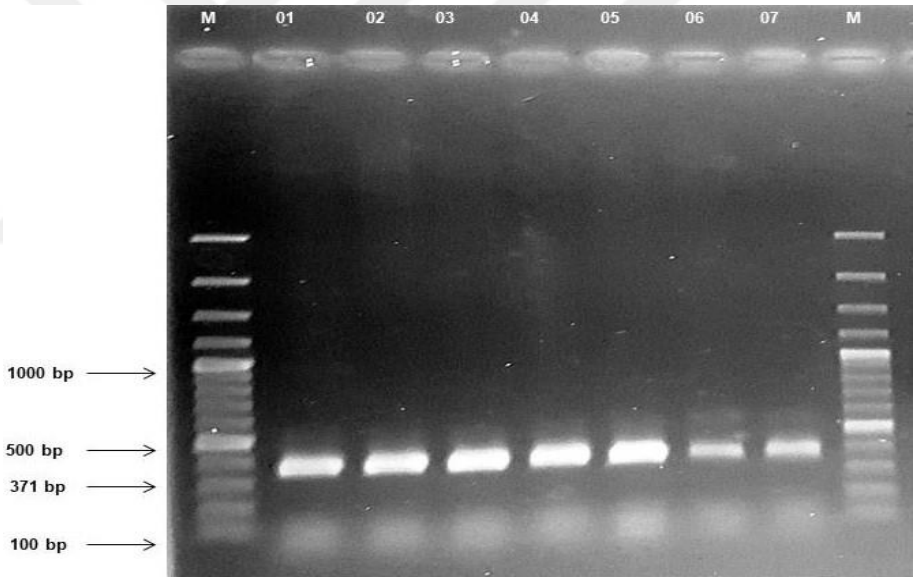
Şekil 5.5**.** Yürek örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 01 nolu örnek)



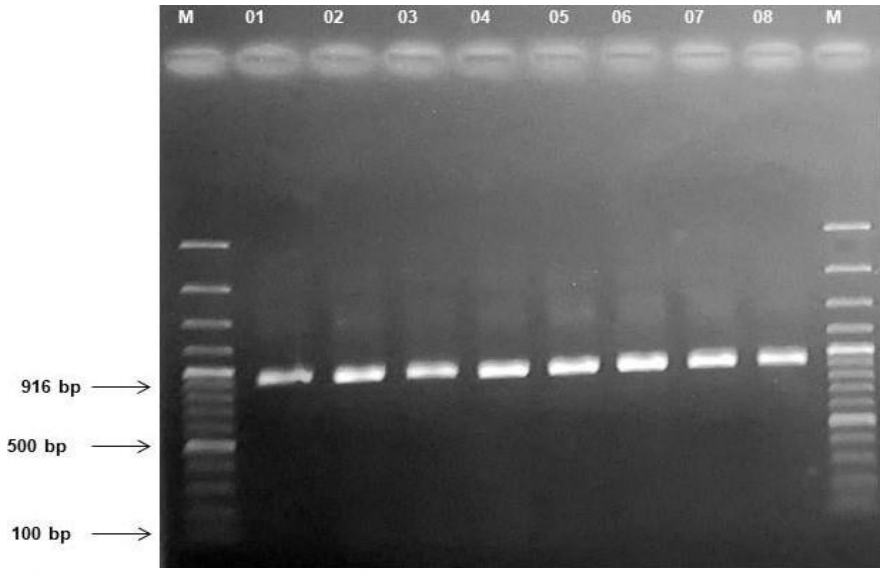
Şekil 6.6. Yürek örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü (M:Ladder 100 bp, FermatasS0357; 02-08 nolu örnekler)



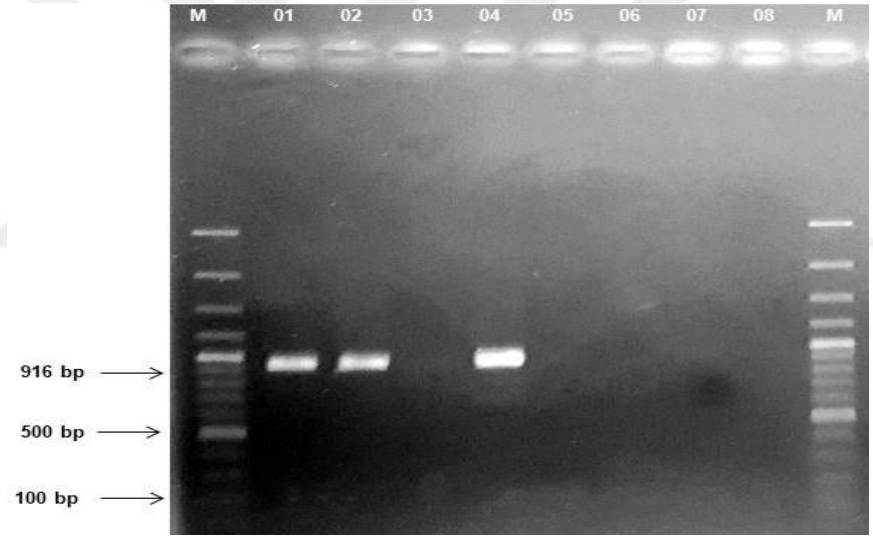
Şekil 7.7. Dalak örneklerinde (*Ovis aries*: koyun*)* 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, Fermatas S0357; 09 nolu örnek)



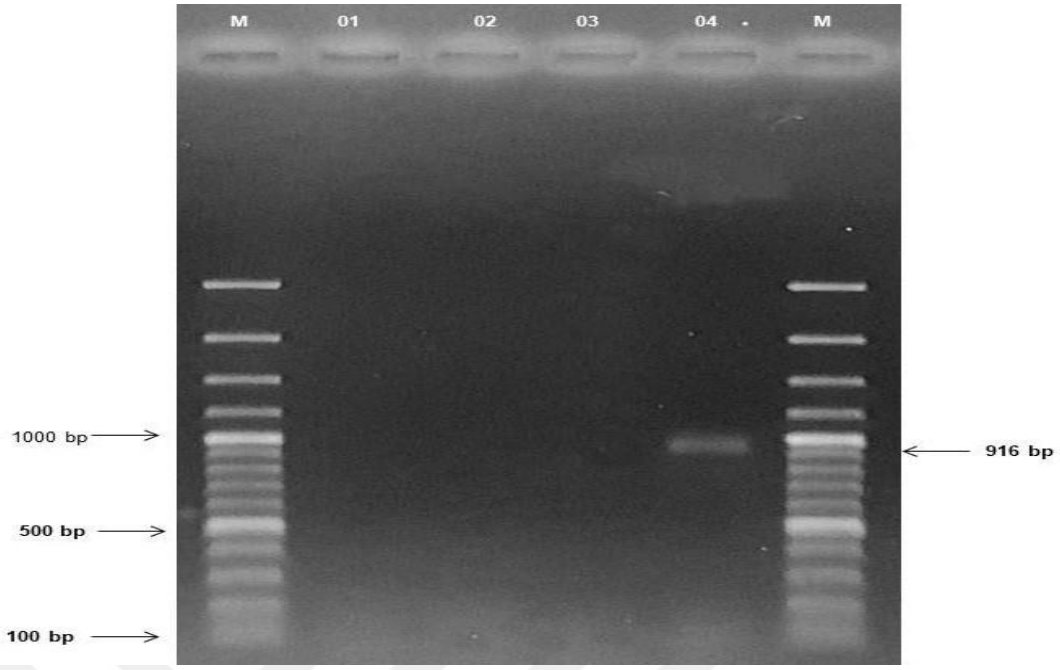
Şekil 8.8. Dalak örneklerinde (*Bos taurus*: sığır) *CYTB* PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357;10-16 nolu örnekler)



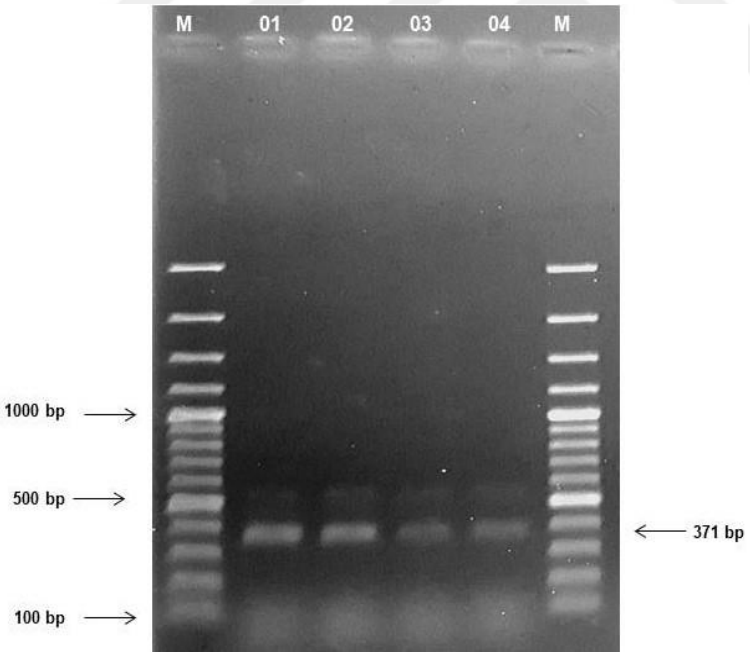
Şekil 9.9. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun*)* 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü
(M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 17-24 nolu örnekler)



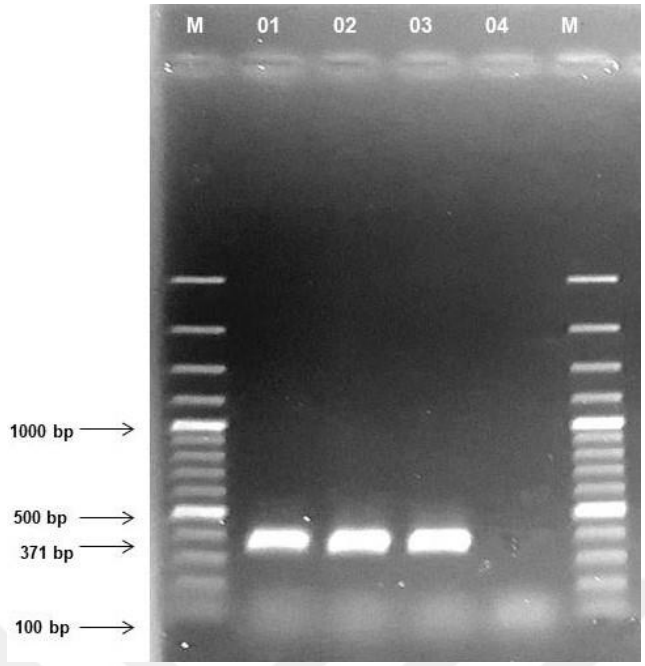
Şekil 10.10. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun *)* 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü
(M:Ladder 100 bp, Fermatas S0357; 25-26-28 nolu örnekler)



Şekil 11.11. Ciğer örneklerinde (*Ovis aries*: koyun) 12S rRNA PCR ürünü jel görüntüsü
(M: 100 bp, FermatasS0357 Ladder; 36 nolu örnek)



Şekil 12.12. Ciğer örneklerinde (*Bos taurus: sığır)* CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü
(M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 27, 29, 30, 31 nolu örnekler)



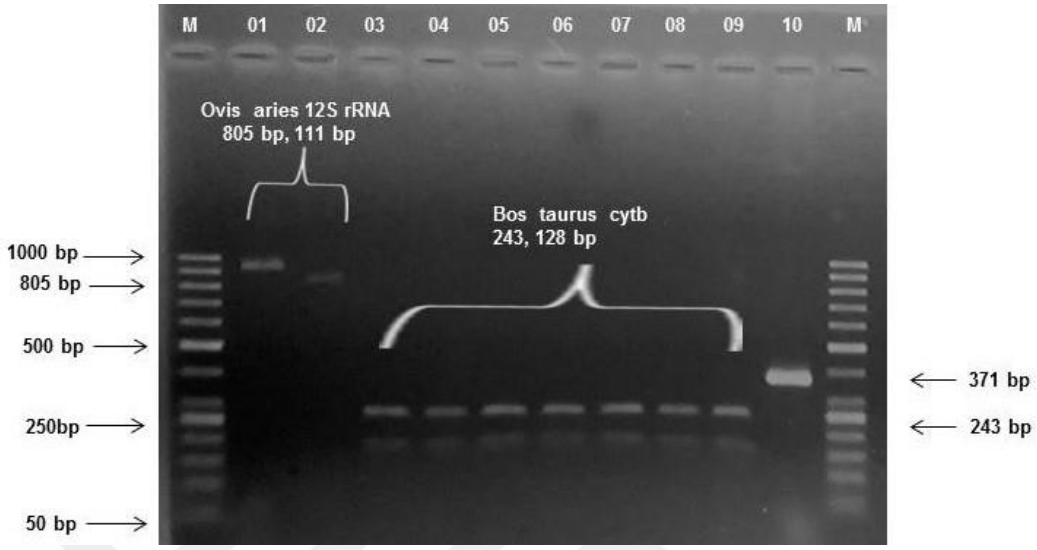
Şekil 13.13. Ciğer örneklerinde (*Bos taurus*: *sığır)* CYTB geni PCR ürünü jel görüntüsü (M: Ladder 100 bp, FermatasS0357; 32, 33,34 nolu örnekler)

4.1.3. PCR-RFLP sonuçları

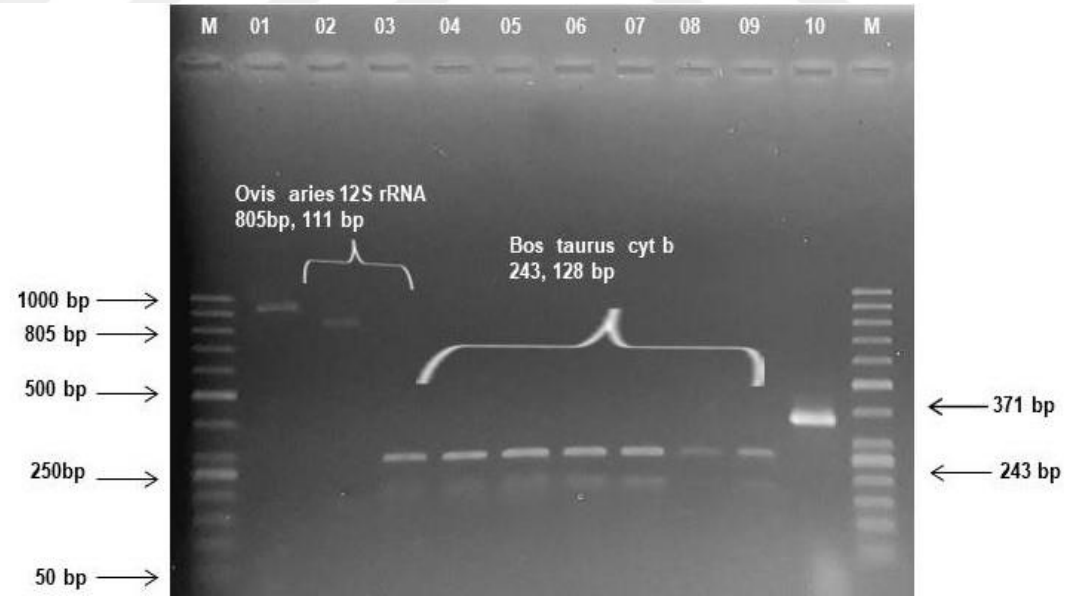
Evcil koyunun 958 bç uzunluğunda bulunan mitokondriyal 12S rRNA geni için tasarlanan primerler ile 916 bç'lik kısım PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile kesilmiştir. *Hae*III enzimi koyunlarda 12S rRNA geni için belirlenen dizi üzerinde 805. baz noktasından kesimi ile 805 ve 111 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Evcil sığırda ise 1140 bç uzunluğunda bulunan CYTB geni için tasarlanan primerler ile 371 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. *Hae*III enzimi sığırlarda CYTB geni için belirlenen dizi üzerinde 243. baz noktasından kesimi ile 243 ve 128 bç'lik fragmentler elde edilmiştir.

PCR-RFLP analizi sonucunda; sakatatlardan 20 adet ciğer örneğinde 12 adet koyun, 7 adet sığır türü tespit edilmiştir. Geriye kalan 1 adet ciğer örneğinde ise koyun, sığır, hindi ve tavuk türleri tespit edilmemiştir. Yürek örneklerinde (8 adet); 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılmıştır. Dalak örneklerinde (8 adet) ise 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılabilmiştir. Bununla birlikte tüm sakatatlarda tavuk ve hindi türü tespit edilmemiştir.

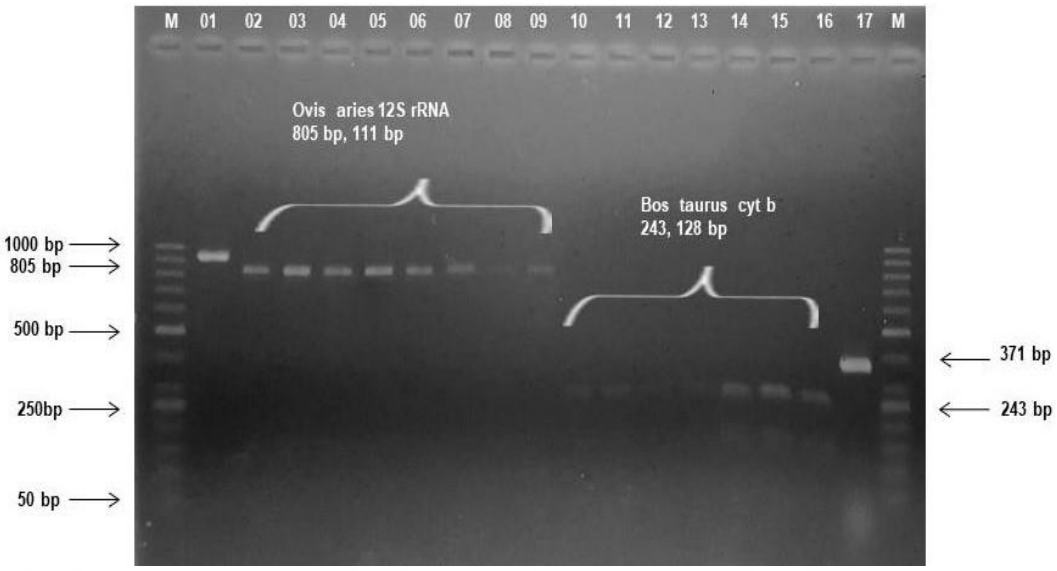
Yürek, dalak ve ciğer örneklerinin *Hae*III enzimi ile kesiminden elde edilen RFLP sonuçları şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.14. Yürek örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü
(M:Ladder 50 bp, Fermatas S0357;*Hae*III)



Şekil 4.15. Dalak örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü
(M: Ladder 50 bp, FermatasS0357;*Hae*III)



Şekil 14.16. Ciğer örneklerinde 12S rRNA ve CYTB geni PCR-RFLP jel görüntüsü
(M: Ladder 50 bp, FermatasS0357;*Hae*III)

İzole edilmiş DNA doku örneklerinden koyunun 12S rRNA gen bölgesi için primer çiftleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primer çiftleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Evcil koyunda 958 bç uzunluğunda bulunan 12S rRNA geninin,tasarlanan primerlerle 916 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile 805. baz noktasından kesimi ile koyunlarda 805 ve 111 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Bunun sonucunda; sakatatlardan 20 adet ciğer örneğinde 12 adet, 8 adet yürek örneğinde 1 adet, 8 adet dalak örneğinde ise 1 adet koyun türü tespit edilmiştir. Girish ve ark. (2005), ise yaptıkları çalışmada 12S rRNA genini ve *Alu*I, *Hha*I, *Apo*I, *BspT*I kesme enzimlerini kullanarak sığır, manda, koyun ve chevon türlerini tanımlayabilmişlerdir. Bununla beraber, Fajardo ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada mitokondriyal 12S rRNA genini kullanarak, kızıl geyik, nadas geyiği, karaca, koyun, sığır ve keçi türlerinden alınan etlerin tanımlanması için *Mse*I, *Mbo*II, *Bsl* ve *Apo*I endonükleazları kullanarak tür tespiti yapmışlardır. Grupta ve ark. (2008), yaptıkları araştırmada yine Mitokondriyal 12S rRNA genini kullanarak, lekeli geyik, domuz geyiği, havlayan geyik, sika geyiği, misk geyiği ve sambar geyiğini *Rsa*1, *Dde*1, *Bsr*1 ve *BstSF*1 enzimleri ile tanımlamışlardır. Bunlara ilaveten Chen ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada mitokondriyal 12S rRNA geninde sığır, yak, manda, keçi ve domuz dizisini analiz ederek türlere özgü varyasyonları belirlemişlerdir. Türlerin tanımlanması için iki endonükleaz, (*Alu*I ve *Bfa*I)

seçmişlerdir. Keçi ve domuz türlerini *Alu*I enzimini kullanarak, sığır, yak ve bufalo türlerini ise *Bfa*I enzimini kullanarak tanımlamışlardır.

Sığırın CYTB gen bölgesi için tasarlanan primer çiftleri ile PCR çalışması yapılmıştır. Tasarlanan primerler ile 1140 bç uzunluğunda bulunan CYTB geni için, 371 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile 243. bazdan kesimi ile 243 bç ve 128 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Böylece 20 adet ciğer örneğinde 7 adet, 8 adet yürek örneğinde 7 adet, 8 adet dalak örneğinde de 7 adet sığır türü tespit edilmiştir. Cespedes ve ark. (1998), çalışmalarında CYTB genini ve seçmiş oldukları *Sau3A*l, *BsmA*l, *Rsa*l ve *Mn*/l enzimlerini kullanarak; taban (Solea solea), Avrupa plaice (Pleuronectes platessa), pisi balığı (Platichthys flesus) ve *Greenland halibut* türlerini tespit etmişlerdir. Yine Murugaiah ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada CYTB genini kullanarak sığır, domuz, manda, bıldırcın, tavuk ve keçi türlerini tanımlamak için *Alu*I, *BsaJ*I, *Rsa*I, *Mse*I ve *BstU*I kesme enzimlerini seçerek, tür tespiti yapmışlardır. Bunlarla beraber Kumar ve ark. (2014)'da çalışmalarında CYTB genini ve *Alu*l ve *Taq*I kesme enzimlerini kullanarak sığır, manda, keçi, koyun ve domuz türlerini tanımlamışlardır. Biz de çalışmamızda da 12S rRNA ve CYTB genleri ve *Hae*III enzimi kullanılarak 36 sakatat örneğinin 35'inde tür tespiti yapılmıştır. Geriye kalan 1 sakatat örneğinde ise koyun, sığır, hindi ve tavuk türü tespit edilmemiştir. Tespit edilmeyen türün, muhtemelen moleküler tekniklerden kaynaklandığı söylenilebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; Şanlıurfa ilinde yaygın olarak tüketime sunulan ve farklı işletmelerden toplanan sakatat (ciğer, yürek, dalak) örneklerinde, PCR-RFLP metodu ile orijin tespiti yapılmıştır. Şanlıurfa ilinde bulunan 36 işletmeden rasgele toplanan sakatat örneklerinden DNA izole edilmiştir. Mitokondriyal 12S ribozomal RNA ve CYTB geni için primer çiftleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primer çiftleri ile koyunlarda 916 bç, sığırlarda 371 bç, tavuk ve hindide 419 bç'lik bölge çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile kesilmiştir. Evcil koyunun 958 bç uzunluğunda bulunan mitokondriyal 12S rRNA geni için tasarlanan primerler ile 916 bç'lik kısım PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *Hae*III enzimi ile kesilmiştir. *Hae*III enziminin koyunlarda 12S rRNA geni için belirlenen dizi üzerinde 805. baz noktasından kesimi ile 805 ve 111 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Evcil sığırda ise 1140 bç uzunluğunda bulunan CYTB geni için tasarlanan primerler ile 371 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. *Hae*III enziminin sığırlarda CYTB geni için belirlenen dizi üzerinde 243. baz noktasından kesimi ile 243 ve 128 bç'lik fragmentler elde edilmiştir. Böylece, sakatatlardan 20 adet ciğer örneğinde 12 adet koyun, 7 adet sığır türü tespit edilmiştir. Geriye kalan 1 adet ciğer örneğinde ise koyun, sığır, hindi ve tavuk türleri tespit edilmemiştir. Yürek örneklerinde (8 adet); 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılmıştır. Dalak örneklerinde (8 adet) ise 1 adet koyun, 7 adet sığır türü tespiti yapılabilmiştir. Bununla birlikte tüm sakatatlarda tavuk ve hindi türü tespit edilmemiştir. Muhtemelen belirlenemeyen türün moleküler tekniklerden kaynaklandığı söylenilebilir. Ayrıca işletmeler tarafından sakatat tüketimi, talebin karşılanması için dönemsel olarak sığır/koyun kaynaklı sakatat temininin değiştiği belirtilmektedir.

Sonuç olarak, son zamanlarda yaygın bir şekilde görülen gıda tağşişine yönelik girişimlerde, tüketici haklarının ve sağlığının korunması, haksız rekabetin önlenmesi gibi konularda sakatatlarda orijin tespitinin yapılması, dolayısıyla bu çalışmalar kapsamında özellikle kolay, ucuz, ekonomik ve hızlı olmasından dolayı moleküler yöntemlerin kullanılmasının yararlı olabileceği söylenebilir. Bununla beraber et ve et

ürünlerinin yoğun olarak tüketildiği bölgelerde, gıda tağşişine yönelik test ve kontrol birimlerinin oluşturulması tüketici hakları ve gıda güvenliği açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

AL-KAHTANI, H. A., ISMAİL, E. A. and AHMED, M. A., 2017. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. Food Chemistry, 219:54–60.

AMARAL, J. S., SANTOS, G., OLİVEİRA, M. B. P. P. and MAFRA, S., 2017. Quantitative detection of pork meat by Eva Green real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. Food Control, 72: 53-61.

ASENSIO'DAKI, L., GONZALEZ, I., FERNANDEZ, CÉSPEDES, A., HERNANDEZ, P.E., GARCIA, T., MARTIN, R., 2000. definition of the round-fragment fragment length polymorphism of the polymerase chain of a 12S rRNA gene fragment of Nile Bass (*Lates Niloticus*), Grouper (*Epinephelus Guaza*) and Debris (*Polyprion Americanus*). Journal of Food Protection, 63 (9): 1248-52.

BO, H., XIANRONG, M., LIYUAN, Z., JINYUE, G., SHAOWEN, L. and HUI, J., 2014. development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of Chicken, Duck and Goose DNA In Meat Products. Meat Science, 10: 90-94.

BÜYÜKÜNAL, S.K. ve KAHRAMAN, T., 2004. Kırmızı Et Tüketimi ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Food Sektör, 4(21): 12-14.

CHEN, S. Y., LİU, Y.P., and YAOY. G., 2010. Species authentication of commercial beef jerky based on pcr-rflp analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. Journal of Genetics and Genomics. 37(11): 763-769.

EAQUB, A., RAZZAK, A., HAMID, S. B., RAHMAN, M., AMIN, A. RASHID, N. R. A. and ASING. 2015. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in İslamic foods. Food Chemistry, 177(15): 214-224.

FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P. E., GARCÍA, T. and MARTİN, R., 2006. PCR-RFLP Authentication of Meats from Red Deer (*Cervus elaphus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and Goat (*Capra hircus*). Journal Agriculture and Food Chemistry, 54(4): 1144-50.

GENG , R.Q., YUAN, C., CHEN, Y. L., 2012. ıdentification of goat cashmere and sheep wool by PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S rRNA Gene. Mitochondrial DNA the Journal of DNA Mapping, Sequencing and Analysis, 23(6): 466-470.

GIRISH, P. S., ANJANEYULU, A. S. R.,VISWAS, K. R., SHIVAKUMAR, B.M., ANAND, M., PATEL, M., SHARMA, B., 2005. Meat Species Identification by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Science, 70: 107–112.

GÖĞÜŞ, A.K., 1986. Et Teknolojisi. Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü. Ziraat Fakültesi Yayınları : 991, Ders Kitabı: 291, Ankara, 67-69s

GÖKÇEK, E. Ö., LÖK, A., KARAHAN, B. ve KURTAY, E., 2017. Farklı İstiridye Türlerinin Tespitinde RAPD-PZR Kullanımı. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 34(1): 25-30.

GÜNŞEN, U., AYDIN, A., OVALI, B.B. ve COŞKUN, Y., 2006. Çiğ Et ve Isıl İşlem Görmüş Et Ürünlerinde ELISA Tekniği İle Farklı Et Türlerinin Tespiti. İstanbul Universitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 32(2): 45-52.

GUPTA, A. R., PATRA, R. C., DAS, D. K., GUPTA, P. K.,SWARUP, D. and SAİNİ, M., 2008. Sequence characterization and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial dna 12S rRNA gene provides a method for species identification of Indian deer. Mitokondrial DNA, 19(4): 394-400.

HAIDER, N., NABULSI, I. and AL-SAFADI, B., 2012. Identification of meat species by PCR RFLP of the mitochondrial COI gene. Meat Science, 90(2): 490–493.

HAN, S. H., OH, H. S., and CHO, I. C., 2017. Identifying the species of origin in commercial sausages in South Korea. Journal of Applıed Animal Research, 45(1): 179–184.

HAUNSHI, S., BASUMATARY, R., GIRISH, P.S., DOLEY, S., BARDOLOI, R. K. and KUMAR, A., 2009. Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin Meat Science, 83(3): 454–459.

İLHAK, O. İ. and ARSLAN, A., 2007. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(3): 159-163.

JONKER, K. M., TILBURG, J. J. H. C., HAGELE, G. H and BOER, E., 2008. species identification in meat products using realtime PCR. Food Additives and Contaminants, 25(5): 527–533.

KARABASANAVAR, N. S., SINGH,S. P., KUMAR, D. and SHEBANNAVAR, S. N., 2014. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-Loop. Food Chemistry, 145: 530–534.

KIM, M.,YOO, I.,S. Y., HONG, Y. and KIM, H. Y., 2016. Quantitative detection of pork in commercial meat products by taqman real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-Loop region. Food Chemistry, 210: 102-106.

KİRAZ, S. ve AĞAR, O., 2016. İvesi Koyunlarında Mitokondriyal 16S rRNA Gen Bölgesi Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemiyle İncelenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 3(3): 218–222.

KITPIPIT, T., SITTICHAN, K. and THANAKIATKRAI, P., 2014. Direct-Multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry, 163(5): 77-82.

KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PAABO, S., VILLABLANCA, F. X. and WILSON, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Nati. Acad. Sci. USA., 86(16): 6196-6200.

MANE, B.G., MENDIRATTA, S. K., RAUT, A. A., and TIWARI, A. K., 2014. PCR-RFLP assay for identification of species origin of meat and meat products. Journal of Meat Science and Technology, 2(2): 31-36.

MATSUNAGA,T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHİBATA,K., YAMADA, J. and SHİNMURA, Y., 1999. A quick and simple method for the identication of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science, 51(2): 143-148.

MEADOWS, J.R., CEMAL, I., KARACA, O., GOOTWINE, E. and KIJAS, J. W., 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near east. Genetics, 175(3): 1371-1379.

MURUGAIAH, C., MOHDNOOR, Z., MASTAKIM, M., BILUNG, L.M., SELAMAT, J. and RADU, S., 2009. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. Meat Science, 83(1): 57-61.

NADERI, S., REZAEI, H. R., TABERLET, P., ZUNDEL, S., RAFAT, S.A., NAGHASH, HR., EL-BARODY, M. A., ERTUGRUL, O., POMPANON, F. and CONSORTİUM, E., 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. Plos ONE, 2(10): 1012.

ONG, S. B., ZURAINI, M. I., JURIN, W. G., CHEAH, Y. K., TUNUNG, R., CHAI, L. C., HARYANI, Y., GHAZALI, F.M. and SON, R., 2007. Meat molecular detection: sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. Asean Food Journal, 14(1): 51-59.

ÖZDEMİR, M., 2006. Türkiye Yerli Sığır Irklarında Mitokondriyal DNA Polimorfik Yapilarinin PCR-RFLP ve DNA Dizi Analizi Yöntemleri ile İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 116s.

ÖZPINAR, H., TEZMEN, G., GÖKÇE, İ. ve TEKİNER, İ. H., 2013. Detection of animal species in some meat and meat products by comparatively using DNA microarray and real time PCR methods. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 19(2): 245-252.

PARMA, P., FELIGINI, M., GREEPPI, G. and ENNE, G., 2003. The complete nucleotide sequence of goat (*capra hircus*) mitochondrial genome. Goat mitochondrial genome. DNA Seq., 14(3): 199-203.

PARK, J. K, SHIN, K. H., SHIN, S. C., CHUNG, K. Y. and CHUNG, E. R., 2007. Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. Food Science of Animal Resources, 27(2): 209-215.

SAIKIA, D.P., KALITA, D.J., BORAH, P., SARMA, S., NAGENDRA, N. B. and DUTTA, R., 2015. Differentiation of sheep and goat species by PCR-RFLP of mitochondrial 16S rRNA gene. Journal of Animal Research**,** 5(2): 213-217.

SIDDAPPA, C. M., SAINI, M., DAS, A., DORESWAMY, R., SHARMA, A.K. and GUPTA, P. K., 2013. Sequence characterization of mitochondrial 12S rRNA gene in mouse deer (*Moschiola indica*) for PCR-RFLP based species identification. Molecular Biology International, 6s.

TANABE, S., HASE, M., YANO,T., SATO,M., FUJIMURA,T. and AKIYAMA, H., 2007. A Real-Time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods biosci. Biotechnol. Biochem., 71(12): 3131–3135.

TANABE, S., MIYAUCHI, E., MUNESHIGE, A., MIO, K., SATO, C. and SATO, M., 2007. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(7):1663–1667.

ULCA, P., BALTA, H., ÇAĞIN, İ. and SENYUVA, H. Z., 2013. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. Meat Science, 94(3): 280–284.

WANG, Q., ZHANG, X., ZHANG, H.Y., ZHANG, J., CHEN, G.Q., ZHAO, D.H., MA, H.P. and LIAO, W.J., 2010. Identification of 12 animal species meat by t-rflp on the 12s rRNA gene. Meat Science, 85(2): 265–269.

WİLLİAMS, J.G.K., KUBELİK, A. R., LİVAK, K. J., RAFALSKİ, J.A. and TİNGEY, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18(22): 6531–6535.

YALÇIN, H. ve ALKAN, G., 2012. 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. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 18(6): 923-927.

YETİM H., KESMEN, Z. ve ŞAHİN, F., 2006. Kayseri ve Erzurum Piyasasında Satılan Et Ürünlerinde Farklı Hayvan Türlerine Ait Etlerin PCR Teknigi Kullanılarak Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 958-988.

ZEKİOĞLU, C., DURMAZ, G. ve SANER, S., 2014 Et ve Et Ürünlerinde Tür Tayini Analizleri. http://www.dunyagida.com.tr.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** Özlem DURĞUN
Uyruğu **:** T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi **:** ŞANLIURFA 23.10.1990
Telefon **:** 0542 275 93 00
e-mail **:** ozlemdurgun114@gmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	: Ticaret Meslek Lisesi, Merkez, Şanlıurfa	2009
Üniversite	: Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Merkez, Erzurum	2015
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Merkez, Şanlıurfa	2019

UZMANLIK ALANI : Zootekni

YABANCI DİLLER : İngilizce