T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK FARKLI İŞLEM GÖRMÜŞ ETLERDE TÜR TAYİNİ VE İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

NURSEL SÖYLEMEZ MİLLİ

BOLU, ŞUBAT - 2021

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK FARKLI İŞLEM GÖRMÜŞ ETLERDE TÜR TAYİNİ VE İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

NURSEL SÖYLEMEZ MİLLİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ÖMER EREN

BOLU, ŞUBAT - 2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Nursel SÖYLEMEZ MİLLİ tarafından hazırlanan **‘‘**MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK FARKLI İŞLEM GÖRMÜŞ ETLERDE TÜR TAYİNİ VE İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU’’ adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği/oy çokluğuyla kabul edilmiştir. 08.02.2021

Jüri Üyeleri	**İmza**
Danışman Prof. Dr. Ömer EREN Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Üye Dr. Öğr. Üyesi Murat TELLİ Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Üye Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Üye Prof. Dr. Hüseyin GENÇCELEP Ondokuz Mayıs Üniversitesi	.....
Üye Prof. Dr. Mustafa KIRALAN Balıkesir Üniversitesi	.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Osman GÖRÜR

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

NURSEL SÖYLEMEZ MİLLİ

ÖZET

MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK FARKLI İŞLEM GÖRMÜŞ ETLERDE TÜR TAYİNİ VE İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU
DOKTORA TEZİ
NURSEL SÖYLEMEZ MİLLİ
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ÖMER EREN)
BOLU, ŞUBAT 2021
xvi+142

Bu çalışmada, sığır (*Bos taurus*) etine farklı oranlarda karıştırılan domuz (*Sus scrofa*) etinin tespiti, SYBR Green temelli gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (SG-qPCR) yöntemiyle yapılmıştır. Domuz ve sığır türü için türe spesifik primerler, mitokondriyal DNA üzerindeki Adenozin trifosfat sentaz alt birimi 8 ve 6 gen bölgelerinden tasarlanmıştır. Domuz primer setinin; sığır, tavuk, at ve eşek türleriyle çapraz reaksiyon vermediği görülmüştür. Çiğ ikili karışım örneklerine; dijital kumpas yardımıyla 6 cm çapında, 0.5 cm yüksekliğinde köfte şekli verilmiştir. Şekillendirilen her 14 grup et örneğinden 10'ar adet köfte elde edilmiştir. Her gruptan 5 adet köfte örneğine 121 ^{0}C'de 15 psi'de 30 dakika boyunca otoklavlama işlemi uygulanmıştır. Çiğ ve ısıl işlem uygulanmış tüm et örneklerinden DNA izolasyonu, ticari bir kitle yapılmıştır. Domuz ve sığır türüne spesifik tasarlanan primerler, çiğ ve ısıl işlem görmüş etler için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Optimizasyon sonunda protokol koşulları: ısıl işlem görmüş örneklerde; 15 µL reaksiyon hacmi, 300 nmol primer konsanstrasyonu, 50 ng/4 µL DNA konsantrasyonu ve 40 döngü, çiğ et örneklerinde ise; 10 µL reaksiyon hacmi, 250 nmol primer konsanstrasyonu, 50 ng/4 µL DNA konsantrasyonu ve 40 döngü olacak şekilde belirlenmiştir. Çalışma, her bir örnek grubu için 3 tekrarlı ve her tekrar 3 teknik tekrarlı olarak yürütülmüştür. Tüm deneme gruplarına ait örneklerin SG-qPCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde yürütülerek hedef bantlar görüntülenmiştir. Buna göre SG-qPCR'de domuz etinin tespit düzeyi ve tespit limiti; ısıl işlem görmüş karışım örneklerinde %0.5 (a/a) ve 0.25 ng/µL, çiğ et karışımlarında ise %0.1 (a/a) ve 0.05 ng/µL olarak tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Domuz Eti, Isıl İşlem Uygulaması, Ette Tür Tayini, Primer Tasarımı, SG-qPCR

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SPECIES AND OPTIMIZATION BY USING MOLECULAR METHODS IN VARIOUS TREATED MEAT
PHD THESIS
NURSEL SÖYLEMEZ MİLLİ
BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEER
(SUPERVISOR: PROF. DR. ÖMER EREN)
BOLU, FEBRUARY 2021
xvi+142

In this study, the detection of pork (*Sus scrofa*) meat mixed into beef (*Bos taurus*) in different proportions was made by SYBR Green-based real-time Polymerase Chain Reaction (SG-qPCR) method. Species-specific primers for porcine and bovine species were designed from the Adenosine triphosphate syntase subunit 8 and 6 gene regions on the mitochondrial DNA. It was observed that the porcine and bovine primers didn't cross-react with each other. Raw binary meat mixture samples were shaped as 6 cm diameter and 0.5 cm high meatballs with the help of a digital caliper. 10 pieces of meatballs were obtained from every 14 groups of meat samples. Autoclaving was applied to 5 meatball samples from each group at 121 ^{o}C at 15 psi for 30 minutes. DNA isolation from all raw and heat-treated meat samples was performed with a commercial kit. Primers designed specifically for porcine and beef were optimized for both raw and heat-treated meats. At the end of the optimization conditions for heat-treated meats; 15 µL reaction volume, 300 nmol each primer concentration, 50 ng /4 µL DNA concentration and 40 cycles, in raw meat samples; 10 µL reaction volume, 250 nmol each primer concentration, 50 ng/4 µL DNA concentration and 40 cycles were determined and analyzes were carried out in SG-qPCR. The study was conducted in 3 repetitions for each sample group and 3 techniques in each repeat. SG-qPCR products of samples belonging to all experimental groups were run on a 2% agarose gel to visualize target bands. In conclusion, the detection level and detection limit of pork in binary meat mixtures by using SG-qPCR were determined as 0.5% (w/w) and 0.25 ng/ µl in heat-treated meats, 0.1% (w/w) and 0.05 ng/µL in the raw meat mixture, respectively.

KEY WORDS: Pork, Heat Treatment, Species Identification, Primer Design, SG-qPCR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI ..... **iii**
ETİK BEYAN ..... **iv**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ ..... **xii**
TEŞEKKÜR ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 Tür Tanımlamada Kullanılan Bazı Protein Tabanlı Teknikler 3
2.1.1 Elektroforez 3
2.1.2 Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) 4
2.2 Spektroskopik Teknikler 7
2.2.1 Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi 7
2.2.2 Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi 8
2.2.3 Raman Spektroskopisi (RS) 9
2.3 Kromotografik ve Kütle Spektrometresi Teknikleri 9
2.4 Elektronik Burun 11
2.5 DNA Tabanlı Yöntemler 12
2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 14
2.5.1.1 Türe Özgü PCR 15
2.5.1.1.1 Singlepleks PCR 16
2.5.1.1.2 Multipleks PCR 21
2.5.1.2 Gerçek Zamanlı PCR 27
2.5.1.3 TaqMan ™ Prob Yöntemi 37
2.5.1.3.1 Floresans Rezonans Enerji Transferi 38
2.5.1.3.2 Moleküler İşaretçiler (Molecular Beacons ™) 39
2.5.1.3.3 SYBR Green Boyası 41
2.5.1.4 Dijital PCR 43
2.5.2 Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) 46
2.5.3 DNA Barkodlama ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) 49
2.5.4 Poliformik DNA'ın Rastgele Amplifikasyonu (RAPD) 51

2.5.5 Restriksiyon Parça Uzunluğu Poliformizm (RFLP) 52
3. MATERYAL VE YÖNTEM 55
3.1 Materyal 55
3.1.1 Et Karışımlarının Hazırlanması ve Analiz Gruplarının Belirlenmesi 55
3.1.2 Primer Tasarımı 55
3.1.3 Primerlerin Özgüllüğü 57
3.2 Yöntem 58
3.2.1 SG-qPCR Analizi 59
3.2.2 DNA İzolasyonu ve Ölçümü 61
3.2.3 Primer Setlerinin Optimizasyonu 62
3.2.4 Isıl İşlem Uygulaması 63
3.2.5 Çiğ Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi 63
3.2.6 Isıl İşlem Görmüş Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi 65
3.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme 66
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 68
4.1 Primer Optimizasyon Sonuçları 68
4.1.1 Primerlerin Spesifitesi 70
4.2 Çiğ Et Karışım Örneklerinde SG-qPCR Analizi 72
4.2.1 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1 SG-qPCR Analizi 72
4.2.2 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2 SG-qPCR Analizi 76
4.2.3 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Grup SG-qPCR Analizi 80
4.3 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi 84
4.3.1 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1 SG-qPCR Analizi 84
4.3.2 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2 SG-qPCR Analizi 88
4.3.3 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG SG-qPCR Analizi 91
4.4 Çiğ ve Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi, Genel Değerlendirme 95
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 103
6. KAYNAKLAR 105
7. EKLER 117
8. ÖZGEÇMİŞ 141
9. ORJİNALLİK RAPORU 142

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. ELISA'nın Şematik Gösterimi. 5
Şekil 2.2. Bazı Et Tür Tespit Teknolojilerinin DNA'ya Dayalı Akış Şeması..... 13
Şekil 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşamaları 15
Şekil 2.4. Gerçek Zamanlı PCR Amplifikasyon Grafiği 28
Şekil 2.5. TaqMan^{TM} Floresan Problarının Mekanizması. 38
Şekil 2.6. Rezonans Floresan Enerji Transferi 39
Şekil 2.7. Moleküler İşaretçi Problarının Mekanizması. 40
Şekil 2.8. Scorpion Etiketli Primerlerin Mekanizması 41
Şekil 2.9. PCR Amplifikasyonu Esnasında SYBR Green Mekanizması..... 42
Şekil 2.10. SYBR Green qPCR'a ait bir amplikonun termal denatürasyon grafiğinden Tm değerinin belirlenmesi 43
Şekil 2.11. ddPCR Analiz Akış Diyagramı 46
Şekil 3.1. % Karışım Oranlarına Ait Örneklerin Analiz Gruplarının Belirlenmesi 57
Şekil 3.2. Domuz, Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerinin Çoklu Hizalaması, Primer Sekans ve Çoğaltılan Bölgenin Gösterimi 58
Şekil 4.1. Domuz ve Sığır Primer Setinin Optimizasyon Aşaması - Gradient PCR Tüm Sıcaklıklar ve EEA 68
Şekil 4.2. Domuz ve Sığır Primer Setinin Optimizasyon Aşaması-Primer setlerinin 51.5 ^{o}C'ye ait Erime Eğrisi Analizi..... 68
Şekil 4.3. Domuz ve Sığıra ait Primer Setlerinin AJE Görüntüsü..... 69
Şekil 4.4. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerine ait Çapraz Reaksiyon Kontrolü-EEA Görüntüsü 70
Şekil 4.5. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerine ait Çapraz Reaksiyon Kontrolü-AJE Görüntüsü 71
Şekil 4.6. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 1. Tekrar SEG 72
Şekil 4.7. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 2. Tekrar SEG 73
Şekil 4.8. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 3. Tekrar SEG 73
Şekil 4.9. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 AJE Görüntüsü..... 75
Şekil 4.10. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 1. Tekrar SEG 76
Şekil 4.11. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 2. Tekrar SEG 77
Şekil 4.12. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 3. Tekrar SEG 77
Şekil 4.13. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 AJE Görüntüsü..... 79
Şekil 4.14. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 1. Tekrar SEG..... 80
Şekil 4.15. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 2. Tekrar SEG..... 81
Şekil 4.16. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 3. Tekrar SEG..... 81
Şekil 4.17. Çiğ Et Karışım Örneklerinde KG AJE Görüntüsü 83
Şekil 4.18. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 1. Tekrar SEG..... 84
Şekil 4.19. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 2. Tekrar SEG..... 85
Şekil 4.20. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 3. Tekrar SEG..... 85
Şekil 4.21. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1 AJE Görüntüsü 87

Şekil 4.22. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 1. Tekrar SEG..... 88
Şekil 4.23. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 2. Tekrar SEG..... 88
Şekil 4.24. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 3. Tekrar SEG..... 89
Şekil 4.25. Isıl İşlem Uygulanmış Et Karışım Örnekleri DG-2 AJE Görüntüsü .. 91
Şekil 4.26. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 1. Tekrar SEG 92
Şekil 4.27. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 2. Tekrar SEG 92
Şekil 4.28. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 3. Tekrar SEG 92
Şekil 4.29. Isıl İşlem Uygulanmış Et Karışım Örnekleri KG AJE Görüntüsü 94

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Domuz ve bazı diğer türlere ait singlepleks PCR çalışmaları 17
Tablo 2.2. Domuz ve bazı diğer türlere ait multipleks PCR çalışmaları 24
Tablo 2.3. Domuz türlerine ait singlepleks ve multipleks PCR çalışmaları 27
Tablo 2.4. Domuz türüne ait qPCR'da yapılan prob tabanlı bazı singlepleks ve multipleks çalışmalar 34
Tablo 2.5. Domuz türüne ait qPCR'da yapılan interkolasyon boya tabanlı bazı singlepleks ve multipleks çalışmalar 35
Tablo 3.1. Domuz ve Sığır Eti % Karışım Oran ve Miktarları 56
Tablo 3.2. Domuz ve Sığır Türüne ait Primer Sekansları 57
Tablo 3.3. Domuz ve Sığır Türlerine ait Primerlerin SG-qPCR Protokol Optimizasyon ve Mastermiks Hazırlık Aşaması 63
Tablo 3.4. Çiğ Et Karışım Örneklerinde SG-qPCR Analizi Protokol 64
Tablo 3.5. Isıl İşlem Uygulanan Örneklerde SG-qPCR Analizi Protokol 65
Tablo 4.1. Domuz ve Sığır Primer Seti 51.5 ºC EEA Verileri 69
Tablo 4.2. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerinde Çapraz Reaksiyon Kontrolü- EEA Verileri Kontrolü- EEA Verileri 71
Tablo 4.3. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 Tüm Tekrar ve SS Değeri 74
Tablo 4.4. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 Tüm Tekrar ve SS ortalaması 78
Tablo 4.5. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG Tüm Tekrar ve SS Değeri 82
Tablo 4.6. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, Tüm Tekrar ve SS Değeri 86
Tablo 4.7. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, Tüm Tekrar ve SS Değeri 90
Tablo 4.8. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, Tüm Tekrar ve SS Değeri 93
Tablo 4.9. Çiğ ve Isıl İşlem Gören Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli E, r^2 ve Eğim Değerleri 96
Tablo 4.10. Çiğ Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli SS ve Cq Değerleri 97
Tablo 4.11. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli SS ve Cq Değerleri 98

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

% : Yüzde

μL : Mikrolitre

2-DE : Two Dimensional gel Electrophoresis(İki Boyutlu jel Elektroforez)

a/a : ağırlık/ağırlık

ANN : Artificial Neural Network (Yapay Sinir Ağları)

ATPase : Adenosine Triphosphatase (Adenozin Trifosfataz)

ATR : Attenuated Total Reflectance (Zayıflatılmış Toplam Yansıtma)

BOLD : Barcode of Life Data Systems (Yaşam Veri Sistemleri Barkodu)

bp : base pair (baz çifti)

CA : Cluster Analysis (Kümeleme Analizi)

cdPCR : chamber digital Polymerase Chain Reaction (Bölmeli dijital PCR)

CGE : Capillary Gel Electrophoresis (Kapiler Jel Elektroforez)

CIEF : Capillary Isoelectric Focusing (Kapiler İzoelektrik Odaklama)

cm : santimetre

COX-I : Cytochrome c oxidase subunit I (sitokrom c oksidaz alt birim I)

COX-II : Cytochrome c oxidase subunit II (sitokrom c oksidaz alt birim II)

COX-III : Cytochrome c oxidase subunit III (sitokrom c oksidaz alt birim III)

Cq : quantification Cycle (kantifikasyon Döngüsü)

Ct : Cycle threshold (Döngü eşiği)

Cy-5 : Cyanine-5 (Siyanin-5)

cyt-b : Cytochrome b (Sitokrom b)

Da : Dalton

DA : Discriminant Analysis (Diskiriminant Analizi)

ddPCR : droplet digital Polymerase Chain Reaction (Damlacık dijital PCR)

D-loop : Displacement-Loop (Yer Değiştirme Döngüsü)

DNA : Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)

dPCR : digital Polymerase Chain Reaction (Dijital PCR)

EB : Ethidium Bromide (Etidyum Bromür)

ECL : Electrochemiluminescence (Elektrokemilüminesans)

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)

FAM : Carboxyfluorescein (Karboksifloresein)

fg : femtogram

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer (Floresans Rezonans Enerji Transferi)

FTIR : Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümü Kızılötesi)

GC : Gas Chromatography (Gaz Kromatografi)

HCA : Hierarchical Cluster Analysis (Hiyerarşik Kümeleme Analizi)

H-FABS : Heart-Type Fatty Acid Binding Protein (Kalp Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)

GDO : Genetiği Değiştirilmiş Organizma

HRM : High Resolution Melting (Yüksek Çözünürlüklü Erime)

HSP-27 : Heat Shock Protein-27 (Isı Şoku Proteini-27)

IDT : Integrated DNA Technologies (Entegre DNA Teknolojileri)

IEF : Isoelectric Focusing (İzoelektrik odaklama)

ITS : Internal Transcribed Spacer (Dahili Yazılı Ara Parçası)

KNN : K-Nearest Neighbor (K-En Yakın Komşu Analizi)

LAMP : Loop Mediated Isothermal Amplification (Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon)

HS : Head Space (Tepe Boşluğu)

LC : Liquid Chromatography (Sıvı Kromatografi)

LDA : Linear Discriminant Analysis (Lineer Diskiriminant Analizi)

LFD : Lateral Flow Device (Yanal Akış Cihazı)

LINE-1 : Long Interspersed Nuclear Elements (Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elemanlar)

LNA : Locked Nucleic Acid (Kilitli Nükleik Asit)

LOD : Limit of Detection (Algılama Limiti)

LOQ : Limit of Quantification (Ölçüm Limiti)

LRM : Low Resolution Melting (Düşük Çözünürlüklü Erime)

m/z : mass-to-charge ratio (kütle/yük oranı)

MAbs : Monoclonal Antibodys (Monoklonal Antikorlar)

MLC : Myosin Light Chain (Miyozin Hafif Zinciri)

MS : Mass Spectrometry (Kütle Spektrometresi)

mtDNA : mitochondrial Deoxyribonucleic Acid (mitokondrial DNA)

ng : nanogram

NGS : Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Sıralama)

NIR : Near Infrared (Yakın Kızılötesi)

nm : nanometre

NTC : None Template Control (Şablon DNA yok)

OCPLS : One-class Classifier variant of the Partial Least Squares (Kısmi En Küçük Karelerin tek sınıflı Sınıflandırıcı varyantı)

PAbs : Polyclonal Antibodys (Poliklonal Antikorlar)

PCA : Principal Component Analysis (Temel Bileşenler Analizi)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

pg : pikogram

pH : potential of Hydrogen (Hidrojen potansiyeli)

pI : Isoelectric Point (İzoelektrik Noktası)

PLS : Partial Least Squares (Kısmi En Küçük Kareler)

PLSR : Partial Least Squares Regression (Kısmi En Küçük Kareler Regrasyon)

POD : Probability of Detection (Tespit Olasılığı)

psi : Pounds per square inch (İnç kare başına pound)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (kantitatif PolimeraZ Zincir Reaksiyonu)

Q-TOF : Quadrupole Time of Flight (Dörtlü Uçuş Süresi)

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA (Polimorfik DNA'nın Rastgele Amplifikasyonu)

rDNA : ribosomal Deoxyribonucleic Acid (ribozomal Deoksiribonükleik Asit)

RFLP **:** Restriction Fragment Length Polymorphism (Kısıtlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi)

RMSEC **:** Root Mean Square Error of Calibration (Kalibrasyonun Kök Ortalama Kare Hatası)

RNA : Ribonucleic Acid (Ribonükleik asit)

rRNA : ribosomal Ribonucleic Acid (ribozomal Ribonükleik Asit)

RS : Raman Spectroscopy (Raman Spektroskopisi)

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

SIMCA : Soft Independent Modeling of Class Analogy (Sınıf Analojisinin Yumuşak Bağımsız Modellemesi)

SS : Standart Sapma

SSCP-PCR : Single Strand Conformation Polymorphism-PCR (Tek Telli Konformasyon Polimorfizmi-PCR)

SVM : Support Vector Machine (Destek Vektör Makinesi)

TAMRA : 6-carboxy-tetramethylrhodamine (6-karboksi-tetrametilrhodamin)

TG : Triglyceride (Trigliserid)

Tm : Temperature of Melting (Erime Sıcaklığı)

Tn I : Troponin I

uHPLC : ultra High Performance Liquid Chromatography (ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)

UV : Ultraviolet (Ultraviyole)

v/v : volume /volume (hacim/hacim)

w/w : weight/weight (ağırlık/ağırlık)

TEŞEKKÜR

Akademik hayatım süresi boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden fazlasıyla istifade ettiğim, birlikte çalışmış olmaktan onur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Ömer EREN Hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süreci boyunca engin tecrübeleriyle çalışmama yön veren başta Dr. Öğr. Üyesi Murat TELLİ hocam olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Ercan Selçuk ÜNLÜ, Prof. Dr. Hüseyin GENÇCELEP, Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN ve Prof. Dr. Mustafa KIRALAN hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma arkadaşlığından çok manevi desteklerini her daim üzerimde hissettiğim Dr. Sanaz LAKESTANİ ve Dr. Bahram SARKARATİ Hocalarıma ve BETUM'da sunduğu olanaklar için Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR Hocama teşekkür ederim.

Sizler olmasaydınız olmazdı dediğim; AİLEM ve ailemizin bir parçası olan manevi kız kardeşim Aslı YILDIRIM'a, oğlumuzun manevi anneannesi ve dedesi sayın Ayşe ve Kemal ERTÜRK ailesine sonsuz şükran ve minnettarlığımı sunarım.

Değeri ve önemini cümlelerle anlatamayacağım sevgili yavrumuz Yavuz Selim ve eşim Mehmet MİLLİ'ye sabır ve anlayışı için sonsuz minnet ve teşekkürlerimle...

Bu doktora tezi çalışması, "Moleküler Yöntemler Kullanılarak Isıl İşlem Görmemiş Etlerde Tür Tespiti Üzerine Bir Araştırma" isimli ve 2017.09.04.1123 nolu proje olarak Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir. Tüm analizler, Bilimsel Endüstriyel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BETUM) yürütülmüştür.

1. GİRİŞ

Et ve et ürünleri, tarih boyunca insanoğlunun beslenmesinde önemli ve vazgeçilmez bir yer edinmiştir. Günümüzde bu durum geçerliliğini korumaktadır. Öyle ki, önümüzdeki 10 yıl içinde sadece sığır eti tüketiminin 76 milyon metrik tona ulaşacağı öngörülmektedir. Bu durumun toplam et tüketiminin %16'sını oluşturduğu belirtilmektedir. 2019-2029 FAO verilerine göre, önümüzdeki 10 yıl içinde özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun artacağı, buna bağlı olarak gelişmekte olan ülkelerin gelişmiş ülkelerden yaklaşık 5 kat daha fazla et tüketim hacmine sahip olacağı rapor edilmiştir. Ancak, gelişmekte olan ülkelerde et tüketimin hızı, gelişmiş ülkelere göre 3 kat daha artış göstereceği yönündedir (1).

Ülkemizde, 2018 yılı kişi başı kırmızı et tüketimi 14.84 kg seviyesinde gerçekleşmiş, bunun 13.3 kg'ını sığır eti oluşturmuştur (2). Çeşitli nedenlerden dolayı 2019 yılında, 26 milyon 635 bin ABD Doları tutarında 55.752 ton sığır eti ithal eden ülkemizde bu durum, tüketicinin alım gücüne yansımaktadır (1). Et ve et ürünlerinin üretim maliyetlerinin diğer gıda ürünleri grubuna göre yüksek olmasından dolayı, bazı üreticilerin bu ürünlerde çeşitli tağşiş/hile yaptığı görülmektedir. Bu hileleri daha çok, kaliteli et yerine daha ucuz etlerle ikame edilmesi olarak görülmektedir. Bu durum, haksız ekonomik kazanç ve üreticiler arasında haksız rekabete neden olsa da tüketiciler açısından farklı konularda endişe kaynağıdır. Tüketicinin ne yediğini bilmek istemesi özlük haklarından biridir ve kişide sağlık problemlerine neden olabilir (zoonotik hastalık riski, toksisite, alerjik durum vb). Bununla birlikte dini inancı gereği tüketmemesi gereken yiyecek/gıdanın farkında olmadan yemesi de etik dışıdır.

Özellikle son yıllarda tüketici tarafından gıda özgünlüğü konusunda artan farkındalık, beraberinde gıda ürününün doğrulanmasını, etikette kasıtlı/kasıtsız belirtilmeyen maddelerin tespit edilmesini zorunlu kılmaktadır. Gıda ürünlerinden özellikle et ve et ürünlerinin kimlik doğrulanması için çeşitli analitik yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları; fiziko-kimyasal (3), immunolojik (4–7), elektroforetik (8–10), kromotografik (11,12), spektroskopik (13–15), proteine dayalı yöntemler (16–18), genomik temelli yaklaşımlar (19–27) ve ayrıca son yıllarda üzerinde daha çok durulan nano-biyosensörler (27,28) olarak yer almaktadır.

Özellikle genomik temelli yaklaşımlardan biri olan PCR yöntemi, zorlu koşullarda DNA'nın stabilitesi nedeniyle diğer yöntemlere göre daha duyarlıdır. Bu nedenle, DNA tanımlama teknikleri adli tıp, teşhis ve gıda analizi için muazzam bir potansiyele sahiptir (29). Araştırmacılar tarafından çeşitli DNA tabanlı tekniklerden bazıları; diziye özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (30–34), gerçek zamanlı PCR olarak da bilinen kantitatif PCR (qPCR) (35–37), PCR-Kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) (38–43), PCR- Rastgele büyütülmüş polimorfik DNA (PCR-RAPD) (44–48), ddPCR (Droplet Dijital PCR) (49–53), DNA Barkodlama (54) olarak önerilmiştir.

Gıda güvenliğinin sağlanması, ulusal ve uluslararası mevzuatlarla sağlanmaya çalışılmaktadır (38,55). Ancak ülkemizde özellikle gıdalarda yapılan taklit ya da tağşişin tespit edilmesi ve giderilmesine ilişkin yaptırımların iyileştirilmesi gerekmektedir. Yaklaşık %90'ı Müslüman olan ülkemizde, özellikle ithal ürünlerin kimlik doğrulaması önemli bir konudur. Buna ilişkin tespit yöntemlerinin iyileştirilmesi ve bu yöntemlerin basit, hızlı, ucuz ve güvenilir olması gerekmektedir (56–59).

Bu tezde; tarafımızca mitokondriyal DNA üzerinden, at, eşek, tavuk ve sığır türleriyle çapraz reaksiyon vermeyen domuz türüne spesifik primer tasarlanmıştır. Ülkemizde çoğu kontrol laboratuvarlarında et tür tayininde prob temelli qPCR tekniği kullanılmaktadır. Bu yönteme alternatif olarak, maliyeti en az 4 kat daha uygun olan SYBR Green temelli bir qPCR yöntemi ile sığır etine belirli oranlarda karıştırılan domuz etinin çiğ ve ısıl işlem görmüş (otoklavlanmış) ikili karışımlarında domuz etinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tür Tanımlamada Kullanılan Bazı Protein Tabanlı Teknikler

Proteinler, moleküler ağırlığı 5000 Da'dan az olmayan, peptit bağıyla bağlanan, amino asitlerden oluşan iyi organize edilmiş makro biyomoleküllerdir. Peptidler ise amino asitlerden oluşan, molekül ağırlığı 5000 Da'dan az olan kısa zincirli molekülleridir. Proteinler, çeşitli işlevleri yerine getirmek için tüm organizmaların temel bileşenleridir. Proteinler; i) enzimler olarak, ii) hücrelerin şeklini ve bir organizmanın duruşunu korumak için yapısal ve mekanik bileşenler olarak, iii) hücre sinyallemesinde düzenleyiciler ve taşıyıcılar olarak, ıv) savunma mekanizmalarında uyaranlara yanıt verenler olarak bulunur (16).

Her türde genler (genom), ifade edilen proteinlerin amino asit bileşimini, miktarını ve sentez oranını önceden belirler (10). Bir organizmanın proteomu, genomunun ekspresyonunun bir sonucu olduğundan, proteinlerin analizi tür tanımlama amacıyla sıklıkla önerilmiştir. Et ve et ürünü doğrulama çalışmaları için elektroforetik, kromatografik ve immünokimyasal teknikler dahil olmak üzere farklı protein tabanlı metodolojiler önerilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin uygunluğu değerlendirilirken, protein bileşiminin yalnızca türler arasında değil, doku türü, hayvanın yaşı ve cinsiyeti, et işleme teknikleri ve raf ömrü gibi diğer birçok faktörle de değişebileceği dikkate alınmalıdır (16,17). Protein bazlı yöntemlerin tür tanımlamasına uygulaması, genellikle işlenmiş et ürünlerine göre çiğ et ürünlerinde daha iyi sonuçlar verir (9,10,16,17,60–62). Protein tabanlı bazı teknikler bu bölümde açıklanmıştır.

2.1.1 Elektroforez

Elektroforez, elektrik alanı kullanımına dayanan, proteinlerin kas dokusundan çıkarıldıktan sonra farklı modellere ayrılması için kullanılan güçlü bir tekniktir. Elektroforetik hareketlilikteki farklılıklar, izoelektrik nokta, moleküler boyut veya bunların bir kombinasyonu gibi protein ayırma için kullanılan prensibe göre farklı elektrokinetik ayırma tekniklerini içerir (60). Elektroforez işlemi; sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), izoelektrik odaklama (IEF), iki boyutlu elektroforez (2-DE), kapiler jel elektroforezi (CGE) ve kapiler izoelektrik odaklanma (CIEF) gibi küçük dar kapilerlerde gerçekleştirilebilir. Kütle spektrometresi (MS) tarafından gerçekleştirilen proteomik çalışmalarda ve farklı DNA (Deoksiribonükleik Asit) tabanlı

yöntemlerde rutin bir araç olarak kullanılmasının yanı sıra, et tür tanımlama çalışmalarında da uygulanmıştır (9,61).

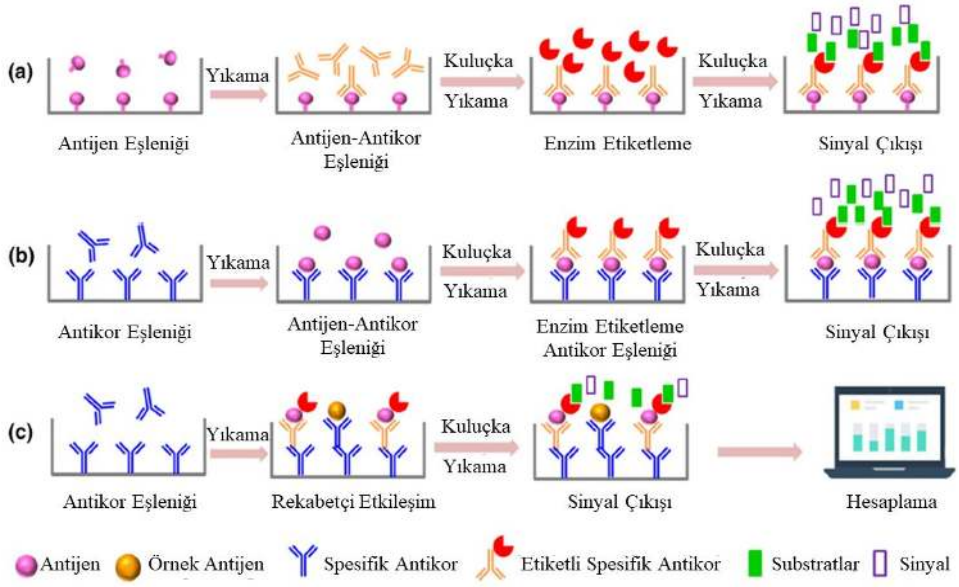
İki boyutlu elektroforez (2-DE) sayesinde, ilgili etlerin türünü belirlemek mümkündür. Diğer bir avantajı, binlerce proteini aynı anda tek bir jelde ayırma kabiliyetidir. Bu nedenle 2-DE, domuz etini diğer etlerden ayırmak için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Montowska ve Pospiech 2012 yılında yaptıkları çalışmada, 6 farklı hayvanın (sığır, domuz, tavuk, hindi, ördek ve kaz) çiğ etinde miyozin hafif zincir (MLC) izoformlarının ekspresyonundaki farklılıkları gözleyerek, bu proteinin et ürünlerinde korunup korunmadığını 2-DE analizi yaparak belirlemeye çalışmıştır. Belirlenen türlerden yapılan kıyma (16 varyant), frankfurter ve sosis (15 ürün) karışımlarından elde edilen MLC'lere 2-DE sonrası görüntü analizi uygulanmıştır. Görüntü analizine göre, et karışımlarında %10'un üzerindeki konsantrasyonlarda türlerin tanımlanabileceği bilgisi verilmiştir. Bununla birlikte MLC izoformlarının, analiz edilen altı türden yapılan et ürünlerinin bireysel olarak doğrulanmasında, belirteç olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir (9). Aynı yazarların yaptıkları farklı bir çalışmada bu kez, seçilen aynı tür hayvanların (sığır, domuz, tavuk, hindi, ördek ve kaz) bireysel türleri farklılaştıran, ancak yaşlanma sırasında nispeten stabil olan ve teknolojik işlemede çok az bozulan proteinlerini araştırmışlardır. Bunun için düzenleyici proteinler, metabolik enzimler, bazı miyofibriler ve kan plazması proteinleri hedeflenmiştir. Seçilen proteinler 2-DE'de analiz edilmiş ve düzenleyici protein grubundan olan HSP27, H-FABP'nin incelenen türler arasındaki elektroforetik hareketlilikte farklılık gösterdiği bulunmuştur. Böylece bu proteinlerin bireysel ve çiğ ette; sığır, domuz, tavuk ve hindi türü tespitinde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (61).

İzoelektrik odaklama (IEF), proteinleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırır ve türe özgü protein modellerini sağlar. Rozycki ve arkaşları (2018), %4 seviyesinde sığır etinde ve %1 seviyesinde kanatlı etinde bir katkı olarak kullanılan domuz etinin varlığını tespit etmek için IEF'yi kullanmışlardır. pI değerinin ölçümü, IEF foregramları üzerindeki protein bandı modelinin stabilitesini doğruladığını belirtmişlerdir (18).

2.1.2 Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

ELISA, belirtilen ilgili proteini antijen-antikor reaksiyonları yoluyla renk değişiklikleri ile ölçmek için kullanılan bir immünoassay tekniğidir (Şekil 2.1.).

Antijen, bir numunede bulunan proteindir, antikor ise spesifik olarak antijene bağlanır veya bunun tersi olur. Birincil ve ikincil antikorlar arasındaki enzimatik reaksiyonların miktarı ile nicelendirilir (5,7). ELISA, uzman olmayan personel tarafından yapılabilmesi, kısa sürede çok sayıda numuneyi işleme imkanı, yüksek hassasiyet ve uygun maliyet gibi avantajları nedeniyle et kimlik doğrulama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (63,64). İmmünolojik bir test olan ELISA'nın yaygın olarak kullanılan iki formundan biri dolaylı ELISA (7) diğeri sandviç ELISA (65)'dır. Hem poliklonal (PAbs) hem de monoklonal (MAbs) antikorlar, daha önce tarif edilen gıda doğrulaması için ELISA varyantlarında kullanılmaktadır (66). Poliklonal antikorlar (PAbs) denatüre proteinlerin saptanmasında; farklı epitopların geniş bir şekilde tanınmasını, antijenlerin denatürasyonu ve polimerizasyonu gibi küçük değişikliklere daha fazla tolerans sağladıkları için daha çok tercih edilmektedir. Öte yandan, monoklonal antikorlar (MAbs) hibridoma teknolojileri ile homojen bir şekilde üretilebilir ve tutarlı özgüllük ile iyi tanımlanmış biyolojik işleve sahip olabilir (5,17).



Şekil 2.1. ELISA'nın Şematik Gösterimi (a): Doğrudan ELISA, (b): Sandviç ELISA, (c): Rekabetçi ELISA (67).

Ayaz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2006), 100 adet farklı et ve et ürününde monoklonal antikor tekniği ile hazırlanan enzim bağlantılı immünosorbent ticari test kitleri (ELISA-TEK) ile tür tespiti testi yapmışlar ve 100 farklı ürünün %22'sinin Türk Gıda Kodeksine uygun olmadığını ortaya koymuşlardır. Uyguladıkları bu yöntemin gıda kontrol laboratuvarlarında uygulanabileceğini belirtmişlerdir (63).

Troponin I proteini, ısıya dayanıklı termostabil marker olarak ELISA testlerinde ısıl işlem görmüş et ve ürünlerinde kullanılmaktadır (7). Liu ve arkadaşları (2006), hedef protein olarak ısıya dayanıklı termostabil Troponin I proteinini kullanarak ısıl işlem görmüş ve görmemiş et karışımlarında sandviç monoklonal antikor ELISA tekniği ile çiğ, pişmiş ve otoklavlanmış tavuk eti içerisinde %0.05 domuz eti, çiğ sığır eti içerisinde %0.05 domuz eti, pişmiş ve otoklavlanmış sığır eti içerisinde ise %0.1 domuz etini tespit edebilmişlerdir (65). Zvereva ve arkadaşları tarafından (2015), Troponin I proteini hedeflenerek çiğ et ve ürünlerinde sığır, domuz, kuzu ve at türü sandviç ELISA tekniği ile belirlenmeye çalışılmıştır. Hedef türlerin tespit limitinin (LOD) 8.7-52 ng/ml arasında olduğu belirtilmiştir (68).

Mandli ve arkadaşları (2018), yüksek afiniteli anti-domuz IgG poliklonal antikorunu rekabetçi ve direkt ELISA tekniklerinde kullanılarak çiğ sığır eti içerisinde domuz eti varlığını tespit etmeye çalışmışlardır. Direkt ELISA tekniği ile 14 saat 15 dakikada tağşiş seviyesini %0.01, rekabetçi ELISA tekniği ile 45 dakikada %0.1 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, elektrokimyasal immünosensörlerin iki formatı kullanılarak % tespit limitlerini daha da detaylandırmışlardır. İlk olarak, doğrudan bir immünosensör ile 2 saat içinde çiğ ette %0.1 ve pişmiş ette %1 domuz etini, rekabetçi immünosensörle ise çiğ ette 20 dakikada domuz etinin %0.01'ini tespit edebildiğini belirtmişlerdir (6).

Yanal akış testleri (Lateral Flow Device-LFD) immünolojik testlerden biridir ve et tür tanımlamalarında son yıllarda kullanılmaktadır (62). Masiri ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, immünolojik temelli yanal akış cihazı testi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu testle domuz eti varlığını, yaklaşık 35 dakika kadar kısa bir sürede çiğ etten (serum albümin proteini hedeflenerek) %0.01, pişmiş etten (termostabil proteini hedeflenerek) ise %1 düzeyinde tespit edebildiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışma, ticari bir ELISA kiti ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar gözlenmiştir (69).

ELISA'nın dezavantajlarından biri, tespit limitinin tağşiş olarak değerlendirilen et seviyesini belirlemede yetersiz kalabilmesidir. Ayrıca, poliklonal antikorların kullanımı değişken afinite ve çapraz reaktivite gibi sınırlamalar sunar. Diğer bir sınırlama ise hedef proteinlerin bazen gıda işleme sırasında denatüre olmasıdır. Bu nedenle, hedef proteinin epitopu, antikorlar tarafından saptanabilen durumda mevcut olmayabilir (62,70).

2.2 Spektroskopik Teknikler

Spektroskopik temelli yaklaşımlar, numunede tahribata ve değişikliğe neden olmadan moleküllerin kimyasal yapısı hakkında hızlı bir şekilde bilgi verir. Bu nedenle son yıllarda, birçok et tür doğrulama çalışmalarında kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmaların çoğu; et karışımlarından ziyade, tek türe ait çiğ etlerin belirlenmesini amaçlamaktadır (17).

Kemometri, veri setinden istatistiksel ve matematiksel yöntemler kullanarak objektif veri değerlendirmesi sunan kimyasal bir disiplindir (71). Kemometri, spektroskopik ve kromatografik verilerin kalibrasyon analizinde güçlü araçlar sağlar (72–75). Bu sayede bir çok spektroskopik ölçüm, çoğunlukla kemometrik yöntemlerle birleştirilerek gıda orijini tespitinde kullanılmaktadır. Spektral verilere uygulanabilen kalitatif-kantitatif analizler arasında; yapay sinir ağları (ANN), küme analizi (CA), diskriminant analizi (DA), ayırt edici kısmi en küçük kare (DPLS), K-en yakın komşular (KNN), doğrusal ayırt edici analiz (LDA), temel bileşen analizi (PCA), sınıf antolojisinin yumuşak bağımsız modellemesi (SIMCA) ve destek vektör makinesi (SVM) sayılabilir (76).

2.2.1 Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi

NIR spektroskopisi, 780 ila 2500 nm (12.500-4.000 cm^{-1}) spektral aralığını kullanır. Elektromanyetik spektrumun NIR bölgesi, O-H, C-H, C-O ve N-H gibi moleküler bağların titreşimleri ile ilgili olarak absorpsiyon bantları oluşturmaktadır (75–77). Her madde, tanımlanmasına ve farklılaşmasına izin veren bir parmak izi olan karakteristik bir spektrum sunar (78,79). NIR spektroskopisinin et ve et ürünlerinin içeriğinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Rady ve Adedeji (2018), kıyılmış sığır eti ve domuz etindeki tağşiş maddelerini hızlı ve doğru bir şekilde tespit etmek için kısmi en küçük kareler diskrimant analizi (PLS-DA) ve bir makine öğrenme algoritması olan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLSR) kullanmışlardır. Saf veya karıştırılmış numunelerin sınıflandırma oranlarını %100'e yakın bulmuşlardır (79).

Pieszczeka ve arkaşları (2018), NIR spektroskopisi ile yaptıkları bir çalışmada, kıyma etini tür kökenine (kuzu-sığır ve domuz) göre sınıflandırmak için; kısmi en küçük kareler yönteminin bir sınıf sınıflandırıcı varyantı (OCPLS) ve SIMCA modelleme tekniklerini kullanmışlar ve birbirlerine göre durumlarını karşılaştırmışlardır. Teknikler arasında önemli bir fark gözlenmemiş ancak, OCPLS

modeli daha hassas bulunmuştur. Her iki modelleme tekniği de belirlenen türlerin tespitinde araştırmacılar tarafından başarılı bulunmuştur (80).

Barbin ve arkadaşları (2020), NIR spektroskopisinin, çiğ ve işlenmiş et ürünlerinde hindi etini ayırt etmede ileriye dönük bir teknik olduğunu belirtmişlerdir. 400 ila 2500 nm dalga boylarındaki spektral bilgiler elde edilmiş ve bu verileri kalite kontrol ve kimlik doğrulama için işlemişlerdir. Spektrum bilgileri, PCA, numuneler ise LDA kullanılarak sınıflandırılmıştır. Bulgular, NIR spektroskopisinin hindi etinin kalite değerlendirmesi için uygun bir araç olduğunu göstermiştir (81).

2.2.2 Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi

Et ve et ürünlerinin orijinlik tespitinde kullanılan başka bir spektroskopik yöntem ise matematiksel bir teknik olan Fourier dönüşümünü kullanan Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisidir. FTIR spektroskopisi et kimlik doğrulama çalışmaları dışında; süt (82), bal (83,84), tahıl (85) ve bitkisel ürünlerin (86) kimlik doğrulama çalışmalarında da uygulanmaktadır. Bununla birlikte FTIR spektroskopisi, hızlı, tahribatsız, uygun maliyetli ve hassas fizikokimyasal parmak izi yöntemini kemometrik tekniklerle birleştirilerek, gıdalarla ilgili yapısal veya fonksiyonel çalışmalar için değerli bir analitik teknik haline gelmiştir (14).

FTIR spektroskopisinde, dana köftesinde domuz etinin tespiti ve miktarının belirlenmesi için hızlı ve tahribatsız bir teknik geliştirmeyi amaçlayan Rohman ve arkadaşları (2011), zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) tekniği ile kısmi en küçük kareler (PLS) kalibrasyonu kullanmışlardır. PLS'nin seçilen parmak izi bölgesindeki (1200-1000 cm^{-1}) domuz eti seviyesini ölçmek için başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir (15).

Domuz etinin, sığır eti ürünleri ya da maaliyeti daha yüksek diğer ürünlere kasıtlı olarak katılması, ekonomik sebeplerden dolayı sıklıkla rastlanan bir durumdur. Kurniawati ve arkadaşları, köfte suyundaki domuz yağı analizi için PLS ve PCA kemometrisi ile birlikte FTIR spektroskopisi kullanmış ve domuz yağı, 1018-1284 cm^{-1} dalga boyu bölgesinde kantitatif olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar seçilen bu parmak izi bölgesinin, köfte suyunda domuz yağı kantitatif analizi ve sınıflandırması için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Kantifikasyon için elde edilen belirleme katsayısını (r^2) ve kalibrasyonun kök hata kareler ortalaması (RMSEC) değerlerini sırasıyla %0.9975 ve %1.34 (v/v) olarak bulmuşlardır (87).

Bu teknik, et ürünlerinden sadece domuz etinin tespitinde değil, aynı zamanda ekonomik değer kaygısına neden olacak diğer et türlerinin tespitinde de çalışılmıştır. Böyle bir çalışma, çiğ sığır etine belirli oranlarda (%0-5-10-20-40-100) karıştırılan hindi ve tavuk eti tespiti için gerçekleştirilmiştir. FTIR ile birlikte hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve PCA kemometri teknikleri birlikte kullanılmıştır. Araştırmacılar bu tekniklerden PCA'nın HCA tekniğine göre daha iyi tanımlama gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir (88).

2.2.3 Raman Spektroskopisi (RS)

Raman spektroskopisi, bir maddenin yapısı veya özellikleriyle ilgili önemli bilgiler edinmek için, ışığın madde ile etkileşiminden yararlanan moleküler bir spektroskopik tekniktir. Raman spektroskopisi, kimyasal ve organik molekül türlerini ve moleküller arası titreşimlerle ilgili bilgiler verir (78). Boyacı ve arkadaşları, çeşitli gıda örneklerinden elde edilen Raman bantlarından bir veritabanını oluşturmaya çalışmışlardır (72). Raman spektroskopisi ile domuz yağından tağşiş çalışmalarının mevcut olduğu (89), ancak domuz etinden tağşişin belirlenmesi adına yapılan çalışma ya da raporların nadir olduğu belirtilmektedir (62).

Biasio ve arkadaşları (2015), kırmızı (domuz, koyun, sığır ve at) ve beyaz et (tavuk, hindi) gruplarından bazı türlerin tespitini mikro-raman spektroskopisinde farklı veri normalleştirme ve sınıflandırma yöntemleri kullarak tespit etmişlerdir. Çiğ etlere uyguladıkları bu yöntemde, kırmızı et grubunun, beyaz et grubundaki türlere nazaran %15 hata payıyla tespit edilebildiğini ancak bu gruplar içindeki türleri ayırt etmek için gelişmiş bir kemometrik modelin gerekli olduğunu belirtmişlerdir (90).

Boyacı ve arkadaşları (2014), farklı oranlarda sığır etine karıştırdıkları at etinin (%25-50-75 (a/a)) tespiti için Raman spektroskopisinin kemometri ile kombinasyon halinde kullanımına dayanan yeni bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Kırk dokuz et örneğinden ekstrakte edilen saf yağ örneklerine ait Raman spektrum verileri, PCA analizi ile gerçekleştirilmiş ve yüksek doğrulukta sığır ve at etininin tanımlaması sağlanmıştır (91).

2.3 Kromotografik ve Kütle Spektrometresi Teknikleri

Gıda ürünlerindeki hedef bileşenlerin tespiti ve miktarının belirlenmesinde kromatografi ve MS kullanımı yaygın olmakla birlikte oldukça hassas ve spesifiktir (16). Kimyasalların ayrıştırılmasını, kalitatif ve kantitatif analizini sağlama

kapasitesi nedeniyle, kromatografiye dayalı yöntemler, gıda kimlik doğrulamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağ asidi bileşimi, protein profilleri ve diğer biyokimyasal moleküller üzerine yapılan çalışmalarda genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi (LC), gaz kromatografisi (GC), ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (uHPLC) gibi kromotagrafik sistemler ve bu sistemlerin farklı dedektörlerle kombinasyonları kullanılmaktadır (92,93).

Kütle spektrometresi, bir numune veya analitin iyonize edilmesi ve iyonize edilen bu iyonların kütle/yük oranının sıralanmasını esas alan analitik bir tekniktir. MS kısaca; bilgisayara bağlı iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve iyon dedektörü olmak üzere üç parçadan oluşur. Numuneler önce iyonize edilerek şarj edilir. Kütle analizörü, bu iyonların kütle ve yüklerine (m/z) bağlı olarak saptırılmasına izin verir. Ardından iyon dedektörü, hassasiyeti artırmak için dedektör plakasına çarptığında iyonları çoğaltır. MS, m/z spektrumlarını veritabanları aracılığıyla işler (62).

İşlenmiş ve işlenmemiş etlerde domuz etinin tespiti, yağı veya protein profili analizi yapılarak tespit edilebilmektedir. Et yağı, trigliseritler (TG'ler) için HPLC ile ve yağ asitleri GC ile analiz edilebilir. İlk çalışmalarda, 11,14-eikosadienoik asit (C20: 2) mevcudiyeti, sığır ve koyun etinde domuz yağındaki tağşişin saptanması için belirteç olarak kabul edilmiş ancak, daha sonra yapılan çalışmada türlerde eikosadienoik asit içeriğinin değişken olmasından kaynaklı olarak tür tespitinde tek başına bu parametrenin yeterli olamayacağı kanıtlanmıştır (11).

Önceden gıda örneklerinde GC analizi ile domuz türünün tespit edilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, domuz yağında bulunan C20:2 yağ asidi marker olarak değerlendirilmekteydi. Ancak, Mahama ve arkadaşları (2020), domuz türünün domuz yağından tespiti çalışmasında, C20:2 yağ asidine ilaveten iki ana yağ asidinin de (oleik asit (C18:1) ve palmitik asit (C16:0)) türün tespiti için kullanılabileceğini ortaya çıkarmışlardır. Böylece analiz edilen gıda gruplarındaki çoğu numunenin, C16:0/C18:1 oranının ortalama >0.6 olması halinde, domuz eti tanımlaması için uygun bir belirteç olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca tür tespiti için lipit bazlı tanımlama tekniklerinin, türlerdeki yağ asidi içeriği ve profillerinin ısıl işlem sırasında değişebilmesinden kaynaklı olarak güvenilir olmayabileceğini de belirtmişlerdir (94).

Sarah ve arkadaşları (2016), LC–Q-TOF-MS cihazında pişmiş domuz etinde olan ve diğer türlerde (tavuk, sığır ve keçi) gözlenmeyen, öncül partikül kütlesi 450.2949 olan özel peptidin "LVVITAGAR" (laktat dehidrogenaz proteininden) yakın gelecekte domuz etinin tespiti için termostabil bir peptit dizisi olabileceğini, ancak ticari et ürünlerinde domuz kontaminasyonunu tespit etmek için kullanılıp kullanılamayacağını doğrulamak adına daha fazla çalışma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (93).

Jiru ve arkadaşları (2019), uHPLC-MS ile yaptıkları çalışmada, belirli aminoasitlerin 3 metil-histidin oranlarına bakarak, net kas proteinlerinin (amino asitler ve β-alanil histidin dipeptitleri) kalitesi ve tür tanımlaması alanında bir yöntem geliştirmişlerdir. Buna göre; domuz etinde anserin/balenin oranının düşük, karnozin/anserin oranının ise yüksek çıktığını bulmuşlardır. Bu oranlara bağlı olarak sığır etine karıştırılmış %2 oranındaki domuz etini tespit etmişlerdir (95).

Gieratta ve arkadaşları (2013), yenilebilir hayvan türlerinin (sığır eti, tavuk, at, devekuşu, domuz ve manda) ayrılması ve tanımlanması için uHPLC kullanarak, çiğ dana burgerlerinde beyan edilmemiş et ilavesinin varlığını değerlendirmek için güçlü bir moleküler belirteç olarak miyoglobini önermişlerdir. Bu yöntemi hazırladıkları farklı kıyma karışımlarında valide etmişlerdir. Böylece, sığır kıyması içindeki %5 (25mg/500mg)'e kadar domuz eti varlığını, geliştirdikleri bu yöntemle tespit edebilmişlerdir (92).

2.4 Elektronik Burun

Elektronik burun (e-burun), koku duyusunu taklit eden bir dizi seçici olmayan sensör ve sinyal işleme için veri toplama sisteminden oluşur. Ölçülen parametrelerle ilgili bilgi sağladıklarından dolayı en önemli kısmı sensörleridir. En sık kullanılan sensörler; elektrokimyasal (amperometrik ve kondüktometrik), piezoelektrik ve optik (koku algılama) ve GC-MS'e dayalı olanlardır (96). e-burunlar, lipid bileşeninin analizi için umut verici olmakla birlikte aynı zamanda hızlı tarama sınırlarından dolayı alternatif bir gaz kromatografisi yöntemidir (97). e-burun, uçucu bileşiklerin herhangi bir ayrımı ve sınıflandırması olmaksızın karmaşık numunelerdeki kokuları tespit etmek ve ayırt etmek için kullanılmıştır. Bu özellikler e-burunu, lipidlerin kokusunu analiz ederek gıda ürünlerini doğrulamak açısından çok yönlü hale getirir (98).

Nurjuliana ve arkadaşları (2011), et ve et sosislerinde domuz etinin varlığını tespit etmek için headspace analizörlü (HS) gaz kromatografisi-kütle

spektrometresine (GC-MS/HS) dayalı bir e-burun geliştirmişlerdir. Bu sistem ile 15 saniyede tamamlanan analiz, diğer et ve sosislerden domuz ve domuz sosisi örnekleri arasında kalitatif olarak başarılı bir şekilde ayrım yapmıştır. Elde edilen sonuçları yorumlamak için temel bileşen analizi (PCA) kemometrisi kullanılmıştır. Araştırmacılar, domuz yağının diğer hayvansal yağlardan tatmin edici şekilde kümelenmesi sayesinde ayrımının gerçekleştiğini belirtmişlerdir (12).

Gıdalardaki domuz bazlı bileşenlerin tanımlanması için kullanılan elektronik buruna dayalı analizler, 5 gramdan az numune gerektirmesi, özel numune hazırlığına gerek kalmaması, hızlı, hassas, düşük maliyetli ve çevre dostu olması bakımından birtakım avantajlara sahiptir (12,96–98).

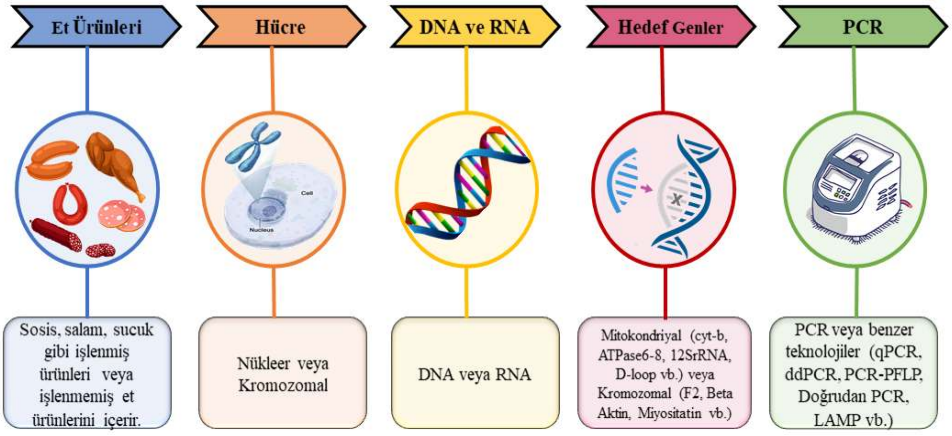
2.5 DNA Tabanlı Yöntemler

DNA, genetik bilginin depolanması, kopyalanması ve iletilmesi için ana materyaldir. DNA tabanlı yöntemlere dayanan analitik teknikler, protein bazlı yöntemlerle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır. Burada, DNA'nın proteinlere göre daha kararlı bir molekül olması, özellikle her hücre tipinde yer alması ve her türlü dokudan kolayca çıkarılabilmesi, işlem ve ısıl işlem gibi koşullarda daha stabil olması avantajları arasında sayılabilir. DNA temelli yöntemlerin çoğu, karmaşık ve işlenmiş gıdalarda bile türlerin menşeinin tanımlanmasına izin veren, özgüllüğü, duyarlılığı, basitliği ve hızı nedeniyle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğine dayanır (56–59).

PCR analizlerinin özgüllüğü, uygun primer seçimine göre hedef dizilerle ilgilidir. Doğru tür tanımlaması için, primerler, özgünlüklerini doğrulamak için yeterli in siliko ve in vitro analizden sonra tasarlanmalı veya seçilmelidir. Hem kromozomal hem de mitokondriyal genler, türe özgü DNA markörleri olarak hedeflenebilir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), hücre başına yüksek sayıda mtDNA kopyası içermesi nedeniyle PCR analizlerinin hassasiyetini artırır ve kromozomal DNA'dan birkaç kat daha fazladır. Ayrıca mtDNA, çekirdek DNA'dan çok daha hızlı evrimleşir ve filogenetik olarak ilişkili taksonların tanımlanmasını sağlayan daha fazla dizi çeşitliliği içerir (41,99). Bununla birlikte ısı, tuz ve basınç gibi çevresel streslere nispeten toleranslıdır. Bu nedenle, türe özgü mtDNA'nın PCR analizi, şu anda et türlerinin tanımlanması ve kimlik doğrulaması için kullanılan en yaygın yöntemdir (Şekil 2.2.).

DNA bazlı tekniklerin en büyük dezavantajı, ısıl işlemin ardından DNA ekstraksiyon veriminin düşük olmasıdır (100). Bununla birlikte, literatürde ısıl

işlemden sonra DNA verimi ile ilgili farklı görüş ve sonuçları içeren raporlar mevcuttur. Bu çalışmaların birçoğunda, gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan çeşitli ısıtma işlemlerinin (kurutma, pişirme, fırınlama, otoklavlama ve püskürtmeyle kurutma) DNA fragmanları üzerinde bozunma etkisi değerlendirilmiştir. Bazı araştırmacılar, gıdaların ısıyla işlenmesi sırasında, bu fragmanların orta veya güçlü bir şekilde parçalanarak zarar gördüğünü belirtmişlerdir. Dolayısıyla hedeflenen amplikon uzunluğu, DNA fragmanının ısıl işlem kaynaklı zarar görmesinden dolayı PCR analizinde kullanımının sınırlandığını belirtmişlerdir (23,101). Bazıları ise farklı hayvan dokularına uyguladıkları çeşitli sıcaklık ve pH'da elde ettikleri DNA veriminde önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (102). Bazı araştırmacılar ise ısıl işlem uygulamasının (kavurma ve mikrodalga) DNA verimini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir (103).



Şekil 2.2. Bazı Et Tür Tespit Teknolojilerinin DNA'ya Dayalı Akış Şeması

Bazı araştırmacılar, uyguladıkları ısıl işlemin şekli ve süresiyle ilgili olarak DNA veriminde değişiklik yaşanabileceğinde hem fikirdir. Bazı araştırmacılar, aynı tip ete haşlama, kaynatma ve buharlı pişirme teknikleri uygulamışlar ve haşlanmış etteki DNA veriminde önemli bir azalma, kaynatma ve buharlı pişirme tekniği uygulanan etin DNA veriminde ise artış olduğunu görmüşlerdir (55,104,105). Araştırmacılar tüm bu sonuçlardan yola çıkarak ısıl işlem uygulmasının türü ve süresinin, DNA verimi üzerindeki etkisine ilişkin mutlak sonuç değerlendirmesini durdurmuşlardır.

2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

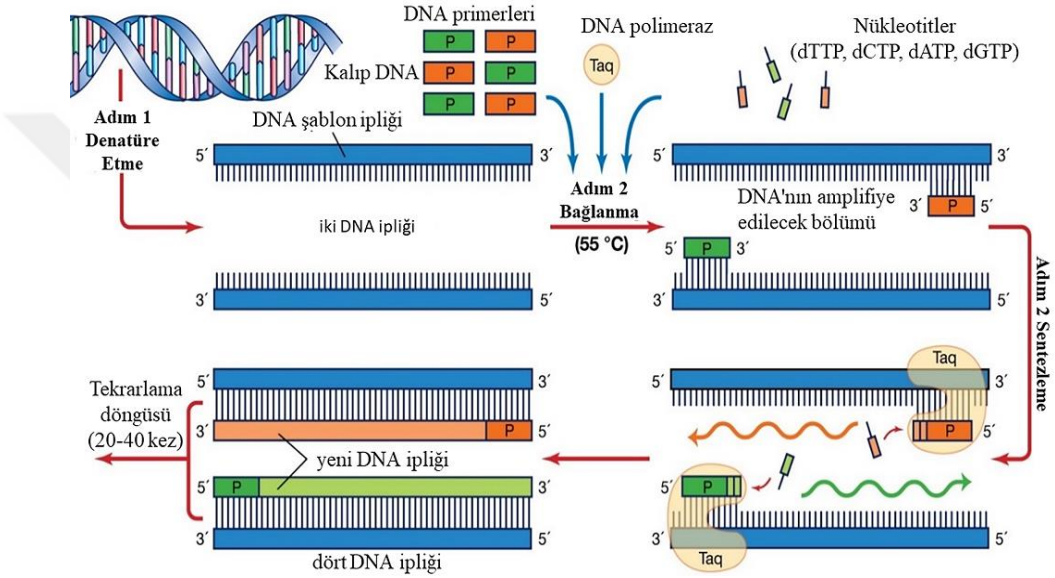
PCR, belirli bir DNA dizisinin miktarını büyütmek veya artırmak için kullanılan in vitro bir yöntemdir. PCR reaksiyonu, DNA polimeraz ve nükleotidler içeren bir çözelti ve hedef DNA dizisine tamamlayıcı olan primerler kullanılarak 3 aşamada gerçekleşir. Böylece hedef DNA dizisi amplifiye edilmiş olur. Bu çözelti ısıtıldığında, çift sarmallı DNA (dsDNA) denatüre olur ve iki ayrı şeride ayrılır. Çözelti soğudukça, primerler ayrılmış DNA ipliklerindeki hedef dizilere bağlanır. DNA polimeraz daha sonra primerleri nükleotidlerle genişleterek yeni bir iplik oluşturur ve hedef DNA dizisinin tamamlayıcı bir kopyasını oluşturur (Şekil 2.3.). Tekrarlandığında, bu denatüre etme, bağlanma ve uzatma döngüsü, hedef DNA sekanslarının sayısını üstel olarak artırır. İdeal olarak, ortamda hedef DNA dizisi yoksa hiçbir amplifikasyon meydana gelmez.

Bir et ürünündeki bir türün varlığını değerlendirmek için uygulanan en basit PCR stratejisi, DNA fragmanlarının amplifikasyonu ve ardından fragman boyutu doğrulaması için agaroz jel elektroforezidir (99). Ek doğrulama yöntemleri ve/veya PCR ürünlerinin incelenmesi şu şekilde gerçekleştirilebilir;

- DNA amplikonlarının dizilenmesi (PCR-dizileme)
- PCR-tek iplikli konformasyon polimorfizm analizi (PCR-SSCP)
- İki veya daha fazla parçanın farklı primer çiftleri ile eş-zamanlı amplifikasyonu (Multipleks PCR)
- PCR-Kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi analizi (PCR-RFLP)
- PCR-Rastgele büyütülmüş polimorfik DNA analizi (PCR-RAPD)
- Gerçek zamanlı floresan boyaları ile PCR deneylerine ilaveten Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM-High Resolution Melting), dijital PCR (dPCR), Mikrosatellitler veya DNA çipleri (mikrodiziler) de et orijini tespitinde kullanılan diğer doğrulama yöntemlerinden bazılarıdır.

Tür tanımlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan mitokondriyal genler arasında, sitokrom b (cyt-b) (33,106–112), 12S ribozomal RNA (12S rRNA), 18S rRNA ve 16S rRNA alt birimleri (34,41,106,113–120), yer değiştirme döngüsü bölgesi (D-loop) (27,31,32,108,121–125), sitokrom c oksidaz altbirimi I ve II (COX-I, COX-II) geni (25,119,126,127), ATPase alt birim 6 ve 8 (ATPase 6 ve ATPase 8) (27,128), NADH dehidrogenaz (ND) alt birimi 2, 4, 5 ve 6 (123,128) genleri sayılabilir.

Bazı araştırmacılar, tür tanımlama çalışmalarında mtDNA üzerindeki genlerin kullanımının, kromozomal DNA'ya kıyasla farklı dokular arasında en az 5 kat değişkenlik göstermesi nedeniyle önerilemeyeceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, tek bir kopya kromozomal DNA'nın hedef tür/türlerin miktar tayini için daha optimal seçim olacağını öne sürmüşlerdir (52). Türe özgü DNA fragmanlarının amplifikasyonuna izin veren farklı boyutlardaki intronların varlığından yararlanarak et türlerini ayırt etmek için nükleer işaretler de tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları; büyüme hormonu geni (129), F2 geni (52), aktin geni (130) veya melanokortin reseptörü 1 (MC1R) genidir (131).



Şekil 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşamaları (132).

2.5.1.1 Türe Özgü PCR

Türe özgü PCR, basitliği, yüksek özgüllüğü ve yüksek duyarlılığı nedeniyle giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu teknik, karmaşık ve işlenmiş gıdalarda bile et kimlik doğrulama çalışmaları için uygundur. Yeterli yöntem optimizasyonundan sonra, hedef türlerden tek bir PCR ürünü üretebilen belirli primerlerin doğru işaret seçimi (Genbank, http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/) ve tasarımına dayanır. Türe özgü PCR, temel olarak kalitatif veya son nokta (end-point) PCR olarak bilinen agaroz jel elektroforezi ile 30-40 amplifikasyon döngülerinden sonra analiz edilen geleneksel PCR'ye dayanır (Şekil 2.3.). Amplifikasyon ürünleri, amplifikasyonun plato aşamaları (Şekil 2.4.) ile analiz edildiğinden, sonuçlar kalitatif olarak kabul edilir, yalnızca belirli durumlarda döngü sayısı optimizasyonu ve normalleştirmeden sonra kantitatif veya yarı kantitatif olarak kabul edilir (133,134).

Hem singlepleks hem de multipleks PCR çalışmaları yapılmıştır. Multipleks PCR, primerlerden biriyle hedef genin korunmuş bir bölgesini hedeflerken, ikinci primer, türe bağlı olarak değişir. Sonuç olarak, farklı uzunluklara sahip birkaç amplikon çoğaltılır; böylece tek bir PCR analizi aynı anda birden fazla türü tespit ederek hem maliyeti hem de zamanı azaltabilir. Ancak düşük ve eşit olmayan amplifikasyon verimliliği ve farklı uzunluktaki şablonlar için değişken duyarlılık, onları hedef miktar tayini için uygunsuz hale getirir. Dahası, tek bir tüpte birden fazla primerin kullanılması, yanlış PCR ürünlerinin veya "primer-dimerlerin" oluşmasına ve uzun DNA fragmanlarının amplifikasyon ayrımı gibi sorunlara neden olabilir (70). Öte yandan, singlepleks PCR analizleri tek bir reaksiyonda birden fazla türü tespit edemese de, daha hassas, doğru ve sağlam olduğu kanıtlanmıştır (Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.).

2.5.1.1.1 Singlepleks PCR

Bu zamana kadar domuz türü teşhisinde kullanılan farklı amplikon uzunluklarına sahip bazı singlepleks PCR analizlerinin değişen hassasiyet ve tespit limitleri Tablo 2.1'de özetlenmeye çalışılmıştır. Bu tabloda verilen kaynaklar bu alanda yapılan tüm çalışmaları kapsamamakla birlikte günceldir. Hedef türlerin tespiti için primerlerin daha çok mtDNA üzerindeki genlerden tasarlandığı görülmektedir (Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.). mtDNA üzerindeki genlerden tasarlanan türe spesifik primerler ile yapılan bazı singlepleks PCR ve tespit limitleri aşağıda örneklendirilmiştir.

Domuz eti tanımlaması için mtDNA üzeeindeki D-Loop bölgesinin türe özgü belirteç olarak kullanıldığı çalışmalarda, farklı amplikon uzunlukları ve farklı tespit limitleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Bununla birlikte genel olarak çiğ ve ısıl işlem görmüş domuz eti ve ürünlerinde bu gen bölgesinden tasarlanan primerlerden türün tespitinin %0.01 (a/a) ile %1 (a/a) aralığında olduğu görülmektedir (Tablo 2.1.) (27,107,108,124,135).

mtDNA üzerindeki ND5 geninin hedef alındığı bir çalışmada Kesmen ve arkadaşları (2007), pişmiş sosislerde düşük seviyelerde domuz etinin saptanması için türe özgü bir PCR deneyi geliştirmişlerdir. Test, ikili et karışımlarından (domuz-at, domuz-eşek) hazırlanan sosis örneklerinden her bir hedef türün varlığını %0.1 (a/a) seviyesinde, testin hassasiyetini ise 0.01 ng/µL olarak belirtmişlerdir (128).

İlhak ve Arslan (2007), sığır, koyun ve keçi etine %0, %2.5, %1, %0.5 ve %0.1 seviyelerde domuz, at, kedi ve köpek eti ilave ederek çiğ ikili et karışımları hazırlamış, cyt-b (cyt-b) geninin domuz türü için 227 bp'lik bölgesini çoğalttığı türe özgü primerlerin domuz eti tespit seviyesinin %0.1 (a/a) olduğunu belirtmişlerdir (33). Chi ve arkadaşları (2014), mitokondriyal sitokrom-c oksidaz alt birim I (COX-I) geninin amplikonlarını hibridizasyon ile görselleştirerek tek başına veya karışık et örneklerinde 5 pg'ye kadar DNA şablonunu tespit edebilmişlerdir (25).

Barakat ve arkadaşları (2014), ticari sosislerde domuz eti saflığını ölçmek için D-loop ve cyt-b genlerini ve ardından bir QIAxcel kapiler elektroforez sistemini güçlendiren bir PCR deneyi kullanmışlardır. Teknik, %0.01'e (a/a) kadar domuz kontaminasyonu tespit etmeye imkan sağlamıştır (107).

COX-I geni ile Dai ve arkadaşları (2015) koyun etinde %0,05 (a/a) düzeyinde domuz eti tespit etmişlerdir (126). Spychaj ve arkadaşları (2016), COX-I genini kullanarak et karışımlarında ve ürünlerinde domuz etinin varlığını %0.1 düzeyinde tespit etmişlerdir (127).

Pinto ve arkadaşları (2015), cyt-b genine dayalı bir PCR tanımlama sistemi ile bazı et ürünlerinin etikette verilen bilgilerin yanlış olduğunu ortaya çıkarmış ve %1 düzeyinde ürünlerde domuz eti tespit etmişlerdir (111).

Tablo 2.1. Domuz ve bazı diğer türlere ait singlepleks PCR çalışmaları

Hedef Tür	**Uygulama**	**Hedef Gen**	**Tespit Limiti**	**K.**
Domuz	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Sosisler	Domuz Büyüme Hormonu	%0.1 (a/a)	(58)
Keçi, Tavuk, Sığır, Koyun, Domuz ve At	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler	Cyt-b	-	(110)
Domuz, Sığır	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler	D-Loop (531bp)	>%5	(31)
Sığır, Domuz, Tavuk ve Ruminant	Sosisler	SINE (Short Interspersed Elements)	0.5 pg (Sığır DNA), 0.05 pg (Domuz DNA), 5 pg (Tavuk DNA) %0.005 (a/a) (Sığır), %0.0005 (a/a) (Domuz), %0.05 (Tavuk) (a/a)	(136)
Domuz (658 bp)	Çiğ Etler	COX-I	5 pg	(25)

ND: Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar**,** Tablo 2.1. Kaynak (17,62) 'den genişletilmiştir.

Tablo 2.1. (Devamı)

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Tavuk, Domuz, Kaz ve Katır Ördeği	İkili Karaciğer / Kaz Ciğeri Karışımları	Alfa-Aktin	%0.1 (a/a)	(120)
Tavuk, Domuz Eti, Kaz, Hindi ve Katır Ördeği	Çiğ Etler, Ciğerler ve İkili Karaciğer / Kaz Ciğeri Karışımları	12S rRNA	%1 (a/a)	(113)
Domuz Eti, Sığır, Koyun ve Keçi	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Et Karışımları	12S rRNA	% (a/a)	(137)
At, Köpek, Kedi, Sığır, Koyun, Domuz (212 bp), Keçi	İkili Çiğ Et Karışımları	Cyt-b	%0.1 (a/a)	(33)
At, Eşek ve Domuz Eti (Domuz-227 bp)	İkili Çiğ Et Karışımları	ATPase 8/ATPase 6, ND2 ve ND5	%0.1 (a/a), 0.01 ng DNA (Suda)	(128)
Domuz (531 bp)	Ticari Et Ürünleri	D-Loop	ND	(27)
Tavuk, Hindi ve Domuz Eti	Çiğ Etler, İkili Çiğ Et Karışımları ve Isıl İşlem Görmüş Etler	Cyt-b	%0.1 (a/a)	(109)
Sığır, Domuz Eti, Koyun ve Tavuk	İkili Et Karışımları, Hayvan Yemleri, Domuz Yağı, Kan, Peynir Altı Suyu, Kazein ve Hemoglobin	12S rRNA, COX-I, 16S rRNA	%0.09 (a/a) (Sığır, Domuz Eti, Koyun), %0.08 (a/a) (Tavuk)	(119)
Sığır, Tavşan, Yaban Tavşan, Kızıl Geyik ve Domuz Eti	İkili Et Karışımları, Av Eti Alheiras	Cyt-b, 12S rRNA	%0.01 (a/a) (Sığır, Tavşan, Yaban Tavşan), %0.1 (a/a) (Kızıl Geyik ve Domuz Eti)	(106)
Domuz (294 bp)	Farklı Etlerin Karışımı ve Ticari Et Ürünleri	COX-I	%0.1	(127)
Domuz (712 bp)	Çiğ Et, Kan ve İkili Et Karışımları	D-Loop	%0.1 (a/a) 10 pg (Domuz DNA)	(124)
Domuz (185 bp)	Çiğ ve Ticari Et Ürünleri	D-Loop	%0.01	(107)
Domuz (117 bp)	Çiğ ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	%0.01	(107)

ND:Tespit edilemedi, K.:Kaynaklar**,** Tablo 2.1. Kaynak (17,62) 'den genişletilmiştir.

Tablo 2.1. (Devamı)

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Domuz (398 bp)	Çiğ Etler, Farklı Etlerin Karışımı ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	%1	(111)
Domuz (268 bp)	Çiğ ve Ticari Et Ürünleri	COX-I	0.001 ng (saf DNA)	(126)
Domuz (268 bp)	Çiğ ve Ticari Et Ürünleri	COX-I	%0.05 (karışım)	(126)
Domuz (294 bp)	Ticari Et Ürünleri ve Isıl İşlem Görmüş Etler	D-Loop	%1	(125)
Domuz (398 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	ND	(112)
Domuz (387 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	12S rRNA	ND	(34)
Domuz (83 bp)	Ticari Et Ürünleri	ATPase 6	ND	(27)
Sığır, Koyun ve Keçi	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler	12S rRNA	%0.1 (a/a)	(117)
Sığır, Koyun, Keçi ve Geyik	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Et Yemekleri	12S rRNA, 16 rRNA	%0.05 (a/a)	(135)
Misk Ördeği, Yeşilbaş Ördek, Katır Ördeği ve Turkuaz	Çiğ Etler, İkili Çiğ Et Karışımları ve Isıl İşlem Görmüş Etler	12S rRNA	%0.1 (a/a) (Misk Ördeği, Yeşilbaş Ördek)	(118)
Kızıl Geyik, Alageyik ve Karaca	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, Jambonlar, Sosisler ve Pişmiş Etler	12S rRNA	-	(115)
Güderi, Pirene Dağ Keçisi ve Kunduz	Çiğ Etler, İkili Çiğ Et Karışımları ve Isıl İşlem Görmüş Etler	D-Loop	%0.1 (a/a)	(32)
Tavuk	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, İkili Et Karışımları (Köfte, Kebap)	D-Loop	%1 (a/a)	(138)
Sığır, Koyun, Tavuk ve Eşek	Çiğ Etler, Kıyma ve İkili Et Karışımları	D-Loop, COX-II, 12S rRNA, ND2	%0.1 (a/a) (Tavuk ve Eşek)	(123)

ND:Tespit edilemedi, K.:Kaynaklar, Tablo 2.1. Kaynak (17,62) 'den genişletilmiştir.

Tablo 2.1. (Devamı)

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Ördek, Keklik, Sülün, Bıldırcın, Tavuk ve Hindi	İkili Et Karışımları, Av Eti	Cyt-b, 12S rRNA	%0.01 (a/a)	(114)
Tavşan	Yulafta Tavşan Etinin İkili Ham ve Isıl İşlem Görmüş Karışımları	12S rRNA	%0.1 (a/a) (Çiğ ve ısıl işlem görmüş)	(116)
Bıldırcın, Sülün, Keklik ve Gine Tavuğu	İkili Çiğ Et Karışımları, Kızarmış Etler, Salamura Etler ve Kıyılmış Etler	12S rRNA	%0.1 (a/a)	(139)
Tavuk, Ördek, Güvercin ve Domuz Eti (835 bp)	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, Kan	Cyt-b, D-Loop	-	(108)
Tavuk	Çiğ Etler, Kan ve İkili Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Et Karışımları	5-Aminolevulinat Sentaz	%0.1 (a/a) 10 pg (Tavuk DNA)	(140)
Köpek	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, Alkollü Sosisler	Cyt-b	%0.1 (a/a) 0.02 ng (Köpek DNA)	(141)
Bıldırcın, Sülün, Keklik ve Gine Tavuğu, Güvercin, Avrasya Çulluğu ve Ötücü Ardıç Kuşu	İkili Çiğ Et Karışımları	D-Loop	%0.1 (a/a)	(139)
Sığır	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, İkili Et Karışımları (Köfte, Kebap)	D-Loop	< %1 (a/a)	(121)
Buffalo	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, İkili Et Karışımları (Köfte, Kebap)	D-Loop	%1 (a/a)	(122)
Sığır	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler, Buğday Ununda Dana Eti, Tortellini, Sosis ve Mantı	Cyt-b	%0.025 (a/a)	(21)

ND:Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar, Tablo 2.1. Kaynak (17,62) 'den genişletilmiştir.

2.5.1.1.2 Multipleks PCR

Çoğullama (multiplexing), bir PCR reaksiyon karışımında, birden çok primer çifti kullanarak, birden fazla hedef diziyi çoğaltabilir. Multipleks PCR'da, PCR koşullarının optimizasyon zorluğu ve düşük verimliliği gibi kendine özgü dezavantajlar vardır. Pek çok çalışmada multipleks PCR için gerekli olan türe özgü primerler tasarlanırken cyt-b geninden yararlanılmıştır. Bununla birlikte mtDNA üzerindeki diğer gen bölgeleri de primer tasarımı için kullanılmıştır. Kromozomal DNA üzerinden tasarlanan primerlerin de multipleks PCR çalışmalarında hedef dizi olarak kullanıldığı görülmektedir (Tablo 2.2. ve Tablo 2.3.). Et ve ürünlerinde multipleks tür tespit çalışmaları, özellikle domuz türü hedeflenerek, son yıllara ait yapılmış çalışmaların bir kısmı, Tablo 2.2. ve Tablo 2.3.'te özetlenmeye çalışılmıştır. Domuz ya da hedef türün tespit limiti; hedeflenen primer sekansının spesifikliğine, PCR koşullarının optimizasyonuna, ekstrakte edilmiş DNA'nın saflığına, ete uygulanan işlemlere (karışım halinde bulunması, ısıl işlem görmüş-görmemiş olması vb.) ve diğer tanımlama yöntemleriyle birlikte kullanılabilirliği gibi durumlarara bağlı olarak değişebilmektedir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak yapılmış çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Ni'mah ve arkadaşları (2016), mtDNA üzerindeki cyt-b geninin bir bölümü hedeflenerek dupleks-PCR ile, taze ve pişmiş sığır eti içinde domuz eti tespit edilmeye çalışılmıştır. Analizler, altı taze et örneği ve altı pişmiş et (sıcak suda 100 ^{0}C'de 30 dakika kaynatılarak) örneği üzerinden yapılmıştır. Taze sığır etine %0, 1, 5, 10, 25 seviyelerinde olacak şekilde domuz eti ilave etmişlerdir. Her iki gruba ait etlerin DNA izolasyonu yapılmış ve PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Dupleks-PCR ürünleri, %1.5'luk agaroz jelde yürütülmüştür. Domuza spesifik 398 bp'lik bant, karışım oranlarından %1'lik seviyede dahil olmak üzere hem pişmiş hem de çiğ karışımlarda görüntülenmiştir. Böylece, sığır etine karıştırılan %1 oranında domuz eti varlığının tespit edilebildiğini belirtmişlerdir (142).

Yukarıdaki çalışmada belirtilen aynı primer sekansının (cyt-b geni) kullanıldığı başka bir çalışmada, Song ve arkadaşları (2017), pille çalışan taşınabilir bir konveksiyon Pam PCR geliştirmişler ve 24 dakikada, 1 pg hassasiyete kadar domuz etini tespit edebilmişlerdir (143).

Kitpipit ve arkadaşları (2014), doğrudan bir multipleks PCR çalışmasında DNA ekstraksiyonuna gerek kalmadan DNA amplifikasyonunu başarılı bir şekilde geliştirmişlerdir. Yaygın olarak tüketilen dört et türüne ait primerleri, önceki

çalışmalarda optimize edilmiş sekanslardan, at ve inek türüne ait primerleri ise kendileri mtDNA üzerindeki COI geninden tasarlamışlardır. Bu primer sekansları sırasıyla; domuz eti, kuzu eti/koyun eti, tavuk eti, devekuşu eti, at eti ve sığır eti için 100, 119, 133, 155, 253 ve 311 bp'lik PCR ürünlerini çoğaltmıştır. Türler arasında çapraz reaksiyon görülmemiştir. Primerlerin ürettiği amplikon uzunluklarının her tür için spesifik olması analizin; sağlam, hızlı, ekonomik, tekrarlanabilir ve spesifik olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar bu testin, 12.500 mtDNA kopyaya (7 fg'ye eşit) kadar duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (144).

He ve arkadaşları (2015), işlenmiş et ürünlerinde sığır, ördek, koyun ve domuz etinin tespiti için dörtlü bir multipleks PCR testi geliştirmişlerdir. Mitokondriyal ND2 ve 16S ribozomal DNA (16S rDNA) genindeki korunmuş bir DNA sekansı üzerinde her tür için, türe özgü ters ve ileri primer tasarlamışlardır. PCR ürünleri; sığır eti için 116 bp, domuz eti için 212 bp, koyun eti için 177 bp ve ördek eti için 322 bp'lik türe özgü DNA fragmanı çoğaltmışlardır. PCR koşullarının optimizasyonu sonrasında analiz duyarlılığının her tür için 0.1 ng olduğunu belirtmişlerdir (145).

Safdar ve arkadaşları (2014), sosislerdeki at, soya fasulyesi, tavuk ve domuz türlerinin hızlı tanımlanması ve tespiti için mtDNA üzerinden farklı gen bölgelerinden primer sekanslarını kullanmışlardır. Türlere ait primerler sekansları farklı çalışmalardan alınmıştır. Domuz türü için ATPase alt birim 6 (ATPase 6) geninin küçük bir parçasını (212 bp) amplifiye eden bir primer seti ile tetraplex PCR testi geliştirmişlerdir. Bu teste göre, testin tespit limitini (LOD) %0.01 olarak belirlemişlerdir (146).

Prusakova ve arkadaşları (2018), et ürünlerinde yaygın olarak tüketilen beş ve yaygın olarak yasaklanmış beş et türünün (Sığır, koyun, domuz, tavuk, hindi, kedi, köpek, fare ve insan) eşzamanlı tanımlanması için optimize edilmiş bir multipleks PCR analizi geliştirmişlerdir. Türe özgü primerler, mtDNA üzerindeki ATPase alt birim 8 (ATPase 8) gen bölgelerinden tasarlanmıştır. Araştımacılar, çiğ ve işlenmiş gıda numunelerinde geliştirdikleri multipleks PCR analizinin; spesifik, reaksiyon başına 30 pg DNA'ya kadar duyarlı, tekrarlanabilir ve ekonomik olduğunu belirtmişlerdir (147).

Qin ve arkadaşları (2019), sığır etindeki tavuk, ördek ve domuz etinin tağşiş bileşenlerinin eşzamanlı tanımlanması için hızlı ve hassas bir multipleks PCR deneyi geliştirilmişlerdir. Türlere ait primer sekansları, daha önce farklı

araştırmacılar tarafından mtDNA üzerindeki Cyt-b, CO III, ATPase 8 ve ATPase 6 gen bölgelerinden tasarlanmış sekanslardır. Araştırmacılar, DNA izolasyonunda manyetik nanopartiküller kullanarak hızlı bir DNA ekstraksiyon tekniği geliştirmişlerdir. Böylece multipleks PCR deneyi ile her türün tespit düzeyinin %0.05 olduğunu tespit etmişlerdir. Yöntemin etkinliği 35 ticari örnek üzerinde denenmiş olup, beş sığır eti ürününde domuz ve bir sığır eti ürününde tavuk eti tespit etmişlerdir. Böylece yöntemin, ticari sığır ürünlerine karıştırılmış tavuk, ördek ve domuz etinin ve bileşenlerinin tespitinde uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir (148).

Hanapi ve arkadaşları (2015), dört hayvan grubunun (domuz, ruminant, kuş ve tavşan) et kökenini belirlemek için ‘‘Ortak Primer Multipleks PCR’’ (CP-M-PCR) tekniğini geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımda, tüm hayvan gruplarının mtDNA üzerindeki NADH dehidrogenaz alt birim 4 (Nad 4) gen dizilerinin homolog bölgesinin 5' ucunda ortak bir ileri primer, ters primerleri ise 5' ucuna bir adaptör dizisi ekleyerek tasarlamışlardır. CP-M-PCR tekniği ile her et grubunun saptama sınırının, 0.1 ng olduğunu ifade etmişlerdir (149).

Ali ve arkadaşları (2015), NADH dehidrogenaz alt birim 5 (ND5) geninden tasarladığı primer setini kullanarak tek bir reaksiyon tüpünde beş et türünün (domuz dahil) doğru tanımlanması için bir multipleks PCR analizi geliştirmişlerdir. Bu analizin türler arası özgüllüğü 0,02 ng LOD olarak belirlenmiştir (150). Aynı gen, karmaşık matrisler altında, 141 bp'lik bir bölgeyi amplifiye ederek, helal olmayan et türlerinin doğrulanması için bir çip üzerinde kullanılmıştır. Araştırmacılar, ≤150 bp olan amplikonların bozulmuş veya ısıyla işlenmiş örneklerde daha stabil kalma şansına sahip olduğunu ve bu nedenle daha iyi duyarlılık ve yöntem geçerliliği sunduğunu belirtmişlerdir (151).

Hossain ve arkadaşları (2019), ND5 geninden tasarladıkları türe özgü primerleri kullanarak, domuz etinin saptanması için kısa bir amplikon uzunluğunun (73 bp) çoğaltılmasını hedeflemişlerdir. QIAxcel otomatik kapiler elektroforezi ile saf hallerde 0.001 ng DNA (türlerin saf DNA içerdiği örnekler) ve köfte ürünlerinde %0.5 düzeyinde domuz türünü tespit etmişlerdir (152).

Muhammed ve arkadaşları (2016), bir hexaplex PCR çalışmasında, 12S rRNA genini kullanarak beş et türü arasında domuz etini %0.01 LOD ile tanımlamışlardır (153). Domuz türü tespiti için başka bir çalışmada, PCR kiti ile

LINE-1 (L1) retrotranspozonun 451 bp'lik bir bölgesi hedeflenmiş ve sığır eti içerisinde domuz eti %0.5 düzeyinde tespit edilmiştir (154).

Li ve ark. (2019), iki bağımsız multipleks PCR ve mikroçip elektroforezi kullanılarak, on dört evcil hayvanın tanımlanmasına yönelik basit ve hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde mtDNA (12S rRNA, 16S rRNA, ND2 ve COI) üzerinde bulunan genlerden tasarlanan on çift primer (üç dejenere primer dahil) aynı anda kullanılarak on dört evcil hayvanın (Grup I: sığır, eşek, köpek, tilki, rakun köpeği, geyik ve at; Grup II: domuz, koyun, keçi, tavuk, ördek, kedi ve fare) tespit edilmesi amaçlanmıştır. Domuz türüne özgü primerler, COI geninden tasarlanmıştır. Domuz türü için analizin LOD'si; çiğ ve işlenmiş et ürünlerinde 0.2 ng DNA, Grup I'deki hayvan türleri için ise 0.02 ng DNA olarak belirtilmiştir (155).

Tablo 2.2. Domuz ve bazı diğer türlere ait multipleks PCR çalışmaları

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Keçi, Tavuk, Sığır, Koyun, Domuz ve At	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler	Cyt-b	0.25 ng DNA	(110)
Ruminant, Kümes Hayvanları, Balık ve Domuz Eti	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, Gıda Maddeleri ve Bebek Maması	12S rRNA, Trnaval, ve 16S rRNA	%0.002 (a/a) (Ruminants)	(156)
Ruminant, Kümes Hayvanları ve Domuz Eti	Çiğ Etler ve Sosisler	16S rRNA, 12S rRNA, 12S rRNA trna-Val	-	(157)
Domuz Eti ve Tavuk	İkili Çiğ Et Karışımları	Cyt-b, 12S rRNA	%0.1 (a/a) (Domuz Tespiti) %1 (a/a) (Domuz Eti Miktar Tayini)	(134)
Sığır, Koyun, Domuz Eti ve Kümes Hayvanları	Kan ve Farklı Dokular	Trna-Val, 16S rRNA, trna-Lys, ATPase 8, 12S rRNA trna-Val, ve 12S rRNA	1 ng (Domuz ve Koyun DNA), 5 ng (Kümes Hayvanı DNA), 0.5 ng (Sığır DNA)	(158)
Tavuk, Sığır Eti, Domuz Eti ve Koyun Eti	Yarı Pişmiş ve Pişmiş Etler, İşlenmiş Yiyecekler	Cyt-b	1 ng DNA	(159)

ND: Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar, Tablo 2.2. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.2. (Devamı)

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Soya Fasulyesi, Kümes Hayvanları, At ve Domuz Eti	Referans Sosisler	Lektin, 12S rRNA, Cyt-b, ATPase 6	%0.01 (a/a)	(146)
Domuz (212 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	ATPase 6	0.001 ng	(146)
Domuz (141 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler, Et Karışımları ve Ticari Et Ürünleri	ND5	%0.1	(151)
Domuz (212 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	0.1 ng	(145)
Domuz (249 bp)	Çiğ Etler	NAD4	0.1 ng	(149)
Domuz (267 bp)	Çiğ Etler	NAD4	0.1 ng	(149)
Domuz (398 bp)	Çiğ Etler	Cyt-b	0.05 ng	(160)
Domuz (73bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Et Karışımları	ND5	0.02 ng (saf DNA)	(161)
Domuz (146 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Et Karışımları	ND5	%0.1 (İkili)	(161)
Domuz (451 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	LINE-1 (L1)	1 Pg (saf DNA)	(154)
Domuz (300 bp)	Çiğ Etler	Cyt-b, 18S rRNA	3.125 ng	(162)
Domuz (73 bp)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Ticari Et Ürünleri	ND5	%0.5 (Mix)	(152)
Domuz (196 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Et Karışımları	ATPase 8/6	%0.05	(148)
Domuz (451 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	LINE-1 (L1)	%0.5 (Mix)	(154)
Domuz (300 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	ATPase 8	30 pg (saf DNA)	(147)
Domuz (300 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	ATPase 8	%0.1–0.2 (karışım)	(147)
Domuz (412 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	0.05 ng/µL	(163)
Domuz (100 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	%0.01	(144)

ND: Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar, Tablo 2.2. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.2. (Devamı)

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Domuz (73 bp)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Ticari Et Ürünleri	ND5	0.001 ng (saf DNA)	(152)
Domuz (100 bp)	Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	ND	(164)
Sığır, Koyun, Keçi ve Balık	Soya Küspesinde Çiğ Etler, Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Et Karışımları	ATPase 8, Tglu/Cyt-b, 12S rRNA	%0.1 (a/a)	(165)
Eşek, Katır ve At	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler	ATPase 8/6, ND2	%1 (a/a)	(166)
Tavuk, Ördek ve Kaz	Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Etler, Et Karışımları, Sosis, Kebap, Kuru Et, Kurutulmuş ve Kıyılmış Sığır Eti	12S rRNA, Cyt-b, D-Loop	%1 (a/a) 0.05 ng DNA	(167)
Sika Geyiği, Kanada Geyiği, Kızıl Geyik ve Ren Geyiği	Kan	D-Loop, 16S rRNA	0.05 ng (Sika Geyiği, Kanada Geyiği DNA), 0.1 ng (Kızıl Geyik DNA), 0.5 ng (Kızıl Geyik DNA), 0.02 ng (Ren Geyiği DNA)	(168)
Sığır, Tavuk, Keçi, Deve ve Eşek	Çiğ Etler ve Sosisler	Cyt-b, 12S rRNA, ND2	-	(169)
At, Soya Fasulyesi, Koyun, Kümes Hayvanları, Domuz Eti ve İnek	Çiğ Etler, Et Karışımları, Sosisler, Köfte ve Çiğ Köfte	Cyt-b, Lektin, 12S rRNA, ATPase 6/8	%0.01 (a/a)	(153)

ND: Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar, Tablo 2.2. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.3. Domuz türlerine ait singlepleks ve multipleks PCR çalışmaları

Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
Domuz (141 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler ve Ticari Et Ürünleri	ND5	0.02 ng	(150)
Domuz (212 bp)	Çiğ Etler, Ticari Et Ürünleri ve Et Karışımları	12S rRNA	%0.01	(153)
Domuz (455 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	mtDNA sekansı	5 pg	(170)
Domuz (418 bp)	Çiğ Etler, Isıl İşlem Görmüş Etler, Et Karışımları ve Ticari Et Ürünleri	Cyt-b	1 pg	(143)
Domuz (115 bp)	Çiğ Etler ve Ticari Et Ürünleri	COX-I	0.2 ng	(155)

ND: Tespit edilemedi, K.: Kaynaklar, Tablo 2.3. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

2.5.1.2 Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR, kantitatif PCR olarak (qPCR) da bilinir (171). qPCR, her PCR döngüsünden sonra, PCR ile amplifiye edilmiş hedef DNA'nın (amplikonlar) eş zamanlı olarak saptanmasını ifade eder. DNA miktarı, üretilen PCR amplikonlarının sayısı ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyali veren floresan boyalarla her amplifikasyon döngüsünden sonra ölçülür. Reaksiyonun üstel aşamasında toplanan veriler, bilgisayar yazılımındaki program sayesinde işlenir ve amplifikasyon hedefinin başlangıç miktarı hakkında niceliksel bilgi verir. qPCR, sentezlenen DNA miktarıyla orantılı olan ultraviyole (UV) kaynaklı bir floresan sinyalinin emisyonuna bağlıdır. Bu amaçla çeşitli floresan sistemleri geliştirilmiştir. Burada amplifikasyonun ilerlemesini izlemek için kullanılan floresan bazlı yöntemler genel olarak 2 gruba ayrılabilir (59,133,172).

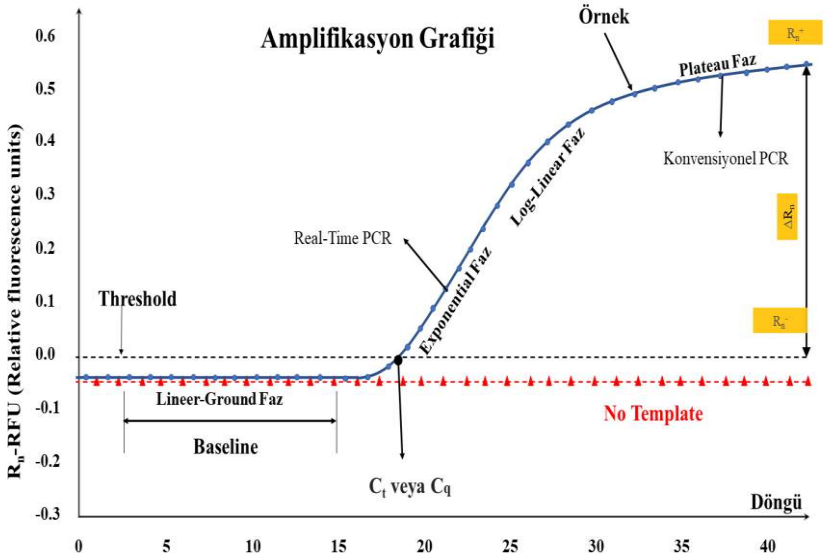
1- Florofor etiketli oligonükleotidler (primer probları, hidroliz probları, hibridizasyon probları, nükleik asit analogları vd.).
2- DNA arasına giren interkolasyon boyaları (SYBR Green, EvaGreen, SYTO9 vd.).

qPCR'de yazılım, ΔRn veya ΔRQ olarak adlandırılan bir değeri hesaplar;

$\Delta Rn = (Rn^{+}) - (Rn^{-})$

Bu denklemde Rn^{+}, bir reaksiyon tüpünde herhangi bir zamanda raportör emisyon yoğunluğunun, söndürücünün emisyon yoğunluğuna oranıdır. Başka bir deyişle; raportör boyanın floresanının pasif bir referans boyanın floresanına

bölünmesidir. Rn− ise aynı reaksiyon tüpünde raportörün emisyon yoğunluğunun PCR amplifikasyonundan önce ölçülen söndürücünün emisyon yoğunluğuna oranıdır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Gerçek Zamanlı PCR Amplifikasyon Grafiği

Şekil 2.4'te görüleceği üzere ΔRn ortalama değerleri Y ekseni üzerinde ve döngü sayısı X ekseni üzerinde işaretlenmiştir. Erken döngülerde, ΔRn taban çizgisinde kalır. Yeterli miktarda hibridizasyon probu, Taq polimerazın 5-nükleaz aktivitesiyle yarıldığında, raportör floresan emisyonunun yoğunluğu tespit edilebilir bir seviyeye yükselir. Taban çizgisinin üzerindeki bir emisyon eşik seviyesi seçilir ve amplifikasyon grafiğinin eşiği geçtiği nokta, Ct (treshold cycle) değeri olarak tanımlanır ve ürün birikiminin log fazının başlatıldığı veya ilk saptandığı döngü sayısını temsil eder (Şekil 2.4.). Eşik (treshold), genellikle taban çizgisinin standart sapmasının (SS) 10 katına ayarlanır. Aralarında 4–5 log kadar farklı genomik DNA konsantrasyonları içeren bir seri dilüsyon hazırlanarak, yazılım tarafından gerçek zamanlı olarak bir dizi amplifikasyon grafiği oluşturulur. Başlangıç hedef DNA miktarı azaldıkça amplifikasyon grafikleri sağa kayar. Ct değerleri, artan hedef miktarla doğrusal olarak azalır. Başlangıç genomik DNA'nın ng loguna karşı Y ekseninde ortaya çıkan Ct değerlerinin bir grafiği, daha sonra bilinmeyen (kör) genomik DNA seviyelere sahip numunelerin miktar tayini için standart bir eğri (referans) olarak kullanılan düz bir çizgi verir. Bu yaklaşım ve Heid ve arkadaşlarının orjinal terminolojisi, nicel PCR için evrensel olarak benimsenmiştir (173).

Gerçek zamanlı PCR tekniği büyük ölçüde gen ekspresyon analizi, mikroorganizmaların tanımlanması ve genetiği değiştirilmiş organizmaların saptanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılırken, son zamanlarda gıda türlerinin tanımlanması için önerilmiştir (174). Karmaşık bileşime sahip ürünlerdeki farklı hayvan türlerinin çok küçük izlerinin bile tespit edilmesine olanak tanır ve et kimlik doğrulaması için en umut verici moleküler araçlardan biri olarak kabul edilir (175). Bu alanda yapılan çalışmalar, gerçek zamanlı PCR'nin kullandığı teknoloji ve yönteme (çeşitli floresan bazlı kimyalar) göre aşağıda ilgili bölümlerde açıklanmış ve bu bölümde örneklendirilmiştir. Genel bir bakış sunması açısından son yıllarda yapılan bazı qPCR çalışmaları Tablo 2.4. ve Tablo 2.5'te verilmiştir.

Prob temelli qPCR çalışmalarından bazılarına Tablo 2.4.'te değinilmiş olup konuyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalardan bazıları şöyledir;

Dooley ve arkadaşları (2004), sığır, domuz, kuzu, tavuk ve hindi etlerinin saptanması için türe özgü gerçek zamanlı PCR (TaqMan) testi geliştirmişlerdir. Türe özgü primerler mtDNA cyt-b geninin küçük (amplikon <150 bp) bölgelerini çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. Tespit amacıyla; ilki memeli türlerine (sığır, koyun ve domuz), ikincisi ise kümes hayvanı türlerine (tavuk ve hindi) ait iki TaqMan probu tasarlamışlardır. TaqMan PCR koşulları optimize edilmiş ve PCR 30 döngü ile sınırlandırılmıştır. TaqMan qPCR sonuçlarına göre, herhangi bir başka türe %0.5 seviyesinde eklenen her türün tespit edildiği belirtilmiş, ancak her tür için mutlak tespit seviyesi belirlenememiştir. Deneysel olarak tespit sınırının dana eti, kuzu eti ve hindi eti için %0.1'in altında olduğu raporlanmıştır (176).

Kesmen ve arkadaşları (2009), eşek, domuz ve at türlerin tanımlanması, çiğ ve pişmiş et ürünlerinde miktarlarının belirlenmesi için prob tabanlı qPCR testi geliştirmişlerdir. Eşek, domuz ve at türü için sırasıyla mitokondriyal ND2, ND5 ve ATPase 6-8 genleri üzerinden spesifik primer ve TaqMan prob tasarlamışlar ve yöntemin performansını test etmişlerdir. Eşek ve domuz türüne özgü primer-prob sistemleri ile hedef olmayan türler (sığır, koyun, tavuk ve hindi) arasında çapraz reaksiyon gözlenmezken, at türüne özgü primer prob setinin 100 ng domuz DNA'sında bir çapraz reaksiyon gözlendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, araştırılan her tür ve deneysel olarak hazırlanan et karışımları için saf etten 0.0001 ng hedef DNA'nın tespit edilebildiğini ifade etmişlerdir (177).

Kesmen ve arkadaşları (2014), mitokondriyal ND2 ve ND5 genlerinin fragmanlarının eşzamanlı amplifikasyonuna dayanan TaqMan prob tabanlı dupleks qPCR yöntemi geliştirmişlerdir. Domuz ve eşek etlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için çiğ ve pişmiş ikili eşek/sığır eti ve domuz/sığır eti karışımlarında yöntemi optimize etmişlerdir. Hedef et türlerinin; çiğ ve fırında pişirilmiş et karışımlarında %0.001, otoklavlanmış et karışımlarında ise %0.01 düzeyinde tespit edilebildiklerini bildirmişlerdir (178).

Wang ve arkadaşları (2020), keçi etine karıştırılan domuz etinin tespiti için prob bazlı gerçek zamanlı PCR geliştirmişlerdir. Yöntemde keçi ve domuz için replikasyon proteini A1 (RPA1)'i kodlayan tek kopyalı housekeeping genleri kullanılmıştır. Keçi etinin Ct'sinin domuz etinin Ct'sine oranı hesaplanarak, şüpheli bir tağşişte keçi eti içeriğinin %5 ile %80 aralığında iyi bir doğrusal korelasyonla (r^2=0.9868) hesaplanabilmesini sağlamışlardır (36).

Hossain ve arkadaşları (2017), sığır, manda ve domuz etinin tespitini eşzamanlı ölçmek için TaqMan Prob ile kantitatif bir tetraplex gerçek zamanlı PCR deneyi gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar türlere ait çoğaltılacak amplikon boyutlarını oldukça kısa seçerek (sığır-106 bp, manda-90 bp ve domuz-146 bp) parçalanma ve moleküler tanıdaki belirsizlikleri ortadan kaldırmayı hedeflemişlerdir. Yanlış negatif sonuçları ortadan kaldırmak için ise endojen kontrol (Ökaryotik 18S rRNA bölgesi-141 bp) kullanmışlardır. Her tür için saf DNA tespit düzeyini 0.003 ng olarak belirtmişlerdir (179).

Wang ve arkadaşları (2018), et ürünlerindeki domuz ve tavuk kaynaklı materyallerin tespit edilmesine yönelik türe özgü TaqMan qPCR testlerini Asya ve Avrupa olmak üzere on üç farklı laboratuvarda aynı yöntem ve teknikle çalışarak, laboratuvarlar arası testin performasını karşılaştırmışlardır. On üç katılımcı laboratuvardan gelen sonuçlar, geliştirilen yöntemlerin özgüllüğü, doğruluğu, yanlış pozitif oranı, tespit sınırı (LOD) ve tespit olasılığını (POD) belirlemek için analiz edilmiştir. Sonuçlar LOD'nin 5 kopya/reaksiyon, laboratuvarlar arası standart sapmanın ise 0.30 olduğunu göstermiştir. Böylece geliştirdikleri yöntemin et ürünlerindeki domuz ve tavuk türevli materyallerin tespiti ve tanımlanması için uygun olduğunu belirtmişlerdir (180).

Xu ve arkadaşları (2018), birden çok et kaynağını (ördek, domuz, sığır ve tavuk) eşzamanlı olarak saptamak için çoklu bir TaqMan kilitli nükleik asit (LNA) qPCR analizi (MLNA-RT-PCR) geliştirmişlerdir. Primer ve TaqMan-LNA

problarını türe özgü mitokondriyal gen sekanslarından tasarlamışlar ve optimize etmişlerdir. MLNA-RT-PCR saptama sınırının her tür için %0.01 olduğunu belirtmişlerdir (181).

Lubis ve arkadaşları (2017), çiğ domuz-tavuk ikili et karışımlarında domuz etinin tespit limitini belirlemek için Hidroliz Zen probu tekniğine dayalı qPCR geliştirmişlerdir. Yönteme göre, ikili çiğ et karışımında 1 pg/µL domuz DNA'sı, %0.001 karışım oranına kadar domuz etini tespit edebildiklerini belirtmişlerdir (26).

Kang ve Tanaka (2018), qPCR sonuçlarının kesinliğini ve doğruluğunu geliştirmek amacıyla ilk kez, beş farklı kantifikasyon yöntemini (daha önce sonuçlandırılmış 5 farklı araştırmacının çalışmaları) karşılaştırmış ve değerlendirmişlerdir. Böylece spektroflorometrik DNA miktar tayini yönteminin, işlenmiş gıda ürünleri için yüksek hassasiyet gerektiren qPCR analizleri için daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuca dayanarak SYBR Green bazlı qPCR ürünlerinin standart eğrilerini oluşturmak için ikili domuz-sığır karışımlarını kullanmışlar ve bunlar, kurum içi domuz modelleri kullanılarak doğrulanmış ve karşılaştırılmıştır. Cyt-b geninin kullanıldığı bu çalışmada, ticari sığır eti ürünlerinde %100 -%0.01 aralığındaki domuz eti miktarları başarıyla tespit edilmiştir (35).

Et kimlik doğrulaması için kullanılan, doğrudan PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için sonrasında jel elektroforezinin kullanılması gerekmektedir. Farklı amplikonların farklı sıcaklıklarda erimesi (Tm) şartıyla, interkalasyon boyası (EvaGreen, SYBR Green, SYTO vd.) ile erime eğrisi analizi bu gerekliliği ortadan kaldırabilir. Hem klasik ya da düşük çözünürlüklü erime eğrisi analizi (LRM) hem de yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRM) kullanılabilir. HRM, eritme adımında daha küçük sıcaklık artışları kullanarak LRM'den daha fazla veri toplar. Bu yöntemin maliyetinin ucuz ve analiz süresinin kısa olması, gerekli cihaz ve ekipmana ulaşımının kolay olmasından dolayı et tür tayini çalışmalarında literatürde son zamanlarda yer edinmiştir. Bunlardan bazıları şöyledir;

Thanakiatkrai ve Kitpipit (2017), farklı et türlerinin tanımlanması için HRM ile ilk doğrudan multipleks gerçek zamanlı PCR (HRM-PCR) testini geliştirmiş ve doğrulamışlardır. Yöntem, çiğ ve ticari etlerden yaygın olarak tüketilen altı et türünü çok kısa bir sürede ve çok uygun bir maliyetle tespit etmeyi sağlamıştır. Domuz eti, sığır eti, at eti, ördek eti, devekuşu eti ve tavuk etini ayırt eden belirli

erime zirvelerine sahip PCR ürünlerini oluşturmak için gerekli olan türe özgü primeler cyt-b, sitokrom oksidaz I ve 16S rRNA genlerinden tasarlanmıştır. Yöntemin hassasiyetinin her tür için 0.32 ng DNA'ya kadar duyarlı olduğunu belirtmişlerdir (182).

Denyingyhot ve arkadaşları (2017), helal gıdalarda yasak olan domuz, köpek ve sıçanların eş zamanlı tespiti için HRM-PCR tekniğini kullanmışlardır. Türe özgü primerler ND5, ATPase 6 ve cyt-b genlerinden tasarlanmıştır. Tasarlanan türlere ait primerlerin, deneysel hayvan türlerinden (domuz, köpek, sıçan, kedi, maymun, tavuk, at, koyun, keçi ve eşek) alınan DNA izolatları ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir. Seçilen yasak üç hayvanın Tm sıcaklıklarının benzersiz şekilde erime zirveleri oluşturması, metodun sağlamlığını kanıtlamış ve yöntem 150 adet ticari gıda ürününde denenmiştir. İncelenen ürünlerde sadece bir numunenin domuz DNA'sı ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (183).

Lopez ve arkadaşları (2017), sekiz yaygın et türünün tanımlanması için HRM-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Sığır, koyun, domuz, eşek, tavuk, hindi, tavşan ve bıldırcın türlerinden alınan numuneler, HRM analizlerinde cyt-b geninden 148 bp'lik bir parçanın amplifikasyonu yoluyla analiz edilmiştir. Her türden, bu türlerin çeşitli DNA karışımlarından ve şahit örneklerden erime profilleri elde edilmiştir. Her tür için bu erime profilleri farklı noktalarda elde edildiğinden, türlerin başarılı bir şekilde tanımlanmasına izin vermiştir (184).

Lopez ve arkadaşları (2006), gıda ürünlerindeki sığır, domuz, at ve kanguru DNA'sının tanımlanması ve nicelendirilmesi için SYBR Green erime eğrisi analizi ile qPCR analizi gerçekleştirmişlerdir. Kantitatif değerler için, hedeflenen her türün saflaştırılmış DNA'sından seri dilüsyonları hazırlanmış, bu dilüsyonların okunan eşik döngüsü (Ct) verilerinden yararlanılmıştır. Tek yönlü reaksiyonlarda tespit limitleri domuz ve kanguru DNA'sı için 0.04 pg, sığır ve at DNA'sı için 0.4 pg olarak tespit edilmiştir. PCR ürünlerinin tür özgüllüğü, DNA erime eğrilerindeki piklerin tanımlanmasıyla test edilmiş ve ikili DNA karışım halinde bulunan örneklerde domuz DNA'sı %5 düzeyinde tespit edilmiştir (185).

Şakalar ve Kaynak (2016), EvaGreen boyasının floresanına dayalı gerçek zamanlı bir PCR testi ile çeşitli sosis ve endüstriyel ürünlerdeki domuz ve sığır etinin türlere ait farklı erime eğrisi (Tm) zirvesinden yararlanarak, bu türleri tanımlamaya çalışmışlardır. Türe özgü primerler Beta-Aktin geninden tasarlanmış

ve domuz türü için erime zirvesi 87.5 °C, sığır türü için 80.5 °C olarak belirlenmiştir. Yöntemin tespit limiti iki tür için 0.01 ng/µL saf DNA iken, sosis ve endüstriyel ürünlerdeki hedef domuz ve sığır eti tespit düzeyi %0.001 olarak rapor edilmiştir (186).

Chung ve arkadaşları (2016), çiğ et karışımlarında domuz etinin tespit edilmesine yönelik SYBR Green tabanlı qPCR testi gerçekleştirmişlerdir. Domuz türüne ve diğer türlere (sığır, manda, tavuk, keçi) ait primerlerin mitokondriyal D-loop bölgesinden tasarlandığı ve amplikon uzunluklarının 150 bp'den kısa tutulduğu bu çalışmada, qPCR döngü sayısı (Ct) 30 olarak sınırlandırılmıştır. Çiğ et karışımlarından hedef türlerin %0.1 saf DNA seviyesine, ikili et karışımlarındaki domuz eti miktarının ise %0.05 seviyesine kadar tespit edilebildiği sonucuna varılmıştır (187).

Amaral ve arkadaşları (2017), işlenmiş et ürünlerinde domuz eti miktarının belirlenmesi için özgün ve oldukça hassas bir EvaGreen qPCR sistemi geliştirmeyi ve doğrulamayı amaçlamışlardır. ΔCt yöntemine dayanan normalize edilmiş bu analizle; çiğ etlerde %0.0001, ısıl işlem görmüş etlerde (121 ^{o}C-15 dk.) %0.01 (a/a) düzeyinde domuz eti varlığını tespit edebilmişlerdir (188).

Orbayinah ve arkadaşları (2019), domuz türüne ait 3 farklı spesifik primer (1F1R, 2F2R, 3F3R) tasarlayarak domuz köftesi ürünlerinin analizinde kullanılmak üzere SYBR Green temelli bir qPCR testi geliştirmişlerdir. Domuza ait tasarlanan primerlerin tavuk, inek ve keçi türlerine karşı çapraz reaksiyon vermediği belirtilmiştir. Testin doğrusallığı ve duyarlılığı için köfte örneğinden izole ettiği DNA'dan bir dizi seyreltme (0, 1, 1, 10, 100, 1.000 ve 10.000 pg/µL DNA) yaparak amplifikasyon eğrisi oluşturmuşlardır. Böylece, 1F1R primer setinin diğer primer setlerinden daha iyi amplifikasyon eğrisi döngüsü değerlerine sahip olduğu ve tespit limitinin 1 pg saf domuz DNA'sı olduğunu belirlemişlerdir (37).

Lubis ve arkadaşları (2018), gıda örneklerinde domuz DNA'sının hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilebilmesi için cyt-b geninden primer tasarlamışlar ve EvaGreen tabanlı bir qPCR testi geliştirmişlerdir. Testin özgüllüğü domuz dışında dokuz hayvan türü (sığır, manda, tavuk, ördek, keçi, at, devekuşu, koyun ve hindi) ve 6 sebze türüne (soğan, sarımsak, kırmızı biber, karabiber, soya fasulyesi ve patates) karşı doğrulanmıştır. Testin duyarlılığı ise 8 farklı 10'ar kat seyreltilmiş DNA dilüsyonları (10 ile 0.00001 ng/µL) ile çizilmiş standart eğride değerlendirilmiştir. Geliştirdikleri test ile çiğ domuz eti ikili karışımında 0.00001

ng/µL'ye kadar domuz DNA'sı ve %0.001 düzeyinde domuz eti varlığını başarıyla tespit etmişlerdir (20).

Maryam ve arkadaşları (2016), Endonezya'da geleneksel bir ürün olarak tüketilen kurutulmuş et ürünü ''dendeng'' gibi işlenmiş et ürünlerinde, domuz eti varlığını tespit etmek amacıyla EvaGreen tabanlı bir qPCR testi gerçekleştirmişlerdir. Türe spesifik primerleri mitokondriyal D-loop686 (114 bp'lik bir bölge) ve cyt-b (cyt-b) (134 bp'lik bir bölge) gen bölgelerinden tasarlamışlardır. Bu primerlerin özgüllüğü sığır, tavuk, keçi ve at türlerine karşı test edilmiştir. Domuz türü için tasarladıkları her iki primer setinin (D-loop686 ve cyt-b) tespit limitini 5 pg/µL domuz DNA'sı ve dendeng ürünlerinde domuz eti varlığını %0.5 olarak tespit etmişlerdir (189).

Tablo 2.4. Domuz türüne ait qPCR'da yapılan prob tabanlı bazı singlepleks ve multipleks çalışmalar

Teknik	Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
qPCR Singlepleks TaqMan	Domuz (149 bp)	Çiğ et karışımları	Cyt-b	%0.5	(176)
	Domuz (ND)	Farklı etlerin karışımı	RPA1 Geni	5 kopya /reaksiyon*	(36)
	Domuz (68 bp)	Ticari et ürünleri	ATPase 8	ND	(190)
ZEN™	Domuz (156 bp)	Çiğ Etler, Ticari et ürünleri ve Farklı etlerin karışımı	12S rRNA	1 pg/µL	(26)
qPCR Multipleks TaqMan	Domuz (80 bp)	Ticari et ürünleri ve Farklı etlerin karışımı	β-Aktin	%0.1	(191)
	Domuz (80 bp)	Farklı etlerin karışımı	β-Aktin	0.01 ng DNA	(192)
	Domuz (107 bp)	Çiğ Etler, Ticari et ürünleri ve Isıl işlem görmüş etler	β-Aktin	0.03 ng**	(193)
	Domuz (107 bp)	Farklı etlerin karışımı	β-Aktin	30 kopya***	(193)
	Domuz (330 bp)	Çiğ Etler ve Ticari et ürünleri	β-Aktin	%0.01	(194)

*Tespit sınırı (LOD)%95, ND: Belirtilmemiş, **:Nitel, ***:Nicel, K.:Kaynaklar, Tablo 2.4. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.4. (Devamı)

Teknik	Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
qPCR Multipleks TaqMan	Domuz	At, öküz ve domuz jelatini ile karıştırılmış eşek derisi jelatini	Cyt-b, ND2	1 ng/µL her tür için	(195)
	Domuz (87 bp)	Çiğ etler, Farklı etlerin karışımı ve Isıl işlem görmüş etler	Miyostatin	5 pg (Saf DNA) %0.001 (Karışım)	(196)
	Domuz (108 bp)	Ticari et ürünleri	Ryanodin reseptörü	>1%	(197)
	Domuz (83 bp)	Çiğ Etler ve Ticari et ürünleri	D-loop	%0.5	(198)
	Domuz (ND)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	ATPase 6	5 pg (Saf Domuz DNA) %1 (Karışım)	(199)
Mericon™ kit	Domuz (290 bp)	Ticari et ürünleri ve Farklı etlerin karışımı	12S rRNA–tRNA-Val	0.0001 ng	(200)
	Domuz (134 bp)	Ticari et ürünleri ve Farklı etlerin karışımı	Pre-1 Sine element	0.0001 ng	(200)
TaqMan-LNA	Domuz (137 bp)	Çiğ Etler	Domuza özgü	0.01%	(181)

*Tespit sınırı (LOD)%95, ND: Belirtilmemiş, **:Nitel, ***:Nicel, K.:Kaynaklar, Tablo 2.4. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.5. Domuz türüne ait qPCR'da yapılan interkolasyon boya tabanlı bazı singlepleks ve multipleks çalışmalar

Teknik	Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
qPCR Singlepleks SYBR Green	Domuz (ND)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	Leptin Primer	ND	(201)
	Domuz (107 bp)	Çiğ ve ısıl işlem görmüş domuz ve sığır ikili karışımı	Cyt-b	%100-%0.01	(35)

*Tespit sınırı (LOD)%95, ND: Belirtilmemiş, **:Nitel, ***:Nicel, K.:Kaynaklar, Tablo 2.5. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.5. (Devamı)

Teknik	Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
qPCR Singlepleks SYBR Green	Domuz (ND)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	Leptin Primer	ND	(201)
	Domuz (107 bp)	Çiğ ve ısıl işlem görmüş domuz ve sığır ikili karışımı	Cyt-b	%100-%0.01	(35)
	Domuz (131 bp)	Çiğ Etler ve Farklı etlerin karışımı	D-loop	%0.1	(190)
	Domuz (102 bp)	Farklı etlerin karışımı ve Ticari et ürünleri	Cyt-b	0.00001 ng/µL (saf domuz DNA) %0.001 (Karışım)	(20)
	Domuz (HRM)	Farklı etlerin karışımı ve Ticari et ürünleri	LINE-1 (L1)	%0.001 (a/a)	(202)
Evagreen	Domuz (149 bp)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	Cyt-b	5 pg (saf DNA)	(189)
	Domuz (114 bp)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	D-Loop686	%0.5 (İkili karışım)	(189)
	Domuz (176 bp)	Çiğ Etler ve Farklı etlerin karışımı	D-Loop22	10 pg (safDNA) %0.5 (İkili)	(203)
SYTO-9	Domuz (103 bp)	Farklı etlerin karışımı	β-aktin	%0.01 (İkili karışım)	(204)
	Domuz (107 bp)	Farklı etlerin karışımı	Cyt-b	%0.01 (İkili karışım)	(204)
	Domuz (83 bp)	Farklı etlerin karışımı	D-loop	%0.01 (İkili karışım)	(204)
qPCR Multipleks SYBR Green	Domuz	Çiğ Etler ve Farklı etlerin karışımı	Troponin I	0.2 ng	(205)
	Domuz (ND)	Laboratuvarda Hazırlanmış Model Ticari Ürün ve Ticari et ürünleri	Cyt-b	1 pg	(37)

ND: Belirtilmemiş, *:Singlepleks türe özgü PCR, **:Multipleks türe özgü PCR, K.:Kaynaklar, Tablo 2.5. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

Tablo 2.5. (Devamı)

Teknik	Hedef Tür	Uygulama	Hedef Gen	Tespit Limiti	K.
qPCR Multipleks Evagreen	Domuz (58 bp)	Çiğ Etler ve Ticari et ürünleri	Cyt-b	0.32 ng	(182)
	Domuz (107 bp)	Ticari et ürünleri, Farklı etlerin karışımı ve Isıl işlem görmüş etler	Cyt-b	%0.0001 (Çiğ) %0.01 (Otoklavlanmış)	(188)
	Domuz (HRM)	Haşlanmış et	Cyt-b	0.1 ng	(184)
	Domuz (111 bp)	Çiğ etler, Farklı etlerin karışımı ve Ticari et ürünleri	β-Aktin	0.0002 ng	(186)
ResoLight dye Singlepleks/ Multipleks	Domuz (144 bp)	Çiğ Etler ve Ticari et ürünleri	ND5	ND	(183)
SYBR green Singlepleks/ Dupleks	Domuz (ND)	Çiğ etler ve Farklı etlerin karışımı	Troponin I	0.01 ng* 20 ng**	(205)
SYTO-9	Domuz (126 bp)	Çiğ etler, Farklı etlerin karışımı ve Ticari et ürünleri	Cyt-b	10.24 pg	(206)

ND: Belirtilmemiş, *:Singlepleks türe özgü PCR, **:Multipleks türe özgü PCR, K.:Kaynaklar, Tablo 2.5. Kaynak (17,62)'den genişletilmiştir.

2.5.1.3 TaqMan ™ Prob Yöntemi

TaqMan™ probları, Perkin Elmer Applied Biosystems tarafından sentezlenen tescilli çift boya problarıdır. Bu tür çift boya probları farklı ticari kaynaklardan temin edilebilir. Taqman™ sistemi, bir floresan sinyal üretmek için Taq polimerazın 5'/3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. qPCR'da TaqMan ™ gibi bir prob bazlı analiz, çok küçük amplikonların ve yalnızca amplikon içinde istenen spesifik sekansa bağlanan dahili probların kullanılmasına izin verir. Her ne kadar TaqMan probları pahalı olsa da, spesifik ve verimli bir şekilde çoğaltılabilirler. Ayrıca, kurulumları kolayca karşılanamayan önemli bir optimizasyon aşaması gerektirmesine rağmen, multipleks reaksiyonları mümkündür (22,207). Özel olarak sentezlenmiş çift etiketli probların kullanımı, multipleks qPCR analizlerine izin verir. Bu tür çift etiketli problar, 5' ucunda bir florofor (floresan verici boya-Raportör) olarak 6-karboksifloresein (FAM) ve 3' ucunda, yayıcının yayılan floresanını önleyecek kadar yakın olan bir söndürücü (Quencher) olarak 6

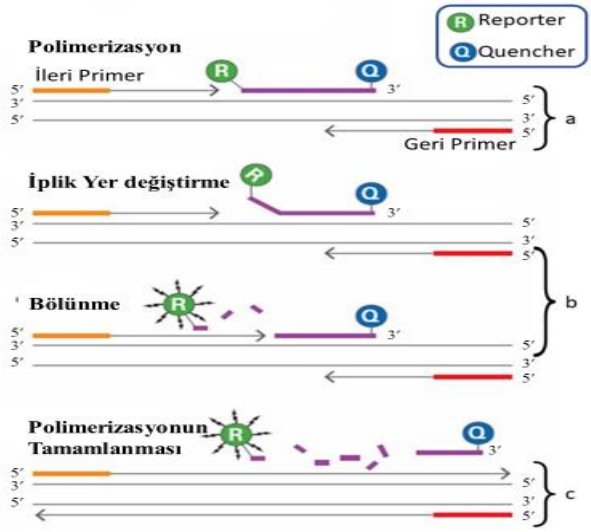
karboksetrametil-rodamin (TAMRA) boya içerir. TAMRA'nın floresan yoğunluğu, PCR amplifikasyonu sırasında çok az değişir. Bu nedenle TAMRA boya emisyonunun yoğunluğu, raportör (FAM) emisyon varyasyonunu normalleştirmek için dahili bir standart görevi görür. Her termal denatürasyon adımının ardından, probun tek sarmallı amplikonlara bağlanmasına izin vermek için sıcaklık düşürülür. Primer uzatma sırasında, Taq polimeraz, probu 5' yönünden 3' yönüne ayırır ve raportör boyayı serbest bırakır, bu durum daha sonra söndürücüye olan uzaklığın artmasının bir sonucu olarak floresan yayar. Floresan, daha sonra her döngünün her bir uzatma aşamasını takiben ölçülür (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5.) (22,29,55,133,173,178,188,208).

Şekil 2.5.'te TaqMan ™ floresan problarının mekanizmasında oluşan reaksiyonlar;

a. TaqMan ™ probu, hedef DNA dizisine bağlanır. Prob, 5 'ucunda bir raportör boya ve 3' ucunda bir söndürücü boya içerir.

b. PCR amplifikasyonu sırasında, tamamlayıcı bir DNA ipliği sentezlenir ve Taq polimerazın 5' eksonükleaz aktivitesi, raportör boyayı kesip çıkarır.

c. Raportör boyanın floresanı, söndürücü boyadan ayrıldığında ve yoğunluk ölçüldüğünde meydana gelir.

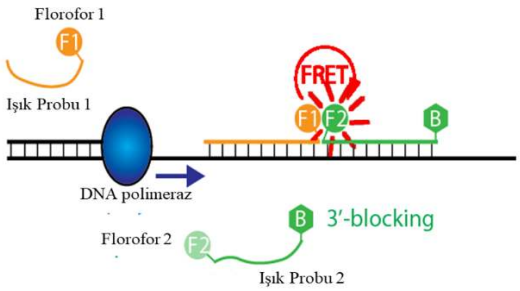


Şekil 2.5. TaqMan™ Floresan Problarının Mekanizması (209).

2.5.1.3.1 Floresans Rezonans Enerji Transferi

Şekil 2.6.'da iki farklı oligonükleotid etiketli prob gösterilmektedir. Prob 1, 3' ucunda bir floresan etiketi taşır ve prob 2, LightCycler Red 640 veya 5' ucunda Cyanin 5 gibi başka bir uygun floresan boya ile etiketlenir. İki probun sekansları,

PCR ürününe baştan sona yönelimde hibridize olabilmeleri ve iki floresan boyanın birbirine yakın olmasıyla sonuçlanacak şekilde seçilir. İlk boya (floresan), döngüleyicinin ışık kaynağı tarafından uyarılır ve yeşil bir floresan ışık yayar. İki boyanın yakınlığı (1-5 nükleotid içinde), yayılan yeşil floresanın, ikinci probun 5' ucuna bağlı LightCycler Red 640 boyasını uyarmasıyla sonuçlanır ve kırmızı bir floresan ışık yayar. Bu enerji transferi FRET olarak bilinir. PCR'den kaynaklı artan DNA miktarı, kırmızı floresanda orantılı bir artış sağlar. 640 nm'de kırmızı floresan yalnızca her iki prob hibridize edildiğinde meydana geldiğinden, floresan bağlanmadan sonra ölçülür. Primer uzatma sırasında, hibridize edilmiş problar, Taq polimeraz tarafından yer değiştirir ve daha sonra FRET'in oluşması için birbirinden uzaklaşır.



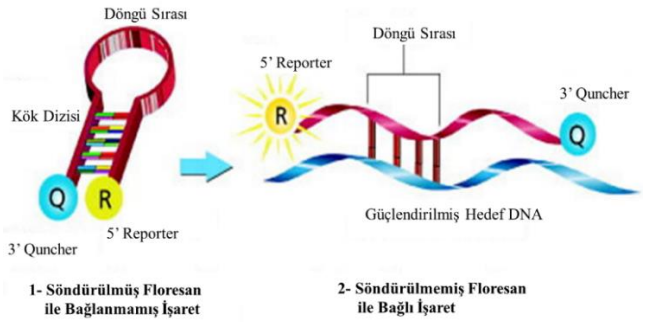
Şekil 2.6. Rezonans Floresan Enerji Transferi (210).

FRET'in ilginç bir varyasyonu, 5' ucunda bir raportör boya LCRed64 veya Cy5 ile etiketlenmiş tek bir probun kullanılmasını ve PCR karışımına SYBR green I'in eklenmesini içerir. Etiketli prob, amplifiye edilmiş hedef ipliğin homolog sekansına hibridize olur ve ardından SYBR Green I, raportör boyayı uyarmak için ortaya çıkan çift iplikli DNA'ya bağlanır. Primer dimerler, PCR'den sonra elde edilen farklı Tm değerleri temelinde amplifiye edilmiş hedef DNA'dan ayırt edilir (133,211).

2.5.1.3.2 Moleküler İşaretçiler (Molecular Beacons ™)

Molecular Beacons™, Stratagene'den özel sentezlenmiş nükleotid problarının tescilli ticari adıdır. Problar bir ucunda bir raportör boya ve diğer ucunda bir söndürücü boya barındırır. Rapotör boya veya florofor, söndürücü boyaya yakındır ve firkete konfigürasyonundayken floresan değildir. Florofor tarafından alınan enerjiyi söndürücüye aktarır ve ışık olarak yayılmak yerine ısı olarak salınır. Prob hibridize olduğunda; söndürücüyü raportör boyadan ayıran ve

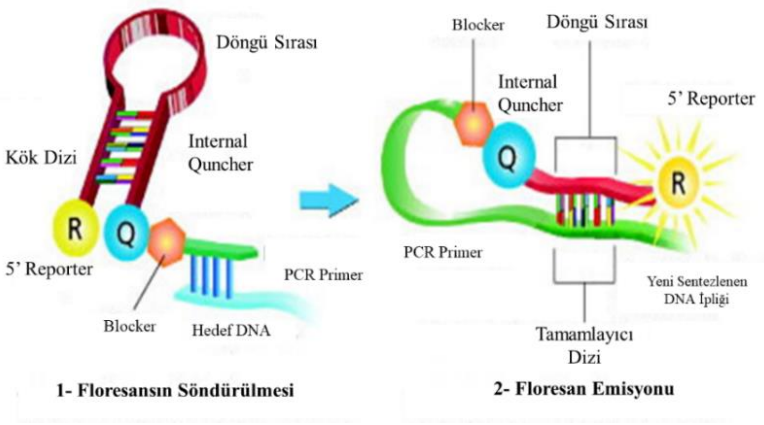
UV ile indüklenen floresan emisyonuna neden olan sert bir çift sarmal oluşturur. Floresan daha sonra her döngünün bağlanma (annealing) aşamasından sonra ölçülür (22,59,133) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Moleküler İşaretçi Problarının Mekanizması (212).

Şekil 2.7.'de görülen moleküler işaretçi problarının mekanizması şu şekilde açıklanabilir: Firkete konfigürasyonundaki moleküler işaret probu, floresein (6-FAM) gibi floresan boyanın ve hibrit sap tarafından muhafaza edilen DABCYI gibi söndürücü boyanın yakınlığı nedeniyle floresan değildir. Döngüdeki prob dizisinin homolog hedef dizisi ile hibridizasyonu, ölçülen floresanın oluşmasına izin veren iki boyanın fiziksel olarak ayrılmasına neden olur. Floresan, probun ısıl denatürasyonundan ve düşük sıcaklıkta (~41°C) bağlanmasından sonra ölçülür.

Scorpions™, bir florofor ve söndürücü içeren "gövde-döngü" kuyruğuna sahip PCR primerleridir (Şekil 2.8.). "Gövde-döngü" kuyruğu, Taq polimerazın kök döngü dizisini kopyalamasını önleyen bir "PCR engelleyici" ile PCR primer dizisinden ayrılır. PCR sırasında Scorpions™ primerleri, PCR ürünlerini oluşturmak için genişletilir. Bağlanma aşaması sırasında, Scorpion'un kuyruğundaki prob dizisi, yeni oluşturulan PCR ürünündeki hedef diziye hibridize olmak için geri kıvrılır. Scorpions™ ve PCR ürününün kuyruğu artık aynı standın bir parçası olduğundan, etkileşim intramoleküler olarak kabul edilir ve dahil edilen florofor, söndürücüden uzaktadır. "Döngü" için önerilen uzunluk 20-35 nükleotitdir (211).



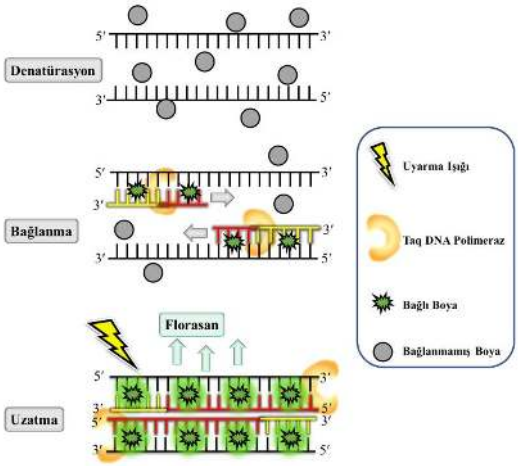
Şekil 2.8. Scorpion Etiketli Primerlerin Mekanizması (213).

Scorpions™ etiketli primerlerin mekanizması Şekil 2.8.'de görüleceği üzere şu şekilde açıklanabilir: PCR sırasında Scorpions™ primerleri, PCR ürünlerini oluşturmak için genişletilir. Bağlanma sırasında, Scorpion'un kuyruğundaki prob sekansı, yeni oluşturulan PCR ürünündeki hedef sekansa hibridize olmak için geri kıvrılır, böylece florofor (raportör boya), söndürücüden önemli bir mesafede yeni sentezlenen ipliğe dahil edilir.

2.5.1.3.3 SYBR Green Boyası

SYBR Green interkolasyon boyası, qPCR için en basit, en ucuz ve en sık kullanılan floresan sistemlerden biri olup çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna (minor groove) bağlandığında UV altında floresanı büyük ölçüde artar. Bağlı boyanın floresanı, serbest boyanınkinden 100 ile 1000 kat daha yüksektir ve bu nedenle bu durum floresan sinyalinde bir artışla sonuçlanır. Bu boya, siyanin boyası olup 480 nm dalga boyuna sahip mavi ışıkla uyarılabilir ve emisyon spektrumu maksimum 520 nm'de floresanınkiyle karşılaştırılabilir (59).

PCR sırasında, hedef sekans çoğaltıldığında SYBR Green, uzatma adımı sırasında her yeni çift sarmallı DNA kopyasına bağlanır, tek iplikli DNA'ya bağlanmaz. Gerçek zamanlı olarak izlendiğinde, polimerizasyon adımı sırasında gözlemlenebilen ve DNA denatüre edildiğinde düşen floresan sinyalinde bir artışa neden olur (Şekil 2.9.). Sonuç olarak, her PCR döngüsünün uzatma adımının sonunda floresan ölçümleri yapılmalıdır (35,202,214).



Şekil 2.9. PCR Amplifikasyonu Esnasında SYBR Green Mekanizması

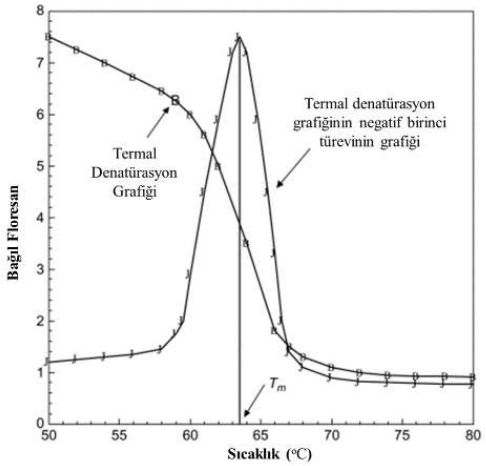
Reaksiyon tüpündeki bağlanmamış SYBR Green boya çok az floresan sergiler, PCR sırasında oluşan çift sarmallı DNA'ya bağlanarak PCR ürünlerini algılar ve şu şekilde çalışır (Şekil 2.9.);

1- PCR sırasında DNA polimeraz, PCR ürünlerini oluşturan hedef sekansı çoğaltır.
2- SYBR Green boya daha sonra çift sarmallı DNA'nın her yeni kopyasına bağlanır. PCR ilerledikçe daha fazla PCR ürünü oluşturulur.
3- SYBR Green boyası, tüm çift sarmallı DNA'ya bağlanır, üretilen PCR ürünü miktarı ile orantılı olarak floresan yoğunluğunda bir artış meydana getirir (Şekil 2.4.).

Termal denatürasyon grafiğinin ikinci türevinin bir yazılım grafiği, orta noktası büyütülmüş ürün için Tm değerini çan şeklinde simetrik bir eğri şeklinde verir (Şekil 2.10.). Primer dimer oluşumundan kaynaklanan sinyalin amplikon sinyaline karışması, sıcaklığın kritik bir noktaya yükseltilmesiyle ortadan kaldırılabilir.

SYBR Green kullanımının dezavantajı, yanlış pozitif sinyaller üretebilmesidir; yani, SYBR Green boyası herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlandığı için, spesifik olmayan çift sarmallı DNA dizilerine de bağlanabilir. Bu nedenle, hedef olmayan sekansları amplifiye etmeyen, iyi tasarlanmış primerlere sahip olmak ve erime eğrisi analizinin (melting curve analysis) gerçekleştirilmesi son derece önemlidir. Diğer bir dezavantajı ise multipleks reaksiyonlara olanak sağlayamamasıdır. Ancak iyi tasarlanmış primer ve çok iyi optimize edilmiş PCR

koşulları sağlandığında ve sistemin Tm analizi ile desteklenmesiyle olası yanlış pozitif sonuçlar ortadan kaldırılabilmektedir. Bununla birlikte son yıllarda yapılan HRM analizi ile farklı amplikon uzunluklarına sahip bölgelerin Tm sıcaklıklarının farklı olması baz alınarak SYBR Green multipleks çalışmalarda uygulanabilmektedir (161,184,186,215). Bu suretle SYBR Green ile qPCR analizi, qPCR problarına olan ihtiyacı ortadan kaldırarak deney kurulum ve maliyetini daha ucuz hale getirmektedir.



Şekil 2.10. SYBR Green qPCR'a ait bir amplikonun termal denatürasyon grafiğinden Tm değerinin belirlenmesi (59).

2.5.1.4 Dijital PCR

Son yıllarda, dijital PCR (dPCR) yöntemi, DNA izlerini tespit etmek için yeni bir ilerlemedir. dPCR'de, reaksiyon bölmelerinin sayısı büyük ölçüde hedef DNA nicelemesi aralığını tanımlar. Piksel sayısı ve dijital görüntünün çözünürlüğü arasındaki ilişkiye benzer şekilde, bölmelerin sayısını artırmak, hassasiyeti artırır ve bir örnekteki nükleik asit dizileri arasındaki küçük konsantrasyon farklılıklarının kolay çözümlenmesini sağlar. dPCR, her reaksiyonu pozitif (1) veya negatif (0) olarak atamak için ikili uç nokta eşiği kullanır. Bu nedenle DNA kopya sayısı niceliğini etkilemeden, amplifikasyon verimindeki geniş eşitsizlikleri tolere edebilir. Teknik, kalibrasyon eğrileri kullanmadan gıda örneklerinde mutlak bir nükleik asit konsantrasyonu ölçümü sağlayarak qPCR'den daha hassas sonuç verir (216). Ayrıca, dPCR, PCR inhibitörlerine veya çapraz reaksiyon gösteren DNA şablonları ve primer-dimerler gibi PCR'ı etkileyebilecek diğer faktörlere karşı daha toleranslıdır (217,218) (Şekil 2.11).

Şu anda ticari olarak temin edilebilen dPCR sistemlerinde iki yaklaşım kullanılmaktadır (219). İlki mikroakışkan bölmelerdeki birkaç bine kadar ayrı tepkimenin bölümlenmesine dayanan bölmeli dijital PCR (cdPCR), ikincisi ise dPCR'den önce bulunan, damlacık dijital PCR (ddPCR)'dir. ddPCR, yağ-su emülsiyon damlacık teknolojisine dayalı bir dPCR varyasyonudur. ddPCR'de, PCR reaksiyon numunesi 20.000 damlaya bölünür ve her bir damlacıkta hedef moleküllerin PCR amplifikasyonu gerçekleşir. Pozitif PCR amplifikasyonları, floresan hedefe özgü problarla izlenir. PCR amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, pozitif PCR ürünü (floresan) ve negatif PCR ürünü içeren damlacıklar sayılır. Son olarak, damlacık okuyucu bir floresan sinyalinin varlığını (pozitif) veya yokluğunu (negatif) tespit etmek için bir hedef DNA konsantrasyonu sağlar. Pozitif damlacıklar en az bir hedef DNA kopyası (cDNA) içerir ve QuantSoft yazılımı, florofor başına pozitif ve negatif damlacıkların sayısını ölçer. Poisson istatistikleri kullanılarak numunedeki hedef moleküllerin doğru miktarı, toplam pozitif damlacıkların yüzdesinden hesaplanabilir (53,220). ddPCR'nin avantajları mutlak ölçüm, kesinlik, tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve doğruluktur (49).

ddPCR yöntemi, nükleotid içerikli birçok alanda çalışma imkanı bulmuş yeni bir teknolojidir. Et ve deniz ürünlerinin orijinalliğini belirlemek, gıda ve yemlerde hedef türleri tespit etmek, *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin tespiti bunlardan sadece bazılarıdır.

Ren ve arkadaşları (2017), koyun ve keçi eti ürünlerinde tavuk varlığının kantitatif tespiti için kopya sayılarının et oranına dönüştürmek için bir sabit (çarpım faktörü) geliştirmişlerdir. ddPCR ve gerçek zamanlı PCR (qPCR)'ı karşılaştırmışlar ve %5 ile %80 aralığında %9'dan daha az sapma gösteren ddPCR'nin qPCR'den daha doğru olduğunu bulmuşlardır. Buna göre et karışımlarında %1 (a/a) koyun ve %0.1 tavuk eti varlığını tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri sabit ile uyguladıkları farklı ısıl işlemlerde ve çok yüksek basınçta bile ddPCR sonuçlarının iyi tekrarlanabilirlik ve stabilite sergilediğini belirtmişlerdir (50).

Wang ve arkadaşları (2018), ddPCR yöntemiyle etlerde keçi ve koyun içeriğini tanımlamak ve ölçmek için kopya sayısı üzerinden et ağırlığını hesaplayabilecekleri bir sabit geliştirmişlerdir. Buna göre hem keçi hem de koyun için tespit limitini 1 kopya/µL ve miktar tayin limitini 5 kopya/µL olarak bulmuşlardır. Geliştirdikleri ddPCR yönteminin keçi ve koyun etini tanımlamak ve

ölçmek için son derece hassas olduğunu ve gelecekte rutin analizlerde potansiyel olarak uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir (51).

Morisset ve arkadaşları (2013), gıda ve yem örneklerinde rutin analiz için DNA örneklerinde MON810 transgeni ve hmg mısır referans gen kopyalarının mutlak sayılarını ddPCR yöntemiyle ölçmüşlerdir. Aynı analizleri cdPCR ve qPCR'de de gerçekleştirmişlerdir. ddPCR (beş hedef DNA kopyası)'nin iki yönteme göre üstün ve hassas olduğunu belirtmişlerdir. Böylece ddPCR teknolojisinin GDO'ların, gıda ve yem numunelerinin kantitatif analizinin gerekli olduğu durumlarda uygulanabileceği sonucuna varmışlardır (53).

Floren ve arkadaşları (2015), ddPCR yöntemiyle işlenmiş et ürünlerinde domuz etinin tağşişi üzerine yaptıkları bir çalışmada, yöntemin %0.01'lik bir miktar tayin limiti (LOQ) ve %0.001'lik bir tespit limiti (LOD) ile domuz eti varlığını tespit edebildiklerini belirtmişlerdir. Bu analizi, kantifikasyonun sağlanması açısından kromozomal DNA üzerinden tasarladıkları F2 geni ile gerçekleştirmişler ve mtDNA üzerinden cyt-b genini hedefleyen başka bir primer seti ile de kıyaslamışlardır. Sonuçta, hücre başına mtDNA içeriğinin dokular arasında en az 5 kat değişken olmasından kaynaklı olarak kantifikasyon için uygun olmadığını belirtmişlerdir (52). Cai ve arkadaşları da (2017), kromozamal DNA üzerindeki β-aktin genini kullanarak tek bir tüp dijital PCR reaksiyonunda sığır eti ve domuz eti karışımı içeren numunelerde et kaynağını eşzamanlı olarak tanımlamak ve ölçmek için çift yönlü bir ddPCR algılama ve kantifikasyon sistemi geliştirmişlerdir. Yönteme göre et ürünlerinde 0.1 ng/ µL hassasiyette domuz varlığını tespit etmişlerdir (221).

Köppel ve arkadaşları (2019), pişmiş bir sosis matrisinde sığır eti, domuz eti, tavuk, hindi, koyun ve at eti oranlarının ölçümünü ddPCR kullanılarak, hedef DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen ağırlık miktarını bulmayı amaçlamışlardır. Bunun için aynı analiz ve prosedürler 6 farklı laboratuvar ortamında uygulanmış ve 20 sosis örneğinin ağırlık oranları belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre her bir tür için tespit limitinin %1 olduğu belirtilmiştir (222).

Ayrıca Bian ve arkadaşları (2015), kirlenmiş içme sularında *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenleri 2 saat içinde ddPCR yöntemiyle tespit etmişlerdir (223).

Şekil 2.11. ddPCR Analiz Akış Diyagramı (224).

2.5.2 Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

LAMP, son zamanlarda biyo-numunede algılama veya teşhis (tür tanımlama/gıda doğrulama) amacıyla kullanılan spesifik, hızlı ve hassas bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem, hedefin birkaç tersine çevrilmiş tekrarı ile kök-ilmek DNA yapılarının gelişmesine yol açan Bst ve Gsp gibi DNA polimeraz etkisine dayanır (24). Hedef gen üzerindeki altı ile sekiz farklı DNA dizisini spesifik olarak tanımak için dört ile altı primer kullanılır. Hedef DNA, 60 dakika içinde 109-1010 kez amplifiye edilebilir. LAMP reaksiyonu sırasında yüksek sıcaklıkta DNA denatürasyonu gerekli olmadığından, bir termal döngüleyiciye kesinlikle ihtiyaç duyulmaz ve reaksiyon izotermal koşullar altında gerçekleştirilir (24,225,226). LAMP amplikonlarını tespit etmek için kullanılan teknikler arasında; jel elektroforezi, bulanıklık ölçümü, kolorimetri, floresan boyaları, yanal akış cihazı (LFD) ve luminol tabanlı elektrokemilüminesans (ECL) sayılabilir (227,228). Hızlı ve minimum ekipman gereksinimleri ile DNA amplifikasyonu için bir tanı yöntemi olan LAMP tekniğinin bazı gıda ürünü ya da ürün içeriğinin tespitinde kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalara aşağıda değinilmiştir;

Sheu ve arkadaşları (2018), alerjik yer fıstığının tespiti için özel olarak tasarladıkları 2 primer setini kullanarak LAMP testi geliştirmişlerdir. Primerlerden biri nükleer ribozomal DNA sekans bölgelerinin dahili kopyalanmış sekans 1 (ITS1), diğeri ise *Arachia hypogeae*'nin (yer fıstığı) Ara h1 gen sekansıdır. LAMP deneyi gerçekleştirilirken ITS1 primerinin Ara h1 gen primerlerinden daha duyarlı olduğunu, LAMP'ın yer fıstığını tespit etme hassasiyetinin ise geleneksel PCR yönteminden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Tasarladıkları LAMP primer setlerinin, yer fıstığının tanımlanmasında yüksek özgüllük gösterdiğini ve ceviz, fındık, badem, kaju ve Macadamia fıstığı gibi diğer fındık türlerine karşı hiçbir çapraz reaksiyon göstermediğini belirtmişlerdir. Haşlanmış ve buharda pişirilmiş

yer fıstığından ekstrakte edilen genomik DNA'lar şablon olarak kullanılmış ve diğer kabuklu yemiş bileşenlerinin içindeki yer fıstığının minimum tespit düzeyi %0.1 olarak belirlenmiştir (229).

LAMP'ın başka bir uygulama alanı ise gluten tespiti ve nicelendirmesidir. Garrido ve arkadaşları 2018 yılında gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve gerçek zamanlı LAMP (qLAMP) yöntemlerini kıyaslayarak gluten içeren bazı tahıllarda gluten tespitini ve hassasiyetini incelemişlerdir. Her iki yöntemin de gluten içeren tahıllar için spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Yöntemlerin kantifikasyon kabiliyeti ikili modelde (buğday/mısır) test edilmiş ve qPCR'nin daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmanın, bazı tahılların gluten içeriğinin saptanması için qLAMP ve qPCR yöntemlerinin karşılaştırılması açısından ilk olduğu vurgulanmıştır (230).

Çin pırasası, Çin soğanı, yeşil soğan, sarımsak ve soğan birçok mutfakta kullanılmasına rağmen Çin vejeteryan diyetinde ''5 yasak sebze'' olarak bilinmekte ve kullanılmasına izin verilmemektedir. Lee ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, bu türlerle ilgili 5 primer seti tasarlayarak LAMP deneyi gerçekleştirmiş ve yeni geliştirilen LAMP testinin geleneksel PCR yönteminden daha hassas olduğu göstermişlerdir. Yasaklı bu 5 bitkiye ait primerlerin diğer bitkilerle çapraz reaksiyon vermediğini, böylece hedef türlerin tespiti için hassas, güvenilir ve gıda pazarlarında uygulanabilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (228).

LAMP tekniği süt saflığının tespitinde de çalışılmıştır. Manda sütü tağşişinin hızlı tespiti için uygulanan bu test, termal döngüleyici gerektirmeden bir su banyosunda gerçekleştirilmiş ve DNA ekstraksiyonundan başlayarak yaklaşık 1 saat 40 dakika içinde tamamlanmıştır. Manda sütü örneklerindeki inek DNA'sı, SYBR Green I/HNB boyalarıyla jel elektroforezinde görüntülenmiş ve manda sütüne karıştırılan %5 düzeyindeki inek sütü tespit edilebilmiştir (231).

Domuz etinin tespitine yönelik geliştirilen LAMP çalışmalarından birisi Cho ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılmıştır. LAMP tekniği, 8 farklı et türünün (sığır, domuz, at, keçi, koyun, tavuk, ördek ve hindi) eş zamanlı olarak tanısı ve tespiti için uygulanmıştır. Türe özgü mtDNA'yı hedefleyen LAMP primer setleri tasarlanmış ve hedef genler, erime eğrisi analizi ile oluşturulan benzersiz bağlanma sıcaklıklarına göre ayırt edilmiştir. Çiğ ve pişmiş ette LAMP analizlerinin tespit limitleri (LOD) 10 pg/µL ile 100 fg /µL olarak belirlenmiştir. Çiğ ve pişmiş et karışımlarındaki LOD'ler ise sırasıyla %0.01 ile %0.0001 olarak tespit edilmiştir.

Analizler 30 dakika içinde gerçekleştirilmiş ve PCR analizlerininkinden daha fazla duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir (232).

Et tağşişinin belirlenmesi için yapılan başka bir çalışmada, LAMP tekniği yanal akış cihazı (LFD) ile birleştirilen akıllı ve kapalı bir biyosensör olarak geliştirilmiştir. Belirli memelileri tanımlamak için spesifik endojen referans gen olarak kromozomal Gcg geni seçilmiştir. LFD-LAMP ve Gcg geninin kombinasyonu olarak geliştirilen biyosensör ile karışık ve işlenmiş etlerde önemli ölçüde yüksek spesifiklik ve 10 pg'a kadar hedef DNA'nın tespiti sağlanmıştır (28).

Farklı bir biyosensör yaklaşımı Fazira ve arkadaşları tarafından sergilenmiştir. LAMP tekniğine ilaveten reaksiyon sonrası ürünün, luminol bazlı elektrokemilüminesans (ECL) sinyalleri ölçülmüştür. Uyguladıkları bu yöntemin literatürde bir ilk olduğunu, sığır eti içerisinde domuz DNA'sının yaklaşık 5 dakika içinde saf etlerde 0.1 pg/µL, ikili et karışımlarında ise %0.001 hassasiyete kadar tespit edebildiklerini belirtmişlerdir (227).

Domuz DNA'sının oldukça spesifik tespiti için tek adımlı, gerçek zamanlı döngü aracılı izotermal amplifikasyon (RealAmp) testini geliştiren Yang ve arkadaşları, türe özgü RealAmp primerlerini, cyt-b genini hedefleyecek şekilde tasarlamışlardır. Reaksiyon, bir dakikalık aralıklarla floresan sinyalini ölçen bir gerçek zamanlı PCR sistemi ile 45 dakika boyunca, SYBR Green I boyası kullanılarak 63 °C'de amplifiye edilmiştir. Hedef olmayan türler ile herhangi bir çapraz reaksiyon olmaksızın 1 pg'a kadar hedef DNA'nın tespit edebildiği belirtilmiştir. 100 °C'de 15 dakika süreyle ısıl işleme tabi tutulmuş, farklı oranlarda (%0.01-%10) domuz eti ile sığır eti karıştırılarak hazırlanan et karışımları test edilmiş ve RealAmp testleri, ette %0.01 oranında domuz etinin tespit edilmesini sağlamıştır (233).

Girish ve arkadaşları (2020), türlerden DNA izolasyonu için Alkalin Lizis (AL) yöntemini kullanarak LAMP tekniğini domuz DNA'sının tespiti için geliştirmişlerdir. Reaksiyonun görsel tespiti, SYBR Green I boyası eklenerek reaksiyondaki renk gelişiminin gözlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. 30 dakika boyunca 121 °C' de ısıtılan, termal olarak işlenmiş et örneklerinde LAMP-AL tekniğinin, sığır etindeki domuz eti karışımının %0.1, DNA saptama sınırının ise 0.5 ng/µL olduğunu belirtmişlerdir (234).

Genel olarak LAMP tekniği düşük işlem maliyeti, kısa zamanda sonuç vermesi (1 saate kadar), çok yüksek amplifikasyon verimliliği gibi avantajlara sahip

olmasına rağmen, bazı dezavantajlara da sahiptir. Bunlardan bazıları; multipleks yaklaşımlara PCR kadar hassas olmaması, matriks inhibitörlerine karşı PCR'den daha az duyarlı olması ve hedef bölge tespiti için çok sayıda primere ihtiyaç duyması sayılabilir (62).

2.5.3 DNA Barkodlama ve Yeni Nesil Dizileme (NGS)

DNA barkodlama, bilinen veya standart bir genomik DNA'nın amplifikasyonu ve sekanslanmasına bağlı olarak taksonomik ilişkileri sınıflandıran "DNA barkodu" olarak adlandırılan hızlı bir teşhis aracıdır. Teknik, genellikle barkod dizilerinin referans kütüphanelerinde bulunan dizileri karşılaştırarak tür seviyesine kadar taksonomik bilgilerin elde edilmesini sağlar. İdeal bir DNA barkodunun iki önemli özelliğinden biri yüksek taksonomik kapsamı, diğeri ise yüksek çözünürlüğüdür. Türler arası değişkenlikten çok, aynı tür içindeki değişkenliğin tespitini mümkün kılarak hızlı, güvenilir, otomatikleştirilebilir ve uygun maliyetli tür tanısına izin verir (235).

DNA barkodlamasının bir zorluğu, belirli bir taksonda düşük değişkenlik ve aynı zamanda yüksek düzeyde türler arası değişkenlik sunan "mükemmel" genin araştırılmasıdır. Bu nedenle, birkaç türde korunan bir bölgenin tespiti, bunların tanımlanmasına izin verebilir. Tür ayrımı için en çok hedeflenen genler; hayvan türleri için mitokondriyal COI ve cyt-b genleri, bitki türleri için olgunaz K (matK) ve karboksilaz (rbcL) genleridir (236,237).

Geleneksel tam uzunlukta DNA barkodlama, hayvan örneklerinde tür tanımlaması için COI geninin yaklaşık 650 bp uzunluğunu hedefler. Bununla birlikte, düşük pH, yüksek sıcaklık ve yüksek basınç koşulları gibi işlem koşulları, işlenmiş gıda örneklerinden tam uzunlukta barkod türetilmesini zorlaştırmaktadır. Buna yönelik olarak DNA'sı bozulmuş ya da hasar görmüş numunelerde tür tanımlanmasını kolaylaştırmak için Meusnier ve arkadaşları, tam uzunluktaki barkod içinde kısa bir DNA bölgesini hedeflemişler ve evrensel "mini barkod" tasarlamışlardır. Bu mini barkodun (100-200 bp), memeliler, balıklar, kuşlar ve böcek örnekleri de dahil olmak üzere test edilen türlerin %92'sinde hedef DNA fragmanını amplifiye edebildiğini saptamışlardır (238).

Yaşam Veri Sistemleri Barkodu (BOLD), tüm yaşam türleri için DNA barkod verilerinin üretilmesini ve uygulanmasını desteklemek için tasarlanmış, birden fazla arama kriteri kullanılarak genel kayıtların aranmasını sağlayan halka açık bir veri alma arayüzü sağlar (17,54). BOLD veritabanını kullanarak Kane ve

arkadaşları (2016), ABD'de yerel marketlerde satılan 48 adet et ürününü COI genini hedefleyerek DNA barkodlama çalışması yapmışlardır. DNA barkodlamasında başarısız olan herhangi bir örnek, tekrar ekstraksiyon ve dizilemeden geçmiş ve bir tür karışımı olasılığı nedeniyle, sığır, tavuk, kuzu, hindi, domuz ve at etini hedefleyen qPCR ile test edilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen 48 numuneden 38'inin doğru, 10'unun yanlış etiketlendiği tespit edilmiştir. Yanlış etiketlenen numunelerin dokuzunun, qPCR'ye dayalı olarak etikette belirtilmeyen et türleri içerdiği ve bir örneğin ise bütünüyle yanlış etiketlendiği tespit edilmiştir. Böylece yanlış etiketlemenin, düşük maliyetli et türlerinin daha yüksek maliyetli ürünlere kasıtlı olarak karıştırılmasından veya işleme sırasında çapraz bulaşma nedeniyle et türlerinin kasıtsız olarak karıştırılmasından kaynaklı olabileceğini ifade etmişlerdir (214).

Geleneksel DNA dizilimine dayanan yöntemler, tür karışımları ile iyi performans göstermese de, mini-barkodlar gibi kısa genetik hedefler, karışık tür numunelerinin tanımlanmasına imkan vermek için yeni nesil dizileme (NGS) ile birleştirilme potansiyeline sahiptir.

Son yıllarda NGS teknolojileri, DNA'yı analiz etme, dizileme ve DNA'yı yüksek verimlilikle tek bir adımda niceleme yönünden devrim niteliğindedir. NGS'nin esnekliği, uygun biyoinformatik araçlarla sekans veri analizi yoluyla elde edilir. 454 GS Junior (Roche), Ion Torrent (Promega) ve MiSeq® (Illumina) gibi NGS'lerin yakın zamanda ve hızlı bir şekilde geliştirilmesi, NGS teknolojilerini et türlerinin tespiti için son derece uygulanabilir hale getirmektedir (239).

DNA barkodlamasının NGS ile bir kombinasyonu olan DNA metabarkodlama, çoğullamaya izin verir ve bu nedenle geleneksel DNA barkodlamadan bile daha güçlüdür. DNA'yı indekslemek için kısa-yapay oligonükleotidler kullanılarak, farklı örneklerden türetilen amplikonlar aynı anda tek bir çalışmada dizilenebilir. Son zamanlarda, MiSeq® platformunda 16S rDNA bölgesini hedefleyen bir DNA metabarkodlama yöntemi geliştirilmiş ve etten DNA özütlerini ve model sosislerden elde edilen DNA karışımlarını analiz etmek için kullanılmaktadır. Hedeflenen et türleri %0.1 oranına kadar ayırt edilebilmiştir (240).

Bununla birlikte NGS, gıda ürünlerindeki türlerin tespit edilmesine yönelik birçok fayda sağlasa da, birden çok yanlış pozitif varyant üretme olasılığı, kalite kontrol zorlukları ve tespit edilen varyantların uygun şekilde yorumlanamaması

gibi sınırlamalara sahiptir. Dahası, NGS teknoloji sistemleri hala çok pahalıdır ve hedeflenen dizilerin DNA amplifikasyonuna dayalı yöntemlere kıyasla uygulama için daha uzman personel gerektirir. Teknik, tekrarlanabilirliğini sağlamak için laboratuvarlar arası testlerle yeterli standardizasyon ve doğrulama gerektirir. Bununla birlikte, bu sınırlamalar gelecekte ortadan kaldırılmalı ve teknik önümüzdeki yıllarda daha da iyileştirilmelidir (22).

DNA barkodlamanın avantajlarına rağmen, şu anda et karışımlarında birden fazla türü tanımlayamamakta, gerçek zamanlı PCR veya NGS gibi diğer yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir (214). Diğer bir sınırlama, DNA'sı bozulmuş ya da hasar görmüş numunelerde tam uzunlukta amplifikasyon sağlanamamasıdır (99,241).

2.5.4 Poliformik DNA'ın Rastgele Amplifikasyonu (RAPD)

Rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) parmak izi kalıpları türe özgüdür ve rastgele primerler kullanarak, DNA'daki birçok sekansı hedeflemek suretiyle, birçok lokusun aynı anda karşılaştırılmasına izin veren karmaşık modeller üretir. Genomik DNA üzerinde birden fazla konumu bağlayan kısa rastgele primer kullanılarak DNA fragmanlarının amplifikasyonunu ve ardından amplifiye edilmiş fragmanların jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrılmasını içerir. Böylece türler arasında yüksek düzeyde polimorfizm tespit edilebilir (46). Ayrıca RAPD-PCR, incelenen türlerin DNA dizileri hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmez, hızlı ve basit bir prosedürdür (62).

Gıda analizi alanında, PCR-RAPD yöntemi gıda ürünlerinde balık, sebze ve et tür tanımlaması için başarıyla kullanılmıştır (45–47,104,242,243). RAPD tekniği ile domuz tağşişinin belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (62).

PCR-RAPD yöntemini kullanarak, Huang ve arkadaşları (2003) devekuşu, bıldırcın, güvercin ve sülünden alınan et örneklerinin doğrulamasını (45), Martinez ve arkadaşları (1998), geyik, kanguru, ren geyiği, manda ve devekuşu gibi av etleri ile bazı evcil et türlerinin (48) tanımlamasını gerçekleştirmişlerdir.

RAPD analizi, otoklavlanmış numunelerde olduğu gibi ciddi şekilde bozulmuş materyalleri analiz etmek için yeterli görülmemektedir. Ayrıca analizde yüksek kaliteli DNA izolatına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte RAPD teknolojisi, birden fazla tür içeren karıştırılmış etlerde hedef organizmanın tanımlanması için uygun değildir (44,104,242,243).

2.5.5 Restriksiyon Parça Uzunluğu Poliformizm (RFLP)

Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ile PCR analizi, et ve balık türlerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (38,244,245). DNA ilk olarak dokudan ekstrakte edilir ve saflaştırılır, ardından mitokondriyal 12S rRNA gibi bir genden bir dizinin geleneksel PCR ile amplifikasyonu yapılır. Elde edilen amplikon daha sonra bir veya daha fazla kısıtlama (restriksiyon) enzimleri aracılığıyla parçalanır; sonunda enzimle parçalanmış ürünler agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde, Etidyum Bromür (EB) ile görselleştirilebilir (22,99,245).

Her türün DNA parmak izi o türe özgüdür ve kullanılan kısıtlama enzimlerine bağlı olarak, bantlama modeli değişir. Görselleştirilen bu farklılıklarda türlerin hatta soyların ayrımları doğru bir şekilde tanımlabilir (22,62). PCR-RFLP'ye dayalı tür tanımlaması temel olarak seçilen hedef sekansa, kullanılan kısıtlama enzimlerine ve amplifiye edilmiş fragmanın uzunluğuna bağlıdır. PCR-RFLP, et ve et ürünlerinde tür tanımlaması için kapsamlı bir şekilde uygulanmıştır (38,41,104).

Doosti ve arkadaşları (2014), İran'da satışa sunulan farklı şirketlerden ve gıda pazarlarından toplanan 224 et ürününün (68 sosis, 48 sosis, 55 hamburger, 33 jambon ve 20 soğuk kesilmiş et) PCR-RFLP tekniği ileürünlerdeki etlerin kimliğini belirlemişlerdir. PCR ürünleri *AluI* kısıtlama enzimi ile sindirilmiş ve sonuçta toplam numunelerin %7.58'inin helal et içermediğini ve etikette belirtilmeyen et içeriğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, PCR-RFLP gibi moleküler yöntemlerin, Helal kimlik doğrulaması için et ürünlerinde et türünün tespiti için potansiyel olarak güvenilir teknikler olduğunu ifade etmişlerdir (246).

PCR-RFLP, ‘‘lab-on-a-chip’’ teknolojisi ile birleştirilerek bazı etlerin tür doğrulama çalışmaları için yararlı bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Burada amplifiye edilmiş PCR ürünleri, bir çip üzerinde laboratuar mikroakışkan biyoanalizör kiti kullanılarak RFLP analizi ile doğrulanmaktadır. Bu teknikle; sığır, koyun, tavuk, hindi veya balık gibi et türlerinin yanında (40,208) kedi (38) ve köpek (39) türlerinin doğrulanma çalışmaları da başarıyla sonuçlanmış ve geleneksel PCR-RFLP tekniğinden daha hızlı ve basit olduğu vurgulanmıştır.

Kumar ve arkadaşları (2014), PCR-RFLP tekniğini kullanarak sığır, manda, keçi, koyun ve domuz olmak üzere en yaygın tüketilen beş hayvan etinin tanımlanması için mitokondriyal sitokrom-b geninin 168-776 bp'lik bir bölgesini

hedeflemişlerdir. Hedefledikleri bu bölgede 609 bp'lik PCR amplikonu elde etmişler ve bu amplikonu *Alu1* ve *Taq1* restriksiyon enzimleriyle muamele etmişlerdir. PCR-RFLP testinin tekrarlanabilirliğini, gözlenen tutarlı sonuçlar ile on kez doğrulamışlardır. Analiz yaklaşık 24 saat sürmüş ancak hedeflenen her türün tanımlanabildiğini belirtmişlerdir (43).

Erwanto ve arkadaşları (2014), yerel pazarda satılan değişik köfte dükkanlarından aldıkları 39 farklı köftede, domuz kontaminasyonunu tespit etmek için cyt-b genini kullanan bir PCR-RFLP tekniği uygulamışlardır. Hedefledikleri bölgenin çoğaltılmasının ardından bu bölge *BseDI* restriksiyon enzimi ile muamele edilmiş ve 131 bp ve 228 bp'lik iki farklı parçaya başarıyla ayrılmıştır. Basit, özgül ve duyarlı olan, cyt-b geninin spesifik PCR amplifikasyonu ve *BseDI* restriksiyon enzimleri tarafından bölünmesi işlemini kapsayan PCR-RFLP tekniğinin, köftede domuz varlığının belirlenmesi için kullanılabileceği vurgulanmıştır (247).

Hossain ve arkadaşları (2016), sığır, bufalo ve domuz türlerinin sosis gibi ürünlerde tanımlanabilmesi için her bir türün iki farklı gen bölgesini (Mitokondriyal cyt-b ve ND5) hedefleyen bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu-kısıtlama fragmanı uzunluğu polimorfizm (mPCR-RFLP) deneyi tasarlamışlardır. Belirledikleri bu üç türün farklı oranlarda (%1, %0.5 ve %0.1) ikili karışımlarından sosis üretimi yapmışlar ve hazırladıkları bu sosisleri 121 °C'de 15 psi basınç altında 2.5 saat otoklavlamışlardır. DNA izolasyonu ve PCR amplifikasyonu sonrasında *AluI, EciI, FatI* ve *CviKI-1* restriksiyon enzimleriyle hedeflenen 73, 90, 106, 120, 138 ve 146 bp'lik bölgeler başarıyla elde edilmiştir. Böylece yöntemin, tüm çiğ ve işlenmiş sosis ürünlerinde %0.1'e kadar ürünlerde domuz eti varlığını tespit edebildiği belirtilmiştir (248).

Guan ve arkadaşları (2018), 8 farklı hayvan türünü (keçi, koyun, geyik, bufalo, sığır, yak, domuz ve deve) içeren, balık ve yaygın diğer evcil hayvan türleriyle çapraz reaksiyon vermeyen bir PCR-RFLP deneyi geliştirmişlerdir. Bunun için her türün mtDNA'sından farklı uzunlukları çoğaltacak bir çift evrensel primer tasarlamışlardır. Her bir PCR ürünü, *SspI* restriksiyon enzimi ile muamele edilmiş ve PCR amplifikasyonları keçi-760 bp, koyun-737 bp, geyik-537 bp, bufalo-486 bp, sığır-481 bp, yak-464 bp, domuz-429 bp ve deve türü için 359 bp uzunlukta fragmanlar vermiştir. Araştırmacılar, çiğ et türlerinin tespit limitinin sekiz hayvan türü için 0.01 ile 0.05 ng genomik DNA arasında değiştiğini tespit etmişlerdir (42).

Genel olarak yöntem, birçok bölge, tüm gen boyunca farklılık gösterse bile, yalnızca seçilen enzimin kısıtlama alanında tanımlama yapılabildiğinden sınırlandırılmıştır. Diğer tekniklerde olduğu gibi, PCR-RFLP analizi, karıştırılmış etlerin analizi için en iyi seçim değildir. Çünkü sonuçlar, numunede yer alan tüm olası türleri temsil eden çeşitli kısıtlama modellerinin bir kombinasyonunu gösterebilir. Bununla birlikte restriksiyon enzimlerinin uygulanabilmesi için büyük DNA fragmanlarına ihtiyaç vardır. DNA'nın ısıl işleme veya yıkıcı işlemlere maruz kalmasından dolayı amplifikasyon gerçekleşmeyebilir (41,43,99).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırmada; domuz (*Sus scrofa)* ve sığır (*Bos taurus*) etlerinin iskelet kas dokuları kullanılmıştır. Sığır eti Bolu'da bulunan yerel bir şarküteriden (Yamaner, Bolu), domuz eti ise İstanbul'da sadece domuz eti ve ürünleri satışı yapan bir kasaptan (Kosmaoğlu, İstanbul) temin edilmiştir. Etler, soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Her bir hayvan türüne ait etler, araştırmada kullanılıncaya kadar -20°C (Panasonic, Japan)'de ayrı raflarda muhafaza edilmiştir. At ve eşek türüne ait saf DNA'lar SNP Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

3.1.1 Et Karışımlarının Hazırlanması ve Analiz Gruplarının Belirlenmesi

Domuz ve sığır türüne ait etler yağsız olacak şekilde temin edilmiştir. Kontaminasyonu ortadan kaldırmak amacıyla domuz ve sığır etleri farklı blenderlerde (Waring Commercial, USA) kıyma haline getirilmiştir. Sığır eti içerisinde domuz etinin belirlenen % oranları ve karışım miktarları (a/a) Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Hazırlanan 14 farklı karışım örneklerine, dijital bir kumpas yardımıyla 6 cm çapında ve 0.5 cm yüksekliğinde köfte şekli verilmiştir. Her bir karışım grubundan, 10'ar adet köfte elde edilmiştir. Her karışım grubundan 5 adet köfte ısıl işlem uygulaması, geriye kalan 5 adet köfte örnekleri ise çiğ örnek grubunun analizleri için ayrılmıştır (Şekil 3.1.). Her gruba ait örnekler ayrı ayrı paketlenmiş ve ilgili analizlerde kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2 Primer Tasarımı

Domuz (NC_000845.1, 16613 bp) ve sığır (NC_006853.1, 16338 bp) türüne ait primerler, mtDNA üzerinden Adenozin Trifosfat sentaz alt birim 6 (ATPase 6) ve Adenozin Trifosfat sentaz alt birim 8 (ATPase 8) gen bölgelerinden tasarlanmıştır. Primer tasarımı kısaca şu şekilde yapılmıştır;

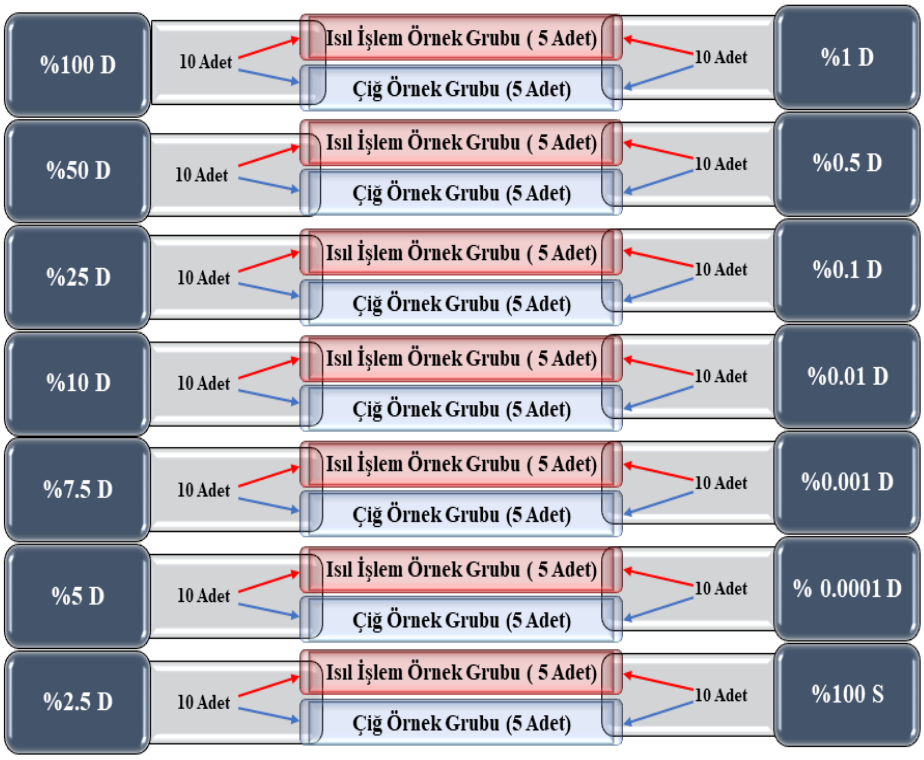
- Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) sitesinden domuz ve sığır türlerinin alt ırkları da dahil olmak üzere mtDNA üzerinde bulunan genlerin sekansları (D-loop bölgesi dahil 16 farklı gen) indirilmiştir.
- Avrupa Biyoinformatik Enstitüsünün (The European Bioinformatics Institute-EMBL-EBI), www.ebi.ac.uk/Tools/msa sitesinden her türün kendi içinde çoklu hizalaması ''Clustal Omega'' programında (Multiple

Sequencing Alingment) yapılmış, uygun görülen sekans o tür için belirleyici ana sekans olarak seçilmiştir.

- EMBOSS Stretcher programında ‘’Pairwise Sequencing Alingment’’ (www.ebi.ac.uk/Tools/psa) yapılarak domuz ve sığır türünün primer olarak kullanılabilecek sekansları gözle taranarak seçilmiştir. Burada primer tasarımı için seçilen oligonükleotid dizisinin primer tasarımında dikkat edilecek kuralları göz önünde bulundurularak çalışılmıştır.
- Primer olarak tasarlanan oligonükleotid dizilerinin 3 farklı program kullanılarak (IDT, NEB, BIOPHP) Tm sıcaklıkları, %GC içeriği gibi primer tasarımında önemli bazı parametrelerine bakılmış ve karşılaştırılmıştır.
- Teorik olarak tasarlanan bu primerlerin Blast analizi yapılmıştır. Böylelikle bu primer setlerinin başka türlere ait bölgeleri çoğaltıp çoğaltmadığı kontrol edilmiştir.
- Daha sonra her türe ait bu primer setlerinin ileri ve geri primer sekanslarının Serial Cloner 2.6.1 programı kullanılarak, çoğaltacağı bölgeye ve uzunluğuna bakılmış ve kontrol edilmiştir. Tasarlanan primerlere ait bilgiler Tablo 3.2. ve Şekil 3.2.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Domuz ve Sığır Eti % Karışım Oran ve Miktarları

Grup No.	(%) S	(%) D	%100 Sığır Eti (S)	%100 Domuz Eti (D)	14 Grup Karışım Et Örnekleri
1	100	-	%100 S 600 g	-	%100 S
2	-	100	-	600 g %100 D	%100 D
3	50	50	%100 S 300 g	300 g %100 D	%50 D
4	75	25	%100 S 250 g	250 g %50’lik D	%25 D
5	90	10	%100 S 300 g	200 g %25’lik D	%10 D
6	92.5	7.5	%100 S 100 g	300 g %10’luk D	%7.5 D
7	95	5	%100 S 125 g	250 g %7.5’luk D	%5 D
8	97.5	2.5	%100 S 200 g	200 g %5’lik D	%2.5 D
9	99	1	%100 S 240 g	160 g %2.5’luk D	%1 D
10	99.5	0.5	%100 S 200 g	200 g %1’lik D	%0.5 D
11	99.9	0.1	%100 S 320 g	80 g 0.5’lik D	%0.1 D
12	99.99	0.01	%100 S 360 g	40 g %0.1’lik D	%0.01 D
13	99.999	0.001	%100 S 360 g	40 g %0.01’lik D	%0.001 D
14	99.9999	0.0001	%100 S 360 g	40 g %0.001’lik D	%0.0001 D



Şekil 3.1. % Karışım Oranlarına Ait Örneklerin Analiz Gruplarının Belirlenmesi

Tablo 3.2. Domuz ve Sığır Türüne ait Primer Sekansları

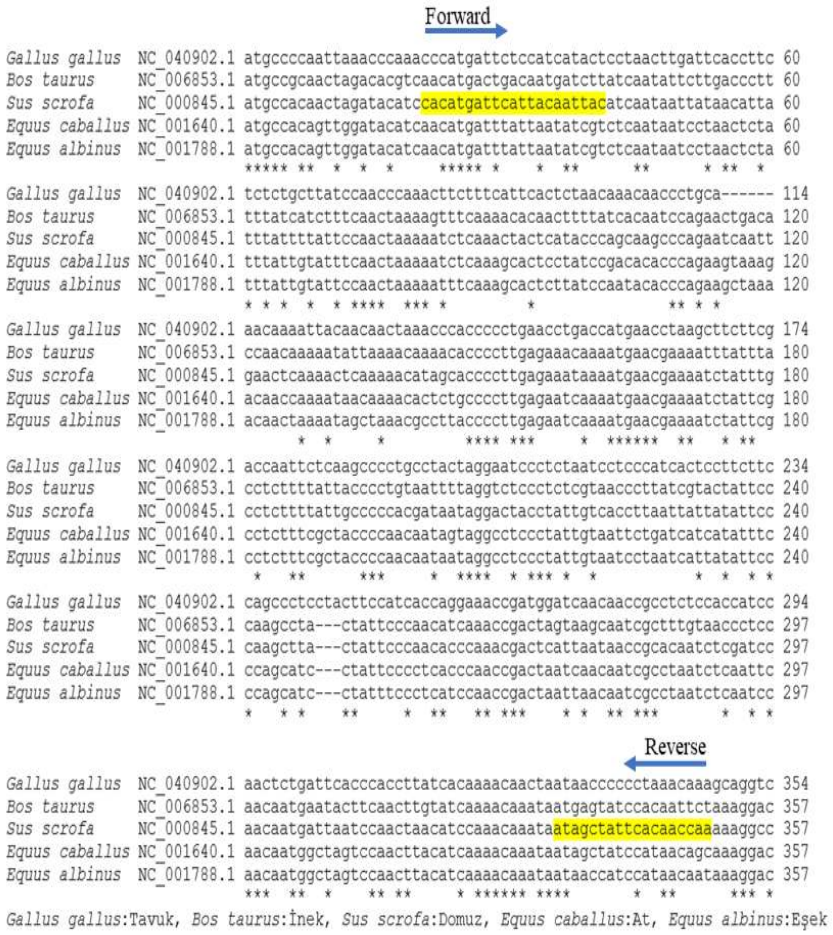
Primer Adı	Sekans 5'-3'	Genomik Pozisyon	Tm (°C)	Amplikon Uzunluğu
ATPase8_ SS_For.	CACATGATTCA TTACAATTAC	mtDNA-ATPase8/ NC_000845.1	50	330
ATPase6_ SS_Rev.	TTGGTTGTGAA TAGCTAT	mtDNA-ATPase6/ NC_000845.1	47	330
ATPase8_ BT_For.	AACATGACTGA CAATGATCTT	mtDNA-ATPase8/ NC_006853.1	52	332
ATPase6_ BT_Rev.	TTCATGTTTGTC CTTTAGAA	mtDNA-ATPase6/ NC_006853.1	49	332

SS: *Sus scrofa* (domuz), BT: *Bos taurus* (sığır), For.: İleri primer, Rev.: Geri primer

3.1.3 Primerlerin Özgüllüğü

Domuz türüne ait primer setinin, bazı türler için çapraz reaksiyon kontrolü yapılmıştır. Buna göre; seçilen türler, gıda ürünlerinde daha çok tağşiş amaçlı olarak katılan türlerden seçilmiştir. Bu türler, sığır türü dışında tavuk (*Gallus gallus*), at (*Equus caballus*) ve eşek (*Equus asinus*) olarak belirlenmiştir (Şekil

3.2.). Bu analiz için Tablo 3.4.'te verilen protokol koşulları uygulanmış ve qPCR ürünlerine ait bantlar agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.



Şekil 3.2. Domuz, Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerinin Çoklu Hizalaması, Primer Sekans ve Çoğaltılan Bölgenin Gösterimi

3.2 Yöntem

Çiğ ve ısıl işlem uygulanmış % karışım oranları belli 14 grup karışım örneğinde domuz eti miktar ve tespit limiti SYBR Green interkolasyon boya bazlı (SsoAdvanced Mastermix, Bio-Rad, USA) gerçek zamanlı PCR (SG-qPCR)'de gerçekleştirilmiştir. Türlere ait primer setlerinin önce kendi içinde, daha sonra çiğ ve ısıl işlem görmüş örnekleri için ayrı ayrı protokol optimizasyonu yapılmıştır. Tüm örneklerin DNA izolasyon aşaması sonrası optimize edilen protokoller ile CFX96 Maestro yazılımı kullanılarak qPCR (Bio-Rad, CFX96, USA) cihazında analiz edilmiştir. Analizler, her bir deneme grubu için 3 tekrarlı ve her tekrar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. Örnek gruplarının SG-qPCR analizleri ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

3.2.1 SG-qPCR Analizi

SYBR Green tüm çift zincirli DNA moleküllerine bağlandığı için her zaman istenilen DNA bölgesinin çoğaldığına işaret etmez, yanlış pozitif sonuç almak mümkündür (59). Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizi yapılması gerekmektedir (249). Erime eğrisi, erime özelliklerine dayalı olarak büyütülmüş ürünlerin özgüllüğünü tahmin etmek için gerçekleştirilen bir PCR sonrası analizdir. Çift sarmallı DNA bağlayıcı boyaların mevcudiyetinde gerçekleştirilen reaksiyonlar, bir dizi artan sıcaklıkta inkübe edilir. Amplikonun erime sıcaklığına (Tm) ulaşıldığında, amplikon çift sarmallıdan tek sarmallı duruma ayrılarak çift sarmallı bağlayıcı boyanın floresanında bir düşüşe yol açar.

Erime eğrileri, floresan sinyalindeki değişim oranını gösteren bir türev çizim olarak sunulur. X ekseni sıcaklığı temsil eder ve y ekseni, dF/dT olarak gösterilen sıcaklığa (T) göre floresanın (F) negatif türevini (değişim oranı) gösterir. Erime sıcaklığı, DNA dizisinin uzunluğuna, G:C içeriğine ve tampona bağlıdır. Grafiğin zirvesi, DNA'nın ~%50'sinin tek sarmallı olduğu erime sıcaklığını (Tm) temsil eder (250). Böylece erime eğrisi analizine bağlı olarak primerlerin Tm sıcaklıkları, çapraz kontaminasyon ve primer-dimer durumu tespit edilmiştir.

qPCR analizlerinde amplifikasyon verimliliğinin tespitinde standart eğriden yararlanılır. Oluşturulan standart eğri grafiği (SEG) ile ortalama PCR verimi (E), analitik duyarlılık ve testin sağlamlığı hakkında basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir gösterge sağlanır. Standart eğrinin çizilmesi için aynı örneğe ait en az 5 farklı dilüsyon aralığını içermesi, en az 2 tekrar ve her tekrarda 3 teknik tekrar içermesi beklenmektedir (171).

qPCR'de özellikle gen ekspresyonu analizlerinde, 1 logaritmik değişimde 3.3 Cq'luk bir artışın olması analizin verimliliği açısından önemlidir. qPCR verimi, testin kesinliği ve tekrarlanabilirliğini etkileyen faktörlerden biri de Cq varyansının standart sapma (SS) değeridir. Bu değerin teknik tekrarlar arasında 0.5'ten küçük olması istenmektedir (133).

qPCR verimliliğinin %100 olduğu düşünüldüğü durumda, her döngüde amplikonun 2'ye katlandığı varsayılır. Buna bağlı olarak standart eğri üzerinde verilen E değerinin %90 ile %110, r^2 değerinin >0.95 ve slope (eğim) değerinin ise -3.1 ile -3.8 arasında olması beklenmektedir (171,250). Bu değerlerin temelinde,

aşağıda verilen formül yer almaktadır. Ayrıca bu formülde, yukarıda bahsedilen 3 parametrenin birbiriyle bağlantılı olduğu görülmektedir.

$$E = 10^{(-1/eğim)} - 1$$

Standart eğri grafiklerinde, x ekseni üzerinde yer alan logaritmik değişimin y ekseni üzerinde yer alan Cq karşılığı verilmektedir. Bu durum, okunan Cq değerinden bilinmeyen test örneklerinin analit konsantrasyonunu tahmin etmenin bir yoludur (250).

Domuz ve sığır türüne ait primerlerin optimizasyonu, optimizasyon sonrası çiğ ve ısıl işlem görmüş et karışımlarındaki domuz eti tespit limiti ve miktarı SG-qPCR analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Türe spesifik tasarlanan domuz ve sığır türlerine ait primerler PRZ BioTech (Ankara, Türkiye) firmasına sentezlettirilmiştir. Sentezlettirilen primerler liyofilize olarak gelmiş ve moleküler saflıkta su (PanReach AppliChem molecular biology grade water, Italy) ile her biri 100 µM konsantrasyona sulandırılmıştır. Primerlerin tamamı, 100 µM'lık 25 µl hacimde ana stoklar halinde 200 µl'lik PCR tüplerine alikotlanmış ve tüplerin üzerine bilgileri etiketlenerek -20 ^{o}C'ye kaldırılmıştır. Analizlerde kullanılmak üzere ana stoktan, 25 µM/µL olacak şekilde ara stoklar hazırlanmıştır. Tüm PCR reaksiyon hazırlıkları öncesi ve sonrası aşamalarda kullanılan tüm sarf malzemeler ''PCR Clean'' sınıfı malzemelerdir.

qPCR reaksiyon hazırlığı için öncelikle primerlerin ve şablon DNA'ların belirli konsantrasyona ayarlaması yapılmıştır. Primerler 25 µM/µL, şablon DNA'lar ise 50 ng/4 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. SG-qPCR analizi için hazırlanan 96 kuyucuklu bir plakada, analizi yapılan tüm örnek gruplarına ait reaksiyon karışımları dışında ayrıca yer alan PCR reaktifleri şunlardır;

1- NTC (None Template Control), şablon DNA haricinde, reaksiyonda olması gereken diğer tüm PCR reaktiflerini içerir. Bu, kurulum kontaminasyonunu ve primer-dimer ürün amplifikasyonunu tanımlamak için kullanılan standart bir negatif kontroldür.
2- %100 domuz DNA'sı ve %100 sığır DNA'sı pozitif kontrol olarak yer almaktadır.
3- Domuz primer setinin sığır DNA'sını, sığır primer setinin de domuz DNA'sını içeren PCR reaktifleri çapraz reaksiyon kontrolü için bulunmaktadır.

Kontaminasyon riskine karşı tüm işlemler biyogüvenlik kabini (ESCO Class-II BBC, Singapur) içinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 DNA İzolasyonu ve Ölçümü

Çiğ ve ısıl işlem görmüş her karışıma ait örneklerden DNA izolasyonu, ticari bir kit olan QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Buna göre işlem basamakları şu şekildedir;

- Her bir örnek grubundan 25 mg et örneği 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde (Dnase-Rnase Free Eppendorf, USA) tartılmış ve üzerine 180 µL ATL tamponu ve 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve vortekslenmiştir (Benchmark, Germany).
- Doku tamamen çözülene kadar numunedeki asılı maddeleri dağıtmak için karışım bir kuru ısıtıcı blokta (Bio-Rad, Digital Dry Bath, USA) 56 °C'de inkübe edilmiştir. Her yarım saatte bir örneklerin vortekslenmesiyle bir gece boyunca inkübasyona devam edilmiştir.
- Ertesi gün kuru ısıtıcı blok 70 ^{0}C'ye çıkarılmış, örneklerin üzerine 200 µL AL solüsyonu eklenip 70 ^{0}C de 10 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında örnekler çıkarılıp üzerine 200 µL etanol (%96-100 saflıkta) ilave edilmiş ve örnekler 15 sn vortekslenmiştir.
- Örnekler QIAamp mini kolona yerleştirilmiş ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüj (Microspin 12, Biosan, Türkiye) işlemi yapılmıştır. Örnek hacmi kolon hacminden fazla olduğundan bu işlem 2 kere gerçekleştirilmiştir. Kolondan çıkan artık/solüsyon vb. için her işlem basamağında kolon toplama tüpü değiştirilmiştir.
- Daha sonra aynı kolona 500 µL AW_1 solüsyonu ilave edilmiş ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Kolon toplama tüpü değiştirilmiştir.
- Sonrasında kolon 1.5 mL'lik temiz bir ependorf tüpüne yerleştirilmiştir. Aynı kolona 2. yıkama solüsyonu olan AW_2'den 500 µL aktarılmış ve 3 dk 14000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Son basamak, QIAamp mini kolona tutulu olan DNA'nın AE solüsyonuna geçirilme işlemidir. Bunun için QIAamp mini kolona 100 µL AE solüsyonu eklenmiş ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Son hacim 100 µL olacak şekilde steril 1.5 mL'lik (DNA-RNA Free) bir mikrosantrifüj tüpte kullanılıncaya kadar -20 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu tamamlanmış örneklerin DNA miktar ve kalitesi nanodrop spektrofotometresi (ThermoScientific™, NanoDrop2000, USA) kullanılarak belirlenmiştir. 260/280 nm'de absorbans değeri oranı 1.7 ile 2.0 değeri arasında olan DNA izolatları, SG-qPCR analizinde kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Uzun süre kullanılmayacak ve kontrol amaçlı olarak saklanması gereken DNA izolatları ise -80 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Primer Setlerinin Optimizasyonu

Domuz ve sığır türlerine ait spesifik primer setleri (domuz: ileri primer-geri primer, sığır: ileri primer-geri primer) mtDNA üzerindeki ATPase 8 ve ATPase 6 gen bölgeleri üzerinden tasarlanmıştır (Tablo 3.2.). Primerlerin SG-qPCR (Bio-Rad, CFX96, USA)'de optimizasyonu aşağıda verilen kriterler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir;

- Primerlerin uygun bağlanma sıcaklık değeri,
- Primerlerin reaksiyon hacmindeki konsantrasyonları,
- PCR reaksiyonunda kullanılacak hedef türün DNA konsantrasyonu,
- qPCR protokolündeki uzatma adımı (extension) süresi ve
- SG-qPCR döngü sayısı (Tablo 3.3.).

Domuz ve sığır türüne ait tasarlanan bu primerlerin optimizasyonu için çiğ %100 domuz ve çiğ %100 sığır etinden izole edilen DNA izolatları kullanılmıştır. Primerlerin optimizasyon basamağındaki bir adım olan DNA konsantrasyonu ve miktarı denemelerinde, izolatlardan 260/280 saflık düzeyi 1.7-2.0 arasında olanlar kullanılmıştır. Bio-Rad marka Sso Advanced SYBR Green supermiksi kullanılmış ve analiz maliyetini düşürmek için toplam SG-qPCR reaksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir.

Türlere spesifik tasarlanan primerlerin, kullandığımız yazılımlar sayesinde öngörülen Tm sıcaklıkları göz önünde bulundurularak, uygun bağlanma sıcaklığının (Tm) tespit edilmesi, primerlerin hedef ve hedef olmayan türleri (çapraz kontaminasyon) çoğaltma durumu, SG-qPCR'de gradient ve erime eğrisi (melting curve) analizi yapılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Belirlenen reaksiyon karışımları 96 kuyucuklu bir plakaya (Bio-Rad Hard Shell, USA) aktarılmış ve Tablo 3.3.'te verilen protokole göre SG-qPCR analizi yapılmıştır. Buna göre primer optimizasyonu için gradient sıcaklıkları sırasıyla; 52.5 ^{o}C, 52.2 ^{o}C, 51.5 ^{o}C, 50.3 ^{o}C, 48.9 ^{o}C, 47.7 ^{o}C, 46.9 ^{o}C ve 46.5 ^{o}C olarak

seçilmiştir. PCR reaksiyon karışımları, türlere ait primerlerin çapraz reaksiyon bilgisi ve primer dimer kontrolü için aşağıdaki gibi oluşturulmuştur:

1-Domuz DNA'sı ve Domuz Primer Seti (DPS),

2-Domuz DNA'sı ve Sığır Primer Seti (SPP),

3-Sığır DNA'sı ve SPS,

4-Sığır DNA'sı ve DPS,

5-NTC (None Template Control-Şablon DNA yok).

Tablo 3.3. Domuz ve Sığır Türlerine ait Primerlerin SG-qPCR Protokol Optimizasyon ve Mastermiks Hazırlık Aşaması

Mastermiks Hazırlığı	10 µL Final Hacim	SG-qPCR Protokol	Erime Eğrisi Analizi
PCR grade su	10 µL'ye tamamlanacak miktar	98 ºC 3 dk	95 ºC 10 sn
İleri Primer	0.25 µM	95 ºC 10 sn	60 ºC 0.05 sn
Geri Primer	0.25 µM	52.5-52.2-51.5-50.3-48.9-47.7-46.9-46.5 ºC 15 sn	95 ºC 0.5 sn
SYBR Green supermiks	5 µL	72 ºC 20 sn	
Hedef türün DNA'sı	4 µL (50 ng)	GO TO 39X	

3.2.4 Isıl İşlem Uygulaması

Her karışım oranından ısıl işlem uygulaması için ayrılan beşer adet köfte şekli verilmiş (Şekil 3.1.) örneklerden ikişer adedi daha önce steril edilmiş kavanozlara ayrı ayrı yerleştirilmiştir. Bu örneklere, 30 dk boyunca 15 psi basınçta, 121 ºC'de otoklavlama (Hiclave HG-80, Hirayama, Japan) işlemi uygulanmıştır.

Otoklavlama işlemi, et ve et ürünlerinin konserve edilmesinin bir simülasyonudur (108). Bu sıcaklık ve sürenin normal koşullara göre DNA'ya daha fazla zarar verdiği bilinmektedir (55). Bu nedenle, mtDNA üzerinden tasarlanan bu primerlerin optimize edilen protokole göre minimum tespit düzeyi hedeflenmiş ve bu nedenle otoklav süresi 15 dk daha uzatılmıştır. Böylece yöntemin hassasiyet ve duyarlılığı bu koşullar altında test edilmiştir.

3.2.5 Çiğ Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi

Çiğ et karışım örneklerinde domuz DNA'sının tespit düzeyi ve tespit miktarının SG-qPCR ile analizi yapılmadan önce, türlerin %100 çiğ etleri üzerinden protokol optimizasyonu yapılmıştır. Buna göre öncelikle %100 çiğ domuz ve %100

çiğ sığır etinden izole edilen DNA izolatları kullanılmıştır. Protokolde uygulanacak döngü sayısı, reaksiyon hacim miktarı, DNA konsantrasyonu ve primer konsantrasyonu optimize edilmiştir (Tablo 3.4.). Yöntemin optimizasyonu, çiğ et ve karışım örneklerinde 3 farklı deneme modeli oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Bu deneme modelleri; yöntemin hassasiyet, duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve PCR verimliliği parametrelerinin ölçülmesi için oluşturulmuştur. Oluşturulan deneme modelleri şöyledir;

1- **Deneysel Grup-1 (DG-1)**: %100 çiğ domuz etinden izole edilen domuz DNA'sının moleküler saflıktaki suyla, 14 grubu (Tablo 3.1.) temsil edecek şekilde % karışım oranlarına (ng/ng) ayarlanmıştır. Ayrıca çiğ %100 sığır etinden DNA izolasyonu, çapraz reaksiyon kontrollerinde kullanılmıştır.
2- **Deneysel Grup-2 (DG-2):** Çiğ %100 domuz etinden izole edilen domuz DNA'sının çiğ %100 sığır etinden izole edilen sığır DNA'sıyla 14 grubu (Tablo 3.1.) temsil edecek şekilde % karışım oranlarına (ng/ng) ayarlanmıştır.
3- **Klinik Grup (KG):** Çiğ %100 domuz eti ve çiğ %100 sığır etinin laboratuvar ortamında daha önceden belirlenen 14 farklı % karışım oranlarındaki (a/a) ikili et karışımlarıdır (Tablo 3.1).

Tablo 3.4. Çiğ Et Karışım Örneklerinde SG-qPCR Analizi Protokol

Mastermiks Hazırlığı	10 µL Final Hacim	SG-qPCR Protokol	Erime Eğrisi Analizi
PCR grade su	10 µL'ye tamamlanacak miktar	98 ºC 3 dk	95 ºC 10 sn
İleri Primer	0.25 µM	95 ºC 10 sn	60 ºC 0.05 sn
Geri Primer	0.25 µM	51.5 ^{0}C 10 sn	95 ºC 0.5 sn
SYBR Green supermiks	5 µL	72 ºC 20 sn	
Hedef türün DNA'sı	4 µL (50 ng)	GO TO 39X	

Türlere ait çiğ et ve 2'li karışımları için oluşturulan 3 deneme modeli, Tablo 3.4.'te verilen protokole göre CFX96 Maestro yazılımı kullanılarak qPCR (Bio-Rad, CFX96, USA) cihazında analiz edilmiştir. Analizler, her bir deneme grubu için 3 tekrarlı ve her tekrar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. Her karışım oranına ait DNA konsantrasyonu, NanoDrop kullanılarak 4µL'de 50 ng olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.6 Isıl İşlem Görmüş Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi

Isıl işlem görmüş karışım örneklerinde domuz DNA'sının tespit düzeyi ve tespit miktarının SG-qPCR ile analizi yapılmadan önce, ısıl işlem gören %100 türe ait etler üzerinden protokol optimizasyonu yapılmıştır. Buna göre, ısıl işlem gören %100 domuz ve %100 sığır etinden izole edilen DNA izolatları kullanılmıştır. Protokolde uygulanacak döngü sayısı, reaksiyon hacim miktarı, DNA konsantrasyonu ve primer konsantrasyonu optimize edilmiştir (Tablo 3.5). Yöntemin optimizasyonu, ısıl işlem gören et ve karışım örneklerinde 3 farklı deneme modeli oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Bu deneme modelleri; yöntemin hassasiyet, duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve PCR verimliliği parametrelerinin ölçülmesi için oluşturulmuştur. Oluşturulan deneme modelleri şöyledir;

Tablo 3.5. Isıl İşlem Uygulanan Örneklerde SG-qPCR Analizi Protokol

Mastermiks Hazırlığı	15 µL Final Hacim	SG-qPCR Protokol	Erime Eğrisi Analizi
PCR grade su	15 µL'ye tamamlanacak miktar	98 ºC 3 dk	95 ºC 10 sn
İleri Primer	0.30 µM	95 ºC 10 sn	60 ºC 0.05 sn
Geri Primer	0.30 µM	51.5 ºC 10 sn	95 ºC 0.5 sn
SYBR Green supermiks	7.5 µL	72 ºC 20 sn	
Hedef türün DNA'sı	4 µL (50 ng)	GO TO 39X	

1- **Deneysel Grup-1 (DG-1)**: Isıl işlem uygulanan %100 domuz etinden izole edilen domuz DNA'sının moleküler saflıktaki suyla, deney setinde belirlenen 14 grubu (Tablo 3.1.) temsil edecek şekilde % karışım oranlarına (ng/ng) ayarlanmıştır.
2- **Deneysel Grup-2 (DG-2):** ısıl işlem uygulanan %100 domuz etinden izole edilen domuz DNA'sının, ısıl işlem uygulanan %100 sığır etinden izole edilen sığır DNA'sıyla 14 grubu (Tablo 3.1.) temsil edecek şekilde % karışım oranlarına (ng/ng) ayarlanmıştır.
3- **Klinik Grup (KG-1):** %100 domuz eti ve %100 sığır etinin laboratuvar ortamında daha önceden belirlenen 14 farklı % karışımlarındaki (a/a) ısıl işlem gören ikili et karışımlarıdır (Tablo 3.1.).

Isıl işlem gören karışım örneklerine ait protokolde çiğ et örneklerinde kullanılan protokolden farklı olarak, primer konsantrasyonları 0.30 µM ve toplam reaksiyon hacmi 15 µL olarak optimize edilmiştir (Tablo 3.5.). 15 µL reaksiyon hacminde optimize edilen protokolde; 7.5 µL SYBR Green Mastermiksi, 300 nmol primer konsantrasyonu, 50 ng/4 µL hedef tür DNA'sı, primer bağlanma sıcaklığı ve süresi 51.5 ºC'de 10 sn ve 40 döngü olacak şekilde SG-qPCR yöntemiyle 3 deneme modelinin analizi CFX96 Maestro yazılımı kullanılarak qPCR (Bio-Rad, CFX96, USA) cihazında analiz edilmiştir. Analizler her bir deneme grubu için 3 tekrarlı ve her tekrar 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Her karışım oranına ait DNA konsantrasyonu, NanoDrop kullanılarak 4µL'de 50 ng olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

SG-qPCR analizinde hedef türlerin erime eğrisi analizine ilaveten, tüm örnek gruplarına ait PCR ürünlerinin doğrulanması, primerlerin spesifikliği ve çapraz reaksiyonlarının kontrol edilmesi için agaroz jel elektroforezi analizi yapılmıştır. Analiz edilecek qPCR örnek sayısına göre farklı boyutlarda agaroz jel tankı (Sub-Cell GT Cell, Mini-Sub Cell GT Cell, Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, USA) sistemleri ve güç kaynağı (Power Supply, Bio-Rad, USA) kullanılmıştır. Buna göre her karışım örneğine ait qPCR ürünleri jelin kuyucuklarına; 5 µL PCR ürünü ve 1.2 µL yükleme boyasından (Thermo Scientific, USA) oluşan karışımdan 4 µL yükleme yapılmıştır. DNA marker (Thermo Fisher Scientific O'Gene-Ruler 100 bp DNA Ladder, USA) 100 bp'lik olup, direkt kuyucuklara 4 µL yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi için güç kaynağı 80 Volta ayarlanmış ve 2 saat boyunca yürütme işlemi kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlanan jeller, 10 mg/mL konsantrasyonundaki Etidyum Bromür (Sigma-Aldrich, Germany) solüsyonunda 15-20 dk bekletilmiş ve jel görüntüleri, görüntüleme cihazı (Chemidoc XRS+, Bio-Rad, USA) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Agaroz jel ve kullanılan diğer solüsyonların hazırlık basamakları aşağıda verilmiştir.

%2'lik Agaroz Jel Hazırlığı;

2 gr toz agaroz (for molecular biology, Sigma-Aldrich, Germany) tek kullanımlık tartım kabında hassas terazide (Ohaus Pioneer PA224C, Switzerland) tartılmış ve 250 mL'lik ölçekli bir behere aktarılmıştır. Beherin üzerine 100 ml 1X TAE tamponu ilave edilmiştir. Mikrodalganın en düşük ayarı kullanılarak solüsyon,

kontrollü bir şekilde (30 sn'de bir) hafifçe çalkalanarak berraklaşana kadar çözündürülmüştür. Solüsyon, yaklaşık 10 dk oda koşullarında bekletildikten sonra tarakları takılmış ve dengelenmiş jel tankına kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Sıvı jel, katılaşana kadar jel döküm tankında bekletilmiş, ardından agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere yatay elektroforez tankına alınmıştır.

50X konsantrasyonda 1 L TAE (Tris-Asetat-EDTA) (pH:8.3) Tampon Hazırlığı;

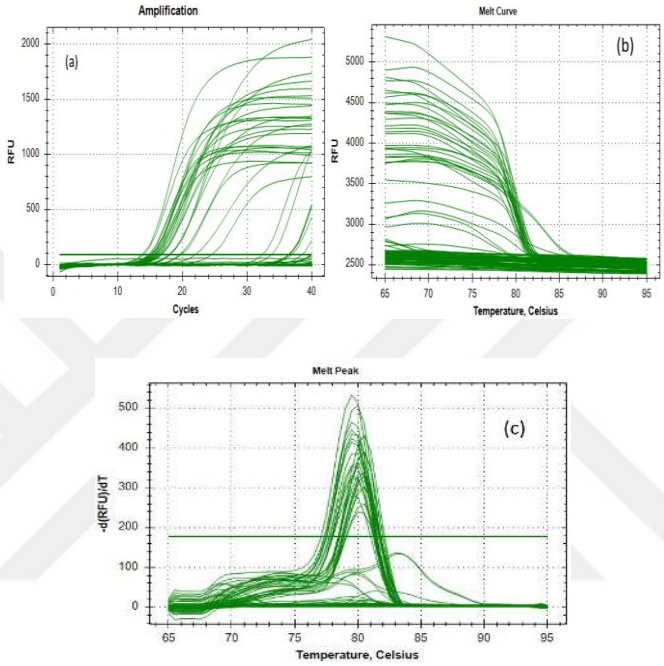
- 242 gr Tris-Base (Sigma-Aldrich, Germany)
- 57.1 mL Asetik asit (glacial) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 37.2 gr $Na_2EDTA.2H_2O$ (Sigma-Aldrich, Germany)

Yaklaşık 300 mL ultra saf suda toz kimyasallar çözündürüldükten sonra yavaş yavaş asetik asit ilave edilmiş ve tampon ultra saf suyla 1 litreye tamamlanmıştır. pH değerinin kontrolü bir pH metre (Thermo Fisher Scientific, Oriaon Star A211, USA) yardımıyla ölçülmüş ve pH:8.3'e ayarlanmıştır. 50X TAE ana stok tampon 1X konsantrasyona; agaroz jel elektroforez tankında yürütme tamponu ve agaroz jel hazırlığında kullanılmak üzere seyreltilmiştir. Tampon ve solüsyon hazırlığında kullanılan tüm kimyasallar, moleküler saflıkta (Sigma-Aldrich, Germany) olup Isolab (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

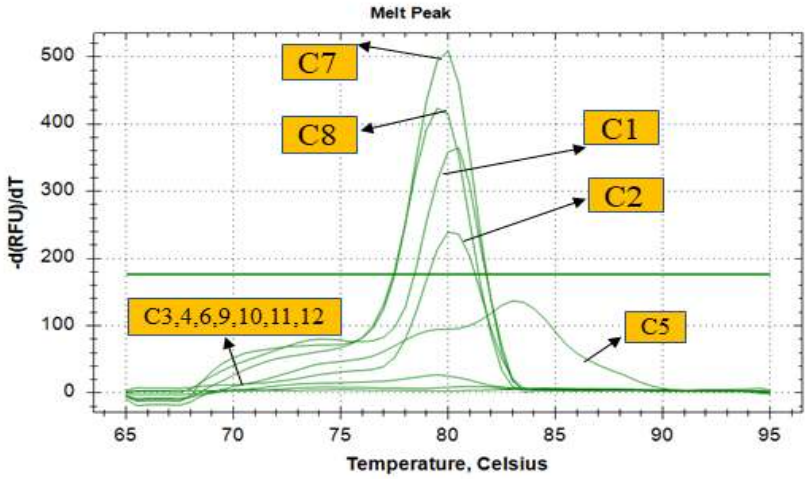
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Primer Optimizasyon Sonuçları

Domuz ve sığır türüne ait tasarlanan primerlerin optimum bağlanma (Tm) sıcaklıkları, primer dimer ve çapraz reaksiyon tespiti için Gradient PCR analizi ve primerlerin belirlenen sıcaklılardaki erime eğrisi analiz (EEA) sonuçları Şekil 4.1a-b-c, Şekil 4.2., Tablo 4.1.'de ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Domuz ve Sığır Primer Setinin Optimizasyon Aşaması - Gradient PCR Tüm Sıcaklıklar ve EEA



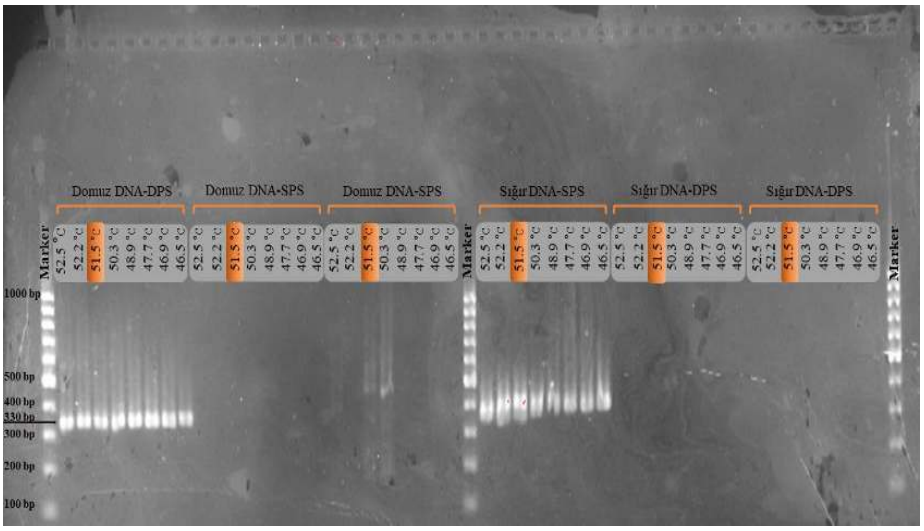
Şekil 4.2. Domuz ve Sığır Primer Setinin Optimizasyon Aşaması-Primer setlerinin 51.5 ºC'ye ait Erime Eğrisi Analizi

C1-C2: Domuz DNA'sı ve Domuz Primer Seti (DPS); C4-C5: Domuz DNA'sı ve Sığır Primer Seti (SPP); C7-C8: Sığır DNA'sı ve SPS; C10-C11: Sığır DNA'sı ve DPS; C3, C6, C9 ve C12:NTC (None Template Control-Şablon DNA yok).

Tablo 4.1. Domuz ve Sığır Primer Seti 51.5 ºC EEA Verileri

Kuyu	Örnek	Erime Sıcaklığı (ºC)	Pik Yüksekliği	Başlangıç Sıcaklık (ºC)	Son Sıcaklık (ºC)
C01	D-DPS	80.50	364.46	76.00	83.50
C02	D-DPS	80.00	239.60	67.50	87.00
C03	NTC	None	None	None	None
C04	D-SPS	None	None	None	None
C05	D-SPS	None	None	None	None
C06	NTC	None	None	None	None
C07	S-SPS	80.00	508.51	68.00	84.00
C08	S-SPS	79.50	423.68	68.50	83.50
C09	NTC	None	None	None	None
C10	S-DPS	None	None	None	None
C11	S-DPS	None	None	None	None
C12	NTC	None	None	None	None

Buna göre; türlere ait primerlerin belirlenen tüm sıcaklıklarda erime eğrileri incelenmiş ve 51.5 ºC'nin diğer sıcaklıklar arasında türlere ait ayrımda daha iyi olduğu ve çapraz reaksiyon vermediği görülmüştür (Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.). Şekil 4.2.'de eşik çizgisinin üzerinde yer alan eğrilerin hedeflenen/beklenen eğriler olduğu ve bunların C1, C2, C7 ve C8 kuyularına ait olduğu görülmektedir. C4, C5, C10 ve C11 kuyuları, türlere ait primerlerin çapraz reaksiyon kontrolleridir. Sadece C5'e ait pik görülmüş, ancak eşik çizgisinin altında kalmıştır. Bu kuyularla birlikte NTC kuyularının da eşik çizgisinin altında kalması, primer dimer ve çapraz reaksiyonun olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda bu kuyuların Tablo 4.1'de verilen erime eğrisi, pik yüksekliği başlangıç ve bitiş sıcaklıklarına sahip olmaması da primer dimer ve çapraz reaksiyonun olmadığını göstermektedir.



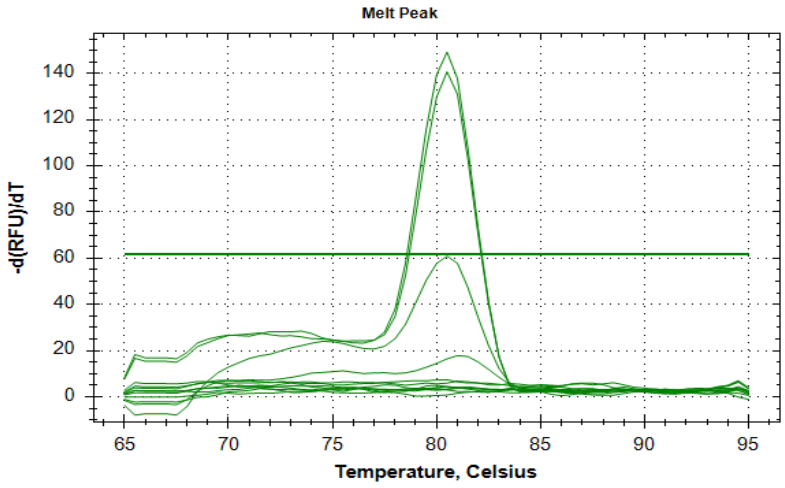
Şekil 4.3. Domuz ve Sığıra ait Primer Setlerinin AJE Görüntüsü

Şekil 4.3.'e ait agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, belirlenen tüm gradient sıcaklıklarında domuz DNA'sının domuz primer setinde ve sığır DNA'sının sığır primer setinde amplifiye olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.). Bununla birlikte; domuz DNA'sının sığır primer seti ve sığır DNA'sının domuz primer seti ile hiç bir sıcaklıkta amplifiye olmadığı görülmektedir (Şekil 4.3.). Şekil 4.2.'de eşik değeri altında kalan tüm eğri ya da sinyallerin agaroz jelde bir bant oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 4.3.).

Seçilen her gradient sıcaklığında; türlere ait primerlerin primer dimer oluşturmadığı ve çapraz reaksiyon vermediği görülmüştür (Şekil 4.3.). Bu nedenle primerlerin Tm sıcaklığı için erime eğrisi analizi eğrisinden yararlanılmış ve sıcaklıkların seçimi piklerin -d(RFU)/dT sinyal şiddetine bağlı olarak seçilmiştir. Buna bağlı olarak 51.5 ^{o}C'nin diğer sıcaklıklardan daha belirgin -d(RFU)/dT sinyal şiddetine sahip olmasından dolayı SG-qPCR analizinde primerlerin bağlanma sıcaklığı (Tm) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1c, Şekil 4.2.).

4.1.1 Primerlerin Spesifitesi

Domuz pimer setinin sığır, tavuk, at ve eşek türleriyle çapraz reaksiyon kontrolüne ait SG-qPCR analiz sonuçları Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir.



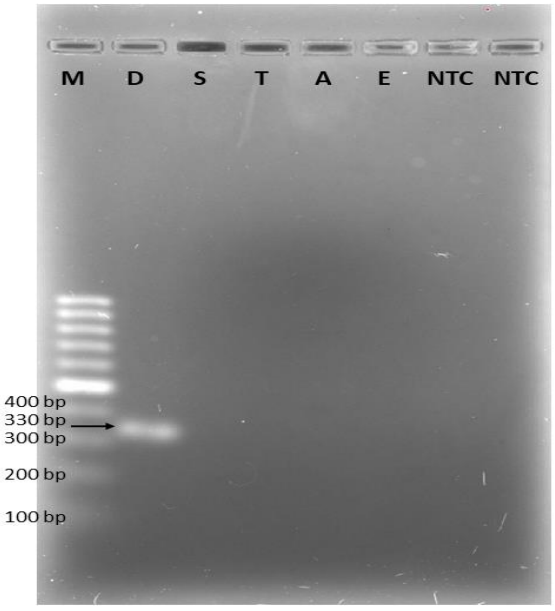
Şekil 4.4. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerine ait Çapraz Reaksiyon Kontrolü-EEA Görüntüsü

Buna göre domuz türüne ait primer setinin; sığır, tavuk, at ve eşek türleriyle reaksiyona girmediği, SG-qPCR erime eğrisi analizi verilerinde ve agaroz jel elektroforezi görüntüsünden tespit edilmiştir (Şekil 4.4., Tablo 4.2. ve Şekil 4.5.). Şekil 4.5.'te eşik çizgisinin üzerinde kalan eğrilerin sadece domuz türüne ait olduğu

görülmektedir. Sığır, tavuk, at ve eşek türlerine ait eğrilerin ise eşik çizgisinin altında kaldığı görülmektedir (Tablo 4.2). Türlerin erime eğrisi analizine ilişkin bazı bilgiler Tablo 4.2.'de verilmiştir. Bu tabloda domuz primer seti ile diğer türlerde ve NTC'lerde herhangi bir amplifikasyonun olmadığı görülmektedir (Tablo 4. 2.). Buna göre, domuz primer setinin domuz türüne spesifik olduğu ve hedeflenen 330 bp'lik bölgeyi çoğalttığı görülmektedir (Şekil 4.5.).

Tablo 4.2. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerinde Çapraz Reaksiyon Kontrolü- EEA Verileri Kontrolü- EEA Verileri

Kuyu	Örnek	Erime Sıcaklığı (°C)	Pik Yüksekliği	Başlangıç Sıcaklık (°C)	Son Sıcaklık (°C)
D03	Domuz DNA	80.50	140.75	76.50	84.00
D04	Domuz DNA	80.50	149.33	76.50	84.50
D05	Sığır DNA	None	None	None	None
D06	Sığır DNA	None	None	None	None
D07	Tavuk DNA	None	None	None	None
D08	Tavuk DNA	None	None	None	None
E03	At DNA	None	None	None	None
E04	At DNA	None	None	None	None
E05	Eşek DNA	None	None	None	None
E06	Eşek DNA	None	None	None	None
E07	NTC	None	None	None	None
D09	NTC	None	None	None	None



Şekil 4.5. Domuz Primer Setinin Sığır, Tavuk, At ve Eşek Türlerine ait Çapraz Reaksiyon Kontrolü-AJE Görüntüsü
M: marker, D: domuz, S: sığır, T: tavuk, A:at, E: eşek, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok)

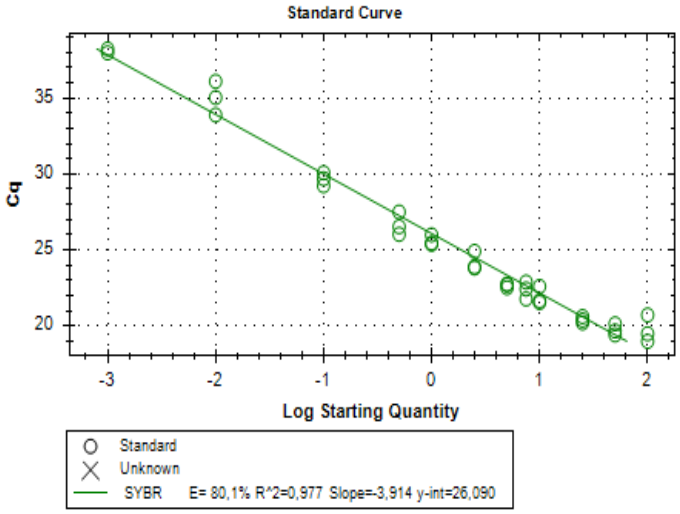
4.2 Çiğ Et Karışım Örneklerinde SG-qPCR Analizi

Çiğ et ve örneklerine ait sığır eti içerisinde domuz etinin SG-qPCR analizinde tespit düzeyinin %0.1 olduğu, buna karşılık gelen DNA tespit limitinin 0.05 ng/µL olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen tespit düzeyi ve limiti; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı, örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları ve agaroz jel elektrofrorezi görüntüsü ile belirlenmiştir.

Domuz eti miktar ve limitinin belirlenmesi için oluşturulan 3 deneme modelinin analizi, SG-qPCR'de 3 tekrarlı ve her tekrar 3 paralelli olacak şekilde Tablo 3.4.'te verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir.

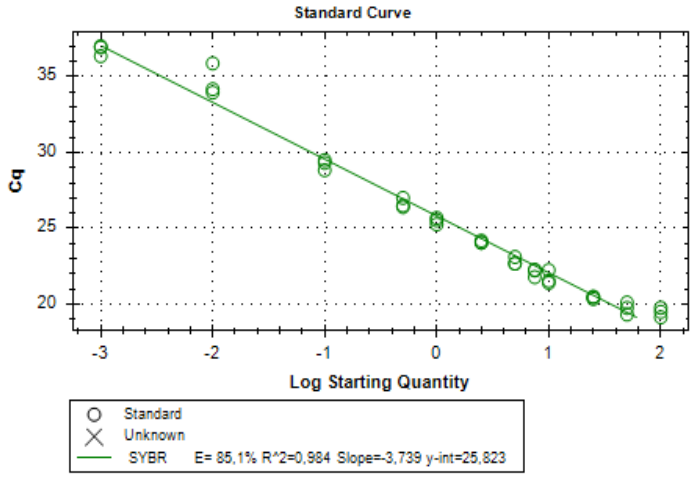
4.2.1 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1 SG-qPCR Analizi

Çiğ et karışım örnekleri için oluşturulan deneme modelinden Deneysel Grup-1'e ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 1.'de, tekrarlarına ait ortalama Cq ve SS verileri ise Tablo 4.3'te verilmiştir. Tekrarların standart eğri grafikleri (SEG) Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. Deneysel Grup-1'deki tüm örnek gruplarının tespit düzeyini ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.9.'da verilmiştir.

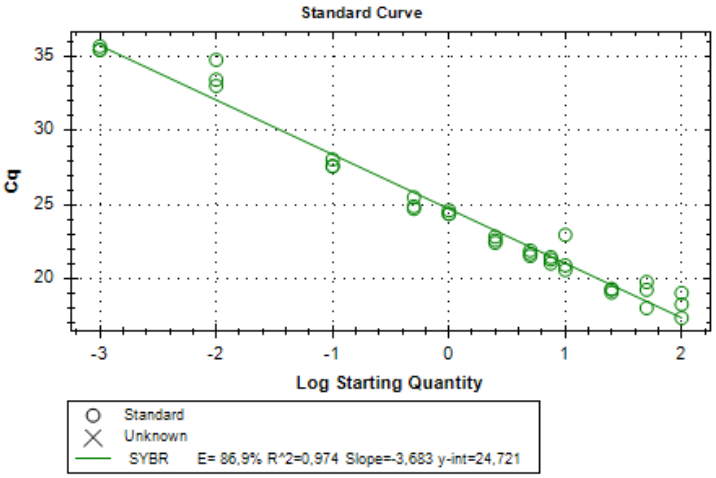


Şekil 4.6. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 1. Tekrar SEG

DG-1 1. tekrar standart eğri grafiğinde, E değerinin %80.1, r^2 değerinin 0.977 ve eğim değerinin -3.914 olduğu (Şekil 4.6.), 2. tekrar standart eğri grafiğinde E değerinin %85.1, r^2 değerinin 0.984 ve eğim değerinin -3.739 (Şekil 4.7.) ve 3. tekrara ait standart eğri grafiğinde E değerinin %86.9, r^2 değerinin 0.974 ve eğim değerinin -3.683 olduğu görülmektedir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 2. Tekrar SEG



Şekil 4.8. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 3. Tekrar SEG

Tüm tekrarlara ait standart eğri grafiğinde bazı değerlerin ‘’outlier’’ olduğu görülmektedir. Özellikle x ekseni üzerinde yer alan -2 ve 2 logaritmik değerlerine karşılık gelen örnek gruplarına ait olduğu görülmektedir. Bunlar %100 D ve %0.01 D örnek gruplarıdır (Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8.). Bu durumun %100 D örnek grubuna ait DNA miktarının reaksiyon koşulları için fazla olabileceğini, %0.01 D örnek grubuna ait verinin ise tespit düzeyinin (%0.1 D) dışında kalmasından dolayı önemsiz olduğunu göstermektedir. Ancak bu değerlerin ve tespit düzeyinden sonraki diğer örnek gruplarının (%0.001 ve %0.0001) standart eğride yer alması özellikle r^2 değerini düşürmektedir. Buna bağlı olarak; E ve eğim değerlerini negatif yönde etkilediği görülmektedir (Ek 2., Ek 3. ve Ek 4.).

Tablo 4.3. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 Tüm Tekrar ve SS Değeri

Deneysel Grup-1 Tüm Tekrarlar					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	19.84	19.12	18.25	19.07	0.65
50 D	19.85	19.37	19.05	19.42	0.33
25 D	20.51	20.13	19.22	19.95	0.54
10 D	22.04	21.39	21.53	21.65	0.28
7,5 D	22.48	21.76	21.29	21.84	0.49
5 D	22.77	22.45	21.75	22.32	0.43
2,5 D	24.32	23.73	22.66	23.57	0.69
1 D	25.70	25.18	24.50	25.13	0.49
0,5 D	26.79	26.28	25.08	26.05	0.72
0,1 D	29.76	28.90	27.80	28.82	0.80
0,01 D	35.09	34.26	33.81	34.39	0.53
0,001 D	38.18	36.34	35.60	36.71	1.08
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	15.60	15.67	13.80	15.02	0.87
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

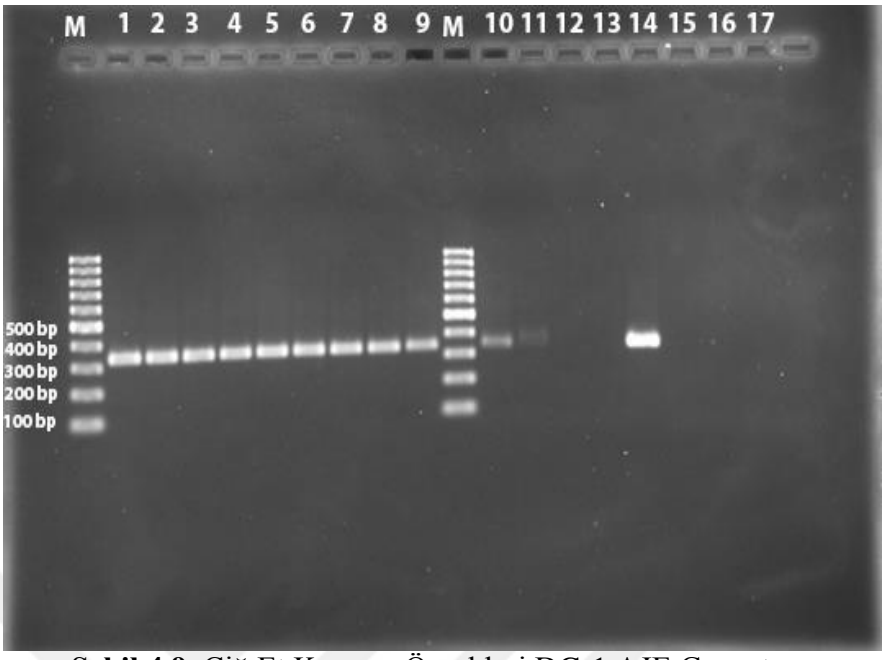
T: Tekrar, Ort.: Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

Deneysel Grup-1'e ait tüm paralellerin ortalamaları alınmış ve Tablo 4.3.'te yeniden değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tekrarlar arasında da tutarlı olduğu, 1/10 kat seyreltilmiş dilüsyonları arasında yaklaşık 3.3 Cq'luk bir fark olduğu görülmektedir.

Çiğ et karışım örneklerinde tespit limiti olarak belirlenen %0.1 D karışım oranına ait örnek grubunun ve tespit limitine kadar olan diğer karışım oranlarının SS'lerinin 0.5'ten büyük çıktığı görülmektedir. Bu durumun pipetleme hatasından ziyade farklı zamanlarda ve koşullarda tekrarlanan örnekler arasında kabul edilebilir bir değere sahip olduğu göstermektedir. Nitekim Lee Lee ve arkadaşları (2020) tarafından SYBR Green qPCR yöntemiyle çiğ ve ısıl işlem gören örneklerde, domuz eti tespitinin hedeflendiği çalışmaya ait tekrarlar arasında hesaplanan SS değerlerinin >1 olduğu görülmektedir. Hatta çiğ örnek karışımlarında en yüksek SS değerinin 3.0081 olduğu görülmektedir (202).

Çiğ et ve örneklerine ait SG-qPCR analiziyle sığır eti içerisinde domuz etinin tespiti amacıyla oluşturulan 1. deneme modelinden Deneysel Grup-1 örneklerinin tespit düzeyinin %0.1 olduğu görülmüştür. Belirlenen tespit düzeyi;

örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı, örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları ve agaroz jel elektrofrorezi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1 AJE Görüntüsü
Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: %100D, 2: %50D, 3: %25, 4: %10D, 5: %7.5D, 6:%5D, 7:%2.5D, 8:%1D, 9:%0.5D, Marker, 10:%0.1D, 11:%0.01D, 12:%0.001D, 13:%0.0001D, 14:%100S, 15:Ç.K.1, 16:Ç.K.2, 17:NTC.

Genel olarak qPCR analizlerinde ilk okunan Cq ile son okunan Cq arasında yaklaşık 10 Cq kadar bir fark, PCR verimliliği açısından önemlidir (133). Tespit düzeyine ait Cq değerinin ortalama 29, ilk örnek grubuna ait Cq değerlerinin ise ortalama 19 olduğu görülmektedir (Tablo 4.3.). Ayrıca tüm örnek gruplarınınn erime eğrisi grafiklerine bakıldığında, %0.1 D karışım oranından sonraki diğer karışım oranlarına ait erime eğrilerinin sinyalleri, eşik çizgisinin altında kalmıştır (Ek 2., Ek 3. ve Ek 4.).

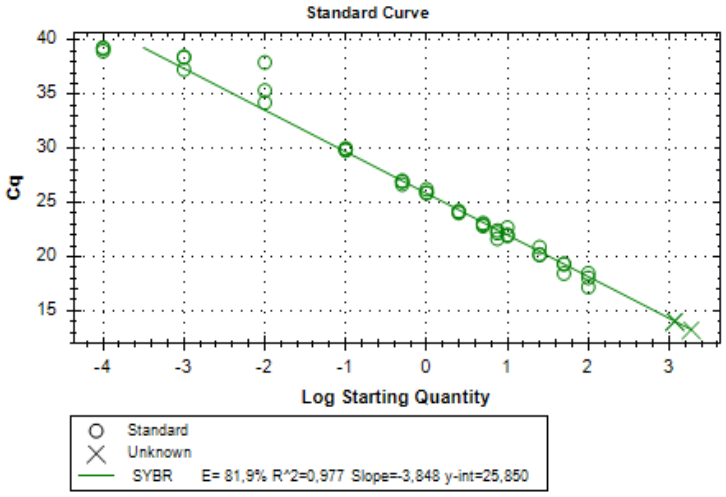
Şekil 4.9.'da, 1 numaradan başlayıp 10 numaraya doğru ilerleyen karışım oranlarında, domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant yoğunluğunda da bir azalmanın olduğu görülmektedir. Jel üzerindeki 14 nolu kuyu, çiğ %100 sığır DNA'sına ait pozitif kontrol örneği olup, amplikon uzunluğu 332 bp'dir. Marker dışındaki diğer jel üzerinde görünen tüm bantlar ise domuz türüne spesifik 330 bp'lik amplifikasyon bantlarını göstermektedir. 15 ve 16 nolu kuyularda bant görülmemesi beklenen bir durum olmakla birlikte, primerlerin türe spesifik olduğunu ve çapraz reaksiyon olmadığını göstermektedir. Ayrıca 17 nolu kuyuda NTC'e ait bant görülmemesi, deney setinde bir kontaminasyonun

olmadığını ifade etmektedir. Böylece negatif kontrol örneklerine ait bantlar görülmemiştir (Şekil 4.9).

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde; DG-1 deneme modeli için çiğ sığır eti karışımı içinde domuz DNA'sı tespit düzeyinin %0.1 (a/a)'lik karışım oranına ait olduğu görülmektedir (Tablo 4.3. ve Şekil. 4.9.).

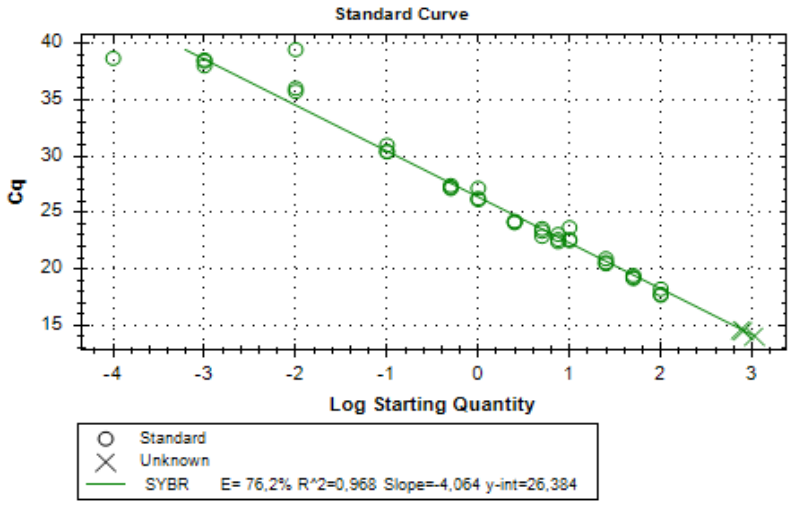
4.2.2 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2 SG-qPCR Analizi

Çiğ et karışım örnekleri için oluşturulan deneme modelinden Deneysel Grup-2'ye ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 5.'te, tekraralarına ait Cq ve SS verileri ise Tablo 4.4'te verilmiştir. Tekrarlara ait çizilen standart eğri grafikleri Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de verilmiştir. Deneysel Grup-2'deki tüm örnek gruplarının tespit düzeyini ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.13.'te verilmiştir.

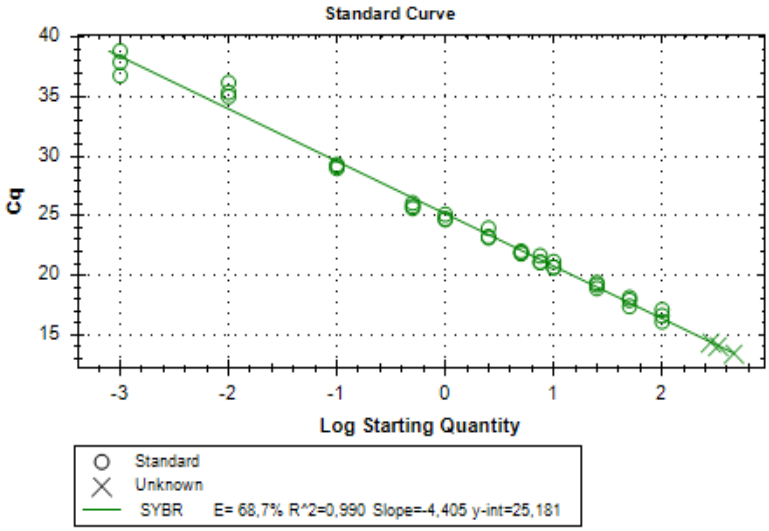


Şekil 4.10. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 1. Tekrar SEG

DG-2 1. tekrar standart eğri grafiğinde, E değerinin %81.9, r^2 değerinin 0.977 ve eğim değerinin -3.848 olduğu (Şekil 4.10.), 2. tekrar standart eğri grafiğinde E değerinin %76.2, r^2 değerinin 0.968 ve eğim değerinin -4.064 (Şekil 4.11.) ve 3. tekrara ait standart eğri grafiğinde E değerinin %68.7, r^2 değerinin 0.990 ve eğim değerinin -4.405 olduğu görülmektedir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 2. Tekrar SEG



Şekil 4.12. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 3. Tekrar SEG

Tüm tekrarlara ait standart eğri grafiğinde bazı değerlerin ‘‘outlier’’ olduğu görülmektedir. Özellikle bu değerler çiğ et karışımları tespit düzeyinden (%0.1 D) sonraki karışım örneklerine ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.). Tespit düzeyinden sonraki diğer örnek gruplarının standart eğride yer alması özellikle r^2 değerini düşürmektedir. Buna bağlı olarak; E ve eğim değerlerini negatif yönde etkilediği görülmektedir (Ek 6., Ek 7. ve Ek 8.).

Deneysel Grup-2'ye ait tüm paralellerin ortalamaları alınmış ve 3 tekrar olarak Tablo 4.4.'te değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tekrarlar arasında tutarlı olduğu, 1/10 kat seyreltilmiş dilüsyonları arasında yaklaşık 3.3 Cq'luk bir fark olduğu görülmektedir (Tablo 4.4.).

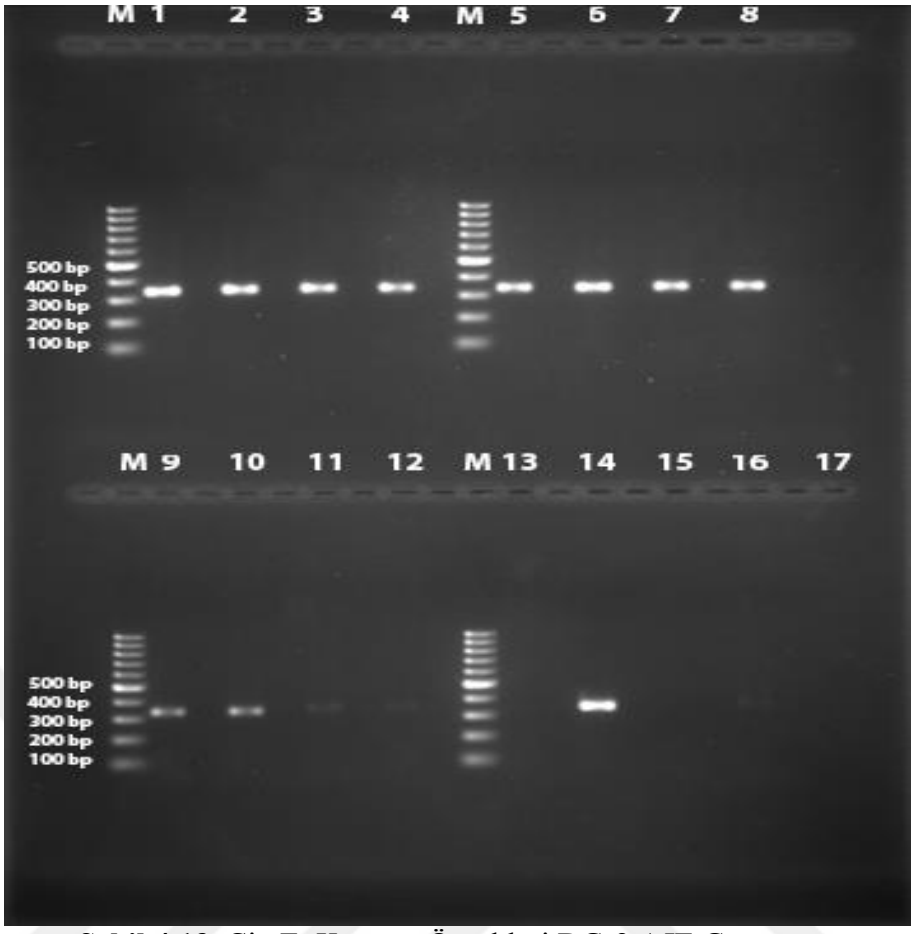
Çiğ et karışım örneklerinde tespit limiti olarak belirlenen %0.1 D karışım oranına ait örnek grubunun ve tespit limitine kadar olan diğer karışım oranlarının SS'lerinin 0.5'ten büyük çıktığı görülmektedir. Bu durumun pipetleme hatasından ziyade farklı zamanlarda ve koşullarda tekrarlanan örnekler arasında kabul edilebilir bir değere sahip olduğu göstermektedir (202).

Tablo 4.4. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 Tüm Tekrar ve SS ortalaması

Deneysel Grup-2 Tüm Tekrar Ort. ve SS Değeri					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	17.81	17.93	16.49	17.41	0.65
50 D	18.94	19.31	17.67	18.64	0.70
25 D	20.33	20.69	19.01	20.01	0.72
10 D	22.12	22.96	20.68	21.92	0.94
7,5 D	22.00	22.73	21.16	21.96	0.64
5 D	22.85	23.31	21.74	22.63	0.66
2,5 D	24.05	24.20	23.32	23.86	0.38
1 D	25.90	26.54	24.71	25.72	0.76
0,5 D	26.43	27.28	25.68	26.46	0.65
0,1 D	29.79	30.62	29.00	29.80	0.66
0,01 D	35.73	37.09	35.36	36.06	0.74
0,001 D	37.97	38.33	37.65	37.98	0.28
0,0001 D	39.09	38.69	N/A	25.93	18.33
100 S	13.69	14.46	13.81	13.99	0.34
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

T:Tekrar, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A:Çoğalma yok

Çiğ et ve örneklerine ait Deneysel Grup-2 örneklerinin tespit düzeyinin %0.1 olduğu görülmüştür. Belirlenen tespit düzeyi; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı, örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-2 AJE Görüntüsü
Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1:%100D, 2:%50D, 3:%25, 4:%10D, M:Marker, 5:%7.5D, 6:%5D, 7:%2.5D, 8:%1D, M:Marker, 9:%0.5D, 10:%0.1D, 11:%0.01D, 12:%0.001D, 13:%0.0001D, 14:%100S, 15:Ç.K.1, 16:Ç.K.2, 17:NTC.

Tespit düzeyine ait Cq değerinin ortalama 29.80, ilk örnek grubuna ait Cq değerlerinin ise ortalama 17.41 olduğu görülmektedir (Tablo 4.4.). Ayrıca %0.1 D karışım oranından sonraki diğer karışım oranlarına ait Cq değerleri olmasına rağmen, erime eğrilerinin sinyalleri eşik çizgisinin altında kalmıştır (Ek 4., Ek 5. ve Ek 6.).

Şekil 4.13.'te 1 numaradan başlayıp 11 numaraya doğru ilerleyen karışım oranlarında, domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant yoğunluğunda azalmanın olduğu görülmektedir. Jel üzerindeki 14 nolu kuyu, çiğ %100 sığır DNA'sına ait pozitif kontrol örneği olup, amplikon uzunluğu 332 bp'dir. Marker dışındaki diğer jel üzerinde görünen tüm bantlar ise domuz türüne spesifik 330 bp'lik amplifikasyon bantlarını göstermektedir. 15 ve 16 nolu kuyularda bant görülmemesi, beklenen bir durum olmakla birlikte primerlerin türe spesifik olduğunu ve çapraz reaksiyon olmadığını göstermektedir. Ayrıca 17 nolu kuyuya

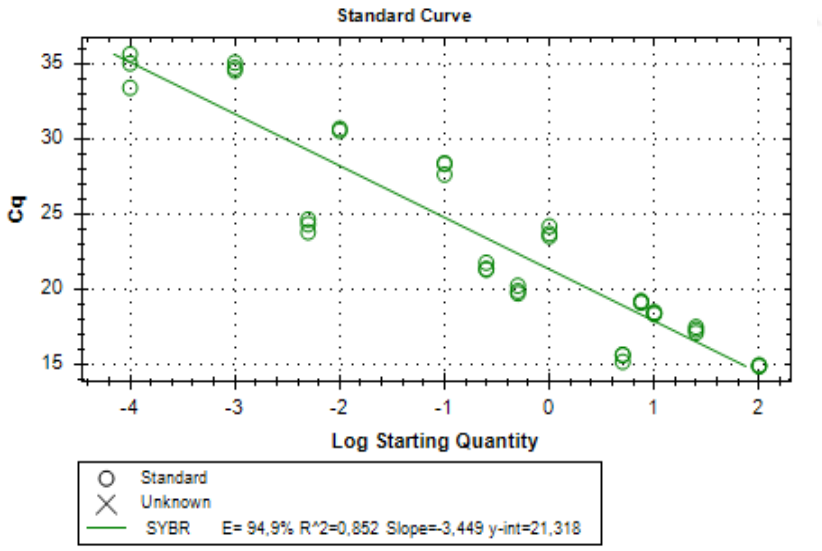
ait NTC'e ait bant görülmemesi, deney setinde bir kontaminasyonun olmadığını ifade etmektedir. Böylece negatif kontrol örneklerine ait bantlar görülmemiştir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde; DG-2 deneme modeli için sığır eti karışımı içinde domuz DNA'sı tespit düzeyinin %0.1 (a/a)'lik karışım oranına ait olduğu görülmektedir (Tablo 4.4. ve Şekil 4.13.).

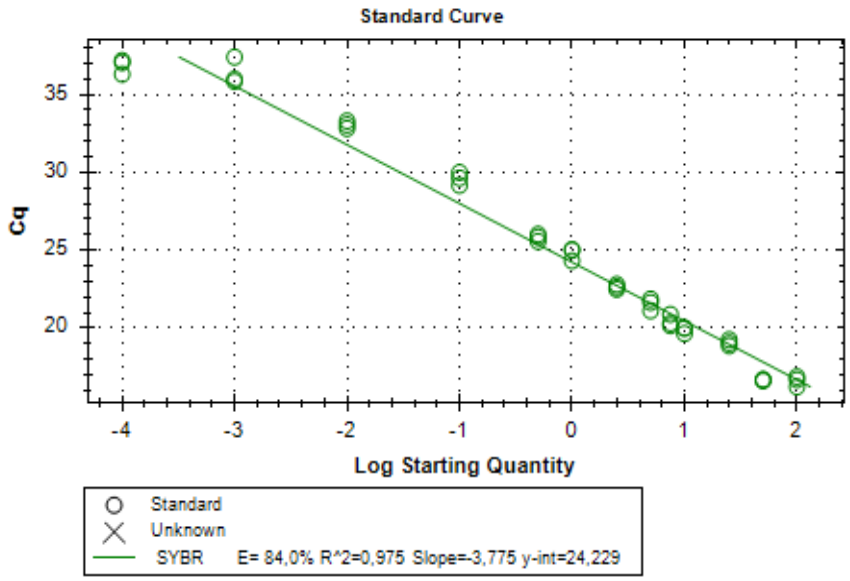
4.2.3 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Grup SG-qPCR Analizi

Çiğ et karışım örnekleri için oluşturulan deneme modelinden Klinik Gruba ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 9.'da, tekrarlarına ait ortalama Cq ve SS verileri ise Tablo 4.5'te verilmiştir. Tekrarların standart eğri grafikleri (SEG) Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'de verilmiştir. Klinik Gruptaki tüm örnek gruplarının tespit düzeyini ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.17.'de verilmiştir.

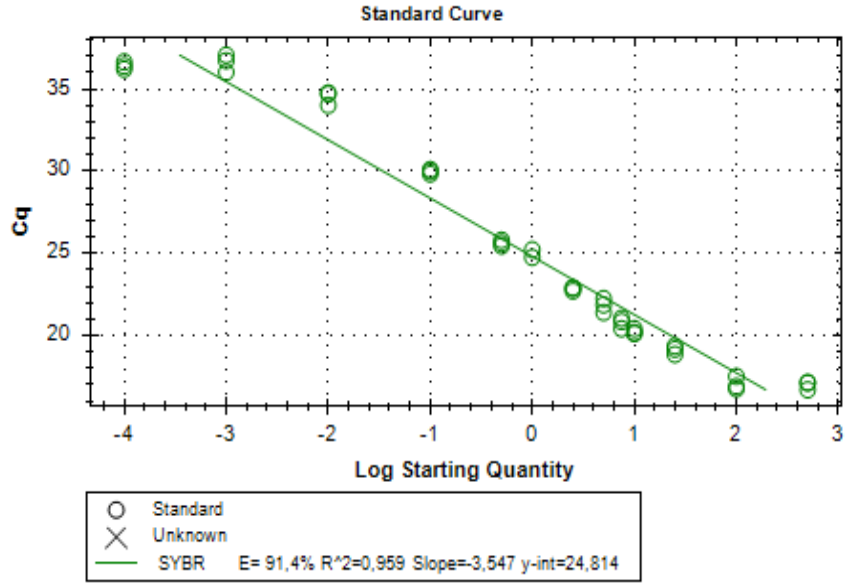
Buna göre bu veriler birlikte değerlendirildiğinde; çizilen her tekrara ait standart eğri grafiğinde tespit düzeyinden sonraki karışım oranlarına ait verilerin outlier olduğu görülmektedir (Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.). Bu durum, PCR verimliliği açısından r^2 değerini ve buna bağlı olarak E ve eğim değerlerini de olumsuz etkilemektedir.



Şekil 4.14. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 1. Tekrar SEG



Şekil 4.15. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 2. Tekrar SEG



Şekil 4.16. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG 3. Tekrar SEG

KG'ye ait tüm paralellerin ortalamaları alınmış ve Tablo 4.5.'te yeniden değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tekrarlar arasında tutarlı olduğu, 1/10 kat seyreltilmiş dilüsyonları arasında yaklaşık 3.3 Cq'luk bir fark olduğu görülmektedir (Tablo 4.5.).

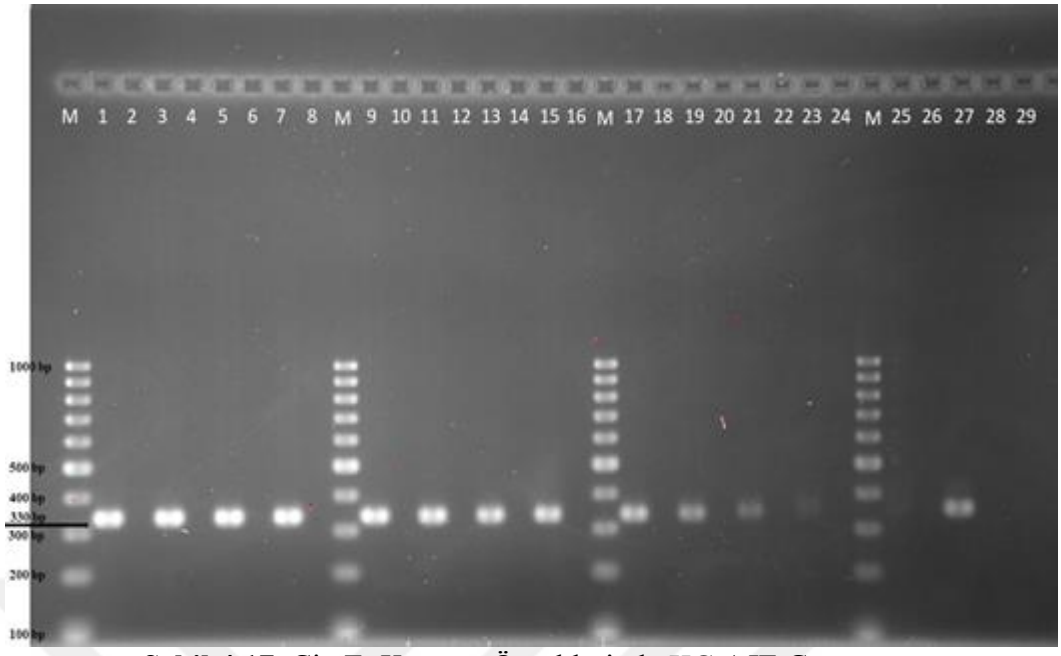
Tablo 4.5. Çiğ Et Karışım Örnekleri KG Tüm Tekrar ve SS Değeri

Klinik Grup Tüm Tekrar Ort. ve SS Değeri					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	14.70	16.46	17.10	16.09	1.01
50 D	15.30	16.53	17.03	16.29	0.73
25 D	17.12	18.93	19.17	18.41	0.92
10 D	18.26	19.74	20.28	19.43	0.85
7,5 D	19.04	20.34	20.82	20.07	0.75
5 D	19.77	21.42	21.89	21.03	0.91
2,5 D	21.34	22.53	22.89	22.25	0.66
1 D	23.68	24.66	25.04	24.46	0.57
0,5 D	24.12	25.68	25.69	25.16	0.74
0,1 D	27.98	29.49	30.03	29.17	0.87
0,01 D	30.45	32.94	34.55	32.65	1.69
0,001 D	34.65	36.30	36.65	35.87	0.87
0,0001 D	34.56	36.73	36.48	35.92	0.97
100 S	15.89	15.51	17.10	15.36	0.50
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

T:Tekrar, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A:Çoğalma yok

Çiğ et karışım örneklerinde tespit limiti olarak belirlenen %0.1 D karışım oranına ait örnek grubunun ve tespit limitine kadar olan diğer karışım oranlarının SS'lerinin 0.5'ten büyük çıktığı görülmektedir. Bu durumun pipetleme hatasından ziyade farklı zamanlarda ve koşullarda tekrarlanmasından kaynaklandığını ve çıkan SS değerlerinin literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında anlamlı olduğu görülmüştür (202,251).

Tespit düzeyine ait Cq değerinin ortalama 29, ilk örnek grubuna ait Cq değerlerinin ise ortalama 16.09 olduğu görülmektedir (Tablo 4.5.). Ayrıca tüm örnek gruplarınınn erime eğrisi grafiklerine bakıldığında, %0.1 D karışım oranından sonraki diğer karışım oranlarına ait erime eğrilerinin sinyalleri, eşik çizgisinin altında kalmıştır (Ek 10., Ek 11. ve Ek 12.).



Şekil 4.17. Çiğ Et Karışım Örneklerinde KG AJE Görüntüsü
Bantlar sırasıyla: M:Marker, 1:%100D, 3:%50D, 5:%25, 7:%10D, M:Marker, 9:%7.5D, 11:%5D, 13:%2.5D, 15:%1D, M:Marker, 17:%0.5D, 19:%0.1D, 21:%0.01D, 23:%0.001D, 25:%0.0001D, 27:%100S, 28:Ç.K.1, 29:Ç.K.2, Tüm Çift Rakamlar:NTC.

KG'ye ait SG-qPCR analizi yapılmış tüm örnek gruplarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmış ve hedeflenen tüm bantlar görüntülenmiştir (Şekil 4.17.). Şekil 4.17.'de jel üzerindeki tüm çift rakamlarda NTC örnekleri verilmiştir. NTC örneklerine ait ve çapraz reaksiyon örneklerine ait (28. ve 29. kuyu) herhangi bir amplifikasyonun olmadığı, dolayısıyla deney setinde kontaminasyon, primer dimer ve çapraz reaksiyon olmadığını ifade etmektedir. 1 numaradan başlayıp 19 numaraya doğru ilerleyen tüm tek sayılı kuyulardaki karışım oranlarında, domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant yoğunluğunda bir azalmanın olduğu görülmektedir (Şekil 4.17.). 19 nolu kuyu sığır etinde %0.1 domuz DNA'sı içeren karışım oranına aittir.

Çiğ et grubu örneklerine uygulanan 3 farklı deneme modelinde, tüm örnek gruplarına ait veriler birlikte değerlendirildiğinde; çiğ sığır eti karışımındaki domuz eti tespit düzeyinin SG-qPCR analizi ve analiz sonrasında uygulanan AJE görüntülerinde %0.1 (a/a) olduğu görülmektedir. Tespit edilen yüzde karışım değerinde, domuz DNA tespit limitinin 0.05 ng/µL olduğu görülmektedir.

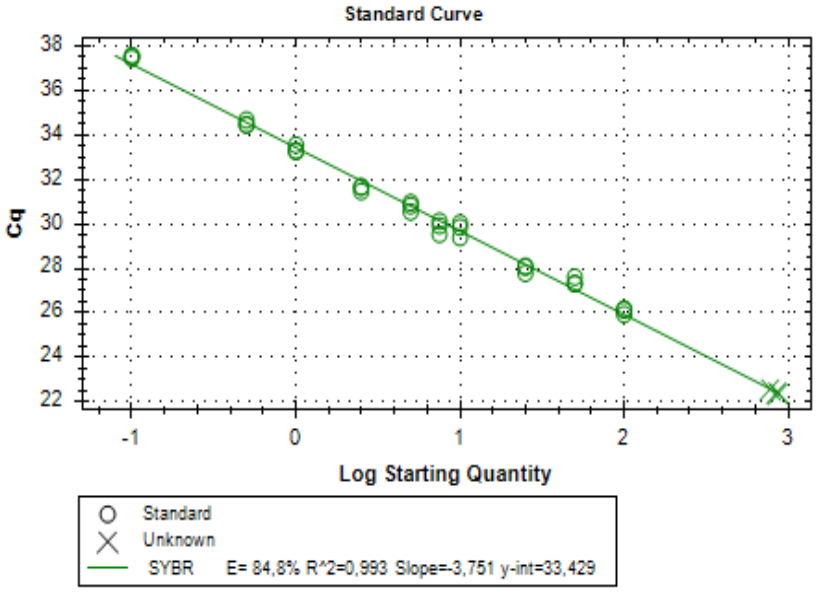
4.3 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi

Isıl işlem uygulanan et karışım örneklerine ait sığır eti içerisinde domuz etinin SG-qPCR analizinde tespit düzeyinin %0.5 olduğu, buna karşılık gelen DNA tespit limitinin 0.25 ng/µL olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen tespit düzeyi ve limiti; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı, örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları ve agaroz jel elektrofrorezi görüntüsü ile belirlenmiştir .

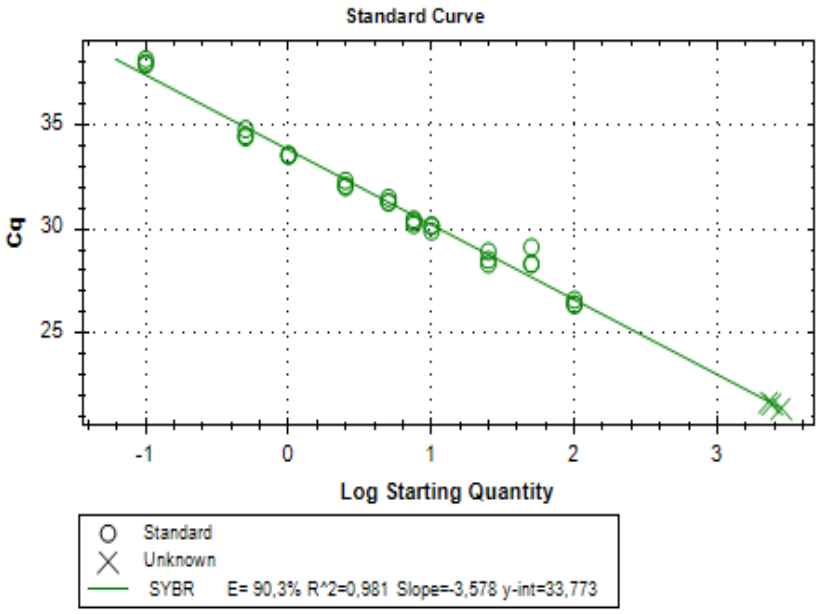
Domuz eti miktar ve limitinin belirlenmesi için oluşturulan 3 deneme modelinin analizi, SG-qPCR'de 3 tekrarlı ve her tekrar 3 paralelli olacak şekilde Tablo 3.5.'te verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1 SG-qPCR Analizi

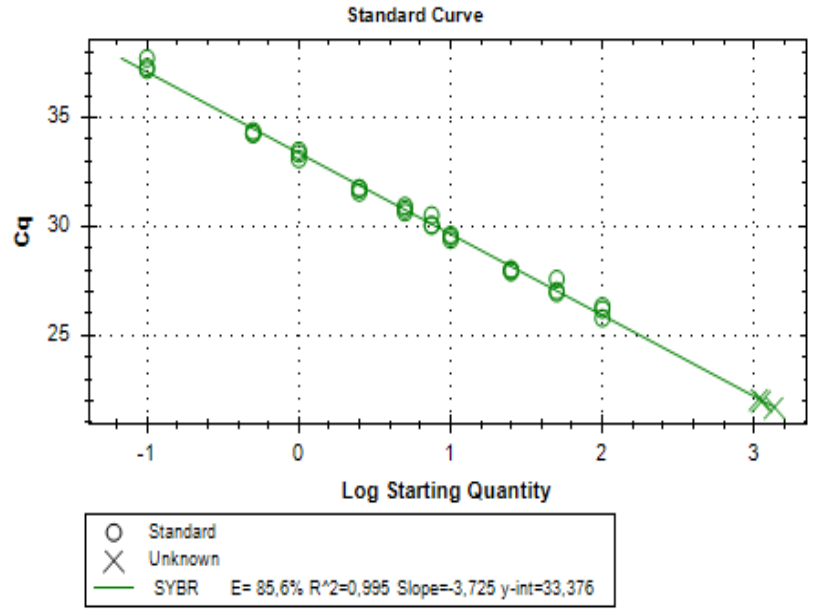
Isıl işlem uygulanan et ve örnekleri için oluşturulan Deneysel Grup-1'e ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 13.'te, tekrarlarına ait ortalama Cq ve SS verileri ise Tablo 4.6'da verilmiştir. Tekrarların standart eğri grafikleri Şekil 4.18., Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.'de verilmiştir. Deneysel Grup-1'deki tüm örnek gruplarının tespit düzeyini ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 1. Tekrar SEG



Şekil 4.19. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 2. Tekrar SEG



Şekil 4.20. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, 3. Tekrar SEG

DG-1 1. tekrar standart eğri grafiğinde, E değerinin %84.8, r^2 değerinin 0.993 ve eğim değerinin -3.751 (Şekil 4.18.), 2. tekrar standart eğri grafiğinde E değerinin %90.3, r^2 değerinin 0.981 ve eğim değerinin -3.578 (Şekil 4.19.) ve 3. tekrara ait standart eğri grafiğinde E değerinin %85.6, r^2 değerinin 0.995 ve eğim değerinin -3.725 olduğu görülmektedir (Şekil 4.20.).

Tüm tekrarlara ait standart eğri grafiğinde tespit limitinden sonraki değerlerin ‘’outlier’’ olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak; r^2, E ve eğim değerlerinin negatif yönde etkilendiği görülmektedir (Ek 14., Ek 15 ve Ek 16).

Belirlenen tespit düzeyi; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı (Ek 13. ve Tablo 4.6.), örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları (Ek 14., Ek 15 ve Ek 16) ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.21.).

Buna göre bu veriler birlikte değerlendirildiğinde; çizilen her tekrara ait standart eğri grafiğinde tespit düzeyinden sonraki karışım oranlarına ait verilerin eşik değeri çizgisinin altında kaldığı görülmüştür (Ek 14., Ek 15 ve Ek 16).

DG-1’e ait tüm paralellerin ortalamaları Tablo 4.6.’da değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tekrarlar arasında tutarlı olduğu, 1/10 kat seyreltilmiş dilüsyonları arasında yaklaşık 3.3 Cq’luk bir fark olduğu görülmektedir (Tablo 4.6.).

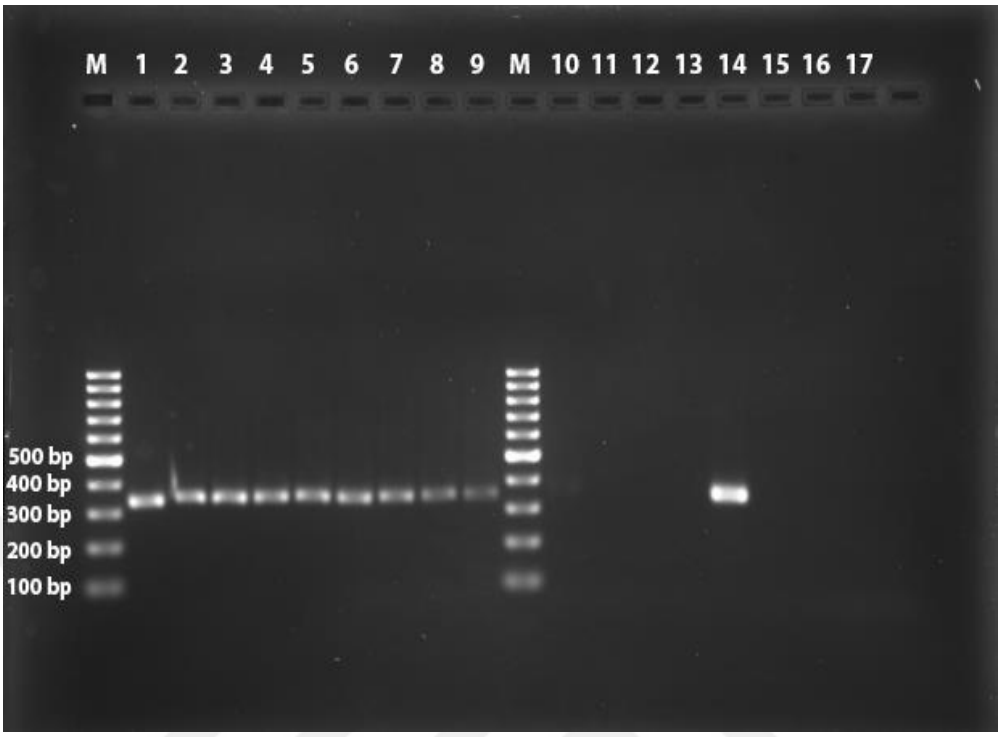
Tablo 4.6. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1, Tüm Tekrar ve SS Değeri

Deneysel Grup-1 Tüm Tekrar Ort. ve SS Değeri					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	26.07	26.57	26.13	26.26	0.22
50 D	27.39	28.70	27.22	27.77	0.66
25 D	27.95	28.69	28.00	28.21	0.34
10 D	29.73	30.17	29.54	29.81	0.26
7,5 D	29.84	30.43	30.23	30.17	0.24
5 D	30.74	31.45	30.82	31.00	0.32
2,5 D	31.56	32.22	31.71	31.83	0.28
1 D	33.34	33.63	33.33	33.43	0.14
0,5 D	34.50	34.64	34.32	34.49	0.13
0,1 D	37.48	38.07	37.44	37.66	0.29
0,01 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	22.44	21.72	21.95	22.04	0.30
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

T:Tekrar, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A:Çoğalma yok

Tablo 4.6.’da görüleceği üzere örneklere ait ilk okunan Cq değerinin 26.26 olduğu görülmektedir. %50 D örneği dışında diğer tüm örnek gruplarına ait

tekrarların SS değerleri 0.5'ten küçük çıkmıştır. %50 D örneğine ait SS değerinin pipetleme hatasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.18.).

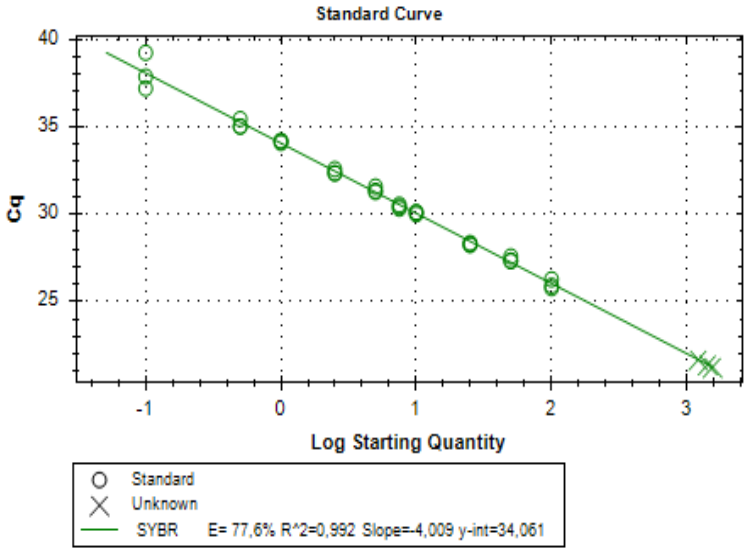


Şekil 4.21. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-1 AJE Görüntüsü Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: %100 D, 2: %50 D, 3: %25vD, 4: %10 D, 5:%7.5 D, 6: %5 D, 7: %2.5 D, 8: %1 D, 9: %0.5 D, 10: %0.1 D, 11: %0.01 D, 12: %0.001 D, 13: %0.0001D, 14: %100 S, 15: Ç.K.1, 16: ÇK..2, 17: NTC

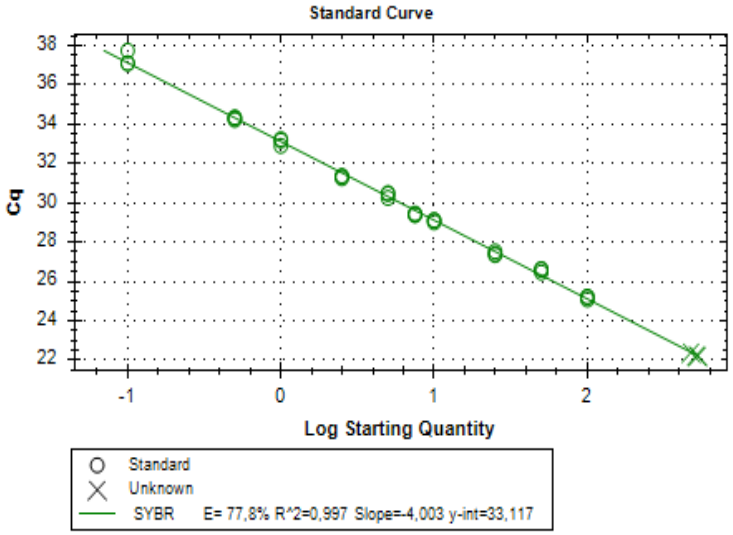
Şekil 4.21.'de domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant yoğunluğunda azalmanın olduğu görülmektedir. 14 numaralı kuyu ısıl işlem uygulanan %100 sığır DNA'sına ait bant olup 332 bp'e karşılık gelmektedir. Marker dışındaki diğer jel üzerinde görünen tüm bantlar ise domuz türüne spesifik 330 bp'lik bantları göstermektedir. 15. ve 16. numaralı kuyularda bant görülmemesi beklenen bir durum olmakla birlikte primerlerin türe spesifik olduğunu ve çapraz reaksiyon olmadığını göstermektedir. Ayrıca 17 numaralı kuyuda NTC'e ait bant görülmemesi, deney setinde bir kontaminasyonun olmadığını ifade etmektedir. Bu durumda tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde; bu deney seti için domuz DNA'sı tespit düzeyinin %0.5 (a/a)'lik karışım oranına ait olduğu görülmektedir (Tablo 4.6. ve Şekil. 4.21.).

4.3.2 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2 SG-qPCR Analizi

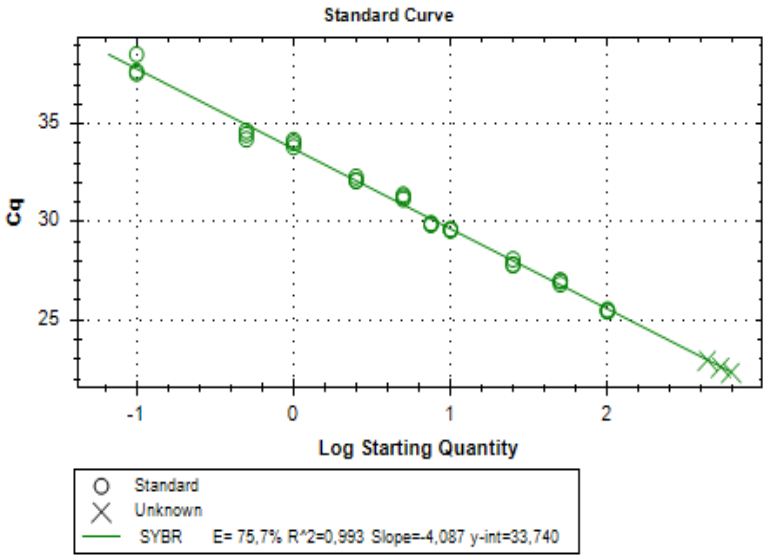
Isıl işlem uygulanan et karışım örnekleri için oluşturulan Deneysel Grup-2'ye ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 17.'de, tekrarlarına ait ortalama Cq ve SS verileri ise Tablo 4.7'de verilmiştir. Tekrarların standart eğri grafikleri Şekil 4.22., Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'te verilmiştir. Tüm örnek gruplarının tespit düzeyi ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.25.'te verilmiştir.



Şekil 4.22. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 1. Tekrar SEG



Şekil 4.23. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 2. Tekrar SEG



Şekil 4.24. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, 3. Tekrar SEG

DG-2 1. tekrar standart eğri grafiğinde, E değerinin %77.6, r^2 değerinin 0.992 ve eğim değerinin -4.009 (Şekil 4.22.), 2. tekrar standart eğri grafiğinde E değerinin %77.8, r^2 değerinin 0.997 ve eğim değerinin -4.003 (Şekil 4.23.) ve 3. tekrara ait standart eğri grafiğinde E değerinin %75.7, r^2 değerinin 0.993 ve eğim değerinin -4.087 olduğu görülmektedir (Şekil 4.24.).

Tüm tekrarlara ait standart eğri grafiğinde r^2 değerinin > 0.99 olmasına rağmen E ve eğim değerinin istenilen aralıkta olamaması, her döngü sonunda beklenen amplifikasyonun iki katına çıkamamasından kaynaklanabileceği, buna bağlı olarak PCR reaksiyon hacminin arttırılması gerektiği düşünülmektedir.

Belirlenen tespit düzeyi; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı (Ek 17. ve Tablo 4.7.), örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları (Ek 18., Ek 19 ve Ek 20) ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.25.). Buna göre bu veriler birlikte değerlendirildiğinde; çizilen her tekrara ait standart eğri grafiğinde tespit düzeyinden sonraki karışım oranlarına ait verilerin eşik değeri çizgisinin altında kaldığı görülmüştür (Ek 18., Ek 19 ve Ek 20).

DG-1'e ait tüm paralellerin ortalamaları Tablo 4.7.'de değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tekrarlar arasında tutarlı olduğu, 1/10 kat seyreltilmiş dilüsyonları arasında yaklaşık 3.3 Cq'luk bir fark olduğu görülmektedir (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri DG-2, Tüm Tekrar ve SS Değeri

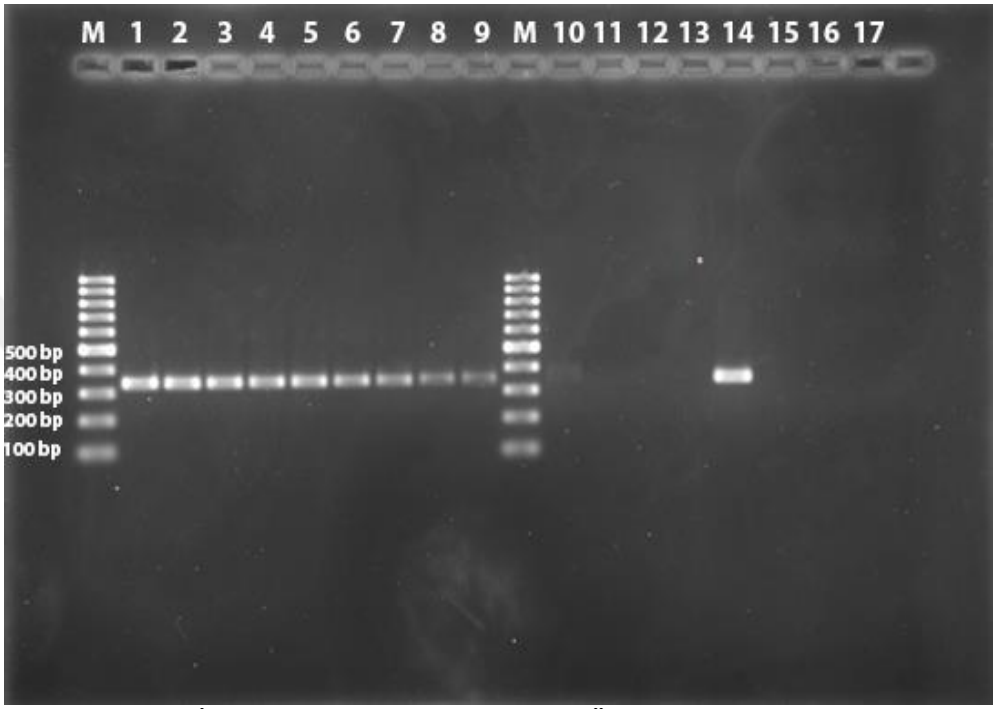
Deneysel Grup-2 Tüm Tekrar Ort. ve SS Değeri					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	25.86	25.12	25.35	25.44	0.31
50 D	27.50	26.50	26.81	26.94	0.42
25 D	28.34	27.37	27.79	27.83	0.40
10 D	30.13	29.02	29.76	29.64	0.46
7,5 D	30.39	29.35	31.17	30.30	0.75
5 D	31.45	30.34	32.08	31.29	0.72
2,5 D	32.48	31.26	33.89	32.54	1.07
1 D	34.20	33.04	34.34	33.86	0.58
0,5 D	35.17	34.09	37.82	35.69	1.57
0,1 D	38.11	37.23	N/A	37.67	0.44
0,01 D	N/A	39.84	N/A	39.84	0.00
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	21.47	22.33	22.58	22.13	0.48
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

T: Tekrar, Ort.: Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok.

Tablo 4.7'de karışım örneklerine ait ilk okunan Cq değerinin 25.44 olduğu görülmektedir. Bazı örnek gruplarında SS değerinin >0.5 olduğu görülmektedir. Bu örnek grupları %7.5 D, %5 D, %2.5 D, %1D ve tespit düzeyi olan %0.5 D'e aittir. Bu durumun pipetleme hatası kaynaklı olabileceği, farklı zaman ve farklı DNA örnekleriyle analizin tekrarından kaynaklı olabilceği düşünülmektedir. Ancak bazı çalışmalara göre tekrarlar arasındaki bu SS değerin düşük olduğu görülmektedir. Literatürdeki son yıllara ait bazı çalışmalardan birinde otoklavlanmış örnek karışımlarında en yüksek SS değerinin 5.6627, başka bir çalışmada işlenmiş ürünlerdeki Cq değerlerinin SS'nin 1.00 olduğu görülmektedir (202,251).

Yöntemin doğruluk ve hassasiyet tespiti için her SG-qPCR analizi sonrasında PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Şekil 4.25.'te domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant yoğunluğunda azalmanın olduğu görülmektedir. 14 numaralı kuyu ısıl işlem uygulanan %100 sığır DNA'sına ait bant olup 332 bp'e karşılık gelmektedir. Marker dışındaki diğer jel üzerinde görünen tüm bantlar ise domuz türüne spesifik 330 bp'lik bantları göstermektedir. 15. ve 16. numaralı kuyularda bant görülmemesi beklenen bir

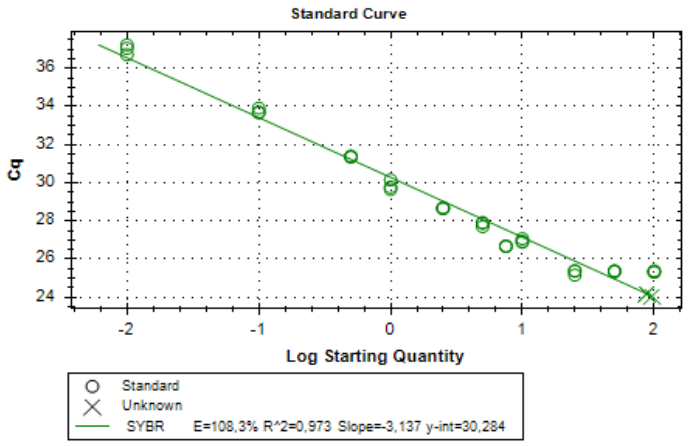
durum olmakla birlikte primerlerin türe spesifik olduğunu ve çapraz reaksiyon olmadığını göstermektedir. Ayrıca 17 numaralı kuyuda NTC'e ait bant görülmemesi, deney setinde bir kontaminasyonun olmadığını ifade etmektedir. Bu durumda tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde; bu deney seti için domuz DNA'sı tespit düzeyinin %0.5 (a/a)'lik karışım oranına ait olduğu ve tespit limitinin 0.25 ng/µL olduğu görülmektedir (Tablo 4.7. ve Şekil. 4.25.).



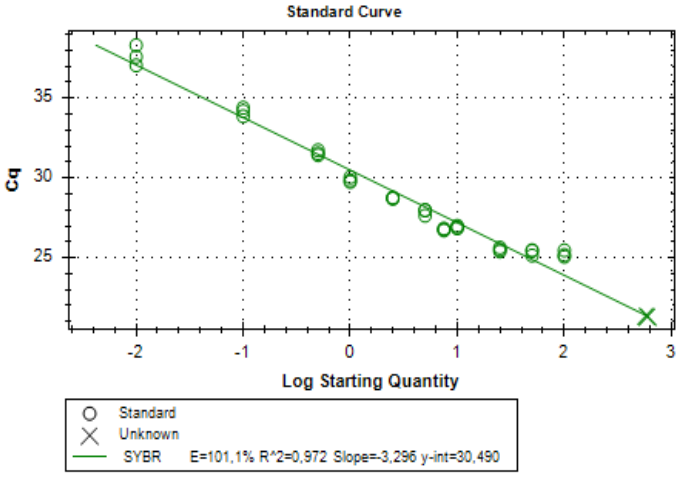
Şekil 4.25. Isıl İşlem Uygulanmış Et Karışım Örnekleri DG-2 AJE Görüntüsü Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: %100 D, 2: %50 D, 3: %25, 4: %10 D, 5:%7.5 D, 6: %5 D, 7: %2.5 D, 8: %1 D, 9: %0.5 D, 10: %0.1 D, 11: %0.01 D, 12: %0.001 D, 13: %0.0001D, 14: %100 S, 15: Ç.K.1, 16: Ç.K.2, 17: NTC

4.3.3 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG SG-qPCR Analizi

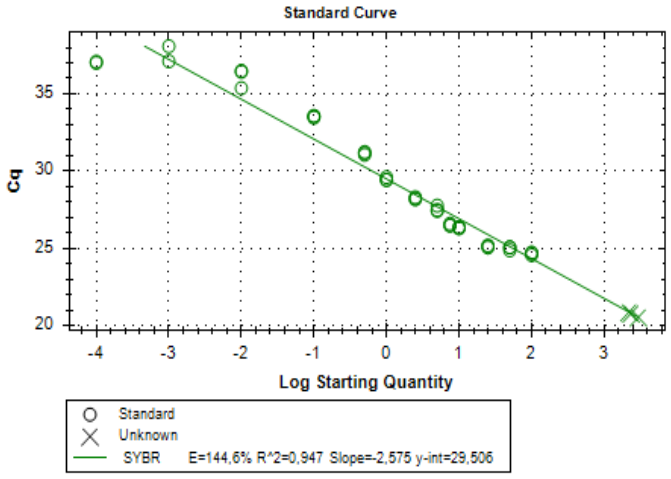
Isıl işlem uygulanan et karışım örnekleri için oluşturulan Klinik Gruba ait örneklerin her tekrardaki 3 paralele ait Cq ve SS verileri Ek 21.'de, tekrarlarına ait ortalama Cq ve SS verileri ise Tablo 4.8'de verilmiştir. Tekrarların standart eğri grafikleri Şekil 4.26., Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.'de verilmiştir. Tüm örnek gruplarının tespit düzeyi ve reaksiyon kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.29.'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 1. Tekrar SEG



Şekil 4.27. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 2. Tekrar SEG



Şekil 4.28. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, 3. Tekrar SEG

KG 1. tekrar standart eğri grafiğinde, E değerinin %108.3, r^2 değerinin 0.973 ve eğim değerinin -3.137 (Şekil 4.26.), 2. tekrar standart eğri grafiğinde E değerinin

%101.1, r^2 değerinin 0.972 ve eğim değerinin -3.296 (Şekil 4.27.) ve 3. tekrara ait standart eğri grafiğinde E değerinin %144.6, r^2 değerinin 0.947 ve eğim değerinin -2.575 olduğu görülmektedir (Şekil 4.28.).

Tablo 4.8. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri KG, Tüm Tekrar ve SS Değeri

Klinik Grup Tüm Tekrar Ort. ve SS Değeri					
% Karışım Oranları	1.T. Cq Değeri	2.T. Cq Değeri	3.T. Cq Değeri	Tüm T. Cq Ort.	SS
100 D	25.25	24.99	24.60	24.60	0.33
50 D	25.26	25.11	24.94	24.94	0.16
25 D	25.21	25.28	25.08	25.08	0.10
10 D	26.85	26.64	26.46	26.46	0.20
7,5 D	26.56	26.49	26.28	26.28	0.15
5 D	27.72	27.58	27.49	27.49	0.12
2,5 D	28.55	28.48	28.17	28.17	0.20
1 D	29.76	29.60	29.42	29.42	0.17
0,5 D	31.27	31.32	31.10	31.10	0.12
0,1 D	33.65	33.89	33.46	33.46	0.22
0,01 D	36.89	37.40	36.03	36.03	0.69
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	24.03	21.14	20.68	20.68	1.82
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

T: Tekrar, Ort.: Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

Belirlenen tespit düzeyi; örnekler arasındaki Cq değerleri ve farkı (Ek 21. ve Tablo 4.7.), örnek karışımlarına ait erime eğrisi analizi sonuçları (Ek 22., Ek 23 ve Ek 24) ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.25.). Buna göre bu veriler birlikte değerlendirildiğinde; çizilen her tekrara ait standart eğri grafiğinde tespit düzeyinden sonraki karışım oranlarına ait verilerin eşik değeri çizgisinin altında kaldığı görülmüştür (Ek 22., Ek 23 ve Ek 24).

KG'ye ait tüm paralellerin ortalamaları alınmış ve Tablo 4.8.'de yeniden değerlendirilmiştir. Buna göre; tüm örnek gruplarına ait Cq değerlerinin tüm tekrarlar arasında tutarlı olduğu görülmektedir (Tablo 4.8.). Isıl işlem uygulanan et karışım örneklerinde tespit limiti olarak belirlenen %0.5 D karışım oranına ait örnek grubunun ve tespit limitine kadar olan diğer karışım oranlarının SS'lerinin 0.5'ten küçük çıktığı görülmektedir (Tablo 4.8.).

Genel olarak qPCR analizlerinde ilk okunan Cq ile son okunan Cq arasında yaklaşık 10 Cq kadar bir fark, PCR verimliliği açısından önemlidir (133). Tespit düzeyine ait Cq değerinin ortalama 31.10, ilk örnek grubuna ait Cq değerlerinin ise ortalama 24.60 olduğu görülmektedir (Tablo 4.8.). Ayrıca tüm örnek gruplarınınn erime eğrisi grafiklerine bakıldığında, %0.5 D karışım oranından sonraki diğer karışım oranlarına ait erime eğrilerinin sinyalleri, eşik çizgisinin hemen altında kalmıştır (Ek 22., Ek 23 ve Ek 24).

Domuz eti tespit düzeyi ve miktarının belirlenmesi için geliştirilen SG-qPCR analiz yönteminin, doğruluk ve hassasiyet tespiti için SG-qPCR analizi sonrasında PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. KG'ye ait SG-qPCR analizi yapılmış tüm örnek gruplarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmış ve hedeflenen tüm bantlar görüntülenmiştir (Şekil 4.29.).

Şekil 4.29. Isıl İşlem Uygulanmış Et Karışım Örnekleri KG AJE Görüntüsü

Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: %100 D, 2: %50 D, 3: %25, 4: %10 D, 5:%7.5 D, 6: %5 D, 7: %2.5 D, 8: %1 D, 9: %0.5 D, 10: %0.1 D, 11: %0.01 D, 12: %0.001 D, 13: %0.0001D, 14: %100 S, 15: Ç.K.1, 16: Ç.K.2, 17: NTC

Şekil 4.29.'da NTC örneklerine ait ve çapraz reaksiyon örneklerine ait (15,16 ve 17 numaralı kuyular) herhangi bir amplifikasyonun olmadığı, dolayısıyla deney setinde kontaminasyon, primer dimer ve çapraz reaksiyon olmadığını ifade etmektedir. 1 numaradan başlayıp 11 numaraya doğru ilerleyen kuyulardaki karışım oranlarında, domuz DNA konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte bant

yoğunluğunda bir azalmanın olduğu görülmektedir (Şekil 4.29.). 9 nolu kuyu sığır etinde %0.5 domuz DNA'sı içeren karışım oranına aittir.

Isıl işlem uygulanan et grubu örneklerine uygulanan 3 farklı deneme modelinde, tüm örnek gruplarına ait veriler birlikte değerlendirildiğinde; Isıl işlem uygulanan sığır eti karışımındaki domuz eti tespit düzeyinin SG-qPCR analizi ve analiz sonrasında uygulanan AJE görüntülerinde %0.5 (a/a) olduğu görülmektedir. Tespit edilen yüzde karışım değerinde, domuz DNA tespit limitinin 0.25 ng/ µL olduğu görülmektedir.

4.4 Çiğ ve Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri SG-qPCR Analizi, Genel Değerlendirme

Dini sebepler, haksız ekonomik kazanç, etik kurallar ve sağlık endişeleri gibi nedenlerden dolayı domuz eti ve ürünlerinin tüketimi, üreticiler ve özellikle tüketiciler için bir endişe kaynağıdır. Bu nedenle, bu çalışmada domuz türüne spesifik bir primer tasarlanarak, farklı oranlarda sığır etine karıştırılmış çiğ ve ısıl işlem gören et karışımlarında, domuz etinin tespit düzeyi ve tespit limitinin SG-qPCR yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çiğ ve ısıl işlem uygulanan et karışım örneklerinde domuz eti miktar ve limiti tespiti için 3 farklı deneme modeli oluşturulmuştur. Bu modeller; Deneysel Grup-1, Deneysel Grup-2 ve Klinik Grup olup, her model 3 tekrarlı ve her tekrarda 3 teknik tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Oluşturulan deneme gruplarıyla PCR verimliliği, yöntemin hassasiyet ve tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Analizde SG-qPCR yöntemi kullanılmış olup, protokol domuz ve sığır türüne spesifik tasarlanan primerlere bağlı olarak optimize edilmiştir (bkz Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.).

qPCR'de %100 verimlilik sağlandığı düşünüldüğü durumda E, r^2 ve eğim değerlerinin olması istenen aralıkları sırasıyla; %90-%110, >0.95 ve -3.1 ile -3.8 değerleridir. Bu değerler çoğunlukla, RNA'dan DNA'ya (cDNA) geçiş yapan ekspresyon analizlerinde daha çok dikkate alınmaktadır. %100 verimlilik kısaca, reaksiyon koşullarının maksimum düzeyde çalıştığı, döngü sonrası amplifikasyon ürününün 2 katına çıktığı durumu temsil etmektedir. Bu durum her logaritmik artışta 3.3 Cq'luk bir değişime tekabül etmektedir (22,133,171).

Tablo 4.9. Çiğ ve Isıl İşlem Gören Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli E, r^2 ve Eğim Değerleri

Çiğ Örnek Grubu Deneme Modeli	Analiz Tekrarları	E Değeri	r^2 Değeri	Eğim Değeri
DG-1	1. Tekrar	%80.1	0.977	-3,914
	2. Tekrar	%85.1	0.984	-3,739
	3. Tekrar	%86.9	0.974	-3,683
DG-2	1. Tekrar	%81.9	0.977	-3,848
	2. Tekrar	%76.2	0.968	-4,064
	3. Tekrar	%68.7	0.990	-4,405
KG	1. Tekrar	%94.9	0.852	-3,449
	2. Tekrar	%84.0	0.975	-3,775
	3. Tekrar	%91.4	0.959	-3,547
Isıl İşlem Uygulanan Örnek Grubu Deneme Modeli	Analiz Tekrarları	E Değeri	r^2 Değeri	Eğim Değeri
DG-1	1. Tekrar	%84.8	0.993	-3,751
	2. Tekrar	%90.3	0.981	-3,578
	3. Tekrar	%85.6	0.995	-3,725
DG-2	1. Tekrar	%77.6	0.992	-4,009
	2. Tekrar	%77.8	0.997	-4,003
	3. Tekrar	%75.7	0.993	-4,087
KG	1. Tekrar	%108.3	0.973	-3,137
	2. Tekrar	%101.1	0.972	-3,296
	3. Tekrar	%144.6	0.947	-2,575

DG-1: Deneysel Grup-1, DG-2: Deneysel Grup-2, KG: Klinik Grup

Çiğ ve ısıl işlem uygulanan et karışım örnekleri deneme modeline ait standart eğri verileri Tablo 4.9.'da verilmiştir. Buna göre çoğu deneme modeline ait standart eğrideki verilerin bu değerler arasında olmadığı görülmektedir. Bu durum şu şekilde ifade edilebilir;

1- Çiğ et karışım örneklerine ait domuz eti tespitinin %0.1 D'lik karışım örneğine ait (mavi ile çizilmiştir, Tablo 4.28.) olduğu, ısıl işlem gören et karışım örneklerinin ise %0.5 D'lik karışım örneğine ait (turuncu ile çizilmiştir, Tablo 4.9.) olduğu tüm deneme modeli analiz verilerinden ve agaroz jel elektroforezi görüntülerinden tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.10., Şekil 4.14., Şekil 4.18. ve bkz. Şekil 4.22., Şekil 4.26., Şekil 4.30.). Tüm deneme modellerine ait çizilen standart eğri grafiklerinde, tespit düzeyinden sonraki tüm örnek gruplarının outlier olduğu görülmüştür. Bu durumun standart eğride özellikle r^2 değerini, buna bağlı olarak E ve eğim değerlerini negatif yönde etkilediği görülmüştür (bkz. Şekil 4.6-8., Şekil 4.10-12., Şekil 4.14-16. ve bkz. Şekil 4.18-20., Şekil 4.22-24., Şekil 4.26-28). Aynı

zamanda standart eğri grafiği sadece 1/10 kat seyreltilmiş örnek grupları değil, 1/5 ve 1/2 kat seyreltilmiş örnek grupları da dahil edilerek çizilmiştir.

2- Çalışmadaki analizler, çift sarmallı DNA (dsDNA) üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Çiğ et karışım örneklerinin tüm karışım örneklerine ait Cq değerlerinin tekrarlar içinde ve arasında tutarlı olduğu (SS <0.5), tespit düzeyine kadar olan 1/10 kat fark olan tüm örnek gruplarına ait Cq değerleri farkının (3.3 Cq) kabul edilebilir olduğu Tablo 4.10.'da görülmektedir. Böylece, çiğ et karışım örnekleri için oluşturulan 3 deneme modeline ait verilerin birbirleriyle tutarlı ve kabul edilebilir olduğu görülmektedir (Tablo 4.10.). Ayrıca tespit düzeyinden sonraki %0.01 D, %0.001 D ve %0.0001 D'ye ait karışım örneklerinin Cq değerlerinin elde edildiği ancak, bunlara ait erime eğrisi grafiklerinin, eşik çizgisinin hemen altında kalmasından dolayı tespit limiti olarak değerlendirilemediği görülmektedir (Tablo 4.10., Ek.1-12.).

Tablo 4.10. Çiğ Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli SS ve Cq Değerleri

	Tüm Tekrarlar SS Değerleri				Tüm Tekrarlar Cq Değerleri			
% Karışım Oranları	DG-1 SS	DG-2 SS	KG SS	3 Model SS	DG-1 Cq ort.	DG-2 Cq ort.	KG Cq ort.	3 Model Cq ort.
100 D	0.65	0.65	1.01	0.21	18.25	17.41	16.09	17.25
50 D	0.33	0.70	0.73	0.22	19.05	18.64	16.29	17.99
25 D	0.54	0.72	0.92	0.19	19.22	20.01	18.41	19.21
10 D	0.28	0.94	0.85	0.36	21.53	21.92	19.43	20.96
7,5 D	0.49	0.64	0.75	0.13	21.29	21.96	20.07	21.11
5 D	0.43	0.66	0.91	0.24	21.75	22.63	21.03	21.80
2,5 D	0.69	0.38	0.66	0.17	22.66	23.86	22.25	22.92
1 D	0.49	0.76	0.57	0.14	24.50	25.72	24.46	24.89
0,5 D	0.72	0.65	0.74	0.05	25.08	26.46	25.16	25.57
0,1 D	0.80	0.66	0.87	0.11	27.8	29.80	29.17	28.92
0,01 D	0.53	0.74	1.69	0.62	33.81	36.06	32.65	34.17
0,001 D	1.08	0.28	0.87	0.41	35.6	37.98	35.87	36.48
0,0001 D	N/A	18.33	0.97	0.11	N/A	25.93	35.92	30.93
100 S	0.87	0.34	0.50	0.27	18.25	13.99	15.36	15.87
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

DG-1: Deneysel Grup-1, DG-2: Deneysel Grup-2, KG: Klinik Grup

Ancak 3 modele ait AJE görüntüleri birlikte değerlendirildiğinde; domuz eti tespit düzeyi olan %0.1'in de altında olan karışım örneklerine ait bantların görünür olduğu gözlemlenmektedir (bkz. Şekil 4.9., Şekil 4.13., Şekil 4.17.).

Çiğ et karışım örneklerinin DG-1'e ait AJE görüntüsünde (bkz. Şekil 4.9.) %0.01 D'lik karışım oranına ait bandın görüldüğü, DG-2'ye ait AJE'de (bkz. Şekil 4.13.) %0.01 D ve %0.001D'ye ait bantların görüldüğü ve KG'ye ait AJE'de (bkz. Şekil 4.17.) ise %0.01 D ve %0.001 D'ye ait bantların görülebildiği tespit edilmiştir. Bu durum bize, tasarlanan primer setlerinin optimizasyon sonuçlarının tespit seviyeleri için daha iyileştirilebilir yönde olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.11. Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Tüm Deneme Modeli SS ve Cq Değerleri

	Tüm Tekrarlar SS Değerleri				Tüm Tekrarlar Cq Değerleri			
% Karışım Oranları	DG-1 SS	DG-2 SS	KG SS	3 Model SS	DG-1 Cq ort.	DG-2 Cq ort.	KG Cq ort.	3 Model Cq ort.
100 D	0.22	0.31	0.33	0.06	26.26	25.44	24.6	25.43
50 D	0.66	0.42	0.16	0.25	27.77	26.94	24.94	26.55
25 D	0.34	0.40	0.10	0.16	28.21	27.83	25.08	27.04
10 D	0.26	0.46	0.20	0.14	29.81	29.64	26.46	28.64
7,5 D	0.24	0.75	0.15	0.32	30.17	30.30	26.28	28.92
5 D	0.32	0.72	0.12	0.31	31.00	31.29	27.49	29.93
2,5 D	0.28	1.07	0.20	0.48	31.83	32.54	28.17	30.85
1 D	0.14	0.58	0.17	0.25	33.43	33.86	29.42	32.24
0,5 D	0.13	1.57	0.12	0.83	34.49	35.69	31.1	33.76
0,1 D	0.29	0.44	0.22	0.11	37.66	37.67	33.46	36.26
0,01 D	N/A	0.00	0.69	0.49	N/A	39.84	36.03	37.94
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	0.30	0.48	1.82	0.83	22.04	22.13	20.68	21.62
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

DG-1: Deneysel Grup-1, DG-2: Deneysel Grup-2, KG: Klinik Grup

Isıl işlem gören et karışım örneklerinin tüm karışım örneklerine ait Cq değerlerinin tekrarlar içinde ve arasında tutarlı olduğu (SS <0.5), tespit düzeyine kadarki 1/10 kat seri dilüsyon halindeki tüm örnek gruplarına ait Cq değerleri farkının (3.3 Cq) kabul edilebilir olduğu Tablo 4.11.'de görülmektedir. Böylece, ısıl işlem gören et karışım örnekleri için oluşturulan 3 deneme modeline ait verilerin birbirleriyle tutarlı ve kabul edilebilir olduğu görülmektedir (Tablo 4.11.). Ayrıca tespit düzeyinden sonraki %0.1 D, %0.01 D'ye ait karışım örneklerinin Cq

değerlerinin elde edildiği ancak, bunlara ait erime eğrisi grafiklerinin, eşik çizgisinin hemen altında kalmasından dolayı tespit limiti olarak değerlendirilemediği görülmektedir (Tablo 4.11., bkz. Ek.13-24.). Ancak 3 modele ait AJE görüntüleri birlikte değerlendirildiğinde; domuz eti tespit düzeyinin (%0.5) de altında olan karışım örneklerine ait bantların görünür olduğu gözlemlenmektedir (bkz. Şekil 4.21., Şekil 4.25. ve Şekil 4.29.).

Isıl işlem gören et karışım örneklerinin DG-1'e ait AJE görüntüsünde (bkz. Şekil 4.21.) %0.1 D'lik karışım oranına ait bandın görüldüğü, DG-2'ye ait AJE'de (bkz. Şekil 4.25.) %0.1 D'ye ait bandın görüldüğü ve KG'ye ait AJE'de (bkz. Şekil 4.29.) ise %0.1 D ve %0.01 D'ye ait bantların görülebildiği tespit edilmiştir. Bu durum bize, tasarlanan primer setlerinin optimizasyon sonuçlarının ısıl işlem uygulanan karışımlarında da tespit seviyeleri için iyileştirilebilir yönde olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; SG-qPCR'de sığır etine belirli oranlarda karıştırılan domuz etinin tespit düzeyi ve tespit limiti; ısıl işlem uygulanan karışım örneklerinde 15 µL PCR reaksiyonu hacminde %0.5 (a/a) ve 0.25 ng/µL, 10 µL PCR reaksiyonu hacminde çiğ et karışımlarında ise %0.1 (a/a) ve 0.05 ng/µL olarak tespit edilmiştir. Çalışmada düşük reaksiyon hacmi kullanılarak analizin maliyeti düşürülmeye çalışılmıştır. Nitekim SYBR Green boya bazlı qPCR analizlerin prob bazlı qPCR analizlerine göre 4 kat daha ucuz olduğu bilinmektedir (202). Aşağıda verilen bazı örneklerde otoklavlama normları, bu çalışmada uygulanan normlarla benzerlik içermekte (105,140) bazılarının ise süre ve basınç değerleri uzun tutulmuştur. Ayrıca bu çalışmaların PCR reaksiyon hacim miktarları çalışmamızdaki reaksiyon hacim miktarının 2 katına tekabül etmektedir. DNA konsantrasyonları benzerlik göstermekle birlikte kullanılan qPCR analizleri interkolasyon boya bazlıdır.

Meira ve arkadaşları (2017), EvaGreen boya bazlı qPCR yöntemiyle, sığır etine karıştırılan at eti karışımlarına 121 ºC'de 15 dk ısıl işlem uygulamışlardır. 20 µL PCR reaksiyon hacmi ve 100 ng/µL şablon DNA içeren analiz koşullarında %0.01 (a/a) oranında at etini tespit edebildiklerini belirtmişlerdir (251). Çalışmamızda; SYBR Green boya bazlı qPCR yöntemiyle 15 µL reaksiyon hacminde 0.25 ng/µL tespit edilebilmiş ancak, AJE görüntülerinde 0.05 ng/µL hatta 0.01 ng/µL'lik tespit limitlerine ait bantları görülebilmiştir (bkz. Şekil 4.29).

Kang ve Tanaka 2018 yılında yaptıkları çalışmada mtDNA üzerindeki cyt-b geninin hedeflendiği SYBR Green tabanlı qPCR analizi gerçekleştirmişlerdir.

Analiz için; 20 µL PCR reaksiyon hacmi ve 20 ng/µL şablon DNA kullanmışlardır. Piyasada ticari olarak satılan sığır eti ürünlerinde, %0.01 oranında domuz eti tespit etmişlerdir (35).

Lee ve arkadaşları 2020 yılında, işlenmiş ürünlerde domuz etinin SG-qPCR yöntemiyle tespit edilmesine yönelik bir kit geliştirmişlerdir. Çalışmalarını 20 µL PCR reaksiyon hacmi ve 25 ng/µL şablon DNA üzerinden optimize etmişlerdir. Primer sekanslarını mtDNA üzerinden tasarlamışlardır. Farklı primer konsantrasyonlarını farklı sıcaklıklarda deneyerek optimum sıcaklıkta optimum primer konsantrasyonunu tespit etmişler ve buna göre protokolü oluşturmuşlardır. Böylece hem çiğ hem de otoklavlanmış (121 ºC,15 dk,15 psi) ikili karışımlarında %0.001 (a/a) düzeyinde domuz etini tespit etmişlerdir (202).

Hossain ve arkadaşları 2017 yılında 121 ºC'de 45 psi basıçta 2.5 saat boyunca domuz, sığır ve manda etlerine ve ikili karışımlarına otoklavlama işlemi uygulamışlardır. 25 µL reaksiyon hacmi, 40 ng/µL şablon DNA, 400 nmol primer konsantrasyonu ve mtDNA üzerinden tasarladıkları türe spesifik primerler ile hem çiğ hem de ısıl işlem gören karışımlarda %0.1 oranında domuz etini tespit edebilmişlerdir (161). Razzak ve ark. (2015), aynı otoklav normlarında domuz, kedi, köpek ve sıçan türlerini tespit etmek amacıyla çip tabanlı bir multipleks PCR yöntemi geliştirmişlerdir. 25 µL reaksiyon hacmi, her türden 10 ng/µL şablon DNA'ın olduğu PCR koşullarında her bir türün tespitini %0.1 oranında gerçekleştirmişlerdir (251).

Karabasanavar ve ark. (2011), 121 ºC'de 15 psi basıçta 30 dk boyunca koyun etine otoklavlama işlemi uygulamışlardır. 25 µL reaksiyon hacmi, 50 ng/µL şablon DNA ile türe spesifik D-loop bölgesinden tasarladıkları primerler ile hem çiğ hem de otoklavlanmış ette %0.1 oranında koyun etini tespit edebilmişlerdir (105). Aynı araştırmacılar 2013 yılında aynı reaksiyon ve aynı otoklav koşullarında tavuk etini hem çiğ hem de ısıl işlem görmüş ette %0.1 düzeyinde tespit etmişlerdir (140).

Çalışmaya ait elde edilen tespit seviye ve limitlerine ilişkin, literatürdeki benzer çalışmalarda reaksiyon hacim ve DNA konsantrasyonları baz alındığında dikkate değer ve uygulanabilir bir yöntem olduğu görülmektedir. Bununla birlikte literatürdeki diğer yöntemlerle kıyaslandığında; çoğu protein tabanlı analizlerin tespit miktar ve düzeyinden önemli derecede kabul edilebilir olduğu görülmektedir. Özellikle günümüzde ve ülkemizde kontrol laboratuvarlarında türün tespiti için

kullanılan ELISA tekniğinin tespit limitlerinin çok üzerindedir. 2020 yılının aralık ayında henüz online olarak yayınlanan bir çalışmada, Jiang ve arkadaşları ısıya dayanıklı Troponin I proteini hedefleyerek domuz ve memeli türü etlerini tespit etmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar ikili et karışımları hazırlamış ve bu karışımları 132 ^{o}C'de, 2 bar basınçta, 120 dk boyunca ısıl işleme maruz bırakmışlardır. Sandviç ELISA tekniği kullanarak domuz etini %1 karışım düzeyinde tespit etmişlerdir (4). Mandli ve arkadaşları (2018), doğrudan ve rekabetçi ELISA tekniğini kullanarak çiğ etlerde %0.1, ısıl işlem gören etlerde %1 seviyesindeki domuz eti tağşişini tespit edebilmişlerdir (6).

Proteine dayalı başka bir çalışmada, 2-DE yöntemiyle çiğ etlerde %10'un üzerinde karıştırılan ikili et karışımlarının tespit edilebileceği belirtilmiştir (9). 2018 yılında IEF yöntemiyle yapılan bir çalışmada, çiğ etlerde domuz etinin tespit seviyesi çalışılmıştır. Buna göre sığır etine %4 ve kanatlı etine %1 oranında karıştırılan domuz etinin tespit edilebildiği belirtilmiştir (18).

Tür tespiti çalışmalarında spektroskopik temelli yaklaşımların tespit düzeyleri protein tabanlılara göre daha az hassastır. Boyacı ve arkadaşları 2014 yılında Raman spektroskopisi ile çiğ sığır etine karıştırılan %25 oranındaki at etini tespit edebilmişlerdir (91). Deniz ve arkadaşları 2018 yılında, FTIR spektroskopisi ile farklı kemometrik yaklaşımlar kullanarak sığır etine karıştırılan %5'in üzerindeki tavuk etini (88) ve yine aynı araştırmacılar 2020 yılında yaptıkları çalışmada sığır etine %5'in üzerinde karıştırılan domuz etini tespit edebilmişlerdir (252).

Kromotografik yöntemlerin de tür tayini ve tespiti için kullanıldığı ancak bu yöntemlerin tespit seviyelerinin de genel olarak %1'in altına inemediği görülmüştür (11,12). Örneğin 2013 yılında Giaretta ve arkadaşları uHPLC'de, türün miyoglobin proteinini saflaştırmış ve bunu marker olarak değerlendirmiştir. Sığır kıymasına %5 oranında karıştırılan domuz etini tespit etmişlerdir (92). Jiru ve arkadaşları 2019 yılında, uHPLC kromotografisi kullanarak etlerdeki bazı aminoasitleri hedeflemiş, bunların birbirlerine oranlarından yola çıkmış ve %2 oranında sığır etine karıştırılmış domuz etini tespit etmişlerdir (95).

Çoğu proteine dayalı enstrümental bazlı tekniklerin, domuz eti tespitinde çiğ etlerde %0.1, ısıl işlem gören et ve karışımlarında %1 oranında tespit sağlayabildiği söylenebilir.

Buna göre; çalışmamızın literatüre ve endüstriye katkı sağlayacağı, geliştirilen yöntemin ucuz, tekrarlanabilir ve hassas tespit düzeyine sahip olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- SYBR Green gibi boya bazlı qPCR çalışmalarının maliyeti, prob tabanlı qPCR çalışmalarından çok daha uygundur. Tespit limitleri olarak prob tabanlı yöntemler daha hassas olsa da, son yıllarda SYBR Green teknolojisinin ilerlemesiyle birlikte tespit limitlerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. mtDNA üzerinden türe spesifik tasarlanan domuz türüne ait primerlerin SYBR Green qPCR yöntemiyle sığır etine belirli oranlarda karıştırılan domuz eti tespit seviyesi ve limiti; çiğ et karışımlarında %0.1 (a/a) ve 0.05 ng/µL, ısıl işlem uygulanan karışım örneklerinde ise %0.5 (a/a) ve 0.25 ng/µL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin tespit seviyesi ve maliyeti göz önünde bulundurulduğunda, kontrol laboratuvarlarında ve et ve et ürünleri endüstrisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

2- Isıl işlem uygulaması olarak et ve et ürünlerindeki konservasyon normları uygulanmış, süre 15 dk arttırılarak 30 dk olarak ayarlanmıştır. Böylece 121 ^{o}C'de, 15 psi basınçta, 30 dk otoklavlama işlemine tabi tutulan etlerden, çoğaltılan amplikon boyutunun verimliliği araştırılmıştır. Sonuçta, 330 bp'lik çoğaltılan PCR ürünün, uygulanan ısıl işlem normlarında stabilitesini koruduğu, %0.5 seviyesinde ve 0.25 ng/µL limit düzeyinde domuz etinin SG-qPCR yöntemiyle tespit edilebildiği görülmüştür.

3- Analiz maliyetinin azaltılması için çiğ örnek gruplarındaki PCR reaksiyon hacmi 10 µL, ısıl işlem gören örnek gruplarında 15 µL olarak çalışılmıştır. Özellikle çiğ et grubu örneklerine ait PCR reaksiyon hacminin 10 µL'den 20 µL'ye çıkarılmasıyla, tespit seviyelerinin daha da iyileştirilebileceği öngörülmektedir. Nitekim bu durum öngörülen karışım oranlarına ait erime eğrisi verileri ve agaroz jel elektroforez görüntüleri ile desteklenmektedir. Aynı şekilde ısıl işlem gören örnek gruplarına ait PCR reaksiyon hacminin arttırılmasıyla, tespit seviyesinin daha da iyileştirilebileceği öngörülmektedir.

4- Deney setinde yer alan %50, %25, %7.5, %5, %2.5 karışım oranlarının daha sonraki çalışmalarda yer almaması, karışım seviyelerinin 1/10 kat olacak şekilde ayarlanması durumunda bilimsel çalışmalarda PCR verimliliği ve analiz maliyetleri açısından daha uygun olacağı öngörülmektedir.

5- Bununla birlikte, qPCR'ye ait birkaç standart eğri oluşturulması esnasında analizin tespit limiti tahminlenebilmektedir. Oluşturulacak karışım seviyesinin tahmin edilen seviyeden en fazla 2 kat daha seyreltilmiş oranı çalışılabilir. Seçilen bu seviyelerin 1/10 olarak değil, 1/5 ya da 1/2 kat seçilmesi yöntemin tespit olasılığını daha güçlendirecektir.

6- Üreticilerin ekonomik kazanım elde etmek için daha ucuz olan et ve et kaynaklarını ürüne en az %10-%30 oranında ilave etmesi gerektiği bilinmektedir. Tağşiş amaçlı bu oran, birçok yöntemle tespit edilebilmektedir. Ancak bulaşı kaynaklı bir durumun tespit edilebilmesi için daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle Müslüman ve Yahudiler için domuz eti ve ürünleri haram kılınmıştır. Bununla ilgili herhangi bir tolerans bulunmadığından, ürünlerde domuz eti/bulaşısı için tespit limitlerinin olabildiğince iyileştirilmesi gerekmektedir.

7- Yaklaşık %90'ını Müslümanların oluşturduğu ülkemizde, özellikle domuz eti tespit yöntemlerinden olan moleküler ve genetik tabanlı yaklaşımların dışa bağımlılığını azaltmak adına, bu alanda verilecek projelerin teşvik edilmesi ve mali anlamda daha çok desteklenmesi, yöntemlerin pratikte uygulanabilirliğini arttıracaktır.

8- Bu çalışmanın bir sonucu olarak; at, eşek, tavuk ve sığır türleriyle çapraz reaksiyon vermeyen türe spesifik olarak tasarlanmış domuz türüne ait primerlerin, taze ve işlenmiş et ürünlerinde domuz türüne ait etin tespitinde kullanılmak üzere, ticari bir kit olarak üretilmesine imkan sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Paris/FAO OP. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. OECD Publishing Paris, /Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2020.
2. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü T ve OB. Tarım Ürünleri Piyasaları(Dana Eti). 2020;2017–20.
3. Singh VP, Neelam S. Meat Species Specifications to Ensure the Quality of Meat-A Review. Int J Meat Sci. 2010 Dec 15;1(1):15–26.
4. Jiang X, Rao Q, Mittl K, Hsieh YHP. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of mammalian meats. Food Control. 2020;110(December 2019):107045.
5. Asensio L, Garcı T, Gonza I. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Food Control. 2008;19:1–8.
6. Mandli J, EL Fatimi I, Seddaoui N, Amine A. Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat. Food Chem. 2018;255(February):380–9.
7. Hsieh YP, Zhang S, CHen F, Sheu SC. Monoclonal Antibody-based ELISA for Assessment of Endpoint Heating Temperature of Ground Pork and Beef Introduction. J Food Sci. 2002;67(3).
8. Grujić R, Savanović D. Analysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins in pork meat by capillary gel electrophoresis. Foods Raw Mater. 2018;6(2):421–8.
9. Montowska M, Pospiech E. Myosin light chain isoforms retain their species-specific electrophoretic mobility after processing , which enables differentiation between six species : 2DE analysis of minced meat and meat products made from beef ,. Proteomics. 2012;10:2879–89.
10. Montowska M, Pospiech E. Differences in two-dimensional gel electrophoresis patterns of skeletal muscle myosin light chain isoforms between Bos taurus , Sus scrofa and selected poultry species. J Sci Food Agric. 2011;(November 2010):2449–56.
11. Marikkar JMN, Mirghani ME. ., Jaswir I. Application of Chromatographic and Infra-Red Spectroscopic Techniques for Detection of Adulteration in Food Lipids: A Review. J Food Chem Nanotechnol. 2016;2(1):32–41.
12. Nurjuliana M, Man YBC, Hashim DM, Mohamed AKS. Rapid identi fi cation of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer. MESC. 2011;88(4):638–44.
13. Altuntas EG, Deniz E, Ayhan B, Candogan K, Demiralp DO. Identification of Meat Species by Using Molecular and Spectroscopic Techniques. Turkish J Agric - Food Sci Technol. 2017;5(5):488–92.
14. Candoğan K, Altuntas EG, İğci N. Authentication and Quality Assessment of Meat Products by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Food Eng Rev. 2020;
15. Rohman A, Erwanto Y, Che YB. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Meat Sci. 2011;88(1):91–5.
16. El-Hack MEA, Khan MMH, Hasan M, Salwani MS. Protein-based techniques for halal authentication. Prep Process Relig Cult Foods. 2018;379–91.
17. Amaral J, Meira L, Oliveira MBPP, Mafra I. Advances in authenticity testing for meat speciation. Advances in Food Authenticity Testing. Elsevier Ltd; 2016. 369–414 p.
18. Różycki M, Chmurzyńska E, Zając EB, Karamon J, Cencek T. Isoelectric focusing of proteins in the pH gradient as a tool for identification of species origin of raw meat. J Vet Res. 2018;62 (2)(24):151–9.
19. Sahilah AM, Babji AS. Porcine DNA Detection in Finished Meat Products Using Different Mitochondrial DNA (mt-DNA) on Polymerase Chain reaction. J Nutr Food Sci. 2014;(August 2015):2–5.
20. Lubis H, Sahilah NT, Norizan NA, Hossain MM, Ahmed MU. Fast and Sensitive Real-time PCR-based Detection of Porcine DNA in Food Samples by Using EvaGreen Dye. Food Sci Technol Res. 2018;24(5).
21. Pascoal A, Prado M, Calo P. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs , commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. Eur Food Res Technol. 2005;444–50.
22. Levin RE, Ekezie FC, Sun D. DNA-Based Technique : Polymerase Chain Reaction (PCR). 2nd ed. Modern Techniques for Food Authentication. Elsevier Inc.; 2018. 527–616 p.
23. Murray SR, Butler RC, Timmerman-vaughan GM. Quantitative real-time PCR assays to

detect DNA degradation in soy-based food products. JSci Food Agric. 2009;(December 2008):1137–44.
24. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acides Res. 2000;28(12).
25. Chi LC, Ling FL, Kwok CP, Mana LC, Fai CK, Han CS. A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. Meat Sci. 2014;96(2):922–9.
26. Lubis H, Thaqifah N, Mosharraf M, Uddin M. Development of fast and sensitive real-time qPCR assay based on a novel probe for detection of porcine DNA in food sample. LWT - Food Sci Technol. 2017;84:686–92.
27. Hamzah A, Mutalib SA, Babji AS. Porcine DNA Detection in Finished Meat Products Using Different Mitochondrial DNA (mt-DNA) on Polymerase Chain reaction. J Nutr Food Sci. 2014;4(6):4–6.
28. Xu Y, Xiang W, Wang Q, Cheng N, Zhang L, Huang K. A smart sealed nucleic acid biosensor based on endogenous reference gene detection to screen and identify mammals on site. Nat Publ Gr. 2017;(December 2016):1–10.
29. Ballin NZ. Authentication of meat and meat products. MESC. 2010;86(3):577–87.
30. Nau F, Désert C, Cochet M, Pasco M, Jan S, Baron F, et al. Detection of Turkey , Duck , and Guinea Fowl Egg in Hen Egg Products by Species-Specific PCR. Food Anal Methods. 2009;231–8.
31. Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncale´s P, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A. Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. J Agric Food Chem. 2000;2829–32.
32. Fajardo V, Gonzalez I, Lopez-Calleja I, Martın I, Rojas M, Garcia T, et al. PCR identification of meats from chamois (Rupicapra rupicapra), pyrenean ibex (Capra pyrenaica), and mouflon (Ovis ammon) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. Meat Sci. 2007;76:644–52.
33. İlhak Oİ, Arslan A. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Türk J Vet Anim Sci. 2007;31(3):159–63.
34. Mohd Hafidz MM, Makatar W-H, Adilan H, Nawawee T. Detection of pork in processed meat products by species - specific PCR for halal verification : food fraud cases in Hat Yai , Thailand. Food Res. 2020;4:244–9.
35. Kang TS, Tanaka T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products. Food Chem. 2018;269(June):549–58.
36. Wang Z, Wang Z, Li T, Qiao L, Liu R, Zhao Y, et al. Real-time PCR based on single-copy housekeeping genes for quantitative detection of goat meat adulteration with pork. Int J Food Sci Technol. 2020;553–8.
37. Orbayinah S, Widada H, Hermawan A, Sudjadi S, Rohman A. Application of real-time polymerase chain reaction using species specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for analysis of pork in meatball products. J Adv Vet Anim Res. 2019;7710(June):260–5.
38. Ali E, Amin A, Bee S, Hamid A, Hossain MAM, Mustafa S, et al. Lab-on-a-chip-based PCR-RFLP assay for the confirmed detection of short-length feline DNA in food. Food Addit Contam Part A. 2015;32(9):1373–83.
39. Rahman M, Ali E. Lab-on-a-Chip PCR-RFLP Assay for the Detection of Canine DNA in Burger Formulations. Food Anal Methods. 2015;1598–606.
40. Dooley JJ, Sage HD, Clarke M-AI, Brown HM, Garrett SD. Fish Species Identification Using PCR − RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis : Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study. J Agric Food Chem. 2005;3348–57.
41. Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Sci. 2005;70:107–12.
42. Guan F, Jin Y, Zhao J, Xu A, Luo Y. A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification. J Anal Methods Chem. 2018;2018.
43. Kumar D, Singh SP, Karabasanavar NS, Singh R, Umapathi V. Authentication of beef , carabeef , chevon , mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cyt b gene. J Food Sci Technol. 2014;51(November):3458–63.

44. Güneren G, Akyüz B, Ertuğrul O. Use of RAPD-PCR for genetic analyses on the native cattle breeds in. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2010;57:167–72.
45. Huang M, Horng Y, Huang H, Sin Y, Chen M. RAPD Fingerprinting for the Species Identification of Animals. Asian-Aust J Anim Sci. 2003;16:1406–10.
46. El-jaafari HAA, Panandam JM, Idris I, Siraj SS. RAPD Analysis of Three Deer Species in Malaysia. Asian-Aust J Anim Sci. 2008;21(9):1233–7.
47. Mane BG, Tanwar VK, Girish P, Sharma D, Dixit V. RAPD markers for differentiation of meat species. Indian J Vet Res. 2008;17:9–13.
48. Martinez I, Malmheden I. Species identification in meat products by RAPD analysis. Food Res Int. 1998;31(6):459–66.
49. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem. 2012;84(2):1003–11.
50. Ren J, Deng T, Huang W, Chen Y, Ge Y. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food. PLoS One. 2017;12(3):1–17.
51. Wang Q, Cai Y, He Y, Yang L, Li J, Pan L. Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products. Eur Food Res Technol. 2018;244(4):767–74.
52. Floren C, Wiedemann I, Brenig B, Schütz E, Beck J. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). Food Chem. 2015;173:1054–8.
53. Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Žel J. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. PLoS One. 2013;8(5).
54. Shokralla S, Hellberg RS, Handy SM, King I, Hajibabaei M. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products. Nat Publ Gr. 2015;1–11.
55. Arslan A, Ilhak OI, Calicioglu M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Sci. 2006;72(2):326–30.
56. Santos CG, Melo VS, Amaral JS, Estevinho L, Oliveira MBPP, Mafra I. Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. Meat Sci. 2012;90:836–41.
57. Rojas M, González I, Pavón MA, Pegels N, Hernández PE, García T, et al. Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. Poult Sci. 2009;1021–32.
58. Meyer R, Candrian U, Lüthy J. Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction. J AOAC Int. 1994;77(3):617–22.
59. Levin RE. The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. Food Biotechnol. 2004;18(1):97–133.
60. Montowska M, Pospiech E. Species Identification of Meat by Electrophoretic Methods. Acta Sci Pol, Technol Aliment. 2007;6(1):5–16.
61. Montowska M, Pospiech E. Species-specific expression of various proteins in meat tissue : Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef , pork and selected poultry species. Food Chem. 2013;136(3–4):1461–9.
62. Zia Q, Alawami M, Fadhilah N, Mokhtar K, Mohd R, Raja H, et al. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products. Food Chem. 2020;324(April 2019):126664.
63. Ayaz Y, Ayaz ND, Erol I. Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. J Muscle Foods. 2006;17(2):214–20.
64. Dzantiev BB, Byzova NA, Urusov AE, Zherdev A V. Immunochromatographic methods in food analysis. Trends Anal Chem. 2014;55:81–93.
65. Liu L, Chen F-C, Dorsey JL, Hsieh Y-HP. Sensitive Monoclonal Antibody-based Sandwich ELISA for the Detection of Porcine Skeletal Muscle in Meat and Feed Products. J Food Sci. 2006;71(1):1–6.
66. Harlow E, Lane D. A laboratory manual. cold spring Harb Lab. 1988;(28):28–9.
67. Li Y, Zhang Y, Liu S, Wang W, Meng F, Liu D. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration. Compr Rev FOOD Sci FOOD Saf. 2020;
68. Zvereva EA, Kovalev LI, Ivanov A V., Kovaleva MA, Zherdev A V., Shishkin SS, et al. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of

mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. Meat Sci. 2015;105:46–52.
69. Masiri J, Benoit L, Barrios-Lopez B, Thienes C, Meshgi M, Agapov A, et al. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. Meat Sci. 2016;121:397–402.
70. Rahmati S, Julkapli NM, Yehye WA, Basirun WJ. Identification of meat origin in food products-A review. Food Control. 2016;68:379–90.
71. Yu P, Yin M, Zhou W. Design of experiments and regression modelling in food fl avour and sensory analysis : A review. Trends Food Sci Technol. 2018;71(January 2017):202–15.
72. Boyaci IH, Temiz HT, Genis HE, Soykut EA, Yazgan NN, Guven B, et al. Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. RSC Adv. 2015;56606–24.
73. Bilge G, Murat H, Sezer B, Efe K, Hakki I. Identification of meat species by using laser-induced breakdown spectroscopy. Meat Sci. 2016;119:118–22.
74. Mendez J, Mendoza L, Quevedo R. Trends in application of NIR and hyperspectral imaging for food authentication. Sci Agropecu. 2019;10(1):143–61.
75. Esteki M, Simal-gandara J, Shahsavari Z, Zandbaaf S, Dashtaki E. A review on the application of chromatographic methods , coupled to chemometrics , for food authentication. Food Control. 2018;93(April):165–82.
76. Cen H, He Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. Trends Food Sci Technol. 2007;18:72–83.
77. Ertugay MF, Başlar M. Gıdaların Kalite Özelliklerinin Belirlenmesinde Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi. Gıda. 2011;36(1):49–54.
78. Boyaci IH, Uysal RS, Temiz T, Shendi EG, Yadegari RJ, Rishkan MM, et al. A rapid method for determination of the origin of meat and meat products based on the extracted fat spectra by using of Raman spectroscopy and chemometric method. Eur Food Res Technol. 2014;845–52.
79. Rady A, Adedeji A. Assessing di ff erent processed meats for adulterants using visible-near-infrared spectroscopy. Meat Sci. 2018;136(October 2017):59–67.
80. Pieszczek L, Czarnik-matusewicz H, Daszykowski M. Identification of ground meat species using near-infrared spectroscopy and class modeling techniques – Aspects of optimization and validation using a one-class classi fi cation model. Meat Sci. 2018;139(March 2017):15–24.
81. Barbin DF, Badaró AT, Honoratoc DCB, Idac EY, Shimokomakia M. Identification of turkey meat and processed products using near infrared spectroscopy. Food Control. 2020;107(May 2019):106816.
82. Du L, Lu W, Gao B, Wang J, Yu LL. Authenticating Raw from Reconstituted Milk Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. J Qual. 2019;2019.
83. Kasprzyk I, Depciuch J, Grabek-lejko D, Parlinska-wojtan M. FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for uni fl oral honey authentication . The case study of rape honey. Food Control. 2018;84:33–40.
84. Sahlan M, Karwita S, Gozan M. Identification and classification of honey ' s authenticity by attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometric method. Vet World. 2019;12:1304–10.
85. Amir RM, Anjum FM. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. J Food Sci Technol. 2013;50(October):1018–23.
86. Rusak DA, Brown LM, Martin SD. Classification of Vegetable Oils by Principal Component Analysis of FTIR Spectra. ACS Publ. 2003;80(5):541–3.
87. Kurniawati E, Rohman A, Triyana K. Analysis of lard in meatball broth using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. Meat Sci. 2014;96(1):94–8.
88. Deniz E, Güneş E, Beycan A, Naşit A, Özel D, Kezban D. Differentiation of beef mixtures adulterated with chicken or turkey meat using FTIR spectroscopy. J Food Process Preserv. 2018;(April):1–12.
89. Gao F, Xu L, Zhang Y, Yang Z, Han L, Liu X. Analytical Raman spectroscopic study for discriminant analysis of di ff erent animal-derived feedstu ff : Understanding the high correlation between Raman spectroscopy and lipid characteristics. Food Chem. 2018;240(July 2017):989–96.
90. Biasio M De, Stampfer P, Leitner R, Huck C. Micro-Raman Spectroscopy for Meat Type Detection. Conf SPIE Sens Technol Appl Balt Maryland, USA; 04/2015. 2015;(April).
91. Boyacı IH, Temiz HT, Uysal RS, Velioğlu HM, Yadegari RJ, Ishkan MM. A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy. Food Chem.

2014;148:37–41.
92. Giaretta N, Di AMA, Lippert M, Parente A, Di A. Myoglobin as marker in meat adulteration : A UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger. Food Chem. 2013;141(3):1814–20.
93. Sarah SA, Faradalila WN, Salwani MS, Amin I, Karsani SA, Sazili AQ. LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination. Food Chem. 2016;199:157–64.
94. Mahama S, Waloh N, Chayutsatid C, Sirikwanpong S, Ayukhen A, Marnpae M, et al. Postmarket laboratory surveillance for forbidden substances in halal-certified foods in Thailand. J Food Prot. 2020;83(1):147–54.
95. Jiru M, Stranska-Zachariasova M, Kocourek V, Krmela A, Tomaniova M, Rosmus J, et al. Authentication of meat species and net muscle proteins: Updating of an old concept. Czech J Food Sci. 2019;37(3):205–11.
96. Śliwinska M, Wisniewska P, Dymerski T, Namies´nik´J., Wardencki W. Food Analysis Using Arti fi cial Senses´. J Agric Food Chem. 2014;
97. Gliszczyńska-Świgło A, Chmielewski J. Electronic Nose as a Tool for Monitoring the Authenticity of Food . A Review. Food Anal Methods. 2017;1800–16.
98. Peris M, Escuder-Gilabert L. Electronic noses and tongues to assess food authenticity and adulteration. Trends Food Sci Technol. 2016;58:40–54.
99. Fajardo V, Gonza I, Garcı T. A review of current methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends Food Sci Technol. 2010;21:408–21.
100. Sentandreu MÁ, Sentandreu E. Authenticity of meat products: Tools against fraud. Food Res Int. 2014;60:19–29.
101. Bergerová E, Hrn Z, Siekel P. Effect of Thermal Treatment on the Amplification and Quantification of Transgenic and Non-transgenic Soybean and Maize DNA. Food Anal Methods. 2010;3:211–8.
102. Arun ÖÖ, Karlo M, Eker FY. The Effect of Heat Processing and pH on PCR Detection of Genetically Modified (GM) Soy in Meat Products. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2014;20(5):765–71.
103. Musto M. DNA Quality and Integrity of Nuclear and Mitochondrial Sequences from Beef Meat as Affected by Different Cooking Methods. Food Technol Biotechnol. 2011;49(4):523–8.
104. Arslan A, Ilhak I, Calicioglu M, Karahan M. IDENTIFICATION OF MEATS USING RANDOM AMPLIFIED. J Muscle Foods. 2005;16:37–45.
105. Karabasanavar NS, Singh SP, Umapathi V, Kumar D, Patil G, Shebannavar SN. A highly specific PCR assay for identification of raw and heat treated mutton (Ovis aries). Small Rumin Res. 2011;100(2–3):153–8.
106. Amaral JS, Santos CG, Melo VS, Oliveira MBPP, Mafra I. Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-speci fi c PCR assays to detect hare , rabbit , red deer , pork and cow meats. FRIN. 2014;60:140–5.
107. Barakat H, El-garhy HAS, Moustafa MMA. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;9805–16.
108. Haunshi S, Basumatary R, Girish PS, Doley S, Bardoloi RK, Kumar A. Identification of chicken, duck , pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. Meat Sci. 2009;83(3):454–9.
109. Hernández-chávez JF, González-córdova AF, Rodríguez-ramírez R, Vallejo-cordoba B. Analytica Chimica Acta Development of a polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis method for the detection of chicken or turkey meat in heat-treated pork meat mixtures. Anal Chim Actanalytica Chim Acta. 2011;708:149–54.
110. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J. A quick and simple method for the identi ® cation of meat species and meat products by PCR assay. Meat Sci. 1999;51:143–8.
111. Pinto A Di, Bottaro M, Bonerba E, Bozzo G, Ceci E, Marchetti P. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay. J Food Sci Technol. 2015;52(April):2479–84.
112. Yacoub HA, Sadek MA. Identification of fraud (with pig stuffs) in chicken-processed meat through information of mitochondrial cytochrome b. MITOCHONDRIAL DNA PART A. 2017;1394.
113. Rodriquez MA, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Hernandez PE, Martin R. Qualitative PCR for the detection of chicken and pork adulteration in goose and mule duck foie gras. J Sci

Food Agric. 2003;1181(February):1176–81.
114. Amaral JS, Santos CG, Melo VS, Costa J, Oliveira MBPP, Mafra I. Identi fi cation of duck , partridge , pheasant , quail , chicken and turkey meats by species-speci fi c PCR assays to assess the authenticity of traditional game meat Alheira sausages. Food Control. 2015;47:190–5.
115. Fajardo V, Gonzalez I, I.Lopez-Calleja, Martın I, Rojas M, Hernandez PE, et al. Identification of meats from red deer (Cervus elaphus), fallow deer (Dama dama), and roe deer (Capreolus capreolus) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Sci. 2007;76:234–40.
116. Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Pegels N, Hernández PE, et al. Polymerase Chain Reaction Detection of Rabit Dna in Food And Animal Feed. World Rabbit Sci. 2009;(September 2008):27–34.
117. Martin I, Garcia T, Fajardo V, Lopez-Calleja I, Hernandez PE, Gonzalez I, et al. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. Meat Sci. 2007;75:120–7.
118. Martin I, Garcia T, Fajardo V, Lopez-Calleja I, Rojas M, Hernandez PE, et al. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. Meat Sci. 2007;76:721–9.
119. Natonek-Wisniewska M, Krzscin P, Piestrzynska-Kajtoch A. The species identification of bovine , porcine , ovine and chicken components in animal meals , feeds and their ingredients , based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. Food Control. 2013;34.
120. Rodriguez MA, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Mayoral B, Lopez-Calleja I, et al. Identification of Goose , Mule Duck, Chicken, Turkey, and Swine in Foie Gras by Species-Specific Polymerase Chain Reaction. J Agric Food Chem. 2003;51:1524–9.
121. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. Food Control. 2012;28(2):246–9.
122. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK, Bhilegaokar KN. Detection of Adulteration of Meat and Meat Products with Buffalo Meat Employing Polymerase Chain Reaction Assay. Food Anal Methods. 2012;5:296–300.
123. Mousavi SM, Khaniki GJ, Eskandari S, Rabiei M, Samiee SM, Mehdizadeh M. Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. J Food Compos Anal. 2015;40:47–51.
124. Karabasanavar NS, Singh SP, Kumar D, Shebannavar SN. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. Food Chem. 2014;145:530–4.
125. Ha J, Kim S, Lee J, Lee S, Lee H. Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products Using the Developed Mitochondrial DNA-Based Primers. Korean J Food Sci Anim Resour. 2017;464–8.
126. Dai Z, Qiao J, Yang S, Hu S. Species Authentication of Common Meat Based on PCR Analysis of the Mitochondrial COI Gene. Appl Biochem Biotechnol. 2015;(461):1770–80.
127. Spychaj A, Szalata M, Slomski R, Pospiech E. Identification of Bovine, Pig and Duck Meat Species in Mixtures and in Meat Products on the Basis of the mtDNA Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Gene Sequence. Polish J Food Nutr Sci. 2016;66(1):31–6.
128. Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat Sci. 2007;77:649–53.
129. Brodmann PD, Moor D. Sensitive and semi-quantitative TaqMan TM real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (Bos taurus) and the detection of the family Mammalia in food and feed. Meat Sci. 2003;65:599–607.
130. Hopwood AJ, Fairbrother KS, Lockley AK, Bardsley RG. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. Meat Sci. 1999;53:227–31.
131. Fajardo V, Gonzalez I, Martın I, Rojas M, Hernandez PE, Garcıa T, et al. Differentiation of European wild boar (Sus scrofa scrofa) and domestic swine (Sus scrofa domestica) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. Meat Sci. 2008;78:314–22.
132. Polymerase Chain Reaction. Encyclopædia Britannica, Inc.
133. Navarro E, Serrano-heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. Clin Chim Acta. 2015;439:231–50.
134. Soares S, Amaral JS, Mafra I, Oliveira MBPP. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. Meat Sci. 2010;85(3):531–6.

135. Ha JC, Jung WT, Nam YS, Moon TW. PCR Identification of Ruminant Tissue in Raw and Heat-Treated. J Food Prot. 2006;69(9):2241–7.
136. Walker JA, Hughes DA, Anders BA, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. Anal Biochem. 2003;316:259–69.
137. Rodriguez MA, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Hernandez PE, Martin R. PCR Identication of Beef, Sheep, Goat, and Pork in Raw and Heat-Treated Meat Mixtures. J Food Prot. 2004;67(1):172–7.
138. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. Food Chem. 2009;116(3):806–10.
139. Rojas M, González I, Fajardo V, Martín I, Hernández PE, García T, et al. Authentication of meats from quail (Coturnix coturnix), pheasant (Phasianus colchicus), partridge (Alectoris spp .), and guinea fowl (Numida meleagris) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gen. Food Control. 2009;20(10):896–902.
140. Karabasanavar NS, Singh SP, Kumar D, Shebannavar SN. Development and application of highly specific PCR for detection of chicken (Gallus gallus) meat adulteration. Eur Food Res Technol. 2013;129–34.
141. Ali E, Rahman M. Canine-Specific PCR Assay Targeting Cytochrome b Gene for the Detection of Dog Meat Adulteration in Commercial Frankfurters. Food Anal Methods. 2014;234–41.
142. Ni'Mah A, Kartikasari Y, Pratama AD, Kartikasari LR, Hertanto BS, Cahyadi M. Detection of pork contamination in fresh and cooked beef using genetic marker mitochondrial-DNA cytochrome b by duplex-PCR. J Indones Trop Anim Agric. 2016;41(1):7–12.
143. Song K, Jin H, Hee J. Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications. Food Chem. 2017;229:341–6.
144. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chem. 2014;163:77–82.
145. He H, Hong X, Feng Y, Wang Y, Ying J, Liu Q, et al. Application of Quadruple Multiplex PCR Detection for Beef, Duck, Mutton and Pork in Mixed Meat. J Food Nutr Res. 2015;3(6):392–8.
146. Safdar M, Junejo Y, Arman K, Abasıyanık MF. A highly sensitive and speci fi c tetraplex PCR assay for soybean , poultry , horse and pork species identi fi cation in sausages : Development and validation. Meat Sci. 2014;98:296–300.
147. Prusakova O V, Glukhova XA, Afanas G V, Trizna YA, Nazarova LF, Beletsky IP. A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species. Meat Sci. 2018;137(September 2017):34–40.
148. Qin P, Qu W, Xu J, Qiao D, Yao L. A sensitive multiplex PCR protocol for simultaneous detection of chicken , duck , and pork in beef samples. J Food Sci Technol. 2019;56(3):1266–74.
149. Hanapi UK, Nasir M, Desa M. A higher sensitivity and efficiency of common primer multiplex PCR assay in identification of meat origin using NADH dehydrogenase subunit 4 gene. J Food Sci Technol. 2015;52(July):4166–75.
150. Ali ME, Razzak MA, Hamid SBA, Rahman MM, Amin M Al, Rashid NRA, et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food Chem. 2015;177:214–24.
151. Razzak MA, Hamid SBA, Ali ME. A lab-on-a-chip-based multiplex platform to detect potential fraud of introducing pig, dog, cat, rat and monkey meat into the food chain. Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2015;32(11):1902–13.
152. Hossain MAM, Uddin SMK, Sultana S, Bonny SQ, Khan MF, Chowdhury ZZ, et al. Heptaplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of beef, buffalo, chicken, cat, dog, pork, and fish in raw and heat-treated food products. J Agric Food Chem. 2019;67(29):8268–78.
153. Safdar M, Junejo Y. The development of a hexaplex-conventional PCR for identification of six animal and plant species in foodstuffs. Food Chem. 2016;192:745–9.
154. Ahmed AS, Pin LL, Raabe CA, Hock, Timofey S. Rozhdestvensky ST. A Combined Rapid DNA Extraction and Multiplex PCR for the Detection of Porcine DNA in Raw and Processed Food. In: Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry. 2017. p. 201–8.
155. Li J, Li J, Xu S, Xiong S, Yang J, Chen X. A rapid and reliable multiplex PCR assay for

simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes. Food Chem. 2019;295(November 2018):395–402.
156. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol Cell Probes. 2004;18(2):81–7.
157. Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control. 2009;20(8):696–9.
158. Zha D, Xing X, Yang F. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. Food Control. 2010;21(10):1402–7.
159. Zhang C. Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. Food Control. 2013;31(2):326–30.
160. El-Shazly E, El-Shinawy N, Tolba K. Molecular assay using PCR based technology to identify fraud and adulteration of some meat products. Benha Vet Med J. 2016;31(2):33–9.
161. Hossain MAM, Ali ME, Hamid SBA, Asing, Mustafa S, Desa MNM, et al. Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. Food Control. 2017;73:175–84.
162. Sugiana FA, Widyowa H, Ali Warisman M, Suryani, Desriani. Low cost and comprehensive pork detecon in processed food products with a different food matrix. Indones J Biotechnol. 2018;23(1):21–7.
163. Liu W, Tao J, Xue M, Ji J, Zhang Y, Zhang L, et al. A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products. Eur Food Res Technol. 2019;245(11):2385–92.
164. Al-qassab T, Kamkar A, Shayan P, Khanjari A. Mislabeling in Cooked Sausage is a Seriously Increasingly Problem in Food Safety Abstract : Iran J Vet Med. 2019;13(1):101–13.
165. Safdar M, Junejo Y. A multiplex-conventional PCR assay for bovine, ovine, caprine and fish species identification in feedstuffs: Highly sensitive and specific. Food Control. 2015;50:190–4.
166. Chen A, Wei C, Chen G, Zhao Y, Yang S. Duplex PCR approach for the detection and quantification of donkey, horse and mule in raw and heat-processed meat products. Int J Food Sci Technol. 2015;50(3):834–9.
167. Hou B, Meng X, Zhang L, Guo J, Li S, Jin H. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. Meat Sci. 2015;101:90–4.
168. Zha DM, Xing XM, Yang FH. Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay. Food Chem. 2011;129(4):1904–8.
169. Nejad P, Tafvizi F, Ebrahimi FT, Hosseni M, Ebrahim S. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages. Eur Food Res Technol. 2014;239(3):533–41.
170. Xue C, Wang P, Zhao J, Xu A, Guan F. Development and validation of a universal primer pair for the simultaneous detection of eight animal species. Food Chem. 2017;221:790–6.
171. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines : M inimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR E xperiments SUMMARY : Clin Chem. 2009;622(55:4):611–22.
172. Nakyinsige K, Bin Y, Man C, Qurni A. Halal authenticity issues in meat and meat products. Meat Sci. 2012;91(3):207–14.
173. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct 1;6(10):986–94.
174. Hanna SE, Connor CJ, Wang HH. Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist : Technologies , Applications , and Limitations. JFS R Concise Rev Food Sci Real-time. 2005;70(3).
175. Köppel R, Zimmerli F, Breitenmoser A. Heptaplex real-time PCR for the identi W cation and quanti W cation of DNA from beef , pork , chicken , turkey , horse meat , sheep (mutton) and goat. Eur Food Res Technol. 2009;125–33.
176. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. Meat Sci. 2004;68:431–8.
177. Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, Yetim H. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Sci. 2009;82(4):444–9.
178. Kesmen Z, Güllüce A, Yilmaz MT, Yetiman AE. Taqman-Based Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for the Detection and Quantification of Donkey and

Pork Adulterations in Raw and Heat-Processed Meats CHAIN REACTION APPROACH FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF DONKEY AND PORK. Int J Food Prop. 2014;17:629–38.
179. Hossain MAM, Ali E, Sultana S, Bonny SQ, Kader A, Rahman MA. Quantitative Tetraplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay with TaqMan Probes Discriminates Cattle, Bu ff alo, and Porcine Materials in Food Chain. J Agric Food Chem. 2017;
180. Wang Q, Cai Y, He Y, Yang L, Pan L. Collaborative ring trial of two real-time PCR assays for the detection of porcine- and chicken-derived material in meat products. PLoS One. 2018;13:1–11.
181. Xu R, Wei S, Zhou G, Ren J, Liu Z, Tang S, et al. Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the di ff erential identi fi cation of various meat and meat products. Meat Sci. 2018;137(April 2017):41–6.
182. Thanakiatkrai P, Kitpipit T. Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting. Food Chem. 2017;233:144–50.
183. Denyingyhot A, Phraephaisarn C, Vesaratchavest M, Dahlan W, Keeratıpıbul S. Simultaneous Detection of Three Forbidden Animals (Porcine, Canine, and Rat) in Halal Food by Using High Resolution Melting Analysis. Sci Bull Ser F Biotechnol. 2017;XXI:284–8.
184. Lopez-Oceja A, Nuñez C, Baeta M, Gamarra D, Pancorbo MM de. Species identification in meat products : A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene. Food Chem. 2017;237:701–6.
185. Lopez-Andreo M, Garrido-Pertierra A, Puyet A. Evaluation of Post-Polymerase Chain Reaction Melting Temperature Analysis for Meat Species Identification in Mixed. 2006;7973–8.
186. Şakalar E, Kaynak A. Practical Molecular Detection Method of Beef and Pork in Meat and Meat Products by Intercalating Dye Based Duplex Real-Time Polimerase Chain Reaction Practical Molecular Detection Method of Beef and Pork in Meat and Meat Products by Intercalating Dye Base. Int J Food Prop. 2016;19(1):31–40.
187. Chung H. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for the authentication of raw meats. Int Food Res J. 2018;25(April):632–8.
188. Amaral JS, Santos G, Oliveira MBPP, Mafra I. Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. Food Control. 2017;72:53–61.
189. Maryam S, Raharjo TJ, Rohman A. Determination of Porcine Contamination in Laboratory Prepared dendeng Using Mitochondrial D-Loop686 and cyt b Gene Primers by Real Time Polymerase Chain Reaction Determination of Porcine Contamination in Laboratory Prepared dendeng Using Mitochondrial D-L. Int J Food Prop. 2016;19(1):187–95.
190. Song Q, Chen Y, Zhao L, Ouyang H, Song J. Monitoring of sausage products sold in Sichuan Province , China : a first comprehensive report on meat species ' authenticity determination. Sci Rep. 2019;1–9.
191. Iwobi A, Sebah D, Kraemer I, Losher C, Fischer G, Busch U, et al. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. FOOD Chem. 2015;169:305–13.
192. Iwobi A, Sebah D, Spielmann G, Maggipinto M, Schrempp M, Kraemer I, et al. A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products. Food Control. 2017;74:89–97.
193. Zdenkova K, Diliara A, Fialova E, Demnerova K. Detection of meat adulteration : Use of efficient and routine-suited multiplex polymerase chain reaction-based methods for species authentication and quantification in meat products Detection of meat adulteration : Use of efficient and routine-suited mult. J Food Nutr Res. 2018;(January).
194. Balakrishna K, Sreerohini S, Parida M. Ready-to-use single tube quadruplex PCR for differential identification of mutton , chicken , pork and beef in processed meat samples. Food Addit Contam Part A [Internet]. 2019;36(10):1435–44. Available from: https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1633477
195. Zhang W, Cui S, Cheng X, Wei F, Ma S. An optimized TaqMan real-time PCR method for authentication of ASINI CORII COLLA (donkey-hide gelatin). J Pharm Biomed Anal. 2019;170:196–203.
196. Ren Y, Li X, Liu Y, Yang L, Cai Y, Quan S, et al. A novel quantitative real-time PCR method for identi fi cation and quanti fi cation of mammalian and poultry species in foods. Food Control. 2017;76:42–51.

197. Bourguiba-hachemi S, Fathallah MD. DNA testing of meat foods raises issues beyond adulteration. Sky J Food Sci. 2016;(January).
198. Kim M, Kim H. A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork , chicken , and beef in commercial processed meat products. LWT - Food Sci Technol. 2019;114(June):108390.
199. Raharjo TJ. TaqMan probe real-time polymerase chain reaction targeting the ATPase 6 gene for the detection of pork adulteration in meat and meatballs. J Food Saf. 2019;
200. Al-kahtani HA, Ismail EA, Asif M. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. Food Chem. 2017;219:54–60.
201. Rohman A, Himawati A, Triyana K, Fatimah S. Identification of pork in beef meatballs using Fourier transform infrared spectrophotometry and real-time polymerase chain reaction. Int J Food Prop. 2017;20(3):654–61.
202. Lee L, Aminah S, Kit S, Citartan M, Raabe CA. Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green real- time PCR assay. Food Chem. 2020;309(October 2019):125654.
203. Rahmawati, Sismindari, Raharjo TJ, Sudjadi, Rohman A. Analysis of pork contamination in Abon using mitochondrial D-Loop22 primers using real time polymerase chain reaction method. Int Food Res J. 2016;23(1):370–4.
204. Wu H, Qian C, Wang R, Wu C, Wang Z, Wang L, et al. Identification of pork in raw meat or cooked meatballs within 20 min using rapid PCR coupled with visual detection. Food Control. 2020;109(September 2019):106905.
205. Cheng J, Chou H, Lee M, Sheu S. Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples. Food Chem. 2016;192:336–42.
206. Dalsecco LS, Palhares RM, Oliveira PC, Teixeira LV. A Fast and Reliable Real-Time PCR Method for Detection of Ten Animal Species in Meat Products. J Food Sci. 2018;83:258–65.
207. Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. Food Microbiol. 2011;28(5):848–61.
208. Dooley J. Development of meat speciation assays using the Agilent 2100 bioanalyzer Application. Agil Technol. 2001;
209. TaqMan Assay [Internet]. Wikipedia. [cited 2020 Nov 30]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan
210. FRET [Internet]. PCR Compendium. [cited 2020 Nov 30]. Available from: https://pcrcompendium.wordpress.com/lightcycler-probes/
211. Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, et al. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic Acids Res. 2001;29(20):e96–e96.
212. Molecular Beacons [Internet]. Sigma Aldrich. [cited 2020 Nov 30]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/molecular-beacons.html
213. Scorpions Probes [Internet]. Sigma Aldrich. [cited 2020 Nov 30]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/scorpions-probes.html
214. Kane DE, Hellberg RS. Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. Food Control. 2016;59:158–63.
215. Kim M, Yoo I, Lee S, Hong Y, Kim H. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan Ò real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. Food Chem. 2016;210:102–6.
216. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. Clin Biochem. 2015;48(15):948–56.
217. Hoshino T, Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. Syst Appl Microbiol. 2012;35(6):390–5.
218. Nakano M, Komatsu J, Matsuura SI, Takashima K, Katsura S, Mizuno A. Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion. J Biotechnol. 2003;102(2):117–24.
219. Baker M. Digital PCR hits its stride. Nat Methods. 2012;9(6):541–4.
220. Bio-Rad. QX200 ™ Droplet Reader and QuantaSoft ™ Software Instruction Manual. BioRad. 2019;40.
221. Cai Y, He Y, Lv R, Chen H, Wang Q, Pan L. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR. PLoS One. 2017;12(8):1–12.
222. Köppel R, Ganeshan A, Weber S, Pietsch K, Graf C, Hochegger R, et al. Duplex digital

PCR for the determination of meat proportions of sausages containing meat from chicken, turkey, horse, cow, pig and sheep. Eur Food Res Technol. 2019;245(4):853–62.
223. Bian X, Jing F, Li G, Fan X, Jia C, Zhou H, et al. A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic Escherichia coli O157 and Listeria monocytogenes. Biosens Bioelectron. 2015;74:770–7.
224. ddPCR Work flow [Internet]. Bio-Rad. [cited 2020 Dec 7]. Available from: https://www.bio-rad.com/en-dk/product/qx200-droplet-digital-pcr-system?ID=MPOQQE4VY
225. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. Biochem Biophys Res Commun. 2001;154:150–4.
226. Tasrip NA, N.F. KM, U.K. H, F. AMY, M.E. A, Y.K. C, et al. Loop mediated isothermal amplification ; a review on its application and strategy in animal species authentication of meat based food products. Int Food Res J. 2019;26(February):1–10.
227. Fazira N, Azam N, Roy S, Lim SA, Ahmed MU. Meat species identification using DNA-luminol interaction and their slow diffusion onto the biochip surface. Food Chem. 2018;248(April 2017):29–36.
228. Lee M, Su T, Lien Y, Sheu S. The development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid authentication of five forbidden vegetables in strict vegetarian diets. Nat Publ Gr. 2017;(January):1–9.
229. Sheu S, Tsou P, Lien Y, Lee M. Development of loop-mediated isothermal ampli fi cation (LAMP) assays for the rapid detection of allergic peanut in processed food. Food Chem. 2018;257(January):67–74.
230. Garrido-maestu A, Azinheiro S, Fuciños P, Carvalho J, Prado M. Highly sensitive detection of gluten-containing cereals in food samples by real-time Loop-mediated isothermal AMPli fication (qLAMP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR). Food Chem. 2018;246(September 2017):156–63.
231. Deb R, Singh G, Umesh S, Sushil S. Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Cow Components Adulterated in Buffalo Milk / Meat. Mol Biotechnol. 2016;58(12):850–60.
232. Cho A, Dong H, Cho S. Meat Species Identification using Loop-mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-specific Mitochondrial DNA. Korean J Food Sci An. 2014;34(6).
233. Yang L, Fu S, Peng X, Li L, Song T, Li L. Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification. Biotechnol Biotechnol Equip. 2014;28(5):882–8.
234. Girish PS, Barbuddhe SB, Kumari A, Rawool DB, Karabasanavar NS, Muthukumar M, et al. Rapid detection of pork using alkaline lysis- Loop Mediated Isothermal Amplification (AL-LAMP) technique. Food Control. 2020;110(May 2019):107015.
235. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Jeremy R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond. 2003;270(January):313–21.
236. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. PLoS One. 2010;5(1):1–8.
237. Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velazquez J, Ortea I. Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food- Authentication Topics. J Agric Food Chem. 2019;
238. Meusnier I, Singer GAC, Landry J, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC Genomics. 2008;4:4–7.
239. Haynes E, Jimenez E, Angel M, Helyar SJ. The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. Food Control. 2019;101(February):134–43.
240. Dobrovolny S, Blaschitz M, Weinmaier T, Pechatschek J, Cichna-Markl M, Indra A, et al. Development of a DNA metabarcoding method for the identification of fifteen mammalian and six poultry species in food. Food Chem. 2019;272(May 2017):354–61.
241. Ferri G, Corradini B. Species Identification Through DNA ‘“ Barcodes .”’ Genet Test Mol Biomarkers. 2009;13(February).
242. Mohindra V, Khare P, Lal KK, Punia P. Molecular discrimination of five Mahseer species from Indian peninsula using. Acta Zool Sin. 2007;53(January):725–32.
243. Rastogi G, Dharne MS, Walujkar S, Kumar A, Patole MS, Shouche YS. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. Meat Sci. 2007;76:666–74.
244. Bossier P. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. J Food Sci.

1999;64(2):189–93.
245. Alikord M, Momtaz H, Keramat J, Kadivar MR, Homayouni A. Species identification and animal authentication in meat products : a review. J Food Meas Charact. 2018;12(1):145–55.
246. Doosti A, Dehkordi PG. Molecular assay to fraud identification of meat products. J Food Sci Technol. 2014;51(January):148–52.
247. Erwanto Y, Abidin MZ, Yasin E, Muslim P, Rohman A. Identification of Pork Contamination in Meatballs of Indonesia Local Market Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis. Asian-Australas J Anim Sci. 2014;27(10):1487–92.
248. Hossain MAM, Ali E, Bee S, Hamid A, Mustafa S, Nasir M, et al. Double Gene Targeting Multiplex Polymerase Chain Reaction − Restriction Fragment Length Polymorphism Assay Discriminates Beef, Bu ff alo, and Pork Substitution in Frankfurter Products. J Agric Food Chem. 2016;64:6343–54.
249. Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S, McDowell D. Real-time PCR for quantitative meat species testing. Food Control. 2003;14(8):579–83.
250. Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). Natl Meas Syst. 2013;First Edit.
251. Meira L, Costa J, Villa C, Ramos F, Oliveira MBPP, Mafra I. EvaGreen real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2017;75:408–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.061
252. Deniz E, Güneş E, İğci AN, Ayhan B, Demiralp DÖ, Candoğan K. Detection of Pork, Horse or Donkey Meat Adulteration in Beef Based Formulations By Fourier Transform Infrared Spectroscopy. J FOOD. 2020;45:369–79.

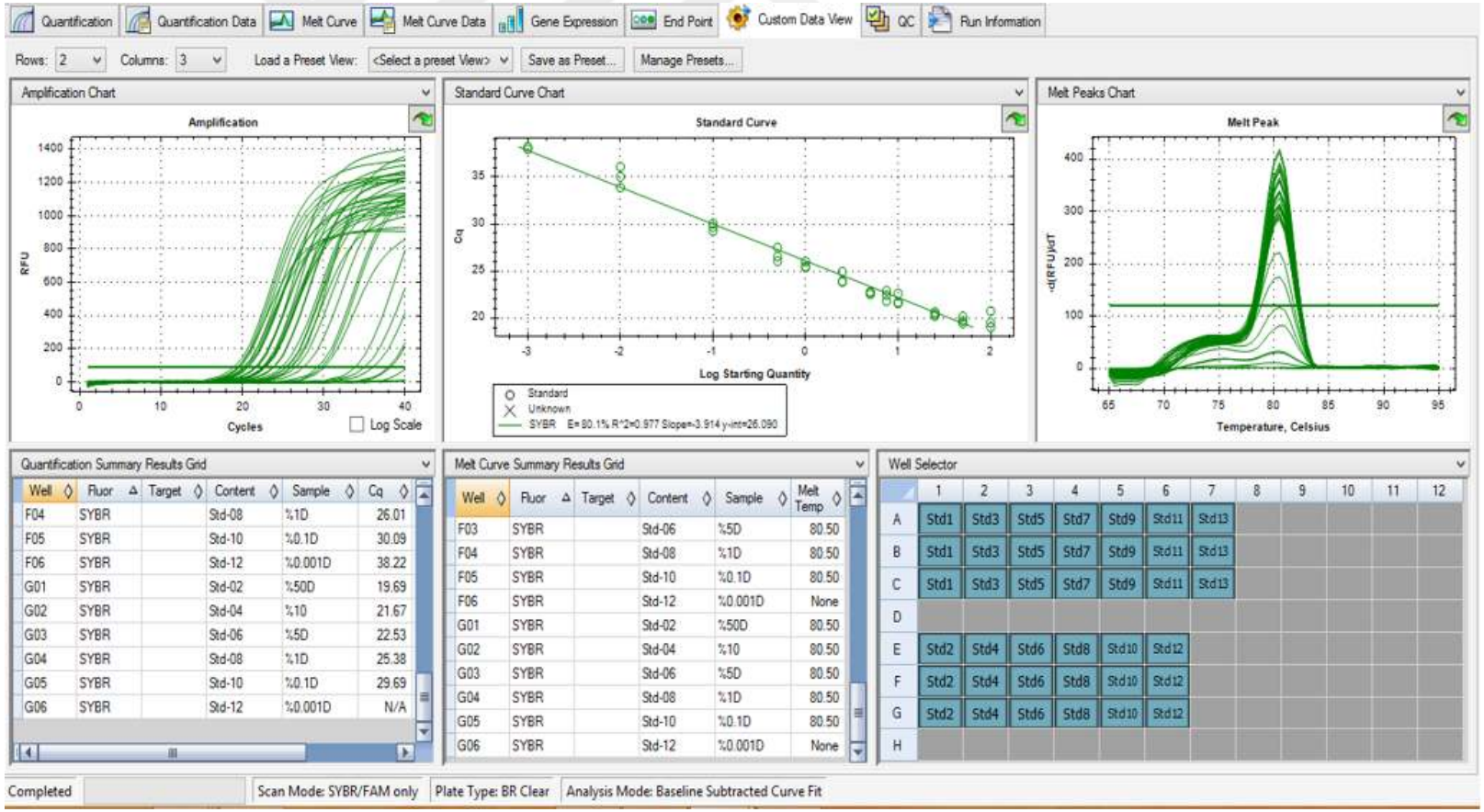
7. EKLER

EK 1 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1'e ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Deneysel Grup-1 1.Tekrar					Deneysel Grup-1 2.Tekrar					Deneysel Grup-1 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	20.83	19.59	19.09	19.84	0.73	19.38	19.18	18.81	19.12	0.24	19.07	18.3	17.38	18.25	0.69
50 D	19.52	20.24	19.78	19.85	0.30	19.01	19.71	19.4	19.37	0.29	18.05	19.29	19.82	19.05	0.74
25 D	20.73	20.49	20.3	20.51	0.18	20.2	20.16	20.02	20.13	0.08	19.29	19.34	19.04	19.22	0.13
10 D	22.71	21.65	21.77	22.04	0.47	21.08	21.91	21.18	21.39	0.37	23.01	20.95	20.64	21.53	1.05
7,5 D	23.01	22.53	21.9	22.48	0.45	21.96	21.9	21.42	21.76	0.24	21.49	21.33	21.06	21.29	0.18
5 D	22.87	22.82	22.61	22.77	0.11	22.29	22.72	22.35	22.45	0.19	21.57	21.95	21.73	21.75	0.16
2,5 D	25.02	24	23.94	24.32	0.50	23.83	23.67	23.69	23.73	0.07	22.88	22.47	22.63	22.66	0.17
1 D	25.56	26.07	25.47	25.7	0.26	24.97	25.34	25.23	25.18	0.16	24.42	24.66	24.43	24.5	0.11
0,5 D	27.6	26.64	26.13	26.79	0.61	26.54	26.19	26.11	26.28	0.19	24.93	25.53	24.77	25.08	0.33
0,1 D	29.32	30.16	29.79	29.76	0.34	28.5	29.16	29.03	28.9	0.29	27.64	28.1	27.66	27.8	0.21
0,01 D	36.17	35.12	33.98	35.09	0.89	33.77	35.47	33.55	34.26	0.86	33.08	34.85	33.5	33.81	0.76
0,001 D	38.05	38.3	N/A	38.18	18.00	36.56	36.45	36	36.34	0.24	35.53	35.76	35.5	35.6	0.12
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	15.13	16.09	15.58	15.6	0.73	15.32	15.99	15.69	15.67	0.24	11.58	15.05	14.76	13.8	0.69
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

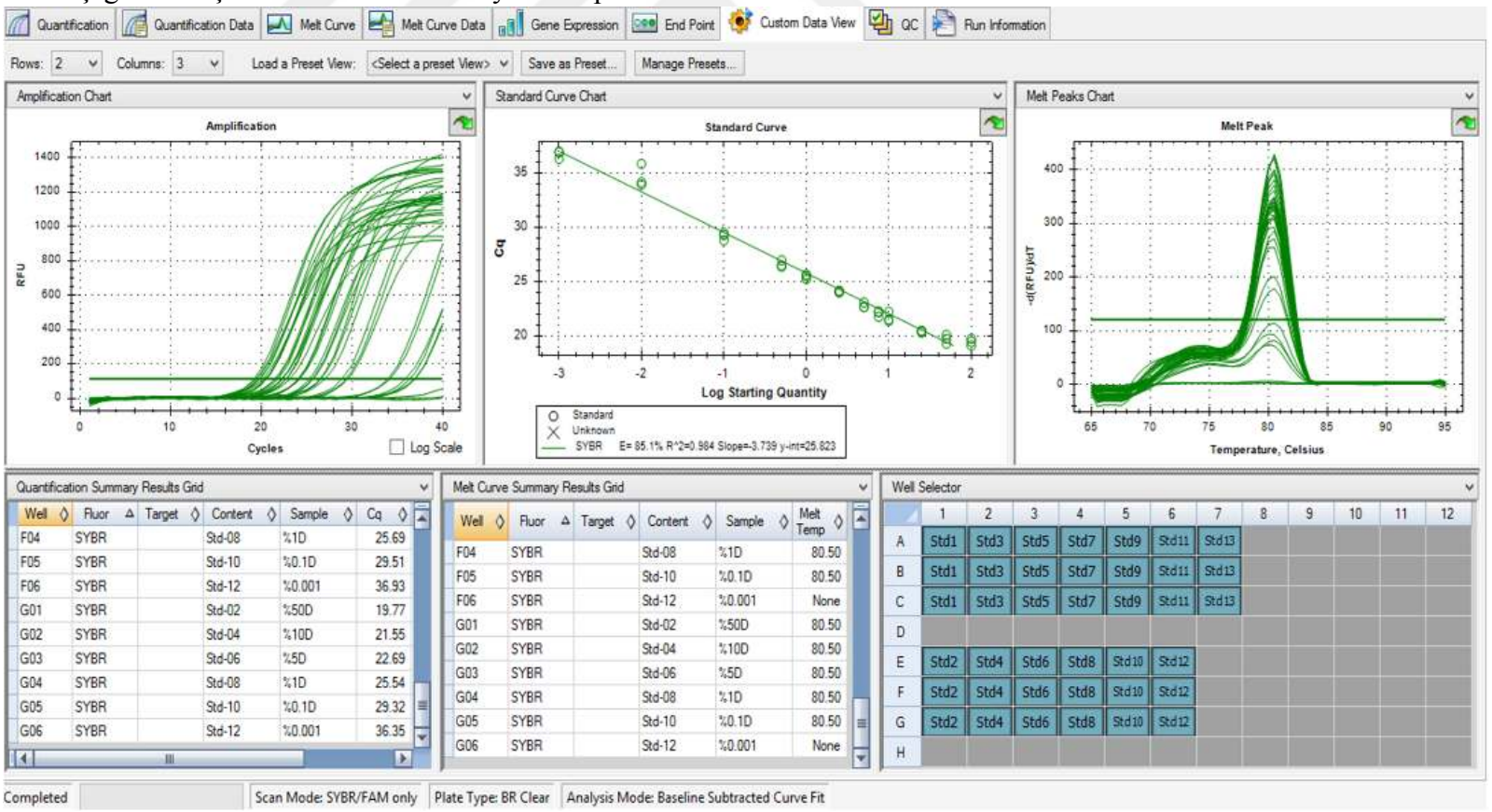
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 2 Çiğ Et Karışım Örnekleri DG-1-1.Tekrar



E=%80,1 R^2=0,987 Eğim=-3,914

EK 3 Çiğ Et Karışım Örneklerinde Deneysel Grup-1-2.Tekrar



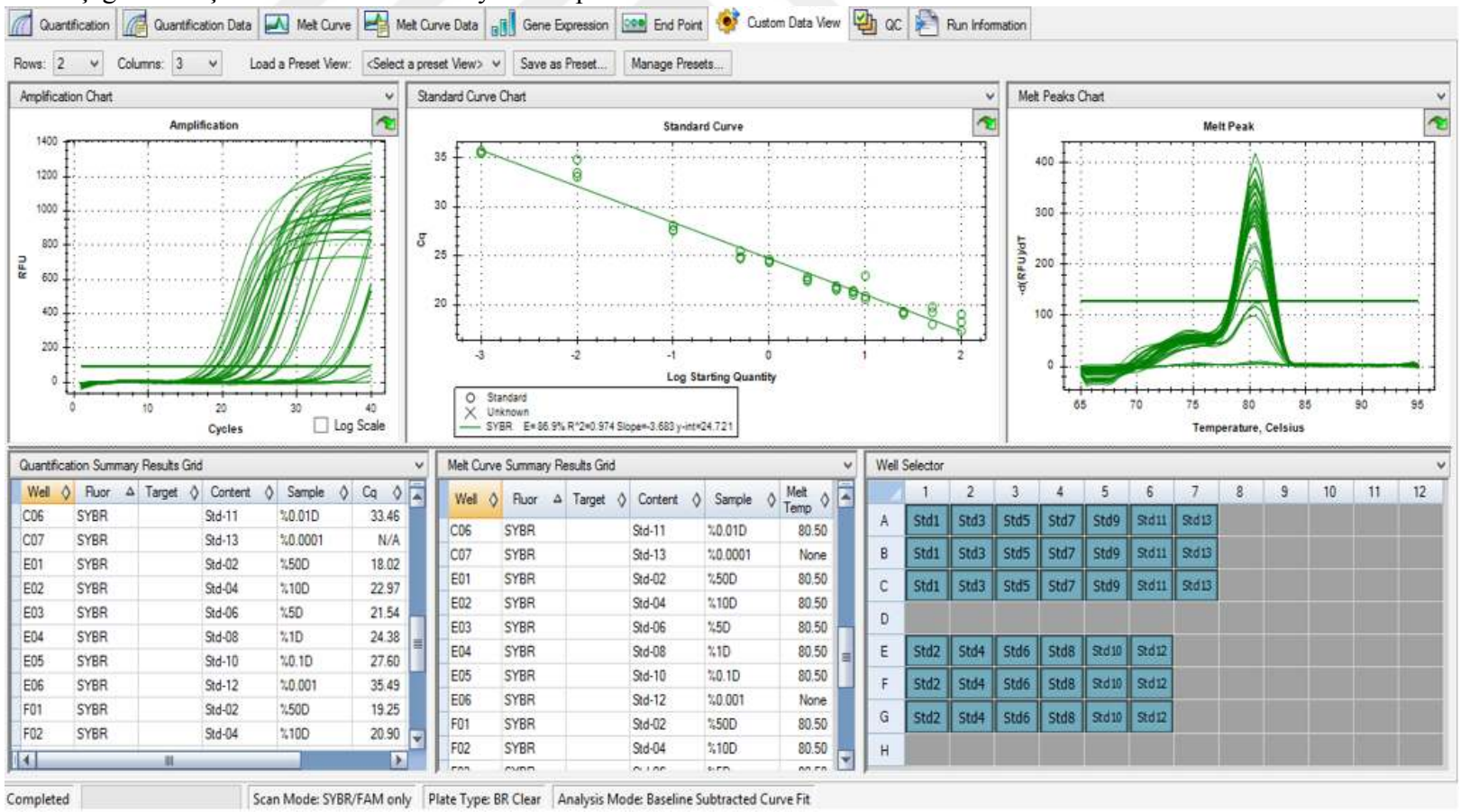
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
F04	SYBR		Std-08	%1D	25.69
F05	SYBR		Std-10	%0.1D	29.51
F06	SYBR		Std-12	%0.001	36.93
G01	SYBR		Std-02	%50D	19.77
G02	SYBR		Std-04	%10D	21.55
G03	SYBR		Std-06	%5D	22.69
G04	SYBR		Std-08	%1D	25.54
G05	SYBR		Std-10	%0.1D	29.32
G06	SYBR		Std-12	%0.001	36.35

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
F04	SYBR		Std-08	%1D	80.50
F05	SYBR		Std-10	%0.1D	80.50
F06	SYBR		Std-12	%0.001	None
G01	SYBR		Std-02	%50D	80.50
G02	SYBR		Std-04	%10D	80.50
G03	SYBR		Std-06	%5D	80.50
G04	SYBR		Std-08	%1D	80.50
G05	SYBR		Std-10	%0.1D	80.50
G06	SYBR		Std-12	%0.001	None

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std3	Std5	Std7	Std9	Std11	Std13					
B	Std1	Std3	Std5	Std7	Std9	Std11	Std13					
C	Std1	Std3	Std5	Std7	Std9	Std11	Std13					
D												
E	Std2	Std4	Std6	Std8	Std10	Std12						
F	Std2	Std4	Std6	Std8	Std10	Std12						
G	Std2	Std4	Std6	Std8	Std10	Std12						
H												

E=%85,1 R^2=0,984 Eğim=-3,739

EK 4 Çiğ Et Karışım Örneklerinde Deneysel Grup-1-3.Tekrar



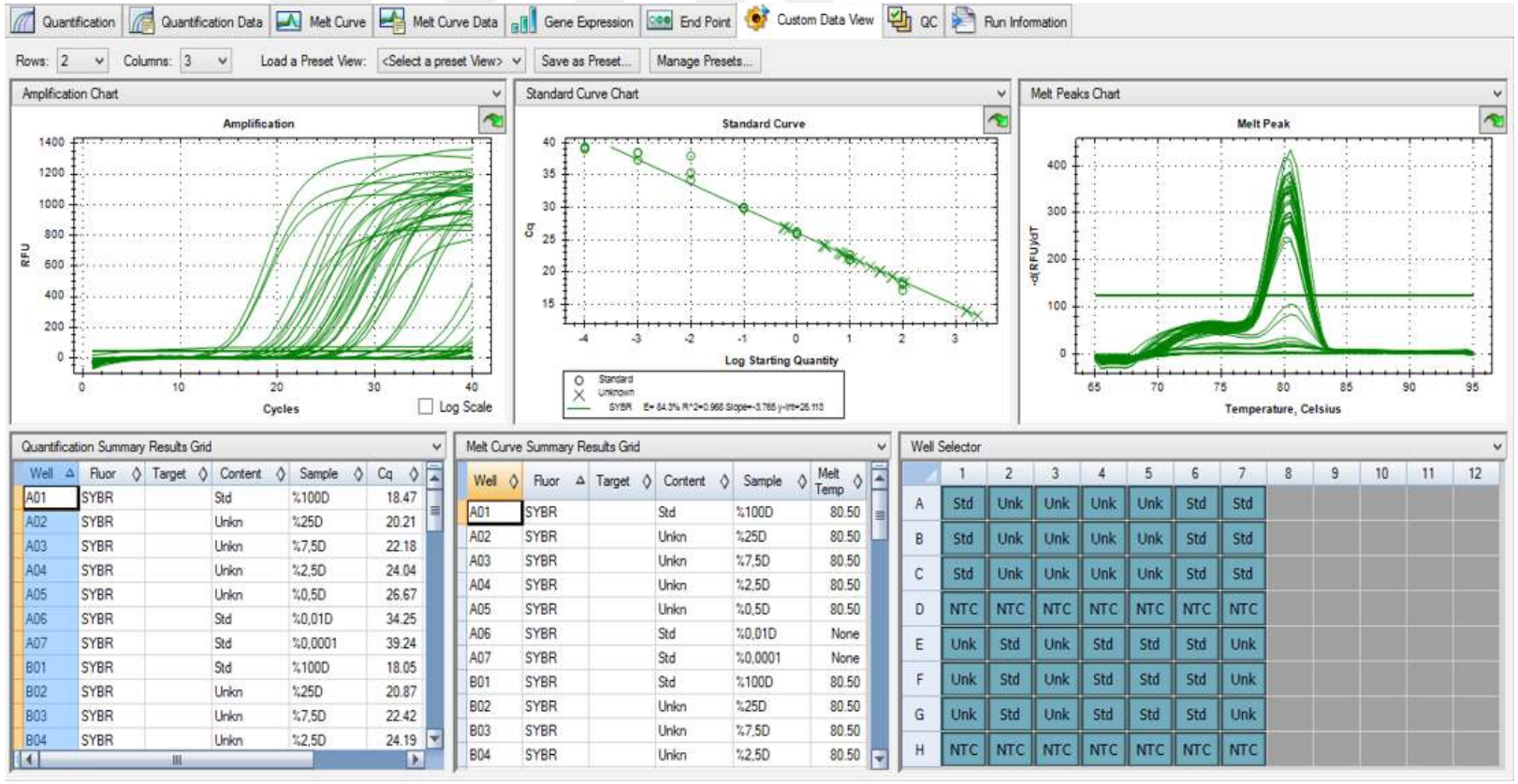
E=%86,9 R^2=0,974 Eğim=-3,683

EK 5 Çiğ Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2'ye ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Deneysel Grup-2 1.Tekrar					Deneysel Grup-2 2.Tekrar					Deneysel Grup-2 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	18.38	17.96	17.11	17.81	0.53	17.81	18.27	17.71	17.93	0.24	17.01	16.48	15.98	16.49	0.42
50 D	18.35	19.25	19.22	18.94	0.42	19.19	19.46	19.29	19.31	0.11	17.26	18.02	17.75	17.67	0.31
25 D	20.12	20.77	20.09	20.33	0.31	20.48	20.96	20.63	20.69	0.20	19.23	19.07	18.74	19.01	0.20
10 D	22.61	21.84	21.92	22.12	0.35	23.7	22.65	22.54	22.96	0.52	21.02	20.51	20.53	20.68	0.24
7,5 D	22.11	22.33	21.56	22	0.32	22.65	23.1	22.44	22.73	0.28	20.97	21.52	21.01	21.16	0.25
5 D	23.01	22.71	22.84	22.85	0.12	23.38	23.62	22.94	23.31	0.28	21.85	21.63	21.74	21.74	0.09
2,5 D	23.95	24.12	24.1	24.05	0.08	24.26	24.14	24.2	24.2	0.05	23.11	23.8	23.05	23.32	0.34
1 D	25.81	26.15	25.76	25.9	0.17	27.19	26.16	26.29	26.54	0.46	24.54	25.02	24.59	24.71	0.22
0,5 D	26.56	26.91	26.82	26.43	0.15	27.16	27.43	27.26	27.28	0.11	25.47	25.61	25.96	25.68	0.21
0,1 D	29.78	29.88	29.71	29.79	0.07	30.4	31	30.45	30.62	0.27	28.79	29.16	29.05	29	0.16
0,01 D	34.13	37.8	35.27	35.73	1.53	35.77	39.47	36.03	37.09	1.69	35.22	36.02	34.84	35.36	0.49
0,001 D	37.22	38.33	38.37	37.97	0.53	38.43	38.56	38.02	38.33	0.23	37.69	36.64	38.64	37.65	0.82
0,0001 D	39.17	38.87	39.23	39.09	0.16	38.69	N/A	N/A	38.69	18.24	N/A	N/A	N/A	N/A	0.00
100 S	13.17	13.97	13.92	13.69	0.37	14.1	14.69	14.6	14.46	0.26	13.29	13.9	14.26	13.81	0.40
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

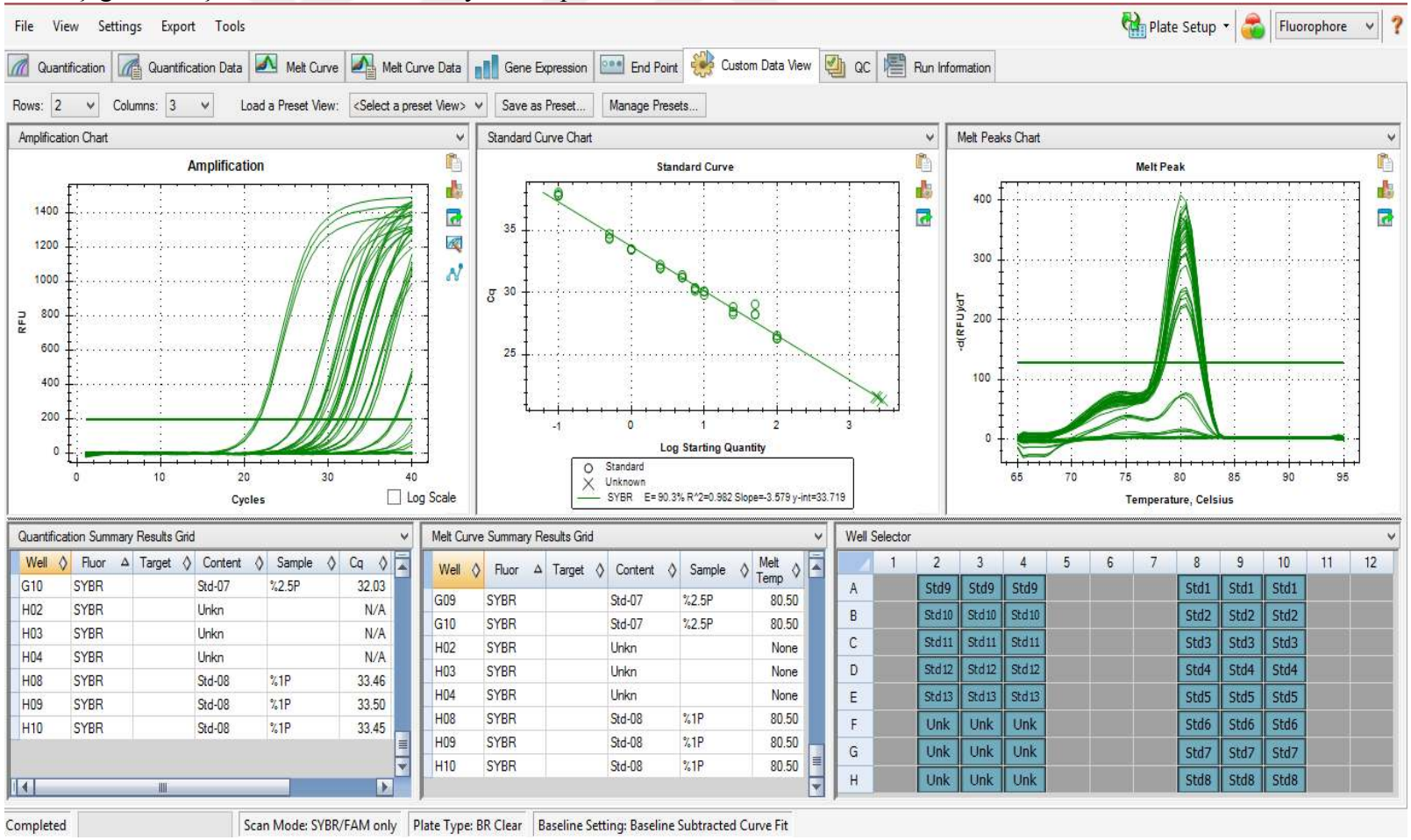
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 6 Çiğ Et Karışım Örneklerinde Deneysel Grup-2-1.Tekrar



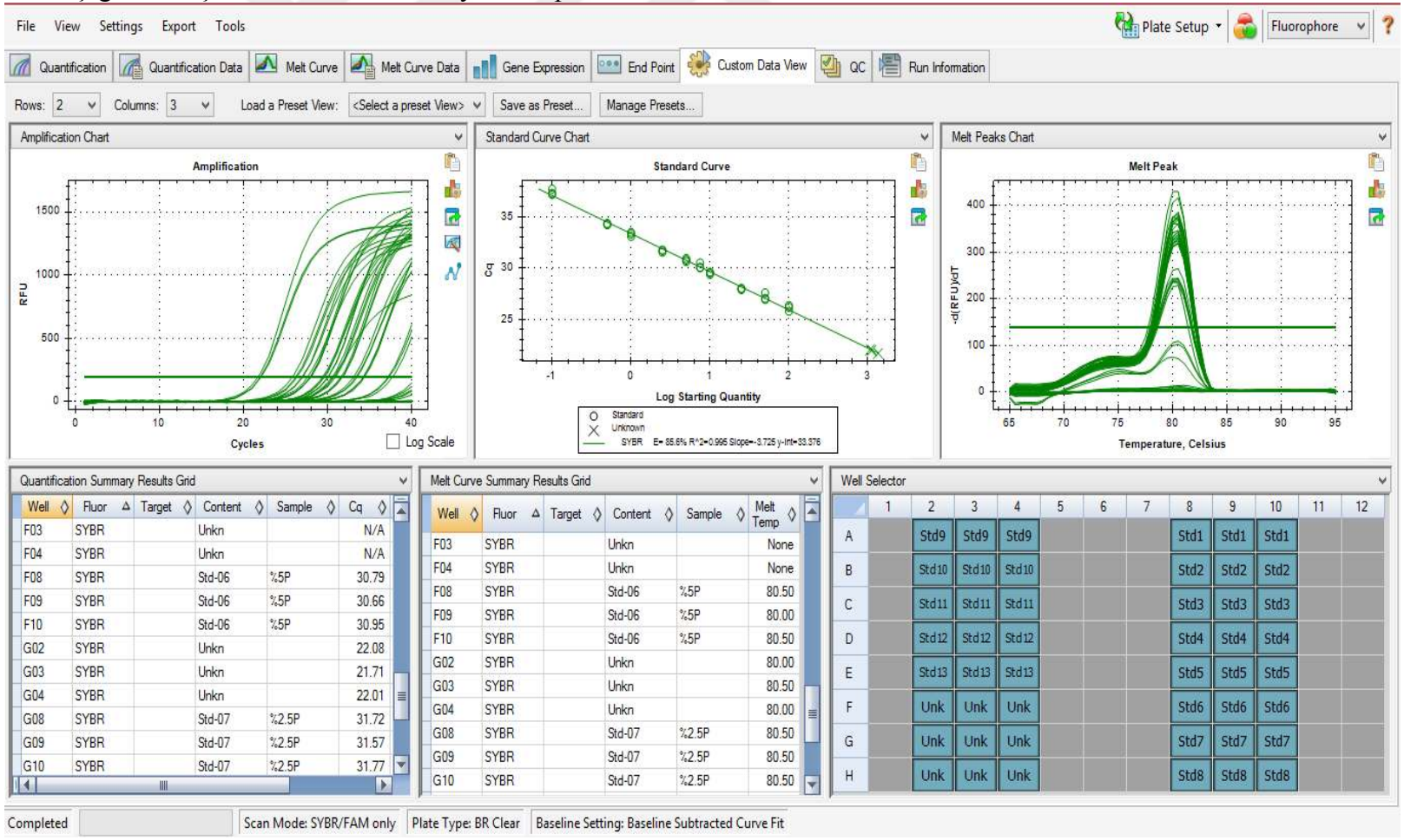
E=%84,3 R^2=0,968 Eğim=-3,765

EK 7 Çiğ Et Karışım Örneklerinde Deneysel Grup-2-2.Tekrar



E=%90,3 R^2=0,982 Eğim=-3,579

EK 8 Çiğ Et Karışım Örneklerinde Deneysel Grup-2-3.Tekrar



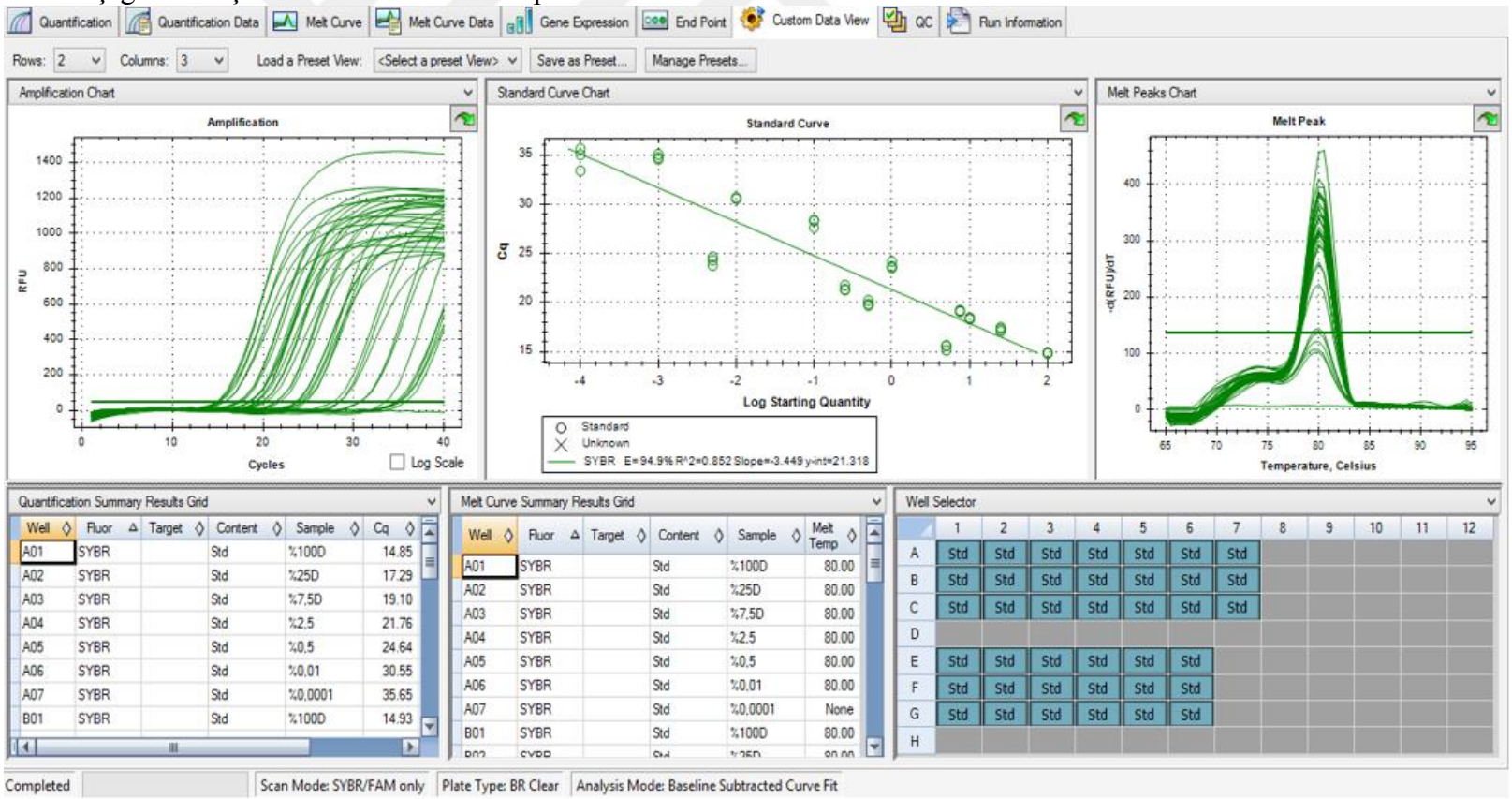
E=%58,6 R^2=0,995 Eğim=-3,725

EK 9 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Gruba ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Klinik Grup 1.Tekrar					Klinik Grup 2.Tekrar					Klinik Grup 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	14.70	14.70	14.70	14.70	0.00	16.56	16.72	16.11	16.46	0.26	17.54	16.97	16.8	17.10	0.32
50 D	15.04	15.45	15.40	15.30	0.18	16.55	16.49	16.55	16.53	0.03	16.75	17.19	17.15	17.03	0.20
25 D	17.16	17.30	16.90	17.12	0.17	18.91	19.16	18.72	18.93	0.18	19.21	19.41	18.9	19.17	0.21
10 D	18.19	18.32	18.30	18.26	0.06	19.86	19.52	19.85	19.74	0.16	20.46	20.23	20.15	20.28	0.13
7,5 D	19.00	19.09	19.00	19.04	0.04	20.21	20.73	20.07	20.34	0.28	20.47	21.09	20.90	20.82	0.26
5 D	19.50	20.10	19.70	19.77	0.25	21.02	21.71	21.53	21.42	0.29	21.45	22.29	21.92	21.89	0.34
2,5 D	21.62	21.16	21.20	21.34	0.21	22.38	22.68	22.52	22.53	0.12	22.93	22.77	22.96	22.89	0.08
1 D	23.57	24.08	23.40	23.68	0.29	24.21	24.92	24.86	24.66	0.32	24.81	0	25.27	25.04	11.81
0,5 D	24.52	24.21	23.60	24.12	0.38	25.72	25.89	25.43	25.68	0.19	25.52	25.87	25.67	25.69	0.14
0,1 D	27.45	28.22	28.30	27.98	0.38	29.08	29.86	29.52	29.49	0.32	29.90	30.14	30.04	30.03	0.10
0,01 D	30.38	0	30.50	30.45	14.35	32.67	33.19	32.95	32.94	0.21	34.77	34.82	34.06	34.55	0.35
0,001 D	34.56	34.42	35.00	34.65	0.25	35.86	37.30	35.73	36.30	0.71	36.78	37.11	36.07	36.65	0.43
0,0001 D	35.51	34.87	33.30	34.56	0.93	37.09	36.92	36.19	36.73	0.39	36.7	36.46	36.28	36.48	0.17
100 S	15.28	18.14	14.30	15.89	1.63	14.83	16.1	15.6	15.51	0.52	14.49	14.81	14.76	14.69	0.14
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

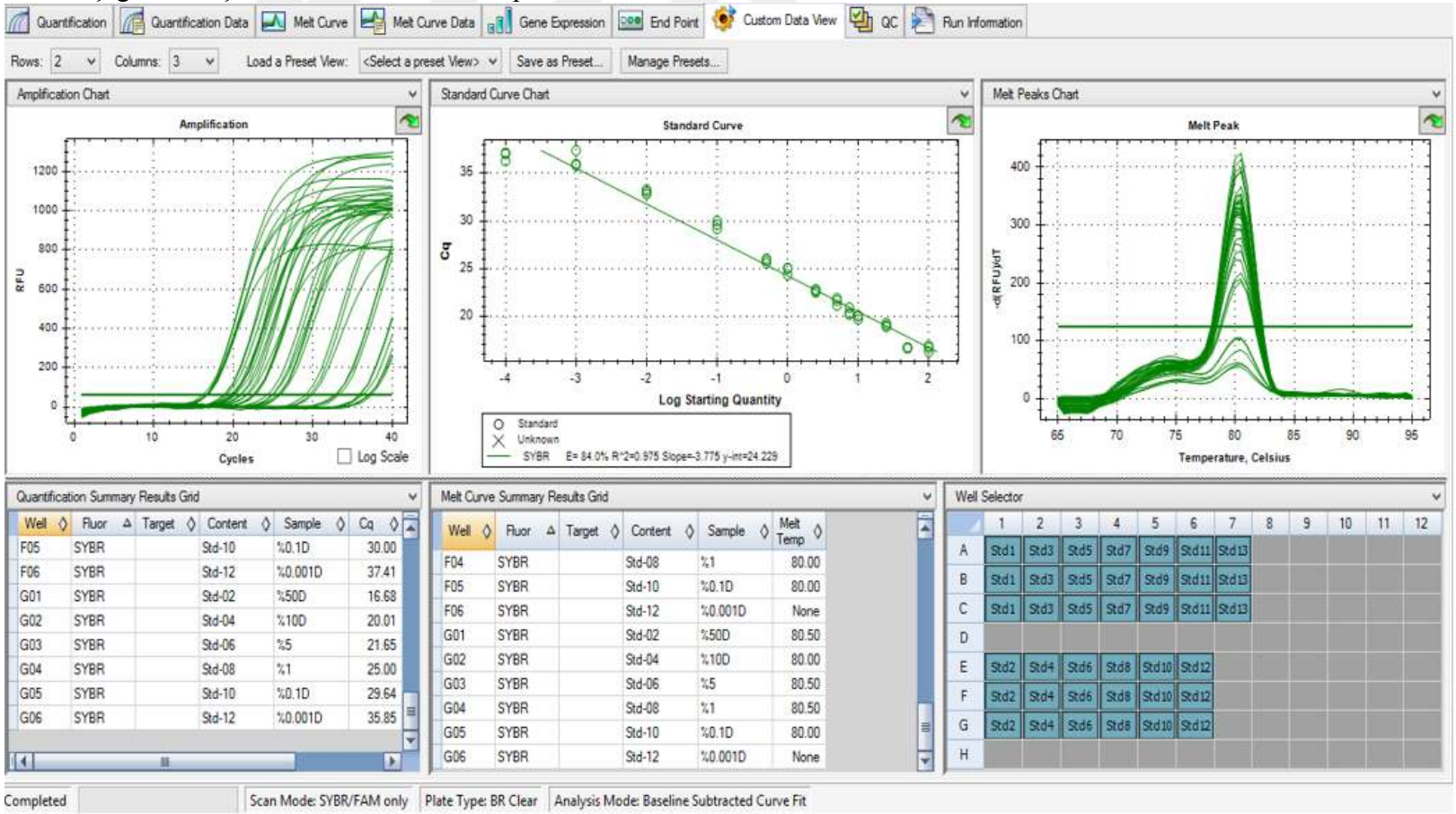
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 10 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Grup -1. Tekrar



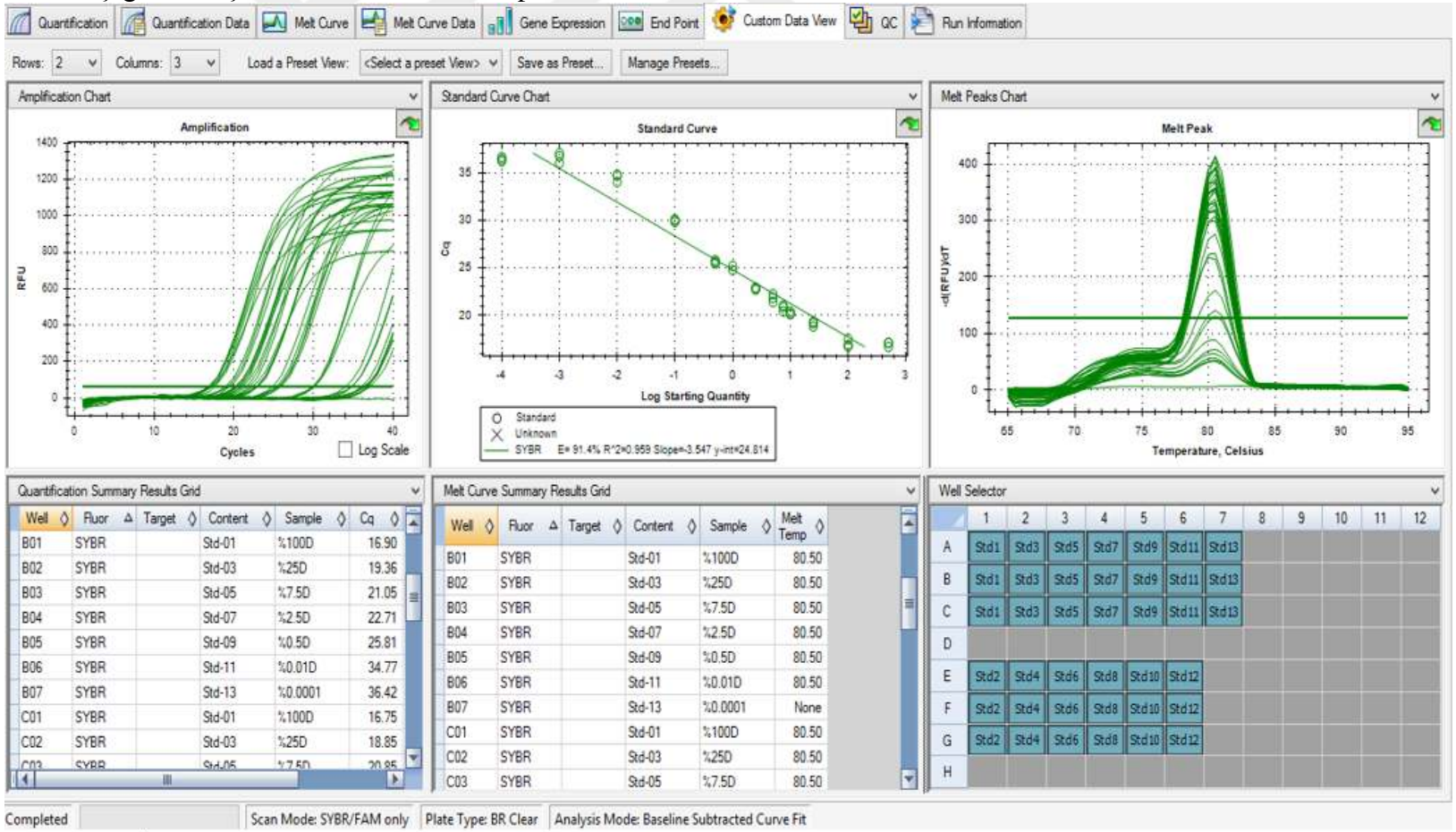
E=%94,9 R^2=0,852 Eğim=-3,449

EK 11 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Grup -2. Tekrar



E=%84,0 R^2=0,975 Eğim=-3,775

EK 12 Çiğ Et Karışım Örnekleri Klinik Grup -3. Tekrar



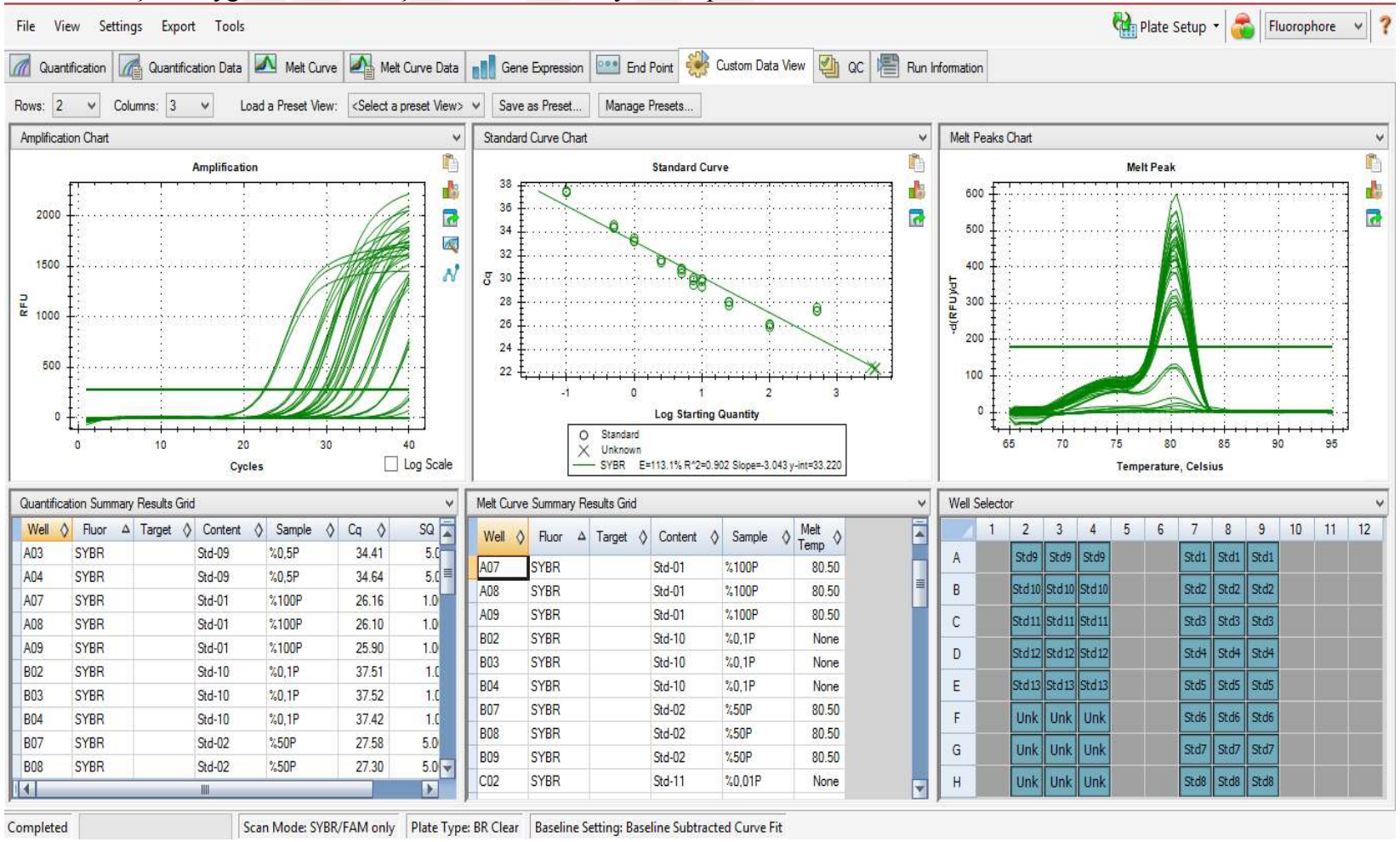
E=%91,4 R^2=0,959 Eğim=-3,547

EK 13 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1'e ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Deneysel Grup-1 1.Tekrar					Deneysel Grup-1 2.Tekrar					Deneysel Grup-1 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	26.16	26.13	25.93	26.07	0.10	26.47	26.51	26.73	26.57	0.11	26.21	25.82	26.36	26.13	0.23
50 D	27.58	27.32	27.28	27.39	0.13	28.43	29.23	28.44	28.70	0.37	26.98	27.06	27.61	27.22	0.28
25 D	27.75	28.07	28.04	27.95	0.14	29.03	28.42	28.63	28.69	0.25	28.05	27.93	28.01	28.00	0.05
10 D	29.36	29.82	30.01	29.73	0.27	30.22	30.27	30.01	30.17	0.11	29.56	29.42	29.64	29.54	0.09
7,5 D	29.51	29.89	30.12	29.84	0.25	30.56	30.29	30.45	30.43	0.11	30.07	30.09	30.54	30.23	0.22
5 D	30.51	30.78	30.92	30.74	0.17	31.60	31.37	31.37	31.45	0.11	30.81	30.68	30.97	30.82	0.12
2,5 D	31.43	31.63	31.63	31.56	0.09	32.09	32.40	32.16	32.22	0.13	31.74	31.59	31.79	31.71	0.08
1 D	33.22	33.27	33.52	33.34	0.13	33.63	33.66	33.60	33.63	0.02	33.51	33.37	33.12	33.33	0.16
0,5 D	34.44	34.41	34.64	34.50	0.10	34.56	34.47	34.89	34.64	0.18	34.28	34.4	34.27	34.32	0.06
0,1 D	37.51	37.52	37.42	37.48	0.04	38.19	38.04	37.97	38.07	0.09	37.75	37.34	37.22	37.44	0.23
0,01 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	22.37	22.55	22.40	22.44	0.08	21.86	21.54	21.77	21.72	0.13	22.10	21.73	22.02	21.95	0.16
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

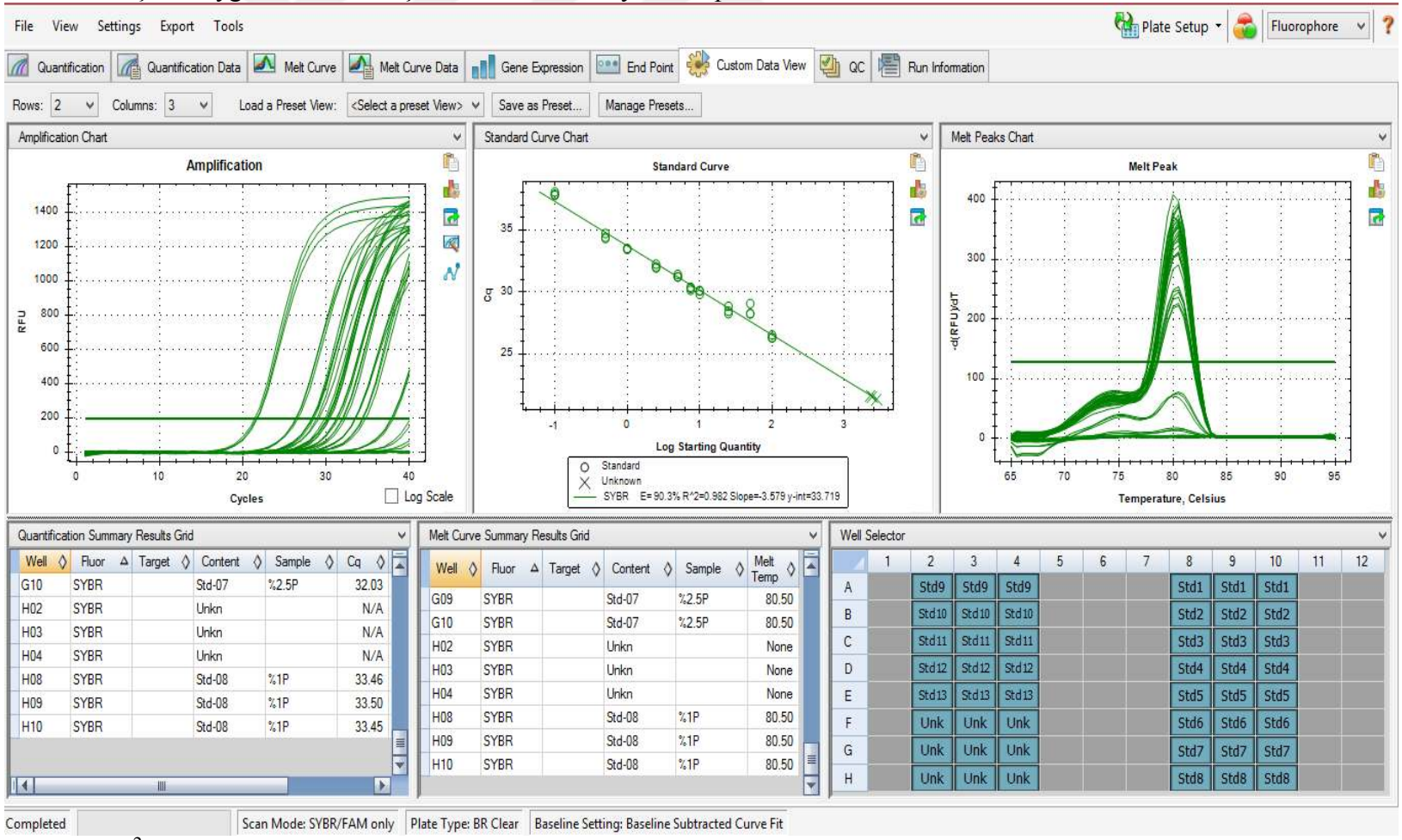
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 14 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1-1.Tekrar



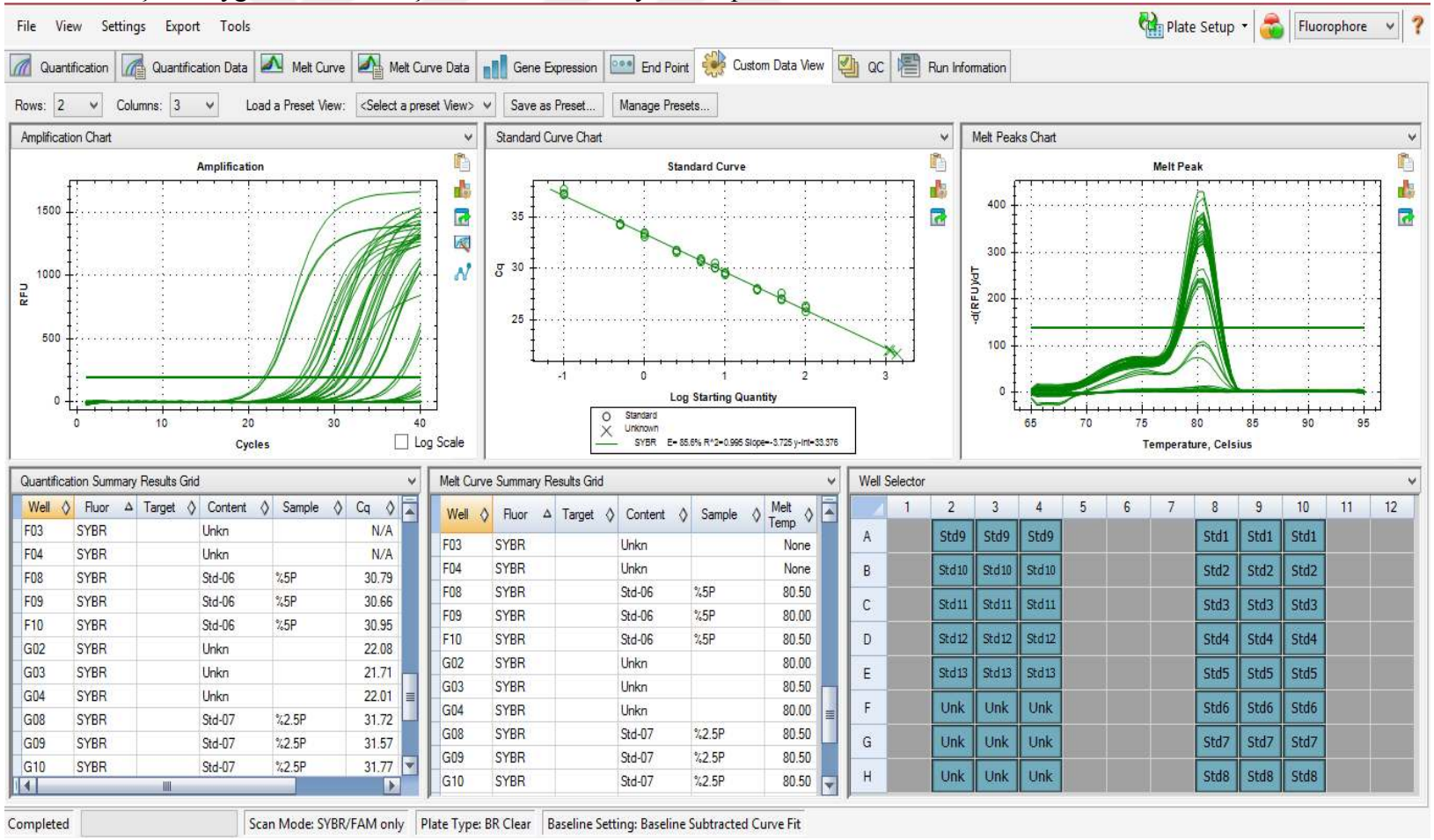
E=%113,1 R^2=0,902 Eğim=-3,043

EK 15 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1-2.Tekrar



E=%90,3 R^2=0,982 Eğim=-3,579

EK 16 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-1-3.Tekrar



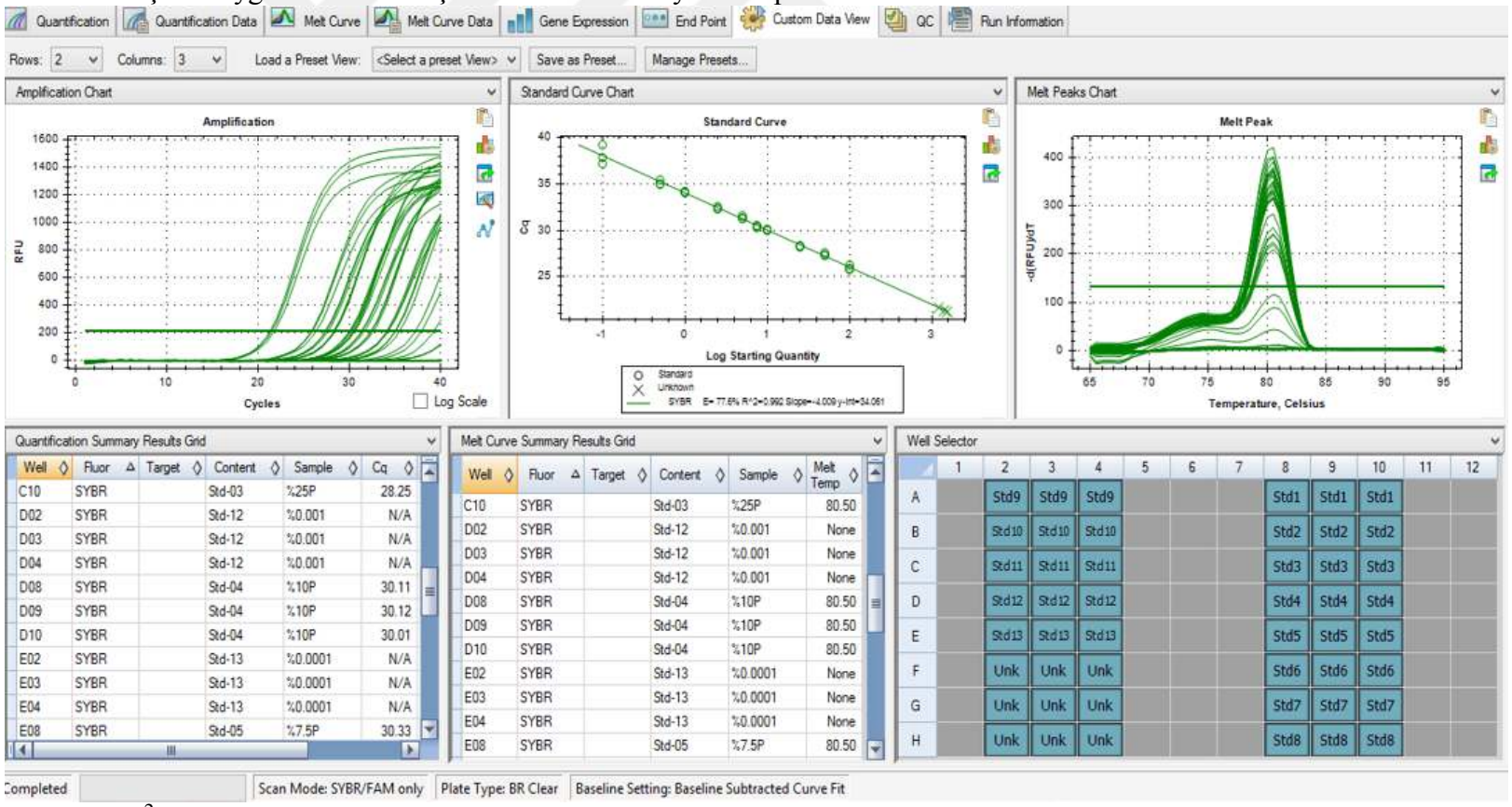
E=%85,6 R^2=0,995 Eğim=-3,725

EK 17 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2'ye ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Deneysel Grup-2 1.Tekrar					Deneysel Grup-2 2.Tekrar					Deneysel Grup-2 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	25.93	25.79	26.30	25.86	0.22	25.15	25.03	25.18	25.12	0.06	25.33	25.33	25.4	25.35	0.03
50 D	27.38	27.61	27.32	27.50	0.12	26.40	26.57	26.54	26.5	0.07	26.69	26.89	26.84	26.81	0.08
25 D	28.3	28.37	28.25	28.34	0.05	27.34	27.29	27.47	27.37	0.08	27.70	27.67	28.00	27.79	0.15
10 D	30.12	30.13	30.02	30.13	0.05	28.94	29.06	29.06	29.02	0.06	29.75	29.73	29.79	29.76	0.02
7,5 D	30.34	30.44	30.56	30.39	0.09	29.31	29.35	29.40	29.35	0.04	31.18	31.06	31.28	31.17	0.09
5 D	31.6	31.29	31.35	31.45	0.13	30.19	30.39	30.44	30.34	0.11	32.01	32.02	32.20	32.08	0.09
2,5 D	32.37	32.59	32.34	32.48	0.11	31.31	31.28	31.19	31.26	0.05	33.91	34.07	33.69	33.89	0.16
1 D	34.19	34.21	34.09	34.20	0.05	32.82	33.18	33.11	33.04	0.16	34.54	34.35	34.12	34.34	0.17
0,5 D	35.45	35.02	35.03	35.17	0.20	33.87	34.16	34.24	34.09	0.16	37.46	38.43	37.56	37.82	0.44
0,1 D	37.21	37.88	39.24	38.11	0.84	36.97	37.04	37.67	37.23	0.31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,01 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	39.84	N/A	N/A	39.84	0.00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	21.70	21.28	21.42	21.47	0.17	22.45	22.20	22.34	22.33	0.10	22.68	22.82	22.23	22.58	0.25
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

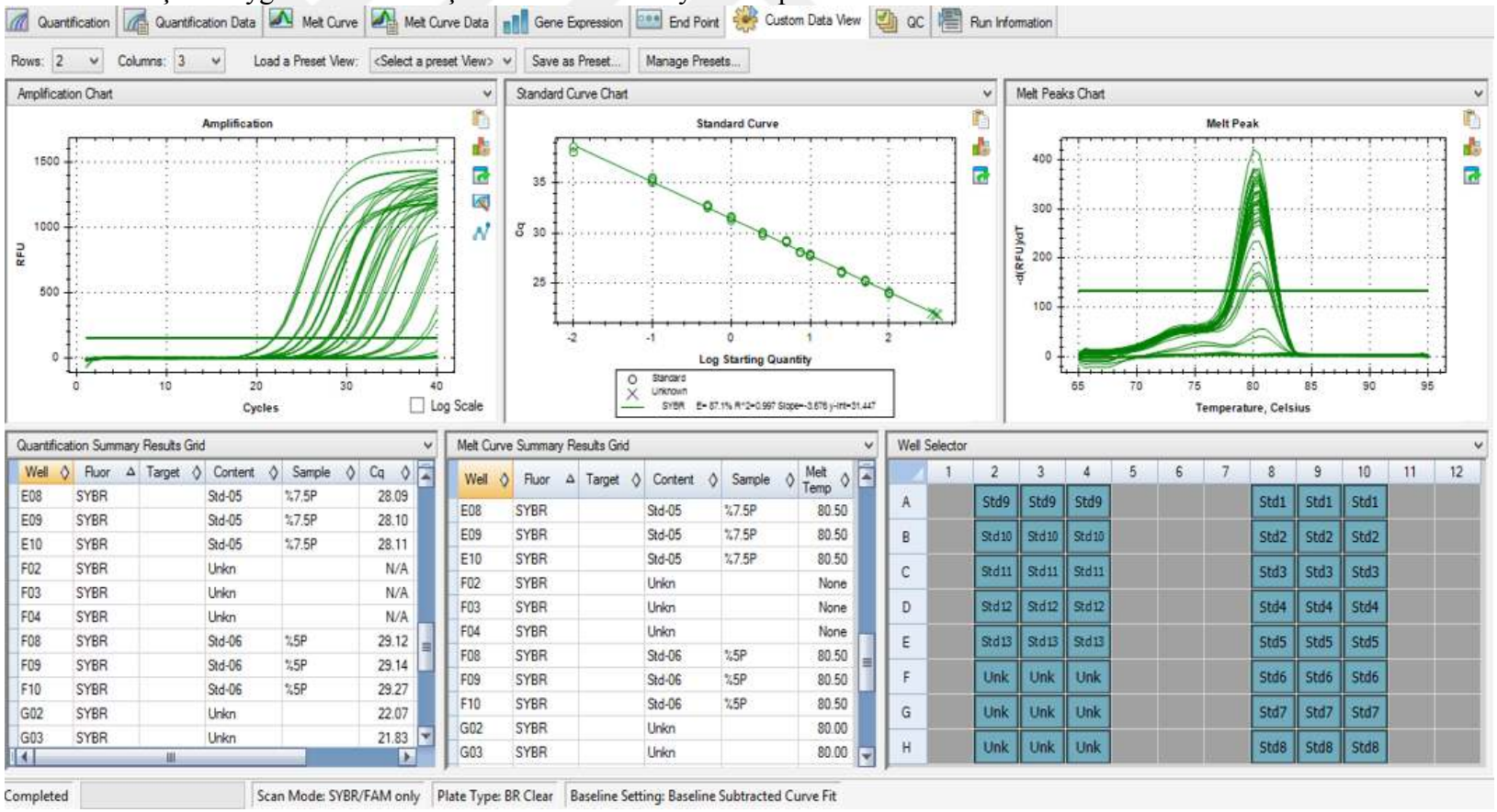
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 18 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2-1.Tekrar



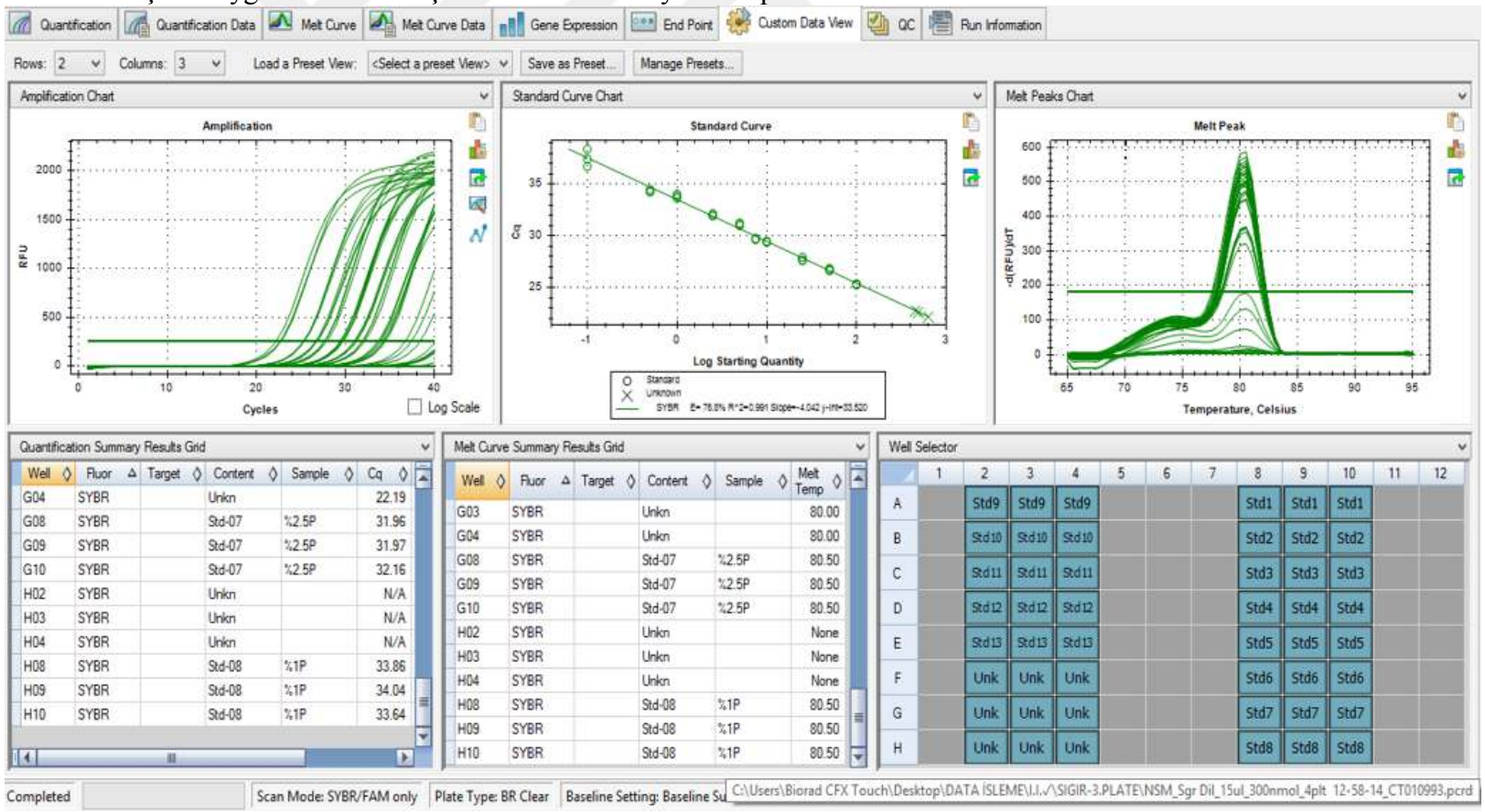
E=%77,6 R^2=0,992 Eğim=-4,009

EK 19 . Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2-2.Tekrar



E=%87,1 R^2=0,997 Eğim=-3,676

EK 20 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Deneysel Grup-2-3.Tekrar



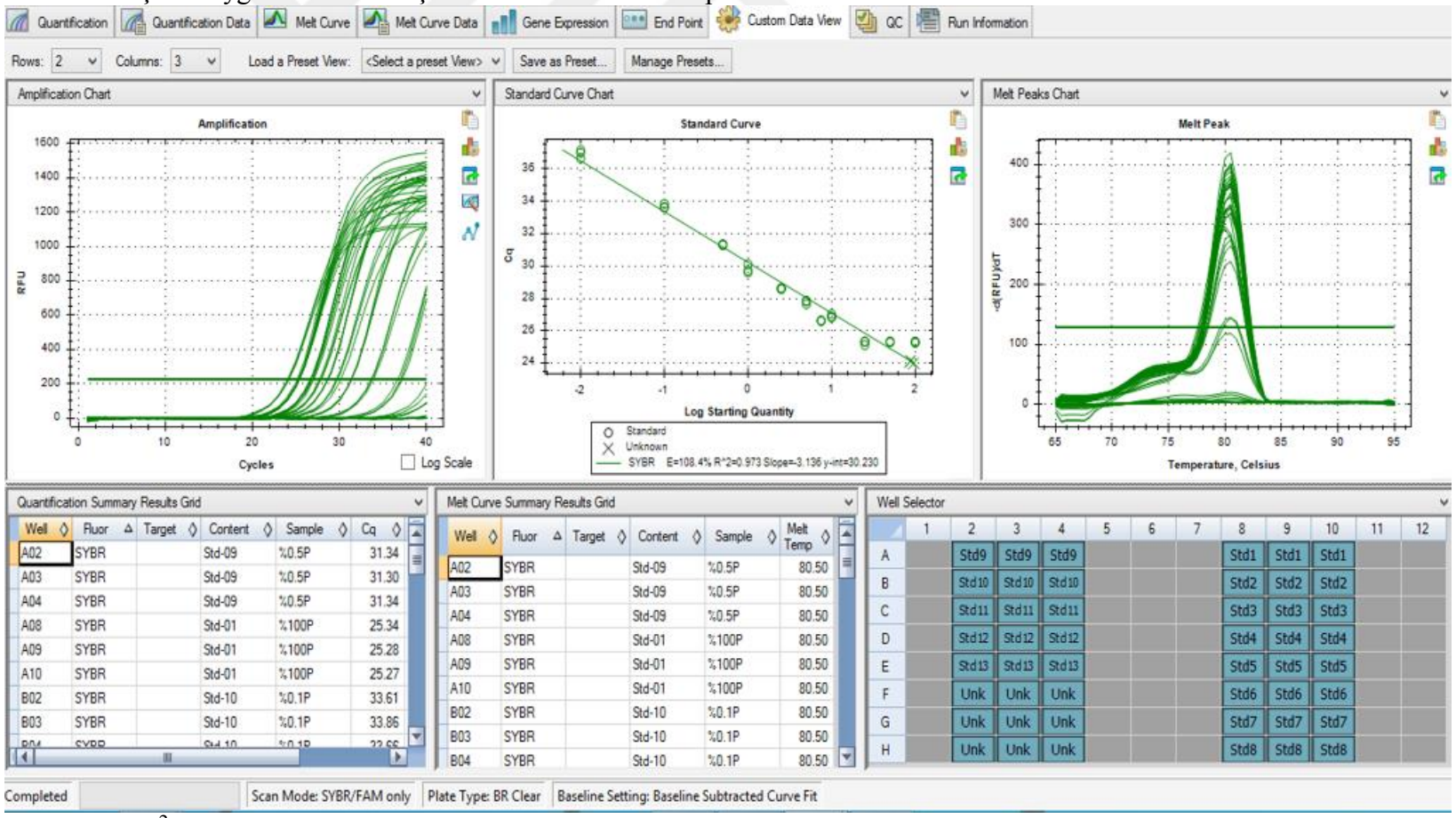
E=%76,8 R^2=0,991 Eğim=-4,042

EK 21 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Klinik Gruba ait SG-qPCR Analizi Cq ve SS değerleri

	Klinik Grup 1.Tekrar					Klinik Grup 2.Tekrar					Klinik Grup 3.Tekrar				
% Karışım Oranları	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS	1.P. Ct Değeri	2.P. Ct Değeri	3.P. Ct Değeri	Tüm P. Ct Ort.	Tüm P. SS
100 D	25.93	25.79	26.30	25.86	0.22	25.15	25.03	25.18	25.12	0.06	25.33	25.33	25.4	25.35	0.03
50 D	27.38	27.61	27.32	27.50	0.12	26.40	26.57	26.54	26.5	0.07	26.69	26.89	26.84	26.81	0.08
25 D	28.30	28.37	28.25	28.34	0.05	27.34	27.29	27.47	27.37	0.08	27.7	27.67	28.00	27.79	0.15
10 D	30.12	30.13	30.02	30.13	0.05	28.94	29.06	29.06	29.02	0.06	29.75	29.73	29.79	29.76	0.02
7,5 D	30.34	30.44	30.56	30.39	0.09	29.31	29.35	29.40	29.35	0.04	31.18	31.06	31.28	31.17	0.09
5 D	31.60	31.29	31.35	31.45	0.13	30.19	30.39	30.44	30.34	0.11	32.01	32.02	32.2	32.08	0.09
2,5 D	32.37	32.59	32.34	32.48	0.11	31.31	31.28	31.19	31.26	0.05	33.91	34.07	33.69	33.89	0.16
1 D	34.19	34.21	34.09	34.20	0.05	32.82	33.18	33.11	33.04	0.16	34.54	34.35	34.12	34.34	0.17
0,5 D	35.45	35.02	35.03	35.17	0.20	33.87	34.16	34.24	34.09	0.16	37.46	38.43	37.56	37.82	0.44
0,1 D	37.21	37.88	39.24	38.11	0.84	36.97	37.04	37.67	37.23	0.31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,01 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	39.84	N/A	N/A	39.84	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,0001 D	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
100 S	21.70	21.28	21.42	21.47	0.17	22.45	22.2	22.34	22.33	0.10	22.68	22.82	22.23	22.58	0.25
Ç.K.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ç.K.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

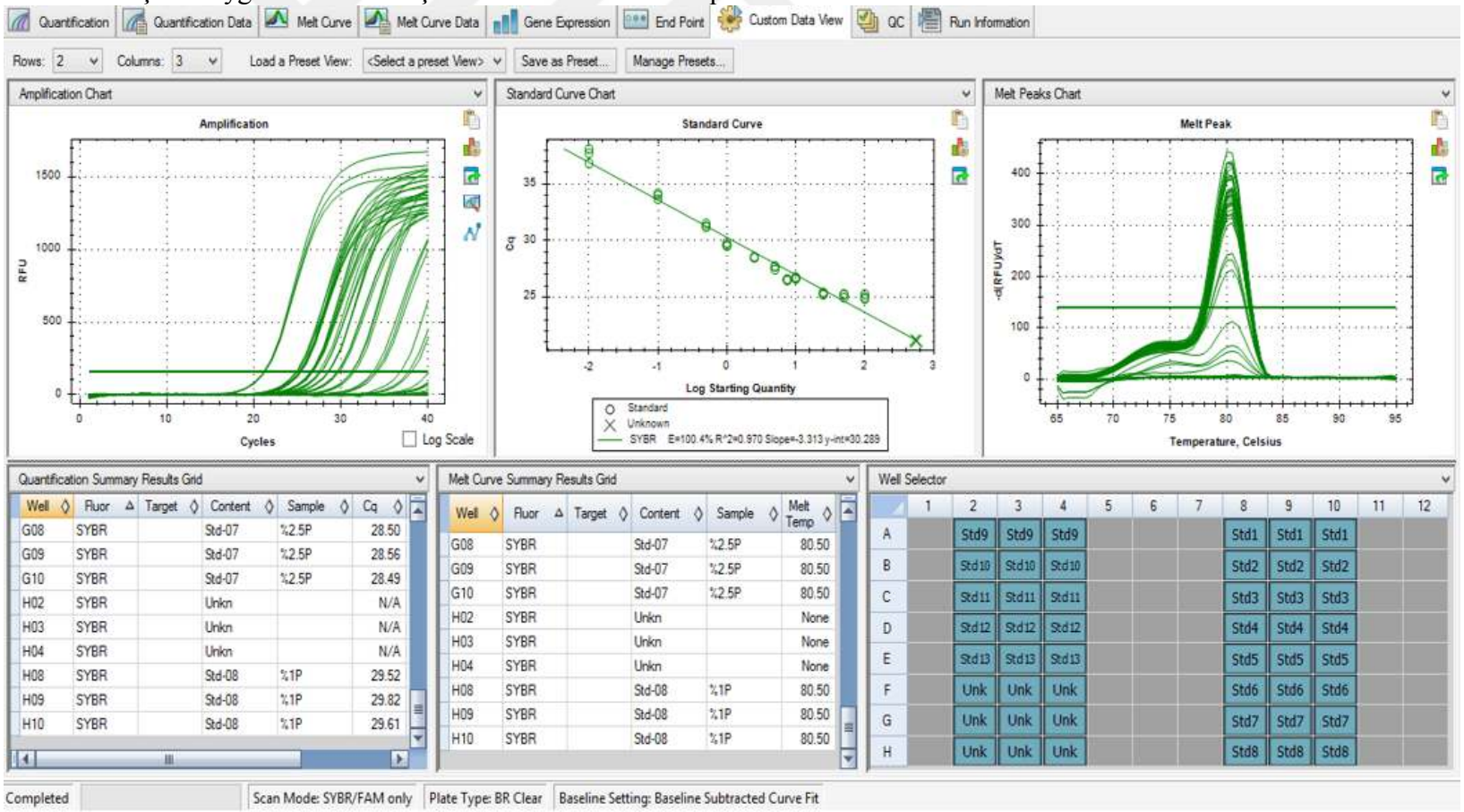
P.:Paralel, Ort.:Ortalama, Cq: Quantification Cycle, SS: Standart Sapma, Ç.K.1: DPS-Sığır DNA, Ç.K.2: SPS-Domuz DNA, NTC: None Template Control (Şablon DNA yok), N/A: Çoğalma yok

EK 22 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Klinik Grup-1.Tekrar



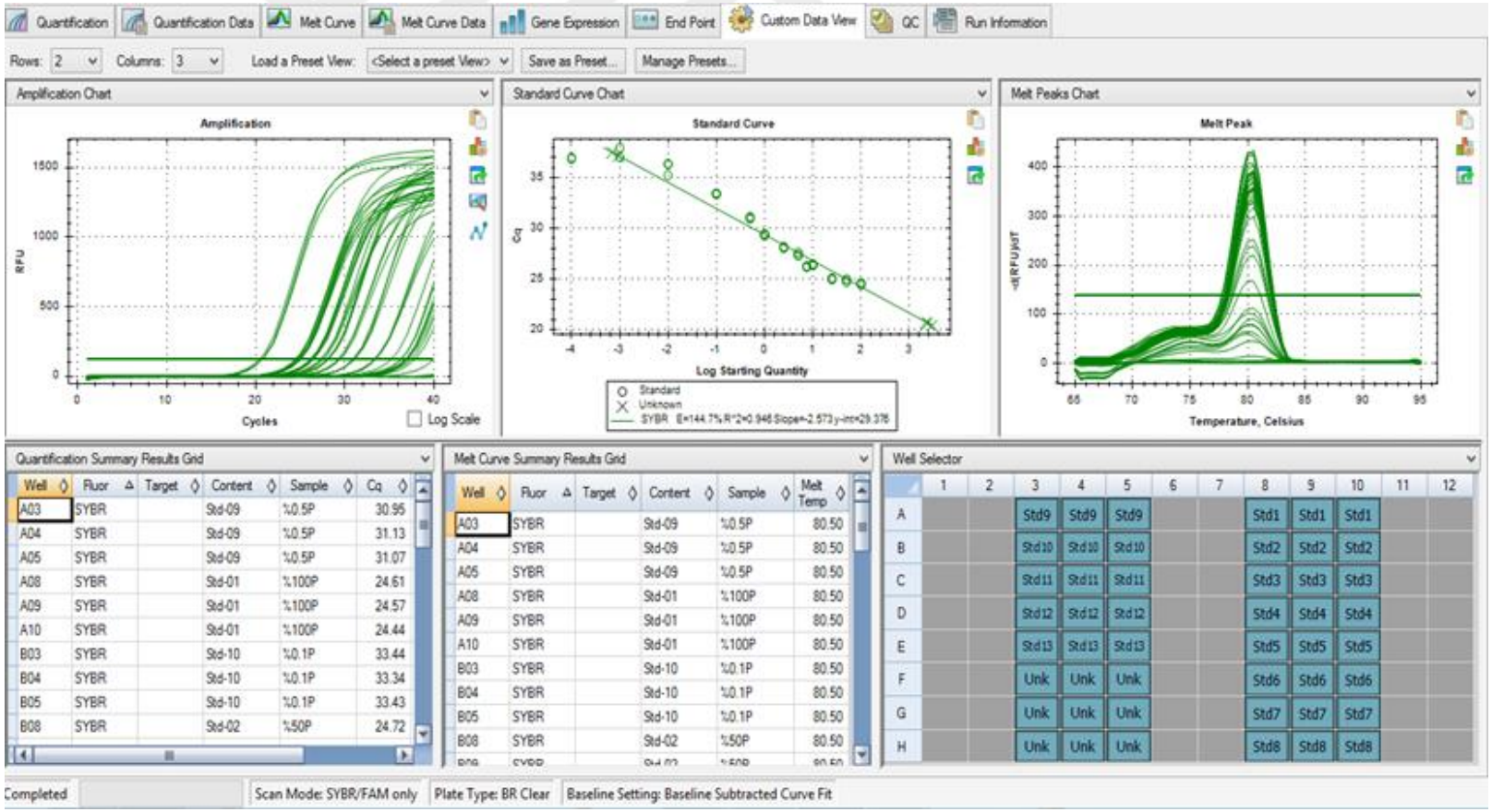
E=%108.4 R^2=0,973 Eğim=-3,136

EK 23 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Klinik Grup -2.Tekrar



E=%100.4 R^2=0,970 Eğim=-3,313

EK 24 Isıl İşlem Uygulanan Et Karışım Örnekleri Klinik Grup-3.Tekrar



E=%144.7 R^2=0,946 Eğim=-2,573

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi :

Doğum Yeri :

Eğitim :

E-posta Adresi :

9. ORJİNALLİK RAPORU

11b- İntihal beyan formu

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ÖĞRENCİ ve TEZ DANIŞMANI İNTİHAL BEYAN FORMU

Anabilim Dalı	Gıda Mühendisliği AD		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Nursel SÖYLEMEZ MİLLİ		
Numarası	37414369478		
Lisansüstü Programı	Tezli Yüksek Lisans ☐	Doktora ☑	
Tez Sınavına Girdiği Eğitim Yılı ve Dönemi	2020 / 2021	☑ Güz	☐ Bahar
Tez Sınavına Girdiği Tarih	08.02.2021		
Tezin Sayfa Sayısı	158		
Tez Başlığı (Tr)	MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK FARKLI İŞLEM GÖRMÜŞ ETLERDE TÜR TAYİNİ VE İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU		
Tez Başlığı (En)	IDENTIFICATION OF SPECIES AND OPTIMIZATION BY USING MOLECULAR METHODS IN VARIOUS TREATED MEAT		

Teze ilişkin 01 / 03 / 2021 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 6 olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimizi ve yukarıda vermiş olduğumuz bilgilerin doğru olduğunu beyan ederiz.

Nursel SÖYLEMEZ MİLLİ	Prof. Dr. Ömer EREN
Öğrenci (Adı, Soyadı, tarih ve İmza)	Tez Danışmanı Onayı (Adı, soyadı, tarih ve İmza)

Açıklamalar:
1-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrencinin tez çalışması muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak ikinci kez benzerlik raporu alınır. "Öğrenci ve Tez Danışmanı İntihal Beyan Formu"na işlenir.
*2- Bu form öğrenci tarafından **elektronik ortamda** hazırlandıktan ve tez sınavından sonra "tez teslim formu (tez sınavı sonrası)" ile birlikte öğrenci dosyasında saklanmak üzere tez danışmanı tarafından EADB aracılığı ile Enstitüye teslim edilmelidir.*