



## VAKA RAPORU

### DNA teknolojisi ile rendering ürünlerinde tür tespiti: Bir vaka raporu

Ercan Kurar<sup>1,3\*</sup>, Yusuf Özsensoy<sup>1</sup>, Müge Doğan Bülbül<sup>2</sup>, Mehmet Nizamlioğlu<sup>2</sup>

#### Özet

**Kurar E, Özsensoy Y, Bülbül MD, Nizamlioğlu M.** DNA teknolojisi ile rendering ürünlerinde tür tespiti: Bir vaka raporu. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 2, 122-125

Deli Dana Hastalığı (BSE) sonrası özellikle ruminant kökenli rendering ürünlerinin hayvan rasyonlarında kullanılması kontrol altına alınmıştır. Gümrük Beyan Belgesinde "hidrolize tüy unu" olarak bildirilen yem materyalinden alınan örnek, T.C. Gümrük Müsteşarlığı Mersin Gümrük Müdürlüğü tarafından gönderilerek hayvansal kökeninin belirlenmesi istenmiştir. İlgili örneğin mikroskopik incelenmesinde kanat ve tüy parçalarının varlığı saptanmıştır. Alternatif olarak, örneklerden standart fenol/kloroform ve dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) yöntemleri ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri kanatlı, ruminant, domuz, at ve karnivor spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiştir. PZR reaksiyonlarında tavuk, keçi, at, kedi DNA'ları pozitif kontrol, her bir lokus sisteminde DNA negatif PZR reaksiyonları negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm PZR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmış ve görüntülenmiştir. İki farklı kanatlı spesifik markör sistemi kullanılarak yapılan PZR analizleri sonucunda, yem örneğinde kanatlı DNA'sının varlığı tespit edilmiştir. Ancak, ruminant, domuz, at ve karnivor DNA varlığı tespit edilememiştir. Bu çalışma, moleküler biyoloji yöntemlerinin yüksek ısılarda muamele edilerek hazırlanan rendering ürünlerinin kökeninin saptanmasında başarıyla kullanılabilceğini göstermektedir.

#### Abstract

**Kurar E, Ozsensoy Y, Bulbul MD, Nizamlioglu M.** Identification of animal species in rendering products by DNA technology: A case report. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 2, 122-125

After bovine spongiform encephalopathy (BSE) outbreak, the use of especially ruminant byproducts in animal rations is under strict control. An animal feedstuff sample was sent from the Turkish Republic, Mersin Customs Directorate in order to identify the animal source. The feedstuff was declared as "hydrolyzed feather meal" in the custom declaration and health certificates. In microscopic inspections, pieces of feathers and hollow shafts were observed. As an alternative method, DNA was extracted by using standard phenol/chloroform and dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) methods. The DNA samples were amplified by Polymerase Chain Reactions (PCR) using poultry, ruminant, swine, horse and carnivore specific oligos. In PCR reactions, chicken, goat, horse and cat DNAs were used as positive controls. DNA free PCR reactions were also amplified as negative control in each system. The resulting PCR products were separated and visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel. The findings suggested presence of poultry DNA in the feedstuff sample since two different poultry specific PCR primer pairs resulted in positive PCR products. However, no PCR products were observed in ruminant, swine, horse and carnivore PCR reactions. The results of this study thereby indicated that molecular biology techniques could successfully be used to identify source of heat proceeded animal byproducts.

<sup>1</sup>Genetik Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Biyokimya Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, <sup>3</sup>İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK), Selçuk Üniversitesi, 42075, Konya, Türkiye

Geliş:08.03.2012, Kabul:10.04.2012

\*ekurar@selcuk.edu.tr

Anahtar kelimeler: DNA teknolojisi, rendering, tür tayini

Keywords: DNA technology, rendering, species identification

Hayvansal kökenli yem maddeleri esansiyel amino asitler bakımından zengin olması nedeniyle hayvan beslemede kullanılmaktadır. Yüksek ısı ve basınç altında üretilen hidrolize tüy unu (feather meal) yüksek ham proteine (%80) sahiptir. Yapısında bulunan keratin ve disülfid bağları nedeniyle sindirilebilirliği düşük olarak kabul edilmekte ve kanatlı beslenmesinde fazla tercih edilmemektedir (Coşkun ve ark 1997). Ancak, organik tarımda nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır.

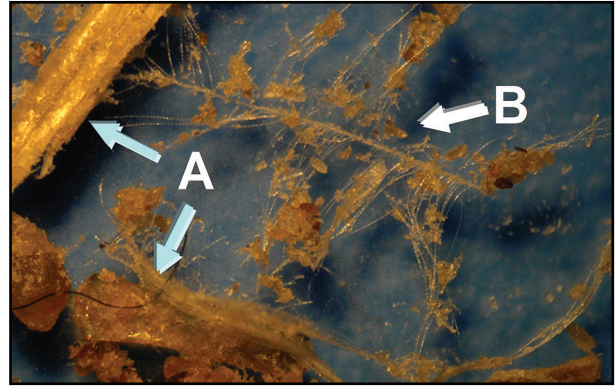
Hayvansal ürünlerin kökenlerinin belirlenmesi, ürünün ekonomik değeri, inanç, etik ve sağlık nedenlerinden dolayı önemlidir. Özellikle, Deli Dana Hastalığının (BSE) 20. yüzyılın sonlarında yaygın olarak görülmesi nedeniyle, Avrupa Birliği (AB) Komisyonu tarafından rendering ürünlerinin hazırlanması, hayvan rasyonlarında kullanılması ve kontrol edilmesi yönünde kararlar alınmıştır (96/449/EC, 2000/766/EC, 2001/999/EC, 2002/1774/EC, 2003/1234EC).

Et ürünlerinin tür tayininde farklı elektroforetik ve immuno-kimyasal yöntemler (ELISA, SDS-PAGE) kullanılmaktadır. Ancak özellikle rendering ürünleri gibi yüksek ısı işlemine maruz kalmış ürünlerde peptid ve epitop yapılarının olumsuz yönde etkilenmesinden dolayı bu yöntemler yeterince hassas değildir (Lahiff ve ark 2001, Tajima ve ark 2002). Bu nedenle, et ürünlerinin tür tayininde daha stabil yapıda olan DNA temelli yöntemler tercih edilmeye başlanmıştır (Tajima ve ark 2002, Dalmaso ve ark 2004). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) teknolojisi ile farklı markör sistemleri (RFLP, RAPD, mtDNA, rRNA, minisatellit, mikrosatellit) kullanılarak daha hassas, hızlı ve ekonomik olarak DNA düzeyinde tür tayini mümkün olmaktadır. Bu amaçla ruminat, kanatlı, balık, domuz, at, karnivor, fare ve rat türleri için markör sistemleri geliştirilmiştir (Lahiff ve ark 2001, Tajima ve ark 2002, Krcmar ve Rencova 2003, Myers ve ark 2003, Dalmaso ve ark 2004, Toyoda ve ark 2004, İlhak ve Arslan 2007, Martin ve ark 2007).

Bu çalışmada, T.C. Gümrük Müsteşarlığı Mersin Gümrük Müdürlüğü tarafından gönderilen ve Gümrük Beyan Belgesinde "hidrolize tüy unu" olarak bildirilen yem örneğinde tür tespitinin yapılması amaçlanmıştır.

Rendering ürününün (yem) Nikon SZM-2T (Tokyo, Japonya) steromikroskop'a adapte edilmiş Nikon H-III (Tokyo, Japonya) görüntüleme sistemi kullanarak yapılan incelemelerde kanat ve tüy parçacıkları gözlenmiştir (Şekil 1).

Rendering ürününden, iki farklı yöntem kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Standart fenol/kloroform yönteminde (Yem örneği-I), 50 mg yem örneğine 100 µL TE pH 8.0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA) eklendikten sonra Sambrook ve ark (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) yönteminde (Yem örneği-II), 50 mg yem örneği üzerine 800 µL Nükleer Lysis Buffer (12 g



Şekil 1. Yem örneğinin mikroskopik muayenesi. A; kanat ve B; tüy parçacıkları.

DTAB, 45 mL 5 M NaCl, 15 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5, 15 mL 0.5 M EDTA pH 8.0, distile su ile 100 mL tamamlanır) eklenip 55 °C'de bir gece bekletilmiştir. Örnek üzerine 800 µL kloroform eklenerek 10°C'de 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni tüpe aktarılıp %95 etanol ile çöktürülmüştür. %70 etanol ile iki kez yıkanan pellet kurutulup 200 µL TE ile sulandırılmıştır. DNA örneklerinin 260/280 nm UV ile kalitesi kontrol edilmiştir. Fenol/kloroform ve DTAB yöntemi kullanılarak izolasyonu yapılan DNA örneklerinin 260/280 nm UV analizlerinde düşük kalitede olduğu ancak PZR için kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri kanatlı, ruminant, domuz, at ve karnivor spesifik primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiştir. PZR protokolü 1x Mg<sup>++</sup> free PCR buffer (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 200 µM dNTP (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 1.5 mM MgCl<sup>++</sup>, 0.375 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 5 pM her bir primer çifti (Tablo 1) ve ~50 ng template DNA toplam 15 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Touchdown PZR profili BioRad MyCycler (Hercules, A.B.D.) ısısal döngü cihazı kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. 95°C'de 4 dakika ile tam bir denatürasyon sonrası ilk aşamada 16 döngü için 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0.5 °C düşürülen ve 30 saniye süren annealing ve 72 °C'de 30 saniye elongation sağlanmıştır. İkinci aşamada 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52 °C'de 30 saniye annealing ve 72 °C'de 30 saniye elongation olacak şekilde 25 döngü kullanılmıştır. Son olarak örnekler adenizasyon için 72 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Tüm PZR ürünleri %2 agaroz gel elektroforezinde ayrıştırılmış, Ethidium Bromide (EtBr) ile boyanarak 365 nm UV'de görüntülenmiştir.

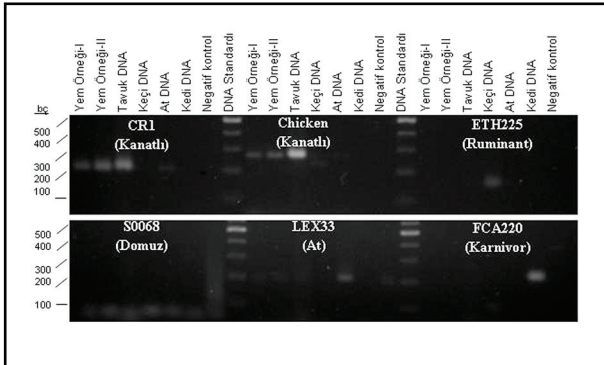
İki farklı kanatlı spesifik markör sistemi (CR1 ve Chicken) kullanılarak yapılan PZR analizleri sonucunda fenol/kloroform (Yem Örneği-I) ve DTAB (Yem örneği-II) ile DNA izolasyonu yapılan örneklerde kanatlı DNA'sının varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2). Diğer türlere ait spesifik markörler kullanılarak yapılan PZR analizlerinde, yem örneklerinde ruminant, do-

Tablo 1. PZR analizlerinde kullanılan primerler

| Lokus   | Tür      | PZR ürünü (bç) | Primer dizisi (5'→3')                              | Referans                      |
|---------|----------|----------------|--|-------------------------------|
| CR1     | Kanatlı  | 201            | atagaatcatagaatggcctg<br>ttttcacacagagggtggtg      | Tajima ve ark (2002)          |
| Chicken | Kanatlı  | 266            | gggacacctcccccttaatagaca<br>ggagggtctggaagaaggagtg | Lahiff ve ark (2001)          |
| ETH225  | Ruminant | 140-156        | gatcaccttgccactatttct<br>acatgacagccagctgctact     | Steffen ve ark (1993)         |
| S0068   | Domuz    | 218-242        | agtgtctctctccctcttgct<br>ccttcaacctttgagcaagaac    | Archibald ve ark (1995)       |
| LEX33   | At       | 155-202        | tttaatacaaggattcagttg<br>tttctctcaggtgtctc         | Guerin ve ark (2003)          |
| FCA220  | Karnivor | 220-224        | cgatggaaattgtatccatgg<br>gaatgaaggcagtcacaaactg    | Menotti-Raymond ve ark (1999) |

muz, at ve karnivor DNA'sı tespit edilememiştir. Yem örnekleri spesifik PZR ürününün varlığı yönünden pozitif ve negatif kontroller karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Tablo 2).

Hayvansal kökenli ürünlerin tür tayininde kullanılan mikroskopik incelemelerin temelini kemik ve doku parçacıklarının gözlenmesi oluşturmaktadır. Ancak, bu yöntem oldukça zaman alıcı olup özel deneyim gerektirmektedir. Ayrıca, mikroskopik yöntemler yalnızca zoolojik sınıflandırma (memeli, kanatlı, balık vs.) hakkında bilgi vermektedir (Dalmasso ve ark 2004). Bu çalışmada örneklerin yüksek ısı ile muamele edilmiş olmasına rağmen (133 °C, 3 bar, 20 dakika) kanat ve tüy parçacıklarının gözlemlenmesi örneğin kanatlı kökenli olabileceğini göstermektedir.



Şekil 2. Kanatlı (CR1 ve Chicken), ruminant (ETH225), domuz (S0068), at (LEX33) ve karnivor (FCA220) primerleri kullanılarak yapılan PZR sonuçları. Her bir markör için sırasıyla Yem örneği-I (1. kuyucuk), Yem örneği-II (2. kuyucuk), tavuk (3. kuyucuk), keçi (4. kuyucuk), at (5. kuyucuk) ve kedi kontrol DNA (6. kuyucuk) ile negatif kontrol (7. kuyucuk) kullanılmıştır. DNA bantları 100 bç DNA standardı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Isıl işlem görmüş ürünlerde, proteinlerde olduğu gibi DNA, termal denatürasyon sonucunda parçalanmaktadır. Ebbelhol ve Thomsen (1991) ısıl işlem görmüş et ürünlerinden izolasyonu yapılan DNA'nın yüksek oranda kırılmış (<300 bç) olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, ısı ile muamele edilmiş ürünlerden izole edilen DNA miktarı taze dokulara göre 10 misli daha azdır

(Lahiff ve ark 2001) ve PZR reaksiyonları için hedef DNA kopya sayısını azaltmaktadır. Bu ürünlerin hazırlanması sırasında oluşan ve PZR'yi baskılayan bazı negatif faktörler reaksiyona taşınabilmektedir (Lahiff ve ark 2001, Fumiere ve ark 2006). Bu nedenle, kullanılan DNA izolasyon yönteminin etkinliği önemli olduğu için farklı izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Lahiff ve ark 2001). Bu çalışmada, organik (fenol/kloroform) ve deterjan (DTAB) temelli iki farklı yöntem kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Her ne kadar her iki yöntem ile izole edilen DNA örneklerinde PZR amplifikasyonu gözlenmiş olsa da, spektrofotometrik analizler sonucunda hidrolize kanat-tüy örneklerinden DNA izolasyonunda DTAB yönteminin daha etkin olduğu gözlenmiştir. Deterjan temelli yöntem organik yöntemine göre kolay olup, kullanıcı ve çevre açısından daha güvenilirdir.

Isıl işlemi görmüş hayvansal ürünlerin tür tayini çalışmalarında kullanılacak DNA markörleri iki kritere göre oluşturulmaktadır. Bunlar PZR hedef bölgesinin küçük ve genomda tekrar bölgelerinin olmasıdır. Rendering ürünlerinde izole edilen DNA yüksek oranda kırılmış olmasından dolayı (Ebbelhol ve Thomsen 1991) küçük PZR ürünü veren (<300 bç) primerlerin kullanılmasının kritik önemi bulunmaktadır (Dalmasso ve ark 2004). Bu çalışmada kullanılan tüm lokuslar bu kritere göre seçilmiştir (Tablo 1).

Genomda yüksek kopya oranına sahip olan DNA markör sistemlerinin kullanılması tür tayini çalışmalarında tercih edilmektedir (Tajima ve ark 2002). Bu amaçla mitokondriyal DNA (mtDNA) markör sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. mtDNA'nın hücrede ~2500 kopyası bulunabilir (Lahiff ve ark 2001, Tajima ve ark 2002). mtDNA dizilim farklılıkları türe spesifik PZR markörlerinin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır (Lahiff ve ark 2001, Herman 2001, Krmar ve Rencova 2003, Dalmasso ve ark 2004, Bellagamba ve ark 2006). Bu çalışmada kullanılan Chicken (Lahiff ve ark 2001) markörü mtDNA kökenlidir (Tablo 1).

Genomda tekrar eden transposabl elementlerinden geliştirilen markörler de tür tespiti amacıyla kullanılmaktadır. LINE (Long Interspersed Repetitive Ele-

Tablo 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu analiz sonuçları.

| Lokus             | Yem örneği-I<br>Fenol/Kloroform | Yem örneği-II<br>DTAB | Tavuk<br>DNA | Keçi<br>DNA | At<br>DNA | Kedi<br>DNA |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------|-------------|-----------|-------------|
| CR1 (Kanatlı)     | +                               | +                     | +            | -           | -         | -           |
| Chicken (Kanatlı) | +                               | +                     | +            | -           | -         | -           |
| ETH225 (Ruminant) | -                               | -                     | -            | +           | -         | -           |
| S0068 (Domuz)     | -                               | -                     | -            | -           | -         | -           |
| LEX33 (At)        | -                               | -                     | -            | -           | +         | -           |
| FCA220 (Karnivor) | -                               | -                     | -            | -           | -         | +           |
| Negatif Kontrol   | -                               | -                     | -            | -           | -         | -           |

ments) elementleri 3000-7000 bp büyüklüğünde olup genomda farklı sayıda bulunmaktadır. Örneğin bir LINE elementi olan CR1 (Chicken repeat 1) elementinin tavuk genomunda 1000000 kopyası bulunmaktadır (Tajima ve ark 2002). LINE DNA dizilerinden geliştirilen PZR primerleri çok sayıda hedef DNA'nın yükseltgenme etkinliğini artırmaktadır. Bu çalışmada kullanılan CR1 markörü tavuk LINE elementlerinden geliştirilmiştir (Tajima ve ark 2002). CR1 ile başarılı ve spesifik PZR amplifikasyonu gözlenmiştir.

Bu çalışma ile oluşturulan DNA test panelinin rendering ürünlerinin ve insan gıdası olarak kullanılan ve yüksek ısılarla hazırlanan et ürünlerinin tür tayini ve bileşiminin tespitinde başarıyla kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

#### ► Teşekkür

Yazarlar mikroskopik analizlerde yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sadullah BAHAR'a teşekkür eder. Bu çalışma, III. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresinde (2007) sunulmuştur.

#### ► Kaynaklar

- Archibald AL, Haley CS, Brown JF, et al, 1995. The PiGMap consortium: linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm Genome*, 6, 157-175.
- Bellagamba F, Comincini S, Ferretti L, Valfre F, Moretti VM, 2006. Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J Food Prot*, 69, 891-896.
- Coşkun B, Şeker E, İnal F, 1997. Yemler ve teknolojisi, Birinci Baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, pp;187.
- Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT, 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes*, 18, 81-87.
- Ebbehol KJ, Thomsen PD, 1991. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci*, 30, 221-234.
- Fumiere O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G, 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem*, 385, 1045-1054.
- Guerin G, Bailey E, Bernoco D, Anderson I, et al, 2003. The second generation of the international equine gene mapping workshop half-sibling linkage map. *Anim Ge-*

net, 34, 161-168.

- Herman L, 2001. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J Dairy Res*, 68, 429-436.
- İlhak Oİ, Arslan A, 2007. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 159-163.
- Krcmar P, Rencova E, 2003. Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *J Agric Food Chem*, 51, 7655-7658.
- Lahiff S, Glennon M, O'Brien L, Lyng J, Smith T, Maher M, Shilton N, 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol Cell Probes*, 15, 27-35.
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández PE, González I, Martín R, 2007. Technical note: detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J Anim Sci*, 85, 2734-2739.
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien SJ, 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*, 57, 9-23.
- Myers MJ, Yancy HF, Farrell DE, 2003. Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *J Food Prot*, 66, 1085-1089.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Steffen P, Egen A, Dietz AB, Womack JE, Stranzinger G, Fries R, 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim Genet*, 24, 121-124.
- Tajima K, Enishi O, Amari M, Mitsumori M, Kajikawa H, Kurihara M, Yanai S, Matsui H, Yasue H, Mitsuhashi T, Kawashima T, Matsumoto M, 2002. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 2247-2250.
- Toyoda A, Nakajo M, Kawachi H, Matsui T, Yano H, 2004. PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. *J Food Prot*, 67, 2829-2832.