

GIDALARDA GENETİK YAPISI DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN (GDO) BELİRLENMESİ

Fadime Kıran, Özlem Osmanağaoğlu*

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Abd, Tandoğan, Ankara

Geliş tarihi / Received: 28.04.2011

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 13.06.2011

Kabul tarihi / Accepted: 17.06.2011

Özet

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) kullanılarak elde edilen ürünler artan bir şekilde dünyanın gıda kaynağı olarak tanıtılmakta ve genetiği değiştirilmiş (GD) gıdalar sıklıkla gündemde yer almaktadır. Avrupa Birliği Komisyonu, GDO kullanılarak elde edilen ve tespit edilebilir miktarlarda DNA veya protein içeren gıda ürünlerinin ve içeriklerinin etiketlenmesi gerektiğini öngörmektedir. Bu aşamada, genetik modifikasyonun belirlenmesi (kalitatif analiz) ve ölçümü (kantitatif analiz) oldukça önemli olmaktadır. Bundan dolayı, GDO'nun belirlenmesi, ölçümü ve izlenmesi için güvenilir, tekrarlanabilir, doğru ve hassas yöntemler gerekmektedir. Bu derlemede genetik değişiklikler, protein ve DNA esaslı kalitatif ve kantitatif GDO tanımlama yöntemleri, bu yöntemlerin uygulama zorlukları ve gelişmekte olan yeni teknolojiler incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Genetiği değiştirilmiş gıdalar, modifikasyon, GDO tespiti, PZR

DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMOs) IN FOOD

Abstract

Products obtained by using genetically modified organisms (GMOs) are increasingly being introduced into the world's food supply and genetically modified (GM) foods are often in the news. Commission of the European Communities recommended that food products and ingredients containing detectable amounts of DNA or proteins, obtained by using GMO have to be labeled. In this point; detection (qualitative analysis) and quantification (quantitative analysis) of genetic modification is becoming increasingly important. Therefore; reliable, reproducible, accurate and sensitive methods are needed for detection, quantification, and monitoring of GMO. In this review, genetic modifications, qualitative and quantitative GMO detection methods based on protein and DNA analysis, the difficulties in the application of these methods and developing new technologies were investigated.

Keywords: Genetically modified food, modification, GMO detection, PCR.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ osmanaga@science.ankara.edu.tr

☎ (+90) 532 433 86 62

☎ (+90) 312 223 23 95

GİRİŞ

Holst-Jensen'in tanımlamasına göre, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO); genetik kompozisyonu gen teknolojisinin kullanımı ile değiştirilmiş bakteri, bitki ve hayvan gibi canlı organizmalardır (1). GDO kullanılarak elde edilen ürünler ise; istenilen fenotipi sergilemesi için genomuna başka bir organizmadan elde edilen gen eklenmiş ya da çıkarılmış gıdalar ve genetiği değiştirilmiş (GD) yemler ile beslenen hayvanlardan sağlanan hayvansal ürünler olabilir.

Genetik mühendisliği, tarımsal biyoteknoloji alanında yeni özelliklere sahip bitkilerin gelişiminde, insan sağlığında ve aynı zamanda hayvan mühendisliği alanında yeni yollar yeni ufuklar açmaktadır (2, 3). İlave kazanımlar ise biyoteknolojinin en göze çarpan avantajının kullanımını sağlayarak gıdaların besin değerini ve kalitesini geliştirmekte ve arttırmaktadır (4-9). Çiftçi için sağladığı ekonomik avantajlar bir yana, "yeşil" mühendisliğin dünyanın ürün üretiminin artırılmasını sağlayacağı ve böylece artan dünya nüfusunu, belli alanlarda durgun olan gıda üretimi ve gıda ithalatına olan bağımlılık gibi durumlardan kaynaklanan problemleri çözmek için katkıda bulunabileceği tartışılmaktadır. GDO kullanılarak elde edilen ürünlerde, ürün biyokimyasının bozulması önceden tahmin edilemeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Bu belirsizlik ise üzerinde en fazla kaygı duyulan nokta olup GDO'ların analizlerle belirlenmesinin önemini arttırmaktadır. İnsan sağlığı açısından riskler iki ana başlık altında toplanmaktadır. Birincisi toksik ve alerjik etki ihtimali, ikincisi ise bitki bünyesinde bulunan antibiyotige dayanıklılık geni gibi transfer edilebilen diğer gen ya da genlerin insan ya da hayvanlara geçme ihtimalidir (2, 3). Bunun dışında çevre ve biyoçeşitlilik üzerinde de olumsuz etkilere neden olabilmektedir (7).

Tarımsal biyoteknolojideki büyük gelişmelerden dolayı, bilim adamları artık geleneksel ürünlere istenilen genlerin transferini sağlayan yapay genetik manipülasyonları başarılı bir şekilde kullanabilir hale getirmişlerdir. Yabancı DNA'nın eklenmesi amacıyla temel olarak *Agrobacterium* sp.'den elde edilen T₁-pilazmidi gibi biyolojik vektörler (Rekombinant DNA teknolojisi), fiziksel yöntemler (partikül silahı ve elektroporasyon) ve kimyasal yöntemler (polietilenglikol ve kalsiyumklorit) kullanılmaktadır (10). Biyolojik vektör sistemi bu 3 yöntemden en sık kullanılanıdır.

Düzenlemeden sorumlu genetik elementlerden en yaygın olarak kullanılan iki tanesi Cauliflower mosaic virüs (CaMV; Karnabahar mozaik virüsü) kaynaklı yapısal 35S promotör ve *Agrobacterium tumefaciens*'in nopalın sentaz geninden (nos) izole edilen nos3' terminatörüdür (11, 12). Bu tür uygulamalara örnek olarak; seçici olmayan herbisit Roundup'a (aktif içerik olarak glifosatu içermektedir) dirençli soya fasulyesinin geliştirilmesi verilebilir (13, 14). Diğer örnekler arasında *Bacillus thuringiensis*'in δendotoksin genine sahip olan mısırın Avrupa mısır kurduna karşı direnç geliştirmesi ve *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edilen fosfoinotrisin (phosphoinothricin) genine sahip olan mısırın ise glifosinat herbisitine tolerans kazanması yer almaktadır (15).

GIDALARDA GENETİK YAPISI DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN (GDO) BELİRLENMESİ

GDO kullanılarak elde edilen gıdaların dünya çapında kullanım alanı her geçen yıl hızla artmaktadır. Bu artış aynı zamanda halkın güvenlik endişesini arttırmış ve tüketiciler GDO kullanılarak elde edilen ürünlerin ve bu ürünlerden elde edilen gıdaların uygun bir şekilde etiketlenmelerini ve kendilerinin de bilgilendirilmelerini talep etmişlerdir. Tüketicilerin gıda güvenliğinde bu dikkate değer artan bilinçlenmeleri, daha fazla gıda kalite kontrol ihtiyacını yaratmıştır. Avrupa Birliği komisyonu GDO kullanılarak elde edilen ve belirlenebilir miktarlarda DNA veya protein içeren gıda ürünleri ve içeriklerinin etiketlenmesini zorunlu kılmaktadır (miktar % 0.9 değerini aşarsa) (16). Etiketleme sisteminin amacı üründe GDO varlığını tüketiciye bildirmek, böylece bu tür gıdaları alıp almama tercihinin tüketicinin inisiyatifine bırakmaktır. GDO kullanılarak elde edilen gıdaların tespiti amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda; Referans Materyal ve Ölçüm Enstitüsü (IRMM, The Institute for Reference Materials and Measurements, Belçika) tarafından üretilmiş, % 0.1-5 ve 0 genetik değişiklik içeren kurutulmuş ürün tozlarından meydana gelmiş ve Fluka Chemie AG (Buchs, İsviçre) gibi markalar tarafından ticarileştirilmiş sertifikalı referans materyal (CRM, Certified Reference Material) standartları pozitif ve negatif kontroller olarak mutlaka kullanılmalıdır (17). GDO kullanılarak elde edilen bir ürünün veya ondan üretilmiş farklı gıdaların analizi için gerekli aşamalar şöyle sıralanabilir: analiz edilecek materyalden uygun miktarda numune alınması, numunenin homojenize edilerek ilgili analiz için

gerekli izolasyon ve saflaştırmanın yapılması, saflaştırılan DNA veya proteinin analizi, pozitif sonuç alındığında genetik değişimin miktarının belirlenmesi. Yöntemler değişik şirket ve ülkeler için çeşitlilik göstermekle beraber temelde genetik değişikliğin belirlenmesi için protein ve DNA temelli test yöntemleri olmak üzere iki temel yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler kendi aralarında çeşitli farklılıklar göstermektedirler. Bununla beraber, yeni nesil analitik teknolojiler gelişmiş ülkelerde kullanıma sunulmaktadır. Halen gelişim aşamasında olan NIR (Near Infrared Imaging-Yakın Kızılötesi Görüntüleme) gibi spektrofotometrik teknikler, mikrodizi, biyoçip, biosensör, genarray, mikroarray gibi yöntemler DNA ve protein esaslı geleneksel yöntemlerle kıyaslandıklarında yüksek teknoloji içeren cihaz sistemlerine ihtiyaç duyduklarından dolayı tüm GDO analiz laboratuvar çalışmalarına dâhil edilememektedirler (18). Yeni nesil teknolojiler olarak adlandırılan bu yöntemlerle aynı anda binlerce genin ekspresyonu ölçülebilmekte, karşılaştırılabilmekte ve elde edilen sonuçlar çeşitli bilgisayar algoritmaları ile sınıflandırılabilmektedir (19, 20). Genetiği değiştirilmiş gıdaların belirlenmesinde biyoçiplerin kullanımına yönelik ilk çalışmalardan biri 2002 yılında Feriotto ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Roundup Ready soya genlerinin ve lektinin dizisini içeren biotinli tek zincir oligonükleotidler sensör çiplerin iki farklı kuyucuğuna immobilize edilmiştir. Oligonükleotid probur bu çipler üzerine enjekte edilmiş ve oluşan reaksiyonlar neticesinde GDO içeren soya örnekleri, yaklaşık 40 dakika gibi kısa bir sürede hızlı bir şekilde tespit edilebilmiştir (21). Mikroarray teknolojisi ise çiplerden esinlenerek geliştirilmiş olup tarama ve tanımlama işlemini aynı anda yapabilmektedir. Yöntem temel olarak, araştırılmak istenilen numunede istenilen gen dizisinin tamamlayıcısının varlığının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Avrupa Birliği tarafından ticarileştirilmelerine izin verilen 9 farklı GDO vakasının (mısır 176, Bt11, GA21, MON810, CBH351 ve T25, Topas 19/2, T45 ve Roundup Ready soya) eş zamanlı taranabilmesi amacıyla geliştirilen mikroarray kitinde, çip yüzeyinde mevcut tutunmuş özgün proburlarla, numuneden amplifiye edilmiş hedef dizilerin hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir (22). Bunun gibi birçok çalışmadan elde edilen başarılı sonuçlar, günümüzde halen biyoinformatik programlarının geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Önemli

olan GDO tespiti için oldukça yüksek hassasiyette, basit ve tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılmasıdır. Son yıllarda iki renkli FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy- Floresan Çapraz Korelasyon İlişkili Spektroskopisi) tekniğinin kullanımı GDO'nun hızlı tespiti için PZR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) bağımsız manyetik boncuk esaslı yöntem olarak tanımlanmıştır. Bu yeni yöntem hızlı ve oldukça kullanışlı bulunmuştur (23). Günümüzde, GDO tespitinde birden fazla tekniğin bir arada kullanıldığı yöntemler de geliştirilmektedir. Luminex xMAP teknoloji, yüz farklı renk setine sahip floresan bilyelerin kullanımı esasına dayanmaktadır. PZR ile çoğaltılan DNA farklı renkteki bilyeler ile muamele edilmekte ve hibridizasyon için beklenmektedir. Fakat Luminex xMAP olarak tanımlanan bu teknoloji henüz sadece p35S ve epsps gibi sınırlı sayıda genetik değişimi belirleyebilmektedir (24). Yeni nesil teknolojiler içerisinde omiks yaklaşımları hedef alan ve GD metabolitlerin veya proteinlerin arandığı MS-esaslı teknolojilerden de bahsedilebilir. Gelişmekte olan "omiks" teknoloji esasına dayanan bu yöntem oldukça yeni olup halen gelişme aşamasındadır (25). Bununla beraber GDO tespiti amacıyla multipleks PZR ve kapiler (capillary) jel elektroforezi birlikte kullanılabilmektedir. Tanımlama ise PZR ürün büyüklüğü ve oluşan renklere göre gerçekleştirilmektedir (26, 27). Bu derleme çalışmasında ülkemizde de sıklıkla kullanılan protein ve DNA-temelli yöntemlerden bahsedilecektir.

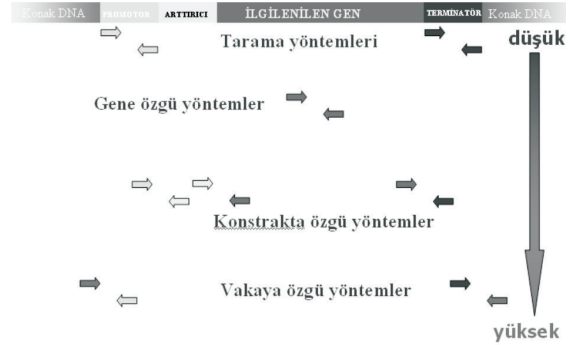
PROTEİN-TEMELLİ YÖNTEMLER

Protein düzeyindeki analizler gen tarafından ifade edilen yeni özgün proteinin tespitine olanak sağlayan yöntemlerdir. Antikor ve antijenin özgün olarak bağlanması temeline dayanan immünolojik testlerin başında ELIZA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Enzim Bağlı Immunosorbent Testi) gelmektedir. Bu yöntemde aranan proteinin kendisine uygun olarak geliştirilmiş antikor ile etkileşimi sonucu oluşan renk değişimi reaksiyonun gerçekleştiğini belirtmektedir. Ticari kitlerin kullanımı ve standart eğrilerin numunede meydana gelen renk değişimi ile karşılaştırılması sonucunda hedef proteinin kantitatif tayini de yapılabilmektedir (28). ELIZA genellikle DNA testlerinden daha ucuza mal olmakta ve daha hızlı sonuç vermektedir. Buna rağmen en büyük dezavantajı sıcaklığın işlem sırasında proteine zarar verebilmesi ve bundan dolayı işlenmiş gıdalar üzerinde iyi çalışmamasıdır.

Dezavantajlarından bir diğeri ise piyasada mevcut ticari kitlerin, GDO kullanılarak elde edilen bazı ürünler için tasarlanmış olması ve gün geçtikçe artan ürünlere cevap verememesidir (29). Özgün antikor emdirilmiş kâğıt şeritlerin (lateral flow strip) kullanılması ise protein-temelli diğeri bir yöntemdir. Pratik olarak yaprak ve tohum numunelerinde kullanılmaktadır (29, 30).

DNA-TEMELLİ YÖNTEMLER

Transgenik dizi olarak eklenen DNA'nın direk tespitine dayalı yöntemlerdir. Daha önce belirtilen ileri teknolojiye sahip tekniklerle karşılaştırıldığında en sık kullanılan yöntem olma özelliğini halen korumaktadır (31). Genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanımı ile üretilmiş gıda ürününün tespitinde kullanılan ilk resmi yöntem özgün DNA bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunu temel almaktadır ve Almanya Federal Gıda ürünlerinin Resmi Yöntemler Koleksiyonunda 35. makale başlığı altında 1993'de yayınlanmış ve 1998 yılında basılmıştır (32). O zamandan beri gıda üretiminde kullanılan değişik GDO'lar için birçok resmi PZR-temelli yöntem tanımlanmıştır. Çalışma yapılan laboratuvarlarda en çok iki tip senaryo ortaya çıkmaktadır (1). Birincisi, numunenin genetik olarak işlenmiş bileşenler içerip içermediği üzerine odaklanan sorulardır. İkinci tip soru ise, numunede tespit edilen özgün bir genetik değişimin miktarının belirlenebileceği laboratuvar ihtiyacına yöneliktir. Her iki sorunun yanıtı ise hedef DNA miktarının yüzdesinin ya kalitatif (pozitif-negatif cevap) ya da kantitatif (miktersal) olarak belirlenmesidir (18). Bu aşamada DNA izolasyonu oldukça önemlidir. Mısır ve mısırdan üretilen farklı gıdalarda altı ayrı DNA izolasyon yöntemi denenmiştir. Sonuç olarak, genetik değişimin belirlenebilmesi için ihtiyaç duyulan DNA'nın, piyasada bulunan ticari kitlerle başarılı bir şekilde izole edilebileceği belirtilmiştir (33). Birinci durumda, GD vakalarının tamamında veya çoğunda ortak olan DNA dizi bileşenlerine bakılmak suretiyle test (veya testler) gerçekleştirmekte ve bu aşamada GDO'ya özgü hedef dizinin bilinmesine gereksinim duyulmaktadır. İkinci durumda ise yapılması gereken bahsi geçen GD vakasına özgü olan nükleotid dizisini tespit etmektir ve Real-Time (RT-PZR), Eş-zamanlı PZR) veya kinetik PZR, analiz için çok küçük DNA miktarları üzerinde yapılması gereken durumlarda kantifikasyon ve yorumlama limitlerini gösterebilmektedir (34).



Şekil 1. Tipik bir gen konstraktının şematik sunumu ve artan spesifisite sergileyen (yukarıdan aşağıya) 4 farklı kategoride sınıflandırılan PZR-temelli çalışmalar (34).

Kalitatif Sistemler

GDO kullanılarak elde edilen ürün tanımlamasından önce, evrensel veya bitki türlerine-özgü PZR kullanımı ile gıda matriksi içerisinde çoğaltılabilir DNA varlığının gösterilmesi ve doğrulanması gerekmektedir. İlk basamak bitki DNA'sından (bitki türlerine özgü genler) özgü dizinin çoğaltılmasıdır. Örneğin, GD soya çalışmasında soya orijinli DNA'nın varlığı ya da yokluğu, lektin genini (*Lec1*-tek kopya gen) hedef alan soyaya özgü primer çiftlerinden GM03/GM04 veya Lektin1 /Lektin6 kullanımı neticesinde PZR ile tespit edilmektedir (35, 36). Bununla beraber, mısır orijinli DNA'nın varlığı/yokluğu ise zein geni ya da mısır invertaz geni gibi mısıra özgü PZR sistemlerinin kullanılmasıyla kontrol edilmektedir (37, 38).

Doğrulama testleri ardından gerçekleştirilen PZR-temelli GDO testleri özgünlük derecelerine uygun olarak en az 4 kategoride sınıflandırılabilir (Şekil 1). Aşağıda detayları belirtilen kategorilerin her biri PZR'de çoğaltılan DNA fragmentlerinin kompozisyonuna karşılık gelmektedir (34, 39).

Tarama yöntemleri

Gıda ürünlerinde GDO'ların varlığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen ve 1. kategori olarak adlandırılan tarama işlemlerinde, kalitatif PZR yöntemleri kullanılmaktadır. Yeni özelliği kodlayan genlerin DNA dizileri, markör genlerin DNA dizileri ve promotör veya terminatör DNA dizileri PZR çalışmaları için hedef DNA dizileridir (Şekil 1). PZR ürününün eksikliği transgenik dizisinin eksikliğini vurgulamaktadır. PZR'de genel bir araştırma için hedef dizilerden sıklıkla çalışılanlar; Cauliflower mosaic virüsünde bulunan ve çoğu GDO konstraktında güçlü yapısal transkripsiyon promotörü olarak kullanılan 35S promotör (P-35S)

ve/veya *Agrobacterium tumefaciens*'deki NOS (nopalın sentaz) terminatörüdür (T-Nos). Bununla beraber, en yaygın olarak kullanılan klonlama vektörleri arasında pBR322 ve bu vektörün amfisiilin (bla-beta laktamaz) antibiyotiklerine karşı dirençliliği kodlayan pUC19 gibi türevleri veya neomisin/kanamisin (nptII) antibiyotiklerine karşı dirençliliği kodlayan vektörler yer almaktadır (34).

Gene özgü yöntemler

İstenilen geni hedef alan PZR yöntemleri (kategori 2) kategori 1 yöntemlerinden daha özgündür. *CaMV* 35S promotör, nos terminatör veya *npII* genlerinin tek başlarına taranması yeterli değildir. GDO kullanılarak elde edilen ürünlerin taranması için ilave transgen-özgü genlerin (*EPSPS*, *pat/bar*, *CryIA(b)*) taranması gerekmektedir (Şekil 1). Uygun genlerin seçimi uygun promotörlerin ve terminatörlerin seçiminden çok daha önemlidir. Normalde kategori 2 yöntemlerinin kullanımı neticesinde alınan pozitif bir sinyal genetik değişim türevli DNA'yı vurgulamakta ve birçok durumda da DNA'nın hangi GDO'dan türediğini tanımlamayı mümkün kılmaktadır. Tarama yaklaşımlarının kullanımıyla GDO'nun kendisinin tanımlanması mümkün olmadığından, tanımlanacak GDO'ya özgü DNA dizisi, takip eden PZR çalışmalarında hedef dizi olarak kullanılmak durumundadır (34, 39).

Konstrakta özgü yöntemler

Birbirine komşu olan en az iki genetik elementin sınırını kapsayacak şekilde yeni dahil edilmiş DNA bölgesi kullanılmaktadır. 3. kategori yöntemleri ilgilenilen gen bölgesi ve promotör arasında olduğu gibi gen konstraktındaki bitişik elementler arasındaki kesişmeleri hedef almaktadır (Şekil 1). Bu yöntemler ile pozitif bir sinyal sadece genetik değişiklik içeren materyalin varlığında ortaya çıkmaktadır. DNA'nın değişiklik kaynağının belirlenmesinde, kategori 2'de yer alan yöntemlerden çok daha uygundur (34). Ancak, aynı gen konstraktı birden fazla GD numunesinde bulunabilir. Örneğin GD mısırlarda Mon809 vakasında; pV-ZMBK07 ve pVZMGT10 transformasyonunun her ikisi de mevcutken, Mon810 vakasında pV-ZMBK07, Mon832'de ise sadece pVZMGT10 pilazmidi bulunmaktadır (40).

Vakaya özgü yöntemler

4. kategori olarak adlandırılmaktadır. GDO'ların PZR ile anlamlı bir şekilde tanımlanabilmesi için, primer seçimi bahsi geçen transgenik organizma

için karakteristik olan hedef diziler üzerine kurulmalıdır (örneğin, integrasyon bölgesi ile özgün bir GDO'nun yeni dahil edilmiş genetik elementi arasında çapraz-sınır alanı gibi veya kesik gen çeşitlerine bağlı özgün dizi değişimleri ya da değişen kodon kullanımı gibi). Transformasyon olayının en eşsiz belirgin özelliği (günümüz teknolojisinin sınırlamalarıyla) alıcı genom ile eklenen DNA arasındaki integrasyon lokusundaki bağlantıdır. Bu bağlantı bu bölümde yer alan yöntemlerin (vakaya özgü) hedefini oluşturmaktadır (Şekil 1). Entegre olmuş gen ve konak organizma genom DNA'sı arasındaki eşsiz ve özgün integrasyon birleşme dizilerini temel alan vakaya özgü tespit stratejisi oldukça yüksek hassasiyetinden dolayı geliştirilen ve kullanılan bir yöntemdir (25, 41).

Kalitatif sistemlere dahil PZR-temelli yöntemler arasında multipleks ve nested PZR teknikleri de yer almaktadır. Nested PZR; klasik PZR'ye ilaveten farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulama prensibine dayanmaktadır. Hassas bir yöntem olup özgün olmayan amplifikasyonları azaltmaktadır. Örneğin, mısırdan elde edilen gıdalarda PZR yöntemi Bt11 varlığını gösterirken, nested PZR Bt176'nın tespitinde kullanılmıştır (42). Multipleks PZR ise tek bir reaksiyonda iki ya da daha fazla hedef dizinin çoğalmasına olanak sağlayan kullanışlı bir yöntemdir (22). GDO'ları oldukça hızlı, tekrarlanabilir ve ekonomik bir şekilde kısa sürede tespit etmektedir. Birden fazla transgenik vaka bu tip bir PZR işlemi ile kısa sürede belirlenebilmektedir. Örneğin; mısır ve soya bitkisinden elde edilen gıdalarda genetik değişikliğin tespiti için *CryIAb* ve *EPSPS* genlerinin birlikte analizine olanak sağlamaktadır (43, 44). Bununla beraber; aynı reaksiyonda sekiz farklı genetik değişiklik de çalışılabilmiştir (45). Son zamanlarda hassaslığı ve tekrarlanabilirliği arttırmak amacıyla, multipleks PZR yöntemi, RT PZR, mikroarray, biyosensör gibi farklı bazı kalitatif ve/veya kantitatif yöntemler ile birlikte kullanılmaktadır (46).

Kantitatif Sistemler

Geçerliliği onaylanmış uygun kalitatif yöntemlerin kullanımı neticesinde eğer GDO'ya özgü DNA (ya da protein) bulunamamış ise, gıda ürününün etiketlenmesine gerek yoktur. Eğer bir ürünün GDO içerdiği gösterilmişse, bunu takip eden basamak PZR kantifikasyonu ile % 0.9 sınır seviyesinde (veya tohumlar için % 0.3 ya da 0.5 seviye) uygunluğun değerlendirilmesi olacaktır (16).

Gıdalarda GDO'ların analizlerine ait en önemli konu kantifikasyondur. Çünkü gıdalardaki GDO'ların maksimum limiti Avrupa Birliği'nde etiketleme için temeldir. Kantitasyon işlemi sıklıkla RT-PZR kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (47). Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA numuneleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda numune son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. PZR ürün miktarlarının ölçümü için çeşitli formatlar kullanılmaktadır: (i) çift zincir DNA bağlanma boyası, SYBR Green I; (ii) hibridizasyon veya FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer-Florasans Rezonans Enerji Transfer) propları; (iii) hidroliz problemleri (TaqMan® teknolojisi); ve (iv) moleküler işaretleyiciler (48). Gıda maddelerinde genetik değişikliğin yüksek kalitede belirlenmesi için genellikle florasans-bağlantılı RT-PZR kullanılmaktadır. Gıda veya yem numunelerinde GDO kantifikasyonu alanında en yaygın olarak kullanılan yaklaşım raportör (reporter) ve baskılayıcı (quencher) boya bağlanmış oligonükleotitten oluşan florojenik bir prob kullanan Taqman® veya 5'-ekzonükleaz denemesidir. 5' ucunda raportör bir boya olan floresan FAM (5'-carboxyfluorescein-karboksifloresin) (veya HEX/VIC), 3' ucunda ise 6-baskılayıcı bir boya olan TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine-karboksitetrametilrodamin) ile işaretlenen TaqMan problemleri tercih edilmektedir.

SONUÇ

Avrupa topluluğu mevzuatı GDO kullanılarak elde edilen ürünlerin piyasada yer almadan önce onaylanmış olmasını gerektirmektedir. Herhangi bir GDO'dan meydana gelen bir gıdanın genetik değişiklik miktarının % 0.9'dan fazla olduğu durumlarda ise etiketleme talep edilmektedir. GDO kullanılarak elde edilen ürünler ve bunlardan üretilen gıdaların marketlerde yer alması, yasalara uygunluğu sağlamak için analitik yöntemlere talep doğurmuştur. Bu durum GDO etiketlemesinin zorunlu olduğu ülkelerde ve aynı zamanda bu ürünlerin ihracatının sınırlamaları olan ülkelere ithalatının yapılması söz konusu olduğu durumlarda da geçerlidir. Bu nedenle GDO kullanılarak elde edilen tarım ürünlerinde ve bu ürünler kullanılarak üretilen gıdalarda GDO'nun varlığının ve miktarının izlenmesine ve doğrulanmasına gerek duyulmaktadır. Buna ek olarak GDO'nun bulunup bulunmadığının teşhisinin onaylanması da önemlidir. Bir test

laboratuvarı, DNA'ya daha sonradan eklenen yeni diziyi tanıyabilmeli, bu materyalin miktarını teşhis edebilmeli ve mevcut özgün değişikliği net olarak belirleyebilmelidir.

GDO kullanılarak üretilmiş gıdaların etiketlendirilmeleri için yapılan ve işlenmemiş materyal ya da gıda ürünlerinde GDO'nun belirlenmesine yönelik güvenilir ve eksiksiz yöntemleri gerekli kılan düzenlemeler dünya çapında yerine getirilmekte ve Türkiye de bu sürecin içerisinde yer almaktadır (Avrupa Birliği uyum süreci). Bu bağlamda; GDO kullanılarak elde edilen ürünlerin analizlerinde transkriptomik, proteomik ve metabolomik teknolojileri de önemli bir yer tutmaktadır. Genetik değişikliği tanımlayan yeni teknolojilerin yurdumuzda da uygulamaya dahil edilebilmesi için bu konuda başarılı çalışmalar gerçekleştiren TÜBİTAK, Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı ve özel analiz laboratuvarları ile üniversite araştırma laboratuvarlarının işbirliğinde yeni laboratuvar altyapılarının geliştirilmesi ve uygulamaya geçirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Holst-Jensen A. 2007. Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs). In: *Food Toxicans Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, Pico Y (ed), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 231–268.
2. Uzogara SG. 2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. *Biotechnol Adv*, 18, 179–206.
3. Azadi H, Ho P. 2010. Genetically modified and organic crops in developing countries: A review of options for food security. *Biotechnol Adv*, 28, 160–168.
4. Egelyng H. 2000. Managing agriculture biotechnology for sustainable development: the case of Semi-Arid India. *Int J Biotechnol*, 2 (4), 343–354.
5. Kuiper HA, Noteborn HPJM, Kok EJ, Kleter GA. 2002. Safety aspects of novel foods. *Food Res Int*, 35, 267–271.
6. Van Meijl H, Van Tongeren F. 2004. International diffusion of gains from biotechnology and the European Union's Common Agricultural Policy. *Agric Econ*, 31, 30–316.

7. Sanvido O, Romeis J, Bigler F. 2007. Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 107, 235–278.
8. Warwick SI, Beckie HJ, Hall LM. 2009. Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops. *Ann NY Acad Sci*, 1168 (1), 72–99.
9. Raveebdar S, Ignacimuthu S. 2010. Improved Agrobacterium mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. *Asian J Plant Sci*, 91, 256–263.
10. Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42, 205–225.
11. McBride K, Summerfelt K. 1990. Improved binary vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*, 14, 269–276.
12. Jen Lu I, Lin C, Ming T. 2010. Establishment of a system based on universal multiplex-PCR for screening genetically modified crops. *Pan Anal Bioanal Chem*, 396, 2055–2064.
13. Cerdeira AL, Duke SO. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J Environ Qual*, 35, 1633–1658.
14. Ovesná J, Ku_era L, Hodek J, Demnerová K. 2010. Reliability of PCR based screening for identification and quantification of GMOs. *Czech J Food Sci*, 28 (2), 133–138.
15. Hurst CD, Knight A, Bruce IJ. 1999. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Mol Breeding*, 5 (6), 579–586.
16. Anon 2003. On genetically modified (GM) food and feed. L268/1 Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC) of The European Parliament and of the Council No 1829/2003 of 22 September 2003.
17. Yoshimura T, Kuribara H, Kodama T, Yamata S, Futo S, Watanabe S, Aoki N, Izuka T, Akiyama H, Maitani T, Naito S, Hino A. 2005. Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using real time PCR. *J Agric Food Chem*, 53, 2060–2069.
18. Querci M, Van den Bulcke M, Zel J, Van den Eede G, Broll H. 2010. New approaches in GMO detection. *Anal Bioanal Chem*, 396, 1991–2002.
19. Kalogianni DP, Koraki T, Christopoulos TK, Ioannou PC. 2006. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (7), 1069–1076.
20. Leimanis S, Hernández M, Fernández S, Boyer F, Burns M, Bruderer S, Glouden T, Harris N, Kaeppli O, Philipp P, Pla M, Puigdomènech P, Vaitilingom M, Bertheau Y, Remacle J. 2006. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Mol Biol*, 61 (1), 123–139.
21. Feriotta G, Borgatti M, Mischiati C, Bianchi N, Gambari R. 2002. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified Roundup Ready soybean gene sequences. *J Agric Food Chem*, 20, 955–962.
22. Michelini E, Simoni P, Cevenini L, Mezzanotte L, Roda A. 2008. New trends in analytical tools for the detection of genetically modified organism: an update. *Anal Bioanal Chem*, 8, 2193–2197.
23. Zhou X, Xing D, Tang Y, Chen WR. 2009. PCR-free detection of genetically modified organisms using magnetic capture technology and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *PLoS ONE*, 4 (11), 1–8.
24. Fantozzi A, Ermolli M, Marini M, Balla B, Querci M, Van den Eede G. 2008. Innovative application of fluorescent microsphere based assay for multiple GMO detection. *Food Anal Methods*, 1, 10–17.
25. Garcia-Canas V, Simo C, Leon C, Ibanez E, Cifuentes A. 2011. MS-based analytical methodologies to characterize genetically modified crops. *Mass Spectrom Rev*, 30, 396–416.
26. Nadal A, Esteve T, Pla M. 2009. Multiplex polymerase chain reaction-capillary gel electrophoresis: a promising tool for GMO screening assay for simultaneous detection of five genetically modified cotton events and species. *AOAC Int*, 92 (3), 765–772.
27. Garcia-Canas V, Mondello M, Cifuentes, A. 2010. Simultaneous detection of genetically modified organisms by multiplex ligation dependent genome amplification and capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence. *Electrophoresis*, 31, 2249–2259.
28. Spiegelhalter F, Lauter FR, Russel JM. 2001. Detection of genetically modified food products in commercial laboratory. *J Food Sci*, 66 (5), 634–640.

29. Ahmed FE. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol*, 20 (5), 215–225.
30. Bulcke MV, Leunda AC, Bernardi D, Schrijver A, Mbongombella G, Sneyers M. 2005. Detection of genetically modified crops in real time practice: a state of art. Institute of Health, 07-10 July, ICBAR, Ravello, Italy, 1–10.
31. Rodríguez-Lázaro D, Lombard B, Smith H, Rzezutka A, D'Agostino M, Helmuth R, Schroeter A, Malorny B, Miko A, Guerra B, Davison J, Kobilinsky A, Hernández M, Bertheau Y, Cook N. 2007. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci Tech*, 18, 306–319.
32. Anon 1998. On detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. Collection of Official Methods under Article 35 of the German Federal Foodstuffs Act. No L-23.01.22-1 of 1993.
33. Elsanhoty RM, Ramadan MF, Jany KD. 2011. DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. *Food Chem*, 26, 1883–1889.
34. Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal GK. 2003. PCR Technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*, 375, 985–993.
35. Tengeli C, Schwab P, Setzke E, Balles J, Sprenger-Haussels M. 2001. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Bio Techniques*, 31, 426–429.
36. Al-Rousan H, Al-hmoud N, Hayek B, Ibrahim M. 2010. A study on the occurrence of genetically modified soybean and maize feed products in the Jordanian market. *J Cell Mol Biol*, 8 (2), 87–94.
37. Ehlers B, Strauch E, Goltz M, Kubsch D, Wagner H, Maidhof H, Bendiek J, Appel B, Buhk HJ. 1997. Identification of genetically modified maize by PCR. *Bundesgesundhbl*, 4, 118–121.
38. Hernandez M, Duplan MN, Berthier G, Vaitilingom M, Hauser W, Freyer R, Pla M, Bertheau Y. 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J Agr Food Chem*, 52, 4632–4637.
39. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Eede WG. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agriculture crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*, 214, 3–26.
40. AgBios. 2008. GMO Database. <http://www.agbios.com/dbase.php> (Erişim tarihi 05 Mart 2010).
41. Pan A, Yang L, XU S, Yin C, Zhang K, Wang Z, Zhang D. 2006. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3' transgene integration sequence. *J Cereal Sci*, 43, 250–257.
42. Dinon AZ, Bosco KT, Arisi ACM. 2010. Monitoring of Bt11 and Bt176 genetically modified maize in food sold commercially in Brazil from 2005 to 2007. *J Sci Food and Agr*, 90 (9), 4566–4569.
43. Forte VT, Martin GG, Vigneau MF, Meyer G. 2005. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food Control*, 16, 535–539.
44. Yoke-Kqueen C, Yee-Tyan C, Siew-Ping K, Son R. 2011. Development of multiplex-PCR for Genetically Modified Organism (GMO) detection targeting EPSPS and Cry1Ab genes in soy and maize samples. *Int Food Res J*, 18, 512–519.
45. Shrestha HK, Hwu KK, Chang M. 2010. Detection of genetically modified maize (*Zea mays* L.) in seed samples from Nepal. *Afr J Biotechnol*, 9 (34), 5581–5589.
46. Shrestha HK, Hwu KK, Chang MC. 2010. Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase-chain reaction methods. *Trends Food Sci Tech*, 21, 442–454.
47. La Paz JL, Esteve T, Pla M. 2007. Comparison of Real Time PCR detection chemistries and cycling modes using Mon810 event specific assays as models. *J Agric Food Chem*, 55, 4312–4318.
48. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of RNA using real time PCR. *Nat protoc*, 1, 1559–1581.