



Kayseri Şehir Merkezinde Kasap ve Marketlerde Satışa Sunulan Sığır Etlerinde PCR Yöntemi ile Cinsiyet Tayini*

Korhan ARSLAN, Bilal AKYÜZ, Esmâ Gamze İLGAR

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı / Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Et büyüme ve gelişmenin tamamlanabilmesi için gerekli temel protein kaynağıdır. Et türleri içinde sığır eti tüketimi ülkemizde önemli bir yere sahiptir. Ette kalite standartlarından biri dişi ve erkek sığır etinin ayırımıdır. Erkek sığırlardan elde edilen etler dişilerden elde edilenlere göre daha kaliteli ve satış fiyatları daha yüksektir. Bu da kasaplık olarak satışa sunulan etlerde cinsiyet tayinini önemli kılmaktadır. Cinsiyetin belirlenebilmesi için farklı laboratuvar yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Y kromozomuna özgü genleri ayırt eden iki farklı primer seti kullanılarak, kasaplık olarak satışa sunulan sığır etlerinde cinsiyet tayininin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre kullanılan 30 adet et örneğinden 15'inin dişi 15'inin erkek cinsiyete ait bant görüntüleri verdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet, PCR, sığır eti

Determination of Gender by using PCR Method on Cattle Meats Sold in Butcher's and Markets in Kayseri City Center

Summary: Meat is an essential protein source required by the body for growth and development. Cattle meat has an important area in our country. Determination of gender is one of the quality standards for meat. The quality of meat obtained from male cattles is higher than that of female ones so the prices of male cattle meat is higher than female cattle meat. A number of methods have been developed for gender determination on meat. In this study, Y chromosome-specific genes that distinguish two different primer sets on the availability of gender determination in cattle meat was aimed to investigate with the polymerase chain reaction (PCR). PCR results were obtained on meat samples (30); 15 female, 15 male genders were determined through gel-electrophoresis images.

Key Words: Gender, PCR, cattle meat

Giriş

Et, vücutta büyüme ve gelişmenin devamlılığı ve metabolizmanın düzenlenmesi için gereken proteinleri, aminoasitleri, vitamin ve mineralleri içerdiği için çok değerli bir besin kaynağıdır. İnsan beslenmesinde ihtiyaç duyulan proteinin %40-50'sinin hayvansal kökenli gıdalardan sağlanması gereklidir. Gelişmiş ülkelerde günlük protein ihtiyacı çoğunlukla et ve et ürünlerinden karşılanmaktadır (12). Bu durum et ve işlenmiş et ürünlerinin tüketiminde devamlı bir artışa neden olmaktadır. Et ürünlerinin çeşitliliğinde ve tüketiminde görülen artış kullanılan etlerde kalite standartlarının gelişme-

sine sebep olmuştur (12, 13). Gıda Tarım Örgütü İstatistik Bölümü (Statistics Division of Food and Agriculture Organization, FAOSTAT) 2009 yılı verilerine göre Türkiye'de tüketime sunulan yıllık kişi başına düşen et miktarı kg bazında 4,5 kg büyükbaş (sığır-manda) eti, 4,2 kg küçükbaş (koyun-keçi) eti, 16,6 kanatlı (tavuk-hindi) eti ve 1,2 kg balık etidir (9). FAOSTAT tarafından bildirilen son kesim verilerine göre ülkemizde 2012 yılında yaklaşık 799.344 ton sığır eti elde edilmiş ve tüketime sunulmuştur (9).

Sığır etleri, elde edildiği hayvanın cinsiyeti ve yaşı göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Dişi sığır etleri erkek sığır etlerine göre özellikle karkas ağırlığı, mermerleşme ve yağlanma skoru gibi kalite standartlarında daha düşük kalitededir (23). Dişi hayvanlar öncelikli olarak üreme ve süt üretimi hedefi ile yetiştirilmekte bu nedenle yaşlandıklarında veya damızlık dışı bırakıldıklarında kesime sevk edilmektedir. Yaşa bağlı olarak kas liflerinin uzun-

Geliş Tarihi / Submission Date : 6.12.2013

Kabul Tarihi / Accepted Date : 28.08.2014

*Bu çalışma 24-26 Ekim 2013 tarihleri arasında Makedonya'nın "Ohrid" Şehrinde düzenlenen "2nd International Symposium on - Traditional Foods from Adriatic to Caucasus" da poster olarak sunulmuştur.

luk ve sertliği artmakta buna paralel olarak kollajen düzeyindeki artış dişi hayvanlardan elde edilen etin kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle, genel olarak et kalitesi standartlarına göre erkek sığır eti, inek veya düve etine göre daha kaliteli kabul edilmekte dolayısıyla yüksek fiyatta satışa sunulmaktadır (24). Bu da kasaplarda satılan veya paketlenmiş et ve et ürünlerinde erkek sığır eti etiketi altında dişi sığır eti kullanılarak tüketicinin aldatılması riskini ortaya çıkarmaktadır (5).

Kasaplık olarak satılan etlerde ve işlenmiş et ürünlerinde kullanılan etin elde edildiği hayvanların cinsiyetini belirlemek için enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) (20), kromatografi, yüksek performans-atmosferik basınç ve kimsayasal iyonizasyon kullanılarak yapılan sıvı kromatografi (LC-APCI-MS-MS) (6) ve gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) (14) gibi hormon analizine dayanan immunokimyasal metodlar kullanılmış ve kullanılmaktadır.

Ancak DNA kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin geliştirilmesi ile son yıllarda et ve et ürünlerinde cinsiyet tayini için kolay ve ucuz olması nedeniyle PCR tabanlı moleküler tanı testlerinden faydalanılmaktadır (1, 18, 21). Genomik DNA kullanılarak yapılan PCR temelli çalışmalar, X ve Y kromozomlarında bulunan amelogen (AMELX ve AMELY) (4, 8, 10, 24) ve zinc finger genlerinin (ZFX and ZFY) varlıklarının ortaya konması prensibine dayanmaktadır (15, 25). Bunun yanında gerçek zamanlı PCR, SYBR Green (3) ve TagMan (17) teknolojisinin de sığır cinsiyet tayininde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada Kayseri şehir merkezinde kasaplık et olarak satışa sunulan sığır etlerinde PCR yöntemi ile etlerin elde edildiği hayvanların cinsiyetlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve DNA Ekstraksiyonu

Çalışmanın materyalini oluşturan 30 farklı sığır eti örneği Kayseri şehir merkezindeki farklı kasap ve marketlerden temin edilmiştir. Cinsiyeti bilinen bir dişi, bir erkek sığır DNA'sı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Toplanan et örneklerinden 10 mg'lık parçalar alınarak uygun parçalama tamponu ile muamele edilmiş ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan DNA'lar Sambrook ve ark. (19) tarafından bildirilen fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiştir.

PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonu için sığır Y kromozomuna özgü iki primer seti kullanılmıştır. Primelerden birisi Kami-

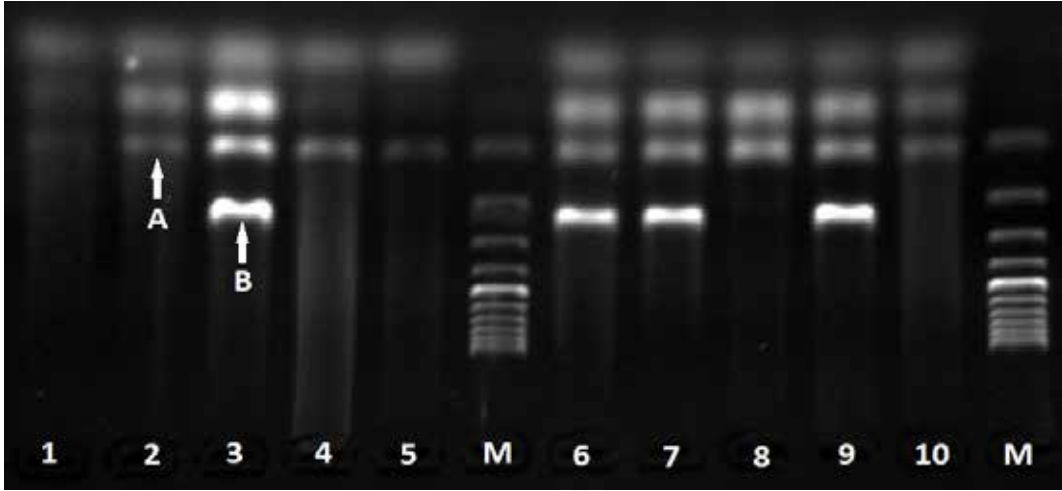
mura ve ark. (14) tarafından önerilen ve çalışma ekibi tarafından Male-I olarak adlandırılan Y- kromozomuna özgü No. AC234853.4 accession numaralı primer setidir. Male-I primer seti forward olarak 5'-TGG ACA TTG CCA CAA CCA TT-3' ve reverse olarak ise 5'-GCT GAA TGC ACT GAG AGA GA-3' şeklinde baz dizisine sahiptir. Her iki cinsiyet içinde ortak olan primer seti forward 5'-GCC CAA GTT GCT AAG CAC TC-3' ve reverse 5'-GCA GAA CTA GAC TTC GGA GC-3' şeklinde baz dizisine sahiptir.

Çalışmada kullanılan ikinci primer seti ise Lopes ve ark. (16) tarafından önerilen, Y kromozomuna özgü ve No. AC247032.3 accession numaralı ve çalışma ekibi tarafından Male-II olarak adlandırılan primer seti kullanılmıştır. Male-II primer seti forward 5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3' ve reverse 5'-GCT ATGC TAA CAC AAA TTC TG-3' şeklinde baz dizisine sahipken, yine bu primer seti ile birlikte her iki cinsiyet için ortak olan baz dizisi forward 5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3' ve reverse 5'-TCG TCA GAAACC GCA CAC TG-3' primer setleridir. Kurulan PCR reaksiyonlarında; 1.5 µl DNA, 2 U Taq polimeraz, 50 µM dNTP Mix ve 0.2 µM hem Y kromozomuna özgü hem de her iki cinsiyet için ortak primerler ilave edilerek toplam hacmi 37 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Male-I primer seti kullanılarak yapılan PCR işlemi 94°C'de 5 dakika başlangıç denaturasyonunu takiben her bir döngüsü; 94°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde 50 döngüyü takiben örneklerin 72°C'de 10 dakika tutulmasından sonra PCR işlemi tamamlanmıştır.

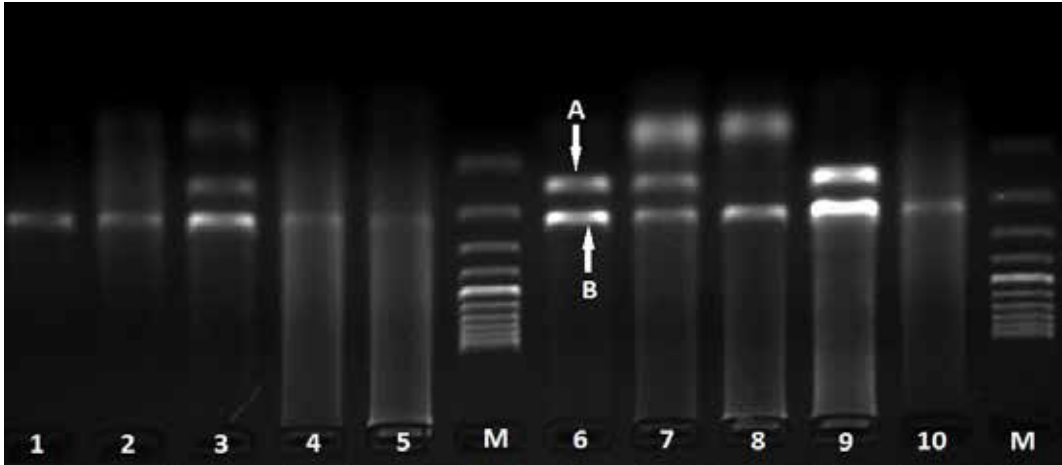
Male-II primer seti kullanılarak yapılan PCR işlemi ise 95°C'de 5 dakika başlangıç denaturasyon aşamasından sonra her bir döngüsü; 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye olacak şekilde 33 döngü yapılmış ve son döngüyü takiben örnekler 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlanmıştır. Çalışmada kullanılan et örneklerinin cinsiyetleri, Male-I ve Male-II primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforesi işlemi sonucunda belirlenmiştir.

Bulgular

Male-I primeri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu elde edilen jel-elektroforez görüntüsünde dişi cinsiyeti temsil eden 102 bp uzunluğunda tek bant, erkek cinsiyeti temsil eden 102 bp ve 226 bp uzunluğunda iki bant görülmüştür (Şekil 1). Male-II primeri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda ise dişi cinsiyeti temsil eden 216 bp uzunluğunda tek bant, erkek cinsiyeti temsil eden 141 bp ve 216 bp uzunluğunda iki bant görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 1. Male-I Primeri ile yapılan agaroz jel elektroforez görüntüsü: A:102 bp (♀), B:102, 226 bp (♂); 1, 2, 4, 5 ve 8 ♀ cinsiyete sahip olduğunu saptanılan örneklerin PCR görüntüsü; 3, 6 ve 7 ♂ cinsiyetine sahip olduğunu saptanılan örneklerin PCR görüntüsü; 9: (+) kontrol ♂ PCR görüntüsü; 10: (+) kontrol ♀ PCR görüntüsü; M: 100 bp'lik DNA ladder (O'Gene Ruler, Fermentas).



Şekil 2. Male-I Primeri ile yapılan agaroz jel elektroforez görüntüsü: A:141 bp (♀), B:141, 216 bp (♂); 1, 2, 4, 5 ve 8 ♀ cinsiyete sahip olduğunu saptanılan örneklerin PCR görüntüsü; 3, 6 ve 7 ♂ cinsiyetine sahip olduğunu saptanılan örneklerin PCR görüntüsü; 9: (+) kontrol ♂ PCR görüntüsü; 10: (+) kontrol ♀ PCR görüntüsü; M: 100 bp'lik DNA ladder (O'Gene Ruler, Fermentas).

Farklı primer setleri kullanılarak yapılan PCR işlemlerinden elde edilen ürünler ayrı ayrı agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak görüntülenmiştir. Her iki işlemde elde edilen sonuçların birbirini desteklediği gözlenmiştir. Buna göre çalışmada kullanılan 30 adet sığır eti numunesi pozitif kontroller ile karşılaştırılmış ve örneklerin 15'inin dişi, 15'inin ise erkek cinsiyeti temsil eden bant görüntüsü verdiği belirlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Kesim sonrası karkaslarda cinsiyet tayininin morfolojik muayene ile kesin sonuçlar veremeyece-

ği ve satış sırasında hileler yapılarak tüketicinin hem ekonomik hem de kalite bakımından zarara uğratılabileceği düşünülmektedir (5). Market ve kasaplarda satılan etlerin cinsiyet tayininin tespiti için birtakım metotlar geliştirilmiş ve bunlarında en hızlı ve en güvenilir olanının PCR tekniği olduğu bildirilmiştir (24). Dişi sığır etleri süt üretimi için yetiştirilen yaşlı inekler ve damızlık değerini kaybetmiş ineklerden elde edildiği için erkek sığır etinden daha düşük kaliteli olarak değerlendirilir (21). Türkiye'de üretilen sığır etlerinin Et ve Süt Kurumu'nun (7) kalite sınıflandırması ve alım fiyatları (kaynak) incelendiğinde alımı yapılan etlerde I. kalite (erkek cinsiyete sahip hayvanlar) etlerin III. kalite (dişi cin-

siyete sahip sığır etleri dahil) etlere göre % 19'luk bir fiyat farkıyla daha yüksek fiyatta alıma sunulduğu görülmektedir. Ülkemizde TÜİK 2009 verilerine göre % 30 oranında dişi sığır eti (düve, inek) tüketime sunulmaktadır (22). Dolayısıyla alım sonrası satılan kasaplık etlerin elde edildiği hayvanların cinsiyetlerinin belirlenmesinin; haksız kazancın önüne geçilmesi ve tüketiciye kalite standartlarına uygun ürünlerin sunulması açısından önemsenmesi gerektiği düşünülmektedir. Tüketime sunulan et ürünlerinde kullanılan etin elde edildiği hayvanların cinsiyetlerini belirlemek için bugüne kadar yüksek duyarlılık ve hassasiyete sahip hormon bazlı immunokimyasal metotlar kullanılmış ancak, yüksek maliyet ve teknik kısıtlamalar sebebiyle kasaplık etlerde cinsiyet tayininde bu yöntemlerin rutin olarak kullanılması sınırlı kalmıştır.

Et ve et ürünlerinde kullanılan etlerin kaynağının ve cinsiyetlerin belirlenmesinde PCR tabanlı moleküller genetik metotların kullanımının; kolaylığı, süresi ve maliyeti nedeniyle son yıllarda artış gösterdiği bildirilmektedir (1, 21). Ballin ve ark. (3) tarafından yapılan bir çalışmada X ve Y kromozomuna ait sekanslara spesifik bölgeleri tanıyan amelogenin lokusunun real-time PCR (RT-PCR) metodu ile sığır etlerinde cinsiyet tayini araştırılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda kullanımı gittikçe yaygınlaşan RT-PCR tekniğini uygulamak uzmanlık ve teknik alt yapı gerektirmekte, ayrıca ekonomik açıdan yaptığımız bu çalışmaya kıyasla daha pahalı olduğu düşünülmektedir. Bai ve ark. (2) Y kromozomunda bulunan SRY geni için üretilmiş farklı primer setini ilkel bir sığır türü olan Yak'larda kullanmış ve cinsiyet tayininde başarılı olmuşlardır. Diğer taraftan Gokulakrishnan ve ark. (11), Amelogenin ve SRY genlerinin incelendiği dubleks PCR metodunu kullanarak bu iki gene ait primerlerden yapılan PCR sonuçlarının birbirini desteklediğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada PCR tekniği kullanılarak Kayseri ilinde satışı sunulan kasaplık et örneklerinde cinsiyet tayini için PCR tabanlı hızlı, güvenilir ve basit bir moleküler protokolün uygulanabilirliği ile bu moleküler protokolden kullanılabileceği bildirilen iki farklı primer setinin sonuçlarının karşılaştırılması hedeflenmiş ve PCR analizinde kullanılan iki primer setinin sonuçlarının da birbiriyle ve pozitif kontroller ile örtüştüğü ortaya konmuştur. Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar, cinsiyet tayininde PCR teknolojisinin kısa zamanda sonuç veren ekonomik bir yöntem olduğu düşüncesini desteklemiş ve PCR işleminde kullanılan iki primer setinin de et örneklerinde cinsiyetlerin belirlenmesinde kullanılabilir olabileceği kanısını oluşturmuştur. Özellikle Avrupa birliğine uyum sürecinde gerek Türkiye'de satışı sunulan et gerekse ithal edilen paketli et

ürünlerinde kalite standartlarını yükseltmek ve ekonomik açıdan tüketicileri tuzağa düşürücü bir takım eğilimlerin önüne geçilmesi hususunda PCR yönteminin ucuz, uygulanabilir ve kısa sürede sonuç alınabilir bir çözüm olabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Appa Rao KBC, Kesava Rao V, Kowale BN, Totey SM. Sex-specific identification of raw meat from cattle, buffalo, sheep and goat. *Meat Sci* 1995; 39(1): 123-6.
2. Bai WL, Yin RH, Zhao SJ, Li C, Ma ZJ, Yin RL. A PCR assay for sex determination of yak (*Bos grunniens*) meat by amplification of the male specific SRY gene. *Food Control* 2010; 21(5): 726-31.
3. Ballin NZ, Madsen KG. Sex determination in beef by melting curve analysis of PCR amplicons from the amelogenin locus. *Meat Sci* 2007; 77(3): 384-8.
4. Checa ML, Dunner S, Canon J. Prediction of X and Y chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis. *Theriogenology* 2002; 58(8): 1579-86.
5. Curi A, Mota L, Amarante M, Lopes C. Bovine carcass sexing by PCR method. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2002; 39(3): 147-8.
6. Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Lucentini L, Cammarata P. Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatog A* 2000; 870(1-2): 511-2.
7. Et ve Süt Kurumu, <http://www.esk.gov.tr/tr/10223/Alim-Fiyatlari>; Erişim Tarihi: 03.03.2014.
8. Ennis S, Gallagher TF. A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Anim Genet* 1994; 25(6): 425-7.
9. FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/compare/Q/QC/E>; Erişim Tarihi: 03.03.2014.

10. Fontanesi L, Scotti E, Russo V. Differences of the porcine amelogenin X and chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(11): 1662-8.
11. Gokulakrishnan P, Kumar RR, Sharma BD, Mendiratta SK, Sharma D. A duplex PCR assay for sex determination of cattle meat by simultaneous amplification of SRY, AMELX and AMELY genes. *Food Biotechnol* 2012; 26(1): 75-84.
12. Göğüş A K. Et Teknolojisi. Ankara: Ankara Üniv Zir Fak Yayınları, 1986; s. 291.
13. Gray JI, Gomaa EA, Buckley DJ. Oxidative quality and shelf life of mets. *Meat Sci* 1996; 43(1): 111-3.
14. Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K, Hamana K. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology* 1997; 43(1): 1563-9.
15. Kirkpatrick BW, Monson RL. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J Reprod Fertil* 1993; 98(2): 335-40.
16. Lopes RF, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 2000; 56(9): 1383-92.
17. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 2006; 66(9): 2202-9.
18. Robertson BC, Gemmell N J. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology. *Conserv Genet* 2006; 7(2): 267-71.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second Edition. New York: Cold-Spring Harbor, 1989.
20. Simontacchi C, Marinelli L, Gabai G, Bono G, Angeletti R. Accuracy in naturally occurring anabolic steroid assays in cattle and first approach to quality control in Italy. *Analyst* 1999; 124(3): 307-12.
21. Tagliavini J, Bolchi A, Bracchi P G, Ottonello S. Sex determination on samples of bovine meat by polymerase chain reaction. *J Food Sci* 1993; 58(2): 237-8.
22. TÜİK, Hayvancılık İstatistikleri. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>; Erişim Tarihi: 03.03.2014
23. Zaujec K, Mojto J, Gondeková M. Comparison of meat quality in bulls and cows. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 43(3): 160-5.
24. Zeleny R, Schimmel H. Sexing of beef A survey of possible methods. *Meat Sci* 2002; 60(1): 69-75.
25. Zinovieva N, Palma G, Muller M, Brem G. A rapid sex determination test for bovine blastomeres using allele specific PCR primers and capillary PCR. *Theriogenology* 1995; 43(1): 365.

Sorumlu Yazar:

Yrd. Doç. Dr. Korhan ARSLAN
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Genetik Anabilim Dalı / Kayseri
E-posta: korhanarslan@erciyes.edu.tr
Tel: (0352) 207 66 66-29751