EK-1

Genetiği Değiştirilmiş Mısır Çeşidi Mon810'un Real Time PCR Metodu ile Tespiti ve Kantifikasyonu için TaqMan Prob Geliştirme ve Optimizasyon

Proje No: 109O482

Prof. Dr. G. Candan (Gürakan) Gültekin
Dr. Houman Jabbari Farhoud
Dr. Remziye Yılmaz

EKİM 2010
ANKARA

Önsöz

Son yıllarda modern biyoteknoloji yöntemleri ile üretilen gıdalar marketlerde görülmeye başlanmıştır. Bu gıdaların biyogüvenliği, regülasyonları, etiketlenmeleri halen tartışma konusudur. Avrupa Birliğin (AB) de genetik modifiye organizma (GDO) ların gıda üretiminde kullanılmaları için onaylanmaları gerekmektedir. Bu nedenle, genetik modifiye gıdaların kantifikasyon ve tespit çalışmaları bu gıdaların yasal düzenlemelerinde önemli rol oynamaktadır.

Laboratuvarımızda Türkiye de marketlerde bulduğumuz GDO Bt11 çeşitli mısırlar için nicelik analizleri ve prob geliştirime kapsayan çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu analiz metotlarının olası mısır çeşitlerini içerecek şekilde artırılması Türkiye deki olası GDO mısırların, pahalı kitleri kullanmaksızın, tespitinin gerçekleştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu projenin amacı mısırda genetik modifikasyon çeşitlerinden Bt11 dışında dünya piyasalarında sıklıkla bulunan MON810 Bt mısır çeşidinin Real-Time yani Eş zamanli PCR cihazı ile tespit ve quantifikasyonunda kullanılmak üzere prob ve yöntem geliştirmektir.

İÇİNDEKİLER

Özet.....7
Abstract.....9
Giriş.....11
Genel bilgiler 11
Event: Mon810.....13
Yöntem/Bulgular 15
DNA izolasyonu:.....16
Konvansiyonel PCR.....16
35S promoter'ın tespiti.....17
***Cry1Ab* geninin tespiti**.....18
Nested PCR.....19
Event-spesifik PCR.....21
Real-time PCR: Mon810 miktar tayini.....23
Absolute kantifikasyon Yöntemi.....23
CRL-JRC 27
Relatif Kantifikasyon Yöntemi 32
Tartışma.....36
Kaynaklar.....38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: pV-ZMBK07 sekans bilgileri.....13

Tablo 2: pV-ZMGT10 sekans bilgileri.....14
.
Tablo 3: Örnekleme yıllarına göre örneklerin saysı ve çeşidi.....15

Tablo 4. Konvansyonel PCR çalışmalarında kullanılan primer bilgileri.....23

Tablo 5: Mon810 real-time PCR analizlerinde kullanılan primer (REFRANS: Designed in this study) ve probun dizilimleri.....24

Tablo 6: Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR miksi.....24

Tablo 7: Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR programı.....24

Tablo 8. Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon sonuçları

Tablo 9: TaqMan prob real-time PCR ile örneklerde tespit edilen Mon810 mısır miktarı.....27

Tablo 10: CRL-JRC valide yöntemi ile Mon810 real-time PCR analizlerinde kullanılan primer ve probun dizilimleri 28

Tablo 11: JRC valide yöntemi ile Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR miksi.....28

Tablo 12: JRC valide yöntemi ile Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR programı.....28

Tablo 13. JRC-CRL valide yöntemi ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon sonuçları.....31

Tablo 14. JRC-CRL valide yöntemi ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon (w/w %) sonuçları'nın "in-house" validasyonu.....31

Tablo 15. Kalibrasyon örneklerinin DNA konsantrasyonu ve teorik olarak DNA copya sayıları 32

Tablo 16: Mon810 mısırın relatif kantifikasyon yöntemi için kullanılan real-time PCR miksi.....33

Tablo 17: Mon810 mısırın relatif kantifikasyon yöntemi için kullanılan real-time PCR programı.....33

Tablo 18. *hmg* ve Mon810 spesifik real-time PCR uygulamaları ile elde edilen DNA kopya sayıları kullanılarak hesaplanan relatif quantifikasyon sonuçları 36

Tablo 19. 4M ve 4G örnekleri için elde edilen kantifikasyon sonuçlarının özeti.....37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: pV-ZMBK07 konstraktı.....13

Şekil 2: pV-ZMGT10 konstraktı.....14

Şekil 3. Zein geninin amplifikasyonu (277 bp).....16

Şekil 4. 35S promoter bölgesinin tespiti (227bp).....17

Şekil 5. 35S promoter bölgesi için LOD oranı tespit (227bp).....17

Şekil 6. *Cry1Ab* geninin tespiti (152 bp).....18

Şekil 7. *Cry1Ab* geni için LOD oranı tespiti (152 bp).....19

Şekil 8. Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron elementlerin.....19

Şekil 9. Nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron ortak bölgenin amplifikasyonu ve LOD tespiti (401 bp).....20

Şekil 10. Bilinmeyen örneklerde nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron ortak bölgenin amplifikasyonu (401 bp).....20

Şekil 11. Bilinmeyen örneklerde nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron elementlerin birleştiği bölge amplifikasyonu (149 bp).....21

Şekil 12. Mon810 gen konstraktı ve event-spesifik PCR analizleri için seçilen amplifikasyon bölgesi.....21

Şekil 13. Mon810 mısırn event-spesifik PCR ile tespiti için LOD belirlenmesi (231 bp).....22

Şekil 14. Bilinmeyen örneklerde Mon810 mısırn event-spesifik PCR ile tespiti (231 bp).....22

Şekil 15. Mon810 gen konstraktı ve real-time PCR analizleri için seçilen amplifikasyon bölgesi.....23

Sekil 16. Mon810 Refrans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....25

Sekil 17. Mon810 Refrans materyallerin C_t değerleri ile elde edilen standart grafik.....25

Sekil 18. Mon810 Refrans materyaller ve örnekler ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....26

Şekil 19. In-house validasyon çalışmalarında kullanılan genel yöntem.....26

Şekil 20. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....29

Sekil 21. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyaller.....30

Sekil 22. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyallerin C_t değerleri ile elde edilen standart grafik.....30

Şekil 23. Kalibrasyon örnekleri ile *hmg* specific real-time PCR amplifikasyon eğrileri.....33
Şekil 24. Kalibrasyon örneklerinin *hmg* specifik TaqMan real-time PCR yöntemi ile elde edilen standart grafik 34

Şekil 25. Kalibrasyon örnekleri ile Mon810 specific real-time PCR amplifikasyon eğrileri.....34

Şekil 26. Kalibrasyon örnekleri ve positif örnekler (4M ve 4G) ile Mon810 specific real-time PCR amplifikasyon eğrileri.....35

Şekil 27. Standard curve generated by Mon810 specific TaqMan real-time PCR of calibration samples.....35

Özet

Bu çalışmanın amacı genetiği değiştirilmiş Mon810 mısırın tespiti, tanımlanması ve miktar tayini için yeni yöntemlerin geliştirilmesidir. ODTÜ, Gıda Mühendisliği Bölümünde bulunan GMO Laboratuvarımızda önceki çalışmaların kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden üç yıl içinde (2006-2008) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden gelişigüzel biçimde toplanılan 88 işlenmemiş mısır örneğinde analizler yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda GM pozitif olarak bulunmuş İki mısır örneği pozitif kontol olrak seçilmiştir. Manuel CTAB yöntemi ile DNA eldesinden sonra, örneklerde genetik değişikliklerin p35S bölgesi tespiti ile taranması için konvansiyonel PZR yöntemi kullanılmıştır. Kalitatif PZR yöntemleri ile *cry* geni tespiti için hedefe özel tespit çalışmaları yürütülmüştür. Konstrakt-spesifik ve event-spesifik PZR deneyleri Mon810 GM mısır çeşinde genetik değişikliğin türünü tespit amacıyla tasarlanmıştır.

Özel primerler ve reporter ve quencher boyaları ile işaretli uygun problar TaqMan prob metodu kullanarak Mon810 mısır örneklerinde absolute ve relatif miktar tayini yapılması için tasarlanmıştır. Absolut ve relatif kantifikasyon sonuçları karşılaştırıldığında aralarında bağlantı bulunmuştur.

Geliştirilen miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla, her örnek için üç paralel uygulama, valide edilmiş CRL protokoluna göre yapılmıştır. Yerinde doğrulama metotları ile yapılan istatistiksel analizlerle nicelik deneylerinin hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir. Relatif Standart Sapma (RSD_r) değerlerine göre, Mon810 sisteminin absolut ve relatif kantifikasyonu için tekrarlanabilirlik validasyon sonuçlarının çoğu ENGL'nin GDO miktar tayini ile ilgili gerekli koşullarını karşılamaktadır.

Tarama çalışmaları, toplamda 5 örneği (H3, H48, H73, 4M, 4G) GM pozitif olarak göstermiştir. Mon810 yanlızca 2 örnekde (4M ve 4G) tespit edilmiştir. Relatif Kantifikasyon sonuçları ise 4M örneğinde %1.31 ve 4G örneğinde %20.82 olarak 0.9% eşik seviyesinin üzerinde bulunmuştur.

Bu çalışmada geliştirilen metotlar düşük maliyetleri ve ticari kitlere olan bağımlılığı azaltmaları nedeniyle Türkiye'de GDO testlerinin yaygınlaşmasına katkı sağlacaktır. Ancak, bu yöntemler için validasyon metotları tamamlanmalı ve diğer GM mısırları kapsayacak şekilde metotlar geliştirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, Mon810, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Miktar tayini (kantifikasyon)

Abstract

This study describes development of methods for screening, identification and quantification of Mon810 genetically modified maize event. Totally 88 maize samples collected randomly throughout Turkey in three years from 2006 to 2008, were analyzed in our laboratories. Two maize samples that were detected as GM positive in previous studies were selected as positive controls. Following the DNA extraction by manual CTAB method, conventional PCR methods were employed for screening of genetic modifications in samples by detecting of P-35S. Qualitative PCR methods were conducted for target specific detection of *cry* gene. Construct-specific and event-specific PCR assays were designed for detection of Mon810 maize event.

Specific primers and corresponding probes labeled with reporter and quencher dyes were designed for both absolute and relative quantification of Mon810 in samples by using TaqMan probe method. Comparing the absolute and relative quantification results indicates that there is correlation between them.

In order to verify the accuracy of the quantification methods, three parallel applications were conducted according to the CRL validated protocol. The statistical analyses were performed to check the precision and repeatability of the quantification experiments by in-house validation methods. Regarding the Repeatability Relative Standard Deviation (RSD_r) values of absolute and relative quantifications Mon810 systems majority of the validation results accomplish the ENGL requirements for quantification of GMOs.

According to screening assays, the overall results indicate that five samples (H3, H48, H73, 4M, 4G) were detected as GM positive. By relative quantification method amount of Mon810 in samples was determined as 1.31 % for 4M and 20.82% for 4G which is higher than 0.9% threshold level.

Since the methods developed in this study reduce dependence on commercial kits they would contribute to expansion of GMO testing in Turkey with lower cost. However the methods developed in this work should be extended to other maize events and their validation procedures should be completed.

Keywords: Genetically modified organisms, Mon810, PCR, Quantification

Giriş

İnsanların besin kaynağı olarak büyük öneme sahip olan mısır projenin temel araştırma konusunu oluşturmaktadır. Mısır gıda endüstrisinde büyük öneme sahip besinlerden biridir. Verimi arttırmak amacıyla genetik mühendisliğinden yararlanılarak bu gıda maddesini belirli türde böceklere karşı dirençli hale getirmek mümkün olmuştur. Son yıllarda Amerika ve çoğu Avrupa ülkesinde genetik modifiye gıdalar market raflarında yer almaya başlayarak gittikçe artan bir öneme sahip olmuşlardır. Amerika da FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ürünler etiketlenmez iken AB de ise onaylı yani otorizasyonu yapılmış ürünlerde 0.9 % üzerinde GDO içeren ürünlerde etiketlenme zorunluluğu vardır. Tüketicinin genetik modifiye gıdaları kullanıp kullanmama hakkı göz önünde bulundurularak, bunların etiketlenmesi gerektiği düşünülmüştür. Avrupa ülkelerinde bu tür gıdalar tüketiciye ulaşmadan önce gerekli teşhis ve kantifikasyon analizleri yapılarak, aktarılan genin tespit edilmesi ve 0.9 % in üzerideki otorize edilmiş (onaylı) ürünlerin ‘’GMO’’ olarak etiketlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Otorize edilmemiş GM ürünlerde ise sıfır-tolerans (zero-tolerans) sistemi uygulanmaktadır.

Bugüne kadar Türkiye de yapılan çalışmalarda çoğunlukla ithal edilen mısırlarda PCR yöntemleri ile 35S promotör ve nos-terminatör bölgeleri gibi genetik elementlerin tespit edilmesi ve genetik modifikasyonları işaret eden gen bölgelerinin tespit edilmesi, genetiği değişitirilmiş mısırlarda çeşit ve kantifikasyon çalışmalarının gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu projenin amacı Türkiyede bulunan mısır örneklerinde konvensiyonel ve Real-Time PCR yöntemleri kullanılarak Mon810 olası modifikasyonunun tespiti için maliyeti düşük ve çok numune ile çalışabilen metot geliştirmektir.

Genel bilgiler

Genetiği modifiye edilmiş bitkilerden üretilen ürünlerin artmasıyla birlikte bu gıdalarla ilgili etiketleme ve gerekli düzenlemelerin yapılması için uygun yöntemlerin kullanımı zorunlu olacaktır. Genetiği değiştirilmiş gıdaları doğal gıdalardan ayırmak için kullanılan metodlar iki ana başlık altında toplanabilir: DNA ve protein bazlı metodlar (Farid E. Ahmed, 2002). ELISA ve bioassay yöntemleri GDO kontaminasyonlarinda spesifik proteinleri tespiti

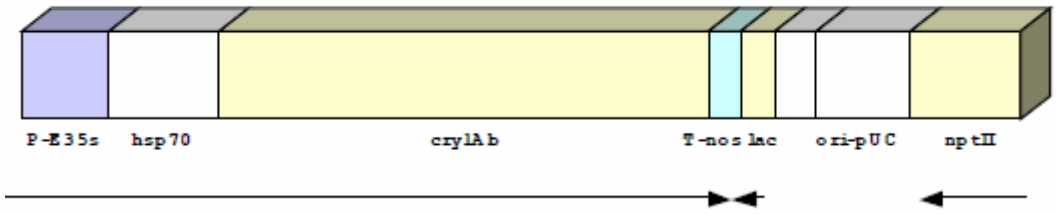
amacıyla kullanılmaktadır. DNA metodlarında kullanılan yöntemler ile varyete spesifik ürünler veya genel olarak genetiği değişmiş varyetelerin tespiti mümkündür (Kok EJ, Scholten IMJ, Angeline Van Hoef AM and Aarts HJM, 2000). Polimeraz Zincir Reaksiyonu genetik olarak değiştirilmiş ürün ve gıdalarda belli bir geni hedef alarak bu geni çoğaltmak için kullanılmaktadır. Mısırda 35S promotör, NOS terminatör, KanR ve patatin gen bölgelerinin PCR yöntemi ile amplifiye edilerek saptanmasına dayanan çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda genetik modifiye organizmaların çeşitliliğinin artışıyla birlikte daha spesifik PCR yöntemleri (konstrukt veya event specific PCR) geliştirilerek modifikasyonun niteliğinin saptanması ve bu modifikasyonların onaylanması gerekli hale gelmiştir. (Zimmermann, A., J. Lüthy, 2000), (Brunnert H., Spener F., 2001), (Terry, C., N. Harris, 2005), (Taverniers, I., P.Wiendels, E. Van Bockstaele, 2005). Nitelik olarak GMO tespitinin yeterli olmaması sebebiyle (Christian Wolf, Margitta Scherzinger, Andreas Wurz, Urs Pauli, Philipp Hübner, Jürg Lüthy (2000), çalışmaların daha sonraki aşamalarında nicel GMO tespiti büyük önem kazanmıştır, bu amaçla kullanılan karşılaştırmalı PCR tekniği sayesinde aktarılan genin sayısal değeri hakkında bilgi edinilmesi mümkün hale gelmiştir (Philipp Hübner, Edgar Studer, Jürg Lüthy, 1999), (Georg A. Schreiber, 1999), (A. Wurz, A. Bluth, P. Zeltz, C. Pfeifer, R. Willmund (1999), Hernandez, M., Pla, .M, Esteve,T., Prat, S., Puigdomenech, P. & Ferrando, A. (2003). Son yıllarda genetik modifikasyon teknikleri alanında önemli gelişmeler meydana gelmiştir. Günümüzde toplam 18 genetiği değiştirilmiş mısır varyetesi OECD ülkeleri tarafından kayıt edilmiş bulunuyor. Böceğe dayanıklık ve herbisit direnci genetiği değiştirilmiş mısırların en önemli iki özelliği sayılmaktadır. GM mısırda böceğe direnç özelliği Bt serisinin toksik protein geninin bitki hücresine taransformasyonu ile elde edilmektedir.

Tarama sonucunda pozitif bulunan örneklerde konstruct ve event spesifik PCR çalışmaları ile genetik modifikasyonun çeşidi tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada amaç rekombinant hat üzerindeki farklı genlerin birleşme noktalarına (konstruct specific) ve/veya transformasyona özgü (event specific) primerler dizayn edilerek MON810 genetiği değiştirilmiş mısır çeşitinin bulunması olasılığı araştırmaktır. DNA dizi analizleri ile konvansyionel PCR yöntemleri ile elde edilen fragmantların beklenen fragmantlar olduğu onaylanacaktır.

Real-time PCR ile pozitif örneklerde genetiği değiştirilmiş mısırın oranını tespit etmek için nicelik içeren çalışmalar yapılacaktır. Bu çalışmalar sırasında TaqMan prob yöntemleri kullanarak prob tasaramları geliştirilmesi planlanmaktadır. Hazır kitleri kullanmaktansa, geliştirilecek böyle bir yöntem, maliyeti azaltacağı gibi rutin olarak gelecekte bu analizleri yapan Türkiyede ki laboratuvarlarda kullanılabilecektir.

Event: Mon810

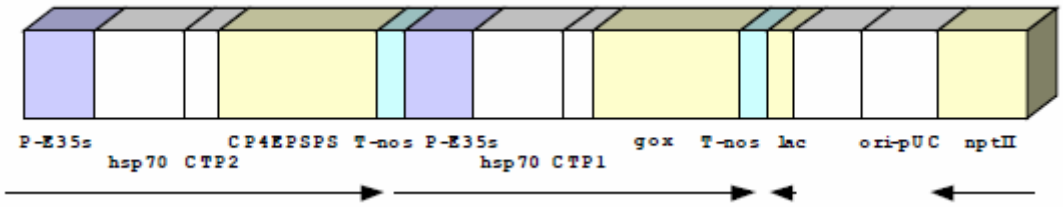
Mon810 mısır hattı Hi-II mısır genotipi pV-ZMBK07 ve pV-ZMGT10 plazmid vektorlerinin Hi-II mısır genotipin'e tranformasyonu sonucu üretilmiştir. pV-ZMBK07 plazmidi *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*'den izole edilen *cry*1A(b) geni içermektedir. *Cry1A(b)* geninin transkripsiyonu CaMV 35S promotör ve nos terminatör ile kontrol edilmektedir. 35S promotör ve *cry*1A(b) geni arasında mısır heat-shock proteini olan *hsp70* geni intron bölgesi olarak bulunmaktadır. İkinci plazmid ise CP4 EPSPS ve *gox* genlerini içermektedir. Her iki plazmid bakteriyel promotör ile kontrol edilen *nptII* genine sahiptir. Transformasyon metodu olarak mikoropartikül bombardıman yöntemi kullanılmıştır. pV-ZMBK07 ve pV-ZMGT10 plazmitlerinin gen haritası ve detaylı sekans bilgileri alttakı resimler ve tabalolarda verilmiştir (Moens W. 2003), (BATS, 30/06/2003).



Şekil 1: pV-ZMBK07 konstraktı

Simgeler	Elementin adı	Boyut (KB)
P-E35s	P-E35s	0.61
hsp70	heat-shock protein 70	0.8
	cry1Ab delta-endotoxin	3.46
T-nos	T-nos	0.26
lac	beta-galactosidase	0.24
Space	Space	-
ori-pUC	ori-pUC	0.65
nptII	neomycin phosphotransferase	0.79

Tablo 1: pV-ZMBK07 sekans bilgileri



Şekil 2: pV-ZMGT10 konstraktı

Simgeler	Elementin adı	Boyut (KB)
P-E35s	P-E35s	0.62
hsp70	heat-shock protein 70	0.8
CTP2	Chloroplast Transit Peptide 2	0.31
CP4EPSPS	CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	1.4
T-nos	T-nos	0.24
P-E35s	P-E35s	0.62
hsp70	heat-shock protein 70	0.8
CTP1	Chloroplast Transit Peptide 1	0.26
gox	glyphosate oxidoreductase	1.3
T-nos	T-nos	0.24
lac	beta-galactosidase	0.24
Space	Space	-
ori-pUC	ori-pUC	0.67
nptII	neomycin phosphotransferase	0.79

Tablo 2: pV-ZMGT10 sekans bilgileri

Mon810'nun genomik DNA'sı üzerine yapılan Southern blot analizleri *Cry*1Ab geninin "enhanced" CaMV 35S (E35S) promoter ve hsp70 öncü sekansı ile birlikte bitkiye transforme olduklarını göstermektedir. Gen kasetinin 3' ucunda ki PV-ZMBK07 plazmidinde bulunan NOS 3' terminator bölgesi kırpma işlemi uygulanarak bitkiye transfer edilmemiştir ve bu nedenle Mon810 hattında bulunmamaktadır.

Konvansiyonel PCR ile elde edilen pozitif örnekler'de Gerçek-zamanlı PCR ile nicelik analizleri geliştirilebilmektedir. Bu analizlerin sonucunda konvansyionel PCR sonuçları onaylanıp ve örneklerde genetiği değiştirilmiş DNA'nın oranı total DNA'ya karşı ölçülebilir (Chiueh, L. *et al*., 2005). Genetik modifiye mısırların tanımında kullanılan TaqMan prob gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile kesin ve güvenilir sonuçlar vermektedir. (Cankar K.*et.al,* 2007), (Heide B.R. *et.al*, 2008). Bir çok ülkede GM gıdaların varlığı veya yokluğu konusunda

geniş çalışmalar yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır (Abdullah T. *et.al.* 2006), (Greiner R., *et.al.* 2005).

Bu projede öncelikle konvensiyonel PCR ile GDO mısır çeşitlerinden MON810 için gen haritasına bağlı olarak çeşit (line) tespit edilmiştir. Bu tespite dayalı olarak MON810 çeşidi için prob tasarlanması ve sentezi sonrası, kantifikasyon çalışmaları ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak yöntem geliştirme çalışmaları başlatılmıştır. Bu amaçla genetik modifiye mısır referans materyallerine özel konstrakt spesifik veya transformasyona özgü primerler sentezlenerek konvensiyonel ve Real-Time PCR ile amplifikasyonlar sağlanmış, modifikasyonun niteliği belirlenmiş ve sonrasında ise kantitatif analizler için gerekli olan, miktara özel standart eğriler oluşturulmuştur.

Yöntem/ Bulgular:

Laboratuvarımızda önceki çalışmaların kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanılan 88 işlenmemiş mısır örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bugüne kadar sayısı 88'e ulaşan bu örneklerin büyük çoğunluğu Ankara'da bulunan marketler va pazarlardan alınmıştır. Bu örneklerin bir kısmı ambalajlı paketlerden ve diğerleri piyasada açık şekilde satılan mısırlardan toplanmıştır. Mısır ve mısır tohumu olarak sınıflandırılan örnekler de piysada açık veya ambalajlı paketlerde bulunmaktadır. Örneklerin sayısı, çeşit ve toplanma yılına göre alttaki tabloda verilmiştir.

YIL	Mısır Koçanı	Kuru Mısır	Tohum	Toplam
2006	14	6	7	**27**
2007	13	8	9	**30**
2008	9	13	9	**31**
				88

Tablo 3: Örnekleme yıllarına göre örneklerin saysı ve çeşidi

Mon810 GDO mısır çeşidi referans materyalleri IRMM (Institute for Reference Material and Measurement) den temin edilmiştir. Ek olarak, çalışmaları Türkiye de bulunmuş bir örnekle teyit etmek amacı ile Tarım bakanlığı İl kontrol GMO laboratuvarı tarafından Melike Baran'a ait doktora tezi çalışması sırasında bulunan pozitif örnek istenmiş ve 4M olarak etiketlenerek

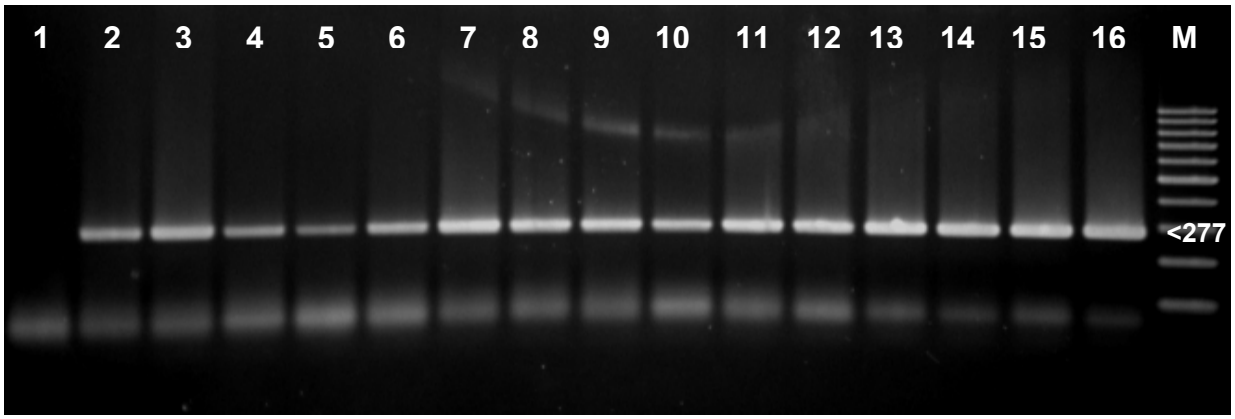
PCR çalışmalarında pozitif örnek olarak kullanılmıştır. Ayrıca laboratuvarımızda 2004 tarihinde GDO pozitif olarak tespit edilen 4G olarak adlandırılan mısır örneği de Mon810 taraması için toplanılan diğer örnekler ile PCR analizlerinde kullanılmıştır.

DNA izolasyonu:

DNA izolasyonu için manuel olan CTAB yöntemi kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve kalitesini ölçmek için DNA örnekleri agaroz jel elektroforezde yürütüldü ve spektroskopi ölçümleri yapılmıştır. Her örnekte DNA konsantrasyon miktarı baz alınarak DNA örnekler steril distile suda sulandırılmıştır. Sulandırılan örneklerin bir miktarı sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 10ng/µl'ye ayarlanıp ve -20º de saklandı, geri kalanı stok olarak -80º de derin dondurucuda tutulmuştur.

Konvansiyonel PCR:

Elde edilen DNA'nın mısıra ait olduğunu onaylamak ve DNA'da PCR'ı engelleyen faktörlerin var olup olmadığını kontrol etmek amacıyla ilk aşamada ZEIN3 ve ZEIN4 (Studer et al., 1997) primerleri sentezlenip ve mısır bitkisine özel zein geni PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Eğer hedef DNA örnekte mevcut ve amplifiye edilebiliyorsa, 277 bazlık bölgenin amplifiye edilmesi beklenmektedir. PCR ürünün agaroz jel elektroforezde yürütülüp, etidium bromid ile boyanmasından sonra, jel göruntüleme cihazında fotoğrafı çekilmiştir (Şekil3).



Şekil 3. Zein geni amplifikasyonu (277 bp)1.DNAsız kontrol (DSK), 2. Mon810 0%, 3. Mon810 2%, 4. Mon810 5%, 5. No:1, 6. No:2, 7. No:3, 8. No:4, 9. No:5, 10.No:6, 11.No:7, 12.No:8, 13.No:9, 14.No:10, 15. M4, 16.G4

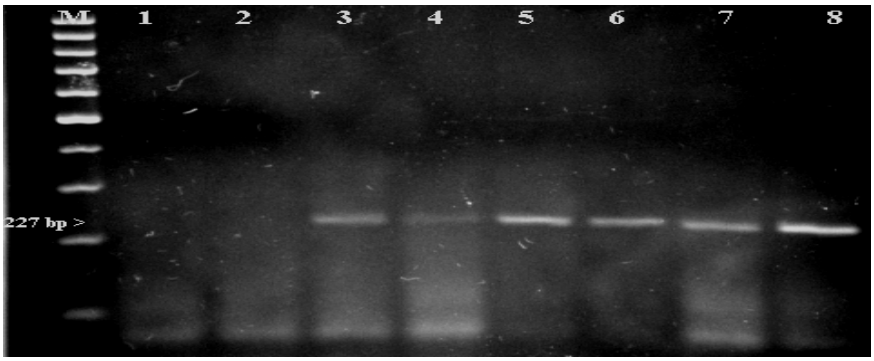
Konvansiyonel PCR çalışmalarımızda kullanılan primer bilgileri aşağıda ki Tablo da (Tablo 4) verilmiştir.

Primerler	Sekans	Amplikon uzunluğu	Referans
Zein -03 Zein-04	AGTGCGACCCATATTCCAG GACATTGTGGCATCATCATTT	277	Querci. *et al*,2002
35S_227_F 35S_227_R	AAGGGTCTTGCGAAGGATAG AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT	227	Bonfini L. 2007
Cry1A_152_F Cry1A_152_R	GGACAACAACCCAAACATCAAC GCACGAACTCGCTGAGCAG	152	Matsuka, T 2000
mg1 mg2	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT	401	Zimmermann, A. 1998
mg3 mg4	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC	149	Zimmermann, A. 1998
Mon810F Mon810R	TCGAAGGACGAAGGACTCTA CTTGCTTTGAAGACGTGGTT	231	This Study

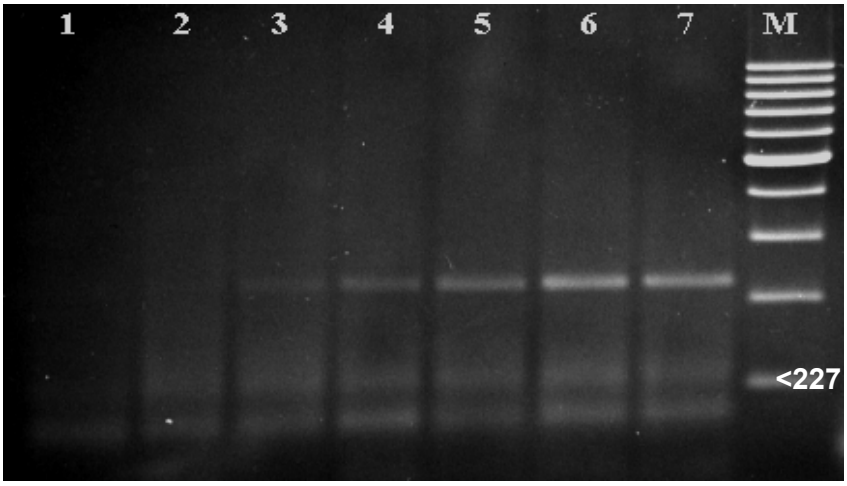
Tablo 4. Konvansyonel PCR çalışmalarında kullanılan primer bilgileri

35S promoter tespiti:

Bu aşamadan sonra tarama metodu ile CaMV 35S promoter bölgesinin tespiti konvansiyonel PCR yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla 35SF/35SR JRC valide primerleri sentezlenerek 227 bazlık bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR koşulları Mon810 Standart Referans Materyal (CRM) kullanarak optimize edilerek adı geçen genetik elementin varlığı örneklerde araştırılmıştır. Mon810 referans materyalleri kullanılarak LOD (limit of detection) oranı tespit edilerek yöntemin hassasiyeti belirlenmiştir. PCR ürünleri agaroz jel elektorforezde yürütülüp, etidyum bromid'de boyandıktan sonra jel görünüleme cihazında fotografı çekilmiştir (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4. 35S promoter bölgesinin tespiti (227bp) **M.** (100bp Ladder), **1:** DSK, **2:** 0.0% Mon810, **3:** 5.0% Mon810, **4:** H3, **5:** H48, **6:** H73 **7:** 4M, **8.** 4G , (1.5% agarose gel)

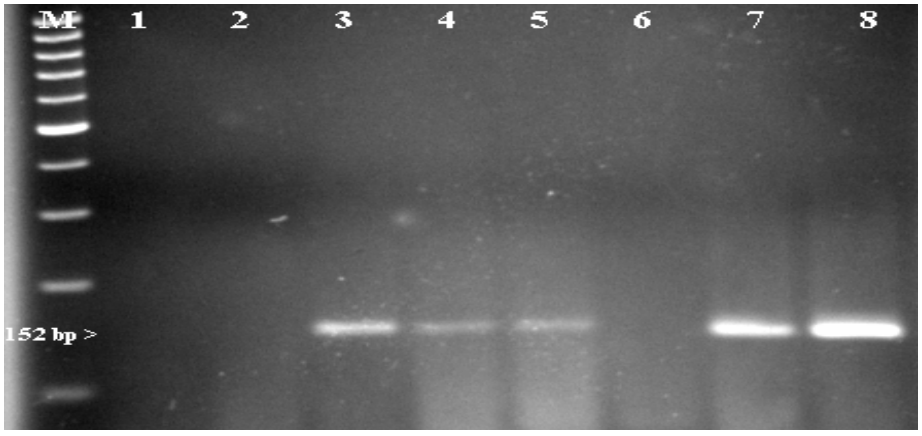


Şekil 5. 35S promoter bölgesi için LOD oranı tespit (227bp). **1.** DSK, **2.** 0%, Mon810 **3.** 0.1%, Mon810 **4.** 0.5% Mon810, **5.** 1.0% Mon810, **6.** 2.0% Mon810, **7.** 5.0% Mon810, **M.**100bp ladder

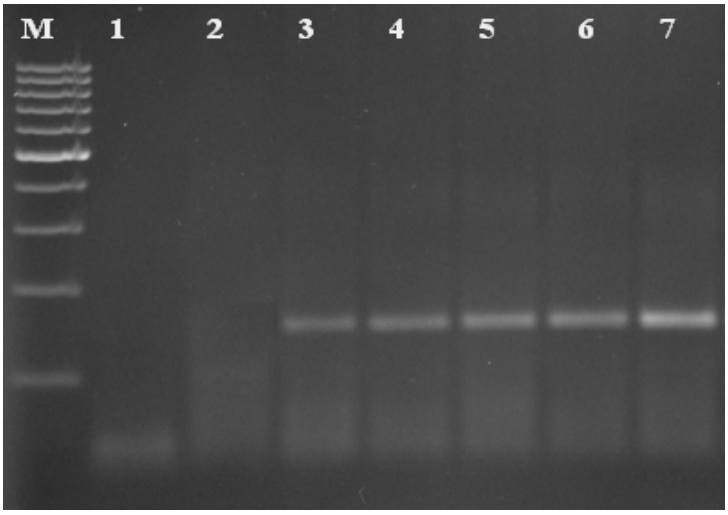
Konvansiyonel PCR ile 35S promoter taraması sonucunda beklenen 227 bazlık PCR ürünü H3, H48, H73, 4M ve 4G örneklerinden elde edildi. Bu çalışmada Saptama Limiti (LOD) 0.1% olarak belirlenmiştir.

***Cry1Ab* geninin tespiti:**

Konvansyonel PCR çalışmalarının devamında Mon810 gen konstaktında bulunan Cry geninin tespiti amacıyla uygun primerler sentezlenmiştir. Mon810 Standart Referans Materyali kullanılarak PCR koşulları optimize edilerek *Cry1Ab* geninin 152 bazlık bir bölgesi amplifiye edilmiştir. Örneklerde konvansyonel PCR yöntemi ile *Cry1Ab* geninin varlığı araştırılmıştır. Mon810 referans materyalleri kullanımı ile LOD (limit of detection) oranı tespit edilerek yöntemin hassasiyeti belirlenmiştir. PCR ürünleri %1.7 agaroz jel elektorforezde 80 dakika yürütülüp, etidyum bromid'de boyandıktan sonra jel görünüleme cihazında fotografı çekilmiştir (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6. *Cry1Ab* geninin tespiti (152 bp), **M.** (100bp Ladder), **1:** DSK, **2:** 0.0% Mon810, **3:** 5.0% Mon810, **4:** H3, **5:** H48, **6:** H73 **7:** M4, **8.** G4 , (1.5% agarose gel)

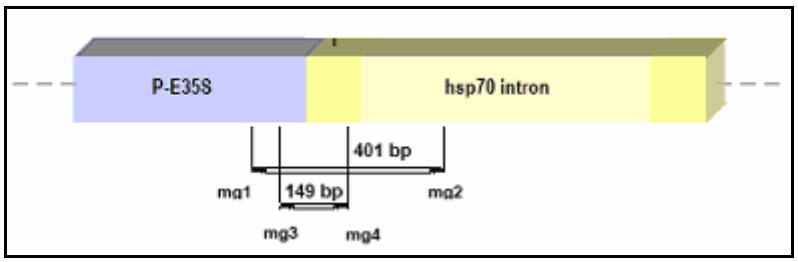


Şekil 7. *Cry1Ab* geni için LOD oranı tespiti (152 bp). **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** 0% Mon810, **3.** 0.1% Mon810, **4.** 0.5% Mon810, **5.** 1.0% Mon810, **6.** 2.0% Mon810, **7.** 5.0% Mon810

Cry1A(b) geninin tespiti için yapılan konvansiyonel PCR çalışmaları sonucunda beklenen 152 bazlık PCR ürünü H3, H48, 4M ve 4G örneklerinden elde edildi. Bu çalışmada Saptama Limiti (LOD) 0.1% olarak belirlenmiştir.

Nested (yuvalanmış) PCR

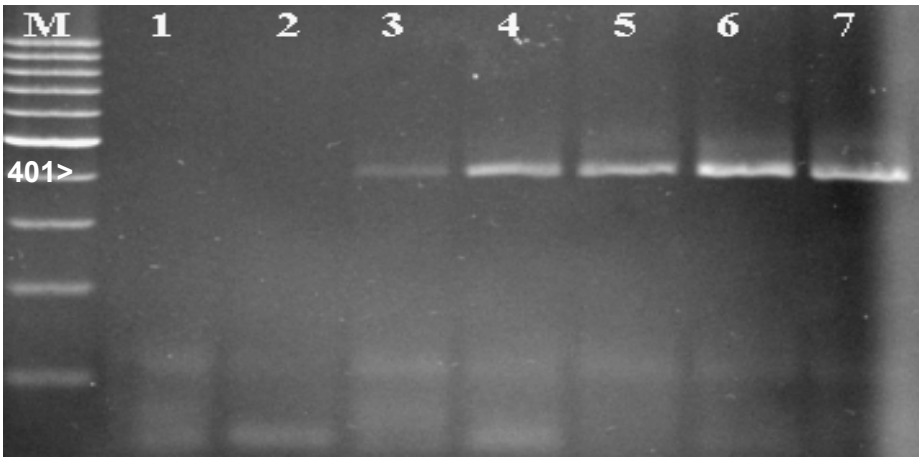
CaMV 35S promoter ve *Cry1Ab* geninin taramasından sonra pozitif olarak belirlenen örneklerde Mon810 mısırın tespiti için JRC tarafından geliştirilen valide yöntem kullanıldı. Bu amçla mg1/mg2 ve mg3/mg4 primer setleri sentezlendi, nested PCR yöntemi ile Mon810 mısırın spesifik tespiti yapıldı (Şekil 8).



Şekil 8. Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron elementleri

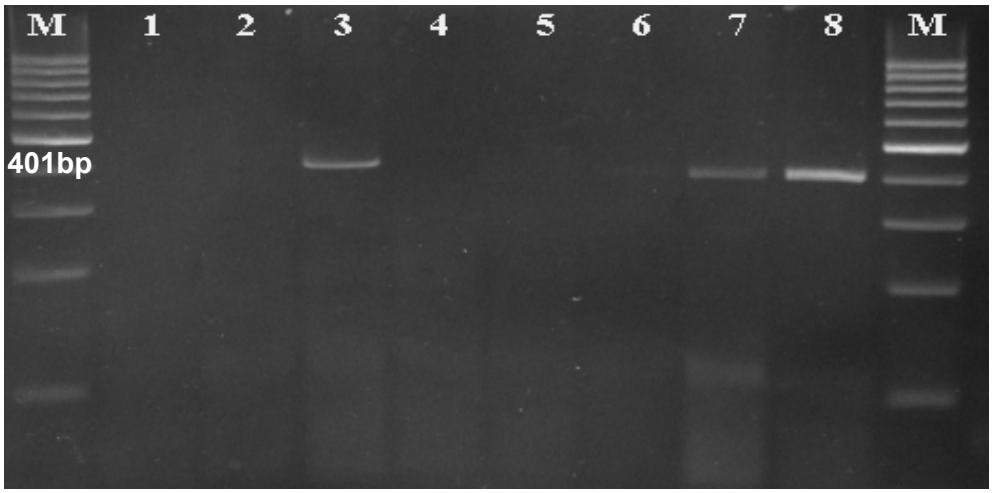
İlk aşamada mg1/mg2 primerleri Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron elementlerinin birleştiği noktayı da kapsayan 401 bazlık bölge konvansyonel PCR ile amplifiye edildi ve ayrıca Mon810 referans materyalleri kullanılarak LOD (Saptama Limiti)

oranı tespit edilerek yöntemin hassasiyeti belirlenmiştir. PCR ürünleri %1.3 agaroz jel elektorforezde 70 dakika yürütülüp, etidyum bromid'de boyandıktan sonra jel görünüleme cihazında fotografı çekilmiştir (Şekil 9).



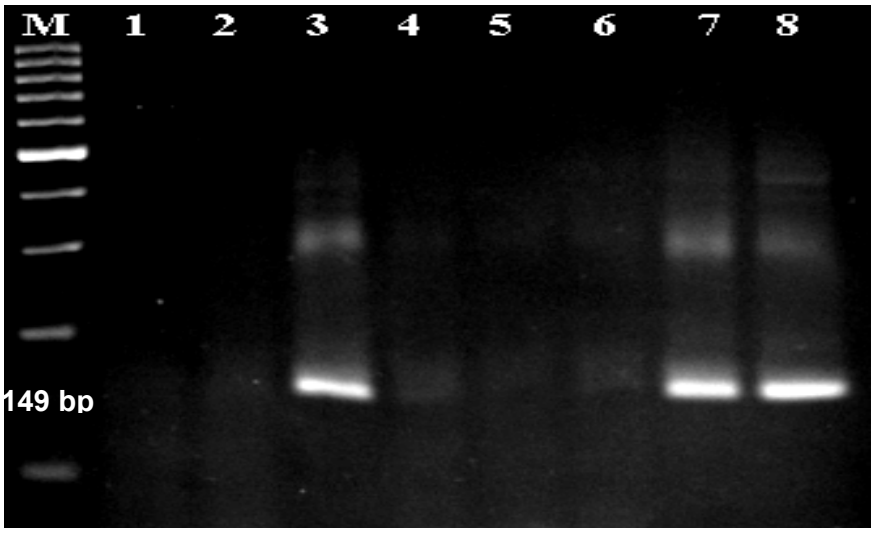
Şekil 9. Nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron ortak bölgenin amplifikasyonu ve LOD tespiti (401 bp), **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** 0% Mon810, **3.** 0.1% Mon810, **4.** 0.5% Mon810, **5.** 1.0% Mon810, **6.** 2.0% Mon810, **7.** 5.0% Mon810

Mon810 referans materyalleri ile PCR koşulları optimize edildikten sonra mg1/mg2 primerleri kullanılarak Mon810'a özel bölge örneklerde taranmıştır. PCR ürünleri %1.3 agaroz jel elektorforezde 70 dakika yürütülüp, etidyum bromid'de boyandıktan sonra jel görünüleme cihazında fotografı çekilmiştir. %0 Mon810 ve %5 Mon810 referans materilaller negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılan çalışmalarda 4M ve 4G örneklerinde amplifikasyon elde edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Bilinmeyen örneklerde nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron ortak bölgenin amplifikasyonu (401 bp). **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** Mon810 0%, **3.** Mon810 5.0%, **4.** No: 3, **5.** No:H48, **6.** No:H73, **7.** 4M, **8.** 4G, **M.**100bp ladder

Nested PCR'ın ikinci aşamasında ilk PCRdan elde edilen PCR ürünleri kullanılarak mg3/mg4 primerleri ile 149 bazlık P-E35S ve hsp70 intron elementlerin birleştiği bölge amplifiye edildi. PCR ürünleri %1.3 agaroz jel elektorforezde 70 dakika yürütülüp, etidyum bromid ile boyandıktan sonra jel görünüleme cihazında fotografı çekildi. %0 Mon810 ve %5 Mon810 referans materilallerin negatif ve pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmalarda 4M ve 4G örneklerinde amplifikasyon elde edilmiştir (Şekil 11).

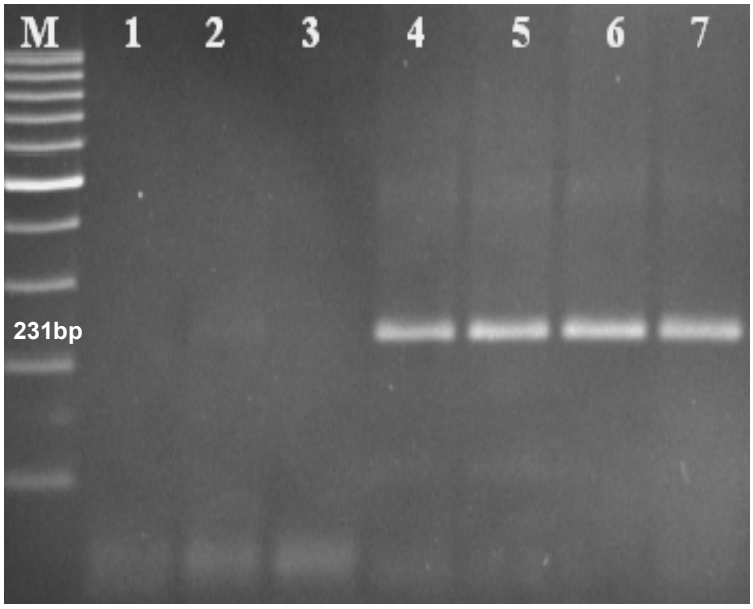


Şekil 11. Bilinmeyen örneklerde nested PCR ile Mon810 gen kostraktında P-E35S ve hsp70 intron elementlerin birleştiği bölge amplifikasyonu (149 bp). **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** Mon810 0%, **3.** Mon810 5.0%, **4.** No: H3, **5.** No:H48, **6.** No:H73, **7.** 4M, **8.** 4G

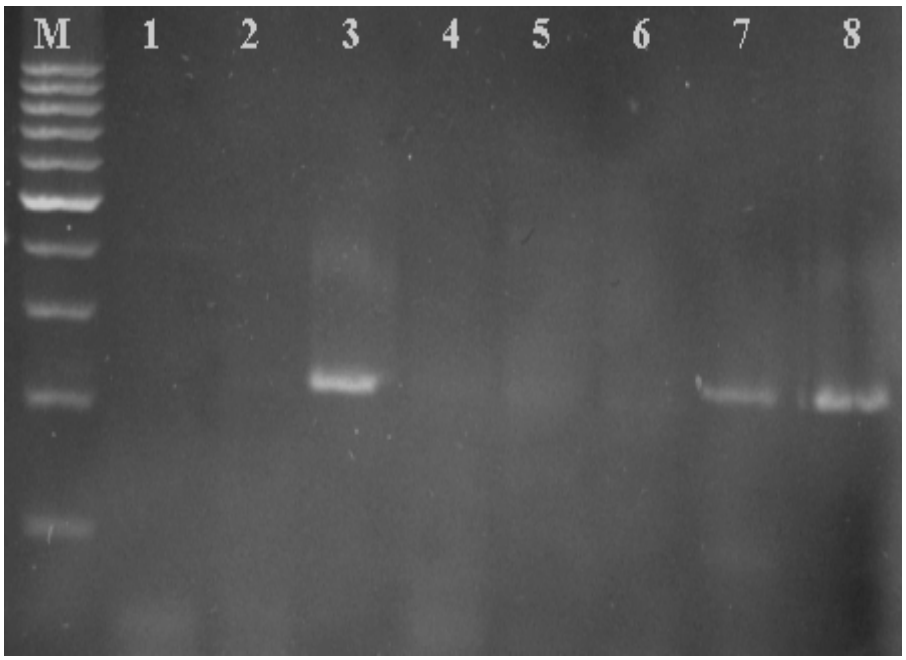
Event-spesifik PCR

Bu çalışmada Mon810 mısırın event-spesifik PCR ile tespiti için Primer3 programı (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) kullanılarak transgenik gen konstraktı ve genomik DNA'nın birleştiği bölgeyi kapsayan primerler bu çalışma kapsamında tasarlandı. (Şekil 12). Konvansiyonel PCR yöntemi ile Mon810F/Mon810R primerleri kullanılarak 231 bazlık bölge amplifiye edildi. PCR koşulları Mon810 referans materyalleri ile optimizasyon çalışmaları yapılarak yöntemin hassasiyeti (LOD) referans materyalleri ile test edildi (Şekil 13 ve 14).

Şekil 12. Mon810 transgenik gen konstraktı ve genomik DNA arasında kalan event-spesifik PCR analizleri için seçilen amplifikasyon bölgesi (Genebank Accession No. AF434709, AY326434 http://gmdd.shgmo.org)



Şekil 13. Mon810 mısırın event-spesifik PCR ile tespiti için LOD belirlenmesi (231 bp). **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** 0% Mon810, **3.** 0.1% Mon810, **4.** 0.5% Mon810, **5.** 1.0% Mon810, **6.** 2.0% Mon810, **7.** 5.0% Mon810



Şekil 14. Bilinmeyen örneklerde Mon810 mısırn event-spesifik PCR ile tespiti (231 bp). **M.**100bp ladder, **1.** DSK, **2.** 0% Mon810, **3.** 5.0% Mon810, **4.** H3, **5.** H48, **6.** H73, **7.** 4M, **8.** 4G

Bu çalışmada Mon810 mısırın event-spesifik tespiti için geliştirilen konvansiyonel PCR analizleri sonucunda beklenen 231 bazlık PCR ürünü 4M ve 4G örneklerinden elde edildi. Bu çalışmada Saptama limiti (LOD) 0.5% olarak belirlendi.

Mon 810 miktar tayini

Absolute kantifikasyon Yöntemi

Bu proje kapsamında laboratuvarımızda Mon810 gen kasetindeki genlerin ortak sınır bölgesini ve gen kasetinin bitkinin genomik DNA'sı ile birleşen bölgeyi kapsayan özel primerler ve prob'lar tasarlandı. TaqMan prob yönteminde kullanmak üzere Spesifik primerler ve ilgili probu 5'-FAM reporter ve 3'-TAMRA quencher boyaları olarak işaretlenerek web üzerinden online olarak erişebilen "Primer3" programı kullanılarak tasarlandı. Bu amaçla Mon810 gen kasetinde 131 baz uzunluğunda olan bitki/35S sınır noktası Real-time PCR da ampifiye edilmek üzere hedef bölge olarak seçildi. Özel primerler ve ilgili prob tasarlanarak 5'-FAM reporter ve 3'-TAMRA quencher boyaları ile işaretlendi (Şekil 15 ve tablo 5)

Şekil 15. Mon810 gen konstraktı ve real-time PCR analizleri için seçilen amplifikasyon bölgesi (Genebank Accession No. AF434709, AY326434 http://gmdd.shgmo.org)

	Oligonücleotid DNA Sekansı (5'→3')	Oligo (bp)	Amplikon (bp)	Referans
Mon810-F	5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTA-3'	20	131	Bu çalışma
Mon810-R	5'-ACGATGGCCTTTCCTTTATC-3'	20		
Mon810-P	5'-FAM-AGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATT-TAMRA-3'	26		

Tablo 5: Mon810 real-time PCR analizlerinde kullanılan primer (REFRANS: Bu çalışmada tasarlandı) ve probun dizilimleri ve büyüklükleri (REFERANS: Bu çalışmada tasarlandı)

Real-time PCR çalışmalarında 120 ng DNA and diğer reaksyon malzemeleri toplamda 25 mikrolitrelik hacimde ABI 7500 thermocycler cihazında inkübe edilerek amplifiye edildi. Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen uygun amplifikakasyon malzemelerin konsantrasyonları ve real-time PCR programı alttaki tablorda verilmektedir. (Tablo 6 ve 7)

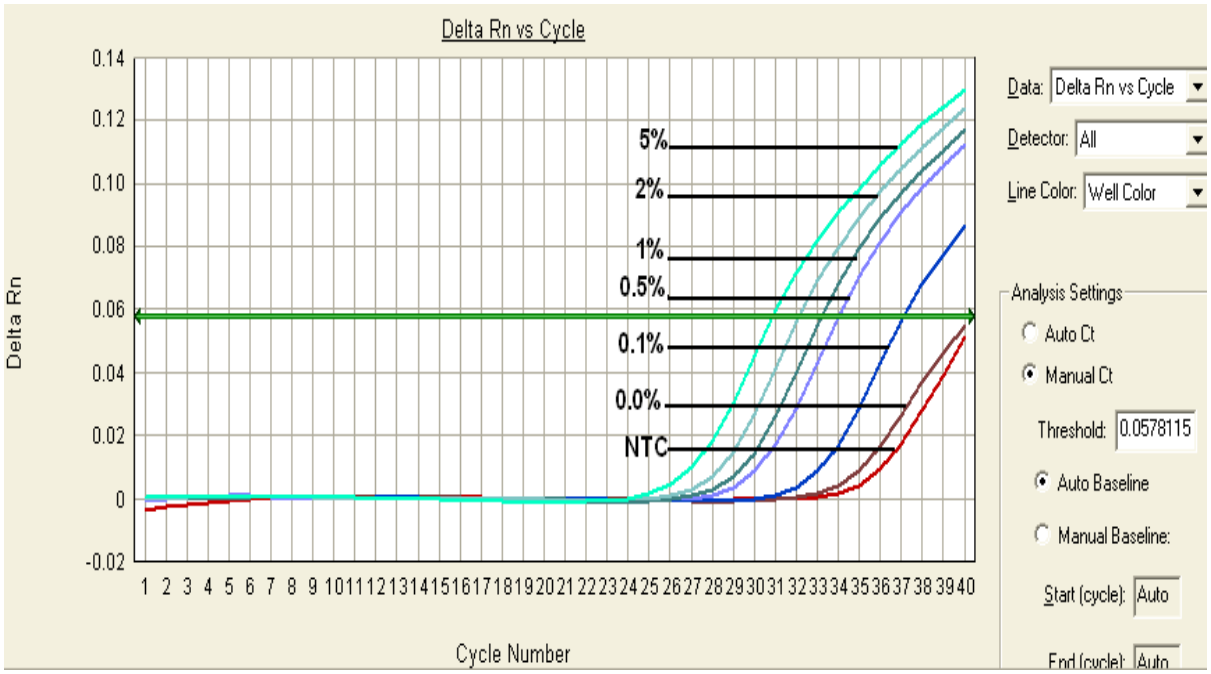
MaximaTM Probe qPCR master Mix (2X)	12.5 µl
İleri Primer	0.4 µM
Geri Primer	0.4 µM
Probe	0.2 µM
Template DNA	120 ng
Su, nucleaz – (arındırılmış)	to 25 µl
Total volume	**25 µl**

Tablo 6: Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR miksi

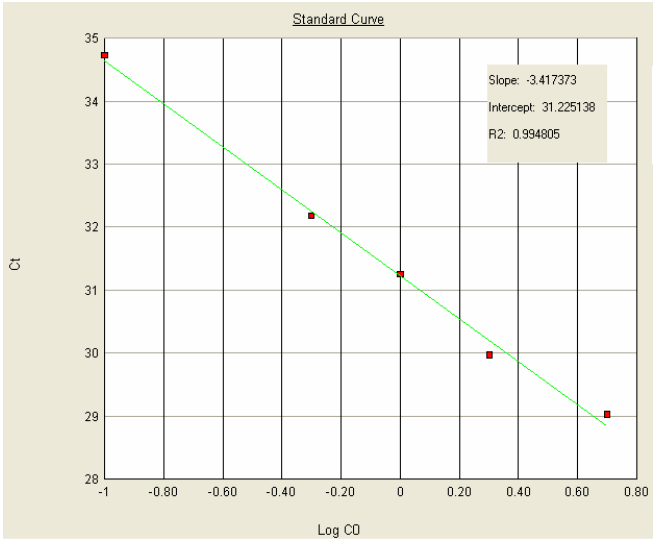
Step	**Temperature, ^{0}C**	**Time**	**Number of Cycles**
Başlangıç denaturasyonu	95	10 min	1
Denaturasyon	95	15 s	40
Annealing	60	30 s	
Extension	72	32 s	

Tablo 7: Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR programı

Real-Time PCR çalışmalarında Mon810 mısırlarının Referans materyalleri (0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%) kullanılarak amplifikasyon eğrileri elde edildi. Alttaki resimde görüldüğü gibi (Şekil 16) Mon810 pozitif standartlarda amplifikasyon grafikleri oluştururken negatif kontrol olarak kullanılan no template ve 0% Mon810 örneklerde amplifikasyon oluşmamıştır. Ayrıca amplifikasyon sonuçları, bu yöntem ile örneklerde %0.1 oranına kadar Mon810 miktar tespiti yapılabileceğini göstermektedir (Limit of Detection 0.1%). Mon810 Referans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri kullanılarak "Treshold Cycle" (C_t) değerleri belirlendi. Hesaplanan C_t değerleri ve standart materyallerin içerdiği Mon810 oranının logaritmik konsantrasyonu kullanılarak ile standart grafikleri çizildi (korelasyon katsayısı R^2= 0,994) (Şekil 17).

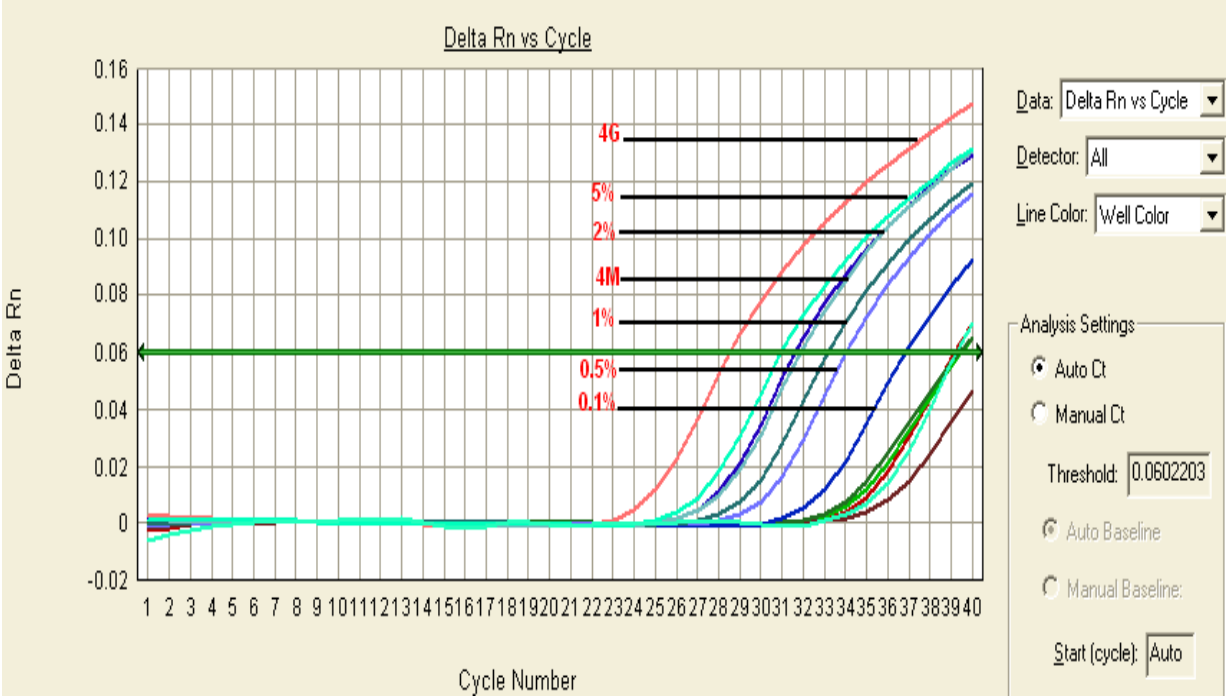


Sekil 16. Mon810 Referans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri (cihaz çıktısı)



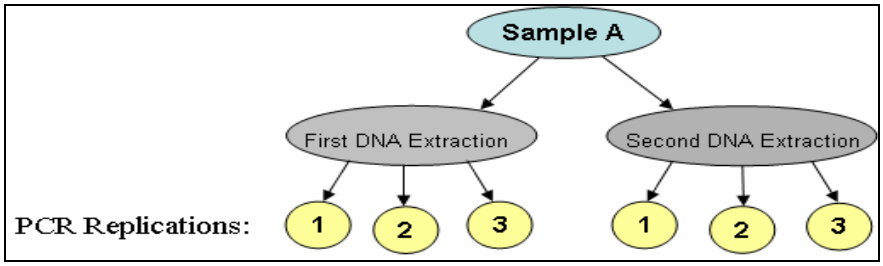
Sekil 17. Mon810 Referans materyallerin C_t değerleri ile elde edilen standart grafik(cihaz çıktısı)

Konvansyonel PCR yöntemleri ile GDO pozitif olarak tespit edilen H3, 48, 4M ve 4G örneklerinde real-time PCR analizleri yapıldı. Konvansyonel PCR ile elde edilen sonuçlardan beklendiği gibi sadece 4M ve 4G örneklerde amplifikasyon eğrileri gözlenmiştir. Konvansyonel PCR çalışmalarında 35S promotör ve nos-terminatör bölgeleri için pozitif sonuçlar veren H3, H48 ve H73'nolu örnek içinde real-time PCR analizleri uygulanmış ve bu örnekte Mon810 mısırının bulunmadığı tespit edilmiştir. (Şekil 18).



Sekil 18. Mon810 Referans materyaller ve örnekler ile elde edilen amplifikasyon eğrileri (cihaz çıktısı)

Bu çalışmada geliştirilen primer ve ilgili TaqMan prob kullanarak her pozitif örnek için birinci ve ikinci DNA izolasyonlarında elde edilen DNA'lar ile 3 ayrı real-time PCR analizi yapılarak örneklerin içerdiği Mon810 mısır oranı yüzde olarak (w/w %) belirlenmiştir. Bu şekilde her pozitif örnek için toplamda 6 kez Mon810 miktar tespiti yapılmıştır. Alttaki tabloda verildiği gibi tekrarlanan kantifikasyon çalışmaları ile uyum gösteren sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 19 ve tablo 8-9).



Şekil 19. In-house validasyon çalışmalarında kullanılan genel yöntem

	Örnek	C_t	Mon810 miktarı (w/w %)
1	NTC	Ölçülmedi	0.00
2	Mon810 0%	Ölçülmedi	0.00
3	Mon810 0.1%	36.89	0.10
4	Mon810 0.5%	33.82	0.50
5	Mon810 1.0%	33.01	1.00
6	Mon810 2.0%	31.93	2.00
7	Mon810 5.0%	30.67	5.00
8	H3	Undet.	0.00
9	H48	Undet.	0.00
10	H73	Undet.	0.00
11	4M	32.96	1.06
12	4G	28.40	18.93

Tablo 8. Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon sonuçları

	Birinci DNA Extraktı						İkinci DNA Extraktı						Averaj		
Sample	1	2	3	mean	Std.	RSD_r	1	2	3	mean	Std.	RSD_r	**mean**	Std.	RSD_r
4M	1,00	N.A.	2,20	1,60	0,85	53,12	1,10	1,10	1,20	1,13	0,06	4,61	**1,33**	0,50	37,87
4G	19,10	21,50	18,90	19,83	1,45	7,31	14,20	15,00	15,20	14,80	0,53	3,58	**17,32**	2,92	16,86

Tablo 9: TaqMan prob real-time PCR ile örneklerde tespit edilen Mon810 mısır miktarı

CRL-JRC valide Yöntemi:

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin doğruluğunu onaylamak amacı ile JRC tarafından Mon810 mısırın tespiti ve kantifikasyon için önerilen valide protokol kullanıldı. Bu çerçevede adı geçen protokolde geliştirilen TaqMan prob ve primerler sentezlenerek real-time PCR çalışmaları yapıldı. JRC protokolune uygun olarak Mon810 gen kasetinin 5'ucundan bitkinin genomik DNA'sı ile birleşen 92 baz uzunluğunda bölgeyi kapsayan özel primerler ve TaqMan prob sentezlendi (tablo 10).

	Oligonucleotide DNA Sekansı (5'→3')	Oligo (bp)	Amplicon (bp)	Referans
Mail-F1	5′-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT-3′	24	92	CRL-JRC
Mail-R1	5′-GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT-3′	24		
Probe Mail-S2	5′FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCCAGC-TAMRA3′	23		

Tablo 10: CRL-JRC valide yöntemi ile Mon810 real-time PCR analizlerinde kullanılan primer ve probun dizilimleri ve büyüklükleri

Real-time PCR çalışmalarında 120 ng DNA and diğer reaksyon malzemeleri toplamda 25 mikrolitrelik hacimde ABI 7500 thermocycler cihazında inkübe edilerek amplifiye edildi. Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen uygun amplifikakasyon malzemelerin konsantrasyonları ve real-time PCR programı alttaki tablolarda verilmektedir (tablo 11-12).

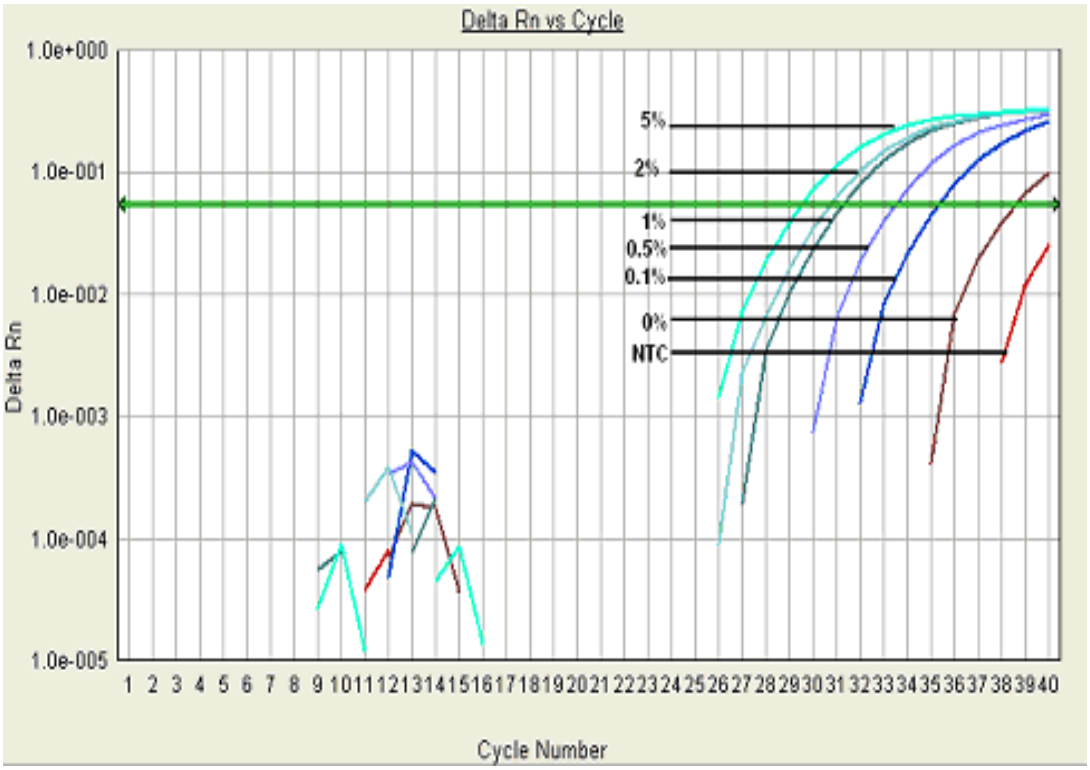
MaximaTM Probe qPCR master Mix (2X)	12.5 µl
İleri Primer	0.4 µM
Geri Primer	0.4 µM
Probe	0.2 µM
Template DNA	120 ng
Su, nucleaz- (arındırılmış)	to 25 µl
Toplam	**25 µl**

Tablo 11: JRC valide yöntemi ile Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR miksi

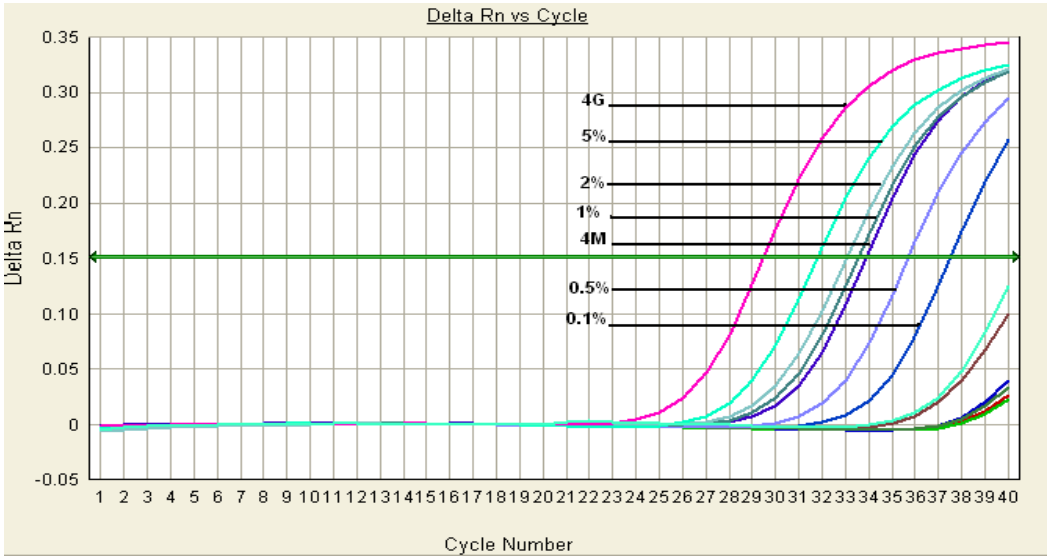
Step	Temperature, °C	Time	Number of Cycles
Başlangıç denaturasyonu	95	10 min	1
Denaturasyon	95	15 s	40
Annealing	60	30 s	
Extension	72	32 s	

Tablo 12: JRC valide yöntemi ile Mon810 mısırın tespiti için kullanılan real-time PCR programı

Önceki çalışmalarda olduğı gibi JRC protokolu ile yapılan real-time PCR deneylerinde Mon810 mısırlarının Referans materyalleri (0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%) kullanılarak amplifikasyon eğrileri elde edildi. Alttaki resimde görüldüğü gibi (Şekil 7), Mon810 pozitif standartlarda amplifikasyon grafikleri oluşutururken negatif kontrol olarak kullanılan no template ve 0% Mon810 örneklerde amplifikasyon oluşmamıştır. Amplifikasyon sonuçları bu yöntem ile %0.1 oranına kadar örneklerde Mon810 miktar tespiti yapılabileceğini göstermektedir (Limit of Detection 0.1%) (şekil 20-21).

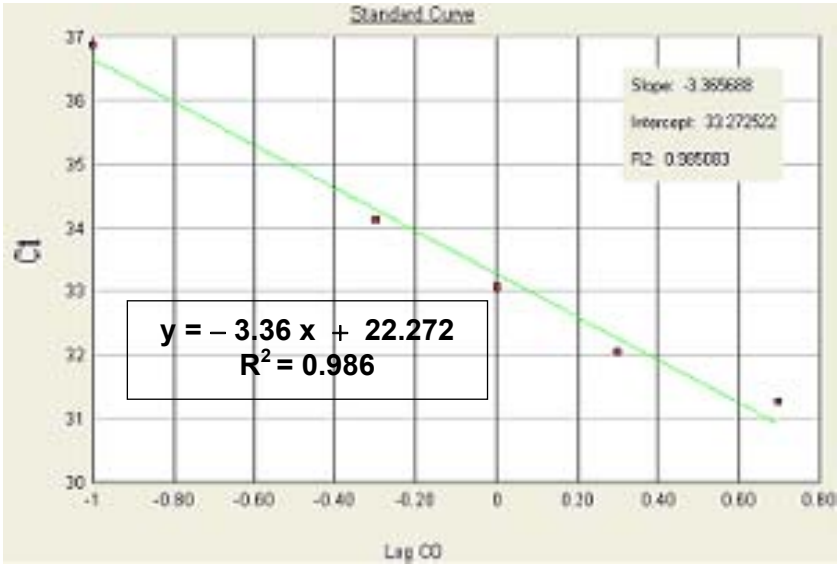


Şekil 20. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%,5%), (Cycle number vs. Delta Rn) (Cihaz çıktısı)



Sekil 21. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyaller (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%) ve örnekler ile elde edilen amplifikasyon eğrileri (Döngü sayısı Delta Rn'a karşı) (Cihaz çıktısı)

Mon810 Referans materyaller ile elde edilen amplifikasyon eğrileri kullanılarak "Treshold Cycle" (C_t) değerleri belirlendi. Hesaplanan C_t değerleri ve standart materyallerin içerdiği Mon810 oranının logaritmik konsantrasyonu kullanılarak standart grafikler çizildi (korelasyon katsayısı R^2= 0,986) (Şekil 22).



Sekil 22. JRC valide yöntem kullanılarak Mon810 Refrans materyallerin C_t değerleri ile elde edilen standart grafik (Log of Mon810 concentration vs. C_t value)

Son aşamada C_t değerleri kullanılarak standart grafikten elde edilen regression formula ile bilinmeyen örneklerde Mon810 miktarının yüzdesi absolute (w/w %) olarak hesaplandı

(Table 3.9). Elde edilen sonuçların doğruluğunu test etmek için Mon810 pozitif örneklerden ikinci DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA'lar ile 3 ayrı real-time PCR analizi uygulanarak istatistiksel testler ile sonuçların tutarlı olduğu gösterildi (tablo 13-14).

	örnek	C_t	Mon810 miktarı (w/w%)
1	NTC	Undet.	0.00
2	Mon810 0%	Undet.	0.00
3	Mon810 0.1%	37.45	0.10
4	Mon810 0.5%	35.64	0.50
5	Mon810 1.0%	33.51	1.00
6	Mon810 2.0%	33.04	2.00
7	Mon810 5.0%	33.73	5.00
8	H3	Undet.	0.00
9	H48	Undet.	0.00
10	H73	Undet.	0.00
11	4M	33.96	1.07
12	4G	29.50	20.57

Tablo 13. JRC-CRL valide yöntemi ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon sonuçları

	Birinci DNA Extraktı						İkinci DNA Extrakt						Averaj		
örnek	1	2	3	mean	std	RSD_r	1	2	3	mean	std	RSD_r	mean	std	RSD_r
4M	1,16	1,22	1,07	1,15	0,08	6,96	1,02	1,28	1,15	1,15	0,13	11,30	1,15	0,10	8,70
4G	20,50	22,70	26,10	23,10	2,82	12,20	24,80	23,70	24,90	24,47	0,67	2,73	23,78	1,98	8,33

Tablo 14. JRC-CRL valide yöntemi ile elde edilen Mon810 absolute quantifikasyon (w/w %) sonuçları'nın "in-house" validasyonu

Relatif Kantifikasyon Yöntemi

"Absolut" kantifikasyon çalışmaların devamında Mon810 mısır için geliştirilen TaqMan probe ve primerler relatif kantifikasyon yöntemi ile Mon810 miktar tayini için kullanıldı. Bu çerçevede mısır bitkisine özgü TaqMan probe ve primerler tasarlandı.

"Relatif" quantifikasyon analizlerin'de kalibrasyon örneklerini oluşturma amacıyla %5 standart refrans materyal (CRM) kullanılarak içerdiği haploid genomik DNA kopya sayısı ve Mon810 gen kopya sayısı hesaplandı. Mısır bitkisinin haploid genom büyüklüğü 2292–2716 Mbp aralığında tahmin edilmekte ve haploid genomun ağırlığı 2.5 pg'a takabül etmektedir. Dolaysıyla 100 ng mısır DNA'sı yaklaşık $3.8x10^4$ kopya haoplid genomik DNA içermektedir. Bu çalışmada 20ng/µl %5 Mon810 CRM örneği 6 kez ½ oranında seyretilerek standard örnekler serisi hazırlandı. Real time PCR uygulamaraında her reaksiyon için 5 µl DNA kullanıldığı öngörülerek standard örneklerde PCR karışımının içerdiği toplam gen kopya sayısı hesaplandı. Örneğin, stok %5 Mon810 CRM örneği (20ng/µl) için her reaksiyonda toplam DNA miktarı 100 ng olarak, içerdiği haploid genomik DNA kopya sayısı 38000'ne ve Mon810 DNA kopya sayısı yaklaşık 1900 kopyaya takabül etmektedir. Haploid genomik DNA ve Mon810 DNA kopya sayıları kalibrasyon örnekleri için hesaplandı (tablo 15).

Kalibration örnek (ng/µl)	Toplam DNA in Reaksiyon (ng)	Teorik *hmg* Kopya sayısı	Teorik Mon810 Kopya sayısı
20	100	38000	1900
10	50	19000	950
5	25	9500	475
2,5	12,5	4750	238
1,25	6,25	2375	119
0,63	3,15	1188	60
0,32	1,6	594	30

Table 15. Kalibrasyon örneklerinin DNA konsantrasyonu ve teorik olarak DNA kopya sayıları

JRC valide yöntemine uygun olarak bitikiye özel *high mobility group (hmg)* geni ve Mon810 event-spesifik bölgeye göre iki paralel real-time PCR uygulandı. Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen uygun amplifikakasyon malzemelerin konsantrasyonları ve real-time PCR programı alttaki tablolarda verilmektedir. (Tablo 16 ve 17)

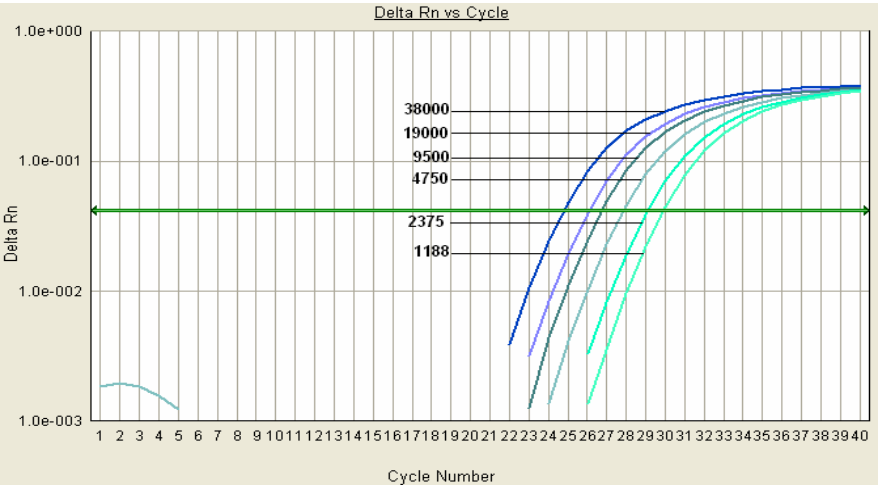
MaximaTM Probe qPCR master Mix (2X) (Fermentas)	12.5 µl
İleri Primer	0.4 µM
Geri Primer	0.4 µM
Probe	0.2 µM
Template DNA	120 ng
Water, nuclease –(arındırılmış)	to 25 µl
Toplam	**25 µl**

Tablo 16: Mon810 mısırın relatif kantifikasyon yöntemi için kullanılan real-time PCR karışımı

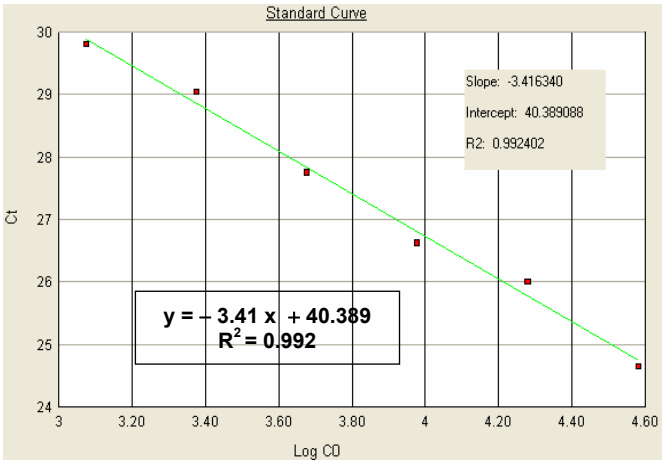
Step	Temperature, °C	Time	Number of Cycles
Başlangıç denaturasyon	95	10 min	1
Denaturasyon	95	15 s	40
Annealing	60	30 s	
Extension	72	32 s	

Tablo 17: Mon810 mısırın relatif kantifikasyon yöntemi için kullanılan real-time PCR programı

Alttaki resimde görüldüğü gibi (Şekil 2) *hmg* genine özel uygulanan real-time PCR çalışmasında kalibrasyon örnekleri ile amplifikasyon eğrileri elde edilerek "Treshold Cycle" (C_t) değerleri belirlendi. Kalibrasyon örnekleri için hesaplanan C_t değerleri ve içerdikleri Mon810 oranının logaritmik konsantrasyonu kullanılarak ile standart grafikleri çizildi (korelasyon katsayısı R^2= 0,992. oluşurken negatif kontrol olarak kullanılan no template örneğinde amplifikasyon oluşmamıştır (Şekil 23-24).

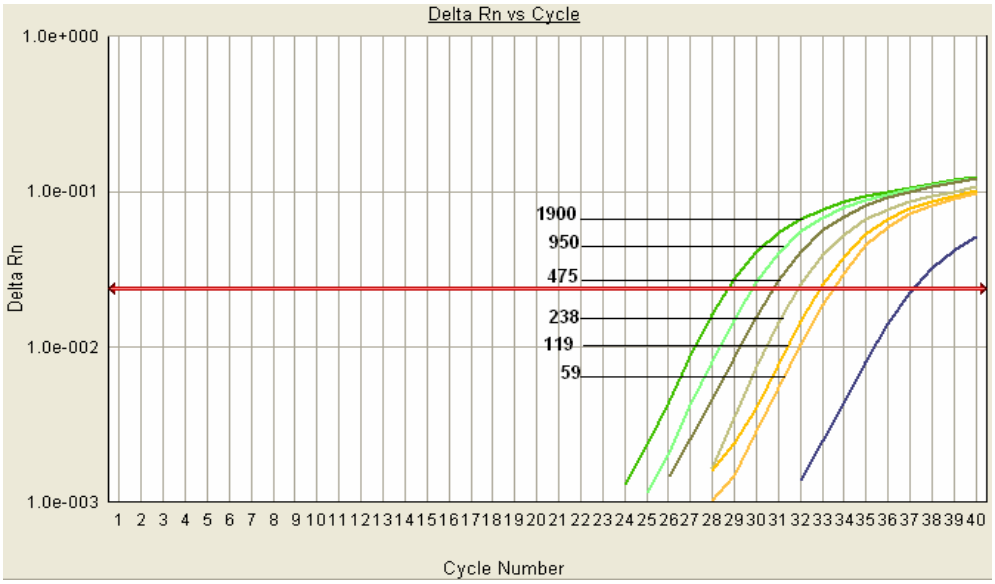


Şekil 23. Kalibrasyon örnekleri ile *hmg* specific real-time PCR amplifikasyon eğrileri (Cycle number vs. Delta Rn) (Cihaz çıktısı)

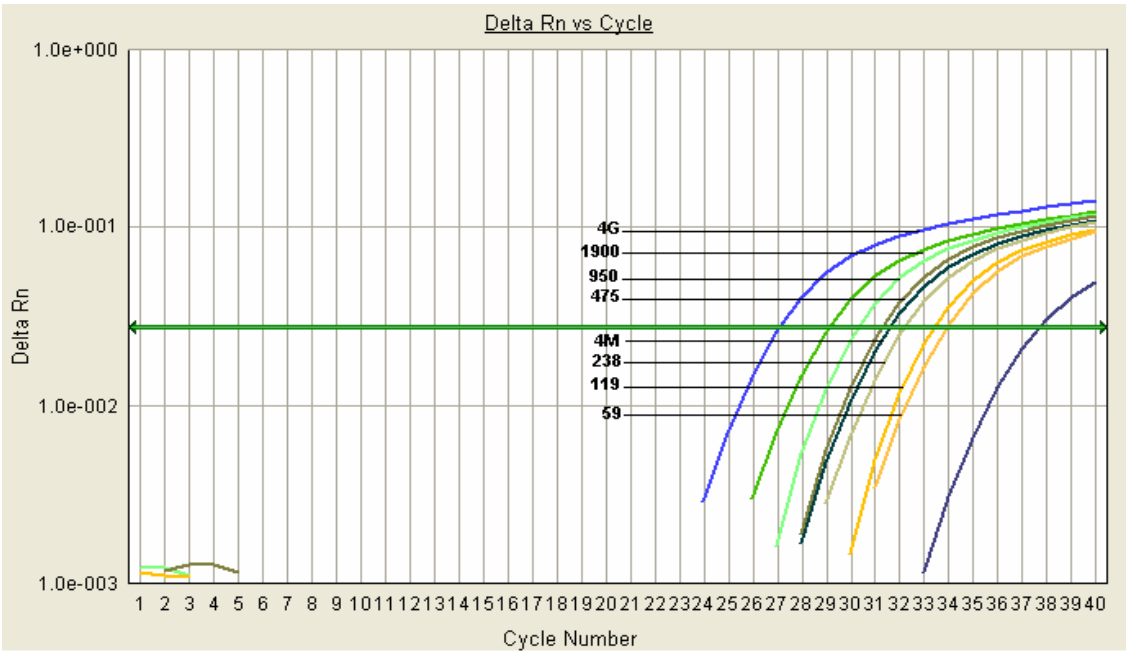


Şekil 24. Kalibrasyon örneklerinin *hmg* specifik TaqMan real-time PCR yöntemi ile elde edilen standart grafik (Cihaz çıktısı)

Mon810 DNA'sına özgü real-time PCR çalışmalarında Mon810 %5 CRM örneğinden oluşturulan kalibrayon örneklerinde beklenen amplifikasyon eğrileri elde edildi. Alttaki resimde görüldüğü gibi (Şekil 2) Mon810 pozitif standartlarında amplifikasyon grafikleri oluşurken negatif kontrol olarak kullanılan no template ve 0% Mon810 örneklerinde amplifikasyon oluşmamıştır. Absolute kantifikasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarından da beklendiği gibi Mon810 4M ve 4G örneklerinde amplifikasyon eğrileri gözlenmiştir. Konvansyonel PCR çalışmalarında 35S promotör ve nos-terminatör bölgeleri için pozitif sonuçlar veren H3, 48 ve H73'nolu örnek içinde real-time PCR analizleri uygulanmış ve bu örnekte Mon810 mısırının bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 25-26).

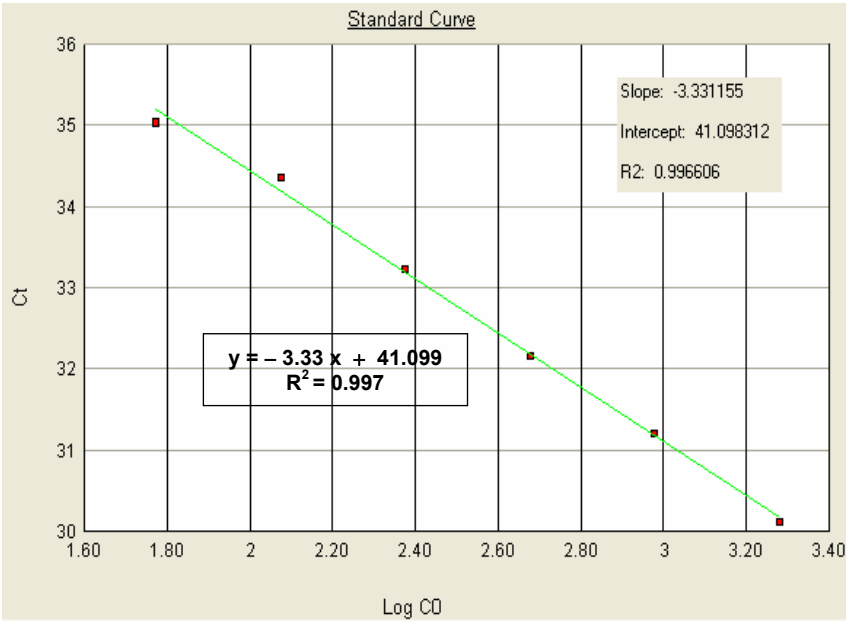


Şekil 25. Kalibrasyon örnekleri ile Mon810 specific real-time PCR amplifikasyon eğrileri (Döngü sayısı vs. Delta Rn) (Cihaz çıktısı).



Şekil 26. Kalibrasyon örnekleri ve pozitif örnekler (4M ve 4G) ile Mon810 specifik real-time PCR amplifikasyon eğrileri (Döngü sayısı vs. Delta Rn) (Cihaz çıktısı).

Real-time PCR çalışması uygulanarak hazırlanan kalibrasyon örnekleri ile amplifikasyon eğrileri elde edilerek "Treshold Cycle" (C_t) değerleri belirlendi. Hesaplanan C_t değerleri ve kalibrasyon örneklerinin içerdiği Mon810 DNA kopya sayısının logaritmik değerleri kullanılarak standart grafikler çizildi (Şekil 27). (korelasyon katsayısı R^2= 0,997).



Şekil 27. Kalibrasyon örneklerinin Mon810 specifik TaqMan real-time PCR yöntemi ile elde edilen standart grafik (Cihaz çıktısı)

hmg geni ve Mon810 için elde edilen C_t değerleri ile iki kalibrasyon eğrisi oluşturularak örneklerde gen kopya sayısı hesaplandı. Mon810 için elde edilen değer *hmg* geni kopya

sayısına bölüp ve 100'e çarpılması ile örneğin içerdiği Mon810 yüzdesi "relatif" olarak elde edildi (tablo 18).

% Mon810 Miktarı = Mon810 hedef KS/ *hmg* Referans Gen KS. ×100

KS : Kopya sayısı

Sample	*hmg* Kopya Sayısı	C_t	Mon810 Kopya Sayısı	C_t	Mon810 /*hmg* × 100	Ortalam	Std.	RSD_r
NTC(0.00 ng)	0.00	0.00	0.00	0,00				
1/64 (3.13 ng)	1187	29,88	60	34,95				
1/32 (6.25 ng)	2375	29,09	119	33,99				
1/16 (12.5 ng)	4750	27,82	238	32,93				
1/4 (25 ng)	9500	26,69	475	31,75				
1/2 (50 ng)	19000	26,06	950	30,89				
1 (100 ng)	38000	24,72	1900	29,73				
H3	0	0	0	0,00	**0,00**			
H48	0	0	0	0,00	**0,00**			
4M	39246,32	24,76	400,85	32,11	**1,02**	**1,31**	**0,42**	**32,60**
4G	30788,81	25,12	8728,48	27,14	**20,21**	**20,82**	**0,61**	**29,30**

Tablo 18. *hmg* ve Mon810 spesifik real-time PCR uygulamaları ile elde edilen DNA kopya sayıları kullanılarak hesaplanan relatif kantifikasyon sonuçları

Tartışma

Bu projenin ilk döneminde yapılan çalışmalarda 88 mısır örneğinde konvansyonel PCR uygulamaları ile GDO taraması yapılarak, toplam beş örnekte (H3, H48, H73 4M ve 4G) pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Mon810 mısırın tespiti için tasarlanan PCR yöntemleri ile 4M ve 4G örneklerinde adı geçen genetiği değiştirilmiş mısır çeşidine rastlanmıştır. GDO tarama ve tanımlama çalışmalarının devamında miktar tayini analizleri için TaqMan probe real-time

PCR yöntemine uygun özel primerler ve prob'lar tasarlanarak quantifikasyon çalışmaları "absolute" ve "relatif" metodları ile yapılmıştır.

Bu projede geliştirilen yöntemler ile elde edilen sonuçların validasyonu amacıyla pozitif örneklerden ikinci DNA izolasyonu yapılarak real-time PCR deneyleri tekrarlandı ve sonuçlar istatistiksel testler ile değerlendirildi. Mon810 sistemleri için elde edilen absolute ve relatif kantifikasyon Relatif Standart Sapma (RSD_r) değerlerine göre doğrulama sonuçlarının çoğu ENGL (European Network of GMO Laboratories)'in GDO miktar tayini ile ilgili gerekli koşullarını karşılamıştır.

Tarama çalışmaları toplamda 5 örneği (H3, H48, H73, 4M, 4G) GM pozitif olarak göstermiştir. Konvansyonel PCR ile yapılan tanımlama analizleri sonucunda 4M ve 4G örneklerinde Mon810 GM mısır çeşidinin bulunduğu gösterilmiştir. Tarama çalışmalarında GDO pozitif olarak tespit edilen H3, H48 ve H73 örnekleri Mon810 içermemektedir.

Mon810 miktarı abolute ve relatif kantifikasyon yöntemleri ile belirlenerek bu örneklerde 0.9% eşik seviyesinin üstünde olduğu belirlenmiştir. Farklı yöntemler ile 4M ve 4G örnekleri için elde edilen kantifikasyon sonuçları tablo 19'da özet olarak verilmektedir .

	Mon810 Miktarı (%)		
	Absolut Kantifikasyon		**Relatif Kantifikasyon**
	Bu Çalışmada geliştirilen Yöntem ile	JRC-CRL Valide Yöntem ile	Bu çalişama geliştirilen Yönetm ile
4M	1,33	1,15	1,31
4G	17,32	23,78	20,82

Tablo 19. 4M ve 4G örnekleri için elde edilen kantifikasyon sonuçlarının özeti

Bu çalışmada geliştirilen metotların düşük maliyetleri ve ticari kitlere bağımlılığı azaltmaları sayesinde Türkiye'de GDO testlerin yaygınlaşmasına katkı sağlanabilecektir. Ancak, bu yöntemler validasyon metotları tamamlanarak diğer GM mısırları kapsayacak şekilde geliştirilmelidir.

Kaynaklar :

Abdullah T., Radu S., Hassan Z., Hashim J. K.Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. Food Chemistry 98 (2006) 575–579

Brunnert H., Spener F. PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. Eur Food Res Technol (2001) 213:366–371

Cankar K., Chauvensy-Ancel V., Fortabat M., Gruden K., Kobilinsky A., Zel J., Bertheau Y. (2007) Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize Analytical Biochemistry

Demanèche S., Sanguin H., Poté J., Navarro E, Bernillon D., Mavingui P., Wildi W., Vogel T.M. and Simonet P. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. pnas.PNAS March 11, 2008 vol. 105, no. 10, 3957-3962

European Food Safety Authority Report, EFSA provides scientific support to the European Commission on issues related to the safety of Bt10 maize 12 April 2005.

Greiner R., Konietzny U., Villavicencio A. (2005) Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. Food Control 753-759

Heide, B. R. , Drømtorp S. M., Rudi K., Heir, E., Holck, A. L. (2008). Determination of eight genetically modiWed maize events by quantitative, multiplex PCR and Xuorescence capillary gel electrophoresis. Eur Food Res Technol (2008) 227:1125–1137

Hemmer, W. (1997). Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. *BATS Report 2*, BATS, Clarastrasse 13, CH-4058 Basel, ISSN 1420-228X

Hernandez, M., Pla, .M, Esteve,T., Prat, S., Puigdomenech, P. & Ferrando, A. (2003). A specific real-time quantitative PCR detection system for event NK603 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res* 12:179–189

Hardegger, M., P. Brodmann & A. Herrmann (1999). Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur. Food Res. Technol. 209: 83-87.*

Hubner, P., Studer, E. and Luthy, J. (1999).Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10:353–358

Hupfer, C., Hotzel, H. and Sachse, K. 1997. Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. Z. Lebensm. Unters. Forsch A. 205: 442-445.

Kok EJ, Scholten IMJ, Angeline Van Hoef AM and Aarts HJM, Detection of genetically modified DNA in food. Food Info newsletter, Netherlands. Available online at http://www.ifis.

Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N.,Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R.,Warren, G.W., Wright, M. and Evola, S.V. 1993 Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from Bacillus thuringiensis. Bio/Technology 11: 194-200

Litao, Y., Huifeng, S., Aihu, P., Jianxiu C.,1 Cheng H. & Dabing Z. (2005). Screening and construct-specific detection methods of transgenic Huafan No 1 tomato by conventional and real-time PCR. *J Sci Food Agric* 85:000–000

Litao, Y.,Aihu P.,Junwei j., Jiayu, D., Jianxiu C., Huang, C., Chengmei Z. & Dabing, Z. (2005) Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes *J. Agric. Food Chem., Vol. 53, No. 2.*

Macilwain C (2005). Stray seeds had antibiotic-resistance genes, Nature online, 29 March.

Meyer, R., F. Chardonnens, P. Hübner & J. Lüthy (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. 203: 339-344.*

Moens W. (2003).Report on the molecular characterisation of the genetic map of event Mon810. Service of Biosafety and Biotechnology

S. Lerat, L. S. England, M. L. Vincent, K. P. Pauls, C. J. Swanton, J. N. Klironomos and J. T. Trevors (2005). Real-Time Polymerase Chain Reaction Quantification of the Transgenes for Roundup Ready Corn and Roundup Ready Soybean in Soil Samples. J. Agric. Food Chem**,** 53, 1337-1342

Studer, E., C. Rhyner, J. Lüthy & P. Hübner (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 207: 207-213.*

Taverniers, I., P. Wiendels, E.Van Bockstaele & M. De Loose (2005). Use of cloned DNA fragments for event specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur. Food Res. Technol*.

Terry, C. & N. Harris (2005). Event specific detection of RoundupReady soya using two different real time PCR detection systems. *Eur. Food Res. Technol.*

Terzi, V., Ferrari, B., Finocchiaro, F.,Di Fonzo, N., Stanca, A., Lamacchia, C.,& Faccioli, P. (2003) TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat. *Journal of Cereal Science 37 157-163*

The Institute of Science in Society-ISIS Press Release, Bt10 Detection Method Unacceptable, 18/05/05

Vaïtilingom, M., H. Pijnenburg, F. Gendre & P. Brignon. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem. 47: 5261-5266.*

Van den Eede, G., M. Lipp, F. Eyquem & E. Anklam (2000). Validation of a double competitive polymerase chain reaction method for the quantification of GMOs in raw materials. Report published by the European Commission, Joint Research Centre, IHCP, Ispra, Italy. EUR 19676, 40pp.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. & Kroath, H. (1999). Genetically modified organismin food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 47:5038–5043

Watanabe, T *et. al*, development and evaluation of event-specific qualitative PCR methods for genetically modified Bt10 maize. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 1247-1279

Zimmermann, A., M. Liniger, J. Lüthy & U. Pauli (1998). A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system. *Lebensm.-Wiss. u. Technol. 31: 664-667.*

Zimmermann, A., J. Lüthy & U. Pauli (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm.-Wiss. u. Technol. 33: 210*

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109O482
Proje Başlığı: Genetiği değiştirilmiş mısır çeşidi Mon810'un Real Time PCR metodu ile tespiti ve kantifikasyonu için Taqman prob geliştirme ve optimizasyonu
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. G. Candan Gürakan-Gültekin, Dr. Houman Jabbari Farhoud, Remziye Yılmaz
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü- İnönü Blv. 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.10.2009 - 01.08.2010
Öz (en çok 70 kelime) Özel primerler ve reporter ve quencher boyaları ile işaretli uygun problar TaqMan prob metodu kullanarak Mon810 mısır örneklerinde absolute ve relatif miktar tayini yapılması için tasarlanmıştır. İstatistiksel analizler nicelik deneylerinin hassasiyeti ve tekrarlanabilirliğini yerinde doğrulama metotları yoluyla kontrol etmek için yapılmıştır. Mon810 sistemleri için elde edilen absolute ve relatif kantifikasyon Relatif Standart Sapma (RSD_r) değerlerine göre doğrulama sonuçlarının çoğu ENGL'nin GDO miktar tayini ile ilgili gerekli koşulları karşılamaktadır.
Anahtar Kelimeler: Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, Mon810, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Miktar tayini
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? **Evet** ☐ **Gerekli Değil** ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: