

***Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* Örneklerinde Kas Dokusu SDS- PAGE Protein Elektroforezi**

Sevgi DURNA

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58140 Sivas
sdurna@cumhuriyet.edu.tr

Received: 04.08.2009, Accepted: 06.10.2009

Özet: Tödürge Gölü'nden (Sivas) yakalanan *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (sazan) ve *Chalcalburnus chalcoides* Guldenstaedt, 1772 (tatlı su kolyozu) türlerinde kas proteinleri, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak, oluşan bant profilleri incelenmiştir. Elde edilen elektrofogramlara göre, kas protein band sayıları belirlenmiştir. SDS-PAGE'de *Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* kas protein bandlarının toplam sayısı 10 olarak bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Cyprinus carpio*, *Chalcalburnus chalcoides*, kas proteinleri, SDS-PAGE.

SDS-PAGE Protein Electrophoresis of Muscle Tissue in *Cyprinus carpio* and *Chalcalburnus chalcoides* Species

Abstract: The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was applied to the muscle proteins of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Cyprinidae) and *Chalcalburnus chalcoides* Guldenstaedt, 1772 (Cyprinidae) fish species taken from Todurge Lake (Sivas). According to the obtained electrophoregrams, the bands of muscle proteins were determined. In the SDS-PAGE result, the total number of the muscle protein bands of *Cyprinus carpio* and *Chalcalburnus chalcoides* were 10.

Keywords: *Cyprinus carpio*, *Chalcalburnus chalcoides*, muscle proteins, SDS-PAGE.

1. Giriş

Günümüzde, fonksiyonelliği ve besleyici özelliğinden dolayı balık kas proteinlerinin besin kaynağı ve gıda katkısı olarak kullanımı hızlı bir şekilde artmaktadır. Bununla birlikte balık biyokimyası üzerine yapılan çalışmalar da önemli derecede hız kazanmış olup moleküler biyolojik araştırmalarda proteinlerle ilgili çalışmalar geniş çapta yer almaktadır [1-8]. Bunların başında çeşitli enzim aktiviteleri, serum proteinleri, hemoglobin protein elektroforezleri, hematolojik ve toksikolojik çalışmalar gelmektedir. Ayrıca araştırmacılar, morfolojik sistematige yardımcı olmak amacı ile çeşitli balık proteinlerini elektroforetik olarak inceleyerek sistematik çalışmalara katkıda bulunmaya çalışmaktadırlar [9-11]. Şimdiye kadar *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta umbla*'ların serum proteinleri SDS-PAGE ile incelenmiş, bu iki balığın serum proteinleri arasında taksonomik açıdan önemli farklılıklar olduğu ve bu farklılıklarında, proteinleri sentezleyen genlerin farklı oluşundan kaynaklandığını ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır [12]. Buna ilaveten, bir çok araştırmacı da çeşitli balıkların serum proteinlerini elektroforetik olarak inceleyerek, bu çalışmaların da taksonomik veriler sunabileceğini belirtmişlerdir [13-17]. Yine başka araştırmacılar tarafından da Cyprinidae familyasına ait 6 türün karaciğer proteinleri, aynı familyadan 2 türün ise sarkoplazmik proteinleri elektroforetik olarak incelenerek taksonomik çalışmalar yapılmış ve bu türler arasında protein elektroforezlerinin karşılaştırılmasının taksonomik sınıflandırma açısından önemli olabileceği vurgulanmıştır [11,18]. Elektroforetik teknikler bu anlamda biyologlar tarafından çok yaygın olarak kullanılan iyi bir ayırıştırma ve saflaştırma yöntemi olarak düşünülmektedir [18,19]. Bu yöntemle araştırma yapılacak numune içerisindeki proteinlerin ayırıştırılmasının yanı sıra molekül büyüklükleri de ortaya konulabilmektedir. Elektrik akımıyla büyük proteinler yavaş bir şekilde hareket ederken, küçük moleküller hızlı bir şekilde hareket etmekte, jel üzerinde daha ileri mesafelerde lokalize olmaktadır ve bu prensipten yararlanarak da proteinler büyüklüklerine göre jel üzerinde ayırıştırılabilmektedir. Nitekim proteinler denatüre (SDS içeren) jelde molekül büyüklüğüne, doğal (native) jelde ise molekül biçimi, büyüklüğü ve yüküne göre ayrılırlar. Denatüre ortamda gerçekleştirilen SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde genellikle çözünürlüğü daha az olan proteinlerin ayrışması sağlanır. SDS polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır ve moleküllere negatif bir yük kazandırmaktadır [20].

Cyprinidae familyasının en yaygın türü olan sazan (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) gerek doğal koşullara adapte olması ve gerekse kültürünün kolaylıkla yapılması nedeniyle çok iyi bilinmektedir. Avrupa, Kuzey Asya ve ülkemizde geniş bir dağılım gösteren sazan balığı, ticari olarak avcılığı yapılan türlerden biridir. Ülkemizde eti sevilerek tüketilen bir balık olması ve büyüme süratinin de göreceli hızlı olması nedeni ile balık üretimi yapan balık çiftliklerinde ilk sırada tercih edilmektedirler. Bu tür, en çok yumurta veren balıklardan olup, genellikle vücut ağırlığının her kilogramı için 120000 yumurta verebilmektedir. Türkiye’de iç su balıkçılığında avlanan türler arasında ilk sıralarda olan sazan balığı daha çok Eğirdir, Beyşehir, Akşehir, Eber, Bafa, Köyceğiz, Işıklı, Gölcük, Karataş, Sapanca, Marmara, Apolyont, Manyas [21] gibi göllerimizin yanı sıra birçok küçük doğal ve yapay göller ile akarsularımızda da yaygındır [22]. Cyprinidae familyasına ait diğer bir tür olan Tatlısu Kolyoz balığı ya da Gümüş balığı (*Chalcalburnus chalcoides* Guldenstaedt, 1772) ise akarsu ve göllerin parlak yüzeylerini tercih eden, gruplar halinde dolaşan ve pelajik bir yaşam süren bir türdür. Başlıca besinlerini omurgasız hayvanlardan kurtlar, mollusklar, küçük krustaseler ve böcek larvaları oluşturan bu tür de ülkemizde eti sevilerek tüketilen ve bu yüzden de üretimi yapılan balık türlerinden birisidir.

Bu çalışma ile; *Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* türlerinde kas protein profillerini incelemek üzere; Kasım ayı içerisinde Tödürge Gölü’nden (Sivas) yakalanan balıkların dorsal, lateral ve kaudal bölgelerinden alınan örneklerden kas proteinleri elde edilerek, SDS-PAGE’ne uygulanmış ve protein profilleri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Örnek Toplanması

Bu çalışmada kullanılan *Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* türlerine ait örnekler Tödürge Gölü (Sivas)’nden 2007 Kasım ayı içerisinde balık ağı kullanılarak yakalandı, balıklar laboratuvara canlı olarak getirildi. Deneysel çalışmalar yapılınca kadar -80 °C’de Sanyo Ultra Low derin dondurucuda saklandı. Her bir gruptan deri ve parazitik enfeksiyonu olmayan 10 balık seçildi ve elektroforez için kullanıldı.

2.2. Laboratuvar Çalışması

Yakalanan balıkların dorsal, lateral ve kaudal kısımlarından olmak üzere steril bir bistüri ile kas doku parçaları alınarak, üç katı hacimde pH' sı 7,40 olan Tris-HCl tamponu içerisinde Ultra Turrax T-25 homojenizatör ile on dakika homojenize edildi. Solüsyondaki kaba partiküller, Eppendorf Centrifuge 5415 D model mikrosantrifüj içerisinde 13000 g' de 25 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Bu şekilde parçalanma sonunda elde edilen homojenattaki çözünmeyen materyalin santrifüjleme ile uzaklaştırılmasından sonra doku ekstresi hazırlanmış oldu. Sıcaklık protein izolasyonu esnasında 15 °C altında tutuldu. Süpernatant protein miktarının belirlenmesinde ve elektroforeze uygulanması işleminde kullanıldı. Örneklerden elde edilen total protein konsantrasyonu spektrofotometrede UV absorbanlarına bakılarak belirlendi.

2.3. SDS–PAGE Elektroforezi

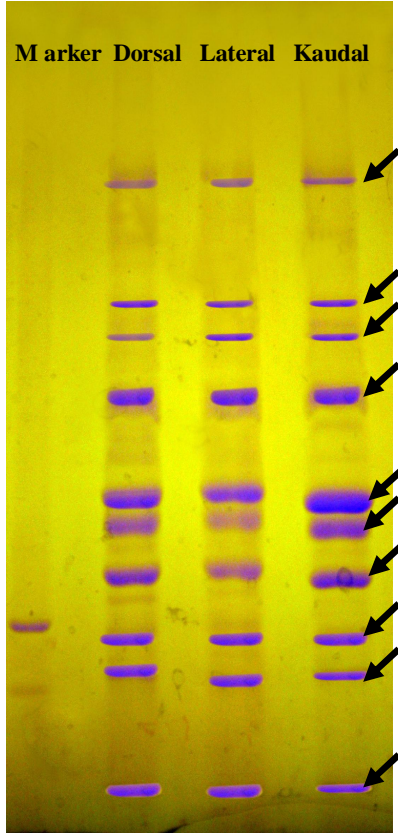
Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit jel elektroforezi, Laemmli (1970) [23] metodunun bir miktar optimize edilmesiyle birlikte yapıldı. Proteinler, 20x20 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında dikey jelde yürütülerek ayrıştırıldı. Dikey jel, proteinlerin stoklandığı yoğunlaştırıcı (stacking jel) ve daha sonra da proteinlerin ayrıştırıldığı ayırıcı jel (seperating) kısımlarından meydana gelecek şekilde hazırlandı. Her numune ve standart % 20 gliserol, % 20 β- merkaptoetanol (β- ME), % 4 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 0.02 brom fenol blue (BPB) içeren numune yükleme tamponu ile karıştırıldı ve her bir örnek için protein konsantrasyonları 20 µg/µl' ye ayarlandı. Daha sonra numuneler ve standart proteinler 100 °C' ye ayarlanmış suda 3 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Yoğunlaştırıcı jelde; her jel çukuruına 20 mikrolitre protein numunesi ve standart protein uygulandı. BPB jelin en alt kısmına gelinceye kadar jelle 150 voltluk gerilim verildi. Elektroforez işlemi sonrası jeller, % 0,15 commassie blue R-250, % 40 metanol ve % 7 asetik asit bulunan boya çözeltisi içerisinde su banyosunda 50 dakika süresince boyandı. Jeldeki fazla boya, % 5 metanol ve % 7,5 asetik asit içeren çözelti ile, her 20 dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle, bir saat boyunca yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Elektroforez uygulamasında protein standardı olarak, geniş spektrumlu Biorad protein marker (6,5- 212 kDa) kullanıldı. Deneyle üç tekrar halinde yapıldı.

3. Tartışma ve Sonuç

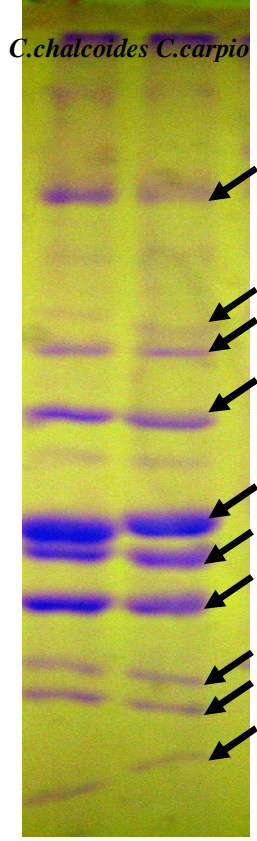
Cyprinus carpio ve *Chalcalburnus chalcoides* türlerinin kas proteinlerinin SDS-Poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile yapılan çalışmasında, Şekil 1 ve 2’de görüldüğü gibi; 10 protein bandı elde edilmiştir. Elde edilen protein bandlarının moleküler ağırlıkları hesaplanmamıştır. *Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* türlerinin kas dokularından elde edilen protein band profillerinin aynı olduğu gözlenmiştir. Bu bakımdan bu çalışmayla birlikte elde edilen bant profilleri her iki türün karşılaştırılması ve farklılıkların ortaya konulması açısından anlamlı değildir. Bu durum yapılan çalışma kapsamında, dokudan izolasyonun yapılması basamaklarında deterjan uygulamasının ve/veya ayrıntılı santrifüjleme işlemlerinin yapılmaması nedeniyle, kas dokusundaki tüm proteinlerin çözünebilir forma getirilememiş olmasından kaynaklanabilir. Daha anlamlı bant verilerinin elde edilebilmesi amacıyla ileri elektroforetik çalışmaların yapılmasıyla, kas proteinleri açısından bu türler arasında farklılıkların olup olmadığı tespit edilebilir. Ayrıca sıcaklık değişimi ile ifade edilen protein sayısının farklı olması durumu göz önünde bulundurulacak olursa, her iki türe ait örneklerin farklı mevsimlerde alınıp, elektroforetik olarak incelenmesi sonucunda da farklı bant profilleri tespit edilebilecektir. Yine de mevcut çalışmalar göstermiştir ki, kas proteinleri yoğun bir şekilde denatüre edildiği ve jel üzerinde etkin bir şekilde lokalize edildiği sürece, elektroforetik yöntemlerle, türlerin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Yine jel üzerindeki proteinlerin çöktürülmesi ve boyanmasıyla ilgili iyileştirmelerin yapılmasıyla ya da immunoblotting yöntemlerin kullanılmasıyla da tam net olarak görülemeyen bantlar açığa çıkarılabilmektedir.

Günümüzde taksonomik çalışmalar genellikle morfolojik ölçümler ve anatomik karakterler üzerine dayandırılmış olup, gen düzeyindeki polimorfizmlerin ortaya konulmasıyla da yeni sınıflandırma çalışmaları yapılmaktadır. Bundan başka sarkoplazmik proteinlerin analizleri, balıkların sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylece, akraba taksonların tanımlanması sarkoplazmik proteinlerin elektroforetik sonuçlarına göre kolayca yapılabilmektedir [11,24-28]. Böylece, balık türlerinin sarkoplazmik proteinleri arasındaki benzerlikler ve/veya farklılıkları incelemek için, bu türler arasındaki genetik benzerlikler ve/veya farklılıkları direkt olarak yansıtan SDS-PAGE gibi çeşitli elektroforetik teknikler kullanılmaktadır [13,14,29,30]. Ayrıca SDS-PAGE tekniğiyle çeşitli sıcaklıklarda dondurulmaya maruz

bırakılmış balık kas dokularında protein düzeyinde değişimler olduğu da başarılı bir şekilde gösterilmiştir [29,31]. Artık biyoinformatik alanındaki son gelişmelerle birlikte protein elektroforezlerinden elde edilen çok sayıdaki bant verileri protein veri tabanlarında (ExPASy, Propsearch, PeptideMass, Pfscan, Saps, Mowse) depolanmaktadır <http://gdbwww.gdb.org/> ve bu veri tabanları, proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlayabilmekte ve biyokimyasal temel araştırmalar açısından kaynak teşkil etmektedir.



Şekil 1. *Cyprinus carpio* türünde dorsal, lateral ve kaudal bölgelerden alınan kas parçalarından elde edilen total protein çözeltilerinin SDS-PAGE band profili. Verilen bantlar sırasıyla, Marker standart proteini ile birlikte Dorsal, Lateral ve Kaudal kas bölgelerinden alınmış örneklere aittir.



Şekil 2. *Cyprinus carpio* ve *Chalcalburnus chalcoides* türlerinde kas doku parçalarından elde edilen total protein çözeltilerinin SDS-PAGE band profili. Sırasıyla bantlar, *Chalcalburnus chalcoides* ve *Cyprinus carpio* türlerine aittir.

Teşekkür

Bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, deneyimleri ve birikimleri ile bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Naci Değerli'ye, kıymetli katkı ve yorumlarından dolayı teşekkür ederim.

Kaynaklar

- [1] T. Brenner, R. Johannsson, T. Nicolai. Characterisation and thermo-reversible gelation of cod muscle protein isolates. *Food Chemistry*, 2009. 115, 26–31.
- [2] R.P. Evans, G.L. Fletcher. Isolation and purification of antifreeze proteins from skin tissues of snailfish, cunner and sea raven. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004. 1700: 209–217.
- [3] M.C. Huang, Y. Ochiai. Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.*, 2005. 141: 461 – 471.
- [4] O. Martinez-Alvarez, M.C. Gomez-Guillen. Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting. *Food Chemistry*, 2006. 94: 123-129.
- [5] V.J. Metcalf, P.M. George, S.O. Brennan. Lungfish albumin is more similar to tetrapod than to teleost albumins: Purification and characterisation of albumin from the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2007. 147: 428–437.
- [6] M. Michalezyk, K. Surowka. Changes in protein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gravads during production and storage. *Food Chemistry*, 2007. 104: 1006–1013.
- [7] D. Ramachandran, M. Mohan, T.V. Sankar. Physicochemical characteristics of muscle proteins from barracuda (*Sphyraena jello*) of different weight groups. *LWT-Food Science and Technology*, 2007. 40: 1418–1426.
- [8] I. Undeland, S.D. Kelleher, H.O. Hultin, J. McClements, C. Thongraung. Consistency and solubility changes in herring (*Clupea harengus*) light muscle homogenates as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51: 3992-3998.
- [9] M. Yılmaz, M. Ayaz. Serum protein elektroforezi ile *Carassius carassius*, *Capoeta capoeta* ve *Siluris glanis* üzerine taksonomik bir çalışma. *USG Bildiri*, 2005, Trabzon.
- [10] M. Yılmaz, H. R. Yılmaz, A. Alas. An electrophoretic taxonomic study on serum proteins of *Acanthobrama marmid*, *Leuciscus cephalus*, and *Chondrostoma regium*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 2007, 3:22-27.

- [11] M. Yılmaz, Y. Çiğremiş, Y. Türköz, M. Gaffaroğlu. A taxonomic study on *Orthrias insignis euphraticus* (Banarescu and Nalbant, 1964) and *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843) by sarcoplasmic protein electrophoresis *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 2005. 18(1): 61-68 ISSN 1303-9709.
- [12] M. Yılmaz, Y. Türköz, A.Ü. Erdemli, E. Kalkan, Y. Çiğremiş. Karakaya baraj gölü bazı balıklarının kan serum proteinlerinin elektroforetik modelleri üzerine taksonomik bir çalışma. *S.Ü.Vet. Bil. Derg.*, 2000. 16(1): 89-92.
- [13] S. Mukhopadhyay, S. Basu, C. Data, A. Bose. Electrophoretic study on serum proteins fresh water teleosts. *Nucleus*, 1987, 30, 3, 101-103.
- [14] A.R. Khan, M. Gadru. Electrophoretic patterns of blood serum pattern of some fish of Kashmir. *Trop. Freshwat Biol.*, 1988, 11, 62-70.
- [15] J. Theophilus, P.R. Rao. Electrophoretic studies on the serum proteins of the three species of genus *Channa*. *Indian. J Fish.*, 1998, 35, 4, 294-297.
- [16] A.A.B. Shahin. Phylogenetic relationship between the characid Nile fish *Alestes dentex*, Cyprinid *Barbus bynni*, *Labeo niloticus*, and the introduced Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella* elucidated by protein electrophoresis. *J. Egypt Ger. Soc. Zool.*, 1999, 29: 21-42.
- [17] C. Li. Electrophoretic analysis on the serum proteins of Xinggua Red Carp, Grass Carp and their hybrid. *Freshwat. Fish Danshui Yuye.*, 1991, 6: 12-14.
- [18] J.I. Miyazaki, T. Hirabayashi, K. Hosoya, T.A.Iwami. Study of the systematics of cyprinid fishes by two dimensional gel electrophoresis. *Environmental Biol. Fishes.*, 1998, 52: 173-179.
- [19] M. Ünlüsayın, R. Erdilal, T. Çağatay, 2009. Balık proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan son yöntemler. *Journal of FisheriesSciences.com* DOI :10.3153/jfscom.2009034, ISSN 1307-234X.
- [20] G. Temizkan, N. Arda. Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması: Denatüre Jel Elektforezi (SDS-PAGE). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 2004. Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı. Sayfa: 161-273.
- [21] R. Geldiay, S. Balık. 2002. Freshwater Fishes in Turkey, (in Turkish). Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. No: 46, Ders Kitabı Dizini No: 16, IV. Baskı, 532s.

- [22] M.A. Yağcı, R. Uysal, V. Yeğen, S. Çetinkaya, M. Cesur, H. Bostan, A. Yağcı. İznik Gölü (Bursa) sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) populasyonunun bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *E.U. Su Ürünleri Dergisi*, 2008. (E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences), 25,1: 19-25.
- [23] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680-685.
- [24] G. Khoo, E.Y.F. Loh, T.M. Lim, V.P.E. Phang. Genetic variation in different varieties of siamese fighting fish using isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *Aquacult. Int.*, 1997. 5: 537-549.
- [25] M.M. Colombo, F. Colombo, P.A. Biondi, R. Malandra, P. Renon. Substitution of fish species detected by thin-layer isoelectric focusing and a computer-assisted method for the evaluation of gels. *Chromatogr.*, 2000. 880: 303-309.
- [26] R.C. Lundstrom. Fish species identification by isoelectric focusing: sarcoplasmic protein polymorphism in monkfish (*Lophius americanus*). *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 1981. 64 (1): 32-37.
- [27] I.M. Macki, S.E. Pryde, C.G. Sotelo, I. Medina, R.P. Martin, J. Quinterio, M.R. Mendez. Challenge in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Tech.*, 1999. 10: 9-14.
- [28] M.A. Valenzuela, N. Gamarra, L. Gomez, A.M. Kettlun, M. Sardon, L.M. Perez , J. Vinagre, N.A. Guzman. A comparative study of fish species identification by gel isoelectrofocusing twodimensional gel electrophoresis, and capillary zone electrophoresis. *J. Capillary Electrophor.*, 1999. 6 (3-4): 85-91.
- [29] E.L. LeBlanc, R.J. LeBlanc. Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins. *J. Food Sci.*, 1994. 59 (6): 1267-1270.
- [30] H. Rehbein, R. Kündiger, I.M. Yman, M. Ferm, M. Etienne, M. Jerome and et al., Species identification of cooked fish by urea isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: a collaborative study. *Food Chem.*, 1999. 67: 333-339.
- [31] K Ragnarsson, J.M. Regenstein. Changes in electrophoretic patterns of Gadoid and Non-Gadoid fish muscle during frozen storage. *J. Food Sci.*, 1989. 54(4): 819-823.