

KARAKAYA BARAJ GÖLÜ BAZI BALIKLARININ KAN SERUM PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK MODELLERİ ÜZERİNE TAKSONOMİK BİR ÇALIŞMA

Muhittin Yılmaz¹@ Yusuf Türköz², A. Ümit Erdemli¹,
Ercan Kalkan¹, Yılmaz Çiğremiş¹.

A Taxonomical Study on Electrophoretic Pattern of Blood Serum Protein of Some Fish of Karakaya Dam Lake

Summary: In this study, an electrophoretic comparison of serum blood proteins of two species of fish, *Capoeta trutta* and *Capoeta capoeta umbla*, were carried out. Study was carried between June and October in 1997. Using the Random Sampling Method, 92 *C. capoeta umbla* and 86 *C. trutta* which the same age and sex were used. The identification of species and subspecies were done through their metric and meristic characteristics. While 16 band pattern was observed in *C. trutta*, the number of protein bands for *C. capoeta umbla* was 11. From the electrophoretic mobility 8 bands of species gave similar pattern, but the rest was seen to be different. As a result, we concluded that, there is a %50 similarity between *C. trutta* and *C. capoeta umbla* based on their serum blood proteins.

Key words: Fish, SDS-PAGE, Serum Proteins

Özet: Bu araştırma Haziran ile Ekim 1997 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Araştırmada, yaşları ve cinsiyetleri aynı olan 92 adet *Capoeta capoeta umbla* ve 86 adet *Capoeta trutta* kullanıldı. Söz konusu balıkların metrik ve meristik değerlerine göre klasik olarak tür ve alt tür tespiti yapıldı. *C. trutta* ve *C. capoeta umbla*'ların kan serum proteinlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) yöntemi ile incelenerek yapılan tür ve alt tür çalışmasında, *C. trutta*'da 16, *C. capoeta umbla*'da ise 11 protein bandı tespit edildi. *C. trutta*'nın elektroforegramında diğer türe göre 8 farklı protein bandı gözlemlendi. Bunun yanı sıra 8 adet protein bandı bu iki balık arasında benzerlik gösterdi. SDS-PAGE ile elde edilen verilere göre, *C. trutta* ve *C. capoeta umbla* arasında elektroforegramda oluşan protein bantları bakımından %50'lik farklılık tespit edilmiş ve bunun taksonomik açıdan önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Balık, SDS-PAGE, Serum Proteinleri

Giriş

Günümüze değin balıklarda yapılan taksonomik çalışmalar daha çok morfolojik ölçümler, anatomik karakterler, renk ve karyotipleri üzerinde yapılmıştır (Kuru 1975, Kalkan ve Erdemli 1996). Ancak bu yöntemler bazı balıklarda, taksonomik açıdan bilim adamlarını zorluklara sokabilmektedir. Morfolojik oranlarda istatistiksel güçlükler, anatomik karakterlerde çok ender de olsa bir türün bireyleri arasında, yakın bir tür için belirleyici karakterler ortaya çıkabilir. Balıkların temel renkleri genetik kontrol altında olmasına rağmen, bir balığın renginin yaşama ortamına ve cinsiyetine göre değişmesinden dolayı değişken bir karakterdir. Bu yöntemde zorluğu, balığın muhafazası sırasında kullanılan fiksatif maddelerden dolayı renginin solmasıdır (Demir 1992).

Son yıllarda söz konusu bu güçlükler elektrophorez tekniği ile türlerin proteinlerinin (çoğunlukla

enzim) benzerliklerinin ve farklılıklarının incelenmesi ile aşılmaya çalışılmaktadır. Türlerin bulundurduğu proteinlerin benzerliği, genetik benzerliğin bir ölçüsü olması nedeni ile bu teknikle taksonomik açıdan önemli sonuçlar elde edilebilir (Mukhopadhyay ve ark. 1987, Theophilus ve Rao 1988, Khan ve Gadru 1988, Komagata ve ark. 1991).

Bu amaçla, proteinlerin türler arasında polimorfizm göstermesinden yararlanarak, SDS-PAGE yöntemi ile *Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'ların kan serum proteinlerinin analizi ile bu iki türün akrabalık dereceleri incelenmeye çalışıldı.

Materyal ve Metot

Balıkların temini için Karakaya Baraj Gölündeki atabay feribot iskelesi ve imamköyü mevkii istasyon olarak seçildi. Araştırma için seçilen balıkların özellikle sağlık durumlarının iyi olmasına dikkat edildi. Elde edilen örnekler metrik ve meristik ölçümler için bidonlarla canlı olarak laboratuara ge-

tirildi ya da yerinde kuyrukları kesilerek kan alındı. Kan alımı sonrası, balıklar diğer analizler için % 4'lük formaldehit içeren bidonlarda muhafaza edilerek laboratuara getirildi. Numuneler musluk suyu altında temizlendikten sonra metrik ve meristik ölçümler, yaş ve cinsiyet tayininde kullanıldı. Daha sonra % 35-40 etil alkol içeren cam kavanozlara alınarak muhafaza edildi.

Balıkların kuyruğu kesilerek kan alınması yönteminde kuyruk kesimi sonrası balığın dorsal aort damarından yaklaşık 2-3 ml kan alındı ve laboratuara getirildi. Bu kan numuneleri +4°C ve 3000 rpm'de 10 dk santrifuj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Analizi daha sonra yapılacak numunelere proteolitik aktiviteyi inhibe etmek için son konsantrasyonları 10 ve 0,1 mM olacak şekilde etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve fenil metil sulfonil florür (PMSF) ilave edilerek -20°C 'de saklandı. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret (Robert ve Michael 1993) yöntemi ile ölçüldü.

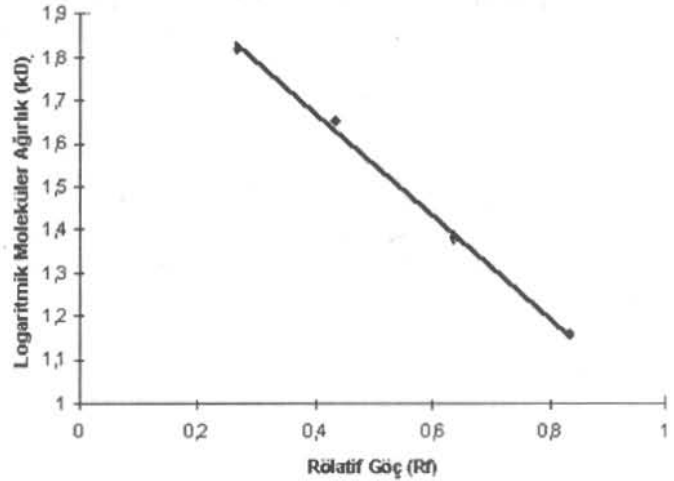
SDS-PAGE işlemi Laemmli (1970) ve O'Farrell (1975) metodlarına göre yapıldı. Proteinler, 12x8 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında slab jelde separe edildi. Slab jel, proteinlerin stoklandığı yoğunlaştırıcı ve daha sonra da proteinlerin separe edildiği ayırıcı jel kısımlarından meydana gelmektedir.

Ayırıcı jel (% 10 Akrlamid içeren) elektroforez işleminden 12 saat önce hazırlanarak polimerize edildi ve bir gece buzdolabında saklandı. Yoğunlaştırıcı jel ise (% 4 Akrlamid içeren) elektroforez işleminden 2 saat önce hazırlanarak polimerize edildi. Her numune ve standart % 10 gliserol, % 2 merkaptotanol (2-ME), % 2 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 0.01 brom fenol blue (BPB) içeren numune tamponu ile karıştırılarak protein konsantrasyonları sırası ile 2 µg/µl ve 0,5 µg/µl'e ayarlandı. Daha sonra numuneler ve standartlar kaynar suda 3 dk bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

Yoğunlaştırıcı jelde her line 20 mikrolitre numune ve standart uygulandı. Brom fenol blue jelin en alt kısmına gelinceye kadar jelle 200 voltluk gerilim verildi. Elektroforez işlemi sonrası jeller, % 0.125 commassie blue R-250, % 40 metanol ve % 7 asetik asit bulunan boya çözeltisi içerisinde 12 saat bekletilerek boyandı. Jeldeki fazla boya % 5 metanol ve % 7.5 asetik asit içeren çözeltide 24 saat bekletilerek dekolore edildi. Elektroforez uygulamasında protein standardı olarak, sığır albümini (66.2 kD), yumurta albümini (45 kD), tripsinojen (24 kD) ve lizozim (14.3 kD) kullanıldı.

Proteinlerin molekül ağırlıkları Weber ve ark. (1972) metoduna göre hesaplandı. BPB'nun uy-

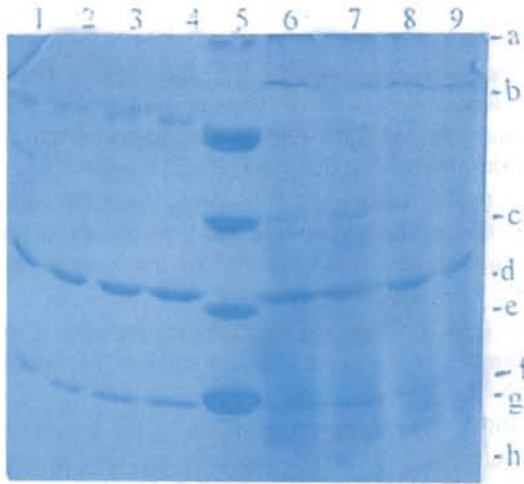
gulama noktasından elektroforez sonuna kadar gittiği mesafe bir birim kabul edildi ve molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerin göç mesafeleri bununla mukayese edilerek her protein için bir rölatif Rf değeri bulundu. Bu Rf değerlerine karşılık gelen molekül ağırlıkları logaritmik bir grafiğe yerleştirilerek düz bir eğri ve elde edildi. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları şekil 1'deki grafikten hesaplandı.



Şekil 1. Standart proteinlerin kalibrasyon eğrisi

Bulgular

Capoeta trutta ve *Capoeta capoeta umbla*'ların kan serum proteinlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez yöntemi ile incelenerek yapılan tür ve alt tür çalışmasında *Capoeta trutta*'dan 16 serum protein bandı, *Capoeta capoeta umbla*'dan 11 serum protein bandı elde edildi. Bu çalışmada, *Capoeta trutta*'ların 8 protein bandı, *Capoeta capoeta umbla*'ların protein bantlarından farklılık gösterdi. Şekil 2'de a,b,c,d,e,f,g,h ile gösterilen farklı protein bantlarının moleküler ağırlıkları zikredildikleri sıraya göre kD cinsinden 135, 113.2, 96.8, 61.6, 52.5, 34.6, 12.5 ve 9.5'dir. Bunun yanı sıra 8 protein bandı bu iki balık arasında benzerlik gösterdi. *C. trutta*'larda pre-albumin bantları oldukça net görülürken *Capoeta capoeta umbla*'larda pre-albumin 2 bandı görülmedi ve pre-albumin 1 bandı bu balıkta oldukça belirsiz olarak görüldü. *C. trutta*'ların yüksek molekül ağırlıklı globulin bantlarından biri (bant-b), *C. capoeta umbla*'lardaki aynı hizada bulunan protein bandından daha koyu olarak boyandığı gözlemlendi. Ayrıca *C. trutta*'larda gözlenen 3 albumin bandı (bant-c,d,e) *C. capoeta umbla*'larda görülemedi.



Şekil 2. *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta umbla*'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegami. 1.2.3.4. Line'lar *Capoeta capoeta umbla*'nın serum proteinleri, 5. Line standart proteinler. 6.7.8.9. Line'lar *Capoeta trutta*'nın serum proteinleri.

Tartışma ve Sonuç

Elektroforez tekniği başlangıçta, insanlarda serum proteinleri, lipoproteinleri, izoenzimleri ve hemoglobin tiplerinin incelenerek birçok hastalığın teşhis ve tedavisinin takibi amacı ile kullanılmıştır (Burtis ve Aswood 1996). Daha sonra gıda alanında özellikle et mamüllerinin kalite kontrolü ve içeriğinin tespitinde elektroforez tekniği ile çok önemli sonuçlar elde edilmiştir (An ve ark.1988 ve 1989, McCormick 1992). Son zamanlarda ise bu tekniğin taksonomik araştırmalarda kullanılabilirliği ve önemli açılımlar getireceği ifade edilmiştir (Mukopadhyay ve ark.1987, Schreiber ve ark. 1992, Theophilus ve Rao 1998). Bu araştırmada, *C. trutta* ve *C. capoeta umbla*'nın serum proteinlerini SDS-PAGE tekniği ile incelenerek elde edilen veriler literatürlerin ışığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada; *C. trutta* ve *C. capoeta umbla*'ların albumin, pre-albumin-1 ve pre-albumin-2 bantları, Ney ve Smith'in (1976) *Lepomis macrochirus* kan proteinleri üzerine yapmış olduğu çalışma ve Menzel'in (1970) *Notripis* balığının kan proteinleri üzerine yapmış olduğu çalışmalara göre tanımlandı. Summerfelt'in (1964) yapmış olduğu bir çalışmada, elektroforezde en yavaş hareket eden fraksiyonun globulin olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacı *Notemigonus crysoleucas*'ın kan serum proteinlerini analiz etmiş ve en yavaş hareket eden fraksiyonu euglobin olarak isimlendirmiştir. Yine Menzel (1970), *Notripis cyprinidae*'nin kan serum proteinlerini elektroforetik olarak analiz ederek en yavaş göç eden protein fraksiyonunun globulin ol-

duğunu göstermiştir. Ney ve Smith'in (1976) araştırma sonuçları, Summerfelt'in (1964) çalışmasını teyit etmiştir. Yukarıdaki literatürler baz alınarak çalışmamızda elde edilen elektroforegramda en yavaş hareket eden serum protein, globulin fraksiyonu olarak kabul edilmiş, bunun yanısıra serum protein fraksiyon-2 albumin bandı olarak dikkate alınmıştır. Yine aynı araştırmacılar albumin bandının iki fraksiyon halinde bulunabileceğini belirtmişler ve serum protein fraksiyon-3'de albumin içeriği olarak kabul etmişlerdir. Yine serum protein fraksiyon-4 ve 5'de transferin ve pre-albumin içerikleri gözlenmiştir. Normalde kandaki albumin proteini üç farklı fonksiyona sahiptir (Murray ve ark. 1992). Bunlar; kanın osmotik basıncının düzenlenmesi, mevcut diğer proteinlerin yapısının korunması ve birçok maddenin kanda taşınmasının sağlanmasıdır. Ney ve Smith'in (1976), *Lepomis macrochirus* üzerinde yaptıkları araştırmada elektroforezde en hızlı göç eden fraksiyonun pre-albuminler olduğunu gözlemlediler. Pre-albuminlerin tiroid hormonları, tiroksin (T4), triidotironin (T3) taşınması ve bağlanması görevli oldukları, transferrinin ise demir taşınmasında görevli oldukları belirtilmiştir.

SDS-PAGE ile yaptığımız çalışmada, şekil 2'de görüldüğü gibi *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta umbla* arasında 8 adet protein bandı farklılık gösterdi. Ayrıca 8 adet protein bandı da benzerlik gösterdi. Molekül ağırlığı en büyük olan globulin bandı 135 kD ve molekül ağırlığı en küçük olan pre-albumin bandı ise 9,5 kD molekül ağırlığında idi. Bu iki balık arasındaki en büyük farklar molekül ağırlıkları 45 kD ve 9,5 kD olan albumin protein bantları arasında gözükte.

Capoeta trutta ve *Capoeta capoeta umbla*'lar molekül ağırlıkları büyük olan globulin bantları arasında sadece iki bant (a,b) farklı görüldü ve bu farklılıkta *Capoeta trutta*'ya ait bantların *C. capoeta umbla*'ya göre daha koyu boyanmasıdır. Komagata ve arkadaşlarının (1988), *Hypomesus nipponensis* ile yapmış olduğu analizde aynı türe ait erkek ve dişi balıklarda istisnasız 30'dan fazla protein bandı gözlemlendiğini belirtmiş ve molekül ağırlıkları 94 kD üzerinde olan üç protein bandının farklı olduğunu gözlemiştir. Çalışmamızda bu bilginin ışığı altında aynı cins ve aynı yaştaki bireyler kullanılmıştır. Yine Ura ve arkadaşları (1994), *Oncorhynchus masou*'da parr ve smoltların serum profillerini western blotting ile birleştirilmiş iki yönlü SDS-PAGE ve karşılaştırmalı İmmünelektroforez (CIE) ile analiz etmiş ve parr ve smoltların protein bantları arasındaki farkların genelde düşük molekül ağırlıklı protein bantlarında olduğunu gözlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta*

umbla'ların protein bantları arasındaki farkların büyük bir kısmı düşük molekül ağırlıklı protein bantlarında gözlemlendi.

Theophilus ve Rao'nun (1998), *Channa* genusuna ait üç türün serum proteinleri üzerine yaptıkları elektroforetik çalışmalarda üç türün hepsinde de başlıca 10 protein fraksiyonu elde etmişler ve bunun her bir tür için yüksek derecede karakteristik modeller olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar bu balıklardan elde edilen elektroforetik farkların önemli olduğunu belirtmişlerdir. Schreiber ve arkadaşları (1992), omurgasız bir hayvan olan Priapulida'nın 4 türünün kan proteinlerini inceleyerek çok önemli taksonomik sonuçlar elde etmişlerdir. Khan ve Gadru (1988), Cyprinidae familyasına ait bazı balıkların kan serum proteinleri üzerinde yaptıkları elektroforetik çalışmada SDS-PAGE yöntemi ile tür ve alttür tespitinin yapılabileceğini belirtmişlerdir. Yine Mukhopadhyay ve ark. (1987), bazı tatlı su kemikli balıklarının serum proteinleri üzerinde yaptıkları elektroforetik çalışmada önemli biyosistemik veriler ortaya koymuşlardır. Lİ (1991), dişi *Cyprinus carpio*, erkek *Ctenopharyngodon idella* ve bu bireylerin hibritlerinin serum proteinlerini poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz etmiş ve her bir ebeveynin elektroferogram tiplerinde farklılıklar bulmuştur.

Capoeta trutta ve *Capoeta capoeta umbla* türü balıkların serum proteinlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez yöntemiyle incelendiği bu çalışmada önemli farklılıklar elde edilmiştir. Serumdaki her proteinin bir veya birden fazla gen tarafından kodlandığı dikkate alındığında, bu iki türün elektroferogramında gözlenen bu farklı protein bantlarının taksonomik açıdan önemli olduğu ve taksonomik araştırmalarda kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

An, H., Wei, C.I., Zhao, J., Marshall, M.R., Lee, C.M. (1989). Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. *J. Food. Sci.*, 54, 253-257.

An, H., Marshall, M.R., Otwell, W.S., Wei, C.I. (1988). Electrophoretic identification of raw and cooked shrimp using various protein extraction system. *J. Food. Sci.*, 53, 313-318.

Burtis, C.A., Aswood, E.R. (1996). Tietz fundamentals of clinical chemistry. W.B.Saunders Company., Philadelphia

Demir, N. (1992). İhtiyoloji. İst. Üniv. Fen Fak. Basımevi. 306.

Kalkan, E. ve Erdemli, A.Ü. (1996). Tohma Balıkları Üzerine Faunistik Bir Araştırma. *Türk Doğa Bil.Dergisi*, 20, 153-160.

Khan, A.R., Gadru, M. (1988). Electrophoretic patterns of blood serum pattern of some fish of Kashmir. *Trop.*

Freshwat Biol., 11, 62-70.

Komagata, K., Kawarabayashi, S., Kuwabara, R. (1991). Sexual dimorphism in electrophoretic patterns of blood serum proteins in a smelt *Hypomesus nipponensis*. *Su-isan Gakkaishi Bull Jap Soc Sci Fish.* 57,8, 1599.

Kuru, M. (1975). Dicle-Firat, Kura-Aras, Van Gölü ve Karadeniz Havzası Tatlı Sularında Yaşayan Balıkların (Pisces) Sistemik ve Zoocoğrafik Yönden İncelenmesi. Atatürk Üniv. Yay., (Doçentlik Tezi)

Laemli (1970). Cleavage of structural proteins during the assemble, of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680.

Li, C. (1991). Electrophoretic analysis on the serum proteins of Xinggua Red Carp, Grass Carp and their hybrid F sub (1). *Freshwat Fish Danshui Yuye*, 6, 12-14.

McCormick, R.J., Collins, D.A., Field, R.A., Moore, T.D. (1992). Identification of meat from game and domestic species. *J. Food Sci*, 57, 516-520.

Menzel, B.W. (1970). An electrophoretic analysis of the blood proteins of subgenus *Luxilus* (Notripis cyprinidae). Ph. D. Thesis. Cornell University.

Mukhopadhyay, S., Basu, S., Data, C., Bose, A. (1987). Electrophoretic study on serum proteins of fresh water Teleosts. *Nucleus*, 30, 3, 101-103.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (1992). *Harper's Biochemistry*. Appleton and Lange Press. Connecticut.

Ney, J.J., Smith, L.L.J. (1976). Serum protein variability in geographically defined bluegill *Lepomis macrochirus* populations. *Trans Am Fish Soc.*, 2, 281-289.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of biological properties and significance. *Comp Biochem Physiol.*, 88 M, 497-501.

Robert, R., Michael, J.D. (1993) *Enzyme assays*. Oxford University Press, Newyork.

Schreiber, A., Svavarsson, J., Storch, V. (1992). Blood proteins in bipolar priapulida. *Polar Biol.*, 12, 6-7, 667-672.

Summerfelt, R.D. (1964). Blood proteins, their patterns, variations and functions in the golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, Cyprinidae. Ph. D. Thesis, University of Southern Illinois, Carbondale.

Theophilus, J., Rao, P.R. (1998). Electrophoretic studies on the serum proteins of the three species of genus *channa*. *Indian. J Fish.*, 35,4 294-297.

Ura, K., Hara, A., Kawamura, H., Yamauchi, K. (1994). Immunochemical studies on serum proteins in juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B, B, 2, 225-229.

Weber, K., Pringle, J., Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS- acrylamide gel. *Meth. Enzymol.*, 26,3.