

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARS ÇAYI'NDA YAŞAYAN *ORTHRIAS ANGORAE*
BURESCHI VE *ORTHRIAS PANTHERA*'NİN
SARKOPLAZMİK PROTEİNLERİNİN SODYUM DODESİL
SÜLFAT- POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİYLE
TAKSONOMİK YÖNDEN İNCELENMESİ**

Erhan İLDEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yard.Doç.Dr.Muhittin YILMAZ

2006

KARS

Erhan İLDEŞ'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Kars Çayı'nda yaşayan Orthrias Angorae Bureschi ve Orthrias Panthera'nın Sarkoplazmik Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle Taksonomik Yönden İncelenmesi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

..... / / 2006

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	:
Üye	:
Üye	:
Üye	:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun /...../ 2006 tarih ve /.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	I
SUMMARY.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETİ.....	2
3.GENEL BİLGİ.....	4
3.1 Poliakrilamid Jeli Elektroföresi (Genel bilgi).....	10
4.MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	14
4.1.Örneklerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi.....	14
4.2. SDS Poliakrilamid Jel Solüsyonlarının Hazırlanması.....	15
4.3.1. % 30'luk Akriamid Solüsyonu.....	15
4.3.2. Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8).....	15
4.3.3. Ayırma jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8).....	15
4.4. Yürütme Tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH 8.3)...	16
4.5. Numune Tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH 6.8).....	16
4.6. Jelin boyanması işlemi.....	16
4.7. Jelden boya çıkarma İşlemi.....	17
4.8. Diğer Kimyasallar ve Özellikleri.....	17
4.9. SDS-Kesikli Jel Tampon Sistemli Jelin Hazırlanması.....	17
4.9.1. Ayırma jelin hazırlanması.....	18

4.9.2. Stoklama jelin hazırlanması.....	19
4.10. Ayırma Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi.....	19
4.11. Stoklama Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi.....	20
4.12. Serum Numunelerinin Sulandırılması ve Jele Yükleme İşlemi.....	21
5. BULGULAR.....	22
6. TARTIŞMA.....	23
7. KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ.....	28

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kars Çayı'nda Yaşayan *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera*'nın Sarkoplazmik Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle Taksonomik Yönden İncelenmesi

Erhan İLDEŞ

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman

Yrd. Doç.Dr. Muhittin YILMAZ

ÖZET: Bu çalışmada, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi)'ne, *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera* balıklarının sarkoplazmik proteinleri uygulandı. Elektroforegramda, her iki balığın sarkoplazmik proteinlerin band sayıları 13 sarkoplazmik protein bandı elde edildi. Buna göre, *Orthrias angorae bureschi*'nin proteinlerinin molekül ağırlıkları 85.0, 82.8, 77.4, 69.6, 60.9, 49.2, 47.9, 43.6, 41.9, 33.0, 32.1, 20.5 ve 11.6 kD olarak bulundu. *Orthrias panthera*'nın proteinlerinin molekül ağırlıkları ise 79.5, 77.4, 69.6, 66.0, 47.9, 46.0, 41.9, 36.7, 35.7, 28.1, 27.4, 19.9 ve 11.6 kD olarak bulundu. Bu elde edilen bulgulara göre, 77.4, 69.6, 47.9, 41.9 ve 11.6 kD'luk protein bandları benzerlik gösterdi

Sonuç olarak, bu iki balığın sarkoplazmik protein elektroforezi ile taksonomik olarak ayırt edilebileceği ve iki türün morfolojik sistematikteki yerlerinin doğru olduğuna karar verildi.

An Electrophoretic Taxonomic Study on Sarcoplasmic Proteins of *Orthrias angorae bureschi* and *Orthrias panthera* Habitated in Kars Stream

Erhan İLDEŞ

Kafkas University

Biology department

Faculty of Arts and Science

Supervisor

Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ

ABSTRACT: In this study, sarcoplasmic proteins of *Orthrias angorae bureschi* and *Orthrias panthera* were applied to the SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). In electrophoregram, band numbers of the proteins of both fish were obtained as 13 sarcoplasmic protein bands. According to this, molecule weights of the proteins of *Orthrias angorae bureschi* were attained as 85.0, 82.8, 77.4, 69.6, 60.9, 49.2, 47.9, 43.6, 41.9, 33.0, 32.1, 20.5 and 11.6 kD. And, molecule weights of the proteins of *Orthrias panthera* were attained as 79.5, 77.4, 69.6, 66.0, 47.9, 46.0, 41.9, 36.7, 35.7, 28.1, 27.4, 19.9 and 11.6 kD. According to these findings, proteins bands of 77.4, 69.6, 47.9, 41.9 and 11.6 kD showed similarities.

Consequently, it was decided that these two fish can be distinguished from each other in terms of sarcoplasmic protein electrophoresis and taxonomic, and the place of these two species in morphological systematic is correct.

TEŐEKKÖR

Tez konumu bana vererek ve projelendirerek alıőmamın her aőamasında değerli ve sonsuz yardımlarını esirgemeyen hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ'a, TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna projemin desteklenmesinde yardımlarını esirgemeyen ve Biyoloji Bölümü laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın hocam Prof. Dr. Arif BAYSAL'a tüm desteklerinden dolayı teőekkörü bir borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: <i>Orthrias angorae bureschi</i>	6
Şekil 2: <i>Orthrias (Nemacheilus) panther</i>	9
Şekil 3. <i>Orthrias angorae bureschi</i> ve <i>Orthrias panthera</i> 'nın sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramı.....	22
1. <i>Orthrias panthera</i> ,	
2. <i>Orthrias angorae bureschi</i>	
3. Standart proteinler	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo1. Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma jeli Hazırlama Prosedürü.....	18
Tablo2. Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü...	19
Tablo 3. <i>Orthrias angorae bureschi</i> ve <i>Orthrias panthera</i> 'nın sarkoplazmik proteinlerinin moleküler ağırlıkları.....	23

1. GİRİŞ

Geçmişte, balık türlerinin sınıflandırılması başlıca dış morfolojik karakterlerin araştırmasıyla yapılırdı. Günümüzde, elektroforez balık türlerinin sınıflandırılmasına yardım amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu maksatla sarkoplazmik proteinler, serum proteinleri, karaciğer proteinleri ve enzimlerin bir çoğu araştırmacılar tarafından kullanılmıştır.

Kasın hücre içi sıvısında glikolitik enzimler, miyoglobin ve mevcut diğer proteinlerden oluşan yüksek derecede suda çözünen sarkoplazmik proteinler sıklıkla spesifik tanımlama için kullanılırdı. Sarkoplazmik proteinler kas hücrelerindeki total proteinin % 30–35'ini kapsar. Balık kas sarkoplazmik proteinlerinin analizi balık türlerinin tanımlanması için çok önemlidir. Son yirmi yıldır sarkoplazmik proteinlerden balıkların tür teşhislerinde faydalanılmaktadır. Bununla ilgili de bir çok çalışma yapılmıştır.

Bu amaçla, sarkoplazmik proteinlerin türler arasında polimorfizm göstermesinden dolayı, sarkoplazmik protein elektroforezinden yararlanılarak

Orthrias angorae bureschi ve *Orthrias panthera* türleri arasında benzerlikler ve farklılıklar ortaya çıkarılmaya çalışıldı.

2. KAYNAK ÖZETİ

Günümüze değin, balıkların protein elektroforezi ile yapılan taksonomik araştırmaların sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

Yılmaz ve vd. (2000) *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta umbla*'nın serum proteinlerini SDS-PAGE ile analiz etmişlerdir. Bu araştırmada, *Capoeta capoeta umbla*'da 11 band ve *Capoeta trutta*'da 16 protein bandının olduğunu gstermiştir. Onlar, serum protein bandlarının sayısının özellikle taksonomide önemli olduğu sonucuna varmışlardır.

Miyazaki vd. (1998) Cyprinidae familyası ve Acheilognathinae, Leuciscinae, Gobioninae alt familyalarına ait 6 türün karaciğer proteinlerini SDS-PAGE yöntemiyle sepe etmişler, *Cyprinus carpio* ve *Pseudogobius esocinus esocinus* un en küçük genetik farkı verdiğini belirtmişlerdir. Buna karşın, *Tribolodon hakonensis* diğer üç tür balıkla hemen hemen eşit genetik farka sahiptir.

Knuutinen ve Harjula (1998) Finlandiya'da en çok bulunan 16 tatlısu balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerinin farklılaştığını gstermişlerdir. Araştırmacılar sarkoplazmik proteinlerin elektroforezi gibi yeni teknikler kullanılarak alt familya ve alt tür gruplandırmasındaki zıtlıklara ışık tutacağı sonucuna varmışlardır.

Türköz vd. (2000) Hem pişmiş hem de taze 6 balık türünün sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE ile analiz etmişler ve balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerine göre sınıflandırılabilceğini belirtmişlerdir.

Pinerio vd. (2001) 5 farklı merlos türü (*Merluccius merluccius*, *M. australis*, *M. hubbsi*, *M. gayi* ve *M. capensis*)'in sarkoplazmik proteinlerinin 2 fazlı elektroforezle incelemiş ve onların bazılarının çok yakın akraba olduğunu bildirmişlerdir.

Sakai vd. (2003) *Lefua* (Balitoridae) türü (loaches) balıklarının DNA analizleriyle intraspesifik ve filogenetik akrabalıkları 2 boyutlu elektroforez kullanılarak incelenmiştir. Protein analizleri *Lefua sp.* ve *L. echigonia* arasında ve *Lefua sp.* ve *L. nikkonis* arasındaki genetik mesafenin *L. echigonia s. Str.* ve *L. nikkonis* arasındaki mesafe kadar büyük olduğunu gstermiştir. DNA analizleri, *Lefua sp.*'nin *L. echigonia s. Str.* ile *L. nikkonis-L. costata* kompleksi'ne göre çok daha yakın ilişkide olduğunu gstermiştir.

Milhara vd. (2005) *Lefua nikkonis*, *Lefua echigonia* ve *Lefua costata*'nın DNA analizleri incelenmiştir. Bu çalışma gösterir ki, *Lefua*'nın her türü, monofiletik bir grup oluşturmuştur, bu da açıkça gösterir ki *Lefua* türleri genetik olarak birbirinden ayırt edilebilir.

Sulaiman vd. (2006) Bornean emici balıklarının, *Gastromizon*'un ve *Neogastromizon*'un mitokondriyal DNA analizleri sitokrom b geni sıralarının karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. *Gastromizon*'un ve *Neogastromizon*'un her ikisi de monofiletiktir ve Çin Homalopterid *Crossostoma lacustre*, Bornean türü ile ilişkili değildir.

3.GENEL BİLGİ

Orthrias angorae bureschi

İlk Bulunuş Yeri (*Terra typica*) : Ankara civarı

Türkçe:Çöpçü balığı

Türkiye'den Eski ve Yeni Kayıtlar : *Nemacheilus angorae* STEIN DAGHNER 1897, Ankara civarı; *Nemacheilus angorae* PELLEGRIN 1928, Kemer çayı (İzmir); Çubuk çayı (Ankara); Eğmir ev Mohan gölleri; Ankara civarındaki hendekler; *Nemacheilus angorae* BATTALGİL 1942, İznik ve Apolyont gölleri, Çubuk çayı, Micinger çayı (Van gölüne akar); *Nemacheilus angorae* TORTONESE 1951, Tuzgölü, Sandıklı, Cihanbeyli, Beyşehir gölü, Van gölü; *Nemacheilus angorae* SLASTENENKO 1955-56 Karadeniz e dökülen Anadolu nehirleri, Çoruh-Aras havzası, Çıldır gölü, Kura havzası, Ümraniye gölü, Kemer çayı (İzmir); *Nemacheilus angorae* GELDİAY 1961, Çubuk barajı, Sarıyer barajı, İrfanlı barajı; *Nemacheilus angorae* BANARESCU-NALBANT 1964, Kayseri (Karpuzatan) Kızılırmak, Kırşehir (Terme), Tuzgölünün kuzey doğusu, Peçenek deresi, (Şereflikoçhisar), Işıklı gölü (Büyük Menderes'in menbası) Çubuk çayı, Sakarya nehri; *Nemacheilus angorae bureschi* BANARESCU-NALBANT 1964, Sapanca gölü, iznik gölü, Beyşehir gölü, Gerede gölü, Çavuşçu gölü, Hazar gölü, Van gölüne akan dereler; *Nemacheilus angorae* TANYOLAÇ, 1968, Hamam çayı, Çubuk çayı, Kızılırmak Eğmir gölü; *Nemacheilus angorae bureschi* GELDİAY-KAHSBAUER 1967, Şirinyer deresi (İzmir); *Nemacheilus angorae* GELDİAY 1969; Çubuk çayı, Eğmir gölü; *Nemacheilus angorae* (FAO) 1971, Dicle, Fırat ve Trakya hariç bütün Anadolu, Bulgaristan; *Nemacheilus (Orthrias) angorae angorae* BANARES-CU 1968, Güllük (Bodrum), Kızılırmak nehri, (Yozgat civarı); *Nemacheilus angorae bureschi* BANARESGU 1968, Bergama, Dereboğazı, Ha-zer gölü, Tortum gölü *fNemacheilus angorae* KURU 1971, Hasankale (Kars); *Noemacheilus angorae bureschi* KURU 1971; *Noemacheilus angorae angorae* GELDİAY-BALIK 1973, Nil çayı ve kollan (İzmir); *Noemacheilus angorae angorae* BALIK 1974, Şaşal deresi (İzmir), Armutlu deresi (Turgutlu) Şirinyer deresi

(İzmir), Nil çayı (Kemalpaşa), Bulgurca deresi (İzmir); *Noemacheilus angorae angorae* KURU 1975, Serçeme deresi (Erzurum), Hoşap suyu (Van), Bağırsak deresi, Kelkit çayı, Çoruh çayı (Cemil bey) ; *Noemacheilus angorae bureschi* KURU 1975, Çoruh sistemi, Murat nehri, Oltu suyu, Araş nehri, Hazar gölü, Tortum suyu, Büyüksu (Çetinkaya), Dicle nehrj, Pamukçay (Silvan), Patates suyu, Çıldır gölü, Selim suyu, Meydancık suyu, Kelkit çayı, Karasu (Erzincan); *Nemacheilus angorae* BALIK 1980 Düver, çayı (BURDUR),. Köprü Çayı (Köprü Çayı (Antalya), Değirmenler deresi (Tefenni), Delibekir çayı (Antakya); *Netnacheilus angorae bureschi* ERKKAN 1983 Sakarya havzası.

Vücut silindirik şekilli olup, çok küçük pullarla örtülmüştür. Kuyruksuz vücut boyunda, vücut yüksekliği 5-6 defa, baş boyu ise 4-4,5 defa bulunur. Gözler küçük ve başın üst tarafına doğru yerleşmiştir. Göz çapı burun uzunluğunda 1.5-1.8 defa vardır ve aşağı yukarı gözler arası mesafeye eşittir. Pektoral yüzgeçler çok uzundur ve Ventral lerin iyice yakınma kadar uzanabilir. Burun üzerinden çıkan bıyıkların boylan aşağı yukarı birbirlerine eşittir ve göz çapından 1-1.5 misli daha uzundur. Dorsal yüzgeç, burun ucuna ve kuyruk yüzgeci başlangıcına eşit mesafede bulunur. Kuyruk yüzgecinin serbest kenarı büyük bir varyasyon göstermekte olup, bazı bireylerde düz, bazılarında ise derinliği az çok değişen bir girinti meydana getirir. Renk çok değişken olmakla beraber, genellikle gri-san görünüştedir. Vücudun sırt bölgesinde ve yan taraflarında, çeşidi büyüklükte ve gelişi güzel dağılmış olan kahverengi-esmer benekler bulunur. Dorsal ve Kavda! yüzgeçler, çoğu kez düzenli seriler halinde yerleşmiş ve küçük kahverengi noktalardan meydana gelmiş enine bantlarla süslenmişlerdir. Diğer yüzgeçler ise, genellikle renksizdir. Maksimum vücut uzunluğu 8–9 cm. kadardır. Bu tür, genellikle temiz ve serin olan nehir ve çayların bilhassa yavaş akan çakıllı-kumlu zeminlerinde yaşarsa da, basan göllerin fazla derin olmayan kıyı zonlarında da bulunur. Gececi özellikte olup gündüzleri daima taşlar altında gizlenen ve sedenter olarak yaşayan bir zemin balığıdır. Temiz suları tercih etmekle beraber, pollusyona karşı da çok dayanıklı olduğundan, oksijenin eser halde bulunduğu ortamlarda bile uzun süre yaşayabilir. Yumurtlama periyodu Mayıs-Temmuz ayları arasına rastlar. Genellikle 5 cm. boyda iken cinsel olgunluğa erişirler. Yumurtalar çakıllar» taşlar ve bitki gövdeleri üzerine yapıştırılır. Başlıca gıdasını bentik omurgasızlardan kurtlar ve böcek larvaları oluşturur. Doğu ve

Güneydoğu Anadolu'nun küçük bir kısmı hariç, bütün Anadolu'ya yayılmış olan bu türün, Dorsal yüzgeçteki dallanmış ışın sayısının farklı olmasına göre Türkiye'de iki alttürünün bulunduğu (*N. Angorae angorae* STEINDACHNER 1897 ve *JV. angorae bureschi* DRENSKY 1928) rapor edilmiştir. Bu rapora göre: *N.a. angorae*'nin yumuşak ışın sayısının genellikle 7 olup Orta ve Kuzeybatı Anadolu kesimlerinde yayıldığı; *JV. buresckvnm* ise yumuşak ışın sayısının genellikle 8 olup Doğu, Güney ve Güneybatı Anadolu bölgelerinde yayıldığı belirlenmiştir. Fakat her iki formun yayılma alanları, özellikle Batı ve Kuzeybatı Anadolu'da birbirine çok karıştığından, alttür yönünden kesin bir sonuç ortaya konulamamıştır.



Şekil 1: *Orthrias angorae bureschi*

***Orthrias (Nemacheilus) panthera* (HECKEL,1843)**

İlk Bulunuş Yeri (*Terra typica*) : Şam (SURIYE)

Türkçe : Çöpçü balığı

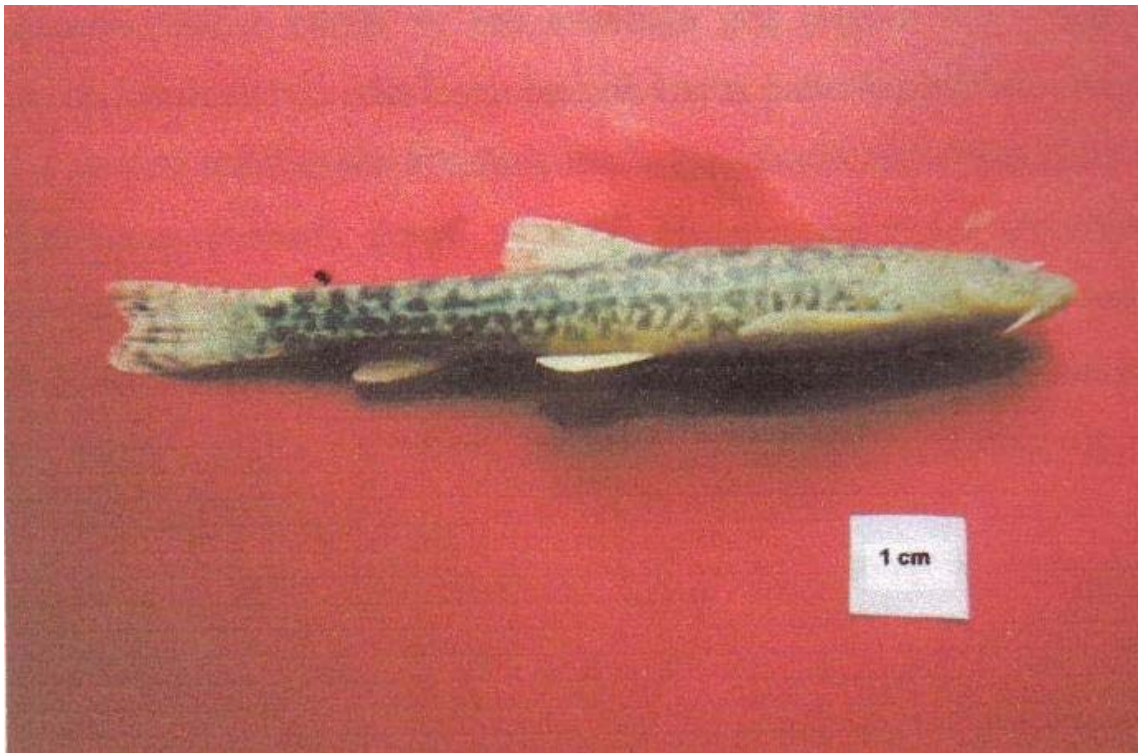
Türkiye'den Eski ve Yeni Kayıtlar:*Nemacheilus panthera* KOSSWIG-BATTALGİL 1943;*Noemacheilus panthera* BANARESCU-NALBANT 1964; Gölbaşı (Malatya), Ceyhan nehri; *Noemacheilus panthera* KURU 1971, Aras nehri (Hasankale);*Nemacheilus panthera* (FAO) 1971, Ceyhan nehri, Antakya civarı, Suriye, Filistin; *Noemacheilus panthera* KURU 1975, Aras nehri, Tortum Kale suyu (Tortum) Pamukçay (Silvan), Çaltı suyu (Çetinkaya), Kars çayı (Kars), Patnos suyu (Patnos); *Nemacheilus panthera* KELLE 1978, Dicle nehri ve kolları.

Vücut yanlardan basılmış ve yüksek yapılı olup, uzunluğu maksimal yüksekliğinin 4.5-5.8 katı kadardır. Vücudun ön kısmı çıplak, arka kısmı ise, çok küçük pullarla örtülüdür. L. lateral tam olmayıp ancak Dorsal yüzgeç kaidesinin ortasına kadar uzanabilir. Kuyruk sapının alt ve üst taraflarında fazla gelişmemiş birer karina bulunur, Dorsal'in serbest kenarı düzdür ve aşağı yukarı Ventrallerle aynı hizadan başlar. Kuyruk yüzgeci genç ve yaşlılarda farklı görünüşte olup, gençlerde daima içeriye doğru hafif girintili olduğu halde, yaşlı bireylerde bazan düz bazan da hafif yuvarlak olabilir. Total vücut boyu 6 cm. kadardır.

Vücudun genel rengi sarımtrak beyaz olup, baş bölgesi ile yan tarafları ve sırt kısmı düzensiz şekilli ve adeta panter derisini andıran kahverengi beneklerle süslenmiştir. Karın tarafta ise bu benekler iyice azalır ve renk kirli-beyaz bir görünüş kazanır.

Aslında Mezopotamya orijinli olan bu tür, Suriye, Ürdün, Lübnan ve Anadolu'da yayılış gösterir. Memleketimizde bugüne kadar Gölbaşı (Malatya), Ceyhan nehri, Fırat nehri, Çoruh nehri, Araş nehri, Asi nehri, Kars çayı, Patnos çayı, Tortum suyu,

Pamuk ayı altı suyu gibi Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinin akarsularından rapor edilmişlerdir.



Sekil 2: *Orthrias (Nemacheilus) panthera*

3.1 Poliakrilamid Jeli Elektrofrez (Genel bilgi)

Elektrofrez genel anlamda bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir. Bu teknik yapılan birbirine çok benzeyen ve doğal olarak bir arada bulunan molekül ya da partikülleri, taşıdıkları yük ve büyüklüklerine göre birbirlerinden ayırmaya yarar.

Bu teknik, başlangıçta klinikte teşhis ve tedavinin seyrini izlemek amacıyla protein, lipoprotein, hemoglobin, immün elektrofrez ve izoenzim elektrofrezleri yapılmaktadır. Örneğin, bir protein bozukluğunun saptanmasında, lipoprotein anomalilerinin tiplendirilmesinde veya bir hemoglobinopatinin ortaya konmasında ya da belli bir organa has izoenzim düzeylerindeki artışı saptayarak teşhisin kolaylaşmasına elektrofrezin inkar edilemeyecek yardımları söz konusudur.

Günümüzde gelişen teknoloji özellikle antijen antikor birleşmesi esasına dayanan analiz teknikleriyle elektrofrezden daha duyarlı kantitatif sonuçlar vermektedir.

Araştırma çalışmalarında da elektrofrez yapılan araştırmanın sonucu kanıtlarıyla birlikte ortaya koyan en iyi yöntemlerden biridir. Örneğin, bir protein veya enzim saflaştırmasının sonucunu elektrofrez en iyi şekilde sergiler. Sonuçların görsel olarak değerlendirilmesi, geniş bir bakış açısı getirmesi ve yönlendirici olması nedeni ile elektrofrezin önemi kendiliğinden açığa çıkmaktadır.

Elektroforeze uygulanacak olan maddenin ilk önce elektrik yüklenebilir durumda olması gerekir. Bu anlamda, proteinler elektroforez için en uygun moleküllerdir. Özellikle taşıdıkları aminoasitlerden dolayı amfoterik bir yapıya sahip onları kolayca yüklenebilir duruma getirmektedir. Bir protein molekülü üzerindeki toplam yükün sıfır olduğu pH'ya "İzoelektrik nokta" denir. Bu noktada proteinler elektroforez ortamında göç edemezler. Bunu önlemek için proteinleri izoelektrik noktadan uzak asit veya alkali tamponlarla (pozitif veya negatif yüklerle) yüklemek gerekir. Protein elektroforezinde izoelektrik noktadan kaçınmak için genellikle pH 8.0 ile 9.0 arasında değişen alkali tamponlar kullanılır. Böylece elektroforetik destek materyali üzerinde daha fazla absorpsiyona neden olmadan ve izoelektrik noktası düşük olan proteinleri de separe edecek şekilde yüklenme sağlanmış olur. Sonuçta alkali ortamda negatif olarak yüklenmiş olan proteinler anoda doğru göç ederler.

Bu teknikte kesintisiz göç sağlamak için tabakalar arası boşluklar uygun tampon çözeltiler ile doldurulmuştur. Numune uygulaması ise, en üstteki yoğunlaştırıcı jel üzerine uygulanır. Akım uygulamasıyla bileşenler uygun büyüklükteki porlardan geçerek; molekül büyüklüğü ve elektrik yüklerine göre separe olurlar. Bu yöntem özellikle araştırma çalışmalarında, tek tek protein fraksiyonlarının saptanmasında ve genetik çalışmalarda kullanılır.

Genel bir elektroforez uygulamasından birbirini takip eden beş ana işlem mevcuttur.

1. Numune ve destek materyallerinin hazırlanması
2. Numune uygulaması
3. Doğru akım uygulaması
4. Boyama ve şeffaflaştırma
5. Kantitasyon
 - a. Densitometrik kantitasyon
 - b. Elüsyon yöntemiyle miktar belirtimi

Elektroforez öncesi separasyonu yapılacak numunenin hazır duruma getirilmesi gerekir. Numunenin yeteri kadar protein içermesi maksadıyla sulandırılması veya

konsantre edilmesi gerekir. Bir hemoglobin elektroforezi yapılacaksa hemolizatin önceden yapılması gerekir.

Genellikle elektroforetik destek materyalleri kullanıma hazır olarak satılmaktadır. Fakat elektroforez öncesi bu maddelere iletkenlik kazandırmak için seçilen tampon çözelti içerisinde iyice ıslatılması gerekir. Ancak, destek materyalinin gözenekleri tampon ile iyice dolduktan sonra kesintisiz iyi bir göç elde edebilir.

Numune tatbik edilirken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar ise: kullanılan tamponun cinsine göre numune uygulaması anodik, katodik veya merkezi uygulama gerektirebilir. Şayet asit bir tampon kullanılacaksa, pozitif olarak yüklenen numunenin göçü negatif kutba doğru olacağından numuneyi mümkün olduğu kadar anoda yakın tatbik etmek gerekir. Eğer alkali bir tampon kullanılacaksa aynı nedenlerden dolayı numune tatbikini bu sefer katoda yakın uygulamak gerekir.

Elektroforez işlemi sırasında devamlı olarak destek materyalinin tamponla temas halinde bulunan uçlarından merkeze doğru bir tampon hareketi vardır. Özellikle ısının yükseldiği ve buharlaşmanın arttığı durumlarda bu daha belirgin olarak ortaya çıkar. Tamponun bu hareketi ve numunenin yoğun ortamdan daha az yoğun ortama difüzyonu nedeniyle kontrolsüz olarak dağılmayı önlemek için numune uygulamaları mümkün olduğu kadar merkeze yakın tatbik edilmelidir. Ayrıca, numune uygulamasını tatbiken hemen akım uygulamasına geçmekte zorunludur.

Bir elektroforez uygulamasında elektroforetik hareketi sağlayan asıl itici güç doğru akımdır. Bu maksatlı iki çeşit güç kaynağı kullanılır. Birisi sabit akım sağlayan güç kaynağı, diğeri sabit voltajlı güç kaynağıdır. Elektroforez sırasında özellikle yan iletken durumdaki destek materyali sonuçta ısı açığa çıkaran sabit bir dirence sahiptir

Elektroforetik göçün hızını büyük oranda voltaj farkı belirlemesine rağmen çoğunlukla yüksek potansiyel uygulamaktan kaçınılır. Elektroforez'de doğru akım uygulamasını takiben oluşan fraksiyonları görünür hale getirmek ve miktar belirlenmesi yapabilmek için mutlaka boyama işlemi uygulamak gerekir. Uygulamanın türüne, kullanılan materyale ve uygulayıcının tercihinine göre değişik boya maddeleri vardır.

Boyar madde tercihi yapılırken dikkat edilmesi gereken önemli hususlar: Boyar maddenin sadece separasyon yapılan numuneyi boyama özelliğinde olması ve destek materyali üzerine bağlanmaması gerekmektedir. Yıkama ile kolayca destek materyalinden ayrılabilmelidir. Son senelerde bilhassa protein elektroforezinde boyar madde olarak Gümüş nitrat kullanılmaktadır.

Boyama işlemini takiben fondaki boya artıkları uzaklaştırıldıktan sonra poliakrilamid gibi bazı destek materyallerinin saflaştırılması işlemi gerekmektedir. Boya ve şeffaflaştırma işlemini takiben fraksiyonların miktarlarının belirlenmesi gerekir. Bunun için genellikle iki yöntem kullanılır Birincisi: Şeffaflaştırılmış boyalı fraksiyonların uygun bir densitometrede grafiklerinin çizimi, ikincisi ise: elüsyon yöntemidir. Elektroforez, kullanılan destek materyali çeşidine ve uygulanan numune tipine göre ayrı ayrı sınıflandırılmaktadır. Buna göre önemli elektroforez çeşitleri:

A. Uygulanan numune tipine göre sınıflandırma

1. Protein Elektroforezi
2. Lipoprotein Elektroforezi
3. Hemoglobin Elektroforezi
4. İmmün Elektroforezi
5. İzoelektrik fokusing Elektroforezi
6. İzoenzim Elektroforezi

B. Kullanılan destek materyalinin çeşidine göre sınıflandırma

1. Kağıt Elektroforezi (P.E.)
2. Agar Elektroforezi (A.E.)
3. Agaroz jel Elektroforezi (A.G.E.)
4. Nişasta jel Elektroforezi (S.G.E.)
5. Selüloz asetat Elektroforezi (C. A.E.)
6. Poliakrilamid jel Elektroforezi (P. A.G.E.)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE): Poliakrilamid jel, uygun bir bağlayıcı ajan kullanılarak monomerlerin hem lineer hem de çapraz bağlanmasıyla elde edilir. Bu bağlanmadan dolayı üzerindeki serbest iyonize gruplardan tamamen arındırıldığı için elektroendosmosis sıfıra indirilmiştir. Ayrıca, jelde kullanılan monomerlerin kompozisyonu ve gözenek boyutları ihtiyaca göre değiştirilebilir. Böylece separasyonu yapılacak bileşenler sadece elektrik yüklerine göre değil aynı zamanda molekül büyüklüklerine göre de ayrılmış olur.

Elektroforezde jellerin hazırlanmasında kullanılan akrilamid monomer yapısındadır. Amonyum persülfat ve tetraetilendiamin (TEMED) serbest radikallerinin varlığında, akrilamid molekülünden başlayıp bir dizi zincir reaksiyonları ile iki fonksiyonlu bir yapı olan, metilenbisakrilamidle polimerizasyon reaksiyonu yapar. Çapraz bağlanan zincirler bir jelin oluşmasında, jeldeki por büyüklüğünü ayarlar.

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

4.1.Örneklerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi

Çalışmada, *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera* kullanıldı. Balık türleri Kars Çayı'ndan(KARS) daha önceden belirlenen bölgelerden elde edildi. Balıklar laboratuara canlı olarak getirildi. Her bir gruptan deri ve parazitik enfeksiyon olmayan 10 balık çeşidi elektroforez için kullanıldı. Balık beyaz kas dokusundan bir parça bistüri yardımıyla alındı. Bütün balıkların doku örnekleri sol dorsal taraftan elde edildi. Sonra, bu örneklerin deri ve kılçıkları temizlendi ve 1 dakika Tris-HCl tamponunda (0,5 M, pH: 6,8) homojenize edildi. Homojenatlar +4 oC ve 20.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar protein analizi ve SDS-PAGE için kullanıldı. Protein içeriği standart protein olarak sığır serum albumin kullanıldığı Lowry vd.(1951)'nin metodu ile ölçüldü ve sonra süpernatantlardaki protein içeriği Tris-HCl tamponuyla 4 µg/ µL'ye ayarlandı.

4.2. SDS Poliakrilamid Jel Solüsyonlarının Hazırlanması.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), vertikal slab jel elektroforez sistemi kullanılarak Laemmli (1970) ve O'Farrell (1975) metotlarına göre yapılmıştır. Bu uygulama için aşağıdaki çözeltilerin hazırlanması yeterlidir.

4.3.1. % 30'luk Akrilamid Solüsyonu

7.5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid hassas terazide tartılarak bir miktar distile suda eritildi. Total hacim 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında koyu renkli şişede 2-3 ay dayanıklıdır. Akrilamid çözeltisinin nörotoksik etkili olması nedeniyle çalışırken eldiven kullanıldı.

SDS-Poliakrilamid jel solüsyonu için pH ve molariteleri farklı stoklama ve ayırma jel tamponları hazırlandı.

4.3.2. Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)

1.5 g Tris ve 100 mg SDS hassas terazide tartılarak yaklaşık 10 ml dH₂O'da eritildi. Daha sonra pH'sı 6.8 olana kadar HCl çözeltisinden (1M) ilave edildi (yaklaşık 1 M HCl'den 7ml). Total hacim dH₂O ile 25 ml'e tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

4.3.3. Ayırma jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)

9.075 g Tris ve 200 mg SDS (Sodyum dodesil sülfat) hassas terazide tartılarak 7.5 ml dH₂O'da eritildi. Daha sonra tamponun pH'sı 1 M HCl çözeltisi ile 8,8'e ayarlandı. Total hacim dH₂O ile 25 ml'ye tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi. 1 M HCl çözeltisi, 11.7 M'lık stok HCl'den 8.55 ml alındı ve total hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

4.4. Yürütme Tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH 8.3)

3.03 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1g SDS hassas terazide ayrı ayrı tartıldı ve ilk önce Tris ve Glisin 750 ml dH₂O'da eritildi, sonra SDS eklenerek pH 8.3'e ayarlandı. Total hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

4.5. Numune Tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH 6.8)

Stoklama jel tamponu	1.25 ml
(0.5 M Tris- HCl, pH 6.8)	
SDS	195 mg
Gliserol (%99'luk)	1 ml
2. Merkaptotanol	0.5 ml
Bromophenol blue	1-2 mg

Distile suyla 10 ml'ye tamamlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

4.6. Jelin boyanması işlemi:

Boyama işlemi için önce Coomassie blue çözeltisi hazırlandı.

Boyama çözeltisi:

Coomassie Brilliant Blue R.250	125 mg (%0.025)
Ethanol	200 ml (%40)
Asetik Asit (AcOH)	35 ml (%7)

Total hacim distile suyla 500 ml'e tamamlandı. Hazırlanan bu boyama solüsyonu 20-40 defa kullanılabilir. Jeller bu boya solüsyonunda 2-4 saat bekletilmek suretiyle boyanırlar. Her jel için kendi hacminin 5-10 katı hacminde boya solüsyonu kullanıldı. Boyama esnasında hafifçe çalkalama işlemi jellerin daha iyi boyanmasını sağladı. Boyama işlemi çalkalamalı benmari su banyosunda 56-60 °C'de bekletilmek suretiyle daha kısa sürede (20 dk) tamamlanabilir. Bu esnada sık sık çalkalama işlemi yapılmalıdır. Bu yöntem her lane (çizgi)'de 0.1-0.5mg proteini boyayabilir.

4.7. Jelden boya çıkarma İşlemi

Jeli boyadan çıkarma işleminde iki metot vardır. Bunlar;

1. Metot;

Methanol %40'lık

Asetik asit (AcOH) %7'lik

Bu solüsyonda jeller 1 saat süreyle bekletilerek ve ara sıra çalkalamak suretiyle boyadan çıkarma işlemi gerçekleştirilir. Protein bantları dışındaki jel kısımlarının daha iyi beyazlaması isteniyorsa süre daha uzun tutulmalıdır.

2. Metot;

Methanol %5

Asetik asit (AcOH) % 7.5

Çalışmamızda boyadan çıkarma işleminde ikinci metot kullanıldı. Bu solüsyonda jellerin boyadan çıkarma işlemi bir gecede tamamlandı. Ancak, bu süre içinde boyadan çıkarma solüsyonu 2-3 defa değiştirilerek daha iyi sonuç elde edildi.

4.8. Diğer Kimyasallar ve Özellikleri:

1. TEMED (N,N,N',N' - Tetra metiletilen diamin)

Hazır preparat olarak minimum % 99' luk hazır çözeltisi bulunmaktadır. Bu çözelti koyu renkli şişede +4 °C' de konsantre halde süresiz bekletilebilir.

2. %1' lik Amonyum persülfat:

Poliakrilamid jel çözeltisine polimerizasyon için ilave edilen bir ajandır. Karışıma çok az ilave edilmesi nedeni ile 5ml'lik veya daha az hacimde, özellikle deneyden hemen önce hazırlandı. Bu çözeltinin stabil olmaması nedeniyle her deneme için tazesini hazırlandı.

4.9. SDS-Kesikli Jel Tampon Sistemli Jelin Hazırlanması

Kesikli jel sistemi, proteinlerin stoklandığı ve birbirinden ayrıldığı iki farklı konsantrasyonda iki ayrı jelden oluşmaktadır.

Bu jelin hazırlanması için ayırma ve stoklama solüsyonları gereklidir.

4.9.1. Ayırma jelin hazırlanması

Tablo1. Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma jeli Hazırlama Prosedürü.

Stok solüsyonlar (ml)	Ayırma jelin son konsantrasyonları (%)						
	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Poliakrilamid solüsyonu (%30)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Ayırma jel tamponu	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
%1 Amonyum persülfat	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
dH ₂ O	5.49	7.99	10.49	12.99	15.49	17	20.49

Toplam hacim 30 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu jel hazırlanırken dikkat edilmesi gereken husus; %1' lik amonyum persülfatın çözeltiye en son katılmasıdır. Çünkü, çözeltiye amonyum persülfat ilavesinden sonra polimerizasyon işlemi başlamakta ve kısa sürede gerçekleşmektedir.

Stoklama jelin hazırlanması

Tablo 2. Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü.

Stok solüsyonlar (ml)	Stoklama Jelin Son Konsantrasyonları (%)			
	6	5	3	
% 30 Poliakrilamid	2	1.67	1.33	1
Stoklama Jel Tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5
% 1 Amonyum persülfat	0.5	0.5	0.5	0.5
TEMED	0.075	0.075	0.075	0.075
dH ₂ O	4.925	5.265	5.595	6.425

Total hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu solüsyonu da hazırlarken %1'lik amonyum persülfat'ın en son ilave edilmesine dikkat edilmelidir.

4.10. Ayırma Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi

Plağa ilk önce ayırma jeli dökülür. Proteinlerin birbirinden ayrılması %10'luk ayırma jelde yapılmıştır. %10'luk jel çözeltisi için;

%30'luk Poliakrilamid solüsyonu	10 ml
Ayırma jel tamponu	3,75 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0,75 ml
TEMED	0,01 ml
dH ₂ O	15,49 ml

Yukarıdaki miktarlar 30 ml jel çözeltisi hazırlamak için gerekli olan miktarlardır. Ayırma jel solüsyonunun toplam hacminin 10 ml olması yeterlidir. Bunun için yukarıdaki miktarlar 2/3 oranında azaltıldı. Beher içerisine 1,25 ml ayırma jel tamponu konuldu ve arkasından 5,163 ml dH₂O ilave edildi. Daha sonra 0,0033 ml TEMED ilave edildi. Eğer jel kalınlığı 1 mm'den küçük ise ortamdaki oksijen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için çözeltiyi bir kaç dakika vakum etmek yeterlidir. Aksi takdirde ortamdaki oksijen polimerizasyonda gecikmeye neden olacaktır. Polimerizan ajan olarak %1'lik amonyum persülfat

kullanılmıştır. Amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözelti hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan ayırma çözelti 10 ml'lik enjektöre alındı ve vakit kaybetmeksizin düzenekteki boşluğa doldurulma işlemine geçildi. ayırma jel çözeltisi köpürtülmezsizin düzenekteki işaretli yere kadar dolduruldu. Jelin üst yüzeyinin keskin ve düzgün bir çizgi haline gelmesini mutakiben hava ile temasını kesmek için jel yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak kadar dH₂O ilave edildi. %1'lik Amonyum persülfat, 50 mg alınarak 5 ml dH₂O'da çözmek suretiyle hazırlandı. Polimerize olan ayırma jelin üzeri naylon bir poşetle hava almayacak şekilde kapatıldı ve +4 °C 'de bir gece bekletildi. Böylece polimerize olmamış akrilamid ve bisakrilamidlerin polimerizasyonu sağlandı. Tam polimerizasyon sonrası akrilamid ve bisakrilamidin nörotoksitesi ortadan kalkar, dolayısıyla bu aşamadan sonra jellerle direk temasta hiç bir sakınca yoktur.

4.11. Stoklama Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi

Proteinlerin stoklanması % 4'lük stoklama jel üzerinde yapılmıştır. %4'lük stoklama jel solüsyonu hazırlamak için, bir mikropipetle aşağıdaki çözeltilerden uygun miktarlarda alındı ve total hacim 3,5 ml'e tamamlandı.

Buna göre;

%30'luk akrilamid solüsyonu	0,468 ml
Stoklama jel tamponu (pH 6.8, 0.5 M)	0,833 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0,25 ml
TEMED	0,015 ml
dH ₂ O	1,95 ml

Toplam Hacim : 3,5 ml

Jel yüzeyindeki distile su boşaltıldı ve iki jelin kolay kaynaşması için ayırma jel yüzeyi stoklama tamponla yıkandı. Daha sonra numune yükleme lane'larını oluşturmak için tarak cam levhalar arasına yerleştirildi. Tarağın kenarından stoklama jel solüsyonu bir enjektörle yavaş yavaş plağa aktarıldı. Ancak jel içinde hava kabarcığı bulunmamasına dikkat edildi. Bu arada tarak yerleştirildikten sonra protein uygulanacak kanallar cam kalemle işaretlendi. Stoklama jel solüsyonu polimerize olduktan sonra tarak alındı ve kanal aralıkları da bir lanset yardımıyla düzeltildi. Protein yükleme çukurları (Lane) yürütme tamponuyla bir kaç defa yıkanarak jel artıkları temizlendi. Sonra elektroforez tankları yürütme tamponu ile (Tris-Glisin pH

8,6) dolduruldu ve plaktaki lastik conta ve klempler çıkarıldı. jel tanka yerleştirilerek plağın alt kısmında oluşan hava kabarcıkları enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu işlemlerden sonra serum numunelerinin hazırlanmasına geçildi.

4.12. Serum Numunelerinin Sulandırılması ve Jele Yükleme İşlemi

En sonunda her bir numune tüpünden 200µl serum alındı ve her birinin üzerine 200 µl numune tampon ilave edilerek son protein konsantrasyonu 2µg/µl'ye ayarlanmış oldu.

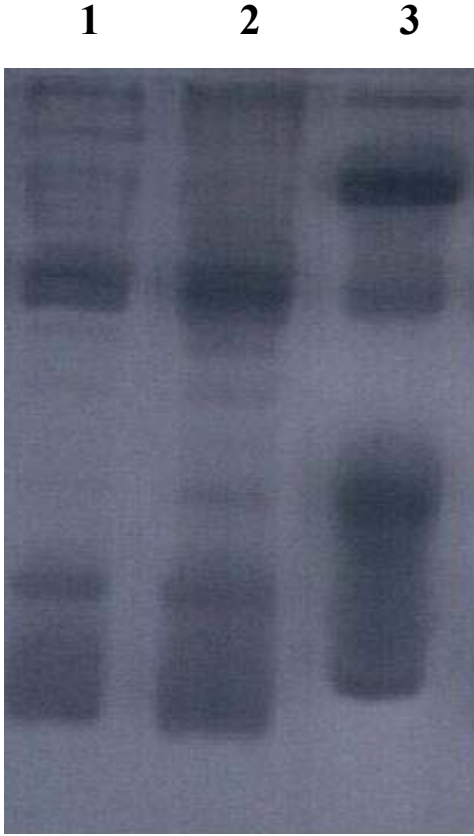
Hazırlanan vidalı cam tüp içerisindeki serum numuneleri bir beher içerisinde bir miktar su konularak 100°C'de 3dk süreyle kaynatıldı. Numune tamponundaki 2-merkaptanoethanol proteinlerdeki disülfid bağlarını açar ve denature olmalarını sağlar. Böylece serum proteinleri tek polipeptidler haline gelmiş olur. Denature edilen protein örneklerinden 1 numaralı Lane *Orthrias panthera*, 2 numaralı Lane *Orthrias angorae bureschi* ve 3 numaralı Lane standart proteinlerden 20'şer µl uygulandı. Böylece 40µg protein jele yüklenmiş oldu. Numuneler plaktaki yerlerine uygulandıktan sonra proteinler 200 V ve 30 mA'de yürütüldü.

Elektroforez de proteinleri yürütme işlemine yaklaşık 2,5 saat devam edildi. Sürenin sonunda jel tanktan alınarak boyama solüsyonda boyama işlemine geçildi. Bu arada plak üzerindeki stoklama jeli kesilerek atıldı. Jeli içinde 250 ml boyama solüsyonu olan bir kaba bırakıldı. Jel, 56-60 °C 'ye ayarlanmış su banyosunda 20-30dk inkübe edildi. Bu esnada kap içindeki boya solüsyonu hafifçe çalkalanarak jelin daha çabuk boyanması sağlandı.

Bu işlem tamamlandıktan sonra her jel, boyadan çıkarma işlemi için %5 methanol ve %7,5 asetik asit bulunan bir kaba alınarak protein bantları dışındaki jel kısımlarının şeffaflaşması sağlandı. Bu işlem, jellerin su banyosunda 55-60 °C'de 60-70dk bekletilmek suretiyle yapıldı. Bu esnada jeller hafifçe çalkalandı. Ancak boyadan çıkarma işlemi esnasında boyadan çıkarma çözeltisi bir kaç defa yenilendi. Bu işlemlerden sonra jeller % 7'lik asetik asit içinde muhafaza edildi. Sonra jellerin fotoğrafları çekildi

5. BULGULAR

Orthrias angorae bureschi ve *Orthrias panthera*'nın sarkoplazmik proteinleri Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezine uygulandı. Elde edilen elektroforegramlara göre, *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera*'da 13 sarkoplazmik protein bandı elde edildi. Buna göre, *Orthrias angorae bureschi*'nin proteinlerinin molekül ağırlıkları 85.0, 82.8, 77.4, 69.6, 60.9, 49.2, 47.9, 43.6, 41.9, 33.0, 32.1, 20.5 ve 11.6 kD olarak bulundu. *Orthrias panthera*'nın proteinlerinin molekül ağırlıkları ise 79.5, 77.4, 69.6, 66.0, 47.9, 46.0, 41.9, 36.7, 35.7, 28.1, 27.4, 19.9 ve 11.6 kD olarak bulundu. Bu elde edilen sonuçlara göre, 77.4, 69.6, 47.9, 41.9 ve 11.6 kD'luk protein bandları benzerlik gösterdi.



Şekil 3. *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera*'nın sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramı. 1. *Orthrias panthera*, 2. *Orthrias angorae bureschi*, 3. Standart proteinler.

Tablo 3. *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera*'nın sarkoplazmik proteinlerinin moleküler ağırlıkları

<i>Orthrias angorae bureschi</i>	<i>Orthrias panthera</i>
(kD)	(kD)
85.0	79.5
82.8	77.4
77.4	69.6
69.6	66.0
60.9	47.9
49.2	46.0
47.9	41.9
43.9	36.7
41.9	35.7
33.0	28.1
32.1	27.4
20.5	19.9
11.6	11.6

6. TARTIŞMA

Taksonomik çalışmalar genellikle morfolojik ölçümler, anatomik karakterler ve karyotip analizleri üzerine dayandırılmıştır. Sarkoplazmik proteinlerin elektroforetik analizleri balıkların sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Böylece, akraba taksonların tanımlanması sarkoplazmik proteinlerin elektroforetik sonuçlarına göre kolayca yapılabilmektedir (Pinerio vd. 1997). Diğer taraftan, türlerin proteinleri arasındaki benzerlikler türlerin genetik benzerliği olarak kullanılabilir. 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, ilgili elektroforetik teknikler kullanılmaktadır (Laird vd. 1982). Günümüzde, SDS-PAGE tekniği kullanılarak balıklar üzerine taksonomik çalışmalar çok sayıdadır.

Yılmaz ve vd. tarafından yapılan bir araştırmada (2000) *Capoeta trutta* ve *Capoeta capoeta umbla* 'nın serum proteinleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Bu araştırmacılar *Capoeta capoeta umbla* 'da 11 band ve *Capoeta trutta* 'da 16 protein bandın olduğunu göstermiştir. Onlar, serum protein bandlarının sayısının özellikle taksonomide önemli olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer olarak, Miyazaki vd. (1998) Cyprinidae familyası ve Acheilognathinae, Leuciscinae, Gobioninae alt familyalarına ait 6 türün karaciğer proteinlerini SDS-PAGE yöntemiyle separe etmişler, *Cyprinus carpio* ve *Pseudogobius esocsinus esocsinus* 'un en küçük genetik farkı verdiğini belirtmişlerdir. Buna karşın, *Tribolodon hakonensis* diğer üç tür balıkla hemen hemen eşit genetik farka sahiptir. Knuutinen ve Harjula (1998) Finlandiya'da en çok bulunan 16 tatlısu balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerinin farklılaştığını göstermişlerdir. Araştırmacılar sarkoplazmik proteinlerin elektroforezi gibi yeni teknikler kullanılarak alt familya ve alt tür gruplandırmasındaki zıtlıklara ışık tutacağı sonucuna varmışlardır. Diğer bir araştırmada, 14 balık türünün sarkoplazmik proteinleri poliakrilamid jel izoelektrik fokusing'le analiz edilmiştir ve genetik polimorfizm bulunmuştur (Colombo vd. 2000). Benzer olarak, *Betta splendes* 'in 4 renkli varyetelerinin sarkoplazmik proteinleri izoelektrik fokusing'le analiz edilmiş ve 6 bandda genetik polimorfizm bulunmuştur (Khoo vd. 1981). Diğer bir araştırmada, dondurma esnasında Gadoid ve Gadoid olmayan türlerin kas proteinleri SDS-PAGE ile incelenmiş ve farklı protein bantları görülmüştür (Ragnarsson vd. 1989).

Bu tip araştırmalar Trkz vd. (2000) tarafından da yapılmıştır. Bu araştırmada, hem pişmiş hem de taze 6 balık türünün sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE ile analiz etmişler ve balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerine göre sınıflandırılabilceğini belirtmişlerdir. Pinerio vd. (2001) 5 farklı merlos türü (*Merluccius merluccius*, *M. australis*, *M. hubbsi*, *M. gayi* ve *M. capensis*)'in sarkoplazmik proteinlerinin 2 farklı elektroforezle incelemiş ve onların bazılarının çok yakın akraba olduğunu bildirmişlerdir. Yılmaz vd. (2005) *Orthrias insignis euphyraticus* ve *Cyprinion macrostomus*'un sarkoplazmik proteinlerinin birbirinden oldukça farklı olduğu bildirmişlerdir. *Cyprinion macrostomus*'ta 18 protein bandı bulunurken, *Orthrias insignis euphyraticus*'un total protein sayısı 20 olarak elde etmişlerdir. Buna göre, mevcut çalışma da kullanılan *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias*

panthera'nın sarkoplazmik proteinleri *Orthrias insignis euphyraticus* 'dan farklı olarak bulunmuştur. Balitoridae ailesine ait balık türlerinin tanımı farklı türler için çeşitli çalışmalarla olsa da, maalesef, sarkoplazmik protein elektroforezleri tarafından *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera* ile yapılmış taksonomik bir çalışma yoktur. Bir araştırmada, *Lefua* (Balitoridae) türü (loaches) balıklarının DNA analizleriyle intraspesifik ve filogenetik akrabalıkları 2 boyutlu elektroforez kullanılarak incelenmiştir. Protein analizleri *Lefua sp.* ve *L. echigonia* arasında ve *Lefua sp.* ve *L. nikkonis* arasındaki genetik mesafenin *L. echigonia s. Str.* ve *L. nikkonis* arasındaki mesafe kadar büyük olduğunu göstermiştir. DNA analizleri, *Lefua sp.*'nin *L. echigonia s. Str.* ile *L. nikkonis-L. costata* kompleksi'ne göre (Sakai vd. 2003) çok daha yakın ilişkide olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada, *Lefua nikkonis*, *Lefua echigonia* ve *Lefua costata*'nın DNA analizleri incelenmiştir. Bu çalışma gösterir ki, *Lefua*'nın her türü, monofiletik bir grup oluşturmuştur, bu da açıkça gösterir ki *Lefua* türleri genetik olarak birbirinden ayırt edilebilir. (Milhara et. Al. 2005). Benzer olarak, Bornean emici balıklarının, *Gastromizon*'un ve *Neogastromizon*'un mitokondriyal DNA analizleri sitokrom b geni sıralarının karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. *Gastromizon*'un ve *Neogastromizon*'un her ikisi de monofiletiktir ve Çin Homalopterid *Crossostoma lacustre*, Bornean türü ile ilişkili değildir. (Sulaiman vd. 2006).

Morfolojik karakterler ve kladistik teknikler üzerine dayandırılan geleneksel metotlar yakın akraba türlerin sınıflandırılmasında yeterli değildir. Problemlerin çözümünde elektroforez gibi yeni tekniklerin kullanımı kaçınılmazdır. Bundan başka DNA-DNA hibridizasyonu sınıflandırmadaki uzun evrimsel tartışmaların çözümü olarak düşünülebilir. SDS-PAGE ile balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerle belirlenmesi, balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerle belirlenmesi, balık türlerinin sistematüğinde kullanılan çok iyi bir tekniktir.

Sonuç olarak, *Orthrias angorae bureschi* ve *Orthrias panthera*'nın sarkoplazmik proteinlerinde 13 protein bandı olmasına rağmen, moleküler ağırlık yönünden 5 protein bandı benzerlik göstermiş ve morfolojik taksonomideki yerlerinin doğru olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Bu iki balığın morfolojik yönden tür tanımlaması zor olduğundan, sarkoplazmik protein elektroforezi ile birbirinden kolayca ayırt edilebileceği gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

An H., Marshall, M.R., Otwell W.S. and Wei C.I., "Electrophoretic identification of raw and cooked shrimp using various protein extraction systems", J. Food Sci., 53(2): 313-318 (1988).

Colombo M.M., Colombo F., Biondi P.A., Malandra R. and Renon P., "Substitution of fish species detected by thin-layer isoelectric focusing and a computer-assisted method for the evaluation of gels", Chromatogr., 880: 303-309 (2000).

Focant B., Jacob M.F. and Huriaux, F., "Electrophoretic comparison of the proteins of some perch (*Perca fluviatilis* L.) head muscles", J. Muscle Res. Cell Motil., 2 (3): 295-305 (1981).

Goll D.E., Muscle Proteins. Chap. 6. In "food proteins, Whitaker J.R., and Tannenbaum S.R., (Ed.) Avi Publishing Co., Westport C.T., p.121 (1977).

Khoo G., Loh E.Y.F., Lim T.M. and Phang V.P.E., "Genetic variation in different varieties of siamese fighting fish using isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins", Aquacult. Int., 5: 537-549 (1997).

Knuutinen J. and Harjula P., "Identification of fish by reversed-phase high performance liquid chromatography with photodiode-array detection", J. Chromatogr., 705B: 11-21 (1998).

Laemmli U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227: 680-685 (1970).

Laird W.M., Mackie I.M. and Ritchie A.H., "Differentiation of species of fish by isoelectric focusing on agarose and polyacrylamide gels-a comparison", J. Assoc. Publ. Analysis., 20: 125-135 (1982).

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., "Protein measurement with the polin phenol reagent", J. Biol. Chem., 193: 265-271 (1951).

Miyazaki J.I., Hirabayashi T., Hosoya K. and Iwami T.A., "Study of the systematics of cyprinid fishes by two dimensional gel electrophoresis", Environ. Biol. Fish., 52: 173-179 (1998).

O'Farrell P.H., "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", J. Biol. Chem., 250: 4007-4021 (1975).

- Pinerio C., Barros-Velazques J., Perez-Martin R.I., Martinez I., Jacobsen T., Rehbein H. and et al. "Development of a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis reference method for the analysis and identification of fishy species in raw and heat-processed samples: a collaborative study", *Electrophoresis*, 20:1425-1432 (1999).
- Pinerio C., Sotelo C.G., Medina I., Gallerdo I.M. and Martin R.P., "Reversed-phase HPLC as a method for the identification of gadoid fish spesies", *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204: 411-416 (1997).
- Pinerio C., Vazquez J., Marina A.I., Barros-Velazques J., Gallardo J.M., "Characterization and partial sequencing of species-specific sarcoplasmic polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis", *Electrophoresis*. 22(8): 1545-1552) (2001).
- Pinerio C., Vazquez J., Marina A.I., Barros-Velazquez J. and Gallardo J.M., "Characterization and partial sequencing of species-specific sarcoplasmic polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis" *Electrophoresis*, 22(8): 1545-1552 (2001).
- Ragnarsson K. and Regenstein J.M., "Changes in electrophoretic patterns of Gadoid and Non-Gadoid fish muscle during frozen storage", *J. Food Sci.*, 54(4): 819-823 (1989).
- Türköz Y., Arslan A., Gönülalan Z. ve İleri T., "Değişik protein ekstraksiyon yöntemleri kullanarak balık türlerinin elektroforetik ayırımı, dondurarak saklama ve ısı işleminin kas proteinlerine etkisinin incelenmesi", *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 14(1): 31-38 (2000).
- Weber K., Pringle J.R. and Osborn M., "Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel", *Meth. Enzymol.*, 26: 3 (1972).
- Yılmaz M., Çiğremiş Y., Türköz Y. ve Gaffaroğlu M. A taxonomic study on *Orthrias insignis euphyraticus* (Banarescu and Nalbant, 1964) ve *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843) by sarcoplasmic protein electrophoresis. *G.U. Journal of Science*.18(1);61-68. 2005.
- Yılmaz M., Türköz Y., Erdemli A.Ü., Kalkan E. ve Çiğremiş Y., "Karakaya baraj gölü bazı balıklarının kan serum proteinlerinin elektroforetik modelleri üzerinde taksonomik bir çalışma", *S. Ü. Vet. Bil., Derg.*, 16(1): 89-92 (2000)

ÖZGEÇMİŞ

1976 Yılında Kars'ta doğdu. İlk,orta ve lise eğitimini Kars'ta tamamladı. 1995 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1999 yılında mezun oldu. 2000 yılından beri Özel Öğretim Kurumları'nda Biyoloji öğretmeni olarak çalışmakta.