

**A TAXONOMIC STUDY ON ORTHRIAS INSIGNIS EUPHRATICUS
(Banarescu and Nalbant, 1964) and CYPRINION MACROSTOMUS (Heckel, 1843)
by SARCOPLASMIC PROTEIN ELECTROPHORESIS**

Muhittin YILMAZ*, Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Kafkas University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, 36100,
Kars, TURKEY
e-mail: muhittinyilmaz@yahoo.com

Yusuf TÜRKÖZ
İnönü University, Faculty of Medical, Department of Biochemistry, 44069,
Malatya, TURKEY,

Muhammet GAFFAROĞLU
Gazi University, Faculty of Kırşehir Science and Art, Department of Biology, 40100,
Kırşehir, TURKEY.

ABSTRACT

In this study, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) was applied to the sarcoplasmic proteins of *Orthrias insignis euphraticus* (BALITORIDAE) and *Cyprinion macrostomus* (CYPRINIDAE) fish taken from Karakaya Dam Lake. The electrophoregram showed that there were differences between the two species in both the number of bands and the molecular weight (MW) of the sarcoplasmic proteins. While *Cyprinion macrostomus* had 18 protein bands, there were 20 protein bands in *Orthrias insignis euphraticus*. On the other hand, the bands obtained from *Orthrias insignis euphraticus* and numbered as 9th protein band with molecular weight of 29.5 kD and 12th band with MW of 27.2 kD were not found in *Cyprinion macrostomus*. 9th protein band with MW of 27.5 kD was only found in *Cyprinion macrostomus*.

We concluded that comparisons of sarcoplasmic proteins might have practical importance in taxonomic classification.

Key Words: Fish, Sarcoplasmic Proteins, SDS-PAGE, Taxonomy.

**SARKOPLAZMİK PROTEİN ELEKTROFOREZİ İLE ORTHRIAS INSIGNIS
EUPHRATICUS (Banarescu and Nalbant, 1964) ve CYPRINION MACROSTOMUS
(Heckel, 1843) TAKSONOMİSİNİN İNCELENMESİ**

ÖZET

Bu çalışmada, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi)'ne, Karakaya Baraj Gölü'nden yakalanan *Orthrias insignis euphraticus* (BALITORIDAE) ve *Cyprinion macrostomus* (CYPRINIDAE) balıklarının sarkoplazmik proteinleri uygulandı. Elektroforegramda, sarkoplazmik proteinlerin band sayısı ve molekül ağırlıklarının iki tür arasında farklı olduğu görüldü. *Cyprinion macrostomus* 18 protein bandına sahipken *Orthrias insignis euphraticus*'da 20 protein bandı vardı. Diğer taraftan, *Orthrias insignis euphraticus*'dan elde edilen 29.5 kD moleküler ağırlığına sahip 9. protein bandı ve 27.2 kD moleküler ağırlığına sahip 12. protein bandı *Cyprinion macrostomus*'ta bulunmadı. 27.5 kD moleküler ağırlığına sahip 9. protein bandı yalnızca *Cyprinion macrostomus*'ta bulundu.

Sarkoplazmik proteinlerin karşılaştırılmasının taksonomik sınıflandırmada pratik önemi olabileceğine karar verildi.

Key Words: Balık, Sarkoplazmik proteinler, SDS-PAGE, Taksonomi.

1. GİRİŞ

Cyprinidae familyasına ait türlerin farinks dişleri 1-3 sıralıdır, her bir sıra maksimum 8 dişlidir. Dudaklar genellikle ince, büküm ya da kabarcık yoktur. Bıyıklı yada bıyiksız olabilir. Genellikle, premaxilla, premaxillayı yapan üstteki çeneyi tamamen sınırlar ya da açıklıktan dışarı bırakır. Üstteki çene genellikle öne uzar. Bazılarında, dorsal yüzgeç diken benzeri ışınlarla sahiptir. Balitoridae familyası genel olarak hızlı akan akarsularda yaşayan küçük balıklardır ve büyük emici ağızlara sahiptirler, modifiye olmuş ventral yüzgeçlerini kayalara tutunmak için kullanırlar. Ağızlarının etrafında çok sayıda bıyık bulunması gibi, Cobitidae sibling familyasıyla bir çok benzerliklere sahiptirler.

Geçmişte, balık türlerinin sınıflandırılması başlıca dış morfolojik karakterlerin araştırmasıyla yapılmıştı. Günümüzde elektroforez balık türlerinin sınıflandırılmasına yardım amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu maksatla sarkoplazmik proteinler, serum proteinleri, karaciğer proteinleri ve enzimlerin bir çoğu araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (1-9).

Kasın hücre içi sıvısında glikolitik enzimler, miyogloblin 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 (10-11). Mevcut araştırmada, *Orthrias insignis euphraticus* ve *Cyprinion macrostomus*'un sarkoplazmik proteinleri SDS-PAGE tekniği ile analiz edilmiştir ve böylece bu türler arasındaki benzerlikler ve farklılıklar incelenmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

Çalışmada, 3 yaşında *Orthrias insignis euphraticus* ve *Cyprinion macrostomus* kullanıldı. Balık türleri Karakaya Baraj Gölü'nden (Malatya, TÜRKİYE) daha önceden belirlenen bölgelerden toplandı. Balıklar laboratuara canlı olarak getirildi. Her bir gruptan deri ve parazitik enfeksiyon olmayan 10 balık seçildi ve elektroforez için kullanıldı. Balık beyaz kas dokusundan bir parça bir 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 °C 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 albümin kullanıldığı Lowry vd.'nin metodu ile ölçüldü (12) ve sonra süpernatantlardaki protein içeriği Tris-HCl tamponuyla 4 µg/µL' ye

1. INTRODUCTION

Species belonged to Cyprinidae family are pharynxteeth with 1-3 rows, each row with a maximum of 8 teeth. Usually thin lips, plicae or papillae absent. With or without barbels. Premaxilla usually borders the upper jaw making the maxilla entirely or almost entirely excluded from the gape. Usually protrusible upper jaw. Dorsal fin with spinelike rays in some. Balitoridae family are small fish that generally live in fast-flowing streams and have a large sucker mouth and modified ventral fins used for clinging to rocks. They have a number of similarities with the sibling family of loaches (Cobitidae), such as multiple barbels around the mouth.

In the past, the identification of fish species are carried out mainly by examining the external morphological characteristics. In the present day, electrophoresis often has been used as an aid in the species identification of fish. For this purpose, sarcoplasmic proteins, serum proteins, liver proteins and a number of enzymes has been used by many investigator (1-9).

The highly water-soluble sarcoplasmic proteins consisting of glycolytic enzymes, myoglobin and other proteins present in the intracellular fluid of muscle were often used for specific identification. The sarcoplasmic proteins comprise 30-35 % of the total protein in muscle cells. Analysis of sarcoplasmic proteins of fish muscle is of major interest for identification of fish species (10, 11).

In the present investigation, sarcoplasmic proteins of *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus* have been analyzed by SDS-PAGE technique and thus, resemblances and differences between these species have been tried to establish.

2. MATERIALS AND METHODS

In the study, 3 years old *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus* were used. The fish species were obtained from predetermined localities from Karakaya Dam Lake (Malatya, TURKEY). The fish were live transported to the laboratory. 10 fish from each group without dermal and parasitical infection were selected and used for the electrophoresis. A piece of white muscle tissue were taken from the fish with aid of a bistoury. Tissue sample of the all fish were taken from left dorsal. Then, these samples cleaned of the skin and fish bone and homogenized in Tris-HCl buffer (0.5 M, pH: 6.8) for 1 min. The homogenates were centrifuged for 15 min at +4°C and 20,000 g. The obtained supernatants were used for the analysis of proteins and SDS-PAGE. Protein content determined by using the method of Lowry et al. (12) with bovine serum albumin as a standard and the protein content in the supernatants

ayarlandı.

SDS-PAGE işlemi Laemmli (13) ve O'Farrell (14) metodlarına göre yapıldı. Proteinler 12x8 cm boyutlarında ve 1mm kalınlığında slab jelde separe edildi. Slab jel, proteinlerin stoklandığı yoğunlaştırıcı ve daha sonrada proteinlerin separe edildiği ayırıcı jel kısımlarından meydana gelmektedir.

Ayırıcı jel (% 10 Akrilamid içeren) elektroforez işleminden 12 saat önce hazırlanarak polimerize edildi ve bir gece buzdolabında saklandı. Yoğunlaştırıcı jel ise (% 4 Akrilamid içeren) elektroforez işleminden 2 saat önce hazırlanarak polimerize edildi. Her numune, % 10 gliserol, % 2 mercaptoetanol, % 2 SDS, % 0.01 brom fenol blue içeren numune tamponu ile karıştırılarak protein konsantrasyonları 2 µg/µL'e ayarlandı. Daha sonra numuneler ısıyla denatüre edildi SDS-PAGE'ye uygulandı. SDS-PAGE'de, 20 mikrolitre numune yoğunlaştırıcı jele uygulandı. Brom fenol blue jelin en alt kısmına gelinceye kadar jele 200 voltluk gerilim verildi. Elektroforez işlemi sonrası proteinler, % 0.125 commassie brilliant blue R-250, % 40'lık etanol ve % 7'lik asetik asit içinde hazırlanan boya çözeltisi içinde 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 Pepsin (34.7 kD) ve β-Lactoglobulin (18.4 kD) kullanıldı. Proteinlerin molekül ağırlıkları Weber vd.'nin (15) metoduna göre hesaplandı. Protein bantlarının densitometrik analizi ImageJ program, versiyon 1.30 kullanılarak yapıldı (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (16).

3. BULGULAR

Sonuçlarda, *Cyprinion macrostomus*'da 18 protein bandı bulunurken, *Orthrias insignis euphraticus*'da ise 20 protein bandı elde edildi. Diğer taraftan, *Orthrias insignis euphraticus*'dan elde edilen bantlardan moleküler ağırlığı 29,5 kD olarak bulunan 9. protein bandı ve moleküler ağırlığı 27,2 kD olarak bulunan 12. protein bandı *Cyprinion macrostomus*'ta bulunamadı.

were then adjusted with Tris-HCl buffer to 4 µg/µL.

SDS-PAGE was performed according to the Laemmli (13) and O'Farrell (14) methods. Proteins were separated on 12 x 8 cm dimension and 1 mm thick slab gel. Slab gel consist of stacking gel which proteins stocked and running gel part on which proteins separate. Running gel (contains 10 % acrylamide) was polymerized 12 hr before from electrophoresis and stacking gel (contains 4 % acrylamide) was poured and polymerized 2 hr before sample application. Each sample mixed with sample buffer which contains 10 % glycerol, 2 % mercaptoethanol, 2 % SDS, 0.01 brom phenol blue and protein concentration adjusted to 2 µg/µL with Tris-HCl buffer, then heat-denatured and run on SDS-PAGE. For SDS-PAGE, 20 µl sample were loaded on the stacking gel. 200 V voltage given until brom phenol blue come to lowest side of gel. Following electrophoresis, the proteins were stained with 0.125 % commassie brilliant blue R-250 in 40 % ethanol and 7 % acetic acid, and then, destained in acetic acid. Pepsin (34.7 kD) and beta-lactoglobulin (18.4 kD) were used as protein standards in electrophoresis. MW's of proteins were calculated according to Weber (15). Also, densitometric analysis of protein bands were performed by using ImageJ program, version 1.30 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (16).

3. RESULTS

In the results, 20 protein bands were found in *Orthrias insignis euphraticus* while *Cyprinion macrostomus* had 18 protein bands.

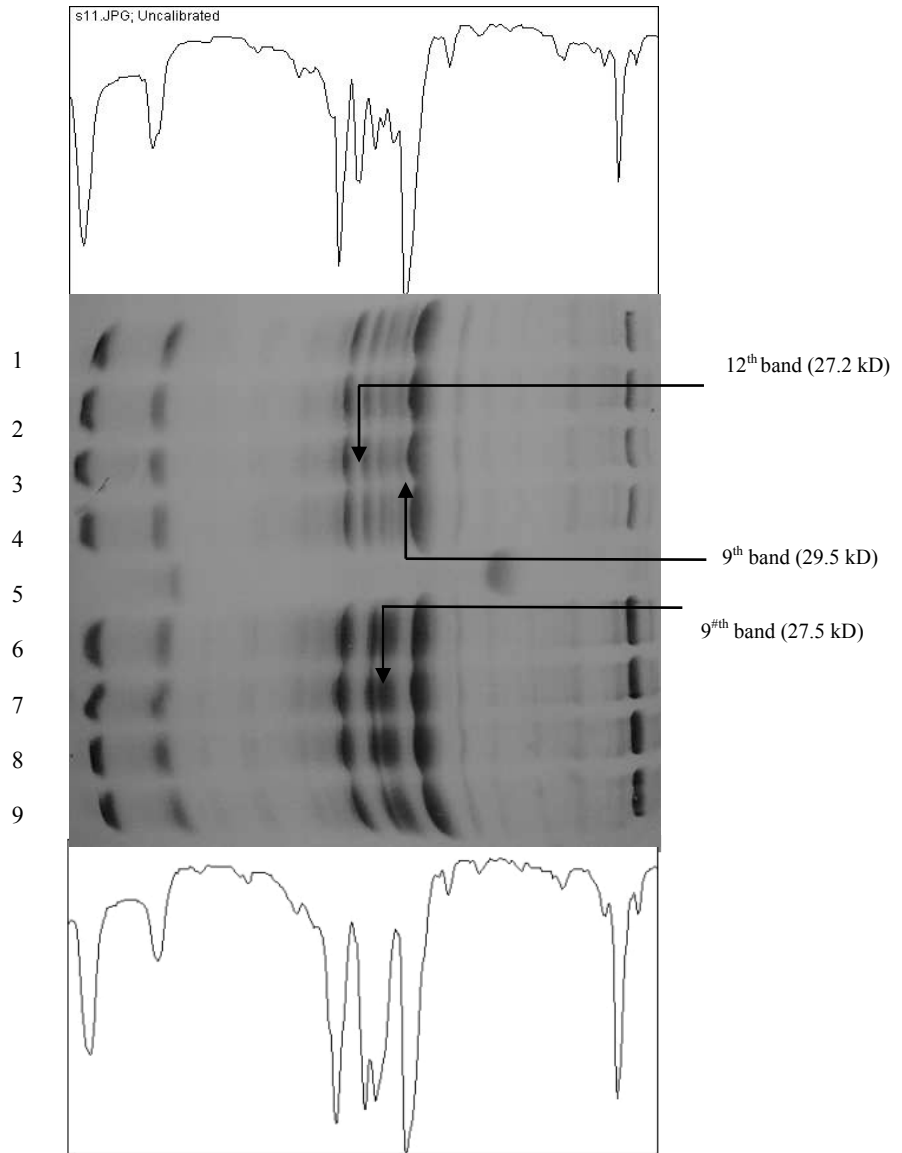


Figure 1. Comparison of sarcoplasmic proteins of *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus*. Protein gel showing proteins of *Orthrias insignis euphraticus*, (lanes 1, 2, 3, 4), the standard proteins (lane 5) and the proteins of *Cyprinion macrostomus* (lanes 6, 7, 8, 9). Densitometric analysis of lane 4 (top graph) and lane 6 (bottom graph).

Şekil 1. Şekil. *Cyprinion macrostomus* ve *Orthrias insignis euphraticus*'un sarkoplazmik proteinlerinin kıyaslanması. *Orthrias insignis euphraticus*'un proteinlerini gösteren protein jel (1, 2, 3, 4), standart proteinler (5) ve *Cyprinion macrostomus*'un proteinleri (6, 7, 8, 9), 4. hattın densitometrik analizi (grafikğin üstü) ve 6. hat (grafikğin altı).

Moleküler ağırlığı 27,5 kD olan 9. protein bandı sadece *Cyprinion macrostomus*'ta bulundu (Şekil). *Orthrias insignis euphraticus* ve *Cyprinion macrostomus*'un protein bantları kıyaslandığında, densitometrik analizlerine göre açık bir farklılık göstermekteydi.

On the other hand, the bands obtained from *Orthrias insignis euphraticus* and numbered as 9th protein band with MW of 29.5 kD and 12th band with MW of 27.2 kD were not found in *Cyprinion macrostomus*. 9th protein band with MW of 27.5 kD was only found in *Cyprinion macrostomus* (Figure). Protein bands comparison of *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus* show clear distinction of both species according to densitometric analysis.

4. TARTIŞMA

Taksonomik çalışmalar genellikle morfolojik ölçümler ve anatomik karakterler üzerine dayandırılmıştır. Son olarak, karyotip analizleri de taksonomide değerlendirilmiştir. Sarkoplazmik proteinlerin analizleri balıkların sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu tip çalışmalar taksonomik değerlendirmelere yeni bir açılım kazandırmıştır. Böylece, akraba taksonların tanımlanması sarkoplazmik proteinlerin elektroforetik sonuçlarına göre kolayca yapılabilir (3, 17-19). Diğer taraftan, türlerin proteinleri arasındaki benzerlikler türlerin genetik benzerliği olarak kullanılabilir. Böylece, balık türlerinin sarkoplazmik proteinleri arasındaki benzerlikler ve/veya farklılıklar incelemek için, bu türler arasındaki genetik benzerlikler ve/veya farklılıkları direkt olarak yansıtan SDS-PAGE gibi, ilgili elektroforetik teknikler kullanılmaktadır (20-24). Günümüzde, SDS-PAGE tekniği kullanılarak balıklar üzerine taksonomik çalışmalar çok sayıdadır. Yılmaz ve vd. tarafından yapılan bir araştırmada (7), *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 bandı olduğunu göstermiştir. Onlar, serum protein bandlarının sayısının özellikle taksonomide önemli olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer olarak, Miyazaki vd. (5) 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 olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın, *Tribolodon hakonensis* diğer üç tür balıkla hemen hemen eşit genetik farka sahiptir. Knuutinen ve Harjula (4) 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 (6). Benzer olarak, *Betta splendens*'in 4 renkli varyetelerinin sarkoplazmik proteinleri izoelektrik fokusing'le analiz edilmiş ve 6 bandda genetik polimorfizm bulunmuştur (2). LeBlanc ve LeBlanc tarafından yapılan araştırmada, çeşitli sıcaklıklarda dondurulmaya maruz bırakılmış *Gadus morhua*'nın miyofibriller proteinlerinde değişimler olduğunu SDS-PAGE'le başarılı bir şekilde göstermişlerdir. Benzer olarak, dondurma esnasında Gadoid ve Gadoid olmayan türlerin kas proteinleri SDS-PAGE ile incelenmiş ve farklı protein bantları görülmüştür (26). Bu tip araştırmalar Türköz vd. (27) tarafından laboratuvarımızda da yapılmıştır. Bu araştırmada, hem pişmiş hem de taze 6 balık türünün sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE ile

4. DISCUSSION

In general, taxonomic studies have based on morphometric measurements and anatomical characteristics. Karyotype analyses have been also evaluated in taxonomy lately, electrophoresis, namely electrophoresis of sarcoplasmic proteins have been widely used in the classification of fish. These kinds of studies have brought about a new look to taxonomical evaluation. Thus, discrimination of related taxa can be easily made according to their electrophoretic results of sarcoplasmic proteins (3, 17-19). On the other hand, resemblance between the proteins of the species can be used as genetical resemblance of the species. Thus, establishing the similarities and/or differences between the sarcoplasmic proteins of fish species are used relevant electrophoretic techniques such as SDS-PAGE, directly reflects the genetic similarities and/or differences among these species (20-24). At present, there are number of taxonomical study on fish using SDS-PAGE techniques. In an investigation carried out by Yılmaz et al. (7), the serum proteins of *Capoeta trutta* and *Capoeta capoeta umbla* were analyzed by using SDS-PAGE. These investigators showed that there were 16 bands in *Capoeta trutta* and 11 band in *Capoeta capoeta umbla*. They concluded that the number of serum protein bands were especially important in taxonomy. Similarly, Miyazaki et al. (5) separated by SDS-PAGE the liver proteins of six species belonging to Cyprinidae family and Acheilognathinae, Leuciscinae, Gobioninae subfamilies. They pointed out that *Cyprinus carpio* and *Pseudogobius esocinus* gave the smallest genetic distance. Nevertheless, *Tribolodon hakonensis* had almost equal genetic distances to the three other species. Knuutinen and Harjula (4) demonstrated that sixteen of the most common Finnish freshwater fish species were differentiated according to their sarcoplasmic proteins. The investigators concluded that using new techniques such as electrophoresis of sarcoplasmic proteins may shed light on confused subfamilies and subspecies grouping in fish. In an other investigation, sarcoplasmic proteins of fourteen fish species were analyzed by polyacrylamide gel isoelectric focusing and genetic polymorphism were detected (6). Similarly, sarcoplasmic proteins of four color varieties of *Betta splendens* were analyzed by isoelectric focusing, and genetic polymorphism were detected in six band (2). Research by LeBlanc and LeBlanc (25) treatment on various frozen storage at various temperature Cod (*Gadus morhua*) showed that SDS-PAGE has been successfully applied to detect myofibrillar protein changes during frozen storage under the various temperature conditions. Similarly, muscle proteins of Gadoid and Non-Gadoid species during frozen storage were investigated by SDS-PAGE and different protein bands were appeared (26). This kinds of

analiz etmişler ve balık türlerinin sarkoplazmik proteinlerine göre sınıflandırılabilirliğini belirtmişlerdir. Pinerio vd. (28) 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.

Şimdiki araştırmada, *Orthrias insignis euphraticus* ve *Cyprinion macrostomus*'un sarkoplazmik proteinlerinin birbirlerinden oldukça farklı olduğu bulundu. Bu sonuçlar yukarıda bahsedilen raporlarla uyum göstermekteydi. *Cyprinion macrostomus*'ta 18 protein bandı bulunurken, *Orthrias insignis euphraticus*'un total protein sayısı 20 olarak bulundu. *Orthrias insignis euphraticus*'un 9. (29,5 kD) ve 12. (27,2 kD) protein bandlarının bazıları *Cyprinion macrostomus*'ta bulunmadı. 9. (29,5 kD) protein bandı sadece *Cyprinion macrostomus*'ta bulundu.

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 sistematğinde kullanılan çok iyi bir tekniktir.

Sonuç olarak, *Orthrias insignis euphraticus* ve *Cyprinion macrostomus*'un sarkoplazmik protein bandlarının sayılarının farklı olmasından dolayı, bu iki balık türü taksonomik olarak birbirinden kolayca ayırt edilebilir.

investigations have been also carried out in our laboratories by Türköz et al. (27). In this investigation, both cooked and fresh sarcoplasmic protein of six fish species were analyzed by SDS-PAGE and they concluded that fish species can be classified according to their sarcoplasmic proteins. Pinerio et al. (28) have investigated by two dimensional electrophoresis sarcoplasmic proteins of five different hake species: *Merluccius merluccius* (European hake), *M. australis* (Southern hake), *M. hubbsi* (Argentinian hake), *M. gayi* (Chilean hake), and *M. capensis* (Cape hake) and they have reported that some of them very closely related.

In the present study, sarcoplasmic proteins of *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus* were quite different, and this result in agreement with the above mentioned reports. Total number of the sarcoplasmic protein bands of *Orthrias insignis euphraticus* were 20 while *Cyprinion macrostomus* had 18 protein bands. Some of protein bands such as 9th (29.5 kD) and 12th (27.2 kD) of *Orthrias insignis euphraticus* were not found in *Cyprinion macrostomus*. 9th (27.5 kD) protein band was only determined in *Cyprinion macrostomus*.

Traditional methods based on morphologic characters and cladistic techniques are not adequate in the classification of closely related species. In solving the problems, the use of new techniques such as electrophoresis becomes inevitable. Furthermore, DNA-DNA hybridization may be considered as the final resolution of long standing evolutionary debates in classification. The identification of the sarcoplasmic proteins of fish species by SDS-PAGE is a well established technique, which used in the systematic of the fish species.

In conclusion, since the number of the sarcoplasmic protein bands differs between *Orthrias insignis euphraticus* and *Cyprinion macrostomus*, two fish species are easily distinguished from each other taxonomically.

KAYNAKLAR/ REFERENCES

1. 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).
2. 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).
3. 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 species", *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204: 411-416 (1997).
4. 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).
5. 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).

6. 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).
7. Yılmaz M., Türköz Y., Erdemli A.Ü., Kalkan E. ve Çiğremiş Y., "Karakaya baraj gölü bazı balıklarının kan serum proteinlerinin elektroforetik modelleri üzerine taksonomik bir çalışma", **S.Ü.Vet. Bil. Derg.**, 16(1): 89-92 (2000).
8. 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).
9. Pineiro 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).
10. Goll D.E., *Muscle proteins. Chap. 6. In "food proteins*, Whitaker J.R., and Tannenbaum S.R., (Ed.) **Avi Publishing Co.**, Wespert, CT., p.121 (1977).
11. 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).
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent", **J. Biol. Chem.**, 193: 265-271 (1951).
13. Laemmli UK., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", **Nature**, 227: 680-685 (1970).
14. O'Farrell P.H., "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", **J. Biol. Chem.**, 250: 4007-4021 (1975).
15. Weber K., Pringle J.R., and Osborn M., "Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel", **Meth. Enzymol.**, 26: 3 (1972)"
16. ImageJ program, version 1.30 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
17. Lundstrom R.C. "Fish species identification by isoelectric focusing: sarcoplasmic protein polymorphism in monkfish (*Lophius americanus*)", **J. Assoc. Off Anal. Chem.**, 64 (1): 32-37 (1981).
18. Macki I.M., Pryde S.E., Sotelo C.G., Medina I., Martin R.P., Quinterio J., and Mendez M.R., "Challenge in the identification of species of canned fish", **Trends Food Sci. Tech.**, 10: 9-14 (1999).
19. Valenzuela M.A., Gamarra N., Gomez L., Kettlun A.M., Sardon M., Perez L.M., Vinagre J., and Guzman N.A. "A comparative study of fish species identification by gel isoelectrofocusing two-dimensional gel electrophoresis, and capillary zone electrophoresis", **J. Capillary Electrophor.**, 6 (3-4): 85-91 (1999).
20. 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).
21. Mukhopadhyay S., Basu S., Data C., and Bose A., "Electrophoretic study on serum proteins fresh water teleosts", **Nucleus**, 30 (3): 101-103 (1987).
22. Khan A.R., and Gadru M., "Electrophoretic patterns of blood serum pattern of some fish of Kashmir", **Trop. Freshwater Biol.**, 11: 62-70 (1988).
23. LeBlanc E.L., and LeBlanc R.J., "Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins", **J. Food Sci.**, 59 (6): 1267-1270 (1994).
24. Rehbein H., Kündiger R., Yman I.M., Ferm M., Etienne M., Jerome M., and et al., "Species identification of cooked fish by urea isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: a collaborative study", **Food Chem.**, 67: 333-339 (1999).

25. LeBlanc E.L., and LeBlanc R.J., "Separation of Cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments", *J. Food Sci.*, 54(4): 827-834 (1989).
26. 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).
27. 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).
28. Pineiro C, Vazquez J, Marina AI, Barros-Velazquez J, Gallardo JM. "Characterization and partial sequencing of species-specific sarcoplasmic polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis", *Electrophoresis*. 22(8): 1545-52 (2001).

Received/ Geliş Tarihi: 13.10.2003 Accepted/Kabul Tarihi: 20.09.2004