



## *Chelon auratus* (Risso, 1810)'un Karaciğerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz'ın Safaştırılması ve Kinetik Karakterizasyonu

### *Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from the Liver of Chelon Auratus (Risso, 1810)*

Salih Görgün\* , Emre Koç 

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Sivas, Türkiye

#### Öz

Bu çalışmada, önemli bir kefal balığı türü olan *Chelon auratus* (Risso, 1810)'un karaciğerinden glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (EC 1.1.1.49), 2'5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile 252 kat saflık, 27.04 EU/mg.protein spesifik aktivite ve % 27.42 verim ile safaştırılmıştır. Elde edilen enzim preparatı için optimum sıcaklık, pH ve iyonik güç sırasıyla 40 °C, pH 8, ve 0.1 M olarak bulunmuştur. Enzimin kinetik davranışı gerek glukoz-6-fosfat (G6P) gerekse NADP<sup>+</sup> için değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri NADP<sup>+</sup> için sırasıyla 0.14 mM ve 3.40 EU/mL olarak belirlenirken, G6P için sırasıyla 0.23 mM ve 2.62 EU/mL olduğu bulunmuştur. Bu veriler, substrat olarak G6P ile karşılaştırıldığında, enzimin NADP<sup>+</sup> için daha yüksek bir afinite sergilediğini önermektedir. Safaştırılan enzim preparatında SDS-PAGE analizi sonucunda, molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 108 kDa ve 60 kDa olan iki protein bandının olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, kefal türlerinden glukoz-6-fosfat dehidrojenazın safaştırılmasında ek kromatografik adımların gerekli olduğunu önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Chelon auratus*, Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, Kinetik karakterizasyon, Safaştırma

#### Abstract

In this study, glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC. 1.1.1.49) from the liver of *Chelon auratus* (Risso, 1810), an economically important mullet species, were purified with purification parameters of 252-fold purity, a specific activity of 27.04 EU/mg.protein and a yield of 27.42%. The optimum temperature, pH and ionic strength were found to be 40 °C, pH 8 and 0.1 M, respectively, for the enzyme preparation obtained. The kinetic behavior of the enzyme was evaluated for both G6P and NADP<sup>+</sup>. According to the data obtained, K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values were determined as 0.14 mM and 3.40 EU/mL for NADP<sup>+</sup>, respectively, while it was found to be 0.23 mM and 2.62 EU/mL for G6P, respectively. These data have been suggested that the enzyme has higher affinity for the NADP<sup>+</sup>, when compared with G6P as a substrate. According to the SDS-PAGE analyses of the purified enzyme, it was observed that there were two protein bands having molecular weight of 108 kDa and 60 kDa. The results obtained have been suggested that additional chromatographic steps might be required for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the mullet species.


**Keywords:** *Chelon auratus*, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Kinetic characterization, Purification


#### 1. Giriş

Pentoz fosfat metabolik yolu, karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yer tutar ve anahtar enzimi glukoz-6-fosfat dehidrojenazdır (G6PD). Bu metabolik yol, balıklar da dahil olmak üzere, anabolik yollarda kullanılan NADPH'ın üretilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir (Hu vd. 2013). NADP<sup>+</sup> varlığında, glukoz-6-fosfat'ın 6-fosfoglukonat'a

dönüşümünü katalizleyen glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (Hasmann vd. 2007), bir dizin enzim sistemiyle birlikte, hücrede antioksidan savunma sisteminin önemli bir kısmını üstlenir ve bu esnada NADPH meydana gelir. Son dönemlerde yoğun araştırma konusu olan G6PD eksikliğinin, NADPH'ın azalmasına ara bulurak hücrede oksidatif hasara yol açmakta olduğu bildirilmektedir (Özmen 2009, Kırıcı ve Atamanalp 2016). NADPH, glutatyon'un indirgenmesi, kolesterol ve yağ asidi sentezi gibi biyosentetik süreçlerde anahtar bir bileşen olarak rol oynar (Ceyhan vd. 2005).

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [sgorgun@cumhuriyet.edu.tr](mailto:sgorgun@cumhuriyet.edu.tr)

Salih Görgün  [orcid.org/0000-0002-2121-2577](https://orcid.org/0000-0002-2121-2577)

Emre Koç  [orcid.org/0000-0002-5942-5287](https://orcid.org/0000-0002-5942-5287)

Pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve anahtar enzimi olan G6PD, Yoshida (1967) tarafından selülozik iyon değiştiriciler ve sefadeks kolon kromatografileri ile saflaştırılmıştır. Günümüzde enzimin tek basamakta saflaştırılmasına olanak sağlayan 2'5' ADP-sepharose afinite kromatografisi, Ninfalı vd. (1990) tarafından ortaya konmuştur. Uluş vd. (1999) koyun lens G6PD enzimini, 2'5' ADP-sepharose afinite kromatografisi ve DEAE sefaroze kolon kromatografisinin bir kombinasyonu ile saflaştırmışlardır. Uluş vd. (1999) tarafından yerine getirilen bu çalışma, pentoz fosfat yolağının iki enzimi olan G6PD ve 6-fosfolukonat dehidrojenaz enzimlerinin aynı anda saflaştırılmasını ortaya koyması açısından oldukça önemli bir çalışma olarak görülebilir. İlerleyen yıllarda G6PD, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden (Çiftçi vd. 2004), rat böbreğinden (Adem ve Çiftçi, 2012), çim sazani (*Ctenopharyngodon idella*) hepatopankreasından (Hu vd. 2013), deve karaciğerinden (İbrahim vd. 2014), *O. mykiss* karaciğeri (Çomaklı vd. 2015) gibi bir çok farklı kaynaktan saflaştırılmaya ve kinetik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. *Chelon auratus* (Risso, 1810), Akdeniz kıyılarında yayılış gösteren ekonomik anlamda önemli bir kefal türüdür (Fazio vd. 2020). Literatür taraması yapıldığında, görebildiğimiz kadarıyla, bu balık türünden G6PD enzimi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada G6PD enzimin *C. auratus*'un karaciğerinden saflaştırılması ve enzimin temel kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Balık Örneklerinin Sağlanması

Bu çalışmada kullanılan *Chelon auratus* (Risso, 1810) bireyleri Köyceğiz (Muğla) Dalyan'ından elde edilmiştir. Elde edilen balık örnekleri laboratuvarında buzlu ortamda diseke edilerek karaciğerleri elde edilmiş ve kullanılabildiği kadar -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

### 2.2. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

6 g kütleyle sahip olan karaciğer dokusu Ultra Turrax T 25 homojenizatör kullanılarak buzlu ortamda 25.000 rpm'de 2 dakika boyunca 20 mM Tris-HCl (1 mM DDT ve 1 mM EDTA katkılı) homojenat tamponu içerisinde homojenize edilmiştir (Adem ve Çiftçi, 2012). Homojenize edilen doku, elyaf pamuk vasıtasıyla süzülerek kaba partiküllerden arındırılmıştır. Daha sonra homojenatın 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen üst sıvı (20 mL) saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

### 2.3. 2'5' ADP-Sepharose Afinite Kromatografisi

Kolon kromatografisindeki çözelti ve yöntemler Adem ve Çiftçi (2012)'ye göre yerine getirilmiştir. Bu amaçla, 2 g toz halindeki, 2'5' ADP-sepharose afinite kolon dolgu materyali öncelikle distile su ile yıkanarak kaba partiküller uzaklaştırılmış ve kolon dolgu maddesi 0.1 M potasyum asetat/0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH=6.9) ile kolona alınmıştır (1.5x8 cm). Daha sonra kolon, kolon dengeleme tamponu (50 mM potasyum fosfat, 1 mM EDTA, 1 mM DDT, pH= 7.35) ile dengelenmiştir. Bu süreçler esnasında akış hızı 40 mL/saat olarak ayarlanmıştır. 20 mL hacminde elde edilen homojenat kolona uygulanmıştır. Daha sonra kolon 40 mL hacimde 50 mM potasyum fosfat tamponu (1 mM EDTA, 1 mM DDT, 80 mM KCl) ile yıkanarak kolona bağlanmayan proteinler elüe edilmiştir. Afinite kolonuna bağlanan G6PD enzimi, 30 mL'lik elüsyon tamponu (80 mM potasyum fosfat, 80 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM NADP<sup>+</sup>, pH= 7.85) ile kolondan elüe edilmiştir.

### 2.4. Enzim Aktivite Tayinleri

Enzim aktivitesi, G6PD tarafından NADP<sup>+</sup>'nın redüksiyonunu esas alan Beutler (1984)'ün ve Hu vd. (2013)'ün yöntemlerine göre, 30 °C'da ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümlerde rutin aktivite tayinlerindeki tüplerin final konsantrasyonları, 0.1 M Tris-HCl (pH= 7.5) tamponu içerisinde 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.6 mM glukoz-6-fosfat (G6P) ve 20 µL enzim çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnek tüpü, kör tüpüne karşı okunmuş ve kör tüpte enzim yerine aynı hacimde tampon kullanılmıştır. NADP<sup>+</sup>'nın NADPH'a dönüşümü 340 nm'deki absorbans değişimleri izlenerek takip edilmiştir. Bir enzim aktivite ünitesi (EU) ise, dakikada 1 µmol NADP<sup>+</sup>'yı indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

### 2.5. Optimum İyonik Gücün Belirlenmesi

Optimum iyonik güç, enzim aktivitesi 0.1 M ile 0.7 M arasındaki konsantrasyonlarda Tris-HCl tamponu içerisinde standart enzim aktivitesi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler üç tekrar olarak yerine getirilmiştir.

### 2.6. Optimum pH Belirlenmesi

Optimum pH'in belirlenmesi amacıyla, enzim aktivitesi 0.1 M Tris-HCl ve fosfat tamponları içerisinde 5 ile 9 pH noktaları arasındaki değerlerde, standart aktivite yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Deneyler üç tekrar olarak yerine getirilmiştir.

**Çizelge 1.** *C. auratus* karaciğeri glukoz-6-fosfat dehidrojenazı saflaştırma tablosu.

Parametre	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Spesifik aktivite	Verim (%)	Safaştırma (Kat)
Homojenat	20	1.40	28	13.01	0.107	100	1
2'5' ADP sepharose 4 B afinite kromatografisi	4	1.92	7.68	0.071	27.04	27.42	252

### 2.7. Optimum Sıcaklık Belirlenmesi

Bu amaçla, enzim aktivitesi 10 °C ile 60 °C arasında değişen sıcaklıklarda, belirlenen optimum pH ve iyonik güç koşulları altında belirlenmiştir. Deneyler üç tekrar olarak yerine getirilmiştir.

### 2.8. Kinetik Çalışmalar

Substrat kinetikleri optimal şartlar altında (0.1 M Tris-HCl, pH=8.0, 37 °C), G6P ve NADP'nın değişen konsantrasyonlarında her iki substrat bileşeni için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu amaçla, NADP'nın değişen konsantrasyonlarının (0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM ve 0.4 mM) sabit G6P konsantrasyonunda (0.6 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenerek NADP<sup>+</sup> için Lineweaver-Burk eğrisi elde edilmiştir. Yine G6P'in değişen konsantrasyonlarının (0.15 mM, 0.3 mM, 0.6 mM, 0.9 mM, 1.2 mM) ve sabit NADP<sup>+</sup> konsantrasyonunda (0.2 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiş ve G6P substratı için Lineweaver-Burk eğrisi çizilmiştir. Çalışmalar Hu vd. (2013)'e göre yapılmıştır. Böylece gerek NADP<sup>+</sup> için, gerekse G6P için  $K_m$  ve  $V_{max}$  parametreleri hesaplanmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

### 2.9. Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein miktarları Bollag ve ark. (1996)'nın metoduna göre yerine getirilmiştir. Standart olarak BSA kullanılmıştır.

### 2.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Enzim saflığının ve moleküler kütesinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE çalışması Laemmli (1970)'e göre yerine getirilmiştir. Homojenat ve afinite kromatografisi ile elde edilen enzim preparatından alınan eşit miktarda protein, elektrofrezde % 3 yürütücü jel ve % 10 ayırıcı jelde 150 mA sabit akımda 1 saat boyunca koşturulmuştur. Elde edilen jel, % 50 metanol, % 10 asetik asit ve % 40 distile su içeren fiksatif çözeltisinde 30 dakika fikse edildikten sonra, % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 içeren fiksatif çözeltisinde 2 saat boyunca orbital çalkalayıcıda dakikada 50 rpm'de çalkalanarak boyanması sağlanmıştır. Daha sonra

jel, boya giderme çözeltisi ile birçok kez yıkanarak protein bantları görülür hale getirilmiştir.

### 3. Bulgular

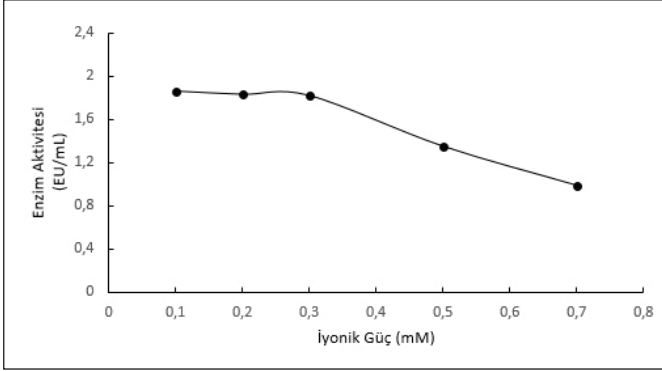
Bu çalışmada, *C. auratus*'un karaciğerinden G6PD enzimi, 2'5' ADP-sepharose 4B afinite kolon kromatografisi kullanılarak 252 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen enzim preparatının spesifik aktivitesi 27.04 EU/mg.protein olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). Enzim saflığının kontrolü ve molekül kütesinin belirlenmesi amacıyla yerine getirilen SDS-PAGE analizi sonucunda, homojenatta yoğun bir şekilde bulunan protein bantlarının, saflaştırılmış enzim preparatında iki bant olarak gözlenmiştir.

Enzimin sergilemiş olduğu kinetik özelliklerden iyonik gücün belirlenmesi çalışmalarında, 0.1 M, 0.2 M ve 0.3 M Tris-HCl uygulamalarında elde edilen enzim aktivitesindeki değişimlerin (1.86 EU/mL ile 1.82 EU/mL arasında) fark göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, 0.5 M ve 0.7 M iyonik güç uygulamalarında enzim aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir (Şekil 1). Optimum iyonik güç (0.1 M Tris-HCl) konsantrasyonlarında farklı pH noktalarına ait aktivite değerleri Şekil 2'de görülmektedir. Buna göre; G6PD için optimum pH, 8 olarak belirlenmiştir. Enzim, pH'ın 7 ile 7.4 olduğu noktalarda benzer aktivite değerleri sergilemiştir. Bir diğer kinetik özellik olan sıcaklık, 10 °C ile 60 °C arasında değerlendirilmiştir. Buna göre, optimum sıcaklığın 40 °C olduğu görülmekle birlikte, 50 °C'da enzimin 30 °C için elde edilen aktiviteden daha yüksek bir aktivite sergilediği belirlenmiştir (Şekil 3).

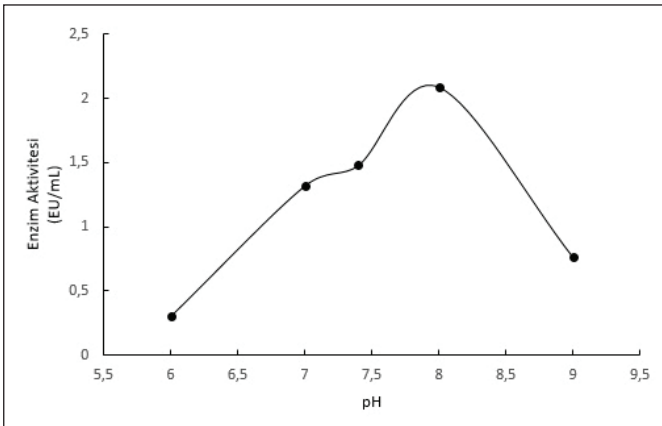
Sabit NADP<sup>+</sup> konsantrasyonlarında, G6P substratı için elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi Şekil 4'te görülmektedir. G6P için belirlenen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin sırasıyla 0.23 mM ve 2.62 EU/mL olduğu bulunmuştur. Benzer olarak, sabit G6P konsantrasyonlarında, NADP<sup>+</sup> için elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi de Şekil 5'te gösterilmiştir. Buna göre NADP<sup>+</sup> için belirlenen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.14 mM ve 3.40 EU/mL olduğu bulunmuştur (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** *C. auratus* karaciğer glukoz-6-fosfat dehidrojenazının G6P ve NADP<sup>+</sup> için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri.

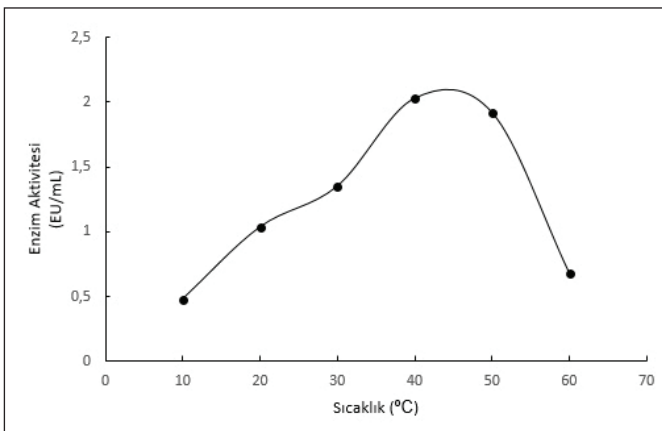
G6P		NADP <sup>+</sup>	
K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (EU/mL)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (EU/mL)
0.23	2.62	0.14	3.40



**Şekil 1.** İyonik gücün G6PD aktivitesi üzerine etkisi.



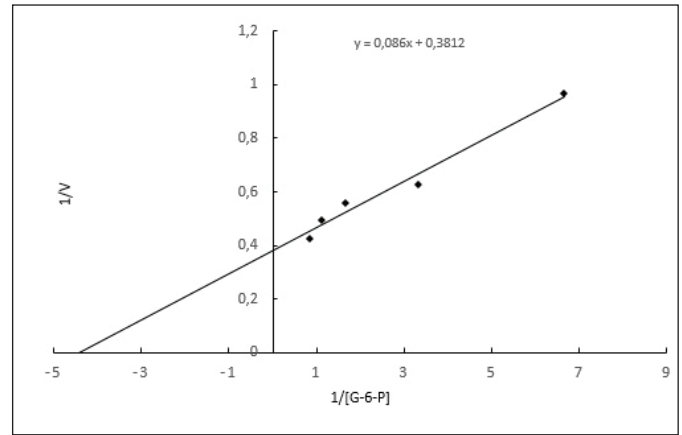
**Şekil 2.** pH'nın G6PD aktivitesi üzerine etkisi.



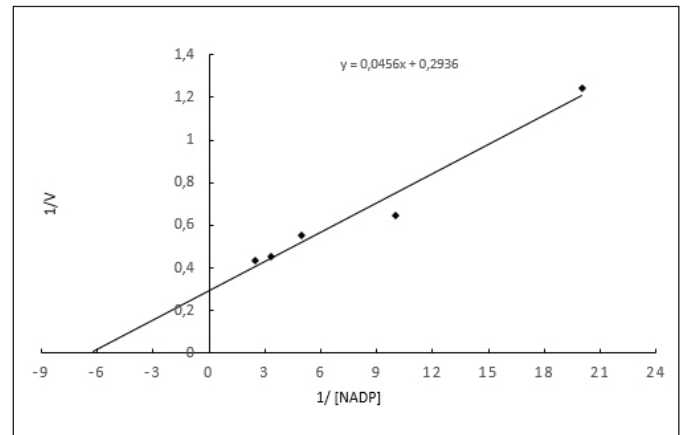
**Şekil 3.** Sıcaklığın G6PD aktivitesi üzerine etkisi.

#### 4. Tartışma

Gerek balıklarda, gerekse farklı organizmalardan pentoz fosfat metabolik yolundaki enzimlerin saflaştırılması birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan ve ekonomik öneme sahip bir kefal balığı türü olan *C. auratus*'tan G6PD enzimi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada, 2'5' ADP-sepharose 4 B afinite kromatografisi ile enzim 252 kat saflıkla ve 27.04 EU/mg.protein spesifik aktivite parametreleriyle elde edilebilmiştir. Çiftçi vd. (2004) tarafından *O. mykiss* eritrositlerinden G6PD enziminin, % 40-65 amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında afinite kolonuyla 1271 kat saflıkla elde edildiği bildirilmiştir. *C. idella* hepatopankreasından enzim afinite kromatografisini takiben DEAE sepharose iyon değişim kromatografisi ile 1066 kat saflık ile elde edilmiştir (Hu vd. 2013). Bir tatlı su balığı olan *Chalcalburnus tarichi* (inci kefal) solungacından G6PD enziminin,



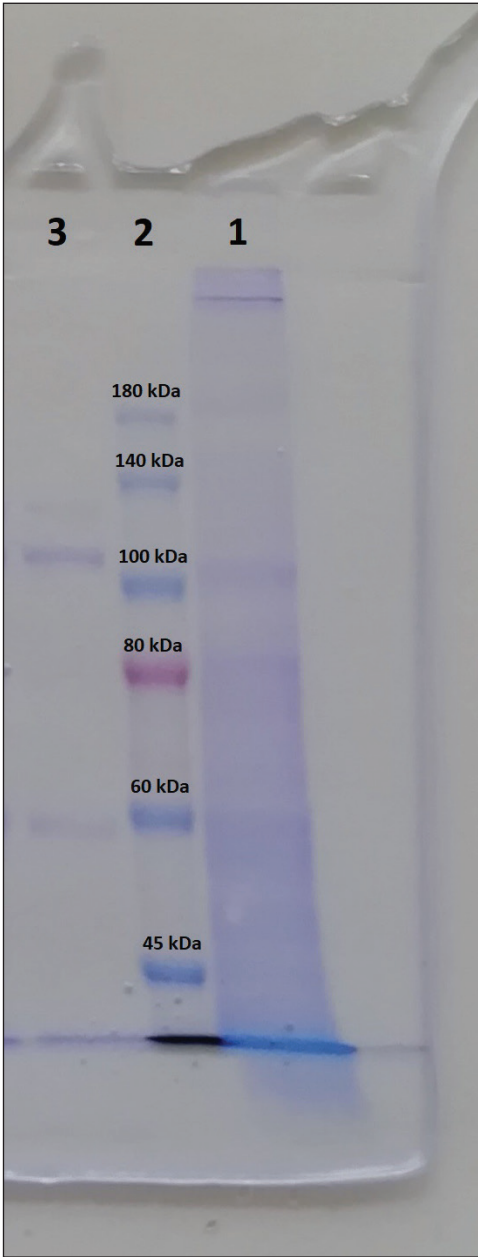
**Şekil 4.** G6P substratı için elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi.



**Şekil 5.** NADP<sup>+</sup> substratı için elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi.

amonyum sülfat çöktürme ve afinite kromatografisi ile 508 kat saflık ve 11.84 EU/mg.protein spesifik aktivite ile elde edildiği bildirilmiştir (Kuzu vd. 2016). Bu veriler göz önüne alındığında, çalışmamızda elde edilen spesifik aktivite, diğer balık türlerinden elde edilen spesifik aktiviteden daha yüksek görünmekle birlikte, daha düşük saflaştırma katsayısı bildirmektedir.

Çalışmamızda, *C. aurata* karaciğerinden elde edilen G6PD enziminin pH=8'de, 40 °C ve 0.1 M Tris-HCl iyonik



**Şekil 6.** SDS-PAGE elektroforez sonuçları. 1: Homojenat, 2: Molekül kütle markırı, 3: 2'5' ADP-sepharose kromatografisi.

gücünde en yüksek aktiviteyi sergilediği belirlenmiştir. Bu parametreler, literatürdeki diğer balık türleri ile elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında optimum aktiviteler; *O. mykiss* eritrositinde pH 8 ve 40 ile 50 °C'da (Çiftçi vd. 2004), *C. idella* hepatopankreasında pH 7.5 ile 9 arasında ve 42 °C'da (Hu vd. 2013), *O. mykiss* karaciğerinde pH= 7.5, 50 °C ve optimum iyonik güç 120 mM (Çomaklı vd. 2015) olarak belirlenmiştir. Bu verilerden, çalışmamızda kullanılan *C. aurata*'nın karaciğer G6PD enziminin diğer balık türleriyle benzer kinetik özellikler sergilediği gözlenmektedir. Bununla birlikte, bafalo eritrositleri (Çiftçi vd. 2003) ve rat akciğeri (Adem ve Çiftçi, 2016 a) ve kalbi (Adem ve Çiftçi, 2016 b) gibi farklı organizmalardan elde edilen G6PD enziminin bazı kinetik değerlerde farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir. Çalışmamızda *C. aurata* karaciğer G6PD enziminin, G6P ve NADP<sup>+</sup> için elde edilen K<sub>m</sub> değerleri sırasıyla 0.23 mM ve 0.14 mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca, G6P ve NADP<sup>+</sup> için elde edilen V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 2.62 EU/mL ve 3.40 EU/mL olarak belirlenmiştir. Bu veriler çalışmamızda elde ettiğimiz enzimin, NADP<sup>+</sup>'ya, G6P'dan daha fazla ilgi gösterdiğini önermektedir. Literatürde, balıklarda bu konu ile ilgili farklı bulguların olduğu görülmektedir. Örneğin; *C. idella* (Hu vd. 2013) hepatopankreasından saflaştırılan enzimin NADP<sup>+</sup>'ya G6P'den daha fazla ilgili olduğu belirlenmesine rağmen, *O. mykiss* karaciğerinden elde edilen enzimin substrat ilgisinin tam tersi olarak G6P için daha fazla olduğu bildirilmiştir (Çomaklı vd. 2015).

Çalışmamızda afinite kromatografisi yoluyla saflaştırılan enzim preparatında molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 108 kDa ve 60 kDa olduğu iki bant gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde gerek balıklar gerekse diğer organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar G6PD enziminin, SDS-PAGE ile tek bant olduğunu bildirmiştir. Bunlardan enzimin molekül kütlesi *O. mykiss* eritrositlerinde 64.26 kDa (Çiftçi vd. 2004), *C. idella* hepatopankreasında 71.85 kDa (Hu vd. 2013), rat böbreğinde 56 kDa (Adem ve Çiftçi, 2013), deve karaciğerinde 64 kDa (İbrahim vd. 2014), *Chalcalburnus tarichi* solungacında 53.6 kDa (Kuzu vd. 2016) olarak belirlenmiştir. Bu verilerden, çalışmamızda elde edilen enzim preparatının kontaminant bir proteini daha içerebileceği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, bir diğer önemli kefal türü olan *Mugil cephalus* karaciğerinde yapılan bir çalışmada (Hochachka ve Clayton- Hochachka 1973) G6PD enziminin elektroforetik olarak ayırt edilebilir tetramer olarak iki formunun (I ve II) olduğu ve her iki tetramerin 200 kDa'dan büyük molekül külesine sahip olduğunu bildirmiştir. Elde etmiş olduğumuz sonuçların,

*C. aurata* türünün karaciğerinden G6PD enzimine ait ilk veriler olması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, elde edilen enzim preparatında belirlenen iki protein bandının G6PD izoenzimi olup olmadıklarının belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 5. Teşekkür

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Birimi tarafından F-625 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Bu nedenle, teşekkürlerimizi sunuyoruz.

## 6. Kaynaklar

- Adem, Ş., Çiftçi, M. 2012.** Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2'5'-ADP sepharose4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expr. Purif.* 81(1): 1-4. Doi: 10.1016/j.pep.2011.08.031
- Adem, Ş., Çiftçi, M. 2016 a.** Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase from rat heart and inhibition effects of furosemide, digoxin, and dopamine on the enzymes activities. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 30(6): 295-301. Doi: 10.1002/jbt.21793
- Adem, Ş., Çiftçi, M. 2016 b.** Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and inhibition effects of some antibiotics. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31(6): 1342-1348. Doi: 10.3109/14756366.2015.1132711
- Beutler, E. 1984.** Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Academic Press, London, 1971, pp 68-71
- Bollag, DM., Rozycki, MD., Edelstein, SJ. 1996.** Protein methods, A John Wiley and Sons, Inc., Publication, 57-82.
- Ceyhan, D., Danişan, A., Ögüş, H., Özer, N. 2005.** Purification and kinetic properties of 6-Phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine. *The Protein Journal.* 24(5): 293-301. Doi: 10.1007/s10930-005-6750-z
- Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Altıkat, S. 2003.** Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expr. Purif.* 29(2): 304-310. Doi: 10.1016/s1046-5928(03)00073-1
- Çiftçi, M., Çiltaş, A., Erdoğan, O. 2004.** Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Vet. Med.-Czech.* 49(9): 327-333. Doi: 10.17221/5712-VETMED.
- Çomaklı, V., Akkemik, E., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Öİ. 2015.** Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and investigation of the effects of some metal ions on enzyme activity. *Toxicol. Ind. Health.* 31(5): 403-411. Doi: 10.1177/0748233713475514
- Fazio, F., Saoca, C., Acar, Ü., Tezel, R., Çelik, M., Yılmaz, S., Kesbiç, OS., Yalgın, F., Yiğit, M. 2020.** A comparative evaluation of hematological and biochemical parameters between the Italian mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758) and the Turkish mullet *Chelon auratus* (Risso 1810). *Tuk. J. Zool.* 44:22-30. Doi: 10.3906/zoo-1907-37
- Hasmann, FA., Gurpilhares, DB., Roberto, IC., Coverti, A., Pessoa Jr., A. 2007.** New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and stability. *Enzyme Microb. Tech.* 40(4): 849-858. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.06.017
- Hochachka, PW., Clayton-Hochachka, B. 1973.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase and thermal acclimation in the mullet fish. *Mar. Biol.* 18: 251-259. Doi: 10.1007/BF00347787
- Hu, W., Zhi, L., Zhuo, M-Q., Zhu, Q-L., Zheng, J-L., Chen, Q-L., Gong, Y., Liu, C-X. 2013.** Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and inhibition effects of several metal ions on G6PD activity in vitro. *Fish Physiol. Biochem.* 39: 637-647. Doi: 10.1007/s10695-012-9726-x.
- İbrahim, MA., Ghazy, A-HM., Salem, AMH, Ghazy, MA., Abdel-Monsef, MM. 2014.** Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from camel liver. *Enzyme Res.* 1-10. Doi: 10.1155/2014/714054
- Kırıcı, M., Atamanalp, M. 2016.** *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) böbrek dokusundan glukoz 6-fosfat dehidrojenaz enziminin saflaştırılması ve bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi.* 3(3): 234-240.
- Kuzu, M., Aslan, A., Ahmed, I., Çomaklı, V., Demirdağ, R., Uzun, N. 2016.** Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes from the gill tissue of Lake Van fish and analyzing the effects of some chalcone derivatives on enzyme activities. *Fish Physiol. Biochem.* 42: 483-491. Doi: 10.1007/s10695-015-0153-7
- Laemmli, DK. 1970.** Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. Doi: 10.1038/227680a0
- Ninfali, P., Orsenigo, I., Baronciani, L., Rapa, S. 1990.** Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Prep. Biochem.* 20(3-4): 297-309. Doi: 10.1080/00327489008050202

- Özmen, İ. 2009.** Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz üzerine bazı sitotoksik kimyasalların etkisi. *SDÜ Fen Dergisi.* 4(1): 112-119.
- Ribeiro, MZ., Silva, DP., Vitolo, M., Roberto, IC., Pessoa-Jr., A. 2007.** Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. *Braz. J. Microbiol.* 38(1): 78-83. Doi: 10.1590/S1517-83822007000100016
- Ulus, NN., Kus, MS., Acan, NL., Tezcan, EF. 1999.** A rapid method for the purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(7): 787-796. Doi: 10.1016/s1357-2725(99)00019-9
- Yoshida, A. 1967.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes: I. Purification and characterization of normal (B<sup>+</sup>) enzyme. *J. Biol. Chem.* 241(21): 4966-4976. Doi: 10.1016/S0021-9258(18)99658-4