





SDS-PAG Elektrofrezinin Et ve Sakatat Analizinde Kullanılması

Use of SDS-PAG Electrophoresis in Meat and Offal Analysis

Özgür KAYNAR^{1*}  İsmail Erim KÖSEOĞLU² 

¹Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD, Kastamonu

²Et ve Süt Kurumu Genel Müdürlüğü, AR-GE Şube Müdürlüğü, Ankara

¹ORCID: 0000-0002-2875-423X, ²ORCID: 0000-0001-7924-8209

*Sorumlu Yazar: ozgurkaynar@kastamonu.edu.tr Geliş Tarihi: 21.07.2022 Kabul Tarihi: 13.09.2022

ÖZET

Et, sağlıklı bir diyet için gerekli olan mükemmel bir protein kaynağıdır. Sağlıklı saç, kemik, cilt ve kanın korunmasına yardımcı olmanın yanı sıra kas oluşturmaya ve onarmaya yardımcı olur. Etten elde edilen protein, Yüksek Biyolojik Değeri (YBD) sayesinde kolayca sindirilir ve böylece vücut tarafından hızlı ve etkili bir şekilde emilir ve özellikle kırmızı et, tavuk ve hindi protein açısından son derece yüksektir.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE), bir protein karışımının bileşenlerini ayrı ayrı çözmek için en yaygın kullanılan analitik yöntemdir. Ayrıca bir proteinin saflığını elektroforetik bir yöntemle değerlendirmek neredeyse zorunlu hale gelmiştir.

Bu araştırmada SDS-PAGE analizi ile farklı et örneklerinin protein profillerine göre ayrımı araştırılmıştır ve önce sığır bonfilesi, tavuk but eti, tavuk göğüs ve domuz but etinin diğer yandan ise tavuk but eti, tavuk göğüs, tavuk karaciğer ve tavuk böbrek örnekleri arasında kesin protein profil farkları olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Protein, Profil, Analiz, Et

ABSTRACT

Meat is an excellent source of protein, which is essential for a healthy diet. It helps maintain healthy hair, bones, skin and blood, as well as help build and repair muscle. Meat-derived protein is easily digested thanks to its High Biological Value (HBV), so it is quickly and effectively absorbed by the body, and is extremely high in protein, especially red meat, chicken and turkey.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is the most widely used analytical method to individually resolve the components of a protein mixture. In addition, it has become almost mandatory to evaluate the purity of a protein with an electrophoretic method.

In this study, the differentiation of different meat samples according to their protein profiles was investigated by SDS-PAGE analysis, and firstly, the precise protein profile of beef tenderloin, chicken thigh meat, chicken breast and pork thigh meat, and on the other hand chicken thigh meat, chicken breast, chicken liver and chicken kidney samples. differences were found.

Keywords: Protein, Profile, Analysis, Meat

GİRİŞ

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), bir protein karışımının bileşenleri ayrı ayrı çözmek için en yaygın kullanılan analitik yöntemdir. Ayrıca bir proteinin saflığını elektroforetik bir yöntemle değerlendirmek neredeyse zorunlu hale gelmiştir. SDS-PAGE, proteinlerin moleküler boyuttaki farklılıkları ile jel matrisi boyunca %1'den daha az farklılık gösteren elektroforetik hareketliliklerini aynı anda kullanarak proteinleri birbirinden ayırır (Scopes, 1993). Teknik aynı zamanda proteinlerin moleküler ağırlıklarını tahmin etme de güçlü bir araçtır (Chrambach ve Rodbard, 1971; Weber vd., 1972).

Protein analizinde vazgeçilmez bir araç olarak SDS-PAGE'in başarısı, elektroforetik hareketliliğin bir proteinin moleküler kütlesi ile korelasyonuna izin veren üç özelliğine atfedilmiştir (Marshak vd., 1996). Öncelikle SDS-PAGE kesintili bir tampon sistemi kullanır. Numunenin hazırlandığı ve jelin çalıştığı sistemlerdeki tamponlar, sırasıyla TrisHCl/Tris-glisin ve pH 6.8/8.3 olmak üzere hem bileşim açısından hem de değer açısından farklılık gösterir (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Yine kesintili tampon sistemleriyle numunenin iyi çözünürlüğü korunurken jel kuyucuklarına daha fazla miktarda numune yüklenmesine izin verir. Bu şekilde aşırı yüklenen protein karışımları önce yığıcı jelde çok ince bandlar halinde "paketlenir" ve daha sonra tüm proteinler aynı anda çözücü jele girer.

Sistemin ikinci avantajı deterjan sodyum dodesil sülfat kullanımı (SDS) ve proteinleri denatüre etmek için kullanılan indirgeyici ajanlardır (Shapiro ve Maizel, 1969). SDS, proteinlere güçlü ve sabit bir oranda bağlanır; 1 Dodesil sülfat molekülü 2 adet amino asit kalıntısına bağlanır (Reynolds ve Tanford, 1970). Bu nedenle, SDS polipeptit zincirine bağlandığında negatif yük/birim kütle oranı zincir tüm proteinler için aynıdır.

Üçüncü avantajı ise ilk iki keşfin birleşimi olan basit bir tris-glisin tampon sistemi kullanılmasıdır (Laemmli, 1970). Daha yakın zamanlarda, tris-borat (Neville ve Glossmann, 1974) ve tris trisin (Schägger ve Von Jagow, 1987) gibi tampon kombinasyonları, orijinal yöntemin çözücü gücünü iyileştirmiştir.

Modern SDS-PAGE, kullanıma hazır prekast jellerin gelişmesine neden olmuştur (Matsudaira ve Burgess, 1978). Kullanıma hazır prekast jeller çok çeşitli jel formülasyonları, akrilamid yüzdeleri, kalınlıkları, kuyu biçimleri ve tampon sistemleri olarak artık birkaç üreticiden ticari olarak temin edilebilmektedir. Diğer yandan jel hazırlamada kullanılan malzemelerin kullanım süreleri oldukça uzundur. Basit bir güç kaynağı ve yürütme tankı ile çevre şartlarından etkilenmeden analizler gerçekleştirilebilmektedir. Diğer metotlarla karşılaştırıldığında en ucuz olanıdır. En basit boyadan (μg hassas, Coomassie Brilliant Blue R250, BioRad), 0,25 ng proteini tespit edebilen hassasiyetteki floresan boyalara (Flamingo, BioRad) kadar geniş bir tespit limiti vardır. Ve günümüzde başarılı bir SDS-PAGE analizi sadece ve sadece dikkatli numune hazırlama ve yüklemeye önce yapılan işlemlere bağlıdır.

Bu çalışmada en basit SDS-PAGE analizinin farklı et ve sakatat örneklerinin ayırımında kullanılabileceği anlatılmaktadır.

MATERYAL VE METOTLAR

MATERYAL

Çalışma materyalini Kastamonu'da yerel bir kasaptan elde edilen örnekler ile Polonya' dan temin ettiğimiz domuz but etinden oluşmaktadır. Elde edilen örnekler (her bir et sınıfından 10 örnek) hassas terazide 1 gr olacak şekilde petri kaplarına tartıldı ve hemen sıvı azot ile öğütme işlemi gerçekleştirildi.

Dokuların öğütülmesi ve homojenizasyonu

1 gr et dokusu bir porselen havana alınarak üzerine sıvı azot döküldü. Doku toz haline gelinceye kadar porselen bir eziciyle öğütüldü ve öğütülen doku örnekleri falcon tüplere alınarak -80 °C' de saklandı.

Daha sonra 1 gr et dokusu üzerine 5 ml %10 SDS eklendi ve ultraturrax homojenizatörde buz içinde 5 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar daha sonra Potter-Elvehjem homojenizatörde cam eziciyle ikinci defa homojenize edilerek homojenizasyon işlemi tamamlandı. Homojenatlar eppendorf tüplere porsiyonlanarak analizler yapıncaya kadar -80 °C' de saklandı (Semis vd., 2021).

Etlerin total protein tayini

Alkali bakır tartarat ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlanır. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Bu renk 750 nm’de okunur (Lowry, 1951).

1. Solüsyonların hazırlanışı

I. Alkali Bakır Ayırıcı: Sigma protein test kiti (P 5656) içerisindeki “Lowry Reagent Modified” (40 g) şişesine 40 ml distile su eklendi ve içerik eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

II. Fenol Ayırıcı: 2.0 N Folin-Ciocalteu-Phenolden (Supelco, 1.09001) 18 ml alındı ve üzerine 90 ml distile su eklendi.

III. Protein Standartları: 20, 40, 60, 80 ve 100 µg sıgır serum albümin BSA/ml standartları kullanıldı.

IV. Örnekler: Homojenatlarda, toplam protein miktarları 100 µg/ml’den az olacak şekilde sulandırma yapıldı.

2. **Yapılışı:** Protein miktarları Tablo 1’deki protokole göre ölçüldü.

3. **Hesaplama:** Protein miktarları standart eğriye göre hesaplandı.

Protein Profilinin Belirlenmesi (SDS-PAGE)

Discontinuous SDS-PAGE, Laemmli metodu (1970) BioRad mini protean TetraCell sistemine uyarlanarak gerçekleştirildi.

1. Solüsyonların hazırlanışı

Akrilamid Stok Solüsyonu (%30)

290 g akrilamid (Sigma, A8887) ve

10 g N, N’-metilen bisakrilamid (Sigma, M7279), 1000 ml’lik beher içine tartılmış ve üzerine 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika süreyle karıştırıldı. Elde edilen karışım bir balon jojeye alınarak toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Yığıcı (stacking) Jel Tamponu (0.5 mol tris-HCl [pH 6.8])

61 g trizma-base (Sigma, T1503) 1000 ml’lik beher içine tartılmış ve üzerine 900 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 10 dakika süreyle karıştırıldı. Karışımın pH’sı % 37’lik HCl (Sigma, 258148) ile 6.8’e ayarlanmıştır. Elde edilen karışım bir balon jojeye alınarak toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Çözücü (resolving) Jel Tamponu (1.5 mol tris-HCl [pH 8.8])

183 g trizma-base (Sigma, T1503) 1000 ml’lik beher içine tartılmış ve üzerine 900 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 10 dakika süreyle karıştırıldı. Karışımın pH’sı %37’lik HCl (Sigma, 258148) ile 8.8’e ayarlandı. Elde edilen karışım bir balon jojeye alınarak toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Tris-Glisin Elektrod Tamponu (pH 8.3)

3.03 g trizma base (Sigma, T1503), 14.4 g glisin (Sigma, G8898) ve 0.5 g SDS (Sigma, L3771) 1000 ml lik beher içine tartılmış ve üzerine 900 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika süreyle karıştırıldı. Elde edilen karışım bir balon jojeye alınarak toplam hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Tablo 1. Total protein analiz metodu

	Örnek	Kör	Standart
Lowry Ayırıcı (ml)	1	1	1
Distile Su (ml)	1	1	1
İlave edildi ve tüpler karıştırıldı. 20 dakika oda ısısında bekletildi.			
Folin & Ciocalteu Phenol Ayırıcı (ml)	0.5	0.5	0.5
Eklenir eklenmez tüpler vortekslenildi. İnkubasyon için 30 dakika beklendi. 750 nm’de standart ve örneklerin absorbanası köre karşı okundu.			

Örnek Tamponu

1 ml yıgıcı jel tamponu (pH 6.8), 0.8 ml gliserol (Sigma, G5516), 1.6 ml %10 SDS (Sigma, L3771), 0.4 ml 2-β-merkaptoetanol (Sigma, 63689), 0.2 ml %0.05 bromfenol blue (Sigma, B8026) karıştırıldı.

%10 SDS

100 g SDS (Sigma, L3771) 1000 ml'lik beher içine tartıldı ve üzerine 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika süreyle karıştırıldı. Elde edilen karışım bir balon jeye alınarak toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

%10 Amonyum Persülfat (APS)

1 g APS (Sigma, A3678) üzerine 10 ml distile su ilave edildi.

Bromfenol Blue Solüsyonu

50mg bromfenol blue (Sigma, B8026) 10 ml distile su içerisinde çözündürüldü.

Coomassie brilliant blue R250

1 gr coomassie mavisi (Sigma, 112553) 1 lt %40 metanolde (Riedelde Haën, 14262) çözündürüldü. Jeller bu boya içerisinde 2 gün bekletildi.

Sypro Red

500 µl boya (Lonza, 50543), 2.5 Lt %7.5 (h/h) asetik asid () içerisinde çözüldü. Jeller bu boyada 1 saat bekletildi.

2. SDS-PAGE analizi

Düz cam plaka (10x8.5 cm) ve 1.5 mm kalınlığındaki spacer olan plaka bir araya getirildi. İlk önce rezolving jel plakaların arasına toplam plaka yüksekliğinin 2/3 kadar (~4 cm) döküldü. En az 2 saat süreyle beklendikten sonra stacking jel hazırlanıp rezolving jelin üzerine döküldü ve 1.5 mm kalınlığındaki taraklar jel üzerine yerleştirildi. Polimerizasyon için 3 saat süreyle bekletildi. Sürenin sonunda taraklar çıkarılarak jeller TetraCell (BioRad) sistemine yerleştirildi.

Tablo 2. SDS-PAGE Jellerinin Kimyasal Kompozisyonları

	Rezolving Jel (%12)	Stacking Jel (%4)
dH ₂ O (ml)	1.675	3.02
Tris-HCl pH 8.8 (ml)	1.25	-
Tris-HCl pH 6.8 (ml)	-	1.25
%10 SDS (µl)	50	50
Akrilamid stok (ml)	2	0.65
APS (µl)	25	25
TEMED (µl)	2.5	5.0

Eppendorf tüpteki örnek karışımı 100 °C'de 5 dk süreyle bekletildikten sonra jel kuyucuklarına 15 µl olarak yüklendi. Örnekler 20 mA/jel sabit akım modu kullanılarak yaklaşık 90 dk süreyle yürütüldü. Süre sonunda jeller gece boyunca oriole solüsyonunda bekletilmiş ve jellerdeki proteinlerin görüntüleri LAS 500 (GE) jel görüntüleme sistemi ile tespit edildikten sonra, her bir örneğe ait protein bantlarının "volume" değerleri ile toplam protein karışımındaki "bireysel oranları" TL120 jel analiz programı (Nonlinear Dynamics) ile tespit edildi (Tablo 3).

Proteinlerin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması

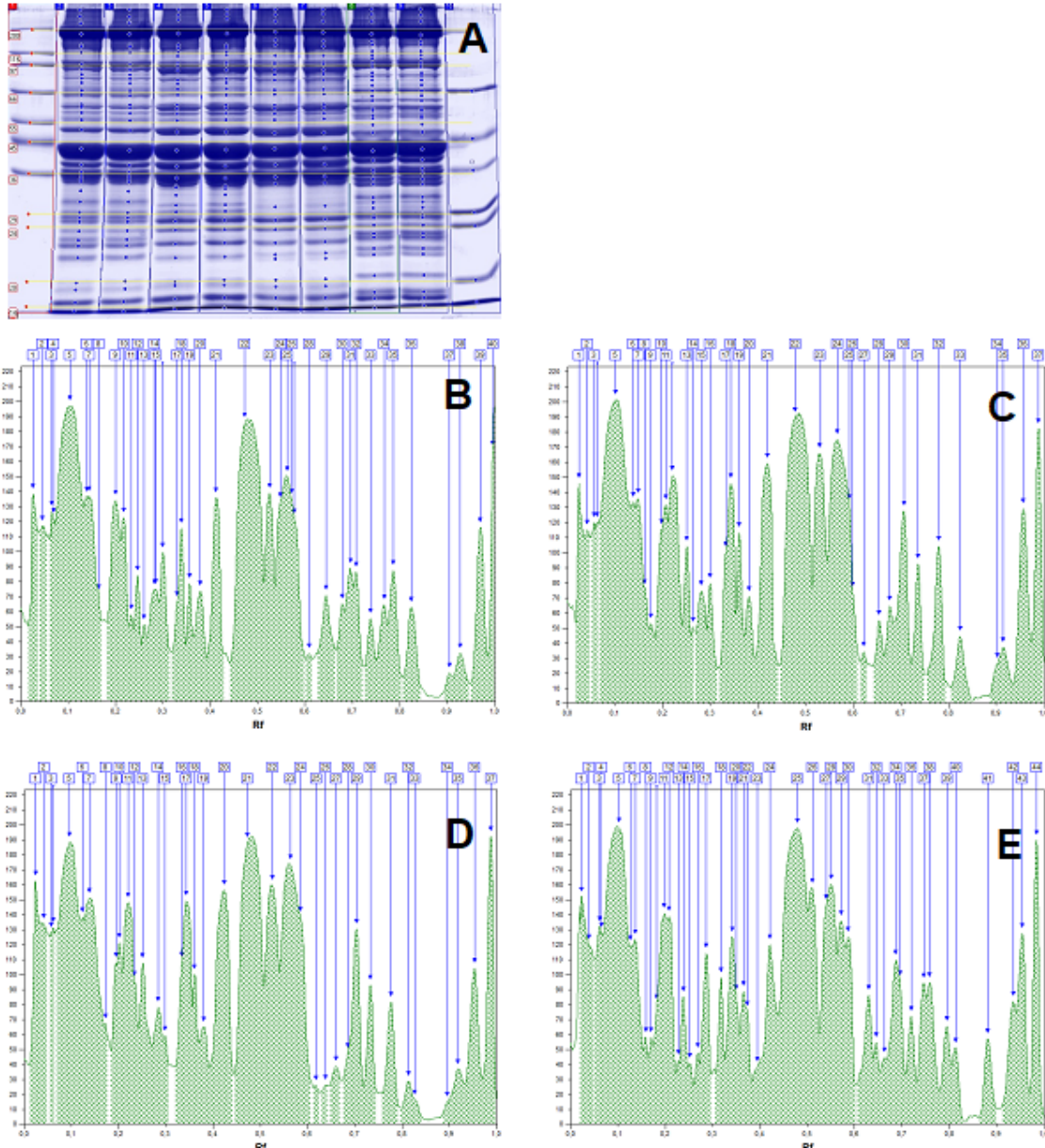
Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin molekül ağırlıkları ve jeldeki göç mesafeleriyle ilişkili olarak semi-logaritmik bir grafik yardımıyla örnek proteinin molekül ağırlığının tespiti esasına dayanır:

$$\text{Nispi göç değeri (Rf)} = \frac{\text{Proteinin göç mesafesi}}{\text{Boyanın göç mesafesi}}$$

Fotoğrafları çekilen süt proteinlerinin molekül ağırlıkları yukarıdaki prensibe göre, TL 120 jel analiz programı ile otomatik olarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Coomassie brilliant Blue R 250 ile boyanan jellerdeki et numunelerinin protein içerikleri karşılaştırıldığında, en yüksek protein içeriğinin sığır but etinde (23,865 g/100 g), sonra sırasıyla tavuk göğüs eti (23,497 g/100 g), domuz but eti (22,951 g/100



Şekil 1. A-Tavuk but, tavuk göğüs eti ile domuz bonfilesine ve sığır bonfilesine ait SDS-PAG elektroforetogramı. Boyama yöntemi Coomassie Brilliant Blue R250, B-tavuk but, C-tavuk göğüs, D-domuz bonfilesi, E-sığır bonfilesine ait dansitogramlar

kompozisyonlarına bakıldığında ise, moleküler ağırlıkları 13-270 kDa arasında değişen farklı sayıda (but eti= 40; göğüs eti= 37; domuz eti= 37; biftek= 43) majör protein tespit edilmiştir. Ayrıca domuz but eti ile tavuk göğüs eti protein profilleri birbirine benzer, tavuk but eti ile sığır but etinin protein profilleri ise birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 1, Tablo 3).

Sığır bonfilesi ile tavuk but eti karşılaştırıldığında 33, 87, 106 ve 113 kDa moleküler ağırlığındaki proteinler sadece sığır etinde, 37-68-74 kDa moleküler ağırlığındaki proteinler ise sadece tavuk but etinde tespit edilmiştir (Şekil 1, Tablo 3).

Domuz but eti ile tavuk göğüs eti karşılaştırıldığında ise 21, 31 ve 85 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin domuz etinde, 32 ve 121 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin tavuk göğüs ve but etinde bulunduğu gözlenmiştir. Bunlara ek olarak 22, 54 ve 87 kDa moleküler ağırlığındaki proteinler sadece sığır etinde tespit edilmiştir (Şekil 1, Tablo 3).

Tavuk but eti, tavuk göğüs eti ile tavuk karaciğer ve tavuk böbreğinin protein profili karşılaştırıldığında ise (Şekil 2) örnekler arasında kesin protein profil farkları olduğu tespit edildi.

Tablo 3. Farklı et örneklerinin SDS-PAGE analizleri

Tavuk But Eti					Tavuk Göğüs Eti				
MW	Av	Min.	Max	Se	MW	Av	Min.	Max	Se
268,6	0,574	0,516	0,604	0,019	269,5	0,539	0,528	0,537	0,002
253,4	0,483	0,473	0,493	0,005	254,1	0,393	0,383	0,394	0,003
					236,7	0,208	0,205	0,207	0,001
230,0	0,231	0,219	0,242	0,006	230,9	0,182	0,178	0,182	0,001
223,2	0,126	0,123	0,130	0,002					
181,9	3,010	2,931	3,088	0,042	184,1	3,173	3,112	3,159	0,013
140,2	0,285	0,271	0,299	0,008	139,3	0,329	0,319	0,331	0,003
134,9	0,649	0,625	0,672	0,012	133,1	0,580	0,501	0,645	0,038
117,9	0,176	0,146	0,205	0,016	120,6	0,177	0,166	0,184	0,005
					112,5	0,190	0,185	0,191	0,002
					100,7	0,335	0,317	0,345	0,007
98,1	0,868	0,863	0,873	0,003	97,4	0,455	0,431	0,468	0,010
90,4	0,468	0,458	0,477	0,005	90,4	1,032	0,993	1,065	0,014
84,3	0,153	0,150	0,155	0,001					
79,2	0,295	0,290	0,300	0,002	79,2	0,404	0,386	0,412	0,007
74,2	0,140	0,131	0,149	0,005	74,8	0,098	0,084	0,109	0,007
68,1	0,301	0,288	0,314	0,007					
66,8	0,167	0,161	0,175	0,003	68,8	0,415	0,397	0,437	0,009
64,1	0,443	0,428	0,459	0,008	64,6	0,359	0,326	0,383	0,015
60,1	0,162	0,157	0,173	0,004	60,2	0,272	0,267	0,270	0,001
59,3	0,386	0,383	0,390	0,002	59,3	0,697	0,650	0,728	0,021
58,0	0,282	0,277	0,287	0,003	57,9	0,430	0,402	0,449	0,013
55,9	0,421	0,417	0,426	0,002	56,0	0,360	0,333	0,380	0,012
51,3	0,794	0,783	0,804	0,006	50,4	1,301	1,242	1,329	0,023
41,6	2,857	2,855	2,859	0,001	41,7	2,858	2,746	2,903	0,042
37,4	0,744	0,739	0,750	0,003					
36,2	0,403	0,393	0,414	0,005	37,3	1,226	1,187	1,236	0,013
35,6	0,905	0,875	0,933	0,011	35,5	2,032	1,985	2,031	0,012
35,2	0,252	0,233	0,271	0,010	34,6	0,220	0,204	0,230	0,007
35,0	0,443	0,414	0,471	0,015					
33,9	0,107	0,105	0,108	0,001	34,2	0,219	0,190	0,244	0,014
					33,5	0,149	0,145	0,150	0,001
32,2	0,513	0,509	0,518	0,002	31,7	0,281	0,259	0,297	0,010
29,4	0,253	0,249	0,256	0,002					
27,5	0,389	0,387	0,392	0,002	29,9	0,307	0,292	0,314	0,006
26,0	0,355	0,353	0,356	0,001	26,6	0,883	0,851	0,893	0,011
23,0	0,276	0,270	0,282	0,003	23,3	0,446	0,416	0,466	0,013
21,4	0,326	0,325	0,326	0,000					
20,9	0,456	0,442	0,469	0,007	21,1	0,622	0,572	0,657	0,023
20,7	0,375	0,357	0,392	0,009	20,7	0,302	0,281	0,315	0,009
20,1	0,075	0,072	0,078	0,002	20,2	0,077	0,071	0,080	0,002
18,8	0,208	0,199	0,218	0,005	19,5	0,278	0,242	0,306	0,017
15,5	0,616	0,609	0,623	0,004	16,6	0,852	0,809	0,874	0,017
12,8	0,443	0,410	0,475	0,017	13,8	0,817	0,758	0,856	0,026
TOTAL g/100g	20,409	19,886	20,910	0,260	TOTAL	23,497	22,643	23,844	0,377

Tablo 3. Farklı et örneklerinin SDS-PAGE analizleri

Domuz Bonfilesi					Sığır Bonfilesi				
MW	Av	Min.	Max	Se	MW	Av	Min.	Max	Se
269,5	0,640	0,630	0,644	0,003	270,0	0,642	0,594	0,691	0,026
253,1	0,594	0,566	0,644	0,017	254,0	0,471	0,469	0,472	0,001
232,8	0,152	0,140	0,164	0,005					
229,0	0,208	0,195	0,235	0,009	229,0	0,464	0,401	0,526	0,033
					223,2	0,116	0,104	0,129	0,007
187,5	2,286	2,270	2,302	0,009	177,4	2,771	2,692	2,850	0,042
153,9	0,305	0,274	0,331	0,011	150,8	0,251	0,210	0,293	0,022
136,6	1,433	1,380	1,486	0,028	141,2	0,626	0,602	0,651	0,013
					121,3	0,157	0,146	0,167	0,006
111,4	0,168	0,147	0,190	0,011	113,0	0,171	0,170	0,171	0,000
100,7	0,312	0,288	0,336	0,013	106,1	0,166	0,145	0,187	0,011
97,7	0,349	0,333	0,376	0,009	99,2	0,736	0,713	0,759	0,012
90,7	0,954	0,949	0,959	0,003	95,2	0,552	0,547	0,557	0,002
					87,1	0,094	0,077	0,104	0,006
85,3	0,219	0,192	0,246	0,014	83,6	0,337	0,316	0,359	0,011
78,2	0,648	0,626	0,669	0,011	78,2	0,135	0,117	0,145	0,006
68,4	0,442	0,427	0,457	0,008	67,2	0,540	0,521	0,553	0,007
65,2	0,188	0,185	0,190	0,001	61,8	0,351	0,344	0,357	0,003
60,3	0,280	0,274	0,287	0,004	59,3	0,601	0,576	0,625	0,013
59,3	0,800	0,762	0,859	0,022	58,7	0,192	0,190	0,194	0,001
58,0	0,347	0,342	0,352	0,003	57,5	0,303	0,291	0,315	0,006
56,4	0,345	0,339	0,351	0,003	56,8	0,220	0,201	0,239	0,010
					54,3	0,263	0,261	0,266	0,001
50,2	1,456	1,422	1,550	0,029	50,5	0,820	0,792	0,848	0,015
42,4	2,507	2,419	2,551	0,029	42,0	3,005	2,869	3,105	0,055
37,6	1,280	1,254	1,305	0,014	38,6	0,873	0,856	0,890	0,009
35,6	1,799	1,775	1,822	0,013	36,8	0,484	0,448	0,520	0,014
34,9	0,666	0,639	0,693	0,014	36,1	0,976	0,932	1,021	0,024
					35,3	0,656	0,640	0,672	0,008
33,7	0,084	0,079	0,092	0,003	34,8	0,593	0,532	0,654	0,032
32,8	0,100	0,085	0,114	0,008	33,1	0,564	0,508	0,620	0,030
					32,3	0,208	0,187	0,229	0,011
31,4	0,203	0,197	0,209	0,003	30,9	0,187	0,166	0,208	0,011
29,3	0,188	0,174	0,202	0,007	28,7	0,571	0,530	0,612	0,022
27,0	0,701	0,662	0,741	0,021	27,8	0,351	0,297	0,406	0,029
23,7	0,459	0,420	0,498	0,021	24,7	0,391	0,353	0,430	0,020
21,1	0,479	0,439	0,519	0,021	22,5	0,446	0,401	0,491	0,024
					21,7	0,572	0,501	0,614	0,025
20,7	0,161	0,141	0,181	0,010	20,8	0,371	0,335	0,408	0,019
20,7	0,070	0,070	0,071	0,000	20,7	0,240	0,217	0,264	0,009
20,3	0,074	0,066	0,081	0,004	20,6	0,330	0,296	0,364	0,018
19,3	0,258	0,248	0,267	0,005	18,1	0,462	0,413	0,511	0,026
16,6	0,688	0,654	0,722	0,018	16,6	0,721	0,686	0,757	0,019
13,5	0,839	0,808	0,863	0,013	14,3	0,738	0,715	0,761	0,012
TOTAL	22,951	21,873	23,557	0,416	TOTAL	23,865	22,496	25,148	0,678

TARTIŞMA ve SONUÇ

Et ve et ürünleri, insan beslenmesindeki en değerli ve temini pahalı protein kaynağıdır. Et ürünlerindeki en yaygın tağşiş ise ucuz hayvan etinin pahalı et ürününe katılması şeklindedir (Hassoun vd., 2020). Bu durumun tespiti için birbirinden farklı çok sayıda tekniğin kullanımı ortaya konmuştur.

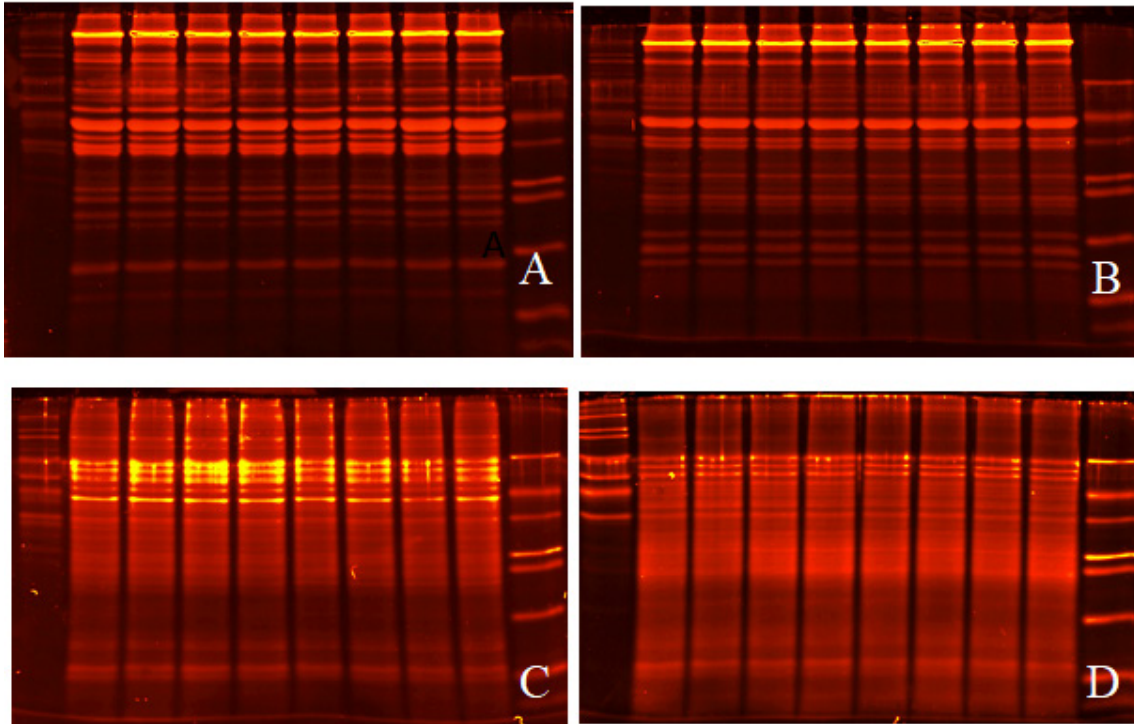
Rózycki vd. (2018) domuz etinin belirlenmesini jel - protein izoelektrik odaklamayı (IEF) kullanarak, Gecaj vd. (2021) tavuk ve sığır bazlı ticari ürünlerde domuz etinin ELISA ile Kuswandi vd. (2015) sığır eti içindeki domuz etini FT-IR spektroskopisi ile Rady ve Adedeji (2018) kıymada domuz eti varlığını NIR spektroskopisi ile Deniz vd. (2018) dana kıymasında tavuk veya hindi etini spektroskopik yöntem ile Alamprese vd. (2016) sığır etinde hindi eti varlığını NIR spektroskopisi ile Ropodi vd. (2017) sığır eti kıymasında at eti varlığını multispektral görüntüleme (MSI) ile Kim vd. (2020) sığır kıymasında eşek etini, Kim vd. (2016) domuz etini, Dalsecco vd. (2018) ise on farklı hayvan türünün etini PCR ile tespit etmişlerdir. Ancak bu yöntemlerin tamamı gelişmiş laboratuvar altyapısına ve teknik beceriye ihtiyaç duyulan yöntemlerdir.

Yine bu analizlerde kullanılan cihazların bakımları çok pahalıdır.

Serolojik testler türlere ait etlerin ayırımında hem spesifik hem de hassastır, ancak birbirine yakın ilişkili türlerin proteinlerinin çapraz reaksiyon - yalancı pozitif sonuç vermeleri çok büyük bir problemdir (Spychaj ve Mozdziak, 2009).

PCR tekniği yine hassas bir yöntemdir ancak PCR' a özel (filtreli pipet uçları, DNA' se free solüsyonlar vb.) hem de termal farklılıklara dirençli malzemeye ihtiyaç vardır. Ayrıca sadece o türe özgün hedef DNA parçasının her iki zincirinin kesin olarak bilinmesi gerekmektedir. Daha ötesinde, bazı gıda işleme teknikleri DNA' da bozulmaya ve dolayısıyla PCR' nin amplifikasyon oranının azalmasına neden olabilmekte (Luykx ve Van Ruth, 2008), fazla DNA yıkımında veya çok farklı kaynaklı et türleri karışımından türleri tanımlamada başarısız olabilmektedir (Luykx ve Van Ruth, 2008; Sychaj ve Mozdziak, 2009).

Yaptığımız bu ön çalışmada SDS-PAGE' in en kaba ve basit haliyle yine çok az bütçeyle dahi herhangi bir teknik problem yaşamadan çok çeşitli tür hayvan doku ve/veya organ örneğinin protein profilini etkili bir biçimde tespit edebildiği görüldü. Yine, onlarca (%6-18 arası) konsantrasyon



Şekil 2. A-Tavuk göğüs B- Tavuk but, C- Tavuk böbrek, D- Tavuk karaciğer örneklerine ait SDS-PAG elektroforetogramı. Boyama yöntemi Sypro Red

kullanabilmesine rağmen sadece tek bir jel kompozisyonu (%12) kullanılan bu çalışmada analiz edilen örneklerin protein batlarının birbirlerinden farklılık gösterdiğini belirlendi. Önce coomassie blue (μg protein tespit edebilir) kullandığımız jellerdeki protein bant tespiti örnekleri kesin olarak birbirinden ayırabildiği, sypro red kullanımının ise band miktarını bir miktar artırdığı ancak tespit limitinin 1 ng altında olduğu - coomassie mavisinden 1000 kat daha düşük miktar - düşünüldüğünde bu tekniğin et analizinde çok etkin bir biçimde kullanılabileceği açıktır.

KAYNAKLAR

- Alamprese, C., Amigo, J. M., Casiraghi, E. ve Engelsens, S. B. (2016). Identification and quantification of turkey meat adulteration in fresh, frozen-thawed and cooked minced beef by FT-NIR spectroscopy and chemometrics. *Meat Science*, 121, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.06.018>
- Chrambach, A. ve Rodbard, D. (1971). Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science*, 172(3982), 440-451. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.440>
- Dalsecco, L. S., Palhares, R. M., Oliveira, P. C., Teixeira, L. V., Drummond, M. G. ve De Oliveira, D. A. A. (2018). A fast and reliable real-time PCR method for detection of ten animal species in meat products. *Journal of Food Science*, 83(2), 258-265. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14001>
- Davis, B. J. (1964). Method and application to human serum protein. *Ann. NY Acad. Sci.*, 121(2), 404-427.
- Deniz, E., Güneş Altuntaş, E., Ayhan, B., İğci, N., Özel Demiralp, D. ve Candoğan, K. (2018). Differentiation of beef mixtures adulterated with chicken or turkey meat using FTIR spectroscopy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(10), e13767. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13767>
- Gecaj, R. M., Muji, S., Ajazi, F. C., Berisha, B., Kryeziu, A. ve Ismaili, M. (2021). Investigation of pork meat in chicken- and beef-based commercial products by ELISA and real-time PCR sold at retail in Kosovo. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(5), 368-375. <https://doi.org/10.17221/164/2020-CJFS>
- Hassoun, A., Mâge, I., Schmidt, W. F., Temiz, H. T., Li, L., Kim, H. -Y., Nilsen, H., Biancolillo, A., Kaddour, A. A., Sikorski, M., Sikorska, E., Grassi, S. ve Cozzolino, D. (2020). Fraud in animal origin food products: Advances in emerging spectroscopic detection methods over the past five years. *Foods*, 9(8), 1069. <https://doi.org/10.3390/foods9081069>
- Kim, M. J., Suh, S. M., Kim, S. Y., Qin, P., Kim, H. R. ve Kim, H. Y. (2020). Development of a real-time PCR assay for the detection of donkey (*Equus asinus*) meat in meat mixtures treated under different processing conditions. *Foods*, 9(2), 130. <https://doi.org/10.3390/foods9020130>
- Kim, M., Yoo, I., Lee, S. -Y., Hong, Y. ve Kim, H. -Y. (2016). Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food Chemistry*, 210, 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.084>
- Kuswandi, B., Cendekiawan, K. A., Kristiningrum, N. ve Ahmad, M. (2015). Pork adulteration in commercial meatballs determined by chemometric analysis of NIR Spectra. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(3), 313-323. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9238-3>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193(1), 265-275.

- Luykx, D. M. A. M. ve Van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.038>
- Marshak, D. R., Kadonaga, J. T., Burgess, R. R., Knuth, M. W., Brennan, W. A. ve Lin, S. H. (1996). *Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Matsudaira, P. T. ve Burgess, D. R. (1978). SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 87(2), 386-396. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90688-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90688-7)
- Neville, D. M. ve Glossmann, H. (1974). Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. In *Methods in Enzymology* (Fleischer, S. ve Packer, L., Eds.), 32, 92-102. New York: Academic Press.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis - I Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 321-349. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x>
- Rady, A. ve Adedeji, A. (2018). Assessing different processed meats for adulterants using visible-near-infrared spectroscopy. *Meat Science*, 136, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.014>
- Reynolds, J. A. ve Tanford, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 1002-1007. <https://doi.org/10.1073/pnas.66.3.1002>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z. ve Nychas, G. -J. E. (2017). Multispectral imaging (MSI): A promising method for the detection of minced beef adulteration with horse meat. *Food Control*, 73, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.048>
- Rózycki, M., Chmurzyńska, E., Bilska-Zajac, E., Karamon, J. ve Cencek, T. (2018). Isoelectric focusing of proteins in the pH gradient as a tool for identification of species origin of raw meat. *Journal of Veterinary Research*, 62(2), 151-159. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0024>
- Scopes, R. K. (1993). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.
- Semis, H. S., Gur, C., Ileriturk, M., Kaynar, O. ve Kandemir, F. M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester in a model of λ -Carrageenan-induced paw edema in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 40(12_suppl), S721-S738.
- Shapiro, A. L. ve Maizel, J. V. (1969). Molecular weight estimation of polypeptides by SDS polyacrylamide gel electrophoresis: further data concerning resolving power and general considerations. *Analytical Biochemistry*, 29(3), 505-514. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90335-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90335-2)
- Schägger, H. ve Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Spychaj, A. ve Mozdziak, P. E. (2009). PCR methods in meat species identification as a tool for the verification of regional and traditional meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8(2), 5-20.
- Weber, K., Pringle, J. R. ve Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In *Methods in Enzymology*, 26, 3-27. Academic Press.