وقائع المؤتمر العالمي للتنمية وتداخلاتها مع التنوع الإحيائي بجنوب العراق، 12-14 كانون أول 2011، 97 - 106

فصل بروتينات أسماك الكارب *Cyprinus carpio* والصبور *Tenualosa ilisha* باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي

أم البشر حميد جابر الموسوي و شمائل عبد العالي صيوان آل عبد النبي
كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة-العراق

المستخلص - فصلت بروتينات أسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* والصبور *Tenualos ilisha* بطريقة الترحيل الكهربائي. وقد أظهرت النتائج أن بروتينات المايوفايبريل لأسماك الكارب والصبور احتوت على 14 و 13 حزمة على التوالي، تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين 17400-112200 دالتون لسمك الكارب، وبين 18600-112200 دالتون لسمك الصبور، في حالة بروتينات الساركوبلازما ظهر وجود 15 حزمة تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين 15100-97700 دالتون لسمك الكارب و 9 حزم لسمك الصبور تراوحت أوزانها الجزيئية بين 17400-93300 دالتون. أما تحليل البروتينات الذائبة بالملح، فقد أظهرت نتائجه وجود 15 و 6 حزم على التوالي تراوحت أوزانها الجزيئية بين 12900-112200 دالتون لسمك الكارب وبين 16200-74100 دالتون لسمك الصبور. هذا فضلا عن وجود حزمة بروتينية على قمة هلام بروتينات المايوفايبريل والبروتينات الذائبة بالملح لأسماك الكارب والصبور، ووجود حزمة بروتينية على قمة هلام بروتينات الساركوبلازما لسمك الكارب فقط، والتي لم تدخل مسامات هذا الهلام، وان جميع هذه الحزم تباينت في شدة كثافتها على طول الهلام.

المقدمة

يتكون بروتين لحم السمك من ثلاثة أنواع رئيسية هي بروتينات الليفات (المايوفايبريل) Myofibrillar proteins وهي ذائبة بالمحاليل المتأينة القوية (أكثر من 0.5 مولاري) وتشكل نسبتها 65-75% من البروتينات العضلية الكلية. وبروتينات الساركوبلازما Sarcoplasmic proteins وهذه تذوب بالماء أو المحاليل الملحية المخففة، ونسبتها 20-30% من البروتينات العضلية الكلية. والنوع الثالث بروتينات الانسجة الرابطةConnective tissue proteins وهي غير ذائبة بالماء أو المحاليل الملحية ونسبتها تشكل 3% من البروتينات العضلية (الطائي، 1986 و Mackie, 1990) كما تحتوي العضلة البيضاء في الكثير من أنواع الأسماك على بروتينات ذائبة بالماء، ثابتة تجاه المعاملات الحرارية ولها أوزان جزيئية واطئة تسمى البارفالبومينات Parvalbumins ويرمز لها PA (Etienne *et al.*, 1999). نتيجة للتطورات الحاصلة في مجال تكنولوجيا الأسماك والمنتجات السمكية فقد اقترحت طرائق مختلفة وتقنيات عديدة ومتتابعة لتحليل بروتيناتها بمختلف أنواعها، وفضلا عن هذا فهي تفيد في الكشف عن عمليات الغش وخاصة في حالة تصنيع المنتجات السمكية اذ يعمد البعض الى استخدام أنواع رخيصة واعتبارها ذات نوعيات عالية (Yman, 1992). وتعد طريقة الترحيل الكهربائي احدى هذه التقنيات وهي طريقة سريعة ومضمونة لفصل البروتينات في مزيج معقد وهي من أكفأ الطرائق المستخدمة لتقدير أوزانها الجزيئية. ونظرا لقلة البحوث المتعلقة بفصل بروتينات الأسماك باستخدام هذه الطريقة فقد أجرينا هذه الدراسة على نوعين من الأسماك المتوفرة بكثرة في بيئتنا المحلية هما: الكارب الاعتيادي (*Cyprinus carpio* Lennaeus, 1758) (الدهام، 1977) والصبور (*Tenualosa ilisha* Hamilton-Buchana, 1822) (النور، 1998).

المواد وطرائق العمل

تحضير الأسماك:

تم الحصول على اسماك الكارب الاعتيادي من محطة تربية الأسماك التابعة لمركز علوم البحار/جامعة البصرة،أما أسماك الصبور فتم الحصول عليها من السوق المحلية وبحالتها الطـازجة، وتم تحضيرها للدراسة حسب الطريقة المذكورة في دراسة (ال عبد النبي والموسوي، 2011).

استخلاص البروتينات العضلية:

استخلصت بروتينات اللييفات (المايوفايبريل) وبروتينات الساركوبلازما لكل نوع سمك حسب الطريقة المتبعة من قبل (LeBlanc and LeBlanc, 1989). أما البروتينات الذائبة بالملح فقد استخلصت حسب الطريقة المتبعة من قبل (Ohnishi and Rodger, 1980).

الترحيل الكهربائي لبروتينات الاسماك:

اتبعت طريقة Webar and Osborn (1975) لفصل بروتينات المايوفايبريل والساركوبلازما والبروتينات الذائبة بالملح وذلك باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي القرصي Disk Electrophoresis وبالاستعانة بالمحاليل المستخدمة في هذه الطريقة.

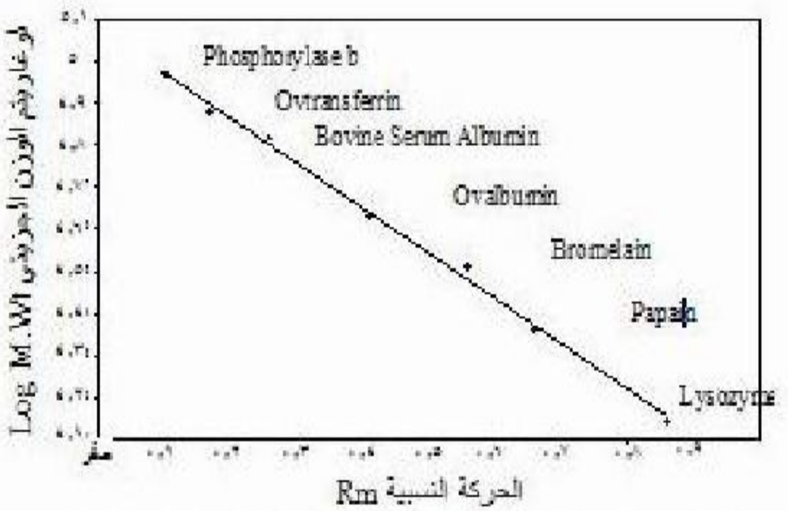
حددت مواقع الحزم البروتينية المفصولة وذلك برسم الهلام الناتج على ورقة بيضاء، اذ أعطى أبعاده الأصلية نفسها في الانبوب، بعدها قيست المسافة من السطح العلوي للهلام والذي يمثل نقطة انطلاق البروتينات الى موقع حزمة البرومو فينول الأزرق واستخرجت قيمة الحركة النسبية (Rm) حسب المعادلة:

$$Rm = \frac{\text{المسافة التي قطعها البروتين}}{\text{المسافة التي قطعتها الصبغة}}$$

ثم رسمت العلاقة بين قيم الحركة النسبية (Rm) ولوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المبينة في الجدول (1) والشكل (1)، بعدها استخرجت قيم (Rm) لبروتينات المايوفايبريل والساركوبلازما والبروتينات الذائبة بالملح وأسقطت على المنحنى القياسي Standard curve وحددت الأوزان الجزيئية للبروتينات المفصولة.

جدول (1). البروتينات القياسية المستخدمة وأوزانها الجزيئية.

البروتين	الوزن الجزيئي (دالتون)
Lysozyme	14000
Papain	23400
Bromelain	33000
Ovalbumin	43000
Bovine Serum Albumin	67000
Ovatransferrin	76000
Phosphorelase b	94400



شكل (1) المنحني القياسي للعلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية للبروتينات القياسية

النتائج والمناقشة

الترحيل الكهربائي لبروتينات المايوفايبريل:

يتضح من الشكل (2) أن بروتينات المايوفايبريل لأسماك الكارب والصبور أظهرت وجود 14 و 13 حزمة بروتينية على التوالي تباينت في شدة كثافتها في مناطق الهلام المختلفة، وقد تراوحت أوزانها الجزيئية - من أعلى الهلام وحتى أسفله - بين 112200-17400 دالتون لبروتينات سمك الكارب ، وبين 112200-18600 دالتون لبروتينات سمك الصبور، هذا فضلا عن وجود حزمة بروتينية على قمة الهلام لم تدخل مساماته بسبب كبر وزنها الجزيئي لكلا نوعي السمك.

في أعلى هلام سمك الكارب يلاحظ وجود حزمتين بروتينيتين، الاولى باهتة والثانية كثيفة لهما وزنان جزيئيان 112200 و 109600 دالتون على التوالي، وقد مثلت الحزمة الكثيفة احدى السلسلتين الثقيلتين للمايوسين، بينما في هلام سمك الصبور ظهرت حزمة كثيفة واحدة مثلت أيضا سلسلة المايوسين الثقيلة والتي كان وزنها الجزيئي 112200 دالتون.

في منتصف الهلام ظهرت حزمة كثيفة وزنها الجزيئي 40700 و 42700 دالتون لكل من بروتينات الكارب والصبور على التوالي وهي تمثل بروتين الأكتين. الحزمة التي تلت حزمة الأكتين مثلت بروتين التروبومايوسين والذي له وزن جزيئي 30200 و 29500 دالتون لكل من الكارب والصبور على التوالي.

نظرا لتقارب الأوزان الجزيئية لبروتينات التروبونينات (T و C , I) والسلاسل الثلاث الخفيفة للمايوسين (MLC-1 و MLC-2 و MLC-3) فان ما تبقى من الحزم البروتينية قد يمثل بعضا منها كلا على حدة ،أو أن هذه البروتينات مندمجة مع بعضها البعض في

هذه الحزم، وقد تراوحت أوزانها الجزيئية بين 17400-25100 دالتون لبروتينات سمك الكارب وبين 18600-25100 دالتون لبروتينات سمك الصبور، هذه النتائج جاءت مقاربة لنتائج فصل بروتينات سمك Turbot عند فصلها بالترحيل الكهربائي بطريقة SDS-PAGE (Focant *et al.*, 2000).

الترحيل الكهربائي لبروتينات الساركوبلازما:

يوضح الشكل (3) أن بروتينات الساركوبلازما لأسماك الكارب والصبور أظهرت وجود 15 و 9 حزم بروتينية لكل منهما، وهي أيضا متباينة في شدة كثافتها في مناطق الهلام المختلفة، تراوحت أوزانها الجزيئية - من أعلى الهلام الى أسفله - ما بين 97700-15100 دالتون لسمك الكارب وبين 17400-93300 دالتون لبروتينات سمك الصبور، مع وجود حزمة بروتينية على قمة هلام سمك الكارب فقط لم تدخل مسامات هذا الهلام بسبب كبر وزنها الجزيئي.

هذه الحزم تضم جميع بروتينات الساركوبلازما الرئيسية الذائبة بالماء المقطر فضلا عن مختلف أنواع البروتييزات والتي من ضمنها بعض الكاثبسينات، وكذلك البروتينات المقاومة للمعاملات الحرارية، البارڤالبومينات Parvalbumins، ذات الأوزان الجزيئية الواطئة.

يلاحظ أن عدد الحزم البروتينية المفصولة في حالة سمك الكارب أكبر مما في سمك الصبـور، وهذا التباين يؤكد وجود اختلافات واضحة في هذا النوع من البروتينات وبالتالي بين أنواع الأسماك، وهذه الاختلافات قد تعزى الى طبيعة معيشة كل نوع من الأسماك كنوع الغذاء، البيئة التي تعيش فيها وغير ذلك.

جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما أجري من تشخيص للبروتينات الذائبة بالماء لبعض أنواع الأسماك المسطحة، وذلك بعد فصلها باستخدام الترحيل الكهربائي ذي البعدين، والتي وصل عددها في بعض الأنواع الى 11 و 14 و 16 و 17 بروتيناً (Pineiro *et al.*, 1999).

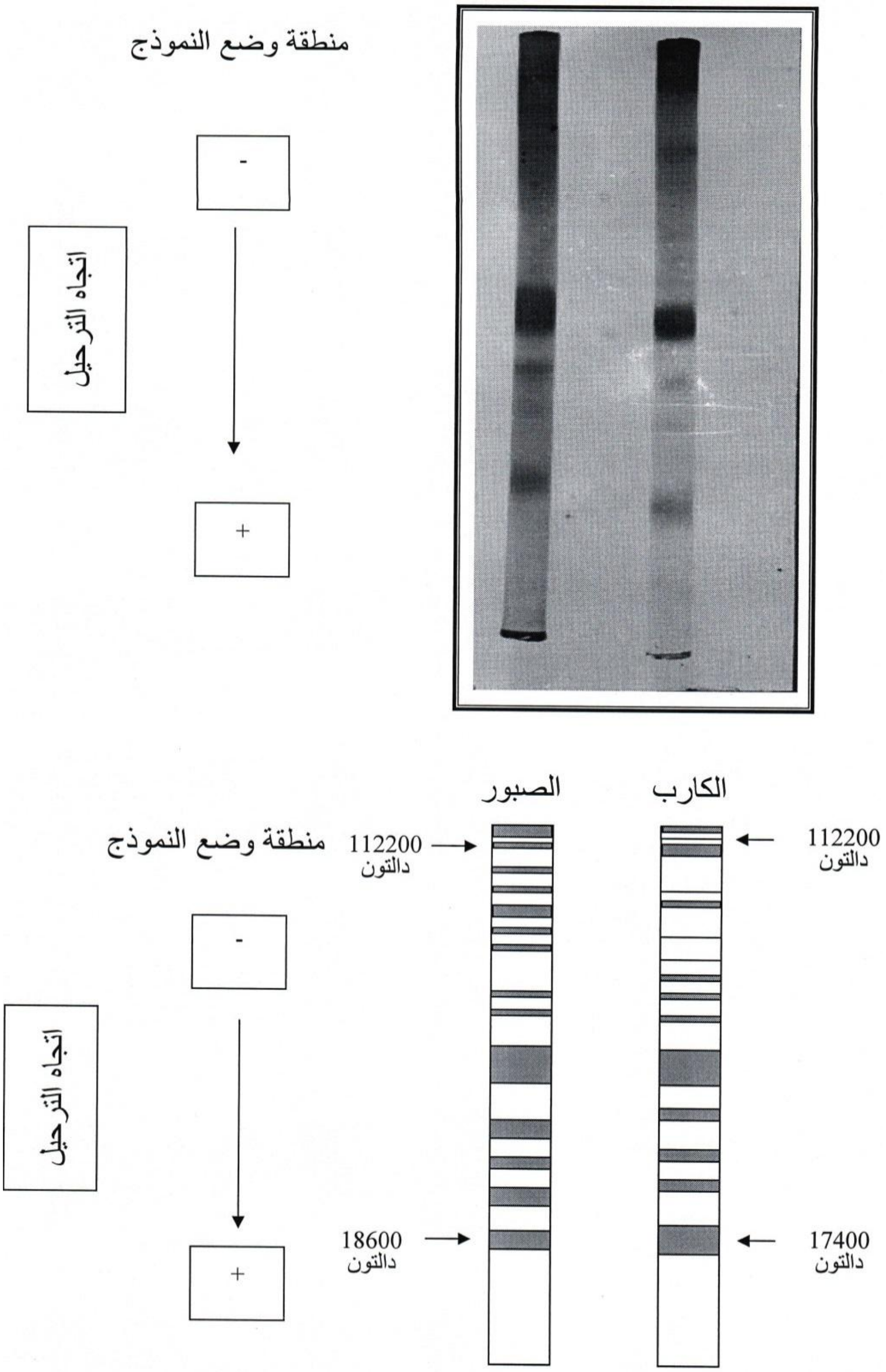
الترحيل الكهربائي للبروتينات الذائبة بالملح:

يتضح من الشكل (4) أن أسماك الكارب والصبور أظهرت وجود 15 و 6 حزم بروتينية لكل منهما على التوالي مثلت البروتينات الذائبة بالملح، وقد أظهرت اختلافاً في شدة كثافتها في مناطق الهلام.

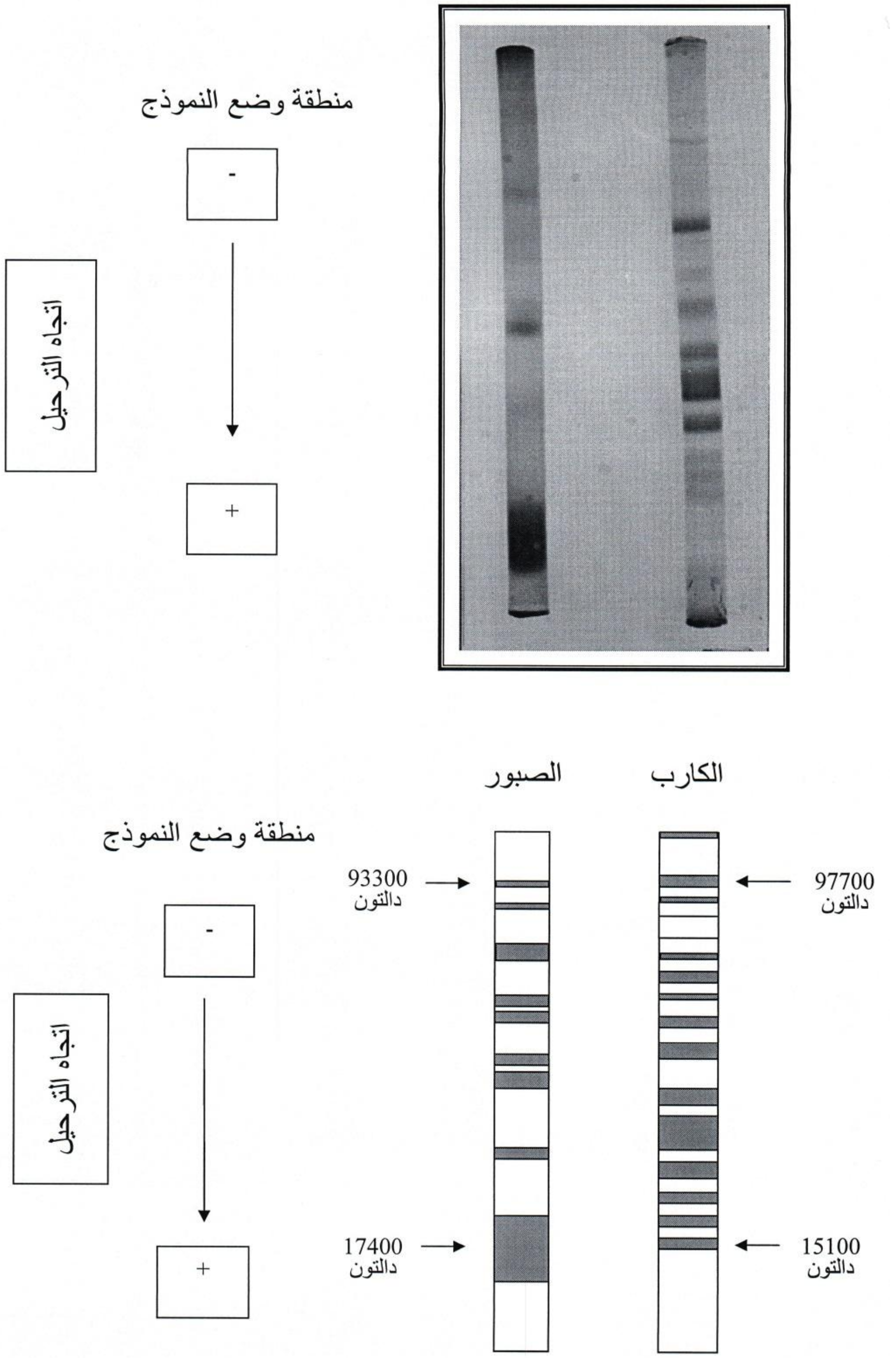
تراوحت أوزانها الجزيئية بين 12900-112200 دالتون في حالة سمك الكارب وبين 16200-74100 دالتون بالنسبة لسمك الصبور، مع وجود حزمة بروتينية على قمة هلام بروتينات كلا نوعي السمك، والتي لم تدخل مساماته بسبب كبر وزنها الجزيئي. وهذه الحزم البروتينية ضمت معظم بروتينات المايوفايبريل الرئيسية وبعض بروتينات الساركوبلازما الذائبة بالملح.

عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج الدراسات الأخرى، نجد أن مستخلص البروتينات الذائبة بالملح لسمك الكارب أعطى عددا من الحزم البروتينية أكبر مما أعطاه مستخلص البروتينات الذائبة بالملح لسمك الكود (Rodger *et al.*, 1980).

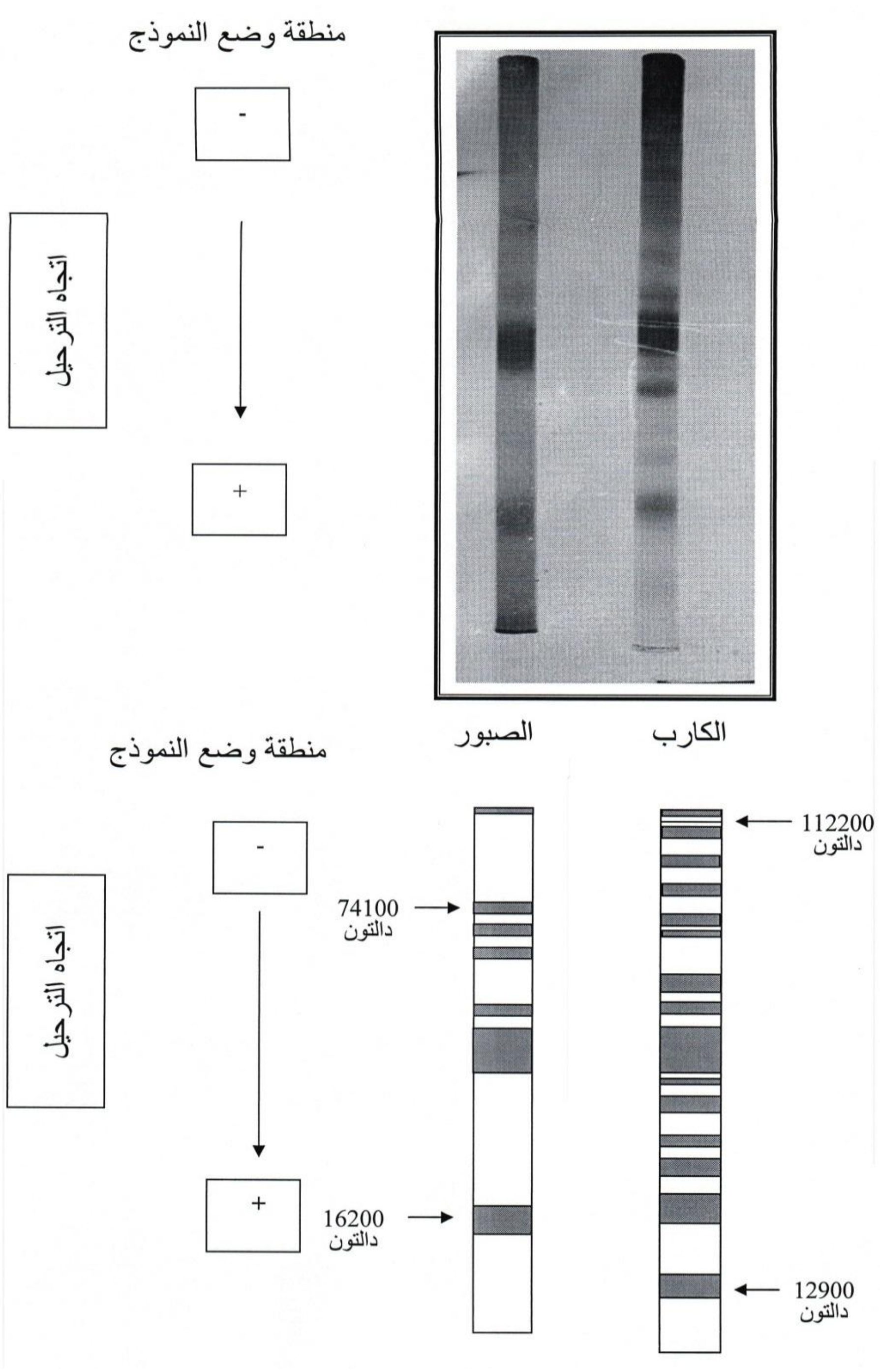
والجدول (2) يوضح أرقام وعدد الحزم المفصولة لبروتينات المايوفايبريل والساركوبلازما والبروتينات الذائبة بالملح و أوزانها الجزيئية مقدرة بالدالتون لكلا نوعي السمك.



شكل (2): الترحيل الكهربائي لبروتينات المايوفايبريل لأسماك الكارب والصبور بطريقة SDS-PAGE.



شكل (3): الترحيل الكهربائي لبروتينات الساركوبلازما لأسماك الكارب والصبور بطريقة SDS-PAGE.



شكل (4): الترحيل الكهربائي للبروتينات الذائبة بالملح لأسماك الكارب والصبور بطريقة SDS-PAGE.

جدول (2). الأوزان الجزيئية (دالتون) للحزم البروتينية المفصولة لأسماك الكارب والصبور.

رقم الحزمة	سمك الكارب			سمك الصبور		
	بروتينات المايوفايبريل	بروتينات الساركوبلازما	البروتينات الذائبة بالملح	بروتينات المايوفايبريل	بروتينات الساركوبلازما	البروتينات الذائبة بالملح
1	112200	97700	112200	112200	93300	74100
2	109600	87000	109600	97700	83200	67600
3	87000	79400	97700	89100	69200	58900
4	83200	70800	85100	83200	52500	74700
5	70800	66000	72400	72400	49000	40700
6	63000	58900	67600	67600	39800	16200
7	57500	53700	55000	56200	35500	-
8	53700	46800	47900	52500	24000	
9	46800	41700	42700	42700	17400	
10	40700	33100	33100	29500	-	
11	30200	28200	30200	25100		
12	25100	22400	25100	21400		
13	21900	19000	22400	18600		
14	17400	17000	18600	-		
15	-	15100	12900			

المصادر

الدهام، نجم قمر، 1977. أسماك العراق والخليج العربي. الجزء الأول. مطبعة الارشاد، بغداد، 395 ص.

الطائي، منير عبود جاسم، 1986. تكنولوجيا اللحوم والأسماك. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة جامعة البصرة، ص 130-368.

آل عبد النبي، شمائل عبد العالي صيوان والموسوي، ام البشر حميد جابر، 2011. فصل وتشخيص بروتينات اسماك الكارب *Cyprinus carpio* والصبور *Tenualosa ilisha* باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي. وقائع المؤتمر العالمي للتنمية وتداخلاتها مع التنوع الإحيائي بجنوب العراق، 12-14 كانون أول 2011.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1996. دراسة الجدوى الفنية والاقتصادية لانتاج الأعلاف السمكية من مصادر غير تقليدية ، ص 8-9 .

النور، ساجد سعد حسن، 1998. حياتية تكاثر الصبور (*Tenualosa ilisha* (Hamilton-Buchana في شط العرب والمياه الاقليمية العراقية. رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة البصرة، 164 ص.

Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Yman, I.M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. and Luten, J. 1999. A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing. Electrophoresis, 20: 1923-1933.

Focant, B., Collin, S., Vandewall, P. and Huriaux, F. 2000. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumins isoforms in white muscle of the developing turbot (*Scophthalmus maximus).* Basic Appl. Myol., 10(6): 269-278.

LeBlanc, E.L. and LeBlanc, R.J. 1989. Separation of Cod *(Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. J. Food Sci., 54(4): 827-834.

Mackie, I.M. 1990. Identifying species of fish. Analytical Proceedings, 27: 89-92.

Ohnishi, M. and Rodger, G.W. 1980. Analysis of salt-soluble protein fraction of cod muscle by gel filtration. In: Advances in Fish Science and Technology. J.J. Connell, ed. Fishing News Book, Ltd. Farnham, Surrey, England., pp: 422-428.

Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Sotelo, C.G. and Gallardo, J.M. 1999. The use of two-dimensional electrophoresis in the characterization of the water-soluble protein fraction on commercial flat fish species. Z. Lebensm Unters Forsch A., 208: 342-348.

Rodger, G., Weddel, R.B. and Craige, P. 1980. Effect of time, temperature, raw material type, processing and use of cryoprote-ctive agents on mince quality. In: Advances in Fish Science and Technology. J.J. Connell. Fishing News Book, Ltd. Farnham, Surrey, England, pp: 199-217.

Webar, K. and Osborn, M. 1975. Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate Molecular Weight Determination Polyacrylamide Gel and Related Procedure. In: The Proteins. Vol. 1, 3rd edition. Academic Press, New York.

Yman, I.M. 1992. Identifying fish species by IEF with PhastSystem. Application Note 379, PhastSystem, Pharmacia LKB biotechnology, Uppsala, Sweden, pp: 1-6.

Separation of Carp (*Cyprinus carpio*) and Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) proteins by electrophoresis method

A.E.H.J. Al-Mousawi and Sh.A.S. Al-Abdul-Nebi
College of Agriculture, University of Basrah, Basrah-I

Abstract - The muscular proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) and Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*), were separated by gel electrophoresis. The results showed that myofibrillar proteins of Common carp and Hilsa shad contained 14 and 13 bands respectively, their molecular weights ranged between 17400-112200 Dalton for Common carp and between 18600-112200 Dalton for Hilsa shad. For sarcoplasmic proteins, the results showed 15 bands, their molecular weights ranged between 115100-97700 Dalton for common carp, and 9 bands for Hilsa shad with molecular weights ranged between 17400-93300 Dalton. For salt- soluble proteins, the results showed 15 and 6 proteinic bands ,respectively, their molecular weights ranged between 12900-112200 Dalton for common carp, and between 16200-74100 Dalton for Hilsa shad. Moreover, there was presence of a band on the top of myofibrillar and salt-soluble proteins gel for both common carp and Hilsa shad, on other hand found only a band on the top of sarcoplasmic proteins gel of common carp, these bands didn’t enter the gel porous. All these bands were varied in their thickness along the gel.