

## دراسة مقارنة لبروتينات الليفات العضلية الهيكلية لبعض الأسماك البحرية

أ. هدى سالم الأصيل

د. إسماعيل محمد الهماي

كلية العلوم - جامعة مصراتة

أ.د. هدى شعبان القبلي\*

كلية البيئة والموارد المائية - جامعة مصراتة

\*elgubbi@sci.misuratau.edu.ly

تاريخ النشر 2023.09.03

تاريخ الاستلام 2023.08.26

### المخلص:

تناولت الدراسة الحالية أربعة أنواع من الأسماك العظمية تمثلت في أسماك المرجان (*Pagrus pagrus*)، والقزل (*Sparisoma cretense*)، والبطاطا (*Siganus rivulatus*)، والرزام المخطط (*Euthynnus alletteratus*). تم تحليل بروتينات الليفات العضلية لأسماك الدراسة باستخدام الترحيل الكهربائي (SDS-PAGE) بهلام متعدد أكريلاميد بجهاز الهجرة الكهربائية (Electrophoresis). تمت التحاليل بمركز البحوث الحيوية بكلية العلوم جامعة مصراتة. أظهرت نتائج الهجرة الكهربائية (SDS-PAGE) لبروتينات العضلات الهيكلية (الجانبية) تباينا في عدد القطع البروتينية، حيث كان عددها 14، و15، و16، و19 في أسماك *S. cretense*، و *P. pagrus*، و *E. alletteratus*، و *S. rivulatus* على التوالي. نستنتج إمكانية استخدام تحليل البروتين العضلي للأسماك كوسيلة تصنيفية من خلال تطابق حزم البروتين المفصولة بالهجرة الكهربائية.

الكلمات المفتاحية: أسماك، اكريلاميد، الليفات، بروتين، عضلات.

## The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscle of some marine fishes

Huda Alasefer, Esmail Mhamed Alhemmal  
Faculty of Science, Misurata University, Libya

Huda Shaaban Elgubbi

Faculty of Environmental Sciences and Natural Resources, Misurata  
University, Libya

### Abstract:

The current study was conducted four teleost species (*Pagrus pagrus*, *Sparisoma cretense*, *Siganus rivulatus* and *Euthynnus alletteratus*). Proteins of lateral muscles were estimated using electrophoresis on an acrylamide gel (SDS-PAGE) in the Biological Research Center (Faculty of science, Misurata university). The present study indicated that the electrophoresis analysis (SDS-PAGE) of skeletal muscles (lateral muscle) proteins showed there was a variation in the number of protein bands fishes were 14, 15, 16 and 19 in *S. cretense*, *P. pagrus*, *E. alletteratus* and *S. rivulatus* respectively. Furthermore, there were an affinity between the protein bands of *E. alletteratus* and *S. cretense*, then with *S. rivulatus*. On the other hand, the result showed that mismatch between with *P. pagrus*. The electrophoresis analysis of lateral muscle proteins revealed that SDS-PAGE can be can be a good tool in taxonomy.

**Key words:** Acrylamide, Fishes, Muscles, Myofibres, Protein, Troponin.

### 1. مقدمة:

تستخدم عدة تقنيات لفصل البروتين من الألياف العضلية في الأسماك، ومنها تقنية الترسيب الجزيئي لكبريتات الأمونيوم (ASFP) Ammonium sulfate fractional precipitation ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>04</sub>))، وهي واسعة الانتشار حيث تستخدم لعزل البروتينات القابلة للذوبان في الماء من أي نبات أو أصل حيواني (Brovko and Zagranchnaya, 1998). علاوة على ذلك، استخدمت تقنية Trichloroacetic acid (TCA) in acetone (TCA/acetone) التي تستخدم لترسيب أنواع مختلفة من بروتينات الثدييات والكائنات البحرية (Chan et al., 2005;

(Wang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). حيث تستخدم تقنية TCA/acetone وتستخدم هذه التقنية على نطاق واسع لترسيب بروتينات الأسماك (Wang *et al.*, 2013). عملية الترحيل الكهربائي للبروتين تستخدم لغرض تحديد عدد قطع البروتينات وأنواعها، وكذلك الوزن الجزيئي لها، كما أن هذه التقنية تعتمد على خاصيتين أساسيتين هما حجم الجزيئات وشحنتها (الحمداني وآخرون، 2016). لذا يعتبر الفصل الكهربائي للبروتينات تقنية فعالة لتوفير بيانات حول التركيب الكيميائي للبروتين العضلي (Jesslin *et al.*, 2013). تستخدم العديد من الأبحاث الترحيل الكهربائي باعتباره وسيلة لتحديد الاختلاف داخل النوع الواحد وبين أنواع الأسماك المختلفة، والتي قد تعكس مستوى التمثيل الغذائي للكائن الحي وتكيفاته للتقلبات البيئية وحالة التغذية المختلفة للأسماك وعاداتها (McDonald and Milligan, 1992). حيث يعتبر هلام الصوديوم دوديسيل كبريتات بولي أكريلاميد الرحلان الكهربائي sodium electrophoresis gel polyacrylamide sulfate dodecyl (SDS-PAGE)، عبارة عن تقنية تستخدم على نطاق واسع لفصل البروتينات وفقاً للترحيل الكهربائي في العديد من المجالات كالكيمياء الحيوية، وعلم الوراثة، والبيولوجيا الجزيئية التعرف على الشكل الخارجي لأسماك تعد أحد الوسائل لتحديد الأنواع، وحديثاً يستخدم الفصل الكهربائي لبروتينات الساركوبلازم وبروتينات المصل وبروتينات الكبد وعدد من الإنزيمات كوسيلة مساعدة في تحديد الأنواع السمكية (Miyazaki *et al.*, 1998; Pineiro *et al.*, 2001) حيث أعيد تصنيف عدد من الأسماك السمnan الطويل *Alburnus mossulensis* والسمnan العريض *Acanthobrama marmid* ونوع من أسماك *Hemiculter leucisculus* من قبل الفيصل وآخرون (2010) بالاعتماد على طريقة الترحيل الكهربائي للبروتينات العضلية (SDS-PAGE).

تعتمد طريقة الفصل باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي للبروتينات على انتقال الجزيئات البروتينية المشحونة خلال الهلام طبقاً لحجمها ولشحنتها أثناء مرور التيار الكهربائي، والتي تختلف تحت ظروف محددة من حيث كتلتها ومقدرتها على العبور خلال سطح الهلام المسامي. حيث يتعذر مرور الجزيئات الأكبر وزناً جزيئياً خلال مسامات الهلام الصغيرة، مما يعطي فصلاً إضافياً للجزيئات على أساس حجمها الجزيئي معززاً ميزة الترحيل الكهربائي باستخدام

هلام البولي أكريلاميد الذي يمتاز بأحجام مسامات مشابهة لأحجام البروتينات، ويساعد استعمال الأكريلاميد في إعطاء الهلام تركيباً مسامياً أكثر انفتاحاً (حنتوش، 1998). أظهر استخدم طريقة الترحيل الكهربائي لبروتينات ثلاث أنواع من الأسماك *Alburnus mossulensis* و *Acanthobrama marmid* و *H. leucisculus* وجود 5 حزم بروتينية للنوع الأول و 6 حزم للنوع الثاني و 7 حزم للنوع الثالث (الفصل وآخرون، 2010). كما أظهر تحليل البروتينات القابلة للذوبان لعضلات نوعين من الأسماك بواسطة SDS-PAGE تباين في مجتوى البروتين حيث تميزت أسماك *Amblypharyngodon mola* بمحتوى أعلى من البروتين (6.91 مجم/جم)، في حين كان محتوى البروتين منخفض في أسماك *Channa punctatus* (1.90 مجم/جرام). كما أكدت نفس الدراسة إلى إمكانية استخدام طريقة SDS PAGE لفصل بروتينات العضلات في الحيوانات المائية وتصنيفها (Bera et al., 2018). هدفت الدراسة الحالية لمعرفة التركيبات البروتينات الليفية العضلية الهيكلية غير معروفة لأنواع من الأسماك المحلية، وذلك من خلال تحديد حزم البروتينات العضلية ونسبها ومعرفة العلاقة بين الأنواع المستخدمة في هذه الدراسة.

## 2. المواد وطرق العمل:

### 1.2 منطقة الدراسة:

تقع منطقة مصراتة في شمال غرب ليبيا، عند الأطراف الشمالية الغربية لخليج سرت، وإلى الشرق من مدينة طرابلس بحوالي 210 كم، ويحدها البحر المتوسط من جهتي الشمال والشرق، ما جعلها تتميز بواجهتين بحريتين، يبلغ طول الساحل البحري حوالي 130 كم (الشركسي وبومدينة، 2010).

### 2.2 عينات الدراسة:

جمعت عينات الأسماك (جدول 1) خلال شهري أكتوبر - نوفمبر 2021 وبواقع 5 أسماك من كل نوع، ونقلت في أكياس بولي إيثيلين داخل حاوية يدوية مغطاة بالتلج للحفاظ على سلامة أنسجتها لحين وصولها إلى معمل قسم الأحياء، شعبة علم الحيوان بكلية العلوم بجامعة مصراتة. صنفت الأسماك اعتماداً على (Fishbase (2023) وقاسم وآخرون (2009)، وتم إجراء القياسات المطلوبة ووزنت الأسماك باستخدام ميزان رقمي (جدول 2). أخذت العضلات البيضاء

من الجزء الأمامي الجانبي، وأزيلت آثار العضلات الملونة بعناية، وأخذ وزن 1 جم من النسيج العضلي وحفظ في قناني بلاستيكية معقمة، مع كتابة البيانات الخاصة بكل سمكة ورقمت الحافظات (containers) بشكل متسلسل وحفظت في درجة حرارة -20م°، لحين استخدامها لدراسة البروتينات الرئيسية.

جدول (1) متوسط الطول القياسي والوزن بالجرام لعينات الدراسة (المتوسط ± الخطأ المعياري)

| المتوسط ± الخطأ المعياري              |                              | الاسم العلمي<br>Scientific Name |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| الطول القياسي<br>Standard Length (cm) | الوزن بالجرام<br>Weight (gr) |                                 |
| 3.40±14.9000                          | 7.00±91.82                   | <i>P. pagrus</i>                |
| 7.81±16.1000                          | 21.12±118.66                 | <i>S. cretense</i>              |
| 1.04±19.6600                          | 26.88±213.94                 | <i>S. rivulatus</i>             |
| 1.13±33.6200                          | 60.96±693.82                 | <i>E. alletteratus</i>          |

### 3.2 ترسيب البروتينات:

لترسيب بكرياتات الأمونيوم (Ammonium sulfate): تم وزن 1 جم من العينة (النسيج العضلي لأسماك الدراسة)، وتم طحن، كذلك وزن 6 جم من كبريتات الأمونيوم وأضيف لها 10 مل من الماء المقطر. أضيف محلول كبريتات الأمونيوم 60% على مستخلص السمكة، ثم رجبت العينة بجهاز vortex لمدة دقيقتين. نقلت العينة لجهاز الطرد المركزي لمدة ربع ساعة عند سرعه 4000 rpm. تم التخلص من الراشح والاحتفاظ بالراسب. أضيف 2 مل من الماء المنزوع الأيونات (DDH<sub>2</sub>O) للراسب. رجبت العينة بجهاز vortex لمدة دقيقتين، ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق عند سرعه 3000 rpm، وكررت هذه العملية مرتين، وتم التخلص من الراشح (DDH<sub>2</sub>O) ووضع الراسب في جفنة ثم وزنت بعد التجفيف. لترسيب البروتينات باستخدام تقنية Tichloroacetic Acid (TCA/acetone)، حيث تم وزن العينة بمقدار 1 جم وطحنت، وأضيف لها 10 مل من الماء المقطر. وضعت في أنابيب خاصه ثم رجبت العينة بجهاز vortex لمدة دقيقتين، ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند سرعه 4000 rpm. أخذ الراشح وتم التخلص من الراسب، ثم خلط الأسيتون المتلجج مع (TCA) بنسبة 1 جم في 10 مل من الأسيتون. قسم الراشح إلى 6 أنابيب

وأضيف له مخلوط الأسيتون و(TCA). وضعت الأنابيب في مبرد لمدة 24 ساعة. نقلت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة ربع ساعة عند سرعة 3000 rpm. أهمل الراشح وأحتفظ بالراسب ثم وضع في جفنة ووزنت ثم وزنت بعد التجفيف (Rinaldi, 2023).

### 3.2 التقدير الكمي للبروتين (اختبار النقاوة):

تم تقدير البروتين وذلك بتجهيز المستخلص البروتيني حيث وضع 1 جم من البروتين المرسل في أنبوبة اختبار وأضيف لها 5 مل من الماء المقطر، ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق عند سرعه 3000 rpm، ثم وضعت في جهاز Vortex لمدة دقيقة. نقلت العينة مرة أخرى لجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق عند سرعة 10000 rpm. وضع حوالي 2 ميكرون من المستخلص في الجهاز وقيس البروتين على طول موجي nm280/260، وقدرت كمية البروتين بالمليجرام على الملليتر.

### 4.2 الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلاميد لبروتينات الألياف العضلية:

أتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلاميد في فصل البروتين، وذلك حسب ما ذكره (Laemmli, 1970). أستخدم محلول الاكريلاميد المركز solution Acrylamide stock، وكذلك محلول فوق كبريتات الأمونيوم Ammonium per sulfate (APS)، ومحلول Sodium dodecyl sulfate (SDS) (10%)، بالإضافة لمحلول التثبيت، ومحلول الصبغ Staining Solution (0.1%)، ومحلول إزالة الصبغة Distaining Solution، ومحلول الحفظ preserving solution، ومحلول صبغة بروموفينول الأزرق Solution Broom phenol blue 0.25% ومحلول العينات.

تم تحضير الهلام (الجل) تركيز 15%: بإضافة 10 مل من الماء المقطر، 5 مل من محلول هلام الفصل، و 4.8 مل من محلول الأكريلاميد المركز، 2 مل من محلول فوق أكسيد الأمونيوم، 10 مل SDS و 10 ميكرون من TAMED. ثم ملئ المستودع Chamber المتكون من قطعتين زجاجيتين بأبعاد 10X10 ملم بواسطة محلول الهلام أو الجل، مزجت المكونات السابقة وسكبت مباشرة بواسطة محقنة ذات سعة 10 مل بين القطعتين الزجاجيتين وبناية خاصة لمنع تكون الفقاعات الهوائية، وبعد اكمال التصلب بحدود (10-15) دقيقة وضع المشط وترك لحين اكتمال التصلب لجل الفصل، تم رفع المشط بعناية لمنع حدوث التشوه

في الحفر المتكونة وتم حقن العينات بواسطة محقنة دقيقة قياس 30 ميكرون. أضيف المحلول المنظم للأقطاب (الداخلي والخارجي) ووضع الغطاء الخارجي للجهاز، وتم تشغيل المنظم الكهربائي على 100 فولت و 16 ملي أمبير وعند وصول الصبغة إلى نهاية الهلام تم قطع التيار الكهربائي (Garfin, 1990).

### 5.2 نزع الهلام:

تم نزع الهلام بين لوحى الزجاج وبعناية لتجنب تمزق الهلام وتم نقل الهلام إلى حوض التثبيت لحين ظهور الحزم باللون الأصفر ثم نقل لمحلول الصبغ وترك لمدة ساعة. أزيلت الصبغة عن الجل (الهلام) بوضعه في محلول إزالة الصبغ، ويتم استبدال محلول إزالة الصبغة كل نصف ساعة لحين ظهور الحزم باللون الأزرق. تم حساب الحركة النسبية Relative mobility الحركة النسبية (Rm) = المسافة التي قطعتها البروتين/المسافة التي قطعتها الصبغة في كل العينة. كما استخدام برنامج الكمبيوتر image-j لتحليل قياس كثافة حزم البروتين، وتم إيجاد معامل الارتباط باستخدام برنامج الارتباط Pearson correlation ومخطط Dendrogram (Mardigian and Taranto, 2001).

### 3. التحليل الإحصائي:

استخدم في هذه الدراسة برنامج Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) الإصدار 24. للتأكيد على درجة التقارب والارتباط بين العوامل قيد الدراسة وأنواع الأسماك طبق التحليل الإحصائي العنقودي الهرمي (Hierarchical cluster analysis). لمعرفة مدى الارتباط بين بروتينات الأسماك المدروسة، والعلاقة مع البروتينات والمعادن الأساسية استخدام تحليل Two step cluster. كما اعتبرت قيمة P أقل من 0.05 ذات دلالة إحصائية ( $P > 0.05$ ).

### 4. النتائج:

#### 1.4 ترسيب البروتينات:

تشير نتائج هذه الدراسة إلى وجود تفاوت بين قدرة المذيبات المستخدمة في ترسيب بروتينات أسماك الدراسة. حيث أظهرت النتائج الحالية أن قدرة كبريتات الأمونيوم (Ammonium Sulfate) في ترسيب واستخلاص البروتينات أعلى من المذيب TCA/Actone التي حقنت في

هلام الأكريلاميد. حيث تم الحصول على عدد أكبر من البروتينات بالمقارنة من عدد البروتينات الأقل الناتجة من استخدام TCA|Actone (جدول 2).

تبيّن النتائج (جدول 2) بأن نسبة (%) كمية البروتينات باستخدام TCA/Acetone كانت لأسماك القزل أعلى بنسبة 2.48%، تلتها أسماك البطاطا بنسبة 1.5%، ثم أسماك المرجان بنسبة 1.4% وكانت نسبة البروتينات لأسماك الرزاق 0.16%. بينما كانت نسبة ترسيب البروتينات بواسطة كبريتات الامونيوم أعلى في عضلات أسماك البطاطا والرزاق (11.04% و 10.4% على التوالي) (جدول 2)، وأقل نسبة سجلت لأسماك القزل والمرجان (2.06% و 1.44% على التوالي). حيث نلاحظ من النتائج السابقة التفاوت بين قدرة المذيبات المستخدمة في ترسيب بروتينات أسماك الدراسة، وذلك بالمقارنة بين الطريقتين المستخدمتين في الترسيب.

أظهر التحليل الإحصائي Two step cluster نسبة التقارب بين أنواع الأسماك المدروسة عن طريق نسبة البروتينات في عضلات أسماك الدراسة (المرجان، والقزل، والبطاطا، والرزاق) باستخدام كبريتات الألومنيوم، وجود مجموعتين تضم كل منهما نوعين من أنواع أسماك الدراسة الحالية، حيث كانت العلاقة قوية بين أسماك المجموعة الأولى والمتمثلة في أسماك البطاطا والقزل بدرجة تطابق عالية (99%)، وصنفت كمجموعة رئيسية. كما ضمت هذه المجموعة أسماك القزل والرزاق وكانت درجة التطابق أقل (82%) وصنفت كمجموعة ثانوية، بينما شملت المجموعة الثانية أسماك المرجان وكانت نسبة الارتباط بينها وبين الأنواع المدروسة الأخرى لا تتجاوز 20% (شكل 1).

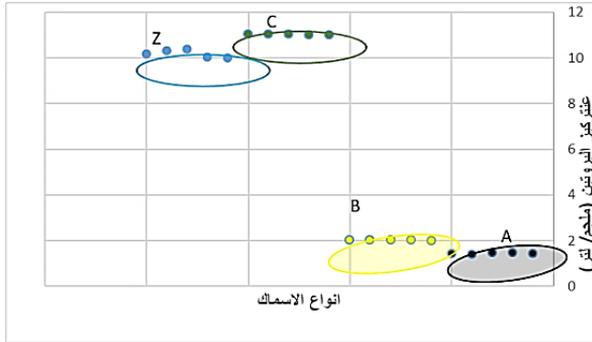
جدول (2) كمية البروتينات لأسماك الدراسة المترسبة بواسطة كبريتات الأمونيوم

#### TCA/Acetone و

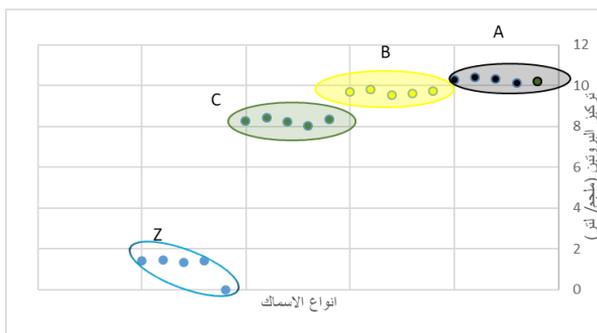
| كمية البروتينات بالمليجرام/جرام وزن رطب |                   | أنواع الأسماك |
|---|-------------------|---------------|
| TCA/Acetone                             | كبريتات الأمونيوم |               |
| 10.2 (1.4%)                             | 1.44 (1%)         | المرجان       |
| 9.7 (2.48%)                             | 2.06 (0.003%)     | القزل         |
| 8.33 (1.5%)                             | 11.04 (3.9%)      | البطاطا       |
| 1.4 (0.16%)                             | 10.4 (4.16%)      | الرزاق        |

لوحظ من خلال شكل (1) أن نسبة البروتينات المترسبة لعضلات أسماك المرجان والقزل كانت قليلة بالمقارنة مع نسبتها المترسبة الأكبر لبروتينات عضلات أسماك البطاطا والرزام. كما أن معامل الارتباط بين الأسماك وبروتينات عضلاتها كان مرتفع (0.86) مما دل على وجود ارتباط طردي قوي وبمستوى معنوية عالي ( $P < 0.001$ ).

هناك مجموعتان من الأسماك حسب طريقة الترسيب (TCA/Actone)، تضم الأولى ثلاث أنواع متمثلة في أسماك المرجان والقزل وأسماك البطاطا، وذلك لوجود علاقة قوية بين الأسماك ونسب بروتيناتها العضلية. بينما ضمت المجموعة الثانية نوع وحيد من أسماك الدراسة تمثل في أسماك الرزام والتي كانت نسب تركيز بروتيناتها العضلية مختلفة بشكل كبير عن المجموعة الأولى من الأسماك (شكل 2). كانت نسبة البروتينات المترسبة في أسماك المرجان والقزل والبطاطا عالية، بينما كانت منخفضة في أسماك الرزام. كما تشير قيمة معامل الارتباط (0.87) بين الأسماك والبروتينات المترسبة بدلالة معنوية عالية ( $P < 0.001$ ).



شكل (1) مجاميع أسماك الدراسة حسب التقارب في نسبة تركيز البروتينات بطريقة كبريتات الألومنيوم (protein AS). أسماك المرجان (A)، أسماك القزل (B)، أسماك البطاطا (C)، أسماك الرزام (Z)



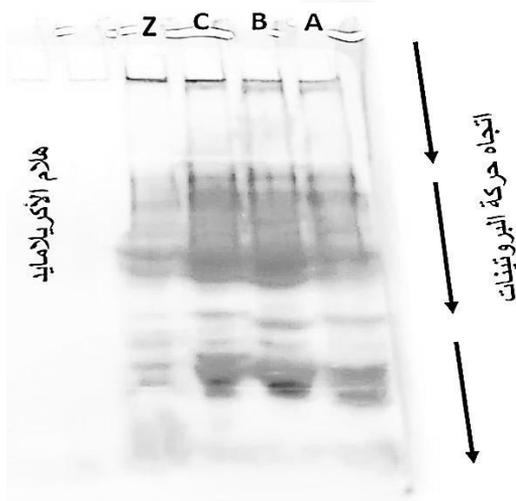
شكل (2) مجاميع أسماك الدراسة حسب التقارب في نسبة تركيز البروتينات بطريقة كيريتات الألومنيوم (TCA/ Actone). أسماك المرجان (A)، أسماك القزل (B)، أسماك البطاطا (C)، أسماك الرزام (Z)

#### 2.4 فصل البروتينات:

تميزت بروتينات العضلات الجانبية على هلام الأكريلاميد لأسماك القزل (*S. cretense*) باحتواء نسيجها العضلي على 14 حزمة بروتينية، بينما كانت 15 حزمة بروتينية لأسماك المرجان (*P. pagrus*) و 16 حزمة بروتينية لسماك الرزام (*E. alletteratus*)، في حين بلغ عدد الحزم البروتينية 19 حزمة لأسماك البطاطا (*S. rivulatus*) (جدول 3، شكل 3)، كما ظهرت وجود ارتباطات موجبة مع بعض الأسماك على هلام الأكريلاميد، وذلك من خلال العلاقة بين أسماك القزل والبطاطا، وأيضاً بين سمكة القزل والرزام. أشارت النتائج الحالية لتقارب أسماك البطاطا والرزام، وأيضاً أسماك الرزام والمرجان، في حين كان هناك مستويات ارتباطات سالبة مع بعض الأسماك.

#### 3.4 امتصاصية الحزم وقيم Rf:

نتائج تحليل قيم الامتصاصية اللون للحزم المفصولة باستخدام برنامج IMAGE J soft were (جدول 3) حيث تظهر المسافة التي قطعتها الحزم في الجل خلال عملية الترحيل الكهربائي. حيث لوحظ وجود تقارب في الامتصاصية للحزم لأسماك البطاطا والقزل وكذلك الرزام، بينما كانت نتائج الامتصاصية اللون أقل تطابق مع أسماك المرجان.



شكل (3) حزم البروتينات العضلية لأسماك الدراسة على هلام الأكريلاميد. A: أسماك المرجان *P. pagrus*، B: أسماك القزل *S. cretense*، C: أسماك البطاطا *S. rivulatus*، Z: أسماك الرزاق *E. alletteratus*

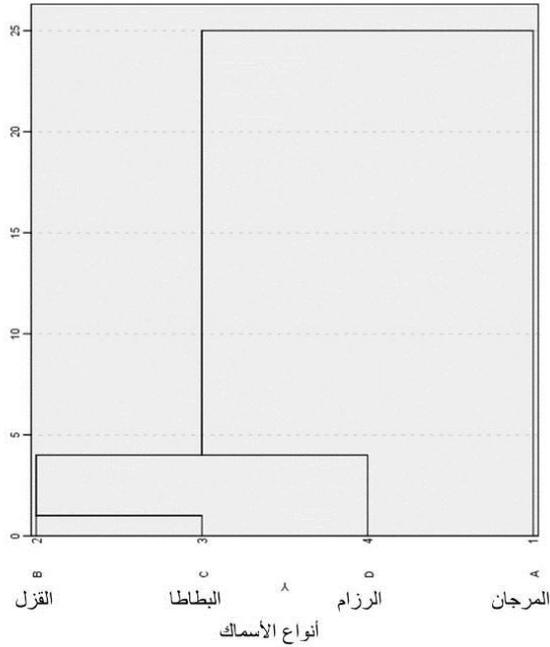
جدول (3) عدد الحزم البروتينية مرتبة حسب قيمة RF لأسماك الدراسة

| أنواع الأسماك          |                     |                    |                  | عدد الحزم |
|------------------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------|
| <i>E. alletteratus</i> | <i>S. rivulatus</i> | <i>S. cretense</i> | <i>P. pagrus</i> |           |
| 0.07                   | 0.08                | 0.06               | 0.04             | 1         |
| 0.10                   | 0.13                | 0.12               | 0.10             | 2         |
| 0.12                   | 0.15                | 0.15               | 0.12             | 3         |
| 0.16                   | 0.18                | 0.21               | 0.23             | 4         |
| 0.20                   | 0.21                | 0.33               | 0.32             | 5         |
| 0.23                   | 0.31                | 0.40               | 0.35             | 6         |
| 0.25                   | 0.35                | 0.42               | 0.37             | 7         |
| 0.32                   | 0.39                | 0.45               | 0.39             | 8         |
| 0.36                   | 0.40                | 0.49               | 0.41             | 9         |
| 0.40                   | 0.42                | 0.53               | 0.52             | 10        |
| 0.41                   | 0.44                | 0.60               | 0.59             | 11        |
| 0.50                   | 0.50                | 0.63               | 0.66             | 12        |

|      |      |      |      |    |
|------|------|------|------|----|
| 0.56 | 0.54 | 0.73 | 0.69 | 13 |
| 0.60 | 0.56 | 0.80 | 0.74 | 14 |
| 0.65 | 0.59 |      | 0.76 | 15 |
| 0.70 | 0.61 |      |      | 16 |
|      | 0.71 |      |      | 17 |
|      | 0.74 |      |      | 18 |
|      | 0.83 |      |      | 19 |

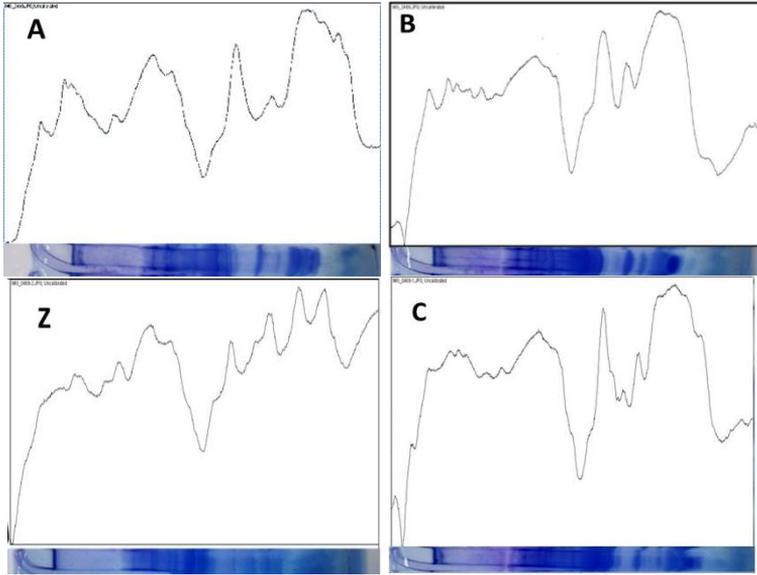
هناك تباين في قيمة RF للمسافة التي قطعها الحزم على الجل أثناء عملية الترحيل الكهربائي، وهناك تطابق بين أسماك البطاطا والقرزل في ثلاث مواقع (0.15 و 0.2166 و 0.425)، ويوجد تطابق في قيمة RF بين قيم أسماك البطاطا والرزام وكذلك بين أسماك القرزل والرزام في موقع واحد (0.5666 و 0.125 على التوالي). على العكس تبين من خلال قيم RF عدم وجود أي تطابق في المسافة التي قطعتها الحزم البروتينية على هلام الأكريلاميد لأسماك المرجان مع الأنواع الأخرى من أسماك الدراسة الحالية (جدول 3).

شكل (4) الذي استخدم التحليل الإحصائي العنقودي الهرمي ( Hierarchical cluster analysis) يشير لوجود تشابه بين بروتينات أسماك الدراسة المشخصة باستخدام طريقة SDS-PAGE، حيث يظهر الشكل (4) وجود مجموعتين رئيسيتين تضم المجموعة الأولى أسماك *A* (*P. pagrus*) فقط، بينما تضم المجموعة الثانية ثلاث أنواع من أسماك الدراسة ممثلة في أسماك المجموعة *B* (*S. cretense*)، والمجموعة *C* (*S. rivulatus*)، إضافة للمجموعة *Z* (*E. alletteratus*). كما لوحظ وجود تقارب وثيق بين أسماك المجموعة *B* و *C* (شكل 4)، بينما كانت أقل تقارب (بنسبة أقل) بين بروتينات عضلات أسماك *B* و *Z*، في حين كانت أسماك المجموعة *A* ضمن مجموعة مستقلة لعدم تقارب بروتيناتها مع أنواع أسماك الدراسة.



شكل (4) التحليل العنقودي لدرجة التشابه بين بروتينات أسماك الدراسة A: *P. pagrus*، B: *S. cretense*، C: *S. rivulatus*، D: *E. alletteratus*

يظهر الرسم البياني (شكل، 5) اختلاف كثافة الحزم البروتين الناتجة من تحليل الترحيل الكهربائي لبروتينات العضلات الجانبية لأسماك الدراسة الحالية، حيث نلاحظ التباين في شدة امتصاص البروتينات حسب الوزن الجزيئي للحزم، إذ تظهر مناطق عالية وأخرى منخفضة على الجل المستخدم في فصل بروتينات عضلات الأسماك المدروسة. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وفحص الامتصاصية للحزم في هلام الجل أن أسماك البطاطا والقرنل لهما درجة تقارب أكبر يليها الرزام، بينما أظهر نفس الفحص اختلافاً كبيراً لأسماك الدراسة مع أسماك المرجان.



شكل (5) يوضح تحليل امتصاص الجل باستعمال برنامج image-z وعدد الحزم البروتينية لأسماك الدراسة (A: *P. pagrus*، B: *S. cretense*، C: *S. rivulatus*، Z: *E. alletteratus*)

## 5. المناقشة:

### 1.5 ترسيب البروتينات:

استخدم في ترسيب البروتينات ملح كبريتات الأمونيوم كما استخدم TCA/Acetone، وذلك بغرض الحصول على أكبر كمية من البروتين المرسل وكذلك تمت للمفاضلة بين أنواع المرسلات المستخدمة في هذه الدراسة. اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما أشارت إليه الدراسات بأن طريقة TCA/Acetone (Trichloroacetic/Acetone) كانت الأفضل لاستخدامها لترسيب البروتين، حيث أكدت نتائج الدراسة الحالية أن كمية البروتينات المترسبة من النسيج العضلي للأسماك بواسطة TCA/Acetone يفوق تلك المرسبة بواسطة كبريتات الأمونيوم (Luís *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2018).

يرجع السبب إلى أن كبريتات الأمونيوم أنها تعمل على ترسيب البروتين يمكن للبروتين المرسل أن يتم إعادة إذابته، وذلك بالتخلص من كبريتات الأمونيوم بتعريض البروتين لعملية غسيل تم يعاد إذابة البروتين المرسل. كما أن البروتينات المترسبة بهذه الطريقة لا تتعرض

لعملية الدنترة أو التحلل، وهي من أهم مميزات استخدام مادة كبريتات الأمونيوم في عملية الترسيب (Wingfield, 2001). أما انخفاض كمية البروتين الذائبة باستخدام TCA/Acetone فهو قد يرجع لصعوبة إذابة البروتين أو إلى تعرضه للتحلل وبالتالي تقل كميته وهذا يتفق مع ما ذكره (Harder *et al.*, 1999) أن فقد البروتين هو نتيجة حتمية لترسيب المذبيبات.

### 2.5 الارتباط والتقارب بين أسماك الدراسة:

أكدت نتائج التحليل الإحصائي أن سمكة البطاطا والرزام يحتويان على تركيز عالي من البروتين الذائب (المرسب بواسطة كبريتات الأمونيوم)، وتتشابه أسماك المرجان والقزل باحتوائهما على تركيز أقل من البروتينات الذائبة وقد يرجح السبب في ذلك لنوع البروتينات الموجودة في الأسماك، فمن المعروف أن البروتينات إما أن تكون ليفية وهذه يصعب ذوبانها في الماء أو كروية ذات الوزن الجزيئي منخفض وتكون سهلة الذوبان في الماء. علاوة على ذلك يمكن أن يرجح سبب الاختلاف إلى قطبية البروتينات فالبروتينات القطبية محبة للماء وتذوب به أما اللاقطبية فهي كارهة للماء وتكون شحيحة الذوبان فيه (Pace *et al.*, 2004).

تؤكد نتائج التحليل الإحصائي وجود تشابه في تركيز البروتينات حيث اتضح وجود ثلاثة مجاميع متقاربة من الأسماك طبقاً لتركيز البروتينات الذائبة والمترسبة بواسطة TCA/Acetone وتشمل هذه الأسماك المرجان والقزل والبطاطا، بينما أسماك الرزام احتوت على أقل تركيز للبروتينات الذائبة. حيث يرجع ذلك لنوع البروتينات وطبيعة المادة المترسبة التي تلعب دوراً في تحديد تركيز البروتين. أيضاً يعلل انخفاض تركيز البروتينات في أسماك الرزام لكونها تعرضت للدنترة وأثر على كميته ومما يؤكد ذلك أن كمية البروتين التي رسبت بواسطة كبريتات الأمونيوم لنفس النوع من الأسماك كانت عالية بالمقارنة مع كمية الترسيب الناتجة عن TCA/Acetone (Harder *et al.*, 1999).

### 3.5 فصل البروتينات:

نتائج الترحيل الكهربائي لبروتينات الليفات العضلية لأسماك الدراسة تؤكد على وجود اختلافات واضحة في حركتها على هلام SDS-PAGE باستخدام مذيبين لتحديد كفاءتها في استخلاص البروتينات وكانت النتيجة أن كبريتات الأمونيوم (Ammonium sulphate) أكثر

كفاءة في استخلاص البروتينات من استخلاص البروتينات باستخدام طريقة الترسيب باستخدام TCA/Aceton. النتيجة السابقة اتفقت مع نتائج (Jiang *et al.* (2004) التي أشارت إلى قدرة كبريتات الألمونيوم على استخلاص البروتينات بكفاءة، كما اتفقت مع ما توصل إليه (2020) Kwok *et al.* عند دراسة بروتينات أسماك الميداكا البحرية (*Oryzias melastigma*) في عدم كفاءة الاستخلاص باستخدام TCA/Aceton. وترجع كفاءة لكون SDS لكونه يعمل على دنتر البروتينات (Denaturation) بفتح سلاسل أحماضها الأمينية وجعلها مستقيمة الشكل بالإضافة لإعطائها شحنة سالبة للبروتينات وإزالة تأثير أي مجموعة مشحونة ضمن البروتين (الفصل وآخرون، 2010).

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلاميد وجود تباين بين عدد حزمة بروتينية الأنواع السمكية المدروسة، حيث أظهرت النتائج وجود 15 حزمة بروتينية بالنسبة لأسماك المرجان و14 حزمة بروتينية لأسماك القزل و19 حزمة بروتينية لأسماك البطاطا و16 حزمة بروتينية لأسماك الرزاق. اتفقت الدراسة الحالية مع العديد من الدراسات التي استخدمت هلام SDS-PAGE كما في دراسة (Ajayi *et al.* (2018) و (Haniffa *et al.* (2017)، و (Dekić *et al.* (2016). الترحيل الكهربائي للهلام بالكهرباء دوديسيل كبريتات الصوديوم (SDS-PAGE) هو تقنية بيولوجية جزيئية يتم فيها فصل البروتينات وفقاً لوزنها الجزيئي، حيث أنها تقنية فعالة مستخدمة لدراسة الاختلاف بين الأنواع وتوضيح مستوى التمثيل الغذائي في الأسماك (Muhammada *et al.*, 2018). كما أن محمد وآخرون (2012) ذكر أن انتقال جزيئات البروتين المشحونة خلال هلام الفصل يقع تحت تأثير الحجم والشحنة حال مرور التيار الكهربائي لذا فإن البروتينات تتفاوت في حركتها ودرجة مرورها من خلال مسامات هلام الفصل. نتائج الترحيل الكهربائي لبروتينات عضلات أسماك الدراسة الحالية تبين وجود فرق في عدد الحزم للبروتينات مما يرجح وجود اختلاف في المحتوى البروتيني لهذه الأسماك وبالتالي فهي تعتبر تقنية فعالة تستخدم لدراسة الاختلاف بين الأنواع المدروسة (محمد وآخرون، 2012). أكدت نتائج التحليل الإحصائي العنقودي الهرمي (Hierarchical cluster analysis)، استناداً على حركة البروتين في هلام الجل (RF) فقد قسمت الأسماك إلى مجموعتين، المجموعة الأولى تضم أسماك البطاطا والقزل وصنفت كمجموعة رئيسية كما ضمت هذه

المجموعة أسماك القزل والرزام وكانت درجة التطابق أقل وصنفت كمجموعة ثانوية. أما المجموعة الثانية فقد شملت أسماك المرجان وكانت نسبة ارتباطها مع الأنواع المدروسة الأخرى ضعيفة. لذا وفقاً لاختبار التقارب يمكن استخدام فصل البروتين بالترحيل الكهربائي بالإضافة لقياس امتصاصية البروتينات لتصنيف الأنواع. حيث يشير إلى اختلاف طبيعة البروتينات التي تحتويها هذه الأسماك.

نتائج الفصل الخاصة بالبروتين بواسطة SDS-PAGES والتي اعتمدت على خاصية الحركة للبروتين داخل الهلام، وكذلك على وزنه الجزيئي، تشير لإمكانية الاعتماد على هذه الطريقة لمعرفة درجة التقارب بين الأنواع. تتفق هذه النتيجة مع ما ذكره Focant *et al.* (1981) و Pineiro *et al.* (2001). كما أكدت دراسة Yilmaz *et al.* (2005) أن استخدام طريقة الفصل للبروتينات بواسطة SDS-PAGE وجدت اختلاف بين عدد الحزم البروتينية بين نوعين من الأسماك (*Orthriasinsignis euphraticus* و *Cyprinion macrostomus*). التباين بين المحتوى البروتيني لعضلات الأسماك يرجع للاختلافات في الأنواع والأجناس والمواسم وكذلك لنوع الغذاء، واختلاف طريقة الفصل والهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي، حيث يحمل كل بروتين شحنة كهربائية ويتحرك حسب الوزن الجزيئي والتي تختلف في المجال الكهربائي بمعدل يتناسب مع شحنتها حسب تكوين الاحماض الأمينية ويعد الترحيل الكهربائي من الوسائل التحليلية في الأنظمة الحيوية لأصناف الأسماك المختلفة (الفيصل وآخرون، 2010; Issa, 1994; Haedrich, 1984).

يرجح التشابه بين عدد الحزم بروتينات أسماك المرجان والرزام لتشابه الغذاء الذي تقعات عليه كلا منهما رغم وقوعهما ضمن عائلتين مختلفتين حيث ترجع أسماك المرجان لعائلة Sparidea، وأسماك الرزام لعائلة Scombridae، وهو ما ذكره الفيصل وآخرون (2010)، حيث استنتج أن التشابه في معظم الحزم البروتينية راجع إلى التشابه في طبيعة غذاء بين السمnan الطويل (*Acanthobrama marmid*) والسمnan العريض (*Alburnus mossulensis*). بينما التباين في عدد قطع البروتينات العضلية لأسماك المرجان والرزام مع أسماك البطاطا (Family Siganidae) والقزل (Family Scaridae) يرجع لاختلاف العوائل بالإضافة لتأثير اختلاف مصدر الغذاء، لذا فإن هذه النتيجة تتوافق مع ما أشار إليه الفيصل

وآخرون (2010) في أن الاختلاف بين الحزم البروتينية للعضلات الهيكلية بين أسماك *Hemiculter leucisculus* وأسماك جنس *Alburnus*، كان سببه الاختلاف في نوع الغذاء.

#### 6. الخلاصة:

نستخلص من الدراسة الحالية إمكانية استخدام الترحيل الكهربائي في تصنيف الأسماك، ووضعها في مجموعات حسب عدد القطع البروتينية. بالإضافة لاستخدام طريقة (Trichloroacetic/Acetone) TCA/Acetone والتي تمكّن من الحصول على كمية من البروتينات المترسبة بشكل يفوق الكمية التي تنتج بواسطة كبريتات الأمونيوم.

#### 7. شكر وتقدير:

نتقدم بالشكر للسيد رئيس مركز البحوث الحيوية بكلية العلوم - جامعة مصراتة د. غيث الدرسي على السماح لإجراء التحاليل الكيميائية بالمركز. أيضا نشكر أ.د. البشير أحمد الجطلاوي عضو هيئة تدريس بقسم الأحياء بكلية العلوم جامعة مصراتة على ملاحظاته القيمة.

## المصادر والمراجع

- الحمداني، قصي حامد وأحمد جاسم الشمري وعبد الكريم طاهر يسر وأمل خضير يعقوب (2016). دراسة مقارنة للتركيب الكيميائي والبروتينات المفصولة لأسماك الصبور من منطقتي أبي الخصيب والفاو (*Tenualosa ilisha* (Hamilton, 1822). مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 29(1): 258-275.
- الشركسي، ونيس عبد القادر وأبومدينة، حسين مسعود (2010). جغرافية مصراتة، الطبعة الأولى، دار ومكتبة الشعب للطباعة والنشر والتوزيع، مصراتة.
- الفصل، عباس جاسم ومحمد عبدالرزق محمود وعلي، ثامر سالم (2010). دراسة تصنيفية لأسماك *Acanthobrama marmid* و *Alburnus mossulensis* و *Hemiculter leucisculus* بطريقة الترحيل الكهربائي للبروتينات في أهوار جنوب العراق. المجلة الأردنية للعلوم الزراعية، المجلد 6، العدد 4، 654-663.
- حنتوش، عباس عادل (1998). التغيرات الموسمية في المحتوى الكيميائي الحيائي لعضلات بعض الأسماك النهريّة والبحرية من شط العرب وشمال غرب الخليج العربي. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة البصرة. 231-235.
- قاسم، أحمد السنوسي، بن عبد الله، عبد الله رجب، التركي، أكرم علي، وبن موسى، محمد ناصر. دليل الأسماك العظمية بالمياه اللببية، مركز بحوث الأحياء البحرية (البيبا- تاجوراء). 2009.
- محمد، عبدالرزاق محمود وجاسم، باسم محمد وإسماعيل، أحمد قاسم (2012). دراسة تصنيفية مقارنة لتجمعات أسماك الشعم الفضي *Acanthopagrus latus* باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي للبروتينات في المياه العراقية. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 25(2): 293-302.
- Ajayi, I. T.; Olandosu, R. N. and Omoniyi, H. E. (2018). Muscle protein bands resolved by *Sarotherodon melanotheron* from and fresh brackish water habitats . Nusantra Bioscience. Vol. 10(1): 41-46.
- Bera, B. and Mondal, M. and Mondal, A. K. (2018). A comparative study of the soluble muscle protein concentration and SDS-PAGE protein profile of

- five small indigenous fresh water fishes of west Bengal. J. Adv. Zool. Vol. 39(2): 51-57.
- Brovko, F. A. and Zagranichnaya, T. K. (1998). Separation of proteins from phenols in cereal leaf extract by hydrophobic interaction — ammonium sulfate fractionation. Plant Phys. and Bioch. Volume 36, Issue 10, October 1998, P773-777
- Chan, L. L.; Hodgkiss, I. J.; Lam, P. K.; Wan, J. M.; Chou, H. N. and Lum, J. H. (2005). Use of twodimensional gel electrophoresis to differentiate morphospecies of *Alexandrium minutum*, a paralytic shellfish poisoning toxin-producing dinoflagellate of harmful algal blooms. Proteomics. Vol. 5(6):1580–93.
- Dekić, R.; Friščić, F.; Ivanc, A. and Kukavica, B. (2016). Characterization of Proteins from Popovo Minnow (*Delminichthys ghetaldii Steindachner*, 1882) Muscle. Turk. J.Fisher. and Aqua. Scie. Vol. 16: 637-642.
- Focant, B.; Jacob, M. F.; Huriaux, F. (1981). Electrophoretic comparison of the proteins of some perch (*Perca fluviatilis* L.) head muscles, J. Muscle Res. Cell Motil. Vol. 2. 295– 305.
- Garfin, D. E. (1990). Purification. Procedures electrophoretic methods. In: Murray, E. D. and Dentscher, P. J. (Eds.). Methods in enzymology. pp425–444.
- Haedrich, R. L. (1984). Stromateidae. In: FAO species identification Sheets for Fishery Purposes, Fischer, W. and G. Bianchi (Eds.). FAO, Rome, Italy. p212-223.
- Haniffa, M. A.; Jeya, Sheela, P.; James, M. M. and Kavitha, K. (2017). Protein profiling for phylogenetic relationship in snakehead species. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 16(4): 1178-1186.
- Harder, A.; Wildgruber, R.; Nawrocki, A.; Fey, S. J.; Larsen, P. M. and Görg, A. (1999). Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis. Vol. 20(4–5):826–9. pmid:10344254
- Huang, L.; Zou, Y.; Weng, H. W.; Li, H. Y.; Liu, J. S. and Yang, W. D. (2015). Proteomic profile in *Perna viridis* after exposed to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. Environ Pollut. Vol. 96:350–7.
- Issa, A. H. (1994). Comparative electrophoretic studies of the tissue protein in *Chalcalburnus mossulensis* and *Alburnus sellal* (Pisces: Cyprinidae) of Basrah, Iraq. Marine Mesopotamica. Vol. 9(1): 23-28.
- Jesslin, G.; Sabaridasan, A.; Edwinthangam, P. and Palanikani, R. (2013). Soranam Electrophoretic studies on the muscle proteins of three species

- of Genus *puntius* (Osteichthyes – Cyprinidae. Int. J. Res. Fish. Aquacult. Vol.3. 16–20.
- Jiang, L.; He, L. and Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. J. Chromatogr. A. Vol.16; 1023(2): 317-20. Doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.029.
- Kwok, C. S.; Lai, K. K.; Lam, S. W.; Chan, K. K.; Xu, S. J. and Lee, F. W. (2020). Production of high-quality two-dimensional gel electrophoresis profile for marine medaka samples by using Trizol-based protein extraction approaches. Proteome Sci. Vol. 18(5): doi: 10.1186/s12953-020-00161-9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196234>. [Online January, 2023].
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol. 227: 680 – 685.
- Luís, I. M.; Alexandre, B. M.; Oliveira, M. M. and Abreu, I. A. (2016). Selection of an Appropriate Protein Extraction Method to Study the Phosphoproteome of Maize Photosynthetic Tissue. Plos one. Vol. 11(10): e0164387. <https://doi.org/10.1371/journal.DOI:10.1371/journal.pone.0164387>.
- Mardigian, R. and Taranto, P. (2001). Biotechnology explorer protein fingerprinting instruction manual. Catalog N. 166-0100EDV.Explorer.bio-rad.com
- McDonald, D. G. and Milligan, C. L. (1992). Chemical properties of the blood, in: W.S. Hoar D.J. Randall, A.P. Farrell (Eds.), Fish physiology, Academic Press, San Diego, CA. pp. 56–133.
- Miyazaki, J. I.; Hirabayashi, T.; Hosoya, K. and Iwami, T.A. (1998). Study of the systematics of cyprinid fishes by two dimensional gel electrophoresis, Environ. Biol. Fish, Vol. 52: 173–179.
- Muhammada, O. I.; Usama, M. M.; Francesco, F. and Sayeda, A. H. (2018). SDS-PAGE technique as biomarker for fish toxicological studies. Toxicology Reports. Vol. 5. 905–909.
- Niu, L.; Zhang, H.; Wu, Z.; Wang, Y. and Liu, H. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PLOS ONE 13(12): e0202238. Available at: [https://doi.org/10.1371/journal.\[online march, 2022\]](https://doi.org/10.1371/journal.[online march, 2022]).
- Pace, C. N.; Treviño, S.; Prabhakaran, E. and Scholtz, J. M. (2004). Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2004 Aug 29;359(1448):1225-34; discussion

- 1234-5. doi: 10.1098/rstb.2004.1500. PMID: 15306378; PMCID: PMC1693406.
- Pineiro, C.; Vazquez, J.; Marina, A. I.; Barros-Velazquez, J. and Gallardo, J. M. (2001). Characterization and partial sequencing of species-specific sarcoplasmic polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis*, Vol. 22; 1545–1552.
- Rinaldi, A. J. (2023). Simple TCA/acetone protein extraction protocol for proteomics studies. Doi.doi.org/10.17504/protocols.io.5jy18j74dg2w/v1.
- Wang, J.; Wang, Y. Y.; Lin, L.; Gao, Y.; Hong, H. S. and Wang, D. Z. (2012). Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *J. Proteome*. Vol. 75(7): 2038–52.
- Wang, L.; Shiming, P.; Chao, C. and Zhaohong, S. (2013). Amino Acid and Fatty Acid Composition of the Muscle Tissue of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*). *J. Food and Nutrit. Rese.* Vol. 1(4): 42-45.
- Wingfield, P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr. Protoc. Protein Sci.* May; Appendix 3: Appendix 3F. doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13. PMID: 18429073; PMCID: PMC4817497.
- Yilmaz, M. (2005). A Taxonomic study on *Orthrias insignis euphraticus* (Banarescu and Nalbant, 1964) and *Cyprihion macrostomus* (Heckel, 1843) by sarcoplasmic protein electrophoresis. *G.U. Journal of Science*. Vol. 18(1): 61-68.