

BAL ARISI ZEHRİNİN KARAKTERİZASYONUNDA SDS-PAGE ELEKTROFOREZ KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

The Investigation of Usage of SDS-Page Electrophoresis in Identification of Honey Bee Venom

(Extended Abstract Can be Found at the end of the Article)

Yakup ŞİRİN¹, Hilal Ebru ÇAKIR¹, Zehra CAN², Oktay YILDIZ³, Sevgi KOLAYLI^{1*}

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon

²Giresun Üniversitesi, Şebinkarahisar Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Giresun

³Karadeniz Teknik Üniversitesi, Maçka M.Y.O., Trabzon

Geliş tarihi: 12.12.2016

Kabul Tarihi: 09.01.2017

ÖZ

Arı zehri (bee venom, apizehir) açık renkte, kokusuz, sıvı bir madde olup, keskin, acı bir tada sahip bir peptit ve protein karışımıdır. Biyolojik aktif değeri yüksek çok sayıda peptit ve proteinden oluşan arı zehri apiterapi uygulamaları için çok değerlidir. Kozmetikten apiterapi uygulamalarına kadar çok sayıda kullanım alanı bulan arı zehrinin kullanılmadan önce kalitesinin test edilmesi gerekir. Arı zehri analizi HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF gibi ileri analiz yöntemleri ve laboratuvar donanımı gerektirmektedir. Yapılan bu çalışmada, arı zehrinin pratik ve ucuz yolla teşhis edilmesine imkân sağlayan metot geliştirildi. Taze toplanan arı zehrinin ham protein miktarı ile sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez kromatografisi yapıldı. Toplam protein miktarı %66 olarak bulunan arı zehrinin SDS-PAGE ile üç önemli protein bandı elde edildi. Molekül ağırlıkları yaklaşık 30 ve 40 kDa iki küçük ve molekül ağırlığı yaklaşık 4 kDa olan büyük bir protein bandı elde edildi. Arı zehrinin yaklaşık %60'ını oluşturan melittin küçük molekül kütlelerinden dolayı en uzağa yürüyen bant olup (4 kDa.dan küçük) molekül ağırlığı 30-40 kDa arasında olan iki küçük bantın hyaluronidaz, fosfolipaz A2 enzimlerine ait oluşu tespit edildi. Sonuç olarak, SDS-PAGE elektroforez tekniği arı zehrinin pratik olarak teşhis edilmesine uygun bir yöntem olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Arı zehri, SDS-PAGE elektroforez, melittin

ABSTRACT

Apitoxin called or bee venom is light color, odor-free, liquid, its taste is bitter and apitoxin is a protein mixture. Peptides and protein of the bee venom have many biological activities and its very important for apitherapeutic applications. Bee venom is used in many areas like apitherapeutic applications and cosmetics, and should be analyzed before uses. Bee venom analyzed need sophisticated analyzed techniques, such as HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF and developed equipment. In this study, an identification method of bee venoms was developed, and this method provides us to identify bee venoms in a cheap and simple way. Crude protein amount and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the fresh collected bee venom was analysed. Total protein content of the sample was 66% and three important protein bands was obtained. Two small bands of nearly 30 and 40 kDa and a big band of nearly 4 kDa was obtained of the SDS-PAGE. The smallest band (4 kDa) represents melittin, which forms approximately %60 of dried bee venom, because of the small molecular mass of melittin. Also, the other bands (30 and 40

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

kDa) represent hyaluronidase and phospholipase A2, which are characteristic proteins of bee venom. In conclusion, SDS-PAGE gel electrophoresis is very suitable for determination identification bee venom that was a practical way.

Key word: Bee venom, SDS-PAGE electrophoresis, melittin

GİRİŞ

Bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri gibi arı ürünlerinin insan sağlığı için her türlü kullanımı apiterapi olarak adlandırmakla birlikte bu yöntem geleneksel ve tamamlayıcı tıbbin önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Stangaciu, 2006; Zumla ve Lulat, 1989). Apiterapinin kökeni insanlık tarihi kadar eski olup ilk kayıtlı metinler 6000 yıl öncesindeki antik Mısır'a kadar dayanmaktadır. Apiterapi uygulamalarında arı zehrinin yeri oldukça farklı olup daha çok canlı arının kullanıldığı arı sokması olarak bilinen tedavi yöntemleri günümüzde Çin, Kore, Rusya, Romanya, Ukrayna, Doğu Avrupa ve Güney Amerika gibi dünyanın pek çok yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1997; Molan, 2006; Moolenaar ve ark., 2006; Lee ve ark., 2005).

Arılar, Hymenoptera takımının Aculeata grubunda Apoidea üst familyasının bir bölümü olan Apiformes'i oluşturan böceklerdir. Yeryüzünde şimdiki kadar tanımlaması yapılmış 18.000'e yakın arı türü bulunmaktadır (Michener, 2007). Hymenoptera takımı üyeleri insanlar için zehirli olan en önemli böcek gruplarından biridir. İşçi arılarda bulunan ovipozitörün (yumurtlama organı) yapısal değişikliğe uğrayarak, savunma amaçlı kullanılan kompleks bir yapıya olan arı iğnesine dönüşür. Zehir miktarı işçi arılar 2-3 haftalık olduğunda maksimum seviyeye ulaşır, daha sonra giderek zehir miktarı azalır (King ve Guralnick, 2004; White, 2000). İğneyle birlikte işçi arı zehir kesesini, kaslarını ve sinir merkezini kaybeder. Vücudunun önemli bir bölümünü kaybeden arı 2-4 saat içinde ölür (White, 2000).

Arı zehri, arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca melittin, apamin, MCD-peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz A2 bulunan, keskin kokulu, acı tatta, sarımtırak renkte, sıvı, hava ile temas edince çabuk kuruyup kristalize olan bir karışımdır (Anonim, 1989). Arı zehri eski çağlardan günümüze kadar daha çok ağrı azaltıcı ve iltihaplı romatizmal hastalıklara karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Billingham ve ark., 1973). Son yıllarda arı zehri tedavisi özellikle romatoid

artrit, multiple sclerosis (MS), kanser ve zona tedavileri için destekleyici tedaviler sunmaktadır (Park ve ark., 2004; Son ve ark., 2007; Putz ve ark., 2006; Gajski ve ark., 2014; Kim ve ark., 2015).

Arı zehri toplanmasında birkaç farklı yöntem kullanılmakla birlikte elektroşok yöntemi en yaygın kullanılan yöntem olup en yüksek verimin alındığı tekniktir (Özbek, 1990, Golden ve ark., 1997). Bu teknikte 12 voltluk akım ile toplanan zehir, cam levhadan bir süre sonra opak bir toz olarak kazanır. Zehir, rutubet ve ışıktan korunursa uzun yıllar muhafaza edilebilir. Aksi takdirde oksidasyona bağlı olarak, rengi beyazdan kahverengi ve sarıya dönüşür ve oksidasyon ile terapötik etkisi azalır (Atayoğlu, 2012). Arı alerjisi olan hastaların %50'den fazlasında IgE antikorlarının oluşturduğu arı zehri protein ve enzimlerine karşı oluşan majör alerjenlerden ileri gelmektedir. Balarısı zehrinde bulunan majör alerjenler fosfolipaz A2 (Api m1), hyaluronidaz (Api m2), düşük moleküler ağırlıklı bir protein olan Api m6, asit fosfataz, allerjen C ve yüksek molekül ağırlıklı bazı proteinlerdir (Gökmen, 2008; Kelle, 2007).

Arı zehri bileşiminin yaklaşık %88'i su olup geri kalan kısmı peptitler, polipeptitler, enzimler, aminler, lipitler, şekerler ve amino asitler oluşturmaktadır (Chen ve Lariviere, 2010; Danneels ve ark., 2015; Son ve ark., 2007). Melittin majör arı proteini olup 26 aminoasitten oluşan molekül ağırlığı yaklaşık 3 kDa olan ve arı zehri kuru ağırlığının %50-60'ını oluşturur. Fosfolipaz A2 (%10-13), hyaluronidaz (%2) enzimleri ile apamin (%2-3), MCD peptid (%2-3), sekapin (%0,5-2), pamin (%1-3) peptitlerini oluşturur (Moreno ve Giralt, 2015; Bogdanov, 2016).

Bugüne kadar arı zehri karakterizasyonu için çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmiş olup bunlar arasında ince tabaka kromatografisi, kapiller elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ultra performans sıvı kromatografisi (UP-LC), MALDI-TOF teknikleri bulunmaktadır (Pacakova ve ark., 1995; Kokot ve Matysiak, 2009; Rybak-Chmielewska ve Szczêsna, 2004). Ancak, bu analiz teknikleri çok az sayıda laboratuvarında

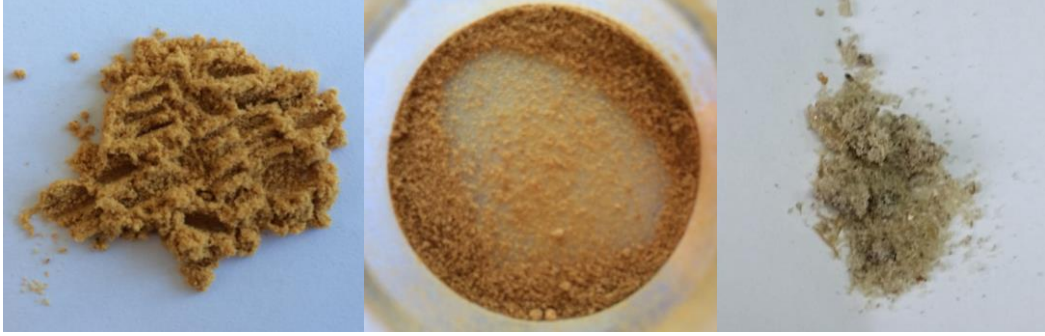
ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

yapılabilen çok sofistike yöntemler olup maliyet gerektirirler. Apiterapik uygulamalarda ve özellikle arı zehri taşımasının önlenmesi amacıyla pratik bir yöntem bulunması faydalı olacaktır. Bu amaçla, sunulan çalışmada hemen her biyokimya laboratuvarında bulunabilen ve pratik ve ucuz bir yöntem olan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez ile arı zehri analizi yapıldı.

MATERYAL VE METOT

Arı Zehrinin Temini

Çalışmada kullanılan arı zehirleri farklı zamanlarda Zonguldak bölgesi arıcılar birliği (ZAYBİR), Artvin ve Ankara bölgesi arıcılarından araştırma amaçlı temin edildi. Temiz ve kuru koyu renkli cam bir şişede -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 1. Kullanılan arı zehri örnekleri

Cihaz ve Kimyasallar

Kullanılan cihazlar SDS-PAGE için Bio-Rad Mini (Sigma, England), protein tayini için UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS Spectrophotometer, USA), pH metre (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), çalkalayıcı (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany), etüv (Nüve, EN 400, Türkiye), hassas terazi (Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland) kullanıldı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS), bovine serum albümin (BSA), fosfomolibtik asit, amonyum persülfat, gliserol, glisin ve marker protein karışımı Sigma-Aldrich Chemie, Germany firmasından satın alındı. N,N,N',N''-Tetrametiletildiamin TEMED, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktifi, bromofenol mavisi, β-merkaptotanol, Coomassie Brilliant Blue R 250 ve metanol Merck, Germany firmasından satın alındı.

Protein Tayini

BSA standardı kullanılarak Bradford yöntemine göre spektrofotometrik olarak toplam protein miktarı tayin edildi (Bradford, 1976). Bu teknikte negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktifi

proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm'de absorbans verir. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılarak konsantrasyona karşı absorbans grafiğinin eğrisi hazırlanarak tayin yapıldı. Arı zehri %0.9 NaCl de çözündürüldü.

Protein Elektroforezi

Klasik SDS-PAGE protein elektroforez tekniğine göre tayin yapıldı. Çalışmada %5'lik yığma jeli ve %8, %10, %12 ve %15 ayırma jelleri kullanılarak en iyi ayırımın yapıldığı jeller tespit edildi.

Jellerin hazırlanması

Elektroforez camları etil alkol ile temizlendikten sonra cam levhalar elektroforez sistemine yerleştirildi. Tablo. 1'de oranları verilen dört farklı ayırma jeline %5, 10-12-15'lik TEMED ilave edilerek polimerleşme başlatıldı. Polimerleşmenin başlatılmasıyla birlikte hazırlanan jel cam levhalar arasına döküldü hava ile teması kesildi. Polimerleşmenin tamamlanması için 1 saat kadar beklendikten sonra jelin üzerine %5'lik yığma jeli hazırlandı ve döküldü. Cam levhaya dökülen yığma jelinin üzerine kuyucuklar oluşturmak için taraklar kondu ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

Elektroforez hazırlanmasında yapılan pipetlemeler Tablo 1'de özetlendi.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler

Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 9,085 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

Yığılma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 6,057 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

SDS Çözeltisi (%10): 5 g SDS saf suda çözüldü hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözüldü hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı.

N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözüldü hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1

bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptotanol'ün karıştırılması ile hazırlandı, kısımlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,30'a ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.

Arı zehrinin elektroforez için hazırlanması: 1 mg/mL konsantrasyonda %0,9 NaCl'de çözelti hazırlandı. Elektroforez kuyucuklarına 50 µL enjekte edildi.

Jele uygulanacak olan örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeler yapılarak etüvde 95°C'de 5 dakika bekletildi. Jel üzerindeki tarak çıkartılarak, jel tamamen tampon içerisinde kalacak şekilde elektroforez kuvetine yerleştirildi ve kuyucuklara örnekler yüklendi. Güç kaynağı ile jele 100 V ve 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi. Cam plakalar arasından çıkartılan jelin boyanması için Coomassie Brilliant mavisi kullanıldı. Jel, boya ile 10 dakika ve çalkalayıcıda 70 rpm'de çalkalandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 70 rpm'de bantlar görünür hale gelene kadar yıkandı.

Tablo 1. Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları

Bileşenler	%5'lik Yığılma Jeli (mL)	%12'lik Ayırma Jeli (mL)
Saf Su	2,7	3,3
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	4,0
1,5 M Tris Tamponu (pH 8,8)	--	2,5
1,5 M Tris Tamponu (pH 6,8)	0,5	--
%10'luk Amonyum persülfat	0,04	0,1
SDS (%10 w/v)	0,04	0,1
TEMED	0,005	0,004

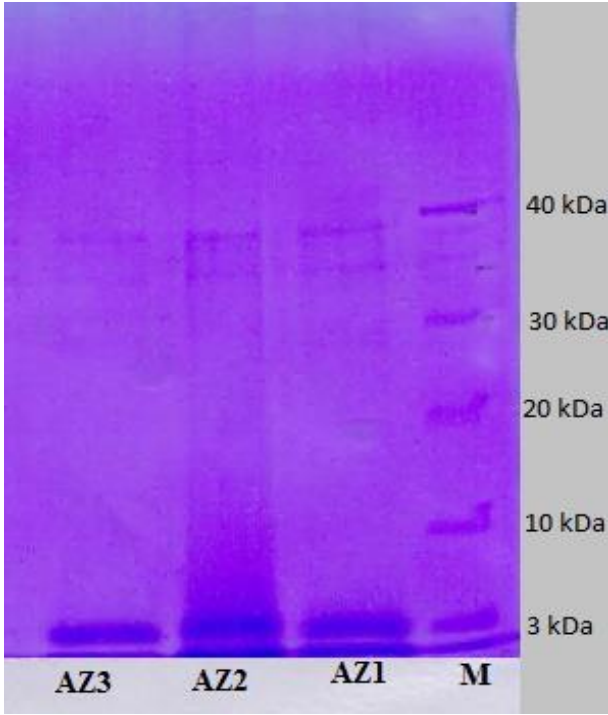
BULGULAR

Çalışmamızda öncelikle Bradford (1976) yöntemiyle arı zehrindeki toplam protein miktarı tayin edildi ve kuru ağırlık başına %66 ham protein olduğu tespit

edildi. Elektroforez için %10'luk SDS kullanıldı ve yürütme hem %10'luk hem de %12'lik SDS-PAGE jelinde yapıldı. 100 V ve 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi. Cam plakalar arasından çıkartılan jel Coomassie

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Brillant mavisi ile 10 dakika ve 70 rpm'de çalkalanarak muamele edildi. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 70 rpm'de bantlar görünür hale gelene kadar yıkandı ve fotoğraflandı. SDS-PAGE elektroforez sonucunda jel üzerinde üç bant görüntülendi. Molekül ağırlığı 30 ile 40 kDa arasında iki küçük protein bandı ve molekül ağırlığı 4 kDa'dan daha küçük, yoğun bir protein bandı olduğu görüldü. Elde edilen üç önemli bandın molekül ağırlığı 30-40 kDa arasındaki bantlar sırasıyla hyaluronidaz, fosfolipaz A2 enzimleri molekül ağırlıkları büyük olduğu için fazla yürümemiş, en büyük bant olan melittin ise molekül ağırlığı küçük olduğu için en uzağa yürümüştür. Şekil 2'de elektroforez sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforez kromatogramı gösterilmektedir. Arı zehri toplam proteinlerinin %60'tan fazlasını melittinin oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 2. Arı zehri içeriğindeki proteinlerin SDS-PAGE incelenmesi

TARTIŞMA

Literatürde melittin tayini için yüksek performans sıvı kromatografisi (Szokan ve ark., 1994) ve kapiler elektroforezine (Pacakova ve ark., 1995) dayanan analitik metotlar bulunmaktadır. Arı zehri bileşiminin aydınlatılmasına yönelik yapılan bir çalışmada HPLC ile bileşenleri olan apamin, fosfolipaz A2, melittin ayrıldığı bildirilmiştir. (Rybak-Chmielewska ve Szczêsna, 2004). Bu çalışmada apamin, fosfolipaz A2 ve melittin ayrılmasında, en az 180 Å gözenek çapına sahip C18 kromatografik kolonun en uygun olduğu gözlemlenmiştir, balarısının zehir bileşiklerinin ortalama %65 melittin, %13 fosfolipaz A2 ve %3 apamin olduğu rapor edilmektedir. Farklı mevsimlerde elde edilmiş arı zehri örneklerinin melittin için istatistiksel açıdan önemli farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada arı zehrinin kapiller elektroforez ile analizi gerçekleştirilmiş olup bu analiz sonuçlarının HPLC de farklı olduğunu ve ayırımlar arasında farklılıkların bulunduğu ifade edilmiştir (Zenon ve ark. 2011).

Elektroforez tekniği, proteinleri molekül ağırlığı ve yüklerine göre ayırmaya yarayan bir kromatografik analiz yöntemi olup, karışımlardaki proteinlerin ayrılmasında, saflaştırılmalarında ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadır. Elektroforez ayrıca klinik biyokimyanın önemli araçlarından biri olup, kan serum ve plazma protein ve lipoproteinlerin analizlerinde de aktif olarak kullanılmaktadır (Longsworth ve MacInnes, 1940). Doğal-PAGE ve SDS-PAGE olarak iki farklı biçimde kullanılan elektroforez bilimsel çalışmalarda saflık kontrolü, molekül ağırlığı tayini ve proteinlerin alt birimlerinin tespiti gibi pek çok amaçla kullanılmaktadır. Bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) negatif yüklerle zengin olup proteinlerin toplam yüklerinin negatif olmasına yol açarak onları molekül ağırlığı esasına göre ayrılmalarını sağlar. Bu nedenle, proteinlerin alt birimlerinin ayrılmasında ve toplam yüklerinin negatif yüklerle yüklenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bir çözeltide bulunan proteinlerin %10'luk SDS ile muamele edilmesiyle alt birimlerine ayrılarak her bir alt birim negatif yüklerle yüklenerek polipeptitlerin molekül ağırlığına göre ayrılması sağlanır. Ancak bu çalışmada en ideal ayırımın %12'lik SDS-PAGE sonucunda olduğu ve ancak üç proteinin bandının elde edilebildiği bulundu. Protein bantlarının molekül ağırlıklarının standart protein karışımı kullanılarak tayin edildiğinde yaklaşık 3 kDa büyük bant ile 30 kDa ve 40 kDa'lık

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

iki küçük bandın olduğu tespit edildi. Melittin 26 amino asitten oluşan bir peptit olup elektroforezde en uzağa göç eden ve toplam arı zehri proteinlerinin %60'tan fazlasını oluşturduğu, diğer iki belirgin bandı ise proteinin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturan 30 kDa fosfalipaz A2 ve 40 kDa'luk hyaluronidaz enzimlerine ait olduğu düşünülmektedir.

Arı zehrinde 15-20'den fazla sayıda peptit ve protein bulunduğu bildirilmektedir. Anca SDS-PAGE elektroforezi ile bu bantları tam olarak ayırmak ve görmek mümkün değildir (Bogdanov, 2016). Çünkü bu SDS karışımındaki proteinleri alt birimlerine ayırarak toplam yüklerini eşitlediği için molekül ağırlığı birbirine yakın bantların üst üste çakıştığı düşünülmektedir. Tam bir ayırım sağlanması için mutlaka LC-Tandem Mass, kapiller elektroforez, Maldi-TOF gibi ileri ayırma tekniklerinin kullanılması gerekir. Ancak, bu çalışma ile her üç arı zehri örneğinin benzer kromatogramlar oluşturması pratik olarak arı zehri teşhisinde önemli bir ipucu veya parmak izi olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak bu üç protein varlığından yola çıkarak SDS-PAGE protein elektroforezi ile bir karışımın arı zehri olup olmadığını tespit etmek mümkün olabilir. Bu bakımdan SDS-PAGE elektroforez tekniği pratik ve ucuz bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak daha ileri ayırım ve tetkikler için ileri ayırma teknikleri ile fosfalipaz ve hyaluronidaz enzim aktiviteleri de kullanılması uygun olabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan arı zehirleri 114Z370 nolu TÜBİTAK projesindeki apiterapik araştırmalar için toplandı. Bu çalışmada kullanılan arı zehirlerinin temin edilmesinde emeği geçen arıcılara teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Anonim, 1989. Arı Zehri Tasarısı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Atayoğlu, T. 2012. Apiterapi Açısından Arı Ürünlerinin Kalite Kriterleri Ve Standardizasyonu, Amerikan Hastanesi, Türk Standartları Enstitüsü.
- Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, R. A., Vernon, C. A. 1973. An anti-

inflammatory peptide from bee venom. *Nature Publishing Group*.

- Bogdanov, S., 2016. Bee Venom: production, composition and quality. In: The bee venom Book, Chapter 1, Muehlethurnen, Switzerland. www.bee-hexagon.net.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72,1-2, 248-254.
- Chen J. ve Lariviere W.R. 2010. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92,151-183.
- Danneels, E. L., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., de Graaf, D. C. (2015). Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins*, 7(11), 4468-4483.
- Gajski, G., Čimbora-Zovko, T., Rak, S., Rožman, M., Osmak, M., Garaj-Vrhovac, V. 2014. Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. *Journal of Applied Toxicology*, 34,12: 1332-1341.
- Golden, D.B., Marsh, D.G., Freidhoff, L.R. 1997. Natural history of Hymenoptera Venom Sensitivity in Adults. *Journal Allergy Clin Immunology*, 100:760-6.
- Gökmen, E.N. 2008. Venom Biyokimyası, Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics, 1(1) :22-25.
- Kelle, İ. 2007. Apiterapi. *Dicle Tıp Dergisi*, 34: 311-315.
- Kim, C. S., Yates, D. M., & Heaney, P. J. 1997. The layered sodium silicate magadiite: an analog to smectite for benzene sorption from water. *Clays and clay minerals*, 45(6), 881-885.
- Kim, J. Y., Lee, W. R., Kim, K. H., An, H. J., Chang, Y. C., Han, S. M., & Park, K. K. 2015. Effects of bee venom against *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in human keratinocytes and monocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1651-1656.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- King, T.P., Guralnick, M. 2004. Hymenoptera allergens. *Clin Allergy Immunology*, 18: 339-53.
- Kokot, Z. J., Matysiak, J. (2009). Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. *Chromatographia*, 69 (11-12), 1401-1405.
- Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. 2005. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. *Evid Based Complement Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2: 79-84.
- Longworth, L. G., MacInnes, D. A. (1940). An electrophoretic study of nephrotic sera and urine. *The Journal of experimental medicine*, 71(1): 77-82.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*, 2nd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Molan, P. C. 2006. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int. J. Low Ekstrem Wounds*, 5 40-54 10.1177/1534734605286014.
- Moolenaar, M, Poorter, RL, van der Toorn, PP, Lenderink, AW, Poortmans, P, Gerardus Egberts, AC. 2006. The effect of honey compared to conventional treatment on healing of radiotherapy-induced skin toxicity in breast cancer patients. *Acta Oncol*, 45: 623-4.
- Moreno, M., Giralt, E., 2015. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7: 1126e1150.
- Özbek, H. 1990. Bal Arısı (*Apis Mellifera* L.) Zehri, Yüksek lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum 18s.
- Pacakova, V., Štulík, K., Hau, P. T., Jelinek, I., Vinš, I., Sýkora, D. (1995). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, 700(1), 187-193.
- Park, H.J. Lee, S.H., Son, D.J., Oh, K.W., Kim, K.H., Song, H.S., Kim, G.J., G.T. Oh, Yoon, D.Y., Hong, J.T. 2004. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis & Rheumatology* 50: 3504-3515.
- Putz, T., Ramoner, R., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., Thurnher, M. 2006. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 55: 1374-1383.
- Rybak-Chmielewska, H., Szczêsna, T. 2004. HPLC Study of Chemical Composition of Honeybee (*Apis Mellifera* L.) Venom. *Journal of Apicultural Science*. 48 (2): 187-193.
- Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology Therapeutics Journal*. 115: 246-270.
- Stangaciu, S. 2006. What is apitherapy? www.apitherapy.com (Accessed 27.10.06).
- Szokan G., Horvath J., Almas M., Saftics G., Palocz A. (1994). Liquid Chromatographic Analysis and Separation of Polipeptide Components from Honey Bee Venoms. *J. Liquid. Chrom.*, 17 (16):3333-3349.
- White, J. 2000. Bites and Stings From Venomous Animals a Global Overview. *Ther Drug Monitoring*. 22: 65-68.
- Zenon J. K., Matysiak, J., Urbaniak, B., Dereziński, P. 2011. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399:7, 2487-2494.
- Zumla ve Lulat, 1989. Honey-a remedy rediscovered. *Journal of the royal society of medicine*. 82 (7): 384-385.

EXTENDED ABSTRACT

Bee venoms are important natural protein mixtures in traditional medicine. The amount of venom in the body of a bee depends on season and the kind of bee, and the amount is generally between 0.05 mL/bee and 0.30 mL/bee. Bee venoms have pharmacological importance, and bee venoms

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

consist of lots of peptides and proteins. In recent years, bee venoms have used in cosmetics and pharmaceutical industry. Therefore, bee venoms are launched to the market as different productions. However, the productions of bee venoms must be tested in point of their qualification before they reaches the costumers. Actually, there is not a certain way to recognize whether a production is made of bee venom or not, and advanced analysis techniques like HPLC, LC-MALDI-TOF and capillary electrophoresis are mostly used in order to identify these productions. Also, the characterization of bee venoms can be done by using the characterization techniques of some enzymes like phospholipase, hyaluronidase and glucosidase. However, these techniques are very expensive and also require lots of experiences in this field. As a result of these requirements, in this field, there is a need for a simple technique in order

to identify bee venoms. In this study, a new identification method of bee venoms was developed, and this method allows us to identify bee venoms in a cheap and simple way. Firstly, the total amount of protein in bee venom was determined as 66%. Subsequently, qualitative analyses of the bee venom were fulfilled by using Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). With 12% of separation gel and 10% of SDS gel, two protein bands whose molecular weights are between 30 and 40 kDa. were obtained, and also a dense protein band being under 4kDa. was obtained. Because of the small molecule mass of melittin, which involves approximately 60% of mixture of bee venom, the outmost band under 4 kDa. and the bands between 40 and 30 kDa. represent hyaluronidase and phospholipase A2 which are characteristic proteins of bee venom.