



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ**

FEN FAKÜLTESİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

BİYOKİMYA LABORATUVARI

SAMSUN

Biyokimya Alanında kullanılan veritabanları

Kaynak	URL
CMS Molecular Biology Resources	http://restools.sdsc.edu/
BioTech	http://biotech.icmb.utexas.edu
Protocol Online	http://www.protocol-online.org/
American Chemical Society	http://pubs.acs.org/
Proteopedia	http://proteopedia.org/

Biyokimyada kullanılan veritabanları

Kaynak	İşlev	URL
NCBI	Veritabanları / kaynaklar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
EBI	DNA dizileri	http://www.ebi.ac.uk/
Nucleic acid database	NMR ve X-ray atlası	http://ndbserver.rutgers.edu/
The Institute for Genomic Research	Genomik veritabanı koleksiyonu	http://www.tigr.org/
PDB	X-ray ve NMR ile saptanmış protein yapıları	http://www.rcsb.org/pdb
Swiss-Protein	Protein dizi ve analizleri	http://www.expasy.ch/tools
RasMol (RasMac)	Proteinlerin moleküler yapıları	http://www.umass.edu/microbio/rasmol
Predict Protein	Protein dizi ve 3 boyutlu yapı tahmini	http://www.predictprotein.org/
Atlas of Macromolecules	Makromolekül atlası	http://www.umass.edu/microbio/chime/atlas/atlas.htm

Derlemelerin (“review”) yayınlandığı biyokimya dergileri:

- Annual Review of Biochemistry
(<http://www.annualreviews.org/>)
- Trend in the Biochemical Sciences (TIBS)
(<http://www.trends.com/tibs/default.htm>)

Araştırma sonuçlarının yayınlandığı bazı dergiler:

- Journal of Biological Chemistry
- Biochimica et Biophysica Acta
- Biochemistry
- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
- Biochemical Journal
- Biochemical and Biophysical Research Communications

Biyokimya araştırmalarında kullanılan metotların yayınlandığı dergiler:

- Analytical Biochemistry
- Analytical Chemistry
- Biochemical Preparations
- Current Protocols in Molecular Biology
- Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology
- Methods of Enzymatic Analysis
- Methods in Enzymology

Üniversitemizden yazılı kaynaklara ulaşma yolları:

Üniversitenin WEB sayfasından kütüphane sekmesinden e-dergilere ve üye olunan veri tabanlarına ulaşmak mümkündür. Yüzlerce kitap, makale ve rapor arasında ilgilendiğiniz konu ile ilgili bilgiye ulaşmak oldukça zordur. Bu nedenle yayınlanmış makalelerin, derlemelerin ve patentlerin kısa özetlerini içeren 2 yayın bulunmaktadır:

- Chemical Abstracts (<http://www.cas.org/>)
- Biological Abstracts (<http://www.biosis.org/products/ba/>)

Bilgisayar ve internet yardımıyla kullanılabilen bazı veritabanı programları:

- BIOSIS Previews/RN (Bio Sciences Information Service tarafından üretilmiştir. Biyoloji alanındaki araştırma sonuçları, derlemeler ve US patentlerini içermektedir)
- CA (Chemical Abstracts servisi tarafından üretilmiştir. Kimya alanındaki tüm raporları içermektedir)
- MEDLINE (US National Library of Medicine tarafından üretilmiştir)
- MEDLARS (*Index Medicus* tarafından üretilmiştir)

Program	URL	
BIOSIS Previews/RN	http://stneasy.fiz-karlsruhe.de/html/english/login1.html	ücretli
CAS	http://www.cas.org/	ücretsiz
MEDLINE (PubMed)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	ücretsiz
MEDLARS	http://www.nlm.nih.gov/bsd/mmshome.html	ücretsiz

Bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda çok fazla miktarda veri elde edilmiştir.

- Binlerce genin dizileri
- Bu genlerin ürünleri olan proteinlerin dizileri ve yapıları
- X-ray difraksiyonu ve NMR ile saptanmış protein yapıları

Elde edilen tüm bu veriler özel bazı veritabanı programlarına kayıt edilmektedir ve bu programlar aracılığıyla istenilen molekül ile ilgili tüm bilgilere ulaşılabilir.

Yapı/Dizi bilgilerine ulaşmak için kullanılan bazı programlar

Program	İşlevi
BLAST	Protein ve nükleik asit dizilerini karşılaştırır
Chime	3 Boyutlu hareketli protein yapısı
Entrez (NCBI)	Dizi karşılaştırma sistemi
FASTA	Protein dizilerini karşılaştırır
GenBank (NCBI)	Gen dizilerinin veritabanı
Molecules R Us	3 boyutlu protein yapısı ve manipülasyonu
RasMol (Ras Mac)	3 boyutlu protein yapısı ve manipülasyonu
SRS (EMBL)	Dizi karşılaştırma sistemi

İÇİNDEKİLER

- 1. Laboratuvar Kuralları, Cihaz Kullanımları**
- 2. Aminoasitlerin Titrasyon Eğrisi ve İzolektrik Nokta Tayinleri**
- 3. Aminoasitlerin Kromatografi ile İncelenmesi**
- 4. Temel Hesaplamalar ve Çözelti Hazırlama**
- 5. Biyomoleküllerin İzolasyonu**
- 6. Bitkilerde Pigment İzolasyonu**
- 7. Zeytinyağından Fenolik Madde İzolasyonu**
- 8. C Vitamini Analizi**
- 9. Antioksidan Aktivite Tayini**
- 10. SDS-PAGE Analizi**
- 11. Sabun Eriyiğinde Yağ Asitleri**
- 12. Yağ Asitlerinde Ester Oluşturma**
- 13. Enzimlerin Aktivite Tayini**
- 14. Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Analizi**
- 15. Kan Analizleri**

LABORATUVAR ORTAMI

Biyokimya canlıların yapısında yer alan kimyasal maddeleri ve canlının yaşamı boyunca sürüp giden kimyasal süreçleri inceleyen bilim dalıdır. Biyokimyanın amacı hücrenin temel bileşenleri olan protein, karbohidrat, lipid gibi organik bileşiklerin ve yaşamsal önem taşıyan kimyasal tepkimelerde en büyük rolü oynayan nükleik asitlerin, vitaminlerin ve hormonların yapısal ve nicel çözümlemesini yapmaktır. Yaşam bilimleri ve kimya ile ilişkili tüm akademik ortamlarda yoğun bir şekilde biyokimya araştırmaları yapılmaktadır. İnsan sağlığıyla ilgili bilimlerde iki alanda incelenir: 1) Temel Biyokimya; 2) Klinik Biyokimya.

Biyokimyada deneysel çalışmaların yürütüldüğü laboratuvarlar, çalışılan organizma ve biyolojik materyallerin örneklenebilmesi ve depolanabilmesi, biyokimyasal analiz ve araştırmaların yürütülebilmesi ve elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için elverişli alet ve sistemler, uygun araç ve gereçler, kimyasallar ve sarf malzemeleri ile donatılmış ortamlardır.

Dünyada en az 65 milyon çeşit kimyasal bileşik üretildiği öngörülmektedir. Kimya endüstrisi tarafından ürün/yan ürün olarak üretilen kimyasallar saflık derecelerine göre satılır. Bazı hassas çalışmalarda çok saf kimyasallara gereksinim duyulur. Genel olarak; bir kimyasalın elde edilmesi ne kadar zorsa ve saflık derecesi ne kadar yüksekse fiyatı o kadar yüksektir. Taşıdığı teknik özellikler, kalite ve miktarına göre fiyatlandırılan kimyasallar laboratuvar koşullarında güvenli bir şekilde muhafaza edilmelidir. Her maddenin saklama koşulları bellidir. Bazı maddeler zorunlu olarak soğukta (4°C/-20°C/-80°C), karanlıkta, nem çekmeyen bir ortamda (ör. vakumlu desikatörde) veya çeker ocak altında saklanmalıdır. Birbiriyle reaksiyona girme riski olan kimyasallar bir arada tutulmamalıdır. Tutuşma ve patlama riski olan kimyasallar, radyoaktif maddeler ve zehirli/toksik bileşikler ise çok daha özel koşullarda muhafaza edilir.

Ülkemizde, moleküler biyolojide kullanılan kimyasalların büyük bir kısmı çok yüksek saflıkta (“molecular biology-grade”) olup hemen hepsi ithal edilmektedir ve oldukça pahalıdır. Bir araştırma için kimyasal seçimi yaparken amaca uygunluğu, miktarı, fiyatı, güvenli bir şekilde ve zamanında teslim edilip edilmeyeceği ve garantisi titiz bir şekilde değerlendirilmelidir. Kapsamlı bir piyasa araştırması yapılarak, en kaliteli kimyasal en güvenli ve en ekonomik şekilde temin edilmeye çalışılmalıdır. Aynı prensipler laboratuvarlarda kullanılan diğer sarf maddeleri, eşyalar, aletler ve ekipmanlar için de geçerlidir.

LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

1. Çeşitli kimyasalların deriye veya giysilere bulaşmasını ve/veya zarar vermesini önlemek amacıyla, laboratuvarda mutlaka **beyaz önlük**le çalışılmalıdır.
2. Laboratuvarın temiz ve düzenli tutulması, yapılacak analizlerin doğruluğu ve güvenliği bakımından çok önemlidir. Kullanılan malzemeler, çalışma sonunda **temiz** ve **yerinde** bırakılmalıdır.
3. Kimyasal maddeler **uygun araçlar** (spatöl, kaşık, pipet, mikropipet, ölçü kabı) ile transfer edilmelidir.
4. Yanlışlıkla deriye bulaşan kimyasallar mutlaka akar su altında bolca yıkanmalı ve laboratuvar görevlisine haber verilmelidir. Yanıcı ve tahriş edici maddelerin cilt ile temasında gecikmeden **bol su** ile yıkayıp görevlilere **haber** verilmelidir.
5. Kimyasallar uygun koşullarda depolanmalıdır.
6. Tehlikeli kimyasallar ile çalışırken gerekli önlemler alınmalıdır.
Örneğin; derişik asit çözeltileri ve organik solventler ile mutlaka eker ocak altında çalışılmalıdır. Derişik asit çözeltileri sadece **dereceli cam pipetle** transfer edilmelidir. Asla ağızla ekilmemeli, cam pipetin içinde kapiler etkisiyle yükselen asit hacmi ölölerek aktarım yapılmalıdır. Derişik asit üzerine su dökölmemelidir (Dikkat! Sıçrama teklikesi!). Seyreltik asit çözeltileri hazırlanırken suyun içine derişik asit konulmalıdır.
Akrilamid gibi nörotoksik, etidyum bromür gibi kanserojen maddeler tartılırken mutlaka **maske** takılmalı, bu maddelerle yürütölen çalışmaların her aşamasında **eldiven** kullanılmalıdır.
7. Çözelti hazırlamak üzere madde tartılırken **temiz spatöl** kullanılmalı, tartılacak madde, darası alınmış temiz bir kağıt/Al folyo/kap içine konulmalıdır. Tartım sırasında maddenin etrafa ve terazinin kefesine saılmamasına dikkat edilmelidir. Tartım işlemi tamamlandıktan sonra terazi ve çevresi **temiz** bırakılmalı, tartılan kimyasalın kapağı kapatılmalıdır.
8. Bütün çalışmalarda **distile su** kullanılmalıdır.
9. Tartılan maddenin üzerine yeterince (son hacimden %10 daha az hacimde) distile su eklenmelidir. Karıştırma işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde, manyetik bar yardımıyla yapılmalıdır. Manyetik bar temiz olmalı, manyetik karıştırıcının hızı taşma yapmayacak şekilde ayarlanmalıdır.

10. pH ayarlaması gerekiyorsa çözünme tamamlandıktan sonra ve uygun sıcaklıkta yapılmalıdır. pH ayarlanırken asit veya baz ilavesi farklı ve temiz Pasteur pipetleri yardımıyla yapılmalı, bu sırada çözelti manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılmalıdır. Manyetik bar, bir mıknatıs veya olta yardımıyla çözeltiden çıkartılmalıdır. Çözeltinin son hacmi çözünme tamamlandıktan sonra ölçü kabıyla ayarlanmalıdır.
11. Reaktif şişelerinin üzerine kimyasal maddenin **adı**, **konsantrasyonu**, hazırlanma **tarihi** ve hazırlayan **kişinin adı** cam kalemi ile okunaklı bir şekilde yazılmalı veya bu bilgileri içeren bir etiket yapıştırılmalıdır.
12. Reaktif şişeleri uygun sıcaklık koşullarında ve ağzı **kapalı** biçimde tutulmalıdır.
13. Hazırlanma tarihi 3 ayı geçen veya bozulan (*renk değişikliği, bulanıklık, çökelti vb. değişiklikler gözlenen*) reaktifler kullanılmamalıdır.
14. Her çalışmadan sonra eller **sabun** ile yıkanmalıdır.
15. Laboratuvar ortamında sigara içilmemeli, herhangi bir şey yenilmemeli ve son derece sakın ve sessiz çalışılmalıdır.
16. Tüm malzemeler (özellikle mikropipetler) ve aletler kullanma talimatına uygun şekilde ve dikkatlice kullanılmalıdır.
17. **Hijyen** şartlarına azami dikkat gösterilmelidir. Kan ve idrar vb. örnekler ve bunlarla bulaşmış kaplar ve atıklar **ayrı bir çöpte** toplanmalıdır.
18. Tüm laboratuvar çalışmalarında azami dikkat, hassasiyet ve ciddiyet gösterilmelidir.
19. Örnek numaraları veya adları ve elde edilen sonuçlar mutlaka **not edilmelidir**.
20. Sonuçlar (hesaplama, tablo, grafik vb) **birimler** verilerek rapor haline getirilmelidir.

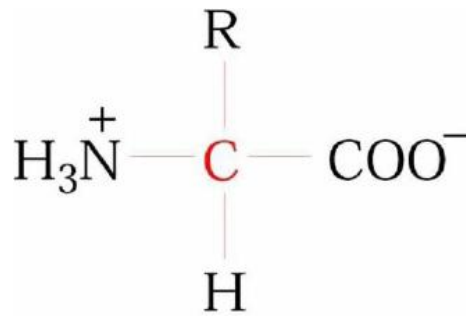
AMİNOASİTLERİN TİTRASYON EĞRİSİ VE İZOLEKTRİK NOKTA TAYİNLERİ

Aminoasitler; katı, renksiz, suda çözünen fakat organik çözücülerde çözünmeyen biyomoleküllerdir.

Erime noktaları çok yüksektir, uçucu değildir. Bu nedenle erime noktalarının üzerinde ısıtılırlarsa bozunurlar.

Aminoasitler sulu çözeltilerinde iç tuz olarak bilinen, iyonlaşmış halde bulunurlar. Aminoasitlerin “standart amino asitler” olarak bilinen 20 tanesi, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir. Standart aminoasitler, aynı karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler.

Aminoasitler R yan gruplarının polaritesine göre veya biyolojik pH’de su ile etkileşme özelliklerine göre (asidik, bazik) sınıflandırılabilirler. “Standart olmayan aminoasitler” ise standart amino asitlerin protein yapısına girdikten sonra yapılarının değişmesi sonucu oluşurlar. Amfoterik maddeler olan aminoasitlerde iki fonksiyonel grup bulunur. Bunlar karboksilik asit (-COOH) ve amino (-NH₂) gruplarıdır. Bu fonksiyonel gruplar nötral ortamda iç tuz oluştururlar.



Aminoasitlerin genel formülü

AMİNOASİTLERDE İZOELEKTRİK NOKTA

Asit baz titrasyonu, asidik olduğu bilinen bir çözeltiye belirli miktarlarda baz damlatılarak eklemek ya da bunun tam tersi yani bazık olduğu bilinen bir çözeltiye belirli miktarlarda asit ekleme işlemidir. Temel amaç asit ya da bazın derişimini tespit etmektir. Buradan da çözeltinin pH değerini kolayca hesaplayabiliriz. Çözeltinin dengelendiği zamanı hassas olarak yakalamak için derişimi bilinmeyen çözeltinin içine indikatör konur. İndikatör renk değıştirdiği anda titrasyon işlemi durdurulur. İndikatör seçimi asit veya bazın tipine göre değışiklik gösterir çünkü indikatörlerin renk değışikliği göstereceği pH aralıkları farklıdır. Titrasyon için kullanılabilecek birçok indikatör vardır. İndikatör seçimi yaparken şu maddeleri göz önünde bulundurmalıyız:

- 1) Kuvvetli asit ile kuvvetli bazın tepkimesi nötrleşme tepkimesi olacağından pH değeri 7 olur.
- 2) Kuvvetli asit ile zayıf bazın tepkimesi sonucu pH değeri 7 den küçük olur.
- 3) Zayıf asit ile kuvvetli bazın tepkimesi sonucunda pH değeri 7 den büyük olur.

Hesaplama sürecinden kısaca bahsedecek olursak: derişimi bilinmeyen ancak hacmi bilinen bir baz ile bu bazı dengeye getiren derişimi de hacmi de bilinen bir asit çözeltisi olduğunu farz edelim. Titrasyon yaparak baz ve asiti dengelediğimize göre şu formülü uygulayarak bazın derişimini bulabiliriz:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Bazın derişimini bulduktan sonra kolayca pH değerini de bulabiliriz. Bunun formülü de

$$pH = -\log(OH^-).$$

Tabi ki bazın içinde ne kadar (OH) bulunduğunu doğru tespit etmek önemlidir. Bazı asit baz indikatörlerinin isimlerini ve kullanıldıkları pH aralıkları;

Timol mavisi	: pH 1.2 – 2.8 asit iken kırmızı, baz iken sarı
Metil sarısı	: pH 2.9 – 4.0 asit iken kırmızı, baz iken sarı
Metil turuncusu	: pH 3.1 – 4.4 asit iken kırmızı, baz iken turuncu
Bromfenol mavisi	: pH 3.0 – 4.6 asit iken sarı, baz iken koyu mavi, mor
Bromkresol yeşili	: pH 4.0 – 5.6 asit iken sarı, baz iken mavi
Klorfenol kırmızısı	: pH 5.4 – 6.8 asit iken sarı, baz iken kırmızı
Fenol kırmızısı	: pH 6.4 – 8.0 asit iken sarı, baz iken kırmızı
Kresol kırmızısı	: pH 7.2 – 8.8 asit iken sarı, baz iken kırmızı
Timol mavisi	: pH 8.0 – 9.6 asit iken sarı, baz iken mavi
Fenolftalein	: pH 8.0 – 10.0 asit iken renksiz, baz iken kırmızı

Asit–baz titrasyonu, protonların derece derece ilavesini veya ayrılmasını kapsar. Amino asitlerin amino grubu hidrojen iyonu kabul edebilir, karboksil grubu ise hidrojen verebilir. Bu sebepten dolayı amino asitler hem asitler hem de bazlarla titre edilebilirler, yani amfoterik özellik gösterirler. Amino asitlerde titre edilebilir en az iki grubun olması, en az iki denge sabiti (K) ve iki iyonizasyon sabiti (K_i) olduğu anlamına gelir. İzoelektrik nokta (pI), aminoasitte bulunan artı ve eksi yüklerin birbirine eşit olduğu, yani amino asidin net yükünün 0 olduğu pH değeridir, yani K₁ ve K₂'nin dengede olduğu noktadır. Amino asitler yapılarında bulunan amino (-NH₂) ve karboksil (- COOH) grupları nedeniyle hem asit hem de baz özelliği taşırlar. Yani asidik ortamda baz, bazık ortamda asit gibi davranmaları nedeni ile amfoterik maddelerdir. Çözeltideki bir amino asit molekülü üzerinde net yükün sıfır olduğu pH değeri, izoelektrik nokta (pI) olarak adlandırılır ve her aminoasit için spesifik bir değerdir.

$$\text{pH} = \text{pI} = \frac{1}{2}(\text{pKa}_1 + \text{pKa}_2)$$

DENEY

GLİSİN'İN İZOELEKTRİK NOKTASININ TAYİNİ

Glisin, (Gly ya da G) formülü $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ olan apolar bir aminoasittir. Yapısal olarak proteinlerde bulunan 20 amino asit arasında en basit olanıdır. Yan zincirinde sadece bir hidrojen atomundan bulunur. Glisindeki α -karbon atomu da bir hidrojene bağlı olduğu için, glisin optikçe aktif değildir, diğer bir deyişle optik izomeri bulunmamaktadır. Çok düşük pH'de, glisinin hakim olan iyonik formu $+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ yani tamamen protonlanmış formudur. Herhangi bir titrasyonda, titre olmaya başlayan protonlanmış grubun pK_a değerinin pH'ye eşit olduğu yerde orta noktaya ulaşılır. Glisin için orta noktada pH 2.34'tür. Glisin titrasyonunda bir diğer önemli nokta pH'nın 5.97'ye ulaştığı noktadır. Bu noktada ilk protonun ayrılması tamamlanmış ve ikincisinin ayrılması başlamıştır. Titrasyonun ikinci evresi glisinin $-\text{NH}_3^+$ grubunun protonunu kaybeder ve ortamın pH'sı $-\text{NH}_3^+$ grubunun pK_a2 değerine eşittir. 20 mL 0.1 N Glisin çözeltisinden 10 mL bir behere alınarak pH metre yardımı ile pH ölçülür. Daha sonra 0.1 N HCl ile titre edilir. Her 1 mL asit ilavesinden sonra pH ölçümü yapılır. İşleme pH göreceli olarak sabit kalıncaya kadar devam edilir. Daha sonra 0.1 N NaOH ile titre edilir. Her 1 mL baz ilavesinden sonra pH ölçümü yapılır. İşleme pH göreceli olarak sabit kalıncaya kadar devam edilir. Milimetrik grafik kağıdı kullanarak x eksenine eklenen asit ve eklenen baz hacmini, y eksenine ise ölçülen pH değerleri yazılarak grafik çizilir ve grafikten pK_a , pK_b ve pI değerleri bulunur.

Çözeltiler:

0.1 N Glisin : 0.750 g glisin tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

0.1 N NaOH : 0.4 g NaOH tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

0.1 N HCl : %37 lik HCl çözeltisinden 0.83 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanır.

VERİLERİN KULLANIMI

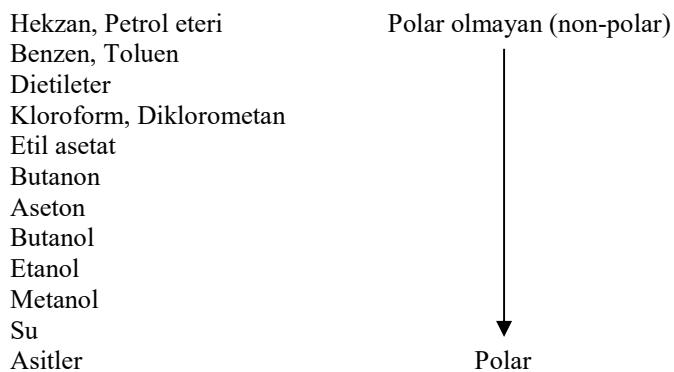
Milimetrik grafik kağıdı kullanarak x eksenine eklenen asit ve eklenen baz hacmini, y eksenine ise ölçülen pH değerlerini koyarak grafiği çizin ve grafikten pK_a ve pK_b değerlerini ve pI değerini bulunuz. Grafik üzerinden elde ettiğiniz verileri teorik değerler ile karşılaştırınız.

AMİNOASİTLERİN KROMATOĞRAFI İLE İNCELENMESİ

İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografi, karışımı oluşturan moleküllerin biri sabit diğeri hareketli iki faz sistemi arasında hareket ederken farklı derecelerde adsorbsiyon, dağılma ve iyon değişimine uğrayarak ayrılmaları temeline dayanır. 1950’lerin sonlarına doğru İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) (“Thin Layer Chromatography”-TLC) basit kalitatif tanımlamalar için hızlı bir teknik olarak laboratuvarlarda kullanılmaya başladı. 1960’ların ortalarına doğru, TLC kantitatif analiz metodu olarak kabul gördü. TLC’de durağan faz olarak ince bir “Silikajel”, “Alümina”, “Selüloz” veya “Poliamid” tabakasıyla kaplanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar (plak) kullanılır. Hareketli faz ise çok çeşitli organik solvent (çözücü) veya solvent karışımları olabilmektedir.

Hareketli faz olarak kullanılan genel çözücüler



Modern TLC birçok sahada iş görmektedir:

- İlaç endüstrisinde
- Yiyecek analizlerinde
- Doğal ürünler, bitki ve otların analizlerinde
- Kozmetiklerin analizinde
- Çevre analizlerinde (örneğin içme sularında bulunan pestisidler)
- Biyokimyasal araştırmalarda
- Klinik analizlerde (örneğin metabolizma düzensizlikleri) kullanılmaktadır

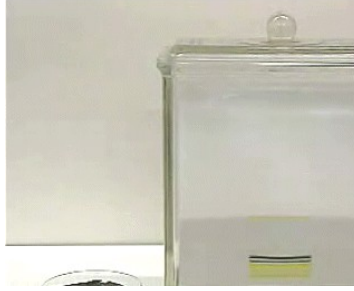
KROMATOĞRAFİNİN PRENSİPLERİ

1.Basamak: Örnek uygulama

Tabakanın (plağın) alt kısmından 1.5 cm yukarıya **kursun kalem** ile örneklerin uygulanacağı yerler işaretlenir. Örnekler kılcal bir boru veya pastör pipeti yardımıyla kromatogram tabakasına nokta veya çizgi şeklinde uygulanır. Örneklerin kuruması beklenir.

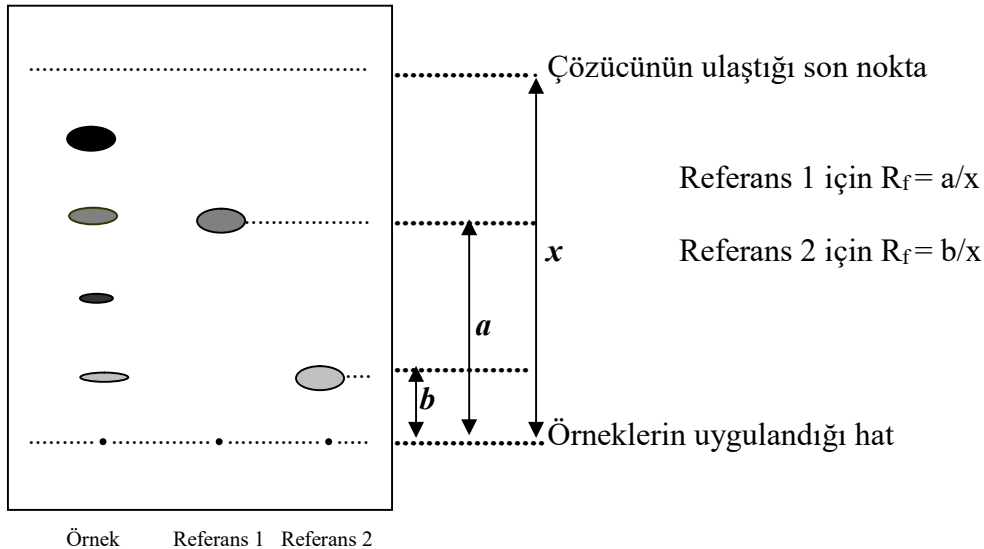
2. Basamak: Kromatogramın yürütmesi

Plak,içinde en fazla 1-2 cm yüksekliğe kadar çözücü bulunan ağzı kapalı bir kap (tank) içine yerleştirilir. Çözücü (hareketli faz), tabaka (durağan faz) üzerinde örneklerin belli aralıklarla göç etmesini sağlar. Örnekler hareket hızlarına göre farklı fraksiyonlara ayrılırlar. Yürütücü faz uzaklaştırıldıktan sonra fraksiyonlar tabaka üzerinde kalır.



3.Basamak: Kromatogramın değerlendirilmesi

İzler (örnekler) renkli ise gözle görülebilir veya UV ışınlar kullanılarak ya da uygun belirteçlerle görünür hale getirilerek incelenir. Her saf maddenin, belli bir sabit fazda ve belli bir çözücü ile ortaya koyacağı davranış hep aynıdır. Yani her saf madde için söz konusu sistemde sabit bir göç noktası vardır. Bu nokta R_f (retention factor) değeri ile ifade edilir.



DENEY

AMİNO ASİT KARIŞIMININ İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILMASI

Serbest amino asitler amfoterik ve hidrofilik bileşiklerdir. Ninhidrin ile farklı reaksiyonlar verirler (prolin ve hidrokisprolin sarı; diğer tüm amino asitler ise kırmızı tonları renk oluştururlar). Amino asitlerin kromatografisi için en uygun durağan faz silikajeldir. Sonuç 1-4 saat arasında alınmaktadır. Kullanılan yürütücü sistemler Tablo 1’de, bazı amino asitlerin yürütücü sistemlere göre verdiği R_f değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

*Örnekler ve standartlar 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde %10 n-propanol içinde hazırlanır ve buzdolabında veya oda sıcaklığında 2-4 hafta saklanabilir.

Gerekli alet/malzeme: Kromatografi Tankı,
Mezür,
Pastör Pipeti
Amino Asit Standartları (Arjinin, Lösin, Fenilalanin)
Bilinmeyen Karışım (1 Mg/MI)
Ninhidrin Belirteci

- Amino asit karışımı TLC plağına uygulanır ve kuruması beklenir.
- Plak, yürütücü sistemin bulunduğu kromatografi tankına dik bir şekilde yavaşça yerleştirilir.

Kullanılan yürütücü sistem: n-butanol:asetik asit: su (65:15:25)

- İşlem tamamlandıktan sonra plak tanktan alınır ve çeker ocak içerisinde kuruduktan sonra üzerine Ninhidrin (%0,3) belirteci püskürtülür.
- Önceden 80° C’ye ayarlanmış etüvde 5 dk bekletilir.
- Oluşan lekeler Tablo 2’deki değerlere göre yorumlanır.

Tablo 1: Amino asitlerin TLC'si için kullanılan yürütücü sistemler

	Bileşenler	Oran (v/v)
A	%96 Etanol – su	70-30
B	n-propanol – su	70-30
C	n-butanol – asetik asit – su	80-20-20
D	Fenol – su	75-25 (w/w)
E	n-propanol - %34 amonyum hidroksit	70-30
F	%96 etanol - %34 NH ₄ OH	70-30
G	Butanon - piridin – su – asetik asit	70-15-15-2
H	Kloroform – metanol - %17 NH ₄ OH	40-40-20

Tablo 2: Bazı amino asitlerin R_f değerleri

Amino asit	A	B	C	D	E	F
Alanin	47	37	22	29	39	40
Arjinin	04	02	01	19	10	06
Aspartik asit	55	33	17	06	09	07
Glutamik asit	63	35	24	10	14	15
Glisin	43	32	18	24	29	34
Histidin	33	20	05	32	38	42
İzolösin	60	53	43	49	52	58
Lösin	61	55	50	48	53	58
Lizin	03	02	03	09	18	11
Metionin	59	51	35	49	51	60
Fenilalanin	63	58	56	55	54	60
Prolin	35	26	14	50	37	30
Serin	48	35	18	20	27	31
Treonin	50	37	20	26	37	40
Triptofan	65	62	47	63	55	58
Tirozin	65	57	41	47	42	51
Valin	55	45	32	40	48	56

BİYOMOLEKÜLLERİN İZOLASYONU

TAMPON ÇÖZELTİLER ve HAM EKSTRE HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

TAMPON ÇÖZELTİ

Asit veya baz eklendiği zaman pH değişikliklerine direnç gösteren çözeltilere **tampon çözelti** denir. Bir çözeltinin tampon çözelti olabilmesi için:

- a) Asitleri nötralize eden
- b) Bazları nötralize eden

olmak üzere iki bileşenin olması gereklidir.

Bu açıdan; zayıf asit ve onun konjuge bazı veya zayıf baz ve onun konjuge asidinin karışımı tampon çözeltidir. Genel olarak kullanılan tampon tipleri, zayıf asit ve bunların konjuge bazlarının tuzlarından oluşan karışımlardır. Tamponun pH değeri sadece asit ve konjuge bazının oranlarına bağlıdır, tampon bileşenleri aynı konsantrasyonda bulunuyorlarsa, ortamın pH'sı pKa'ya eşittir. Tamponların kullanılmasında birincil amaç, çözeltinin pH değerini kontrol altında tutabilmektir. Tamponların herhangi bir sistemdeki ikincil kullanım amacı ise; iyonik kuvvetin ve sistemdeki çözünen diğer bileşenlerin kontrol altında tutulmasıdır. Örneğin tamponlar; nükleik asitlerin, nükleik asit-protein komplekslerinin ve biyokimyasal reaksiyonların stabilizasyonunda kullanılırlar. Ayrıca kompleks tampon sistemleri, çeşitli elektroforetik sistemlerde pH değerinin kontrol edilmesinde ve pH gradientlerinin oluşturulmasında kullanılırlar.

Tamponlar pKa değerlerinin ± 1 pH değerlerinde en etkilidirler. Hangi pH aralığında çalışılacaksa, o pH aralığına ± 1 yakınlıkta pKa değeri olan sistemler seçilir. Tampon seçimi sırasında dikkat edilmesi gereken noktalardan bir diğeri de; kullanılacak olan tampon bileşenleri ile çözeltideki diğer bileşenlerin etkileşime girip girmediğinin belirlenmesidir. Belirli inorganik iyonlar, tampon bileşenleri ile çözünmeyen kompleksler oluşturabilirler. Örneğin; kalsiyum iyonu, fosfatın çözünmeyen kalsiyum fosfat şeklinde çökmesine neden olmaktadır.

TAMPON SEÇİMİNDE DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KURALLAR:

- Çalışma pH'sı,
- Tamponun anyonik veya katyonik karakterde olması,
- İyonik kuvvet ve sıcaklık etkisiyle pH değişimi,
- Kimyasal etkinlik,
- Biyolojik etkinlik,
- Diğer bileşenlerle etkileşim,
- Biyolojik membranların geçirgenliği,
- Toksisite,
- 280 nm ve altındaki dalga boylarında absorpsiyon,
- Maliyet,
- Çözünürlük

ZAYIF ASİTLERİN pH'sını Hesaplama

Henderson-Hasselbalch eşitliği



Zayıf asit Konjuge baz

K_a = Asidin dissosiyasyon sabiti

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$[\text{H}^+] = \frac{K_a [\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$-\log[\text{H}^+] = -\log \frac{K_a [\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K_a + -\log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$\text{p}K_a$ ne kadar küçükse, asit o kadar kuvvetlidir.

GENEL TAMPONLAR

		Farklı formların moleköl ağırlığı		
Tampon	pK _a	Nötral form	HCl tuzu	Na ⁺ tuzu
H ₃ PO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pK _{a1})	2.12	98.0	-	120.0
Glisin (pK _{a1})	2.34	75.07	111.5	-
Sitrik asit (pK _{a1})	3.13			
Asetik asit	4.75	60.05	-	82.0
Sitrik asit (pK _{a2})	4.76	192.1	-	294.1
MES	6.15	195.2	-	217.2
Kakodilik asit	6.27			
H ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ (pK _{a1})	6.37	62.01	-	84.01
Sitrik asit (pK _{a3})	6.40			
Bis-Tris	6.50	209.2	245.7	-
ADA	6.60	190.2	-	212.1
Bis-Tris Propan (pK _{a1})	6.80	282.4	318.9	-
PIPES	6.80	302.4	-	325.3
ACES	6.90	182.2	218.7	-
İmidazol	7.00	68.1	104.5	-
BES	7.15	213.2	-	235.2
MOPS	7.20	209.3	-	231.2
NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (pK _{a2})	7.21	120.0*	-	142.0*
TES	7.50	229.3	-	251.2
HEPES	7.55	238.3	-	260.3
HEPPSO	7.80	268.3	-	290.3
Trietanolamin	7.80	149.2	185.7	-
Trisin	8.10	179.2	215.6	-
Tris	8.10	121.1	157.6	-
Glisin amid	8.20	74.1	110.6	-
Bisin	8.35	163.2	199.7	-

Glisilglisin (pK _{a2})	8.40	132.1	168.6	-
TAPS	8.40	243.2	-	265.3
Bis-Tris Propan (pK _{a2})	9.00	?	355.3	-
Borik asit (H ₃ BO ₃ / Na ₂ B ₄ O ₇)	9.24	61.8	-	201.24
CHES	9.50	207.3	-	229.3
Glisin (pK _{a2})	9.60	75.07	-	96.1
NaHCO ₃ / Na ₂ CO ₃ (pK _{a2})	10.25	84.01	-	105.99
CAPS	10.40	221.3	-	243.3
Piperidin	11.12			-
Na ₂ HPO ₄ / Na ₃ PO ₄ (pK _{a3})	12.67	142.0*	-	164.0*

Ortam pH'sının 7 ve 7'ye yakın değerlerde olduğu koşulda en geniş çapta kullanılan tamponlar **tris** ve **fosfat** tamponlarıdır.

Ek bilgi için Bkz. MBKY Kitabı Ek 9, 10, 11

İYONİK KUVVET

Bir tamponda yer alan iyonların derişimi ve yükü de moleküler biyoloji çalışmalarında önem taşır.

Fizyolojik iyonik kuvvet: 0.15-0.2 arasındadır!

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i$$

c_i = iyonun molar konsantrasyonu

z_i = iyonun yükü (işareti dikkate alınmaz)

Bazı Genel Tamponların Hazırlanması

Tampon	Stok Çözelti	Bileşenler	1 litre çözelti başına miktar	Stok çözeltinin konsantrasyonu	Son konsantrasyon
PBS (Phosphate Buffered Saline, tuzlu fosfat tamponu) pH ~7.3	10X	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄	80 g 2 g 11.5 g 2 g	1.37 M 27 mM 43 mM 14 mM	137 mM 2.7 mM 4.3 mM 1.4 mM
SSC pH ~7.0	20X	NaCl Sodyum sitrat	175 g 88 g	3 M 0.3 M	150 mM 15 mM
STE (Tuzlu Tris EDTA)	1X	Tris bazı NaCl EDTA (asit)	1.2 g 0.6 g 0.29 g	10 mM 10 mM 1 mM	10 mM 10 mM 1 mM
TAE (Tris asetat EDTA) pH ~8.5	50X	Tris bazı Asetik asit (glasiyel) EDTA	242 g 57.1 mL 37.2 g	2 M (Tris asetat) 0.1 M	40 mM (Tris asetat) 2 mM
TBE (Tris borat EDTA) pH ~8.0	10X	Tris bazı Borik asit EDTA	108 g 55 g 40 mL (0.5 M pH 8)	0.89 M 0.89 M 0.02 M	89 mM 89 mM 2 mM
TE (Tris EDTA) pH ~7.5	1X	Tris Bazı H ₂ EDTA (asit)	1.2 g 0.29 g	10 mM 1 mM	10 mM 1 mM

pH 7 ve yakınındaki değerlerde, en çok kullanılan tamponlardan biri olan fosfat tamponu geniş bir çalışma aralığı sağlamaktadır. Fosfat tamponu aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanır.

Gerekli alet/malzeme: Tartı, Karıştırıcı, Beher, pH metre (veya pH kağıdı), Erlen, Balon joje, Mezür, Pastör pipeti, Puar, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mw:156.01 g/mol), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mw: 268.07 g/mol), Distile su

Fosfat tamponunun hazırlanması

Stok Çözeltiler

A: 0.2 M NaH_2PO_4 (veya KH_2PO_4)

B: 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (veya $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

x ml A çözeltisi, y ml B çözeltisi ile karıştırılır ve son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.

pH	x	y	pH	x	Y
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	89.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

HAM EKSTRE HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Homojenizasyon aşamasında istenilen molekül grubunu (nükleik asit ya da protein) içeren doku veya hücrelerin çeper ve zar yapıları parçalanıp yok edilir. Elde edilen karışıma **homojenat** adı verilir. Hücre yapısı ortadan kalkmış olan homojenatta, serbest ya da organeller içerisindeki hücre bileşenleri (membran parçaları ve bir miktarda parçalanmamış hücrelerle birlikte) parçalanmanın yapıldığı ortamda dağılmış bir süspansiyon halinde bulunurlar. Uygun parçalama tekniği kullanılarak elde edilen homojenat, filtre edilerek veya santrifüjlenerek membran parçaları ve parçalanmamış hücrelerden ayrılır. Elde edilen karışıma **ham ekstre** adı verilir.

DENEY:

Önce yukarıdaki tablodan yararlanarak pH 7.2 olan 0.2 M Na fosfat tamponu hazırlayınız. Tamponu nasıl hazırladığınızı ayrıntılı bir şekilde yazınız.

0.2 M NaH_2PO_4 stok çözeltisinin hazırlanması:

.....g NaH_2PO_4 tartıldı. ml saf suda çözündürüldü. Son hacimml'ye tamamlandı.

0.2 M Na_2HPO_4 stok çözeltisinin hazırlanması:

.....g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartıldı. ml saf suda çözündürüldü. Son hacimml'ye tamamlandı.

pH 7.2 olması için:

..... ml 0.2 M NaH_2PO_4 stok çözeltisi ile

..... ml 0.2 M Na_2HPO_4 stok çözeltisi karıştırıldı.

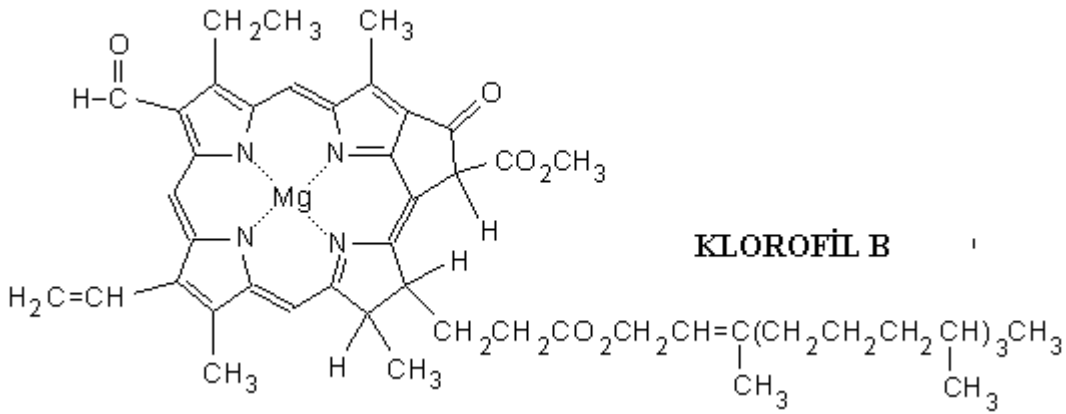
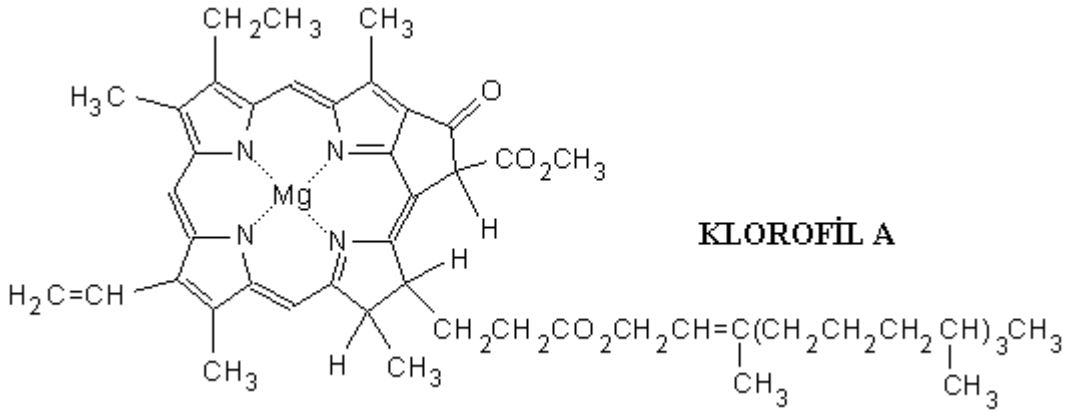
Son hacim ml'ye tamamlandı.

BİTKİLERDEN PİGMENT İZOLASYONU: KLOROFİL VE KAROTENOİD TAYİNİ

Bitkilerin temel fotosentetik pigmentleri iki gruba ayrılır: Klorofiller ve karotenoidler. Bu pigmentlerin ikisi de, kloroplastların içinde bulunur ve fotokimyasal olarak aktif fotosentetik biyomembranlar olan tilakoidlerdeki proteinlere bağlı olarak yerleşmişlerdir. Bitki dokusunun aseton veya metanol gibi çözücülerde parçalanması sonucunda bu pigmentler, proteinlerden bağımsız bir şekilde elde edilirler. Klorofil ve karotenoidler, organik çözücülerde kolaylıkla çözündüklerinden, biyokimyasal olarak lipidler sınıfına sokulmaktadır.

En çok görülen bitki pigmentleri olan klorofil a ve klorofil b yaklaşık olarak;

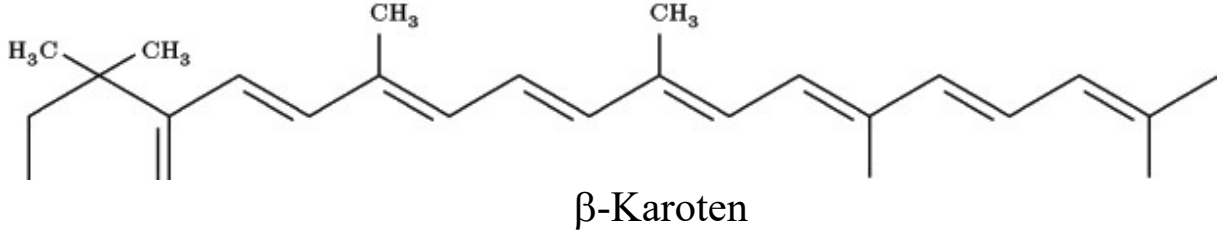
a:b = 3:1 oranında karşımıza çıkmaktadır. Canlı bitki hücrelerinde, klorofiller birincil fotosentetik pigmentlerdir, bu pigmentler ışığı mavi (450 nm) ve kırmızı bölgede (650-700 nm) absorplamaktadır. Işığın absorplanması, klorofil molekülünde bir elektronun eksite olmasını (uyarılmasını) sağlar, böylelikle de NADPH ve ATP üretimi ile fotosentetik sürecin başlaması için enerji sağlanmış olur. Elde edilen NADPH ve ATP bitki tarafından karbohidrat metabolizmasında kullanılır.



İkinci pigment grubu karotenoidler iki farklı tipte görülür:

1-karotenler: sadece karbon ve hidrojen içerirler.

2-ksantofiller: karbon, hidrojen ve oksijen atomlarını hidroksil veya epoksit işlevsel grupları formunda taşırlar. Bitkilerdeki karotenoidlerin yüzde bileşimi büyüme koşullarına bağlıdır.



Klorofil a ve klorofil b 400-475 ve 600-675 dalga boyları arasında maksimum absorpsiyon gösterir. Bu dalga boylarında görülen piklerin maksimum absorpsiyonları kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır: örneğin; dietil eter içinde klorofil a için yoğun absorpsiyon piki 660 ve 428 nm.'de görülürken, daha polar olan metanol içinde bu pikler 665 ve 432 nm.'ye kaymaktadır.

Karotenoidler klorofillerin aksine tek bir bölgede yoğun bir absorpsiyon gösterirler (350-500 nm.). Bu tip çalışmalarda elde edilen spektrofotometrik bilgi pigment tanımlanmasının yanında bir bitki ekstresindeki pigmentlerin konsantrasyonlarının da belirlenmesinde kullanılır.

GEREKLİ MALZEMELER:

- Bitki dokusu
- Aseton (%100)
- Havan
- Cam tozu
- Spektrofotometre
- Spektrofotometre küveti (cam; 1 ml)
- Susuz sodyum sülfat
- Filtre kağıdı

DENEYİN YAPILIŞI:

a) Pigmentlerin Ekstraksiyonu: Bu deney zayıf ışık altında tamamlanmalıdır. 0,5 g bitki dokusu alınır ve küçük parçalara ayrılır, havan içine yerleştirilir. 15 ml aseton ölçülür ve kap içine doldurulur, yaklaşık olarak 0,5 g cam tozu eklenir ve çözelti keskin yeşil bir renge alana kadar karıştırılır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra 1-2 g susuz sodyum sülfat ilave edilir, bu işlem ile su ekstreden uzaklaştırılır. Ekstre filtre kağıdından geçirilir ve hacmi ölçülür.

b) Pigment Konsantrasyonunun Hesaplanması: Ekstrenin klorofil ve karotenoid içeriğini belirlemek için çeşitli dalga boylarında (661.6, 644.8 ve 470 nm) ölçümler yapılmalıdır.

Pigment Konsantrasyonunun Hesaplanması:

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6}$$

$$C_{a+b} = 7.05A_{661.6} + 18.09A_{644.8}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.90C_a - 63.14C_b}{214}$$

C_a = Bitki ekstresindeki klorofil a konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_b = Klorofil b konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{a+b} = Total klorofil konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{x+c} = Total karotenoid konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

Kendi deneyiniz için aşağıdaki bilgileri doldurup sonucu belirtiniz.

ÇALIŞMA MATERYALİ:

MİKTARI: g

EKSTRAKSİYONDA KULLANILAN ÇÖZÜCÜ HACMİ: ml

EKSTRE HACMİ (filtreden geçirdikten sonraki hacim) : ml

$A_{661.6} = \dots\dots\dots$ $A_{644.8} = \dots\dots\dots$ $A_{470} = \dots\dots\dots$

$C_a =$

$C_b =$

$C_{a+b} =$

$C_{x+c} =$

Aynı deneyi tekrarlayan en az 2 arkadaşınızla birlikte 3 deneyin ortalamasını alarak ve STANDART SAPMASINI HESAPLAYARAK DENEY SONUÇ RAPORU hazırlayınız

ZEYTİNYAĞINDAN FENOLİK MADDE İZOLASYONU

Genel Bilgi:

Yapısında, oksijene bağlı doymamış 6 karbon halkası içeren bileşikler **FENOLİK** bileşikler olarak kabul edilir. Doğada, çok sayıda fenolik bileşik bulunur, örnek olarak; salisilik asit (aspirinin temel yapısını oluşturur) ve miristisin (hindistancevizine tadını veren kompleks bir fenol) verilebilir. Fenolik bileşiklerin bitkilerde birçok işlevi vardır, bunlar arasında; patojenlere ve herbivorlara karşı savunma bileşikleri olarak rol oynama (Tanninler, İsoflavanoidler), mekanik destek sağlama (lignin), tozlaştırıcıların çekimlenmesi (antosiyantinler), UV radyasyonun absorpsiyonu (flavonoidler) sayılabilir.

Zeytinyağı, yüksek antioksidan aktiviteye sahip birçok fenolik bileşik içermektedir (hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit vb.). Zeytinyağının kimyasal bileşimi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Zeytinyağının kimyasal bileşimi

Bileşen	En çok bulunan tür	Miktar
Yağ Asitleri	Oleik asit (C18:1)	% 55-83
	Palmitik asit (C16:0)	% 7.5-20
	Linoleik asit (C18:2)	% 3.5-21
Basit Fenoller	Sekoiridoidler, tirozol, oleuropein, hidroksitirozol	9- 752.3 mg/ml
Lignanlar	(+)-pinoresinol, (+)-1-asetoksinpinoresinol	0.65- 99.97 mg/ml
Flavonoidler	Luteolin, apigenin, kersetin	Belirlenmemiş
Karotenoidler	β -karoten, lutein	1- 20 mg/ml
Tokoferoller	γ - tokoferol, α - tokoferol	5- 300 mg/ml
Terpenoidler	Skualen	2.08- 6.52 g/ml
Fitosteroller	β -sitosterol, kampestrol	1- 2 g/ml

Zeytinyağında 9-800 mg/kg olarak bulunan fenolik bileşikler, yağın hazırlandığı meyvelerin ait olduğu ağacın alttürüne, meyvenin olgunlaşma evresine (meyve olgunlaştıkça fenolik içerik düşer), ezme prosesine ve yağın saklanma koşullarına bağlı olarak çok farklı derişimlerde olabilir.

Malzeme ve Yöntem:

Ticari olarak satın alınmış olan zeytinyağından (doğal sızma, Marmara Birlik) zeytinyağı fenolik fraksiyonunun (ZFF) elde edilmesinde aşağıdaki prosedür izlenecektir:

1. 10 g (9,5 ml) zeytinyağı 3 ml metanol (MeOH) ile ayırma hunisinde iyice çalkalanacak ve fazlar birbirinden ayrıldıktan sonra MeOH fazı (alt faz) ayrı bir kaba alınacaktır. Ekstraksiyon işlemi 3 defa tekrarlanacak ve MeOH fazları birleştirilecektir.
2. MeOH ekstresi 3 kez 15 ml hekzan ile ayırma hunisinde çalkalanarak hekzan fazına (üst faza) geçen yağ kalıntıları uzaklaştırılacaktır.
3. Ekstre vakumlu döner buharlaştırıcıda 40°C'da kuruluğa kadar buharlaştırılacaktır.
4. Ele geçen kuru ekstre ağırlığı belirlenecektir.

MeOH ekstresinin total fenolik içeriğinin belirlenmesinde Ragazzi ve Veronose (1973) tarafından geliştirilen yöntem kullanılacaktır. Fenolik madde standardı olarak kullanılan gallik asit (GA) stok çözeltisi 500 µg/ml derişimde hazırlanacak ve 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15.62 µg/ml, 7.8 µg/ml, ve 3.9 µg/ml'lik seri sulandırımı yapıldıktan sonra bir ml örnek veya standart üzerine 0.5 ml Folin belirteci (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) eklenecektir. Bu karışıma 3 ml Na₂CO₃ (200 g/l) katılarak tüp karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 5.5 ml deiyonize su eklenecek ve 1250 xg'de 5 dakika santrifüjlenecektir. Süpernatantın 725 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrede (µQuant, Bio-Tek) ölçülecektir.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Yöntemin uygulanması sonucunda elde edilecek olan, gallik asit standartlarına ait OD₇₂₅ değerleri absise, gallik asit standartlarının derişim değerleri ise ordinata konularak standart grafik çizilecek ve doğru denklemi oluşturulduktan örneklerin içerdiği fenolik madde miktarları standart grafiğe ait doğru denklemi yardımıyla hesaplanacaktır. Sonuç olarak kullanılan zeytinyağının fenolik içeriğinin gallik asit eşdeğeri (mg)/ kg olarak verilecektir.

C VİTAMİNİ (ASKORBİK ASİT) ANALİZİ

Bu vitamin vücutta hem redükte (askorbik asit) hem de okside (dehidro askorbik asit) şeklinde bulunur. Redükte olanı daha çoktur. Her iki şekli de vitamin karakterindedir. Alınanın bir kısmı idrarla dışarıya atılır. Diğer kısmı da (%50-75'i) metabolizmada inaktif hale geçer. Bu olay geri dönüşümsüzdür ve meydana gelen madde vitamin karakterinde değildir. CO₂ degradasyonu ile yıkılır gider. Diğer son ürün de okzalik asittir. C vitamininin insan vücudundaki yarı ömrü 16 gündür.

Askorbik asit, , meyveler ve genellikle sebzelerde özellikle turunçgiller, yeşil biber, domateste büyük miktarlarda bulunur. Pişirme işlemi sırasında gıdalarda bulunan askorbik asitin yüzde 50'sinden fazlası parçalanır. Günlük alınması önerilen miktar 35-80 miligramdır. İnce barsaktan glukoza benzer biçimde hızlı ve kolay emilir. C vitamini pek çok reaksiyona katılmaktadır.

C vitamini eksikliğinde ortaya çıkan başlıca hastalık skorbüttür. İnsanlarda C vitamininden yoksun gıdalarla beslenildiğinde, ,

- Halsizlik
- Ateş ve enfeksiyona karşı direncin düşmesi,
- Diş etlerinde şişme ve iltihaplanma, kanama gözlenir.

C Vitamini Fazlalığı

- En sık görülen etkisi ishaldir.
- Karın ağrısı,
- İdrarda yanma,
- Aynı şekilde vitamin C idrarı asitleştirdiği için idrar yollarında oksalat taşlarının çökmesine neden olabilir.

C Vitamini Gereksinimi (günde)

0 - 1 Yaş	35 mg
1 – 14	50mg
14 yaş üzeri	60 mg
Gebe kadınlar	80 mg
Emziren anneler	100 mg

C Vitamini Doğal Kaynakları

Taze meyve ve meyve suları ile sebzelerde bol miktarda bulunur. Besinlerin pişirilmesi sırasında önemli oranda yitirilir.

Kaynak	Miktar (mg/100g)
Siyah üzüm	200
Narenciye	50
Çilek	60
Kavun, karpuz	20
Yeşil biber	100
Maydanoz	150
Brokoli, B.Lahanası Çiğ	100
Havuç	6
Soğan	10
Çiğ bezelye	25
Pişmiş bezelye	10

DENEY:

BESSEY'İN MODİFİYE TİTRİMETRİK YÖNTEMİ İLE C VİTAMİNİ TAYİNİ

Yöntem meyve sularında C vitamini tayini için düzenlenmiştir.

Prensip:

2,6-diklorofenol indofenol ile askorbik asit arasındaki oksidoredüksiyon reaksiyonuna dayanır. 2,6-diklorofenol indofenol (pembe), askorbik asit tarafından renksiz löko türevine indirgenirken, askorbik asit dehidroaskorbik aside yükseltgenir. 2,6-diklorofenol indofenol aynı zamanda indikatör görevi yapar. Titrasyonun sona erdiği 2,6-diklorofenol indofenol'ün pembe renginin sabit kalması ile anlaşılır. Titrasyon ortamında asetik asit veya metafosforik asidin bulunması gerekmektedir. Çünkü bu asitler; bazı metal iyonlarının katalize ettiği aerobik oksidasyonu inhibe eder; enzimleri inaktive ederler; proteinleri çöktürerek proteine bağlı askorbik asidi serbestleştirirler.

Gerekli Alet/Malzeme:

- Büret, Erlenmeyer, mezür, beher, tüpler, porttüp
- Distile su
- Askorbik asit standardı (1mg/ml $\equiv$ %100)
- Glasiyel asetik asit
- 2,6 diklorofenol indofenol (% 0,1)

DENEYİN YAPILIŞI:

10 ml askorbik asit standart çözeltisi (1mg/ml $\equiv$ %100) Erlenmeyere konulur, üzerine 25 ml glasiyel asetik asit ilave edilir. Bürete konulan indefenol çözeltisi ile pembe renk 5 saniye süreyle sabit kalıncaya kadar titre edilir. Bu şekilde 1 mg askorbik aside eşdeğer boya çözeltisi miktarı bulunur.

10 ml'deki askorbik asit miktarı = 10 mg

10 mg askorbik asit için kullanılan indofenol miktarı =X ml ise

1 mg askorbik asit için kullanılan indofenol miktarı = 1.X/10 = A ml

A: 1 mg askorbik aside eşdeğer indofenol miktarı (mg/ml)

10 ml örnek Erlenmeyere konur. Üzerine 25 ml glasiyel asetik asit çözeltisi eklenir. İndofenol çözeltisi ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilir.

(Deney en az 3 kez tekrarlanarak hesaplamada ortalama sarfiyatlar kullanılacak ve standart sapma değerleri hesaplanacaktır.)

HESAPLAMA:

$$\% (100 \text{ ml' de mg C vit.}) \text{ C vitamini} = \frac{\text{Titrasyonda kullanılan indofenol çözeltisi (V ml)}}{A \text{ (mg/ml)}} \times 10$$

SONUÇLAR

ÖRNEK:

$$X_1 = \quad X_2 = \quad X_3 = \quad X_{\text{ort}} =$$

$$A_1 = \quad A_2 = \quad A_3 = \quad A_{\text{ort}} =$$

$$V_1 = \quad V_2 = \quad V_3 = \quad V_{\text{ort}} =$$

$$(\%C)_1 = \quad (\%C)_2 = \quad (\%C)_3 = \quad (\%C)_{\text{ort}}$$

%C vitamini

Ölçüm				Ortalama=
X-X _{ort}				
(X-X _{ort}) ²				Toplam:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_0 - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Standart sapmalı sonuç=

SABUN ERIYİĞİNDE YAĞ ASİTLERİNİN ARANMASI

Sabunlar, karbon sayısı 6'dan fazla olan yağ asitlerinin alkali metallerle yaptıkları tuzlardır. Bu tuzlara kuvvetli mineral asitlerin etkisi sonucu tekrar serbest yağ asitleri elde edilir.

Deney:

Vida kapaklı cam tüp içindeki 1 ml sabun eriyiğı üzerine 1 ml 1N H₂SO₄ eklenirse suda çözünmeyen saf yağ asitleri beyaz bir tortu oluşturur. Bu karışımın üzerine 1-2 ml eter ilave edilir ile kuvvetlice çalkalanır. Yağ asitleri eter fazına geçerek burada çözünür. Üstte kalan eter fazına süzgeç kağıdı daldırılır ve sonra kağıt havada kurutularak eterin uçması sağlanır. Eter uçtuktan sonra kağıtta butirik asit, kaproik asit gibi uçucu yağ asitlerinden ileri gelen acılaşmış tereyağı kokusu duyulur.

Katı sabun oluşumunun genel reaksiyonunu yazınız:

YAĞ ASİTLERİNİN ESTER OLUŞTURMA REAKSİYONUNUN GÖZLENMESİ

Yağ asitlerinin karboksil grupları alkolle geri dönüşümlü olarak esterleşebilir. Esterleşme kendiliğinden yavaş, fakat yüksek sıcaklıkta veya hidrojen iyonu varlığında hızlı olur.

Deney:

Bir deney tüpüne 1 ml saf etil alkol, 1 ml asetik asit ve 1 ml derişik H_2SO_4 konulup birkaç dakika beklenir (*Dikkat! Derişik asit cam pipetle transfer edilir ve asla ağızla çekilmez!*) Karışım, içerisinde saf su bulunan bir behere dökülürse, asetik asit ile etil alkol arasında ester bağı oluşması nedeniyle asetik asitin iğneleyici kokusunun yerini asetik asidin etil esterinin hoş, meyve esansı kokusu alır.

Asetik asidin etil alkol ile esterleşme reaksiyonunu yazınız:

SDS PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Elektroforez bir elektrik alanda yüklü moleküllerin ayrılması için kullanılan bir yöntemdir. Jel elektroforezi ise porlu bir destek ortam kullanılarak, moleküllerin yük, büyüklük ve konformasyon farklarına göre ayrılması tekniğine dayanmaktadır.

Jel elektroforezi kullanılan destek ortamın türüne göre iki başlıkta toplanabilmektedir.

1-Agaroz Jel Elektroforezi

2-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Agaroz jelin ayırma gücü poliakrilamid jele göre daha düşüktür. Agaroz Jel Elektroforezi yatay bir sistem üzerinde gerçekleştirilirken poliakrilamid jelde dikey bir jel düzeneği kullanılmaktadır. Agaroz Jeller soğuyarak jel haline gelirken poliakrilamid Jeller polimerleşme reaksiyonu ile meydana gelmektedir.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE); SDS poliakrilamid jel elektroforezi proteinlerin analizi açısından çok güçlü bir yöntemdir. Prensip olarak suda çözülmeyenler de dahil olmak üzere, bütün proteinlerin ayrımı için kullanılabilir.

Zar proteinleri, hücre iskeletinin protein bileşenleri ve daha büyük hücresel topakların bileşenlerini oluşturan proteinlerin hepsi bu yöntemle ayrılabilir. Proteinler moleküler ağırlığına dayalı olarak bir poliakrilamid jeli içinde ayrılır.

Proteinler amfoterik molekküllerdir, yani hem pozitif hem de negatif yüklere sahiptirler. Proteinleri tek yönlü hareket ettirebilmek için, üzerlerine düzgün bir şekilde negatif yük yaratılır. Proteinler SDS ile karıştırıldığı zaman net bir negatif yük alırlar. SDS proteinleri denatüre eder ve denatürasyon sonrasında bütün proteinler benzer yapı gösterir. Ayrıca anyonik bir deterjan molekülüne bağlanma sonucu, bütün proteinler homojen bir biçimde dağıtılmış negatif yüke sahiptir.

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sistemlerinde kesintili bir jel sistemi kullanılır. Örnekler öncelikle yükleme jeli boyunca dar bir alanda konsantre edilir. Yükleme jelinin konsantrasyonu ve pH'ı daha düşüktür. Düşük konsantrasyon sayesinde porlar daha büyük, moleküler eleme etkisi daha düşüktür. Örnekler yürütme jeline girdikten sonra ise büyüklüklerine göre ayrılırlar. Yürütme jelinin konsantrasyonu ve pH'ı daha yüksektir.

Jel Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar;

Akrilamid; Jel polimerinin monomeridir. Serbest radikal polimerizasyonu ile polimerize olur.

N,N'-metilen-bis (Akrilamid); Çapraz bağlayıcı ajandır. Jelleşmeyi sağlar.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat); Proteinleri denatüre eder ve üç boyutlu yapılarını bozarak proteinleri doğrusal hale getirir.

Tetrametilendiamin (TEMED); Serbest radikalleri kararlı hale getirir.

Amonyum Persülfat (APS); Serbest radikallerin kaynağıdır ve jel oluşumunu başlatır.

Gliserol; Örnekler yoğunluk vermek için kullanılır.

β -Merkaptoetanol; Denatürasyona yardımcı olur ve disülfid bağlarını kırar.

Tris

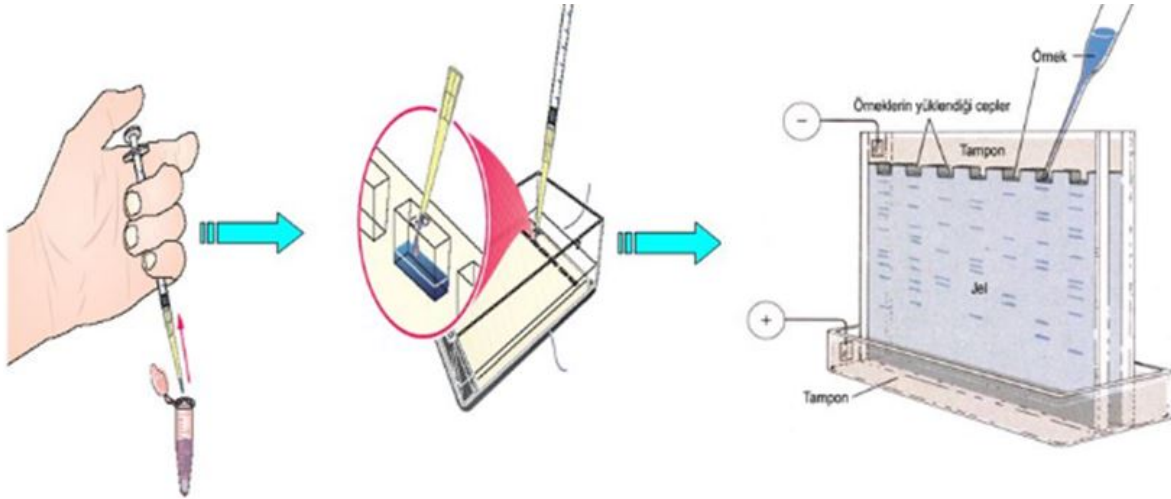
Brom fenol mavisi

TCA (Trikloroasetik asit)

Coomassie

Glasiyel asetik asit

Yürütme ve Yükleme Jellerinin Hazırlanması;



Yükleme Ve Elektroforez İşlemi

- Öncelikle dikey elektroforez sistemi hazırlanır. Jelin döküleceği camlar temizlenir ve düzenek kurulur.
- İlk olarak yürütme jeli olmak üzere jeller hazırlanır.
- Yürütme jeli için kullanılacak maddelerden APS ve TEMED hariç diğer maddeler belirlenen miktarlarda temiz bir behere koyulur.
- Koyulan maddeler iyice karıştırıldıktan sonra APS ve TEMED eklenir.

- Elde edilmiş olan karışım hızlı bir şekilde camlar arasına mikropipet yardımı ile dökülür. Hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilir.
- Jel dökümü bittikten sonra, distile su yürütme jelinin üzerine dökülerek jelin hava almaması sağlanır.
- Jelin polimerleşmesi için yaklaşık olarak 30-40 dk kadar beklenir.
- Yürütme jeli hazır olduktan sonra aynı işlemler yükleme jeli için de gerçekleştirilir.
- Yürütme jeli yüklendikten sonra camların ara kalınlığına uygun olarak taraklar yerleştirilir.
- Yükleme jeli donduktan sonra taraklar yavaşça çıkarılır ve jel elektroforez aparatına yerleştirilir.
- Jel tankına elektroforez tamponu ilave edilir.
- İstenilen miktarda protein örneği, belli miktar yükleme tamponu ile karıştırılarak 3 dakika kadar kaynatılır.
- Kaynayan örnekler dikkatli bir şekilde kuyucuklara yüklenir.
- Yükleme bittiğinde jel tankının kapağı kapatılarak güç kaynağının bağlantıları yapılır.
- Örnekler yükleme jeli boyunca 80V'da, yürütme jeline geçildiğinde ise 120V'da yürütülür.
- Yürütme bittiğinde jel önce boyama çözeltisine alınır ve belli bir süre de inkübe edilir.
- Boyama çözeltisinden alınan jel arındırma çözeltisinde bir süre inkübe edilir.
- İnkübasyon boyunca arındırma çözeltisi sürekli yenilenir.
- Jel boyadan arındığında ise arındırma çözeltisinden çıkarılır ve görüntüleme cihazında beyaz ışık altında bantlar gözlemlenir.

ENZİMLERİN İZOLASYONU

Bunun için her şeyden önce en uygun enzim kaynağı seçilir. Bu kaynak belli bir bitki, hayvan veya mikroorganizma olabilir. Kaynak bol ve ucuz olmalıdır. Kaynak olarak seçilecek organizmanın izole edilecek enzimi bol ve aktif olarak ürettiği daha önceden bilinmesi gereklidir. İzole edilecek enzimin intraselüler veya ekstraselüler olup olmadığı ile bitkisel ve hayvansal kaynaktan elde edilecek enzimin hangi organ ya da dokuda lokalize olduğu konularında ön bilgilerine sahip olunmalıdır.

İntraselüler enzimlerin izolasyonu için her şeyden önce hücre duvarı ve ilgili membranların belli tekniklerle parçalanması ve böylece de hücre içeriğinin enzimlerle birlikte dışarı alınması gereklidir. Ekstraselüler enzimlerin izolasyonunda ise böylesi bir aşamaya gerek yoktur çünkü ekstraselüler enzimler hücrenin bulunduğu ortama salınmaktadır. Örneğin; mikroorganizmalar ekstraselüler enzimlerini, direkt olarak geliştikleri kültür ortamına salgılamaktadırlar. İzolasyon aşaması ekstraksiyon, enzim çözeltisinin ayrılması ve konsantre edilmesi gibi alt işlemleri içermektedir.

EKSTRAKSİYON

Enzim üretimi için bir hayvansal kaynak kullanılacak ise ilk önce ilgili organlar toplanıp, düşük sıcaklıklarda üretim birimine taşınır ve çok kısa süreler için depolanır organ dondurulma öncesinde yağları ve bağ dokularından temizlenir. Dondurulmuş organ doğranır ve /veya kıyılır ve uygun bir tampon çözeltisi içinde ekstrakte edilir. Organ içine tutulan yağlar uygun bir organik çözücü kullanılarak uzaklaştırılabilir. Emmekte olan buzağılardan şirdeninden elde edilen rennet enzimi için yukarıda açıklanan yöntemden daha farklı ve özel bir yol izlenmektedir. Enzim üretimi için bir bitkisel materyalin (kök, gövde, tane, bitki özsuğu vb.) kullanımı söz konusu olduğunda materyal katı ise önce bir parçalama, kıyma, veya öğütme işleminde gerekebilir. Kıyılmış parçalanmış veya öğütülmüş materyal uygun bir tampon çözelti içinde ekstraksiyon işlemine geçilir.

Enzim üretiminde mikroorganizmalardan yararlanılması durumunda ise ilk önce amaca uygun mikroorganizma tür ve hatta suşun belirlenip seçilmesi gereklidir. Bunun da ötesinde enzim üretim amacıyla genetik işlemlerden geçirilerek özel karakterler kazandırılmış mikroorganizma suşlarında seçilip kullanılabilir. Mikroorganizma seçimini bu mikroorganizmanın uygun bir sıvı ortamda ve koşullarda geliştirilmesi ve kültürlerinin elde edilmesi takip eder. Her mikroorganizmanın belirli koşullar altında enzimlerini en fazla olarak

biriktirdiği bir üreme dönemi vardır. Bakteriler genel olarak enzimlerini üremenin özellikle logaritmik sabit dönemleri ile ölüm döneminin başlangıcında biriktirme eğilimindedirler. Buna göre de izole edilecek enzimin belirli koşullar altında en fazla biriktirildiği üreme döneminin daha önceden belirlenmesi yararlı olacaktır. Ekstraselüler enzimler üremenin genellikle logaritmik fazında yüksek düzeylere eşmektedir. Enzim intraselüler ise mikroorganizma kültürüne veya kültürden ayrılan hücre süspansiyonuna uygun bir hücre duvarı parçalama işlemi uygulanmalıdır. Hücre süspansiyonuna uygulanan başlıca mekanik yöntemler; yüksek basınç homojenizasyonu, yüksek hızda karıştırılan boncuklar varlığında yaş ezme işlemi, ultrasonik vibrasyon uygulaması şeklinde sıralanabilir. Mekanik olmayan yöntemler ise; hücre duvarının yüksek sıcaklık uygulanarak yıkılması, hücre kültürünün dondurularak kurutulması ve aseton tuzlarını hazırlama ile hücre içeriğinin dışarı alınması, lizozim enzimi kullanılarak hücre duvarının yıkılması, deterjan veya antibiyotik uygulamasıyla hücre duvarının parçalanması örnek gösterilebilir.

Hücrelerin Parçalanması

Alkali ile Muamele: Mikroorganizma hücreleri pH 11–12 olan alkali ortamda 20-30 dakika inkübe edildiğinde hücre membranı parçalanmakta ve membrana bağlı komponentler de serbest hale geçmektedir. Bu yöntem daha çok terapötik enzimler için uygundur.

Lizozim ve EDTA ile Muamele: Lizozim hücre membranında bulunan beta 1–4 glikozit bağınyı parçalar. Ortama EDTA katıldığında gram negatif bakterilerin membranı da parçalanır. EDTA zarın stabilitesi için esas olan iki değerlikli katyonlar ile şelat oluşturur ve lizozim etkisine olanak sağlar.

Deterjanlar ile Muamele: Deterjanlar membranlardaki lipoproteinleri çözer ve membran geçirgen hale geçer

Soğuk Şok: Mikroorganizma hücrelerinin normal büyüme sıcaklığından ani olarak 0°C'ye soğutulmalarına soğuk şoku denir. Büyük ölçekli üretimler için uygun bir yöntem değildir.

Osmotik Şok: yöntem, mikroorganizmaların besi ortamı komponentlerinden tamamen kurutuluncaya kadar uygun bir tamponla yıkanması ve ardından %20 sakkaroz çözeltisinde yeniden dağıtılması esasına dayanır. Osmotik şok gram pozitif bakterilerin ürettiği enzimler için uygun değildir.

Ultrasound: Ultrasound (20kHz den daha yüksek frekanslı sesler) 1950 den beri hücrelerin parçalanmasında kullanılan bir tekniktir. Dondurma ve Çözündürme: Genelde bu uygulama yalnız başına iyi bir sonuç vermez. Dondurma ve çözme enzimde yapısal değişikliklere neden olduğu için verim düşüşüne neden olur.

Katı Kırma: Hücre parçalanmasında endüstriyel boyutta ilk kullanılan tekniktir. Maya pastası ve kieseler karıştırılıp karışıma hidrolik basınç uygulanmıştır.

Sıvı Kırma: Bugün için endüstriyel boyutta en verimli tekniktir ve iki şekilde uygulanır. Yüksek basınç homojenizatörü ve Küreli değirmenler. Yüksek basınç homojenizatöründe mikroorganizma hücrelerinin parçalanması için süspansiyon 560 kg/cm² değerine kadar çıkabilen basınç altında bir iğneden geçmeye zorlanır. İğneyi terk eden süspansiyon atmosfer basıncı ile karşılaşır. Bu basınç farkı hücrelerin parçalanmasına neden olur. Küreli Değirmenlerde ise; kürecik çapı 0,3-1,0mm arasında değişen cam veya alüminyum oksitten yapılmış değirmenlerde hücreler öğütülür. Bu mekanik işlem sırasında açığa çıkan enerji kararlılığı düşük enzimler için problem yaratır. Süspansiyonun etkin bir şekilde soğutulması gerekir.

ENZİM ÇÖZELTİSİNİN AYRILMASI

Bitki veya hayvan organ ekstraktları ile mikroorganizma kültürlerinin elde edilmesinde sonraki ortak aşama enzimlerin bu ortamdan ayrılması işlemidir. Kültür sıvısına geçmiş enzimlerin bu ortamdan ayrılması işlemidir. Kültür sıvısına geçmiş enzimler bu sıvı ortamlardaki hücre kırıntıları (intraselüler enzim eldesinden arta kalan materyal) veya hücreler ile hif gibi yapılardan (ekstraselüler enzimlerden arta kalan materyal) filtrasyon veya santrifügasyon gibi tekniklerden birisi uygulanarak ayrılabilir.

ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Oksidanlar başta proteinler, lipitler, DNA ve karbohidratlar olmak üzere biyomolekülleri doğrudan veya dolaylı hasara uğratma yeteneği bulunan reaktif oksijen türleri (ROT) dir. Süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) gibi ROT'lar çeşitli in vivo koşullarda oluşabilirler. Metabolizmanın normal işleyişi sırasında, gerek elektronların elektron transport zinciri boyuncaki akışıyla, gerekse NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz, glukoz oksidaz, sitokrom P450 enzimleri ve siklooksijenazlar gibi oksidoredüktazların aktivitesiyle oluşan ROT'lar hücre ve dokuları biyolojik hasara uğratabilirler. Hücre ve dokular da bu hasarı önlemek için ROT'ları süpürmeye ve yok etmeye çalışırlar. Genel olarak antioksidan savunma olarak adlandırılan bu savunma sisteminde çeşitli enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), peroksiredoksin, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri) ve antioksidan bileşikler [askorbik asit, tokoferoller, indirgenmiş glutatyon (GSH), bilirubin, karotenler, ürik asit, ubikinon vb] görev alır.

ROT'ların yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi reperfüzyon, inflamasyon, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları gibi birçok patolojik durumda etken rol oynadığı kabul edilmektedir. Günümüzde, organizmada oluşam oksidatif strese karşı önlem almak üzere ve/veya etiyopatolojisinde serbest radikallerin yer aldığı bilinen hastalıkların tedavisi amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır.

Diyetle birlikte alınan polifenolik bileşikler, E vitamini ve karotenoidlerin, oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde en etkili antioksidanlar olduğu saptanmıştır. Bu yüzden son yıllarda antioksidanlarla yapılan çalışmalarda artış gözlenmektedir.

Çalışmalar genellikle antioksidan kapasiteyi belirlemeye yöneliktir ve antioksidan aktiviteyi belirlemede birçok yöntem kullanılmaktadır. *In vitro* antioksidan aktivite deneyleri iki kategoride değerlendirilebilir: **1- hidrojen atomu transfer reaksiyonlarını içeren aktivite testleri** [ORAC (oksijen radikali absorbans kapasitesi), linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu, TRAP (total radikal tutuklama antioksidan parametresi)] **2- elektron transfer reaksiyonu temelli aktivite testleri** [FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan parametresi), DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil)]. Bilinen tüm aktivite tayini protokollerinin taşınması gereken özellikler:

- a) biyolojik olarak bilinen bir substratı seçmeli
- b) çeşitli oksidasyon koşullarını test etmeli
- c) hem başlangıç, hem ikincil oksidasyon ürünlerini ölçmeli
- d) antioksidanları, aynı konsantrasyondaki aktif yapıtaşı ile karşılaştırmalı
- e) yüzde inhibisyonu veya IC_{50} (%50 inhibisyona neden olan antioksidan konsantrasyonu) değerini belirlemeli

DPPH Yöntemi

DPPH stabil ve ticari olarak elde edilen azot radikalidir ve 515 nm’de maksimum absorbanza sahiptir. Aktivite testi sırasında, örnek aktifse (DPPH’nin indirgenmesine yola açıyorsa) zamanla hazırlanan karışımın renginde açılma gerçekleşir.

Gerekli Malzemeler ve Alet:

Antioksidan aktivitesi ölçülecek materyal (örneğin, bitki ekstresi)

DPPH (1,1-difenilpikrilhidrazil) reaktifi: $[2 \times 10^{-4}$ M DPPH metanol (MeOH) içinde hazırlanır]

Metanol (MeOH),

Referans antioksidan (C vitamini)

Distile su,

Spektrofotometre

Deneyin Yapılışı:

5 farklı konsantrasyonda örnek çözeltileri (antioksidan aktivitesi belirlenecek madde) ve C vitamini (referans antioksidan) çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan ekstreler ve C vitamini ölçüm yapılacak kapta, DPPH reaktifi ile aşağıdaki oranlarda karıştırılır ve oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (50 devir/dak), 10 dak bekletilir.

KÖR ÖRNEK: 1 hacim çözücü: 4 hacim DPPH reaktifi

(96 kuyucuklu microplate için her bir kuyucukta

40 µl organik çözücü veya distile su + 160 µl DPPH)

ÖRNEK: 1 hacim örnek çözeltisi: 4 hacim DPPH reaktifi

(96 kuyucuklu microplate için her bir kuyucukta

40 µl örnek + 160 µl DPPH)

C VİTAMİNİ: 1 hacim C vitamini çözeltisi + 4 hacim DPPH reaktifi

(96 kuyucuklu microplate için her bir kuyucukta

40 µl C vitamini çözeltisi + 160 µl DPPH)

ÖRNEKLER RENKLİ İSE RENKTEN İLERİ GELEN ABSORBANS BULUNUR.

RENK: 1 hacim çözücü + 4 hacim MeOH

(96 kuyucuklu microplate için her bir kuyucukta

40 µl çözücü + 160 µl MeOH

Spektrofotometrik Ölçüm:

Karışımların spektrofotometrede 515 nm’de absorbansları ölçülür ve aşağıdaki tabloda yerine yerleştirilir.

	Örneğin absorbansı*	C vitamininin absorbansı*	Örneğin GERÇEK absorbansı**
Konsantrasyon I			
Konsantrasyon II			
Konsantrasyon III			
Konsantrasyon IV			
Konsantrasyon V			

* Absorbans değerleri en az 3 ölçüm değerinin ortalaması alınarak kaydedilecektir.

** Örneklerin absorbans değerlerinden, renkten ileri gelen absorbans değerleri çıkartılır ve elde edilen sonuçlar örneklerin gerçek absorbansı olarak kullanılır.

HESAPLAMA:

$$\% \text{ inhibisyon} = 1 - \frac{\text{Abs örnek (veya C vit.)}}{\text{Abs kör örnek}}$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri ile bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak çizilen standart grafik yardımı ile % 50 inhibisyona karşılık gelen konsantrasyon hesaplanır ve bu değer antioksidan aktivitenin yorumlanabilmesi için C vitamini ile karşılaştırılır.

SONUÇLAR:

% inhibisyon (X₁)=

% inhibisyon (C₁)=

% inhibisyon (X₂)=

% inhibisyon (C₂)=

% inhibisyon (X₃)=

% inhibisyon (C₃)=

% inhibisyon (X₄)=

% inhibisyon (C₄)=

% inhibisyon (X₅)=

% inhibisyon (C₅)=

KAN VE İDRAR ANALİZLERİ

HEMOGLOBİN MİKTAR TAYİNİ

Deneyin prensibi: Hemoglobinden potasyum ferri siyanür ile methemoglobin, methemoglobinden de potasyum siyanür ile siyanmethemoglobin oluşur. Bu madde 540 nm.de max absorpsiyon yapmaktadır.

Gerekli malzemeler/aletler:

Kan örneği, siyanomethemoglobin reaktifi (potasyum siyanür, sodyum karbonat, potasyum ferrisiyanür), deiyonize su, spektrofotometre, cam küvet

Siyanmethemoglobin reaktifinin hazırlanması:

- 5 mg potasyum siyanür
- 0,1 gr sodyum karbonat
- 20 mg potasyum ferrisiyanür

Deiyonize su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı:

Kör ve örnek aşağıdaki tabloya göre siyanmethemoglobinle işleme sokulur. Örneğe ait absorbans değeri 540 nm'ya ayarlanmış bir spektrofotometrede köre karşı okunur.

	KÖR	ÖRNEK
ÖRNEK	-	0,01 ml
SİYANMETHEMOGLOBİN	2,5 ml	2,5 ml
DİSTİLE SU	0,01 ml	-

Deney en az 3 kez tekrarlanarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplamaya geçilir.

$$C_{\text{örnek}} (\text{g/dl}) = A_{540\text{-örnek}} \times 36,77$$

SONUÇLAR:

$$(1.) A_{540} = \quad (2.) A_{540} = \quad (3.) A_{540} =$$
$$C_1 = \quad C_2 = \quad C_3 =$$

Hemoglobin konsantrasyonu

Ölçüm				Ortalama=
X-X _{ort}				
(X-X _{ort}) ²				Toplam:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_0 - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Standart sapmalı sonuç=

İDRAR ANALİZİ

Gerekli malzemeler/aletler:

- Santrifüj
- Santrifüj tüpü
- Maşa
- İsperto ocağı
- %3'lük asetik asit
- % 20 sülfosalisilik asit
- Nitrik asit
- Fehling ayıracı (%50 Fehling I , %50 Fehling II)

(Aşağıda verilen deneyler en az üç kez tekrarlanmalıdır.)

Protein arama deneyleri : İdrarda protein arama deneyleri yapılmadan önce idrarın süzülmesi veya santrifüj edilmesi gerekir.

1) Kaynatma deneyi: Bir tüpün yarısına kadar idrar doldurulur. Tüp idrarın üst seviyesi civarından kaynatılır. Isıtılan kısmında bulanıklık olması üç sebepten ileri gelir.

- Protein
- Karbonat
- Fosfat , bulanıklığın bu maddelerin hangisinden ileri geldiğini anlamak için üzerine birkaç damla %3'lük asetik asit damlatılır. Bulanıklık kaybolmazsa idrarda protein vardır. Kaybolursa fosfat yada karbonatlardan ileri gelmiştir.

2) Sülfosalisilik asit deneyi: Tüpe bir miktar idrar (yaklaşık 1/4) konur, birkaç damla %20 sülfosalisilik asit damlatılır. Bulanıklık meydana gelmezse protein yoktur. Bulanıklık olursa ya proteinlerden ya da albümoz ve peptonlardan ileri gelmiştir. Bunları birbirinden ayırmak için tüp ısıtılır. Bulanıklık kaybolmazsa proteinlerden, kaybolursa albümoz ve peptonlardan ileri gelmiştir.

3) Heller'in halka deneyi : Tüpe bir miktar idrar konur. Tüpü eğik tutarak kenarından damla damla HNO_3 akıtılır. HNO_3 'ün yoğunluğu idrarın yoğunluğundan daha fazla olduğundan kendisi dipte toplanıp idrarı yukarı doğru kaldırır. İdrar ile HNO_3 'ün birleşme yüzeylerine bakılır. İkisi arasında beyaz renkli bir halka oluşumu proteinlerin varlığını gösterir.

ŞEKER ARAMA DENEYİ

Fehling deneyi:

Bir deney tüpüne eşit miktarda Fehling I ve Fehling II çözeltisi konur ve çalkalanır. Koyu mavi renkli bir çözelti meydana gelir. Bu iki çözelti karışımı “Fehling Ayıracı” adını alır. Açık alevde kaynatılır. Rengi değişmezse ayıraç temizdir. İçinde indirgen maddeler bulunmuyor demektir. Bu kontroller yapıldıktan sonra üzerine damla damla idrar katılarak kaynatma sürdürülür. İdrarda fazla şeker varsa sarı ya da kiremit rengi bulanıklık ya da çökelti görülür. Şeker az miktarda ise, Fehling ayıracının hacmine eşit olacak miktarda idrar katılır. Sarı ya da kırmızı çökelti meydana gelirse şeker vardır. Deney şu şekilde de yapılabilir: Fehling ayıracı ve Fehling ayıracına eşit hacimde idrar ayrı ayrı kaynatıldıktan sonra bu iki kaynak sıvı birbiriyle karıştırılır. İdrarda yeterli miktarda şeker varsa yine pozitif bir sonuç alınır.

ÖRNEK HAKKINDA KISA BİLGİ:

DENEY SONUÇLARI:

YORUMLAR:

NÜKLEİK ASİTLERİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ VE DENATÜRASYONUN UV ABSORPSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm boyunda maksimum absorpsiyon gösterir. Bu nedenle 260 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Çift zincirli DNA molekülleri için 1 optik dansitenin (O.D.) 50 µg/ml’ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50$$

A₂₆₀ daki değerler DNA ve RNA’yı birbirlerinden tam olarak ayırt etmeye yetmez. Bununla beraber 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran, nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bunun yanı sıra proteinler de 280 nm de absorpsiyon özelliği gösterirler, bu nedenle 280 nm de ölçülen bir değerdeki artış A₂₆₀/A₂₈₀ oranında düşmeye neden olur. Saflaştırılmış DNA’da A₂₆₀/A₂₈₀ oranı yaklaşık 1.75-1.80’in üzerinde olmalıdır.

DNA çözeltileri ısı, alkali, organik çözücüler gibi denatüre edici ajanlarla muamele edilirse, U.V absorblama özellikleri büyük oranda artar. Şekilde sıcaklıkla, DNA’nın U.V’yi absorblama özelliği arasındaki bağlantı gösterilmektedir. Bu grafik ‘termal denatürasyon eğrisi’ olarak adlandırılır. Her bir absorpsiyon artışının orta noktasına denk gelen sıcaklık T_m (geçiş sıcaklığı veya erime sıcaklığı) olarak adlandırılır. Absorpsiyonun artışı ise ‘hiperkromik etki’ olarak adlandırılır. Absorpsiyondaki değişimler, düzenli çift zincirli DNA yapısının denatüre bir duruma veya rastgele eşleşmemiş DNA zincirlerine dönüşmeleri sonucunda ortaya çıkar. Doğal DNA solüsyonunda çift zincirli DNA molekülleri bulunur. Zincirler birbirinin tamamlayıcısı baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları tarafından bir arada tutulur. Baz çiftleri arasındaki hidrofobik ve π-π etkileşimleri de bu çift zincirli yapıyı kuvvetlendirmektedirler. Bu kuvvetleri (hidrojen bağı, hidrofobik ve π-π etkileşimleri) bozan ajanlar, çift zincirli yapının çözülmesine veya ayrılmasına neden olur. Rastgele sarmal oluşumlarında baz-baz etkileşimleri en az düzeydedir, bu durum da aromatik halkaların rezonans davranışlarını değiştirerek absorpsiyon artışına neden olur.

Gerekli alet/malzeme:

UV spektrofotometre, kuvarz spektrofotometre küveti, standart DNA çözeltisi (suda hazırlanır; 20 µg/ml), izole edilmiş DNA çözeltisi (suda hazırlanmış fakat konsantrasyonu bilinmiyor), distile su, cam tüp, su banyosu (90 °C), metal porttüp

Deneyin Yapılışı:

İzole edilen DNA, hangi çözücüde çözündürüldü ise, aynı çözücü referans olarak kullanılır. Elimizdeki izole DNA su içerisinde çözündürüldüğü için, 1 ml distile su kuvarz küvete konulur ve 260 nm. de ölçüm yapılarak alet sıfırlanır. İzole DNA 200 kez sulandırılarak 260 nm. de absorbans ölçülür. Ölçülen değer 1'den büyük ise absorbans değeri 0.5-1 arasında olacak şekilde sulandırım gerçekleştirilir. Aynı DNA örneği için 280 nm.de de ölçüm yapılır. Su içerisinde konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde 10 ml'lik bir DNA çözeltisi hazırlanır. 260 nm. de absorbans değeri ölçülür yaklaşık olarak 0.4 olması gereklidir. Üç ayrı deney tüpüne 3'er ml DNA çözeltisi konularak her bir tüp numaralandırılır; birinci tüp oda sıcaklığında bırakılırken, diğer iki tüp 90 °C'lik su banyosunda 15 dakika tutulur. İnkübasyon sonrasında 2 numaralı tüp hızlı bir şekilde hemen buz üzerine alınır. 3 numaralı tüp ise oda sıcaklığında yavaş yavaş soğumaya bırakılır (yaklaşık 1 saat). Sonra her bir tüpün 260 nm dalga boyunda ölçümü gerçekleştirilerek sonuçlar yorumlanır.

(Her adım en az 3 kişi tarafından ayrı ayrı yapılır ve hesaplamalarda ortalama değerler kullanılır.)

Figure 4.31 Denaturation of DNA

(a) Schematic diagram of DNA denaturation. Native DNA (double helix) is heated to form Denatured DNA (single strands). The process is reversible upon cooling.

(b) Graph of ΔG° for denaturation versus Temperature. The curve shows a minimum at the melting temperature T_m .

(c) Graph of Absorbance versus Wavelength (nm). The Native DNA curve shows a peak at 260 nm. The Denatured DNA curve shows a peak at 260 nm and a shoulder at 280 nm.

(d) Graph of Absorbance at 260 nm versus Temperature. The curve shows a sharp increase in absorbance at the melting temperature T_m .

DENEY SONUÇLARI:

ÖRNEK HAKKINDA KISA BİLGİ:

Sulandırım oranı:

(1.) $A_{260} =$ (2.) $A_{260} =$ (3.) $A_{260} =$ **ort.** $A_{260} =$

(1.)A₂₈₀ = (2.)A₂₈₀ = (3.)A₂₈₀ = ort.A₂₈₀ =

(1.) $A_{260}/A_{280} =$ (2.) $A_{260}/A_{280} =$ (3.) $A_{260}/A_{280} =$ **ort.** $A_{260}/A_{280} =$

DNA konsantrasyonu (µg/ml)

Ölçüm				Ortalama=
X-X _{ort}				
(X-X _{ort}) ²				Toplam:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_0 - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Standart sapmalı sonuç=

DENATÜRASYON DENEYİ:

Örnek: DNA çözeltisi (20 µg/ml)

ISITMADAN ÖNCE:

(1.)A₂₆₀ = (2.)A₂₆₀ = (3.)A₂₆₀ = **ort.A₂₆₀** =

ISITMADAN SONRA:

1 Tüp: Sıcaklık uygulanmamış (oda sıcaklığında bekletilmiş) örnek

(1.)A₂₆₀ = (2.)A₂₆₀ = (3.)A₂₆₀ = **ort.A₂₆₀** =

2.Tüp: 90 °C'lik su banyosunda 15 dakika tutulmuş ve inkübasyon sonrasında hızlı bir şekilde hemen buz üzerine alınmış örnek

(1.)A₂₆₀ = (2.)A₂₆₀ = (3.)A₂₆₀ = **ort.A₂₆₀** =

3. Tüp: 90 °C'lik su banyosunda 15 dakika tutulmuş ve inkübasyon sonrasında oda sıcaklığında yavaş yavaş (yaklaşık 1 saat) soğumaya bırakılmış örnek

(1.)A₂₆₀ = (2.)A₂₆₀ = (3.)A₂₆₀ = **ort.A₂₆₀** =

KAYNAKLAR

- Arda, N. ve Ertan, H. (2004). Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler“, Genişletilmiş 2. Baskı, Editörler: G. Temizkan ve N. Arda, İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM) Yayın No:2, ISBN: 975-420-347-4, Nobel Tıp Kitabevleri, s.161-274.
- Boyer, R. (2000). Modern Experimental Biochemistry 3rd Edition, Prentice Hall Inc., ISBN: 0-8053-3111-5.
- Holme J. H., Peck H. (1998). Analytical Biochemistry Third Edition, Addison Wesley Longman Limited Inc., ISBN: 0 582 29438-X.
- Minch, M. (1989). Experiments in Biochemistry: Projects and Procedures, Prentice Hall Inc., ISBN-10:0132952394.
- Yenson, M. (1982). Klinik Biyokimya Laboratuar Çalışmaları, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Rektörlük no: 2950, Fakülte no: 139.
- BOSKOU, D., 2000, Olive oil, World Rev. Nutr. Diet., 87: 56- 77.
- BOUAZIZ, M., CHAMKHA, M., SAYADI, S., 2005, Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of olive cultivar Chemlali from Tunisia, J. Agric. Food Chem., 52, 5476–5481.
- FAGLIANO, V., RITIENI, A., MONTI, S.M., GALLO, M., MEDEGLIA, D.D., AMBROSSI, M.L., SACCHI, R., 1999, Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system, J. Sci. Food Agric., 79, 1803- 1808.
- NENADIS, N., TSIMIDOU, M., 2002, Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation, J. Am. Oil Chem. Soc., 79, 257- 259.
- NOUSIS, L., DOULIAS P. T., ALIGIANNIS, N., BAZIOS, D., AGALIAS, A., GALARIS, D., MITAKOU, S., 2005, DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. Free radical Res., 39 (7), 787- 795.
- OWEN, R.W., MIER, W., GIACOSA, A., HULL, W.E., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H., 2000, Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil, Clin. Chem., 46, 976-988.
- RAGAZZI, E., VERONESE, G., 1973, Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation, J. chromatogr., 77, 369-375.
- ROTONDI, A., BENDINI, A., CERRETANI, L., MARI, M., LERCKER, G., TOSCHI, T.G., 2004, Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. nostrana di brisighella extra virgin olive oil, J. Agric. Food Chem., 52, 3649- 3654.
- SERVILI, M., BALDIOLI, M., SELVAGGINI, R., MINIATI, E., MACCHIONI, A., MONTEDORO, G., 1999, High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D and 2D nuclear magnetic resonance characterization, J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 873- 882.
- STEFANOUDAKI, E., KOTSIFAKI, F., KOUTSAFTAKIS, A., 1999, Classification of virgin olive oils of the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition, Am. Oil Chem. Soc., 76, 623- 626.
- VISIOLI, F., GALLI, C., 1998, The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. Nutr. Rev., 56, 142- 147.

Yararlı linkler

<http://www.juliantrubin.com/biochemistryprojects.html>

<http://www.biojournals.com/latest%20experiments%20related%20to%20biochemistry.html>

<http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>

http://w3.gazi.edu.tr/web/erkoc/BIYOKIMYA/kalitatif_testler.pdf