

2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DÖNEM I TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI Uygulama Kitapçığı 2024 – 2025

*“Natura nihil frustra facit”
“Doğa hiçbir şeyi boşuna yapmaz”*

*Aristoteles
(M.Ö. 384 - M.Ö. 322)*

Hazırlayan:

İSÜTF-MÖTEP

Laboratuvar Kurulu

İSÜ | İSTİNYE
ÜNİVERSİTESİ
İ S T A N B U L

Revizyon No: 2024-Rev0.

ÖNSÖZ

Sevgili Öğrenciler,

Bu laboratuvar kitapçığı, tıbbi biyokimya alanındaki temel deneyleri, prosedürleri ve laboratuvar prensiplerini anlamanız ve uygulamanız için hazırlanmıştır. Biyokimya, canlı organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli tüm kimyasal reaksiyonların moleküler düzeyde oluşumunu, işleyişini, düzenlenmesini sorgulayan ve araştıran bir bilim dalıdır. Bu nedenle, laboratuvar çalışmaları, biyokimyasal kavramların anlaşılması ve pratik becerilerin geliştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Laboratuvar derslerimizde çözelti hazırlanması, enzim kinetiği ve biyomoleküllerin kalitatif tayinleri gibi temel biyokimyasal analizleri içeren bir program uygulanmaktadır. Bu kitapçıkta, laboratuvarda uyulması gereken kurallar, kullanılan ekipmanlar, deneylerin teorik temelleri ve uygulama adımları detaylı bir şekilde sunulmuştur. Bu bilgiler, laboratuvar çalışmalarınızı daha verimli ve güvenli bir şekilde yürütmenize yardımcı olacaktır.

Laboratuvarlarda disiplinli, dikkatli ve özenli çalışmak önemlidir. Her deneyin sonunda, bilimsel düşünceye ve etik değerlere uygun olarak deney verilerinizi analiz etmeniz ve sonuçlarınızı değerlendirebilmeniz beklenmektedir. Öğrendiğiniz her bilgi ve edindiğiniz her beceri, sizleri geleceğin nitelikli hekimleri olmaya bir adım daha yaklaştıracaktır.

Bu kitapçığın, laboratuvar çalışmalarınızda size rehberlik etmesini ve biyokimyaya olan ilginizi artırmasını diliyoruz. Yolunuz bilimin ışığıyla daima aydınlık olsun...

Başarılar dileriz.

İstinye Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
ÖĞRENİM ÇIKTILARI ve DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ	4
LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR	5
SANAL LABORATUVAR BİLGİLENDİRMESİ.....	6
1. Laboratuvara Giriş ve Çözelti Hazırlama	7
2. Spektrofotometre	15
3. Enzim Kinetiği	19
4. Karbohidratların Kalitatif Tayini.....	24
5. Lipitler	27
6. Protein Tayini	30
KAYNAKLAR.....	33

ÖĞRENİM ÇIKTILARI ve DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ

KURUL ADI	DENEYİN ADI	ÖĞRENİM ÇIKTISI	DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ
<i>Tıbbi Bilimlere Giriş-I</i>	Çözelti Hazırlama	Laboratuvarında kullanılan gereçleri tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Çözelti, çözünürlük ve çözünürlüğe etki eden faktörleri açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Katı kimyasalların tartımını yapar ve farklı derişimlerde çözelti hazırlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Tampon çözelti oluşturmak için gereken asit-baz çiftini hazırlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		pH metreyi kullanabilir	ÇSS, AUS*, BD*
	Spektrofotometre	Spektrofotometrik analizin temel prensibini tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Standard Eğri'nin anlamını açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Lambert-Beer yasası ile spektrofotometrik analiz arasındaki ilişkiyi açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
<i>Tıbbi Bilimlere Giriş-II</i>	Enzim Aktivitesi	Lambert-Beer yasasının prensiplerini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Spektrofotometrik ölçümlerin çeşitlerini tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Spektrofotometrik analiz yaparak enzim aktivitesini hesaplayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Enzim aktivite birimlerini sayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
<i>Tıbbi Bilimlere Giriş-III</i>	Karbohidrat	Anomerik karbon tanımını yapabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Fehling reaksiyonunu tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		İndirgen uç içermeyen disakkaritlerin ayırımını yapabilir	ÇSS, AUS*, BD*
<i>Pasif Hareket Sistemi</i>	Lipitler	Lipitleri ve özelliklerini tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Yağ asitlerindeki çift bağların halojenizasyonla tayin prensibini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Yağ asitlerini renk tepkimesine bağlı olarak doygunluk derecesine göre sıralayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Kolesterolün nitel tayininde Salkowski metodunu açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Kolesterolün Salkowski renk tepkimesini değerlendirebilir	ÇSS, AUS*, BD*
	Protein Tayini	Amino asitlerin yapısını ve peptit bağının özelliklerini tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Biüret metodunun prensibini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Biüret metodunun avantaj ve dezavantajlarını sayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Spektrofotometre ile bilinmeyen bir protein örneğinin derişimini hesaplayabilir	ÇSS, AUS*, BD*

ÇSS: Çoktan Seçmeli Sınav, AUS: Açık Uçlu Soru, BD: Boşluk Doldurma

*Mazeret sınavlarında uygulanılır

LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

1. Laboratuvarda sessiz çalışılmalı ve çalışma tezgahının üzerine eşya konulmamalıdır.
2. Laboratuvara önlükle gelinmeli ve laboratuvar süresince önlük çıkarılmamalıdır. Çalışma sırasında önlük ilikli olmalı, saçlar her zaman toplu halde tutulmalıdır.
3. Her öğrenci, kendisine ayrılan alanı ve malzemeleri kullanmalıdır.
4. Çalışmanın sonunda her öğrenci, kullandığı malzemeleri temizleyip görevlilere temiz ve düzenli bir şekilde teslim etmelidir.
5. Laboratuvarda kimyasal maddelere dokunulmamalı, koklanmamalı ve tadına bakılmamalıdır.
6. Deneylede mümkün olduğunca az madde kullanılmalı ve madde israfından kaçınılmalıdır. Stok şişelerinden gerektiği kadar madde alınmalı; artanlar stok şişesine geri konulmamalıdır.
7. Çalışmalarda kirlı malzeme kullanılmamalıdır.
8. Uçucu, yanıcı ve patlayıcı (eter, alkol, kloroform vb.) maddelerin şişeleri kapalı tutulmalı; yakınlarında çakmak, kibrit gibi yakıcı maddeler bulundurulmamalıdır.
9. Çözelti hazırlanıyorsa uygun koşullarda saklanmalı; reaktiflerin üzerlerine adı, hazırlayanın adı, hazırlanma tarihi ve varsa son kullanma tarihi yazılmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş reaktifler kullanılmamalıdır.
10. Saf su yerine kesinlikle musluk suyu kullanılmamalıdır.
11. Kimyasal bir maddeyle, özellikle asit ve alkalilerle temas durumunda, temas bölgesi bol su ile yıkanmalı ve derhal ilgililere haber verilmelidir.
12. Her çalışmadan sonra eller sabunla yıkanmalıdır.
13. Kullanımı bilinmeyen cihazlar kullanılmamalıdır.
14. Çalışma bitince her grup, aldığı malzemeleri sağlam ve temiz bir şekilde teslim etmelidir.
15. Görevliden izin alınmadan laboratuvar terk edilmemelidir.
16. Her laboratuvar çalışması sonunda yoklama kağıdı imzalanmalıdır.
17. Bu deneyde kırılabilir cam malzemeler kullanılmaktadır. Malzeme kırıldığında, toplamaya çalışılmamalı ve hemen deney sorumlusuna haber verilmelidir.

SANAL LABORATUVAR BİLGİLENDİRMESİ

Tüm deneyler sanal ortamda da yer almakta olup, yıl boyunca erişime açık olacaktır. Sanal laboratuvar uygulamalarına erişim MEDU-EYS üzerinden gerçekleştirilecektir. Giriş için gerekli bilgilere, MEDU-EYS platformunda ilk deney olarak yer alan "Çözelti Hazırlama" ders notlarından ulaşabilirsiniz.

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ-I KURULU

1. Laboratuvara Giriş ve Çözelti Hazırlama

LABORATUVAR: ANK-Z14 ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Laboratuvarda kullanılan gereçleri tanımlayabilir
Çözelti, çözünürlük ve çözünürlüğe etki eden faktörleri açıklayabilir
Katı kimyasalların tartımını yapar ve farklı derişimlerde çözelti hazırlayabilir
Tampon çözelti oluşturmak için gereken asit-baz çiftini hazırlayabilir
pH-metreyi kullanabilir

A. TEORİK BİLGİ

Laboratuvara Giriş

Ayrıştırma (analiz) ve birleştirme (sentez) gibi yöntemler kullanılarak tıp, eczacılık, fizik ve kimya gibi bilim dallarına yönelik araştırmaların ve deneylerin yapıldığı özel donanımlı alanlara laboratuvar denir. Laboratuvarlar, gerçekleştirilecek deneylerin niteliğine göre çeşitli kurallar ve düzenlemeler içerir. Bu düzenlemeler sayesinde, insan sağlığına etkisi olan organizmaların bulaşması, kimyasal maruziyetlerin insan vücut bütünlüğüne zarar vermesi veya yangın ya da patlama gibi ciddi olayların önüne geçmek mümkün olmaktadır. Laboratuvarda çalışanların ve çevredeki kişilerin güvenliği için alınması gereken önlemlere ek olarak, deney sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak amacıyla da uyulması gereken kurallar bulunmaktadır. Bu kurallar arasında örneklerin birbirine karışmaması, cihazların doğru sonuç verecek şekilde ayarlanması ve bulguların doğru kaydedilmesi gibi başlıklar yer alır. Sonuç olarak, bir laboratuvarda çalışırken kuralların bilinmesi ve uygulanması büyük önem taşır.

Biyokimya Laboratuvarlarında Kullanılan Cam ve Plastik Malzemeler

Beher: Bardağa benzeyen silindirik bir yapısı olup ağız kısmında sıvı aktarımını kolaylaştıran bir oluk bulunur. Cam ya da plastik malzemeden yapılabilir ve genellikle çözelti hazırlarken ilk çözünme işlemi için kullanılır. 10 mL'den küçük veya 1 L'den büyük hacimlerde bulunabilir. Yaklaşık hacim gösterdiği için volümetrik özellik taşımaz.

Erlen (Erlenmayer Beher): Geniş bir alt kısma ve ağız kısmına doğru daralan konik bir yapıya sahiptir. Mikrobiyolojide bakteri üretiminde yaygın olarak kullanılır. Yaklaşık sıvı hacmini gösteren bir dereceye sahip olabilir ancak bu da volümetrik değildir.

Test Tüpleri: Farklı uzunluklarda, cam ya da plastik malzemeden üretilmiş silindirik tüplerdir. Altları yuvarlak olduğundan kendiliğinden dik durmazlar ve bir tüp standına ihtiyaç duyarlar. Kapaklı veya kapaksız olabilirler. Yaklaşık hacim gösterdiklerinden volümetrik özellik taşımazlar.

Santrifüj Tüpleri: Test tüplerine benzeyen ancak dipleri genellikle konik şekilde biten tüplerdir. Bunlar da yaklaşık hacim gösterdiklerinden volümetrik özellikte değildir.



Beher



Test tüpleri



Santrifüj tüpleri



Erlen

Balon Joje: Balona benzer küresel bir gövdesi ve ince uzun bir boynu olan, tıpa şeklinde kapak takılabilen cam kaplardır. Belirteç çizgisine kadar sıvı doldurulduğunda, üzerinde yazılı hacmi tam olarak içerir, bu nedenle volümetrik bir kaptır. Çözeltilerin son hacmini ayarlama için kullanılır. Volümetrik özelliğini kaybetmemesi için ısı işlemlerden korunması gereklidir.

Mezür (Dereceli Silindir): Kendi başına dik durabilen, ağız kısmında sıvı aktarımını kolaylaştıran bir oluk bulunan ve içinde sıvının hacmini gösteren bir derecelendirme olan silindirik kaplardır. Volümetrik özelliklerini kaybetmemeleri için ısı işlemlerden kaçınılmalıdır.

Pipet: Sıvı aktarımında kullanılan, aktarılan sıvının hacmini doğru bir şekilde gösteren volümetrik silindirik gereçlerdir. Cam ya da plastikten yapılmıştır ve sıvıyı çekme/boşaltma ucunun konik bir yapısı vardır. Diğer ucuna takılan, "puar" adı verilen bir pompa ile sıvı çekme/verme işlemi yapılır.

Otomatik Pipet: Aktarılabilecek sıvı hacminin otomatik olarak ayarlanabildiği ve küçük hacimlerde daha hassas çalışmaya olanak tanıyan cihazlardır. Her kullanımda değiştirilen plastik uçlarla çalışılır.

Büret: Sıvı aktarım ucunda musluk bulunan, uzun ve volümetrik özellikteki silindirik cam kaplardır. Hassas sıvı ekleme gerektiren titrasyon deneylerinde sıklıkla kullanılır.



Balonjoje



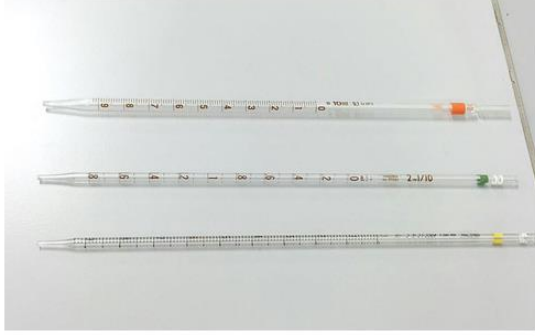
Mezür



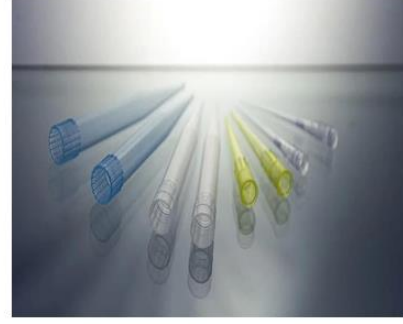
Büret



Otomatik pipet



Pipet



Otomatik pipet uçları

Biyokimya laboratuvarlarında kullanılan cihazlar

Terazi: Tartım işlemlerinde kullanılır. 0,1 mg kadar düşük miktarları tartabilen hassas teraziler olduğu gibi, daha yüksek ağırlıkları (>100 g) ölçebilen analitik teraziler de vardır. Teraziler, hava akımından etkilenmeyecek şekilde düz ve sabit bir zeminde kullanılmalıdır.

Santrifüj: Bir merkez etrafında dönme hareketiyle oluşan merkezkaç kuvveti sayesinde, çözeltideki katı maddelerin çökerek ayrılmasını sağlar. Hız kapasitesine ve rotör özelliklerine göre farklı çeşitleri bulunur. Bazı santrifüjlerde soğutma özelliği vardır ve bu, sıcaklığa duyarlı biyolojik materyalin korunmasına yardımcı olur. Örneklerin daima simetrik yerleştirilmesi ve kapağın tam kapatılması gerekmektedir.

Su Banyosu: Reaksiyon koşullarına bağlı olarak sıcakta bekletilmesi veya hızla çözülmesi gereken donmuş örneklerin konulduğu, su sıcaklığının ayarlanabildiği tanklardır. Bazı modellerinde çalkalama özelliği bulunur. Suyun kontaminasyonunu önlemek için düzenli aralıklarla değiştirilmesi ve bakır sülfat eklenmesi gereklidir.

pH Metre: Sıvıların pH değerlerini ölçmeye yarayan elektrokimyasal bir cihazdır. Elektrot içeren prob, kullanılmadığı zaman KCl (potasyum klorür) çözeltisinde bekletilir. Ölçümden önce ve sonra saf su ile yıkanıp kullanılmalıdır.

Manyetik Karıştırıcı: Çözelti içeriğindeki maddelerin çözünmesini hızlandırmak için kullanılan otomatik bir karıştırıcıdır. Çözeltinin içinde manyetik özellikli küçük bir çubuk (manyetik balık) bulunur ve manyetik karıştırıcının altındaki dönen manyetik alan etkisiyle kapta döner, böylece karıştırma işlemi gerçekleşir. Isıtma özellikli modelleri de mevcuttur.

Vortex: Genellikle test tüplerinin yerleşebileceği bir bölme ya da düz bir platforma sahiptir ve motor gücüyle dönerek tüp içindeki çözeltinin karışmasını sağlar.

Spektrofotometre: Çözelti içerisinde geçen ışık şiddetini ölçen bir cihazdır. Bu sayede çözelti ışığı ne kadar soğuruyorsa, derişimi de o ölçüde nicel olarak belirlenebilir. Çözelti derişimlerinin tayininde yaygın olarak kullanılır.

Biyokimya laboratuvarlarında kullanılan diğer gereçler

Piset: Genellikle saf su içerir ve pH probunu temizlemek, kaplara istenen seviyeye kadar su eklemek, yıkanmış malzemeleri saf su ile durulamak gibi işlemlerde su aktarıcı olarak kullanılır.

Spatül: Katı maddelerin aktarımında kullanılır. Ucu kaşık şeklinde veya düz olabilir. Çok küçük miktarlarda madde alabilenlere “mikrospatül” adı verilir.

Parafilm: Ağzı açık kapların veya tüplerin örtülmesinde kullanılan, şeffaf veya yarı şeffaf, esneyebilen bir malzemedir. Mutfaklarda kullanılan “stretch film”lere benzer. Uçucu organik çözücülerin örtülmesinde kullanılmamalıdır.

Çözeltiler

İki veya daha fazla maddenin meydana getirdiği homojen karışımlara çözelti adı verilir. Çözeltiyi oluşturan bileşenlerden miktarı fazla olana çözücü (çözgen), az olana ise çözünen adı verilir. Laboratuvarlarda en sık kullanılan çözeltiler katı-sıvı ya da sıvı-sıvı çözeltileridir. Aksi belirtilmediği sürece çözgen olarak su kullanılır.

Çözünürlüğe etki eden faktörler:

- Çözücünün ve çözünenin türü
- Sıcaklık
- Basınç
- Ortak iyon etkisi

Çözünme hızına etki eden faktörler:

- Sıcaklık
- Tanecik büyüklüğü
- Karıştırma

Bir çözeltide çözünen maddenin miktarı çeşitli şekillerde belirtilebilir.

Ağırlık yüzdesi (%w/w): Bir çözeltinin 100 gramında bulunan madde miktarıdır. Örneğin %37’lik HCl çözeltisi denildiğinde, bu çözeltinin 100 gramında 37 gram HCl içerdiği anlaşılır.

$$\% w/w = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (g)}}{\text{Çözeltinin toplam kütlesi (g)}}$$

Hacimce yüzde (%v/v): Bir çözeltinin 100 mL’inde bulunan madde miktarı olarak tanımlanır. Örneğin %5’lik etanol çözeltisi denildiğinde toplam 100 mL olan çözeltinin 5 mL etanol içerdiği anlaşılır.

$$\% v/v = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (mL)}}{\text{Çözeltinin toplam hacmi (mL)}}$$

Ağırlık:Hacimce yüzde (%w/v): Hibrit bir tanımdır. Örneğin %5'lik NaOH çözeltisi denildiğinde 5 g NaOH'ın toplam hacminin 100 mL olacak şekilde suyla tamamlanması ile hazırlanması anlaşılır. Rutin laboratuvar çözeltilerinin hazırlanmasında genellikle bu ifade kullanılır.

$$\% w/v = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (g)}}{\text{Çözeltinin toplam hacmi (mL)}}$$

Molarite (M): Bir litre çözelti içinde çözünen maddenin mol sayısını ifade eder.

$$M (\text{molarite}) = \frac{n (\text{çözünen maddenin mol sayısı})}{V (\text{Çözelti toplam hacmi, L})} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$n (\text{mol sayısı}) = \frac{m (\text{kütle, g})}{M_w (\text{moleküler ağırlık, g/mol})} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Örnek: 100 mililitrelik 5 molar sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) solüsyonu hazırlamak için kaç gram Na_2HPO_4 gereklidir? (Moleküler ağırlığı=141,96 g/mol)

Çözüm: İstenenler;

Hacim 100 mL = 0,1 L (molaritede hacim litre olarak ifade edilir)

Molarite = 5M

Eşitlik 1'de yerine koyarsak:

$$5 \text{ M} = \frac{n}{0,1 \text{ L}} \quad n = 5 \times 0,1 = 0,5 \text{ mol olarak bulunur}$$

İhtiyacımız olan 0,5 mol Na_2HPO_4 kaç gram eder? Bunu da Eşitlik 2'yi kullanarak bulabiliriz.

$$0,5 \text{ mol} = \frac{m}{141,96 \text{ g/mol}} \quad m = 0,5 \times 141,96 = 70,98 \text{ gram olarak bulunur}$$

Normalite (N): Molariteye oldukça benzer bir birimdir. Molarite, 1L çözelti içindeki "mol" sayısı iken, normalite 1L çözelti içindeki "eşdeğer mol" sayısıdır. Eşdeğer mol kavramı, maddelerin tesir değerliğine göre değişir. Normalitenin hesaplanması için basitçe tesir değerliğinin bilinmesi gereklidir. Bu değer bilinirse, molarite hesabı üzerinden kolaylıkla hesaplanabilir.

$$N (\text{normalite}) = \frac{n (\text{çözünen maddenin eşdeğer mol sayısı})}{V (\text{Çözelti toplam hacmi, L})}$$

Eşdeğer mol, kütlelerin eşdeğer gram sayısına bölünmesi ile bulunur (m/eşdeğer gram sayısı)

$$N (\text{normalite}) = \frac{\frac{m}{\text{eşdeğer gram sayısı}}}{V (\text{Çözelti toplam hacmi, L})}$$

Eşdeğer gram sayısı, maddenin molekül ağırlığının tesir değerliğine oranıdır. (Mw/ Tesir değeri)

$$N (\text{normalite}) = \frac{\frac{m}{M_w / \text{Tesir Değeri}}}{V (\text{Çözelti toplam hacmi, L})}$$

$$N (\text{normalite}) = M (\text{molarite}) \times \text{Tesir Değeri}$$

Tesir değeriği, asitlerin ortama verdiği H⁺ sayısı, bazların ortama verdiği OH⁻ sayısı, tuzların ise ortama verdiği ya da aldığı elektron sayısıdır. Örneğin HCl asit ortama 1 H⁺ iyonu verdiği için tesir değeriği 1'dir. H₂SO₄ ise ortama 2 H⁺ iyonu verdiği için tesir değeriği 2'dir.

1M HCl = 1N HCl

1M H₂SO₄ = 2N H₂SO₄

Çözelti hazırlama kuralları

- İstenen çözelti özelliklerine göre hesaplamalar yapılır.
- Katı maddeler, yapışmayacakları yüzeylerde tartılmalıdır.
- Katı maddeler beher içinde çözülür. (Isıtma, karıştırma işlemleri beherde yapılır)
- Beherde çözünen maddeler, istenen hacime balon joje kullanılarak getirilir.
- Sıvı-sıvı çözeltilerin hazırlanması istenen hacimler mezür yardımı ile belirlenir.
- % çözeltilerdeki 100 mL olarak belirtilen ifade tüm çözeltinin hacmidir.
- % çözeltilerdeki 100 g olarak belirtilen ifade tüm çözeltinin kütesidir.

A. pH ve Tampon Sistemler

pH, basitçe ortamın asitlik/bazlık seviyesi hakkında bilgi verir. Sulu çözeltilerinde ortama hidrojen iyonu (H⁺) veren maddeler asit, hidroksil iyonu (OH⁻) veren maddeler ise baz olarak tanımlanır. Bir çözeltide bulunan [H⁺] miktarı fazla ise bu çözelti asidik, az ise bazik olarak adlandırılır.

pH=7 nötr kabul edilir. [H⁺] derişiminin negatif logaritması alınarak çözeltinin pH değeri bulunur.

Ortama güçlü asitler ya da güçlü bazlar eklendiğinde oluşacak pH değişimlerini minimize eden ve bir zayıf asit-konjuge baz ya da zayıf baz-konjuge asit çiftinin bulunduğu çözeltilerdir. Vücudun farklı bölgelerindeki pH değerlerini korumada önemli rol oynarlar. Bunun yanı sıra, *in vitro* uygulamalarda biyomoleküllerin pH değişiminden etkilenmemesi için laboratuvarlarda sıklıkla kullanılırlar. Tampon sistemini oluşturan konjuge çiftin konsantrasyonları arasındaki oran ve bu zayıf asit ya da bazın denge sabiti ile pH arasındaki ilişki "**Henderson-Hasselbalch Denklemi**" ile açıklanır.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1. Beher
2. Balon joje
3. pH Metre
4. Manyetik karıştırıcı
5. Manyetik balık
6. Terazi
7. Mezür
8. Piset
9. Pastör pipeti
10. NaCl (Sodyum klorür)
11. CH₃COOH (Asetik asit)
12. C₂H₃NaO₂. 3H₂O (Sodyum asetat trihidrat)

C. PROTOKOL

Uygulama Öncesi

1. Laboratuvar tanıtımı sunumuna ve turuna katılarak, acil durum çıkışları, güvenlik ekipmanları, atık kapları, kimyasal dolapları gibi fiziksel yapı ile ilgili bilgi edinilir.
2. Denemelerde kullanılacak ekipmanlar ve kullanım amaçları tanıtılır

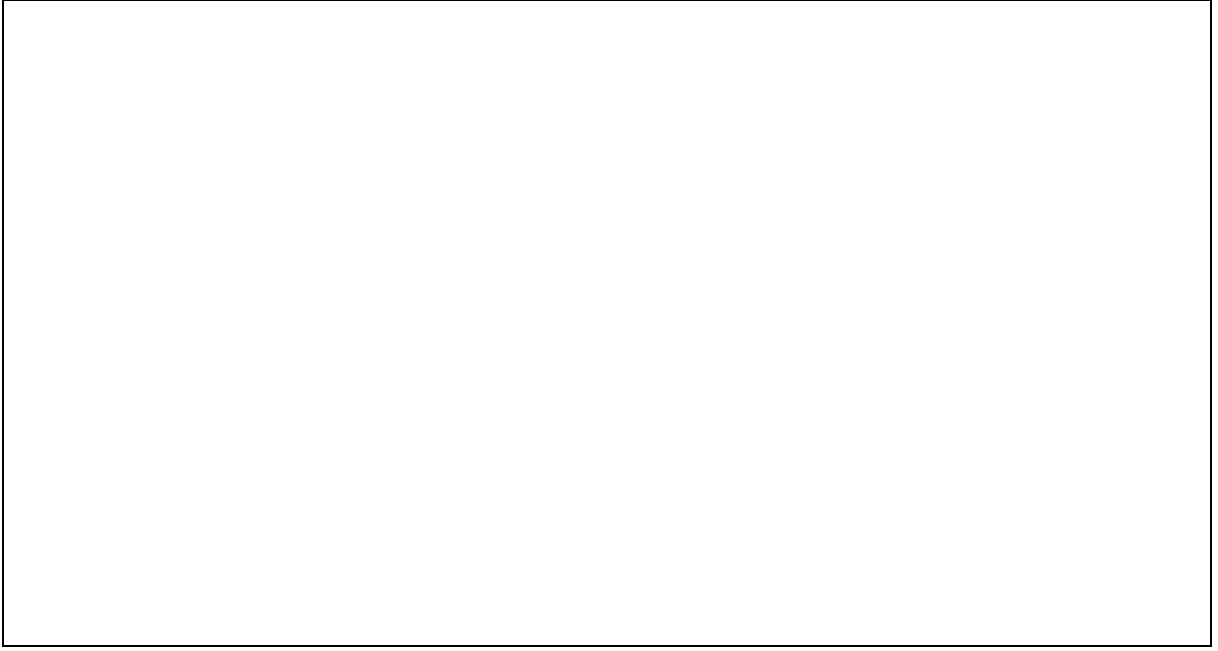
Uygulama-1 Serum Fizyolojik Hazırlama

1. 100 mL %0,9'luk NaCl çözeltisini hazırlamak için gerekli hesaplamalar yapılır.
2. Tartım kabının darası alınarak hesaplanan miktarda NaCl tartılır. Tartım miktarı notlar kısmına kaydedilir.
3. Tartılan NaCl 100 mL hacmindeki behere konulur.
4. Behere yaklaşık 60 mL su eklenir.
5. Tartı temizlenir.
6. Beher yavaşça çalkalanarak NaCl çözülür.
7. Çözelti 100 mL hacmindeki balon jöjeye aktarılır.
8. Saf su ile balon jöjedeki 100 mL çizgisine kadar dikkatlice su eklenerek istenen hacim sağlanır. (Su seviyesi çizgiye yaklaştıktan sonra pastör pipeti ile daha hassas dolum yapılabilir.)

Uygulama-2 Asetat Tamponu Hazırlama

1. 100 mL 0,1M pH:5 olan asetat tamponu hazırlamak için gerekli hesaplamalar yapılır (Bknz: Hesaplamalar).
2. Tartım kabının darası alınarak hesaplanan miktarda $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ tartılır. Tartım miktarı notlar kısmına kaydedilir.
3. Tartılan $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ 100 mL hacmindeki behere konulur ve üzerine yaklaşık 70 mL saf su eklenir.
4. Tartı temizlenir.
5. Beher manyetik karıştırıcı üzerine konur. Cihaz yavaş devirde çalıştırılarak çözünmenin gerçekleşmesi beklenir.
6. Çözeltiye 211 μ L CH_3COOH eklenir.
7. Çözelti balon jöje kullanılarak 100 mL hacme tamamlanır.
8. Hazırlanan tampon çözelti bir erlene aktarılır.
9. pH metre açılır. pH metre probu, içinde bulunduğu koruyucu çözeltiden çıkarılarak, bir atık kabı üzerinde saf su ile yıkanır.
10. pH probu tampon çözelti içine daldırılarak pH okunur.
11. pH probu tekrar saf su ile yıkanarak içinde koruyucu çözelti içerisinde konur. Cihaz kapatılır.

NOTLAR



ATIK YÖNETİMİ

Hazırlanan serum fizyolojik çözeltisi lavaboya dökülebilir.

Hazırlanan tampon çözeltisi sıvı atık şişesine dökülecektir. Deney sorumlusundan bilgi alınız.

2. Spektrofotometre

LABORATUVAR: ANK-Z14 ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Spektrofotometrik analizin temel prensibini tanımlayabilir
Standard Eğri'nin anlamını açıklayabilir
Lambert-Beer yasası ile spektrofotometrik analiz arasındaki ilişkiyi açıklayabilir

A. TEORİK BİLGİ

Laboratuvara Giriş

Spektroskopi: Işın-madde etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların ışının etkisi ile bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesi şeklinde de tanımlanabilmektedir.

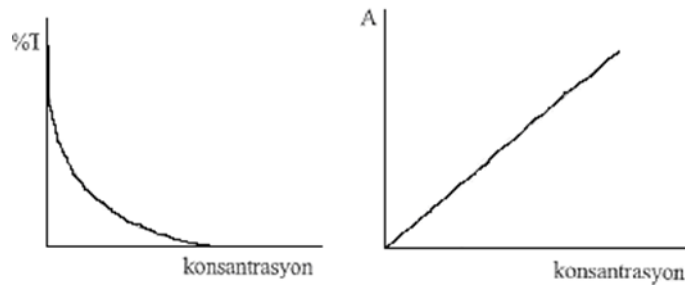
Kolorimetri: Çözelti içindeki madde miktarını çözeltinin renginden faydalanarak ölçme işlemine kolorimetri adı verilir, bu ölçümü yapan cihazlara kolorimetre adı verilir. Ölçülecek çözeltinin rengi değişik konsantrasyonlardaki standartların rengi ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

Fotometri: Bir çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, bu ölçümü yapan cihazlara ise fotometre veya spektrofotometre denir. Fotometrelerde hem ışığın tüm bölgelerinde (görünür, UV, IR) ölçüm yapılabilir, hem de renk yerine ışık ölçüldüğü için renksiz çözeltiler de ölçülebilir.

Beyaz ışık çeşitli dalga boylarındaki ışığın bir karışımıdır. Bu ışık prizmadan geçirilip kırılmaya uğratılır ise dalga boylarına göre spektrumlarına ayrılır. Işık spektrumlarının 200-350 nm arasına UV bölgesi, 350-750 nm dalga boyundaki kısmına görünür bölge ve 750-1200 nm arasına kızılötesi bölgesi denir. Fotometrik ölçüm ışığın UV, görünen ve IR bölgelerinde yapılabilir.

Renkli çözeltiler sadece kendi rengindeki ışığı geçirirler diğerlerini ise tutarlar (absorblarlar). Herhangi bir çözeltiliye gönderilen bir ışığın çözelti tarafından tutulmasına absorbans, ışığın çözülden geçişine ise transmittans denir. Tutulan ışığın miktarı çözeltinin rengini meydana getiren madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. İşte, solüsyona gelen ışık şiddetiyle solüsyondan çıkan ışık şiddeti arasında Lambert-Beer kanunu gereği matematiksel bir ilişki vardır.

Lambert-Beer kanunu: Bir çözülden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde katettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır.



Ölçülen maddenin konsantrasyonu ile absorptans değeri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Konsantrasyon arttıkça absorptans artar, transmittans azalır. Bu kanuna göre;

$$A_N = \epsilon \cdot l \cdot C_N$$

A_N = Cihazla ölçülen numune absorptansı

ϵ =(Ekstinsiyon katsayısı) Reaksiyon sonunda okunan maddenin molar absorptivite katsayısıdır ve sabit bir değerdir.

l = Işığın geçtiği yol

C_N = Numune konsantrasyonu

$$\frac{A_{\text{standart}}}{A_{\text{numune}}} = \frac{C_{\text{standart}}}{C_{\text{numune}}}$$

Transmittans: Çözeltiden çıkan ışığın çözeltilere giren ışığa oranıdır.

% Transmittans: Çözeltilere giren ışığın yüzde kaçının çözeltilere çıktığını gösterir. Ölçüm sonuçları yine Beer kanununa göre hesaplanır.

Ölçüm yaparken maksimum hassasiyet sağlamak için aranan madde tarafından maksimum absorbe edilen dalga boyundaki ışık kullanılır. Bunun için o maddenin 1 molar çözeltisinin çeşitli dalga boylarındaki absorptans değerleri ölçülür. En yüksek dalga boyunun elde edildiği dalga boyu o maddenin en iyi ölçüm yapılan dalga boyu olarak kullanılır. Spektrofotometrede iyi bir ölçüm yapabilmek için o maddenin Lambert-Beer kanununa uyması gereklidir.

B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1. Deney Tüpü
2. Metil Orange (4 mg/ml)
3. Distile su
4. Küvet
5. Spektrofotometri cihazı
6. Eldiven

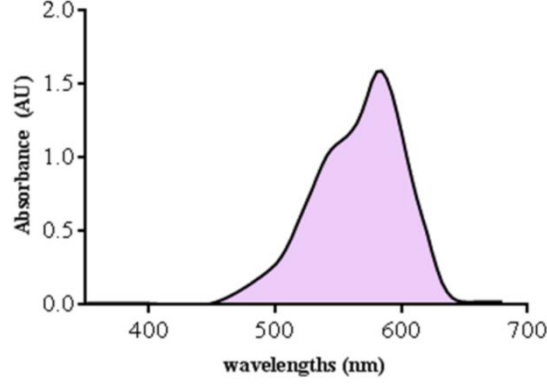
C. PROTOKOL

Standart örneklerin hazırlanması:

1. Altı adet deney tüpü ve Bakır sülfat stok çözeltisi (önceden hazırlanmış, konsantrasyonu belli 40 µg /mL) alınır.
2. Birinci tüpe 40 µg /mL Bakır sülfat stok çözeltisinden 2 mL otomatik pipet ile pipetlenir.
3. İkinci tüpten itibaren her tüpe 1 mL distile su ilave pipetlenir.
4. Birinci tüpten 1 mL Bakır sülfat alınır, 2. tüpe konur, karıştırılır.
5. İkinci tüpten 1 mL alınır, 3. tüpe konur, karıştırılır bu işlem 4, 5 ve 6. tüpler için de tekrar edilir.
6. En son tüpteki fazla olan 1 mL sıvı atık kabına otomatik pipet vasıtasıyla atılır.

Ölçüm için uygun dalga boyunun seçilmesi:

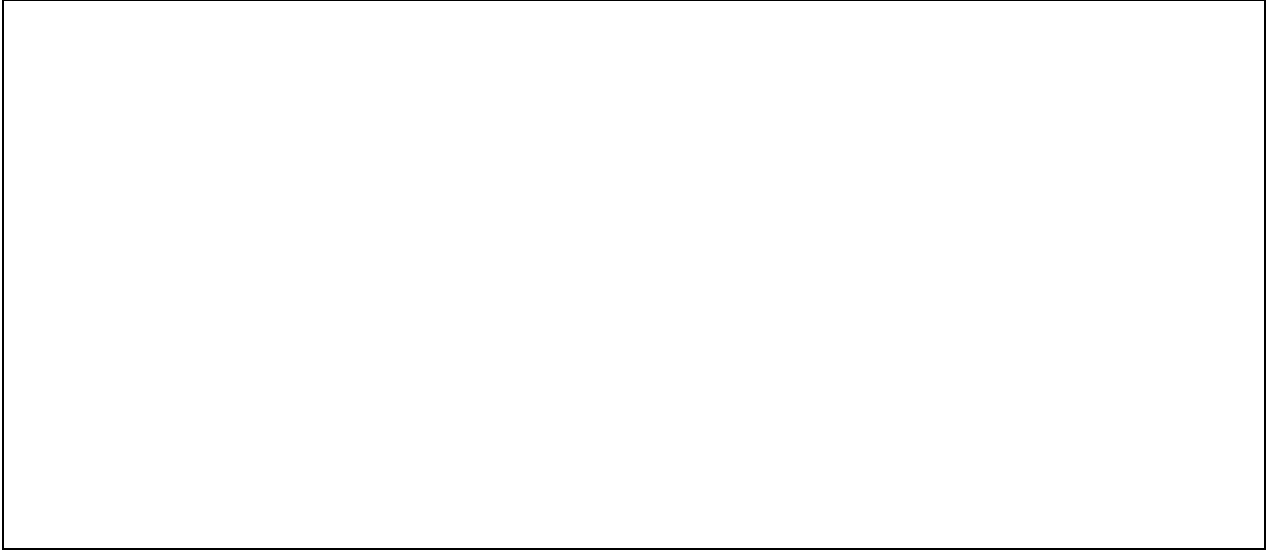
1. Spektrofotometre cihazına örneğimiz otomatik pipet yardımı ile 1 mL küvete pipetlenir.
2. Cihazın tarama düğmesine basılır ve aşağıdaki şekilde egride en fazla pik verdiği dalga boyu kaydedilir. Bu esnada cihazın göstergesinde bir eğri gözlemlenir.



Örnek ve standartların saptanan dalga boyunda ölçülmesi:

Kör (Blank): Küvet, solvent ve aranan madde hariç reaktif ve örnekteki diğer maddelerden kaynaklanan non-spesifik absorpsiyonların tespit edilerek analiz ölçümüne etkilerini sıfırlamaktır. Kör olarak çözücü madde ne ise o kullanılır. Bu deneyde distile su kör olarak kullanılacaktır.

1. Küvete 1 mL distile su pipetlendikten sonra spektrofotometreye yerleştirilir.
2. Ardından cihazın ölçüm düğmesine basılır ve cihaz sıfırlanmış olur.
3. Sırasıyla hazırladığımız 6 standart ve konsantrasyonunu bilmediğimiz örneğimiz küvete 1 ml pipetleyerek ölçüm alınır.
4. Her ölçüm sonrası elde edilen değerler ölçüm tablosuna girilir.
5. Ölçümler alındıktan sonra absorbansa karşılık gelen konsantrasyon grafiği çizilir ve bilinmeyen örneğin konsantrasyonu grafikten elde edilen formül ile hesaplanır.
6. Deney bittikten sonra cihaz kapatılır.
7. Eldiven çıkarılarak atık kabına atılır.

NOTLAR:**ATIK YÖNETİMİ**

Metil Orange içeren tüm çözeltiler atık şişesine dökülecektir. Deney sorumlusundan bilgi alınız.

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ-II KURULU

3. Enzim Kinetiği

LABORATUVAR: DigiLab ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Lambert-Beer yasasının prensiplerini açıklayabilir
Spektrofotometrik ölçümlerin çeşitlerini tanımlayabilir
Spektrofotometrik analiz yaparak enzim aktivitesini hesaplayabilir
Enzim aktivite birimlerini sayabilir

A. TEORİK BİLGİ

Laboratuvara Giriş

Spektrofotometrik ölçümler **end point** ve **kinetik** olmak üzere iki şekilde yapılabilir.

End Point Okuma: Fotometrik okumalarda bir reaksiyon tamamlandıktan sonra yapılan okumaya end point okuma denir. End point okuma için reaksiyon karışımı belirli bir süre ve sıcaklıkta inkübe edilir. Reaksiyon tamamlanıp ürünlerin oluşumu ve dolayısı ile renk oluşumu tamamlandıktan sonra okuma yapılır. End point okumalarda **kör, standart ve numune** olmak üzere üç tüp hazırlanır.

Reaksiyon lineer olarak devam ediyorsa bir standart; reaksiyon lineer olarak devam etmiyorsa birden fazla standart kullanmak gerekir.

Lambert-Beer kanunu gereği standart için aşağıda verilen formül kullanılır. Bu formüldeki A(std), standart solüsyonun absorbansını, C(std) standart solüsyonun konsantrasyonunu, A(num) numunenin absorbansını ve C(num) numunenin konsantrasyonunu göstermektedir.

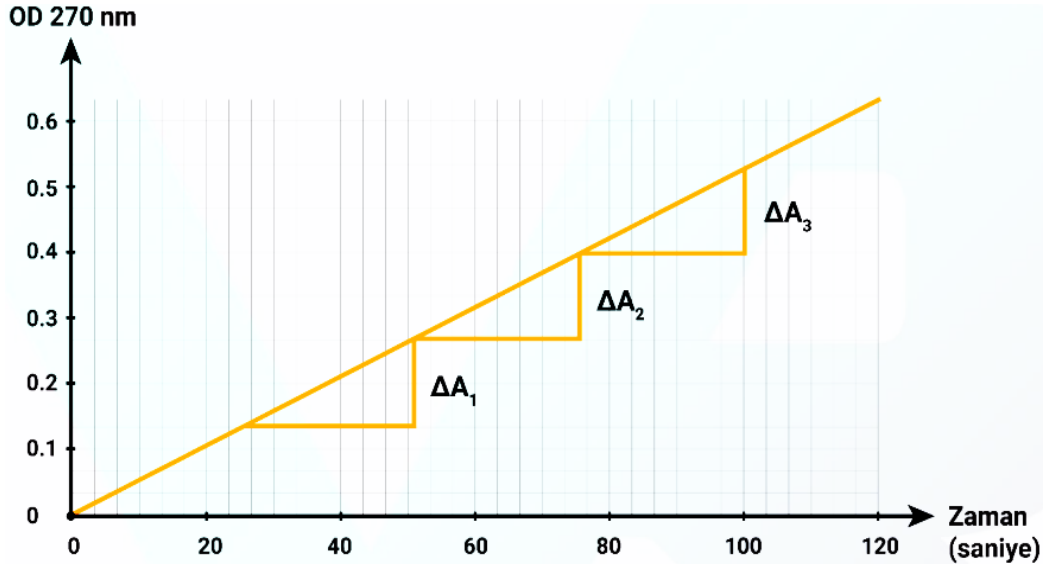
$$\frac{A(\text{std})}{C(\text{std})} = \frac{A(\text{num})}{C(\text{num})}$$

Kinetik Okuma: Genellikle reaksiyon süreleri oldukça uzun olan enzimlerin katalitik aktivitelerinin tayininde kullanılan bu yöntemde **birim zamandaki** absorbans değişimi ölçülür. Hesaplama için standarttan ziyade deney ortamındaki kromojen maddenin molar absorpsiyon katsayısının (ϵ) bilinmesi gerekir.

Molar absorptivite katsayısı (ϵ): Reaksiyon sonunda okunan maddenin molar absorptivite katsayısı olup sabit bir değerdir. Örneğin; rutin biyokimya laboratuvarlarında özellikle enzim ölçümlerinde çoğunlukla reaksiyona giren veya reaksiyon sonucu oluşan NADH veya NADPH koenzimleri kullanılır. Bu koenzimlerin indirgenmiş halleri 340 nm'de maksimum absorbans gösterirler. Bu koenzimlerin molar absorptivite katsayıları 340 nm'de 6.22×10^3 L/mol.cm veya 6.22 L/mmol.cm dir.

$$\epsilon = A/(b.c)$$

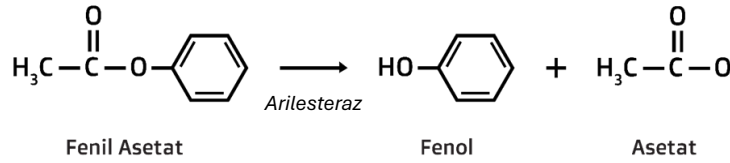
Kinetik okumalarda analiz tüpüne reaktif ve numune konulup belirtilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. Absorbans belirli aralıklarla (her 10 saniyede bir, her dakika bir vb.) alınır. Her absorbansın farkı hesaplanır ve ΔA olarak gösterilir. Daha sonra, her okumanın ΔA değerleri toplanarak toplam zamana bölünerek ortalaması alınır. Böylece, belirlenen zamandaki ortalama absorbans değişimi ($\Delta A/\text{zaman}$) bulunmuş olur.



Şekil 1: Birim zaman başına absorbans değişimini gösteren örnek grafik.

$$\frac{\Delta A}{Zaman} = \frac{(\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \dots)}{\text{total zaman (saniye, dakika. vb)}}$$

Deneyde ölçülen maddenin miktarı reaksiyon sonunda gittikçe artıyorsa artan absorbans değeri bulunur, azalıyorrsa azalan absorbans değeri bulunur. ΔA değerlerinin işaretleri dikkate alınmadan mutlak değerlerin alınması gerekir.



Şekil 2: Fenil asetatın arilesteraz enzimi ile fenol ve asetata ayrılmasının şematik gösterimi.

Ariesteraz: Bu enzim insan serumunda HDL'ye bağlı olarak bulunan bir enzimdir. Enzim Fenilasetat'ı substrat olarak kullanır. Fenilasetat'ı fenol ve asetat'a ayırır. Oluşan Fenol'un 270 nm'deki **dakikalık absorbans artışı** ile bu enzimin aktivitesi ölçülebilir. Uygun görüldüğü takdirde maksimum absorbans tayini yapılabilir (bkz: Spektrofotometre deneyi).

Gerekli işlemler yapıldıktan sonra elde edilen ΔA değerleri aşağıdaki denkleme yerleştirilerek enzim aktivitesi bulunur. Bu denklemde dakikadaki ortalama absorbans değişimini ($\Delta A/dk$), 10^6 birim değişimini U/L ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), toplam reaksiyon hacmini (V_t) ml, a molar absorptivite katsayısını (ϵ) $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ışık yolunu (b) cm, numune hacmini (V_{num}) ml göstermektedir.

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{dk}\right) \cdot 10^6 \cdot V_t}{\epsilon \cdot b \cdot V_{num}}$$

B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1. Birinci Reaktif: Tampon çözelti (100 mM pH 8 Tris ve 2.5 mM kalsiyum klorür)
2. İkinci Reaktif: Fenil asetat (Substrat, 300 mM etilen glikol içerisinde)
3. Numune: İnsan serum örneği
4. Deney tüpü (x6)
5. Otomatik mikro pipet (10-100 µL)
6. Otomatik mikro pipet (100-1000 µL)
7. 100 µL pipet uçları
8. 1000 µL pipet uçları
9. Spektrofotometri cihazı
10. Spektrofotometri küvetleri

C. PROTOKOL

Not: Deneyin yapılışı ile ilgili protokol, sanal lab uygulaması içinde bulunan tablette ayrıntılı olarak verilmiştir. Protokol özeti aşağıdaki gibidir.

- 1) Laboratuvar asistanınız Amy'yi dinledikten sonra girişin sol tarafında yer alan önlük ve eldivenleri giyin.
- 2) Masada bulunan reaktifleri analizör cihazını kullanarak etiketleyin.
- 3) Serum örneğinden 50 µL (0.05 mL) alın ve ilk deney tüpüne pipet ile ekleyin.
- 4) Tampon çözelti kabından 1.5 mL alın ve ilk deney tüpüne pipet ile ekleyin.
- 5) Deney tüpüne 50 µL (0.05 mL) substrat çözeltisi pipet ile ekleyin ve karıştırın.
- 6) Deney tüpündeki içeriğin tamamını, spektrofotometri küvetine pipet kullanarak aktarın.
- 7) Spektrofotometri cihazını, "Aç" tuşuna basarak açın. Cihazın kapağını kaldırın. Spektrofotometri küvetini, spektrofotometri cihazına yerleştirin.
- 8) Spektrofotometri cihazının "Ölçüm" tuşuna basın. Absorbans değerlerini görmek için VRLab Tablet'in Deney sekmesindeki "Dakika başına absorbans değerleri" sekmesini açın. Verilerin Tablo 1'e otomatik olarak doldurulduğunu gözlemleyin. VRLab Tablet'te "Grafik Çiz" tuşuna basarak topladığını verilerin grafiğini çizin.
- 9) VRLab Tablet'in Deney sekmesindeki "Enzim aktivitesinin hesaplanması" sekmesini açın. Deneyde takip ettiğiniz adımlara uygun şekilde Tablo 2'yi doldurun.
- 10) VRLab Tablet'in Deney sekmesindeki "Değerlendirme sorusu" sekmesini açın ve çoktan seçmeli soruyu cevaplayın. Doğru cevap yeşil, yanlış cevaplar kırmızı olarak görünecektir.
- 11) Cevaplarınızı VRLab Tablet'e kaydetmek için "Verileri Kaydet" tuşuna basın. Kaydedilen verilerinize "My Data" bölümünden erişebilirsiniz.

D. TABLOLAR VE HESAPLAMALAR

1. Kinetik enzim aktivitesi ölçümleri

Zaman (Saniye)	0	20	40	60	80	100	120	ΔA
Absorbans								
ΔA								

2. Enzim aktivitesinin hesaplanması

Parametreler	Değerler
$\Delta A/dk$	
Toplam hacim	
Numune hacmi	
ϵ	
Işık yolu	
Birim değişimi	
Enzim aktivitesi	

E. TARTIŞMA

Bu deney sonucunda Lambert-Beer yasasının prensiplerini deneyimlediniz. Spektrofotometrik ölçümlerin çeşitlerini öğrendiniz ve 270 nanometrelik dalga boyunda spektrofotometrik analiz yaparak dakikadaki ortalama absorbans değişimini buldunuz. Toplanan verileri Lambert-Beer yasası formülüne uygulayarak arilesteraz enziminin aktivitesi hesaplandınız. Sizce farklı bir enzimin aktivitesini ölçmek için deneyimizde ya da hesaplamalarımızda neleri değiştirmemiz gerekirdi? Tartışın.

F. DENEY SORUSU

Bir araştırıcı saflaştırdığı enzimin aktivitesini ölçmek istemektedir. Reaksiyon hacmi 240 µL, numune hacmi 20 µL ve 2 dakika boyunca 10'ar saniye aralıklar ile kinetik okuma aldığında delta absorbansın 1.22 olduğu bulunmuştur. Buna göre araştırıcının elindeki enzimin aktivitesi nedir?

- a) 4,28 U/L
- b) 3,22 U/L
- c) 5,68 U/L
- d) 1,22 U/L
- e) 2,65 U/L

NOTLAR:

ATIK YÖNETİMİ

Sanal laboratuvar olduğu için atık bulunmamaktadır.

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ-III KURULU

4. Karbohidratların Kalitatif Tayini

LABORATUVAR: ANK-Z14 ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Anomerik karbon tanımını yapabilir
Fehling reaksiyonunu tanımlayabilir
İndirgen uç içermeyen disakkaritlerin ayırımını yapabilir

A. Teorik Bilgi

Bir karbohidrat, genel formülü $C_m(H_2O)_n$ olan organik bir bileşiktir, yani sadece karbon, hidrojen ve oksijenden oluşur. Karbonhidratlar yeryüzündeki organik maddelerin büyük kısmını oluşturur ve canlılarda pek çok işlevsel rolü vardır.

Karbonhidratlar, aktif aldehit ya da keton grubu taşıyan polihidroksialkoller olarak tanımlanırlar. Karbon sayısına göre (Triozlar, tetrozlar, pentozlar, heksozlar, heptozlar ve oktozlar); monomer sayısına göre (Monosakkaritler, oligosakkaritler, polisakkaritler); Aldehit ya da keton grubu içermelerine göre (aldoz, ketoz) sınıflandırılırlar.

Polisakkaritler enerji deposu (örneğin bitkilerde nişasta ve hayvanlarda glikojen) veya yapısal bileşenler (ör. Bitkilerde selüloz ve eklembacaklılarda kitin) olarak işlev görürler. Yapısal polisakkaritler sıklıkla proteinler (glikoproteinler veya mukoproteinler) veya lipitler (lipopolisakkaritler) ile birlikte bulunur.

5-karbonlu monosakkarit riboz, koenzimlerin (örneğin ATP, FAD ve NAD) ve RNA olarak bilinen genetik molekülün omurgasının önemli bir bileşenidir. İlgili deoksiriboz, DNA'nın bir bileşenidir. Sakkaritler ve pek çok önemli türevleri, bağışıklık sisteminde, fertilizasyonda, patogenezi önlemede, kan pıhtılaşması ve gelişimde anahtar rol oynarlar.

İndirgeyici şekerler olarak karbohidratlar:

İndirgeyici şeker, bir çözültide bir aldehit veya bir keton grubuna sahip olan herhangi bir şekerdir. Alkali koşullar altında şekerlerin enolizasyonu indirgeme testlerinde önemli bir husustur. Bir şekerin alkalın test reaktiflerini azaltma kabiliyeti, indirgeme reaksiyonları için bir aldehit veya keto grubunun mevcudiyetine bağlıdır.

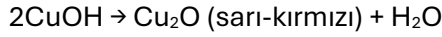
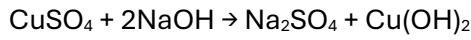
Birtakım şekerler, özellikle disakkaritler veya polisakkaritler, bir karbohidrat (şeker) molekülünün bir diğerine bağlanmasını içeren **glikozidik bağlantılara** sahiptir. Dolayısıyla sükröz, glikojen, nişasta ve dekstrindeki gibi şeker üzerinde indirgeyici grup yoktur. Şekerlerin indirgenmesinde, alkali varlığı, özellikle yüksek pH ve sıcaklıkta geniş ölçüde enolizasyona neden olur.

Bu durum, oksidasyon reaksiyonlarına nötr veya asidik pH'a göre daha yüksek bir duyarlılığa yol açar. Dolayısıyla bu şekerler Cu^{+2} 'yi Cu^{+} 'ya, Ag^{+} 'i, Ag^0 'ya ve benzeri şekilde azaltabilen potansiyel ajanlar haline gelir. İndirgen şekerlerin tespiti için en sık kullanılan testler **Fehling Testi**, **Benedict'in Testi** ve **Barfoed Testi**'dir.

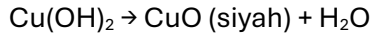
Fehling Testi:

Fehling'in Çözeltisi (koyu mavi renkli), indirgen şekerlerin ve aldehitlerin varlığını belirlemek için kullanılır.

Serbest formdaki indirgeyici gruplar (aldehit ve keton), sıcak bazik ortamda Cu^{+2} iyonlarını Cu^{+1} 'e indirgemekte ve oksitlenmektedir. İndirgenme derecesine ve su kaybına bağlı olarak, CuOH 'nin sarı renginden Cu_2O 'nun kırmızı rengine bir renk değişimi gözlenir.



Şeker yokluğunda;



Sükrozun İversiyonu:

Sükroz bir disakkarittir, yani iki basit şekerden (monosakkaritler) türetilen bir moleküldür. Sükroz, basit şekerler olan glikoz ve fruktozdan oluşur. Invert şeker, glukoz ve fruktoz karışımıdır ve sükrozun bu iki bileşene ayrışmasıyla elde edilir. Sükrozun ayrışması, basitçe sulu bir sükroz çözeltisinin ısıtılmasıyla indüklenabilen bir hidroliz reaksiyonudur. Ayrıca ortama eklenecek olan asit, sükrozun inversiyonunu hızlandırır.

B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1. **Fehling A solüsyonu:** (6,94 g bakır sülfat distile su içinde çözündürülür ve 0,5 mL sülfürik asit ilave edilir, daha sonra hacmi distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.)
2. **Fehling B solüsyonu:** (25 g NaOH ve 34,6 g Na^+ - K^+ tartarata 100 mL distile suda çözündürülür.)
3. Konsantre HCl çözeltisi
4. Seyreltik NaOH çözeltisi
5. Turnusol kağıdı
6. Isıtıcı
7. Cam deney tüpleri
8. Tüp maşası

C. PROTOKOL

Uygulama-1 Glukoz Tayini

- 1) 0,1 M glukoz çözeltisinden bir deney tüpüne 2 mL eklenir. (Tüp 1)
- 2) M glukoz çözeltisinden farklı bir deney tüpüne 2 mL eklenir. (Tüp 2)
- 3) Tüp 1 içine 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B eklenir.
- 4) Tüp 1, maşa ile tutularak ısıtıcı üzerinde 30 sn ısıtılır.
- 5) Tüp 2 içine 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B eklenir.
- 6) Tüp 2, maşa ile tutularak ısıtıcı üzerinde 30 sn ısıtılır.
- 7) Tüp 1 ve Tüp 2 içinde oluşan renkler karşılaştırılır.

Uygulama-2 Sükroz inversiyonu

- 1) Sükroz çözeltisinden iki farklı deney tüpüne 2 mL eklenir. (Tüp 1 ve Tüp 2)
- 2) Tüp 1 içine 10 damla HCl eklenir ve maşa ile tutularak ısıtıcı üzerinde ısıtılır.
- 3) Tüp soğutularak NaOH ile nötralize edilir (Turnusol kağıdı ile kontrol edilerek)
- 4) Tüp 1 içine 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B eklenir.
- 5) Tüp 1, maşa ile tutularak ısıtıcı üzerinde 30 sn ısıtılır.
- 6) Tüp 2 içine 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B eklenir.
- 7) Tüp 2, maşa ile tutularak ısıtıcı üzerinde 30 sn ısıtılır.
- 8) Tüp 1 ve Tüp 2 içinde oluşan renkler karşılaştırılır.

NOTLAR:

ATIK YÖNETİMİ

Fehling içeren tüm çözeltiler atık şişesine dökülecektir. Deney sorumlusundan bilgi alınız.

PASİF HAREKET SİSTEMİ KURULU

5. Lipitler

LABORATUVAR: DigiLab ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Lipitleri ve özelliklerini tanımlayabilir
Yağ asitlerindeki çift bağların halojenizasyonla tayin prensibini açıklayabilir
Yağ asitlerini renk tepkimesine bağlı olarak doymamlık derecesine göre sıralayabilir
Kolesterolün nitel tayininde Salkowski metodunu açıklayabilir
Kolesterolün Salkowski renk tepkimesini değerlendirebilir

A. TEORİK BİLGİ

Lipitler suda çözünmeyen ve kloroform, eter, benzen gibi apolar çözücülerde çözünen biyolojik moleküllerdir. Lipitler yapısal olarak farklı sınıflara ayrılırlar. Bunlardan serbest yağ asitleri ve triaçilgliserol, temel olarak enerji depolanması ve kullanımında görevlidir. Hücre zarının yapısal ve fonksiyonel özellikleri de gliserofosfolipitler, sfingolipitler, glikolipitler ve kolesterol gibi lipitler tarafından sağlanır. Lipitlerin bir alt sınıfı olan steroidler de çeşitli hormonların sentezlenmesinde görev alırlar.

Lipitlerin ortak özellikleri aşağıda listelenmiştir.

- Lipitler, biyolojik kaynaklı organik bileşiklerdir.
- Lipitlerin yapılarında C, H, O bulunur; ayrıca N, P, S gibi elementler de bazı lipitlerin yapısına girerler; O miktarı, C ve H atomlarına oranla daha azdır.
- Lipitler, yağ asitlerinin esterleridirler ya da esterleşebilen bileşiklerdir; temel yapı taşları yağ asitleridir.
- Lipitler, suda çözünmeyen, apolar veya hidrofobik bileşiklerdir. Ancak yapılarında hidroksil (-OH) ve karboksil (-COOH) grupları gibi polaritesi fazla olan hidrofilik grupları fazla miktarda içeren lipitler suda kısmen çözünebilirler.
- Lipitler, kloroform, eter, benzen, sıcak alkol, aseton gibi organik çözücülerde çözünebilirler; buldukları bitkisel ya da hayvansal dokulardan bu çözücülerle ekstrakte edilebilirler.
- Lipitlerin enerji değerleri yüksektir; ancak yanma için karbonhidrat ve proteinlerden daha fazla oksijene gereksinim gösterirler.

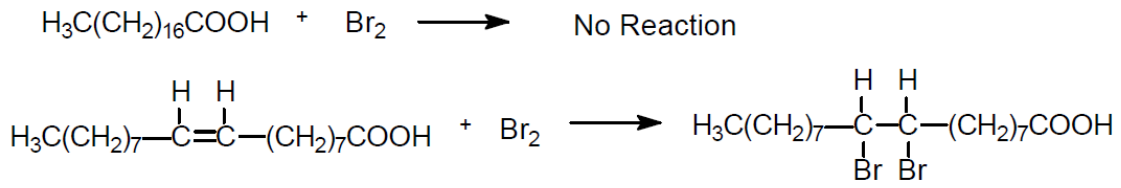
B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1. İnternet bağlantısına sahip bilgisayar ya da tablet

DENEY 1. Halojenizasyon Deneyi

Halojen olarak adlandırılan flor (F), klor (Cl), brom (Br) ya da iyot (I), bir yağ asidinde bulunan çift bağ ile etkileşime girebilirler. Yağ asitlerinde bulunan çift bağ, doymamışlık olarak da adlandırılır. Bu sayede, bir yağın içerdiği doymamışlık oranı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Deneyde kullanılan brom çözeltisi sarı renktedir. Bu çözelti içine doymamış yağ asidi içeren bir çözelti damlatıldıkça, brom ile çift bağ etkileşime gireceği için bu sarı renk yok olur. Damlatma işlemi devam ettikçe, yağ asidi içeren çözeltinin de sarı renk aldığı görülür. Bu nokta, yağ asitlerindeki tüm çift bağların doyduğu ve artık brom ile etkileşecek çift bağın kalmadığı noktadır.

Deneyde, kloroform içinde çözülmüş brom çözeltisi kullanılarak, farklı tüplerde ve aynı miktarda bulunan oleik asit, stearik asit ve araşidonik asit arasındaki doymamışlık oranı karşılaştırılacaktır.



C. PROTOKOL

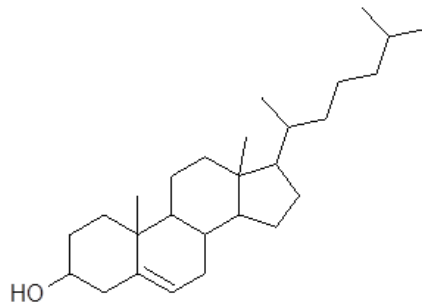
Not: Deneyin yapılışı ile ilgili protokol, sanal lab uygulaması içinde bulunan tablette ayrıntılı olarak verilmiştir. Protokol özeti aşağıdaki gibidir

1. Boş deney tüplerine oleik asit, stearik asit ve araşidonik asit konur.
2. Damlalık ile oleik asit içeren tüpe brom çözeltisi damlatılır. Her damladan sonra çözeltinin rengi incelenir. Çözelti rengi sarıya döndüğü anda işlem durdurulur. Harcanan damla sayısı not edilir.
3. İkinci basamaktaki işlem stearik asit için tekrar edilir.
4. İkinci basamaktaki işlem araşidonik asit için tekrar edilir.
5. Her yağ asidi için not edilen damla sayısı karşılaştırılır ve doymamış bağ sayısı hakkında yorum yapılır.

Örnek	Çözeltinin sarıya dönmesi için gerekli damla sayısı
Oleik asit	
Stearik asit	
Araşidonik asit	

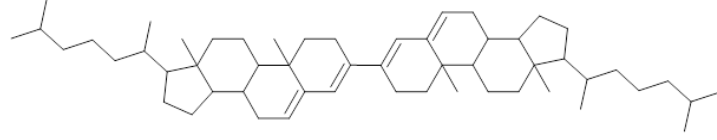
DENEY 2. Salkowski Yöntemi ile Kolesterol Tayini

Ernst Leopold Salkowski tarafından geliştirilen bu yöntem, kolesterol içeren bir çözeltinin, sülfürik asit ile tepkimesi sonucu kırmızı renk oluşturması prensibine dayanır. Bu sayede, kolesterol içeren bir çözelti nitel olarak tayin edilebilir.



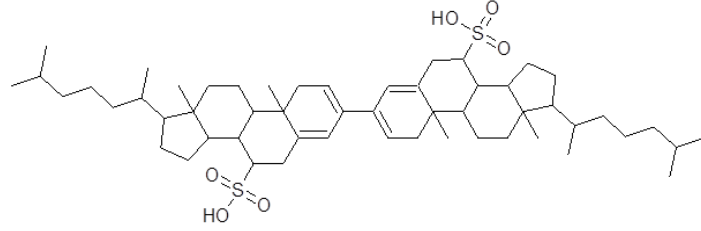
Kolesterol molekülü

Sülfürik asit oldukça higroskopik bir maddedir. Bu özelliği ile kolesterol molekülünden su ayrılmasına sebep olur. Su moleküllerinin ayrıldığı 2 molekül kolesterol birleşerek (kondenzasyon) bikolestadien molekülünü oluşturur.



Bikolestadien molekülü

Sülfürik asit, oluşan bikolestadien molekülünün aromatik halkasını 7,7 pozisyonundan sülfonlanmasını sağlayarak (yapıya $-SO_3H$ grubu katılması) bikolestadien-disülfonik asit oluşturur. Bu oluşan bileşik kırmızı renk verir.



Bikolestadien-disülfonik Asit

PROTOKOL

Not: Deneyin yapılışı ile ilgili protokol, sanal lab uygulaması içinde bulunan tablette ayrıntılı olarak verilmiştir. Protokol özeti aşağıdaki gibidir

1. Boş bir deney tüpüne kloroform içinde çözünmüş olan kolesterol çözeltisi ve farklı bir tüpe kontrol grubu olarak kullanılmak üzere sadece kloroform konur.
2. Kolesterol içeren tüpe damlalık ile sülfirik asit ekleyin ve çalkalayın
3. Sadece kloroform içeren tüp için de ikinci adımdaki işlemi uygulayın.
4. Tüpler arasında renk değişimi olup olmadığını gözlemleyin.

NOTLAR

ATIK YÖNETİMİ

Sanal laboratuvar olduğu için atık bulunmamaktadır.

6. Protein Tayini

LABORATUVAR: ANK-Z14 ve Serbest çalışma zamanında erişim sağlanan Sanal Laboratuvar

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Amino asitlerin yapısını ve peptit bağının özelliklerini tanımlayabilir
Biüret metodunun prensibini açıklayabilir
Biüret metodunun avantaj ve dezavantajlarını sayabilir
Spektrofotometre ile bilinmeyen bir protein örneğinin derişimini hesaplayabilir

A. TEORİK BİLGİ

Biüret Metodu

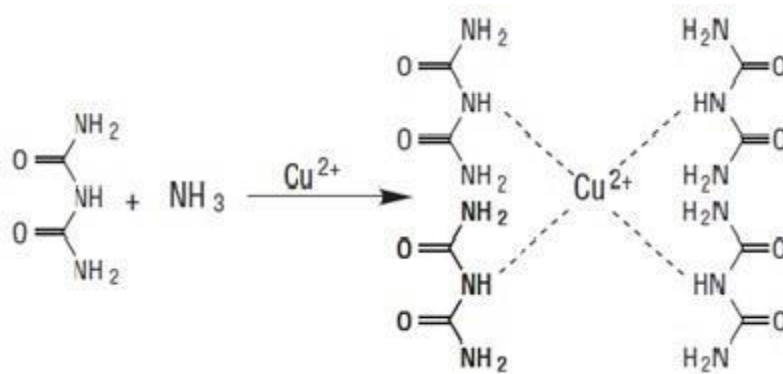
Serum proteini ölçümünde en yaygın kullanılan yöntem biüret reaksiyonudur. Bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{2+} iyonlarının amonyum, aminoasitler, peptitler ve proteinler gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Protein ve peptitlerde iki peptit bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biüret ayırıcından gelen Cu^{2+} 'nin renkli kompleks oluşturması esastır. Oluşan bu kompleks 540-560 nm dalga boyunda maksimum absorbands verir.

Biüret bileşiği yapı olarak peptit bağına benzer bir maddedir ve Cu^{2+} iyonları ile proteinlerin verdiği reaksiyona benzer bir renkli kompleks oluşturur. Bu nedenle kullanılan yöntem Biüret Yöntemi, Cu^{2+} içeren çözeltiliye de Biüret Ayırıcı adı verilir.

Metodun amacı: Konsantrasyonu bilinmeyen proteinin miktarının tayin edilmesi.

Metodun prensibi:

- İki ya da daha fazla peptid bağına sahip peptidler ya da proteinlerin bazik ortamda Cu^{2+} iyonu ile mor-mavi kompleks yapması esasına dayanır.
- Bu kompleks iki peptid zincirindeki 4 azot atomunun ortaklaşmamış elektronları ile Cu^{2+} iyonları mavi-mor renkli kompleks oluşturur.
- Oluşan renkli bileşik 540-560 nm'de ölçülebilir.
- Duyarlılığı düşük (1-100 g/L ya da 0,1 – 10 g/dL) olmakla beraber, pratikliği nedeniyle geniş çapta kullanılan bir yöntemdir.



Metodun Avantajı:

Oluşan renk şiddeti sadece proteine aittir. Burada nükleik asitlerin bulunması ölçümü etkilemez. Pratik bir yöntemdir.

Metodun Dezavantajı:

Bu metot sonucu protein başka bir moleküle dönüştüğü için onu geri kazanmamız olanaksızdır. Amonyak ve amonyum iyonları bozucu faktör olduğundan amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen protein numunesine direkt uygulanamaz. Duyarlılığı düşük.

B. EKİPMAN ve MATERYALLER

1- Biüret reaktifi:

- 1,5 g bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve 6g potasyum sodyum tartarat 500 mL distile suda çözündürülür.
- 300 mL %10 (w/v) NaOH çözeltisi ekleyip 1 litreye tamamlanır.
- 1 g Potasyum iyodür ilave edilir.

2- Protein standardı

4 mg/mL BSA çözeltisi distile su ile hazırlanır.

C. PROTOKOL

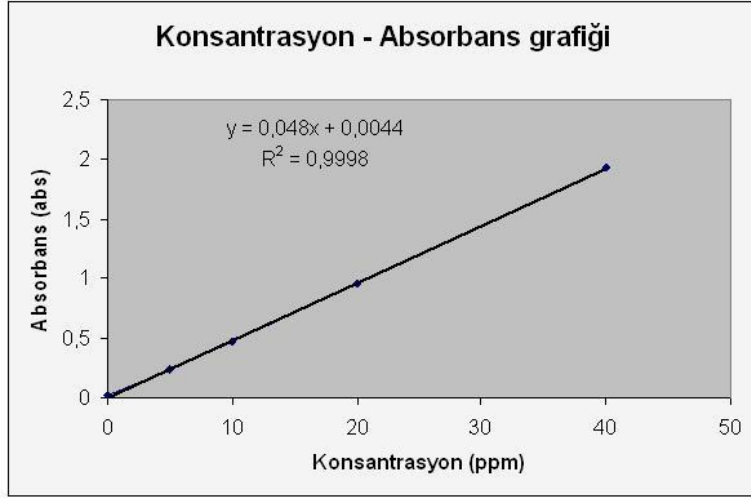
Standartların hazırlanması

Standart grafiğini oluşturmak için 4 mg/mL BSA çözeltisinden 0,8 ; 1,6 ; 2,4 ve 3,2 mg/mL derişimlerdeki çözeltiler distile su ile seyreltilerek hazırlanır. BSA içermeyen ve sadece distile sudan oluşan kör çözelti kullanılır. (Standart çözeltilerin hazırlanması için aşağıdaki tabloyu kullanabilirsiniz)

	Kör	S1	S2	S3	S4	S5
İstenen derişim (mg/mL)	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4
BSA (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Distile su (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0

Hazırlanan tüplere ve derişimi bilinmeyen örnek tüpüne 1 mL Biüre reaktifi eklenir ve oda sıcaklığında 30 dakika beklenir. Spektrofotometre 540 nm dalga boyunda ölçüm yapacak şekilde ayarlanır. Köre karşı sıfırlamadan sonra standart çözeltiler ve örnek absorbanı 540 nm'de okunur. Her çözelti için elde edilen değerler notlar kısmına yazılır.

Standart çözeltilerin derişim-absorbans grafiği aşağıdaki örnekte görüldüğü şekilde çizilir. Standart eğrisi denkleminde, bilinmeyen örneğin absorbanı değeri yazılarak derişim hesaplanır.



Örnek hesaplama: Bilinmeyen örneğin absorbansı 0,873 gelmişse, absorbansı gösteren y değeri yerine bu sayı yazılıp, denklemdaki derişime karşılık gelen x hesaplanabilir.

$$0,873 = 0,048x + 0,0044$$

$$0,873 - 0,0044 = 0,048x$$

$$0,8686 = 0,048x$$

$$18,09 = x$$

Örnek 18,09 mg / mL olarak bulunur.

NOTLAR

ATIK YÖNETİMİ

Büret reaktifi içeren tüm çözeltiler atık şişesine dökülecektir. Deney sorumlusundan bilgi alınız.

KAYNAKLAR

1. A. Ninfa,D. Ballou,M. Benore, 2010, *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
2. Mustafa Altınışık,2007, Organik Kimya ve Biyokimya Uygulamaları, <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/78Uygulamalar.pdf>, Erişim Kasım 2024
3. Charlotte W. Pratt, Kathleen Cornely , 2017, *Essential Biochemistry*, 4th Edition | Wiley
4. Gupta Ppg. 2016, *Essentials of Practical Biochemistry*. Jaypee Brothers Medical P;.