



BİYOKİMYA

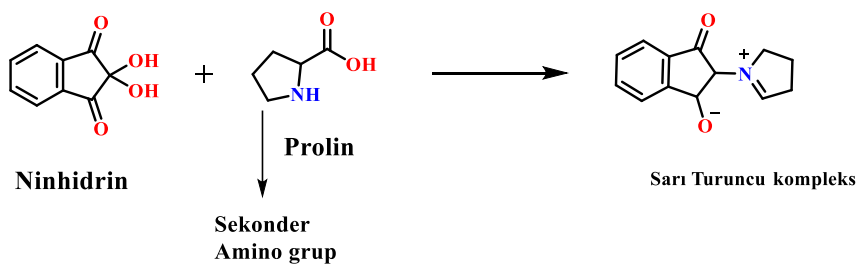
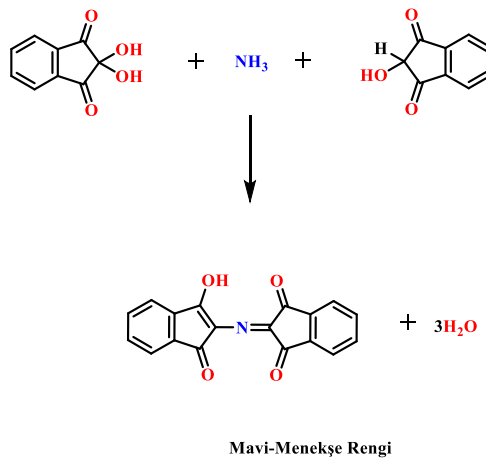
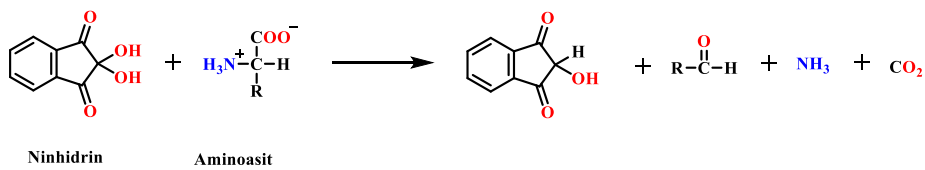


LABORATUVARI

DENEY NO: 1

AMİNO ASİTLERE NİNHİDRİN TESTİ

Serbest bir amino aside ait amino grubu, güçlü bir oksitleyici bir ajan olan ninhidrin ile kimyasal reaksiyona girer. Ninhidrine maruz kaldığında, amino asitlerin oksidatif dekarboksilasyonuna neden olarak CO₂, NH₃ ve aldehit meydana getirir. Amonyak başka bir ninhidrin molekülü ile reaksiyona girerek diketohidrin (Rukemann kompleksi olarak da bilinir) mavi-menekşe bir kompleks oluşur. Prolin ve hidroksiprolinin gibi imino asitler içerdiğinde sarı renkli bir kompleks oluşur. Asparagin kullanıldığında ortaya çıkan kompleksin rengi kahverengidir.



DENEYİN YAPILIŞI:

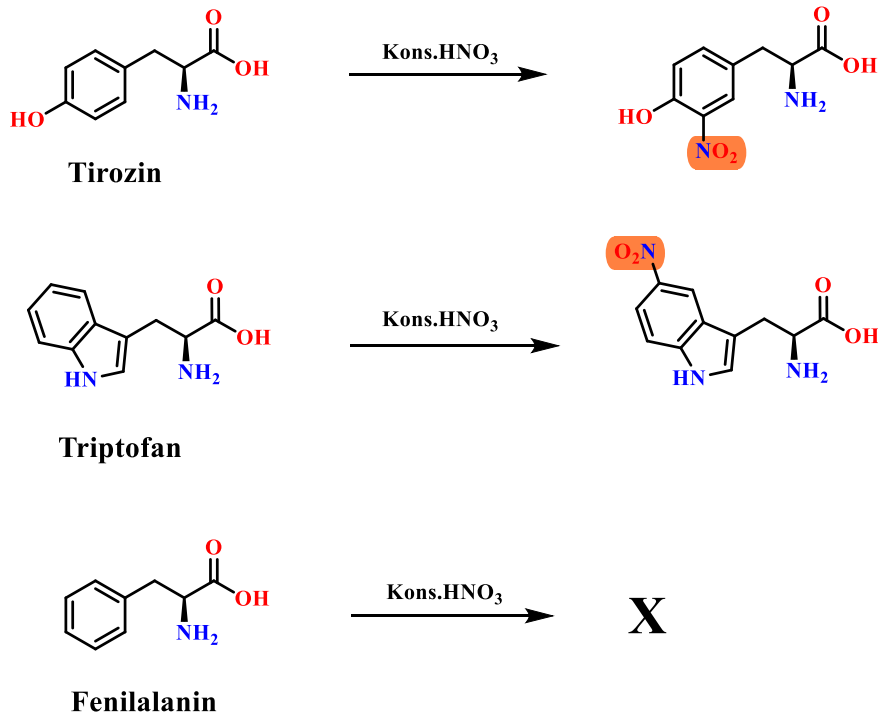
Çözelti: %0.1 Ninhidrin çözeltisi hazırlanır

1. Bir deney tüpüne 2 ml yumurta albumini çözeltisi konur
2. Tüpe 0.5 ml ninhidrin çözeltisi ilave edilir. Kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilir.
3. Tüp çıkarılır ve soğumaya bırakılır. Mavi-menekşe rengin oluşumu gözlenir.

DENEY NO: 2

KSANTOPROTEİN DENEYİ

Proteinlerin oluşturan amino asitlerin yan zincirlerinde yer alan aromatik grupların konsantre nitrik asit (HNO_3) ile benzen çekirdeklerinin nitrolanması esasına dayanır. Oluşan sarı renkli alkali (baz) ilavesi ile portakal rengine döner. Amino asitlerden tirozin ve triptofan kolayca nitratlanarak sarı renkli bileşiklere dönüşen aktif benzen halkaları (aromatik çekirdek) içerir. Ancak fenilalanin aromatik halkası, bir benzen halkası içermesine rağmen nitrik asit ile reaksiyona girmez.



Materyal: Yumurta albumini

Çözelti: Konsantre nitrik asit, %40 NaOH

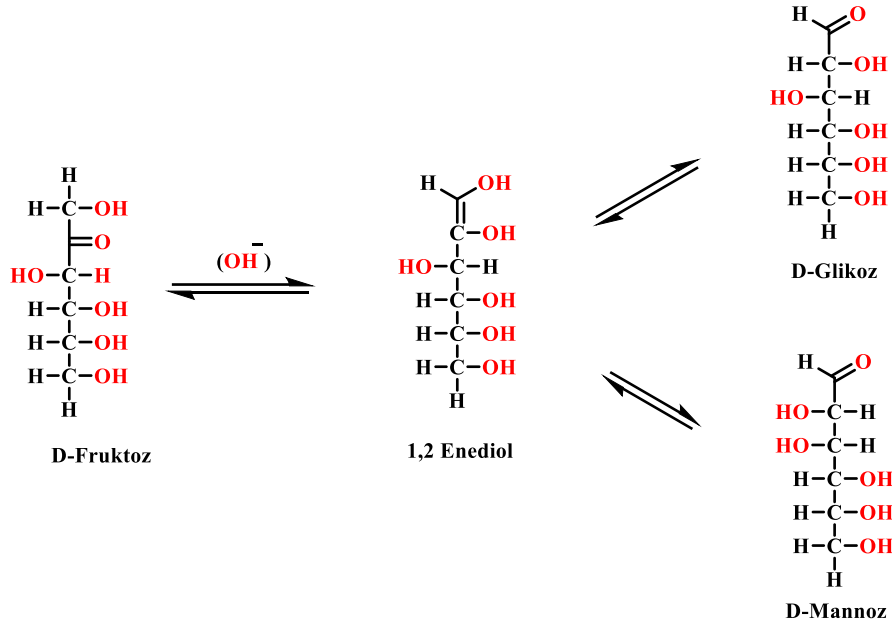
DENEYİN YAPILIŞI

1. Bir deney tüpüne 2 ml yumurta albumini çözeltisi koyulur,
2. Üzerine dikkatle 1 ml konsantre nitrik asit ilave edilir ve karıştırılır Beyaz çökeleğin oluşumu gözlenir.
3. Tüp dikkatle su banyosunda ısıtılır. Bu kez sarı renkli çökeltinin oluşumu gözlenir.
4. Tüp musluk suyu altında soğutulur.
5. Yine dikkatle damla damla 2ml %40 NaOH ilave edilerek, rengin sarıdan portakal rengine (Turuncu) dönüşümü gözlenir.

DNEY NO:3

MOORE DENEYİ

Serbest aldehit veya keton grupları bulunan şekerlere özel bir testtir. Şeker çözeltisi üzerine az miktarda NaOH veya KOH ilavesi ile sarı, portakal rengi ve kahverengi bir renk meydana gelmesi esasına dayanır. Renk değişikliği reaksiyon sonucu serbest hale geçen aldehitlerin polimerizasyonundan ileri gelir. Bu sırada karamel kokusu duyulur.



Metaryeller: %1 Sükroz, %1 Nişasta, %1 Glukoz, %1 Fruktoz

Çözeltiler: %10 NaOH

DENEY YAPILIŞI

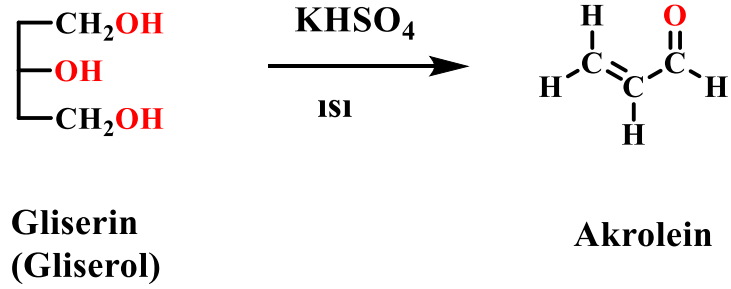
- Dört adet deney tüpü alınır. Tüplerden birincisi üzerine sükroz ikincisine nişasta, üçüncüsüne glukoz ve dördüncüsüne fruktoz yazılır. Her bir tüpe üzerinde yazılı olan madde çözeltisine 5'er ml eklenir.
- Her tüpe 1 ml %10'luk NaOH çözeltisi ilave edilir,
- Tüpler ağzı kapatılarak karıştırılır ve kaynar su banyosunda veya bek alevinde 5 dakika süre ile kaynatılır. Sarı, portakalsarı veya kahverengi bir renk oluşur.
- Karamel kokusunun alınması çözelti içinde serbest aldehit veya keton grupları bulunan karbohidratların olduğunu gösterir.
- **Sükroz** ve **nişasta**, aldehit ve keton gruplarına sahip olmadığından reaksiyon ve renk vermezler. **Glukoz** ve **fruktoz** alkalilerle ısıtıldığında aynı **1,2-enediol** oluşur.

DENEY NO: 4

AKROLEİN DENEYİ

Gliserol tayini için kullanılan bir deneydir. Gliserol yağ asitleri ile birlikte muhtemelen ince bağırsaklarda lipidlerin parçalanması sonucu meydana gelir. Nötral yağlar gliserolün farklı yağ asitleri ile yapmış olduğu esterlerdir.

Prensip; Gliserolün KHSO_4 ile ısı karşısında dehidrate olması ve doymamış bir aldehit olan akrolein'in meydana gelmesidir. Akrolein karakteristik kötü kokusu ile tanınır.



Materyel: Gliserol ve KHSO_4

Deneyin Yapılışı:

1. Üç spatül ucu (yaklaşık 1.5 g kadar) KHSO_4 deney tüpüne alınır.
2. Üzerine 1 ml gliserol ilave edilir.
3. Tüp su banyosunda ısıtılır. Oluşan kötü koku akroleinden ileri gelir.

DENEY NO: 5

NİŞASTANIN HİDROLİZİ

Nişasta asit ile (*In vitro*) hidroliz edilirse, sırayla dekstrinler, maltoz ve glukoz meydana gelir. Hidroliz başlangıcında önce dekstrinler oluşur. Dekstrinler az sayıda glukoz ünitesinden oluşan polisakkaritlerdir. Molekül ağırlıklarına göre amilodekstrinler, eritrodekstrinler ve akrodekstrinlerdir olarak sınıflandırılabilirler. Hidroliz sonucu dekstrinler maltoz ve glukoz parçalanır. Nişastanın hidrolizi sırasında oluşan bu parçalanma ürünleri, İyotla verdikleri renk reaksiyonları ile gözlenebilirler. Bu maddelerin iyotla verdikleri renkler aşağıda gösterilmiştir.

Nişasta-----Mavi

Amilodekstrin-----Mavimsi kırmızı (Menekşe)

Eritrodekstrin----- Kırmızı

Akrodekstrin----- Hafif sarımsı

Maltoz ve Glukoz----Renksiz (Benedikt reaksiyonu ile kırmızı renk verir)

Çözeltiler:

%1 Nişasta Çözeltisi

3N HCl Çözeltisi

I₂/KI çözeltisi: 0.1 g I₂ ve 0.5 g KI 30 mL saf suda çözülerek hazırlanır

Kalitatif Benedikt Çözeltisinin Hazırlanışı: 1.73 g sodyum sitrat, 1 g susuz sodyum karbonat (Na₂CO₃) ve 0.173 g bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) 10 mL suda çözülerek hazırlanır.

DENEYİN YAPILIŞI:

Bir deney tüpüne 10 ml nişasta çözeltisi alınır. Üzerine 3 ml 3N HCl ilave edilir. Hidrolizattan birkaç damla alınarak bir başka tüpe aktarılır ve 2 damla İyot çözeltisi koyularak renk gözlenir. Hidrolizin başlangıç safhasında küçük bir numune alınıp iyot çözeltisi ilave edilirse mavimsi kırmızı (menekşe) renk verir. Bu, amilodekstrin olduğunu gösterir. 5 dakika sonra tekrar küçük bir numune alınıp iyot çözeltisi ile kontrol edilirse kırmızı renk verir. Bu da eritrodekstrin olduğunu gösterir. 5 dakika sonra yine küçük bir numune alınıp iyot çözeltisi ile muamele edilirse hafif sarımsı renk gözlenir. Bu da akrodekstrin olduğunu gösterir. Hidroliz sona erince çözeltilerden 0.5 ml alınır, ortama bir spatül ucu Na₂CO₃ ilave edilir ve 5 ml kalitatif benedikt çözeltisi üzerine ilave edilir ve eğer nişasta glukoz ve maltoza kadar parçalanmış ise ısıtma sonucunda kiremit kırmızısı çökelek görülür.

DENEY NO: 6

KETON CİSİMLERİ

Hücrede yağ asitleri, glukoz ve amino asitler çeşitli yollarla asetil Ko-A ünitelerine kadar yıkılırlar. Oluşan bu asetil Ko-A moleküllerinden büyük bir kısmı enerji elde edilmek amacı ile krebs siklusuna girerek CO₂ ve suya kademeli parçalanırlar. Bir kısım asetil Ko-A ise transasetilasyon, kolesterol sentezi, yağ asitleri sentezi gibi biyosentez reaksiyonlarında kullanılır. Bütün bu reaksiyonlardan arta kalan asetil Ko-A molekülleri de bir seri reaksiyonlardan geçerek keton cisimleri denilen maddeleri oluştururlar. Bu maddeler, büyük ölçüde karaciğerde ve az olarak da böbreklerde sentezlenirler. Hücrede asetil Ko-A moleküllerinden keton cisimlerinin oluşumuna ketogenezis adı verilir.

Keton cisimlerinin biyosentezinde ilk basamakta iki molekül asetil Ko-A birleşerek asetoasetil Ko-A oluşur. Bu maddeden de önce asetoasetik asit meydana gelir. Asetoasetik asidin büyük kısmı redüksiyon ile *p*-hidroksi bütirik aside, küçük bir kısmı ise dekarboksilasyon ile asetona dönüşür.

Meydana gelen asetoasetik asit, *p*-hidroksi bütirik asit ve aseton molekülleri keton cisimleri olarak adlandırılır.

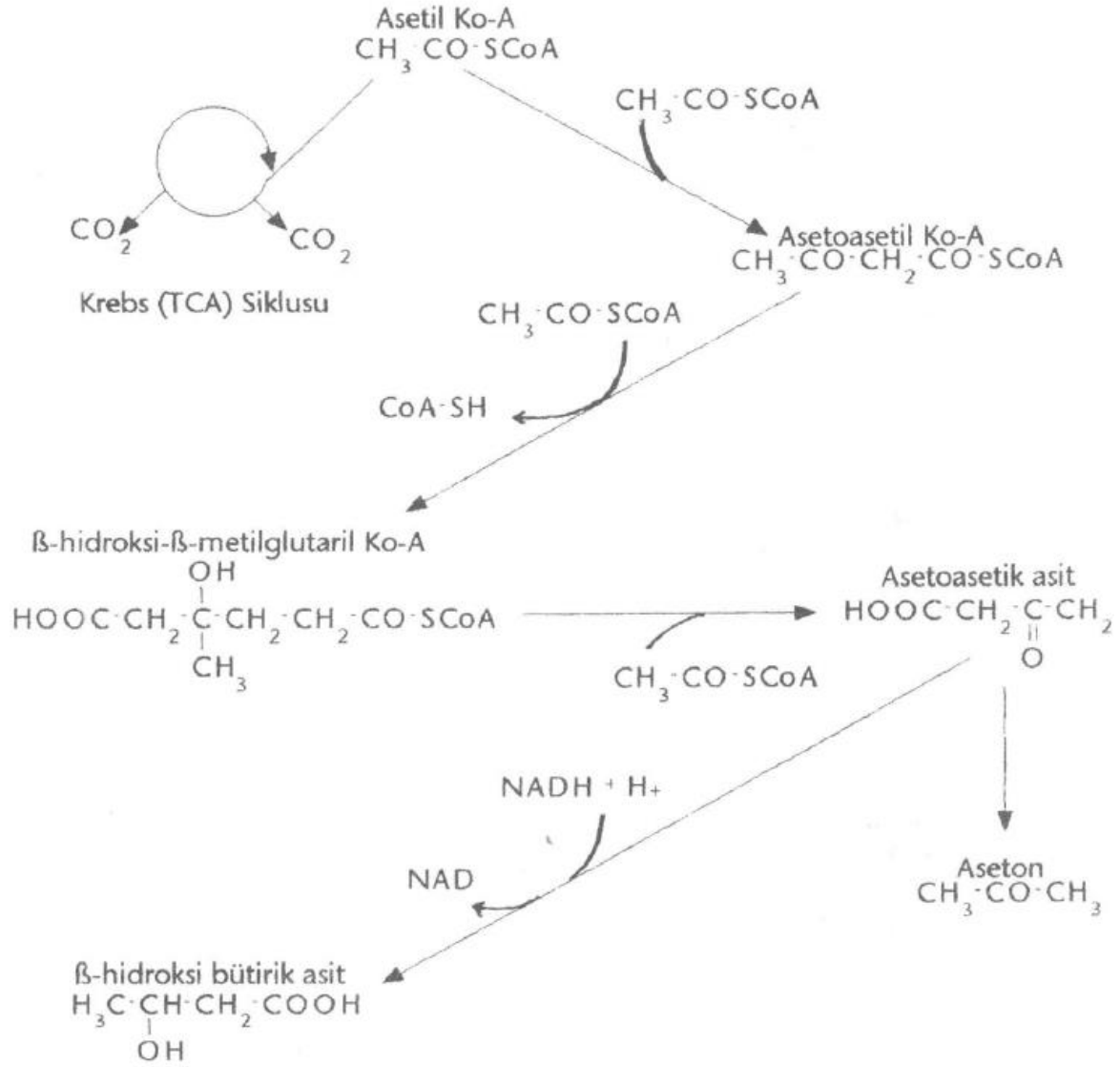
Karaciğerde meydana gelen keton cisimleri kan yolu ile ekstrahepatik dokuya taşınır. Ekstrahepatik dokuya gelen keton cisimleri tekrar oksitlenerek yıkılırlar. Yıkılma, keton cisimlerinin önce tekrar asetoasetil Ko-A şekline dönüp, krebs siklusuna girerek CO₂ ve suya kadar parçalanmasıdır. Keton cisimlerinin ekstrahepatik dokuda yıkılmasına ketolizis adı verilir.

Yağ asidi kullanımının arttığı bazı hallerde, bu yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu çok fazla miktarda asetil Ko-A okside etmek yeteneğinde olmadığından, bunlar keton cisimlerine dönüşerek kana verilirler ve ekstrahepatik dokuya girerler. Ekstrahepatik dokunun, keton cisimlerini kullanma yeteneği oldukça fazladır. Ancak karaciğerdeki keton cisimleri oluşumu (ketogenezis) hızı ekstrahepatik dokuda kullanılma (ketolizis) hızını aşacak olursa, organizmada keton cisimleri birikir, buna ketozis denir. Ketozis sonucu kanda keton artar. Kanda keton cisimleri konsantrasyonunun artmasına ketonemia veya hiperketonemia denir. Kanda miktarı artan keton cisimleri idrara da geçerler. Bu duruma ketonüria denir.

Asit özelliğinde olan keton cisimlerinin kanda birikmesi sonucu asidozis denen bir durum meydana gelir.

Ketozis, şeker hastalığı, ileri derecede açlık, yüksek yağlı düşük karbonhidratlı besin diyeti, süt verme ve gebelik gibi patolojik ve fizyolojik durumlarda görülür. Normal idrarda keton cisimleri, kullandığımız metotlarla gösterilemeyecek kadar azdır. Bundan dolayı normal İdrarda pratik olarak keton cisimleri yoktur denir.

KETON CİSİMLERİNİN OLUŞUMU



LEGAL DENEYİ (İdrarda Aseton Aranması)

Prencip: Sodyum nitroprussiyatın aseton ile renkli bir kompleks vermesi esasına dayanır.

Materyal: İdrar

Çözeltiler: 1. Sodyum nitroprussiyat
2. %10 NaOH
3. Glasiyel asetik asit

Deneyin Yapılışı:

1. Bir tüpe birkaç sodyum nitroprussiyat kristali konur. 2 ml kadar distile suda çözülür.
2. Diğer bir tüpe 5 ml idrar konur. Üzerine alkali reaksiyon verinceye kadar birkaç ml (3 ml) NaOH ilave edilir. Alkali reaksiyon verip vermediği turnusol kağıdı ile kontrol edilir.
3. İkinci tüp üzerine birkaç damla, birinci tüpte hazırlanan sodyum nitroprussiyat çözeltisi ve birkaç damla glasiyel asetik asit ilave edilir. Menekşe renginin oluşumu İdrarda aseton bulunduğunu gösterir.

GERMARD DENEYİ (İdrarda Asetoasetik Asit Aranması):

Prencip: Asetoasetik asidin FeCl_3 ile kırmızı bir renk vermesi esasına dayanır.

Materyal: İdrar

Çözeltiler: 1. %10 FeCl_3

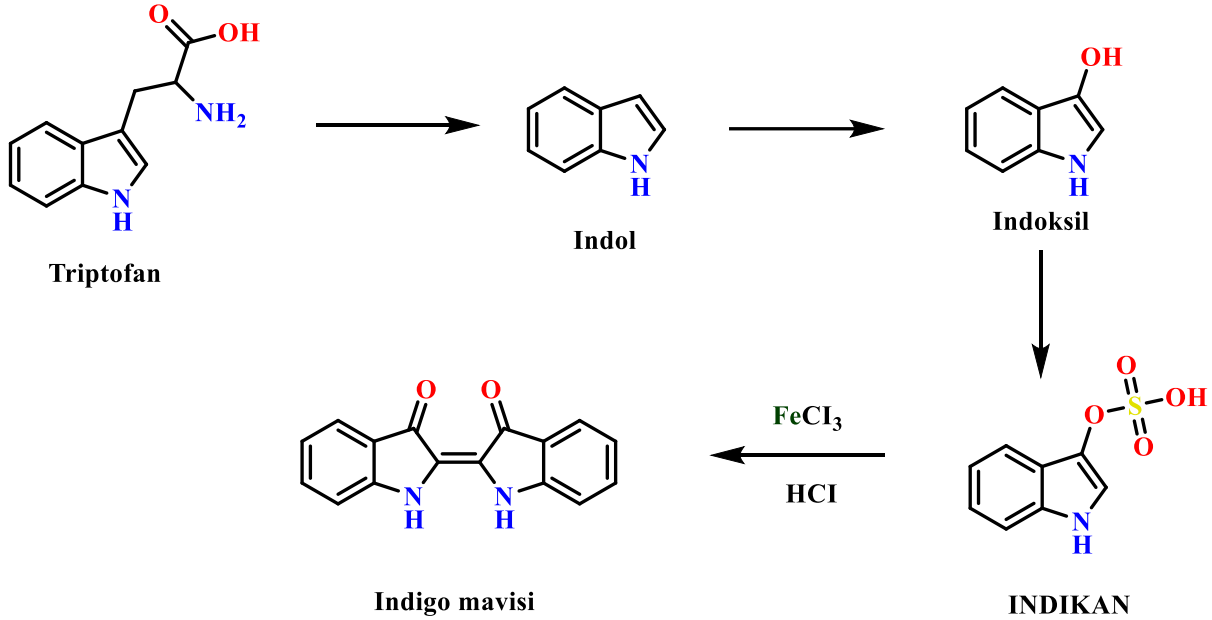
Deneyin Yapılışı

1. Bir deney tüpüne 5 ml İdrar alınır. Üzerine fosfatlar tamamen çökünceye kadar FeCl_3 ayırıcı damla damla ilave edilir. FeCl_3 ayırıcı renk meydana gelinceye kadar ilave etmemek gerekir. Eğer renk oluşursa, renk kayboluncaya kadar yeniden idrar ilave edilir.
2. İdrarda görülen beyaz çökelti süzgeç kağıdı ile süzülerek ayrılır.
3. Elde edilen berrak süzüntü ikiye ayrılır. Birinci tüpteki süzüntü kontrol olarak saklanır. Diğerine birkaç damla FeCl_3 ayırıcı ilave edilir. Kiraz veya bordo kırmızısı renk meydana gelmesi idrarda asetoasetik asit varlığını gösterir. Aseton bu rengi vermez.

DENEY NO: 7

OBERMAYER TESTİ (İdrarda İndikan Tayini İçin)

Prensip: İndikanın HCl ile indoksile, indoksilin de FeCl₃ İle Indigo mavisi veren bir bileşiğe dönüşmesidir.



Materyal: İdrar

Çözeltiler:

1. **Obermayer ayıracı:** 3 g FeCl₃, 100 ml konsantre HCl de çözülür. Taze hazırlanmalıdır.
2. Kloroform

Deneyin Yapılışı

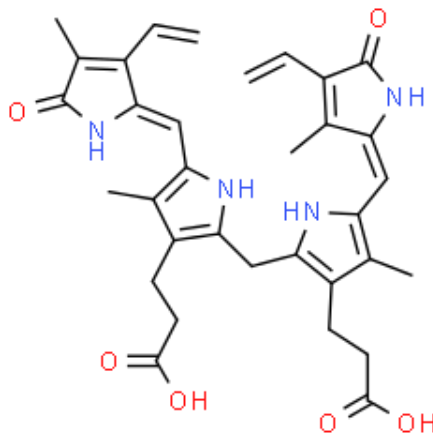
1. Bir deney tüpüne 5 ml idrar ve üzerine eşit miktarda obermayer ayıracı konur. Tüp baş aşağı getirilerek karıştırılır.
2. Üzerine 2-3 ml kloroform ilave edilir, tekrar karıştırılır. Tüpün dip kısmında mavi renkli kloroformun toplanması indikanın varlığını gösterir.

İyot, salisilik asit ve timol gibi ilaçlar alınmışsa mavi renk yerine gül pembesi renk görülebilir. Adı geçen ilaçlardan dolayı meydana gelen kırmızı renk, sodyum tiyosülfat ilavesiyle kaybolur. Rengin kaybolmaması İdrarda indikan varlığını gösterir bu renk indigo kırmızısıdır.

DENEY NO: 8

İDRARDA BİLİRUBİN ARANMASI (Smith-Rosin Deneyi)

Bilirubin, vücudun kırmızı kan hücrelerini parçalama işlemi sırasında ortaya çıkan sarımsı bir maddedir. Bu madde karaciğerde bulunur ve normal olarak sindirim sırasında vücuttan dışarı atılır. Karaciğerin hasar görmesi durumunda, bilirubin kan ve idrara sızabilir. İdrarda bilirubin, karaciğer hastalığının bir belirtisi olabilir. Bu durumda kandaki bilirubin miktarını ölçmek için bilirubin testi uygulanır. Bu maddenin vücutta bir fonksiyonu bulunmamaktadır.



Prensip: Bilirubinin iyotla birleşerek yeşil renkli bir bileşik vermesi esasına dayanır.

Materyal: İdrar

Çözeltiler. İyodun etil alkoldeki çözeltisi: 0.7 g I₂ ve 0.5 g KI üzerine 5 ml distile su konur, karıştırılır, daha sonra üzerine 95 ml %96 etil alkol eklenerek yeniden karıştırılır.

Deneyin Yapılışı

1. Bir deney tüpüne 5 ml idrar alınır.
2. Üzerine tüp eğik tutularak, pipet tüpün kenarına değdirilmek suretiyle 12 ml iyodun etil alkol çözeltisinden eklenir. İki tabaka arasındaki yeşil bir halkanın oluşması İdrarda bilirubin olduğunu gösterir.

DENEY NO: 9 ve 10

İDRARDA GİZLİ KAN ARANMASI İLE İLGİLİ DENEYLER

Hematüri ve Hemoglobinüri

Hematüri idrarda eritrositlerin bulunması halidir. Hemoglobinüri ise idrarda yalnız serbest hemoglobinin bulunduğu halidir. Bu durumda eritrositler daha önce parçalanmışlardır. Hematüri çeşitli böbrek ve idrar yolu hastalıklarında görülür. Böbrek travması, bazı mesane karsinomlar, böbrek taşlarının varlığı ve idrar yollarının ağır enfeksiyonlarında idrarda bulunan kan büyük ölçüdedir, bu hale makrohematüri denir. Ağır hipertansiyon krizleri ile aşırı egzersiz, fazla soğuğa maruz kalma da makrohematüri nedenlerindendir, Mikrohematüride idrarda eritrositlerin varlığı, mikroskobik olarak ya da kalitatif kimyasal yöntemlerle saptanır, özellikle böbrek taşı ve böbrek tüberkülozunda sıklıkla mikrohematüri görülür.

Hemoglobinemiyi yani kanda serbest halde bulunan hemoglobin düzeyini haptoglobin isimli bir serum mukoproteini düzenler. Plazmadaki serbest hemoglobin düzeyinin haptoglobinin taşıma kapasitesini aşması halinde idrara hemoglobin geçer, bu duruma organizmada meydana gelen sürekli hemoliz olayında rastlanır. Hemoglobinürinin nedenleri çeşitlidir. Bunları başlıca dış ve iç faktörlerden kaynaklanan hemoglobinüriler olmak üzere iki bölümde incelenir. Dış faktörlerden ileri gelenlere bakteriler, protozoalar, çeşitli kimyasal maddeler (kinin, sülfamid, asetanilid, pimakrin, saponin, fenil hidrazin v.b.) bazı bitkisel ve hayvansal zehirler (kinin, kroton, vicia faba, yılan zehiri v.b.) ile bazı serumlar örnek verilebilir. İç faktörlerden ileri gelenlere ise örnekler, paroksimal soğuk hemoglobinürisi, yürüyüş hemoglobinürisi ve proksimal gece hemoglobinürisidir.

O-TOLUIDİN DENEYİ

Prensip: H₂O₂ varlığında hemoglobinin hem kısmının o-toluidin ile mavi renk vermesi esasına dayanır.

Materyal: İdrar

Çözeltiler:

1. %1 o-toluidin çözeltisi: 1 g o-toluidin 100 ml %95'lik etil alkolde çözülerek hazırlanır.
2. Asit-peroksit çözeltisi: 50 ml glasiyal asetik asit 100 ml %3'lük H₂O₂ ilavesiyle hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

1. Bir tüpe 5 ml idrar konur.

2. zerine iki damla o-toluidin ve iki damla asit-peroksit çözeltisi damlatılır. 30- 60 saniye içinde mavi ya da yeşil-mavi rengin oluşması deneyin pozitif olduğunu gösterir. Bu test benzidin deneyinden daha duyarlıdır.

BENZİDİN DENEYİ

Prensip: Hemoglobinin hem kısmının H_2O_2 varlığında benzidinin oksidasyonunu katalize ederek benzidin mavisi adlı bileşiğe çevrilmesi esasına dayanır

Materyal: İdrar

Çözeltiler: 1. %1 Benzidin dihidroklorür çözeltisi
2. %3 Hidrojen peroksit çözeltisi
3. %1 Sodyum asetat çözeltisi

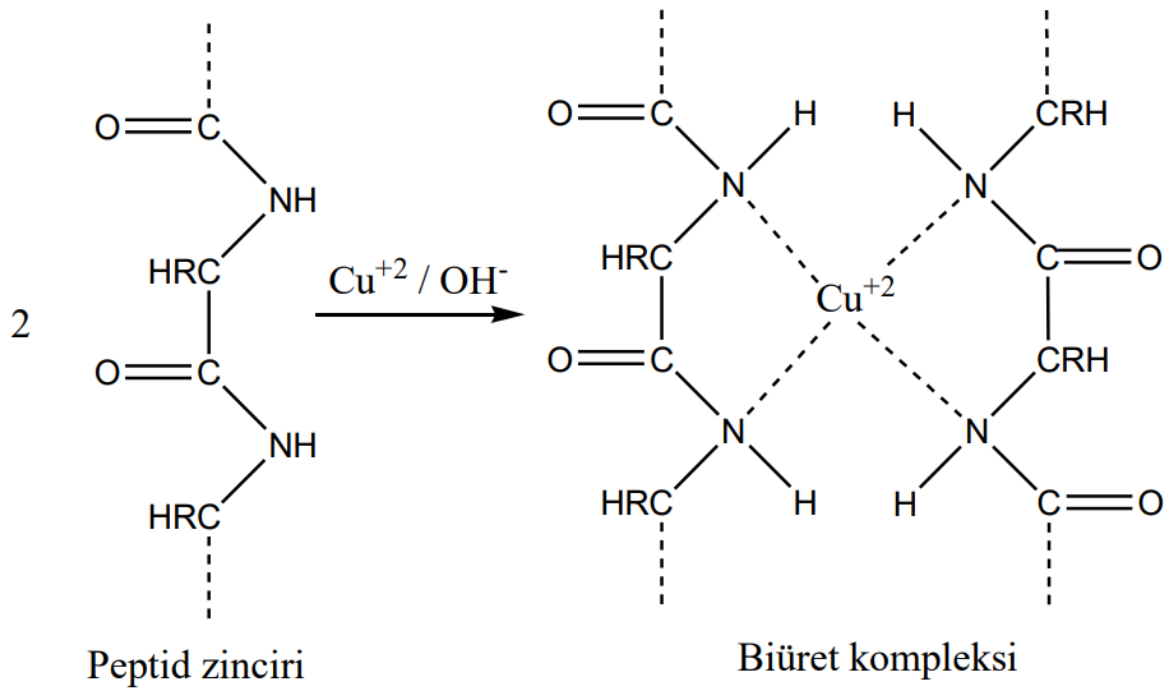
Deneyin Yapılışı:

1. Bir deney tüpüne 1 ml idrar konur ve distile su ile 5 ml'ye tamamlanır. 2. Sonra İdrara sırası ile 1 ml benzidin hidroklorür, 1 ml H_2O_2 ve 1 ml sodyum asetat çözeltilerinden ilave edilir. Yeşil, mavi-yeşil ya da mavi rengin oluşumu idrarda hemoglobin varlığını gösterir. Rengin meydana gelmesi için geçen zaman idrardaki 1-10 saniye içinde görülür. Eğer idrarda çok az miktarda kan varsa idrar santrifüj edilir. Dipteki çökelekli kısım bir lama aktarılır ve üzerine sırayı yukarıda sözü edilen çözeltilerden birer damla damlatılır. Lam parmaklar arasında rotasyon yaptırılarak çözeltilerin birbiriyle karışması sağlanır. Renk reaksiyonu testin pozitif sonucunu gösterir.

DENEY NO: 11

Biüret Deneyi:

Peptid bağlarının varlığının gösterilmesi için yapılır. Alkali ortamda CuSO_4 iki veya daha fazla peptid bağı ihtiva eden moleküllerle reaksiyona girerek menekşe renkli kompleks meydana getirir. Serbest amino asitler peptid bağı içermediği için bu reaksiyonu vermezler. Reaksiyonda CuSO_4 içerisindeki Cu^{2+} iyonları peptid bağlarına girerek mavi-menekşe rengin oluşmasını sağlar.



1. Deney için gerekli kimyasal maddeler: 2 N NaOH, %0,1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2. Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 mL protein çözeltisi, 1 mL 2 N NaOH eklenerek karıştırılır. Tüpler su banyosunda 30 dakika bekletilir. Üzerine %0.1 CuSO_4 ilave edilip karıştırıldığında menekşe rengin oluştuğu görülür. Peptid bağları sayısı protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan kantitatif olarak protein konsantrasyonunu belirlemede de kullanılabilir. Spektrofotometre 555 nm dalga boyuna ayarlanır.

DENEY NO: 12

Sütten Kazein Elde Edilmesi

Kazein sütteki belli başlı proteinlerden biri olup bir fosfoproteindir. Alfa, beta, gama ve kappa kazein olmak üzere dört şekilde bulunur. Kazein bu dört şeklin heterojen bir karışımıdır

Kullanılan çözeltiler ve araçlar:

Yağsız süt

%2' lik HCl

pH-metre

Karıştırıcı ve manyetik çubuk

Buchner hunisi

Süzgeç kağıdı

Beher (1 L' lik)

AgNO₃ (%1' lik)

Etil alkol (%95' lik)

Eter

0.01 N NaOH

Deneyin Yapılışı:

Deney için, 100 mL yağsız süt 300 mL çeşme suyu ile sulandırıldıktan 30 dakika sonra %2' lik HCl ilave ederek pH metre yardımıyla pH 4.8' e ayarlanır. Bu çözelti 10 dakika karıştırdıktan sonra yarım saat bekletilir. Bu sırada kazein çöker, çökelek süzülür. Çökelek her defasında 200 mL destile su kullanılarak iki kere yıkanır ve üstteki sıvı atılır. Bir Buchner hunisine filtre kağıdı yerleştirilerek kazein vakum altında süzülür ve kurutulur. 30 mL destile su ile birkaç kez yıkanır ve klorür iyonu kalıp kalmadığı kontrol edilir (0.5 mL' lik örneğe birkaç damla %1' lik AgNO₃ damlatıldığı zaman eğer çözeltide klorür iyonu varsa rengi bulanacaktır). Klorürden temizlenen çökelek santrifüjle ayrılabilir. Çökelek %95' lik alkolün 15 mL' si ile sulandırılır, 5 dakika karıştırılır ve süzülür. Alkol ekstraksiyonunu bir kez daha tekrarlandıktan sonra iki kez 15 mL eterle aynı yolla ekstraksiyon yapılır. Süzüldükten sonra vakum pompasına bağlanarak kurutulur. Böylece beyaz pudra halinde kazein elde edilir. Yıkamalar sonrasında kazeinden 0.01 N NaOH içinde % 1' lik çözelti hazırlanır ve soğukta saklanır.