



## SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

### ÖĞRENCİ LABORATUVARI ÇALIŞMA KILAVUZU (DÖNEM I ve II)



2014-2015 KONYA

## **LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR**

- 1) Temel prensip sessiz çalışmaktır.
- 2) Laboratuvara önlükle gelinmeli ve laboratuvar süresince çıkarılmamalıdır. Laboratuvar çalışmalarında önlüğün düğmeleri ilikli olmalıdır.
- 3) Her öğrenci kendisine ayrılan bölümü ve malzemeleri kullanmalıdır.
- 4) Çalışmanın bitiminde, her öğrenci kullandığı malzemeleri temizlemeli, kendisinden sonra kullanacak olana temiz ve düzenli olarak bırakmalıdır.
- 5) Laboratuvar içerisinde şakalaşmak, özellikle kimyasal maddelerle şakalaşmak çok sakıncalı ve kesinlikle yasaktır.
- 6) Laboratuvarda kimyasal maddelere el sürülmemeli, koklanmamalı, tadına bakılmamalıdır.
- 7) Deneylede mümkün olduğu kadar az madde kullanılmalı ve madde israfından kaçınılmalıdır. Stok şişelerinden gereği kadar madde alınmalı, artanlar stok şişesine boşaltılmamalıdır. Tüplerde bulunan diğer kimyasal madde artıkları stok şişesindeki bütün maddenin bozulmasına yol açabilir.
- 8) Çalışmalarda kirli malzeme kullanılmamalıdır.
- 9) Uçucu, yanıcı ve patlayıcı (eter, alkol, kloroform vb.) madde şişelerinin ağızları devamlı kapalı tutulmalı ve yanında çakmak, kibrit gibi yakıcı maddeler kullanılmamalıdır.
- 10) Çözelti hazırlanıyorsa onun uygun şartlarda saklanması gerekir. Reaktiflerin üzerine reaktiflerin adı, hazırlayanın adı, hazırlanma tarihi ve biliniyorsa son kullanma tarihi yazılır.
- 11) Son kullanma tarihi geçmiş reaktifler kullanılmamalıdır.
- 12) Bütün çalışmalarda, özellikle analizlerde saf su kullanılmalıdır.
- 13) Her ne şekilde olursa olsun kimyasal bir madde ile temasta, temas bölgesi bol su ile yıkanmalıdır. Bunlardan en çok karşılaşılanı asit, alkalilerle temas ve yanıklardır. Böyle bir durumda ilgililer haberdar edilmelidir.
- 14) Her çalışmadan sonra eller sabunla yıkanmalıdır.
- 15) Kan ve kan ürünleriyle çalışılıyorsa eldiven kullanılmalıdır.
- 16) Kullanımı bilinmeyen cihazlar kullanılmamalıdır.
- 17) Çalışma bitince her grup aldığı malzemeyi sağlam ve temiz olarak teslim edilmelidir.
- 18) Görevliden izinsiz laboratuvarı terk etmek yasaktır.
- 19) Her laboratuvar çalışması sonunda yoklama kağıdı mutlaka imzalanmalıdır.

## CAM MALZEMELER VE CİHAZLAR

**Deney Tüpü:** Uzun ve silindirik bir cam malzemedir. Kimyasal reaksiyonlar bu tüpler içerisinde gerçekleştirilir. Uzun ve kısa olabilen deney tüplerine ilaveten santrifüj işleminde kullanılan tüpler de vardır. Bu tüplerin dip kısmı yuvarlak ya da konik olabilir. Bu tipleri özellikle idrar analizlerinde kullanılır.

**Tüp Sporu:** Tüplerin, içlerindeki deliklere yerleştirilmesiyle dik durmalarını sağlar. Tüplerin muhafazası ve taşınmasında kullanılır. Plastik ve metal çeşitleri bulunur.

**Temizleme Fırçası:** Cam malzemenin temizlenmesinde kullanılır. (Örnek: Tüp, beher, vb.).

### Pipet:

#### a) Cam pipetler

Belli ölçülerdeki sıvıların bir kaptan diğerine aktarılmasında kullanılırlar. Pipet içine sıvı alınması, pipet içindeki havanın emilmesiyle olur. Emme işlemi ağızla, puarla veya pipet pompası ile mümkündür. Dar cam borulardır. Alt ve üst kısımları açıktır. Pipetin en üstündeki rakam pipetin ölçtüğü toplam hacmi gösterir.

**Pipetlerin Kullanımı:** Gerek pipet ve gerekse dereceli silindirde sıvı hacimlerinin okunmasında en önemli nokta, gözün sıvı yüzeyi hizasına getirilerek okunmasıdır. Berrak sıvıların ölçümünde, menisküs altı çizgisi hizasına getirilerek okunur. Sıvılar genellikle iki kısımda değerlendirilir:

**a-** buldukları kabı ıslatan **b-** ıslatmayan sıvılar (ör: Civa,  $KMnO_4$ ).

Sıvının kabı ıslatır veya ıslatmaz hali tamamen adezyon ve kohezyon güçleri ile ilgilidir. Bu sıvıların pipet veya dereceli silindir içerisine alınması neticesinde yüzey geriliminin etkisiyle üst kısımda bir kavis gözlenir (menisküs: kavis). Buldukları kabı ıslatan sıvılarda bu kavis iç bükey iken, ıslatmayan sıvılarda dışbükeydir. Okumalar sıvının berrak ya da renkli oluşuna göre de farklılık arz etmektedir. Berrak sıvılarda okumalar menisküsün alt ucundan, renkli solüsyonlarda ise üst kısımdan yapılır.

#### b) Otomatik Pipetler (mikropipet)

İstenen hacmi sabit olarak çekebilene ve çok daha küçük hacimlerin pipetlenmesini sağlayan pipetlerdir. Bu pipetlerle 1-5000  $\mu$ l arası sıvı pipetlenebilir.

**Pipet pompası:** Asit, baz, hasta serumu vb. zararlı maddelerin pipetlenmesinde pipet ucuna takılarak kullanılır.

**Tahta Maşa:** Tüplerin ısıtma ve taşınma işlemlerinde kullanılan tahta malzemedir.

**Bunzen Beki:** Deneysel çalışmalarda ısıtma kaynağı olarak kullanılan alev başlığıdır. Isıtma işlemleri mutlaka uzun tüpte ve alevin mavi kısmında yapılmalıdır.

**Üçlü Saç Ayağı:** Üstüne amyanthlı tel konularak bunzen bekinin üzerine yerleştirilir.

**Amyanthlı Tel:** Isıtma işlemlerinde üç ayağın üzerine konulan normal ve emniyetli ısınmayı sağlayan, orta kısmı ısıya dayanıklı kille sıvanmış tel kafeslerdir. Isının homojen şekilde dağılmasını sağlar.

**Reaktif Şişesi:** Reaktiflerin saklanması için kullanılırlar. Genellikle koyu renkte olurlar. Üzerlerinde reaktifle ilgili bilgileri içeren etiket bulunmalıdır.

**Damlalık Şişe:** Oluklu kapağa sahip şişelerdir. İçlerindeki solüsyonun damla damla akmasını sağlarlar. Titrasyon deneyinde indikatör damlatmak için kullanılırlar. İki tipi vardır :

a) Reaktif şişe ağzı damlatmaya uygundur. Reaktif şişe ağzı sıkıca kapatılamaz.

**b) Reaktif şişe ağız kapağı damlalıktır.** Reaktif şişe ağız sıkıca kapatılabilir.

**Süzgeç kâğıdı:** Süzme yapılırken huninin üzerine konularak kullanılır. Süzgeç kâğıdını geçip tüpte biriken sıvıya **filtrat (süzüntü)** denir. Süzgeç kâğıdında da partiküller kalır.

**Santrifüj:** Santrifüj makinesinin adıdır. Santrifüj makinası bir çözeltideki partikülleri yüksek hızla çevirerek ayırır. Tüpün alt kısmında birikene **ÇÖKELTİ**, üstte kalan sıvı kısma **SÜPERNATAN** denir.

**Dengeleme Terazisi:** Miktar ölçümünde kullanılmaz. Santrifüj için iki tüpün dengede olması gerekir. Dengeleme işlerinde kullanılır.

**Piset:** Distile suyun deneylerde kullanılmak üzere kısa süreli muhafaza edilmesinde kullanılır.

**Vorteks (Çalkalayıcı):** Deney tüpü içerisindeki maddelerin karıştırılmasına yardım eder.

**Manyetik Karıştırıcı:** Çözelti karıştırmaya yarar.

**Manyetik Bar:** Manyetik alan oluşturmak amacıyla karıştırıcı ile birlikte kullanılır.

**Spatül:** Katı maddelerin tartımı sırasında kullanılır. Metal, porselen ve plastik olmak üzere çeşitleri vardır. Bazılarının ucu düz, bazılarının ki yuvarlaktır.

**Baget:** Uçları kütleştirilmiş cam çubuktur. Çözeltilerin karıştırılmasında kullanılır.

**Beher:** Çeşitli hacimlerdeki sıvıların konulabildiği içindeki sıvıyı kolayca boşaltmaya imkân veren geniş ağızlı silindirik, ısıya dayanıklı cam malzemelerdir. Plastik çeşitleri de bulunmaktadır.

**Erlenmayer:** Dar bir boyun ve alta doğru genişleyen özellikte cam malzemedir. Rahatça karıştırmaya imkân veren yapısı nedeniyle titrasyon deneylerinde kullanılırlar.

**Dereceli Silindir (Mezür):** Çözelti almaya veya ölçmeye yarayan dereceli çeşitli büyüklükteki cam malzemelerdir. Genellikle hassasiyet gerektirmeyen sıvı hacimlerini ölçmeye yarayan cam malzemelerdir (örnek: 24 saatlik idrar hacmi ölçümünde büyük mezür kullanılır. 50 ml' lik küçük mezürde idrar dansitesi ölçülebilir).

**Balon Joje:** Adi balona benzeyen cam kaptır. Üzerinde miktar bildiren çizgiler bulunur. Çözelti hazırlanmasında kullanılır. En hassas volümetrik kaptır.

**Adi Balon:** Üzerlerinde hiç işaret yoktur. Bu yüzden bu kaplarda miktar ölçümü yapılamaz. Sıvıların toplanmasında, biriktirilmesinde ve saklanmasında kullanılır.

**Büret:** Titrasyon deneyinde kullanılan alt ucu musluklu borulardır.

**Büret sporu ve sehпасı:** Büreti dik tutmaya yarayan araçtır.

**Parafilm:** Cam malzeme ağzının kapatılmasına yarar. Malzeme gerilerek kullanılır.

**Flaster:** Reaktif şişesinin üzerine yapıştırılarak etiketlemede kullanılır.

**Laboratuvar saati:** Analiz sırasında inkübasyon gereken durumlarda belirlenen süreyi takip etmek amacıyla kullanılan kurmalı çalar saattir.

**Mikropipet ucu:** Otomatik pipet uçlarıdır.

**Dispensör:** Reaktif şişelerine adaptör gibi takılarak kullanılır. Seri şekilde eşit miktarlarda sıvı boşaltımında kullanılırlar.

**pH Metre:** Çözelti pH'larını ölçer. Kullanılmadan önce distile sudan geçirilir ve kurutulur. Sonra çözelti içerisine daldırılır. Ölçüm yapılır. Ölçüm sonrası temizlendikten sonra kalibrasyon solüsyonu içerisinde saklanır.

**Dansitometre:** Solüsyonların yoğunluğunu ölçen aletlerdir. Özellikle idrar için kullanılır.

**Refraktometre:** Solüsyonların yoğunluğunu ölçen aletlerdir (örnek: idrar).

**Spektrofotometre ve küveti:** Spektrofotometrik ölçümlerin (renkli çözeltiden belirli dalga boyundaki ışık geçirilerek) yapıldığı cihazlardır. Absorbans veya transmittans ölçülebilir. Cihazların küvetleri kristal, cam veya plastikten yapılmıştır.

**Benmari (Su Banyosu):** Deney tüplerinin belli bir ısıda tutulmalarını sağlar.

**Huni:** Genellikle süzme, çözelti aktarma gibi işlemlerde kullanılan cam malzemelerdir.

**Hassas Teraz:** Katı maddelerin miktarını ölçmeye yarar. Miligrama kadar olan ölçümleri yapar.

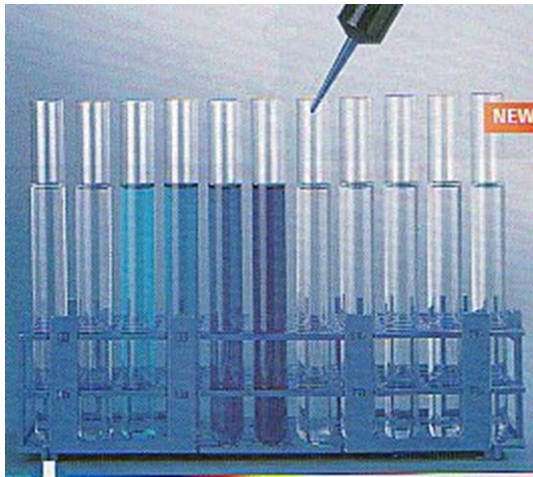
**Havan:** Katı maddeleri ezmede kullanılır (örnek: maya).

**Desikatör:** Özellikle kimyasal maddelerin nemden korumak için kullanılırlar. Nemi tutmak için içerisinde susuz kalsiyum klorür ve silikajel gibi nem emici maddeler bulunur. Kapağın kenarına vazelin sürülerek kapatılır. Böylece hava alması engellenir (örnek: sodyum klorür, sodyum hidroksit).

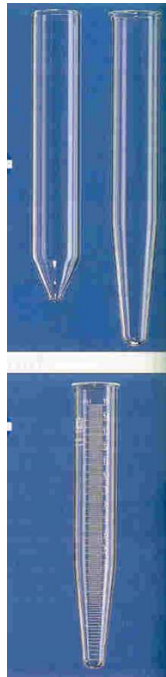
## MALZEME TEMİZLİĞİ ve BİYOKİMYADA KULLANILAN SULAR

**1-Distile Su (Saf su):** Laboratuvar çalışmalarında kullanılan sudur. Distile su yapısında anyon, katyon, mineral ve organik madde içermez. Çeşme suyu özel cihazlarla veya kaynatılma ile distile su haline getirilebilir.

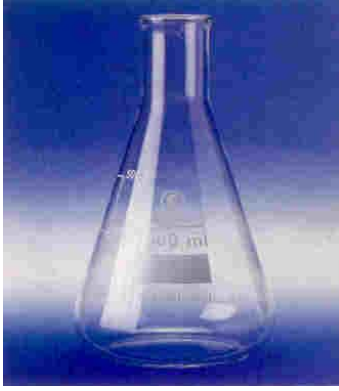
**2-Deiyonize Su:** Çeşme suyunun reçinelerden geçirilerek, iyonlarının tutulması ile elde edilir. Reçine tarafından tutulamayan organik maddeler ise su içerisinde kalırlar. Steril değildir. İçerisinde bakteri barındırabilir. Bu yüzden bekletilmeden kullanılması gerekir.



**Deney tüpleri-santrifüj tüpleri**



**Beher (beherglas)**



**Erlen (erlenmayer)**



**Damlatma şişesi**



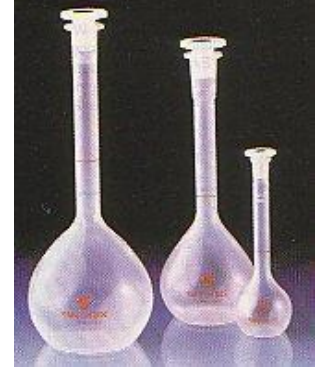
**Huni**



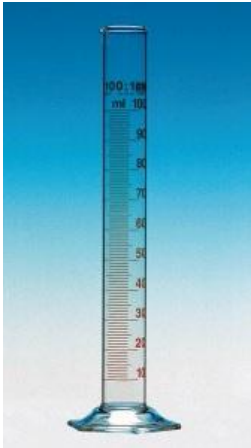
**Tüp sporları**



**Adi balon**



**Balon joje**



**Mezür (dereceli silindir)**



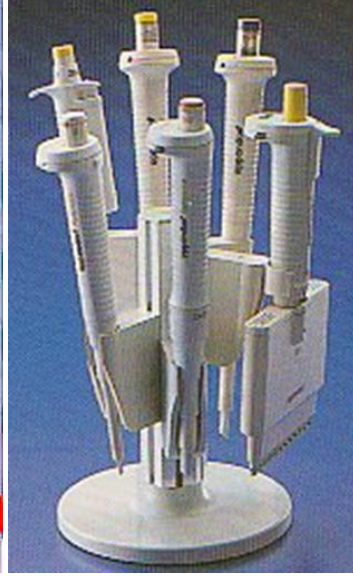
**Temizleme Fırçası**



**Havan**



**Cam Pipet**



**Otomatik Pipet**



**Bunzen beki**



**Üçlü sacayağı**



**Puar**



**Piset**



**Büret**



**Benmari (Su banyosu)**



**Santrifüj Cihazı**



**Refraktometre**



## ÇÖZELTİ HAZIRLAMA

1. 100 ml izotonik NaCl hazırlayınız. (MA NaCl= 58,5 g/mol)
2. 250 ml %10'luk CuSO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlayınız. (MA CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O= 250 g/mol).
3. 1 M 500 ml NaOH çözeltisi hazırlayınız.(MA NaOH= 40 g/mol)
4. Dansitesi 1,19 olan %38'lik konsantre HCl'den (HCl'nin molekül ağırlığı 36,46) 500 mL 0,2 N'lik HCl çözeltisi hazırlayınız.

**Not:** Hazırladığınız çözeltilerin hazırlama şeklini (miktar hesabı) kitapçığınıza kaydediniz. Hazırlanan çözeltileri görevlilere gösterdikten ve bilgi verdikten sonra dökünüz.

### MATERYAL:

#### A-Kimyasallar

- \* NaCl
- \* NaOH
- \* HCl
- \* CuSO<sub>4</sub>

#### B-Malzeme Ve Ekipman

- \* Beher
- \* Spatül
- \* Pipet
- \* Terazi
- \* Balon joje
- \* Manyetik karıştırıcı

**Kullanılan kimyasalların molekül ağırlıkları ve yoğunluk değerleri stok şişelerinin üzerindeki etikette yer almaktadır.**

### Tampon Çözelti Hazırlanması

1- pH = 5 ve pK = 4,77 olan 0,2 M 100 ml asetat tamponu hazırlayınız (d=1 gr/ml, %=100, MA asetik asit=60 gr/mol, MA sodyum asetat=82 gr/mol, antilog 0,23=1,7).

2- pH = 7 olan 0,1 M 100 ml fosfat tamponu hazırlayınız. (pK=7,2, MA Potasyum dihidrojen fosfat=136 gr/mol, MA Sodyum monofosfat dihidrat=178 gr/mol, antilog -0,2=0,63)

### Deney:

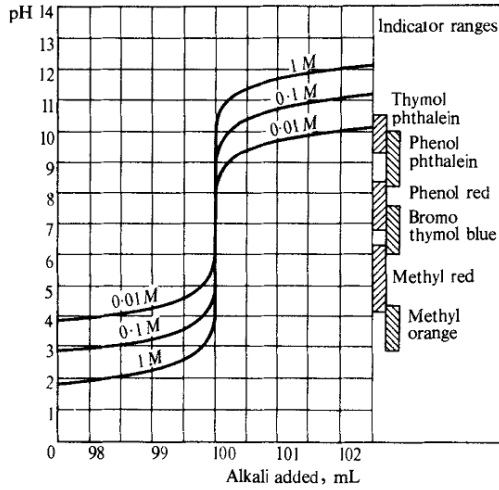
1. Suyun pH'ının ölçülmesi.
2. Kuvvetli asit ve bazın pH'ının ölçülmesi.
3. Tampon eklenerek pH ölçümü.

### Malzeme ve Ekipman

- \* pH metre
- \* Beher

## TİTRASYON

Konsantrasyonu bilinmeyen bir çözeltinin konsantrasyonunu, konsantrasyonu bilinen bir çözeltinin yardımıyla ekivalan noktaya kadar titre ederek bulmaktır. Ekivalan nokta asit ya da bazın mol sayılarının eşit olduğu noktadır. Ekivalan nokta uygun bir indikatörle, diğer bir deyişle ekivalan noktada renk değişikliğine uğrayan çözeltilerle saptanır. İndikatörler, zayıf asit ya da baz özelliğinde, titrasyonda ekivalan noktanın tayininde kullanılan boyar maddelerdir. Asidik ve bazik çözeltilerde farklı renk oluştururlar. Örneğin; bromtimol mavisi pH <6.1’de sarı renk verirken, pH>8.1’de mavi renk verir. pH 6.1 ile 8.1 arasında ise ara renk olarak yeşil oluşur.



Değişik titrasyon çeşitleri bulunmaktadır. Bunlardan en çok bilinen ve kullanılan asit-baz titrasyonudur. Asit-baz titrasyonu kendi içinde;

- Kuvvetli asit-Kuvvetli Baz Titrasyonu
- Zayıf Asit-Kuvvetli Baz Titrasyonu
- Zayıf Asit-Zayıf Baz Titrasyonu
- Kuvvetli asit- Zayıf Baz Titrasyonu olarak ayrılır.

## TİTRASYON EĞRİLERİ ve DENEYLERİ

**Kuvvetli Asit-Kuvvetli Baz Titrasyon Eğrisi:** Kuvvetli bir asit olan HCl ile kuvvetli bir baz olan NaOH titre edildiğinde eğri elde edilir. Burada kullanılan asit ve bazın normalitesi 0.1 N’dir. 50 ml 0.1 N HCl ile titrasyona başlanıp, NaOH eklenerek değişik pH’lara ulaşılmıştır. Baz eklenmesiyle pH önce yavaş artış gösterirken, ekivalan nokta civarında bu yükselme şiddetlenir ve tam bu noktada sıçrama şeklinde gözlenir. Tekrardan yavaşlayarak artış gösterir.

**Zayıf Asit-Kuvvetli Baz Titrasyon Eğrisi:** 0.1N’lik asetik asit ve NaOH titre edildiğinde elde edilir. NaOH eklenmesiyle sodyum asetat oluşur ve ekivalan nokta pH 7’nin üzerindedir. Diğer taraftan kuvvetli asidin zayıf bazla titrasyonunda ekivalan nokta pH ‘sı asit alanda gözlenir.

### Ayrıçlar:

1. 0.1 N HCl
2. 0.1 N NaOH

3. 0.1 N CH<sub>3</sub>COOH
4. Fenol Ftalein: 0.5 g tartılarak, %50'lik 100 ml alkolde eritilerek hazırlanır.
5. Metil Red: 0.1 g tartılarak, % 50'lik 400ml alkolde eritilerek hazırlanır.

## METOD

### A- Kuvvetli Asit-Kuvvetli Baz Titrasyonu:

Durulamadan sonra büret NaOH ile doldurularak, sıfır çizgisine teğet olacak şekilde sıvı seviyesi ayarlanır. 0.1 N HCl'den 50 ml'lik erlene pipetle 10 ml konur ve içine 1-2 damla fenol ftalein indikatörü damlatılır. Titrasyon işlemine yavaş yavaş büretten erlene NaOH damlatılarak başlanır ve pembe renk oluşumu 30 saniye sabit kalana dek devam edilir. Kullanılan NaOH eriyiklerde anlatıldığı şekilde tam 0.1 N olarak hazırlanmış ise kullandığımız HCl'nin kesin normalitesini aşağıdaki formülle saptamamız olasıdır.

$$N_1.V_1=N_2.V_2$$

N<sub>1</sub>: HCl'nin saptayacağımız normalitesi

V<sub>1</sub>: Erlene konan HCl hacmi (10 ml)

N<sub>2</sub>: NaOH'in normalitesi (0.1N)

V<sub>2</sub>: Büretten harcanan NaOH hacmi

Büret durulaması: 0.1 N NaOH az bir miktarda bürete konur. Birkaç damla büretin musluğundan akıtıldıktan sonra musluk kapatılır ve yatay olarak elde çevrilerek büret durulanır. Bu olay üç kez tekrarlanır.

**B-Zayıf Asit-Kuvvetli Baz Titrasyonu:** Yukarıdaki deney için anlatılanlar aynen uygulanır, ancak erlene 10 ml asetik asit konur ve indikatör olarak da metil red kullanılır. Asetik asidin kesin normalitesi yine yukarıdaki formüle göre saptanır.

Yapılan titrasyonlar sonucunda ayıraçların normalitesi istenilen değerden (0.1 N) düşük ya da yüksek çıkarsa, bunu tam 0.1 N yapmak için aşağıdaki örneklerde verilen işlemler uygulanır.

\*HCl'in normalitesi 0.09 olarak saptanırsa aşağıdaki formül kullanılarak ayarlama yapılır.

$$(N_1.V_1)+(N_2.V_2)=N_3.V_3$$

N<sub>1</sub>:HCl'nin titrasyon sonucu saptanan normalitesi (0.09 N)

V<sub>1</sub>: Ayarlanmak istenilen HCl'nin hacmi (1000 ml hazırlanmış ise ve 50 ml kullanılmış ise geriye kalan 950 ml)

N<sub>2</sub>:: Stok HCl'in normalitesi (12 N)

V<sub>2</sub>: Eklenecek stok HCl'nin bilinmeyen miktarı

N<sub>3</sub>: Olması istenilen normalite (0.1 N)

V<sub>3</sub>: İstenilen hacmi (1000 ml)

## KARBOHİDRAT TANIMA REAKSİYONLARI

### DENEY 1

#### DENEY ADI: Kömürleşme

**DENEYİN AMACI:** Yoğun mineral asitlerin karbohidrattaki bütün su moleküllerini ayırdığının gösterilmesi.

**PRENSİP:** Karbohidratlar yoğun asitler ile muamele edilirse bütün su moleküllerini (OH ve H gruplarını) kaybederek karbon zincirlerinden ibaret basit bir yapıya dönüşürler (kömürleşme).

#### MATERYAL:

- \* Yoğun H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- \* 1 adet kesme şeker

#### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* 1 kesme şeker alınır.
- \* Üzerine birkaç damla yoğun H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> damlatılır.
- \* Beklemeye bırakılır ve gözlemlenir.

\* **DİKKAT:** İçerisinde alkali maddeler bulunan tüplerin ısıtılmasına son derece itina gösterilmelidir, tüp içerisinde fazla miktarda madde bulunduğunda ve/veya karıştırmaksızın tek bir nokta üzerinden aleve tutularak ısıtıldığında tüp içerisindeki çözelti aniden kaynayarak fişkırtma tarzında tüpten fırlar. Bundan dolayı hem ısıtma işlemleri itina ile yapılmalı, hem de tüplerin ağızları arkadaşlarınızın bulunduğu tarafa çevrilmemelidir.

#### YORUM:

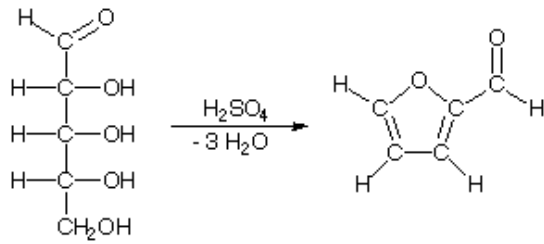
## DENEY 2

### DENEY ADI: Molisch Deneyi

**DENEYİN AMACI:** Bilinmeyen bir solüsyon içinde karbohidrat olup-olmadığının araştırılması.

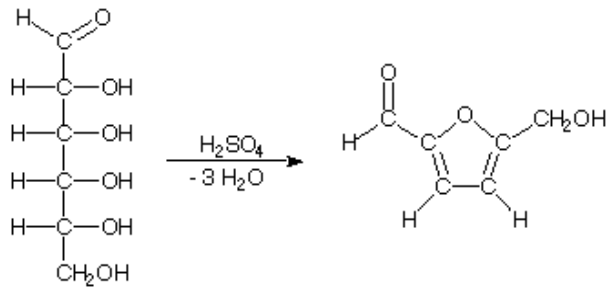
**PRENSİP:** Kömürleşmede bahsedilen olay sulu çözeltide gerçekleştirilirse karbohidrat sadece 3 mol su kaybeder ve furfural oluşur. Elimizdeki karbohidrat 5 karbonlu şeker (pentoz) ise furfural, 6 karbonlu şeker (heksoz) ise furfural türevi olan 5 hidroksi metil furfural oluşur.

Karbohidratların asit tesiri ile furfurala dönüşüp  $\alpha$ -naftol ile de renk vermeleri ortamda karbohidrat olduğunu tanımlayan Molish deneyi ile olur. Amino şekerler, şeker alkolleri ve karboksilik asitler hariç bütün karbohidratlar bu deneye pozitif cevap verir.



Pentoz

Furfural



Heksoz

5-hydroximetil furfural

### MATERYAL:

- \* Konsantre  $H_2SO_4$
- \* Bilinmeyen bir çözelti
- \* Molish ayırıcı ( $\alpha$ -naftolun alkolde hazırlanmış çözeltisi)
- \* Deney tüpü
- \* Pipet

### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* Bir adet deney tüpü alınarak içerisine 1-2 ml kadar bilinmeyen çözelti koyulur.
- \* Üzerine 1 -2 damla molish ayırıcı damlatılıp karıştırılır.
- \* Deney tüpü  $45^\circ$  açı yapacak şekilde tutularak tüpün kenarından 2 ml yoğun  $H_2SO_4$  ilave edilir.

\*  $H_2SO_4$  yoğun olduğundan dibe çöker ve iki sıvının temas yüzeyinde mor-kırmızı renkte halka şekillenmesi deneyin (+) olduğunu gösterir.

\* Daha sonra tüp çalkalanacak olursa asit ile tamamen karıştığından bütün sıvının renklendiği gözlenir.

**YORUM:**

### **DENEY 3**

#### **DENEY ADI: Seliwanoff Deneyi**

**DENEYİN AMACI:** Seliwanoff deneyi ile karbohidratın aldoşeker mi, ketoşeker mi olduğunun anlaşılması.

**PRENSİP:** Seliwanoff keton grubu taşıyan şekerlerin tanınması için uygulanan bir deneydir. Çözelti içerisindeki şekerin aldoşeker mi yoksa ketoşeker mi olduğu bu deneyle anlaşılır. Deneyde kullanılan reaktif içerisindeki rezorsin ile keton grubu taşıyan karbohidrat ünitesi arasında şekillenen (reaksiyon neticesinde kırmızı bir renk ortaya çıkar) bu durumun görülmesi ketoz şekerler için pozitiftir.

Aldoz şekerler de bu deneyde pozitif sonuç verebilir. Fakat bunun anlaşılması için uzun süre beklemek gerekir. Renk yoğun ve net olmayabilir.

#### **MATERYAL:**

- \* Seliwanoff ayıracı
- \* Fruktoz çözeltisi
- \* Glukoz çözeltisi
- \* 3 adet deney tüpü
- \* Kaynar su banyosu

#### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* 3 adet deney tüpü alınır.
- \* Birinci tüpe 2 ml fruktoz ve ikinci tüpe 2 ml glukoz, üçüncü tüpe de kontrol amacıyla 2 ml seliwanoff reaktifi koyulur.
- \* İlk iki tüpe 1-2 ml seliwanoff ayıracı ilave edilir ve karıştırılır.
- \* Bütün tüpler kaynar su banyosuna koyulur.
- \* 5-10 dakika içerisinde fruktoz bulunan çözeltide kırmızı rengin şekillendiği görülür. Daha uzun süre beklenildiğinde, daha açık renkte olmak üzere, glukoz bulunan tüpte de renk şekillenir. 3. tüpteki reaktifin kendi renginde ise bir değişme olmaz.

#### **YORUM:**

## **DENEY 4**

### **DENEY ADI: Benedict Deneyi**

**DENEYİN AMACI:** Benedict deneyi ile karbohidrat olduğu bilinen çözeltinin indirgeyici olup olmadığı anlaşılır. Bu deney ile idrarda şeker varlığı belirlenebildiği gibi konsantrasyonu da semikantitatif olarak tayin edilebilir.

**PRENSİP:** Serbest aldehit ya da keton grubu (karboksil gurubu) taşıyan karbohidratlar alkali ortamda, ısının da etkisiyle bakır iyonlarını +2'den +1'e indirgerler ve renk değişimi gözlenir. Monosakkaritlerin tamamı serbest karbonil grubuna sahip olduğundan bu deneyde pozitif sonuç verirler. (Disakkaritler ?)

### **MATERYAL:**

- \* Kaynar su banyosu
- \* Deney tüpü
- \* Pipet
- \* Benedict ayıracı (Na-K Tartarat veya Na Sitrata,  $\text{CuSO}_4$  , NaOH)
- \* Karbohidrat çözeltileri (glukoz, sakkaroz, nişasta, laktoz)

### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* Bir adet deney tüpü alınarak içerisine 2,5 ml benedict ayıracı koyulur.
- \* Üzerine 4-5 damla karbohidrat çözeltisi ilave edilir.
- \* Tüp kaynar su banyosunda 4-5 dakika bekletilir ve takip edilir.
- \* İdrar kullanıldığında şekillenecek renkler ve yorumları şöyledir:

Mavi veya çok açık yeşil => (-)

Yeşil (tortulu) => (+)

Yeşil - sarı (tortulu) => (+ +)

San - portakal (tortulu) => (+ + +)

Portakal - kırmızı (tortulu) => (+ + + +)

### **YORUM:**



## **DENEY 5**

### **DENEY ADI: İyot Testi**

**DENEYİN AMACI:** Nişastanın iyotla renk vermesi

**PRENSİP:** İyot nişasta molekülündeki bağlara girerek fiziksel özelliğini değiştirir.

### **MATERYAL:**

- \* Nişasta çözeltisi
- \* İyot
- \* Deney tüpü

### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* Deney tüpüne 2 ml nişasta süspansiyonu alınır.
- \* Üzerine 1 damla iyot damlatılır. Mavi renk meydana gelir.
- \* Karışım ısıtıldığında renk ne oldu?
- \* Çeşme altında soğutulduğunda ne oldu?

### **YORUM:**

## **PROTEİN TANIMA DENEYLERİ**

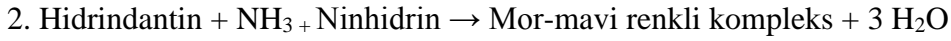
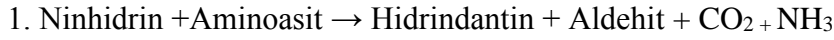
### **DENEY 1**

#### **DENEYİN ADI: Ninhidrin Deneyi**

#### **MATERYAL:**

- \* Ninhidrin çözeltisi
- \* Bunzen beki
- \* Numune (aminoasit çözeltisi)

**PRENSİP:** Güçlü bir okside edici madde olan ninhidrin, amino asitlerin oksidatif dekarboksilasyonuna neden olarak CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> ve aldehit meydana getirir. Daha sonra indirgenmiş ninhidrin serbest hale gelen amonyak ile reaksiyon vererek mor-mavi renkli kompleks oluşur. Prolin ve hidroksprolin ise ninhidrin ile sarı renk verirler.



#### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* Deney tüpüne 1 ml. amino asit çözeltisi pipetle konur.
- \* Üzerine 5 damla ninhidrin eklenir.
- \* Tüp bunzen bekinde 2 dakika kaynatılır.

Tahta maşayla tutulan tüp soğutularak (buzlu su veya çeşme suyu ile), tüpteki karışımın rengi takip edilir (ne kadar zaman geçiyor ve renk tonu şiddeti nasıl değişiyor?).

#### **YORUM:**

## **PROTEİN DENATÜRASYON DENEYLERİ**

### **DENEY 1**

#### **DENEYİN ADI: Isı ile Denatürasyon**

#### **A- Kaynatma Deneyi**

##### **MATERYAL:**

- \*Asetik asit
- \*Numune (protein çözeltisi ve idrar)
- \*Deney tüpü
- \*Pipet
- \*Maşa
- \*Bunzen beki

##### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \*Deney tüpüne 2–3 ml kadar idrar alınarak bunzen bekinde ısıtılır. Isıtmayı takiben bulanıklık görülmesi proteinler için pozitifdir.
- \*İdrarda protein aranması için yapılan kaynatmada protein harici diğer faktörlerde (karbonat ve fosfat kristalleri) bulanıklığa neden olur. Ayırt edilmesi için üzerine birkaç damla (0.5 ml kadar) % 3'ü asetik asit ilave edilir.

**YORUM:**Asit ilavesi sonucunda: Bulanıklık kaybolmaz ve artarsa protein Bulanıklık köpürme tarzında kaybolursa karbonat Bulanıklık köpürme olmadan kaybolursa da fosfat kristalinden olduğu düşünülür.

#### **B-Tanret Deneyi**

##### **MATERYAL:**

- \* Tanret reaktifi:(KI+HgC12 ,Asetik asit % 20)
- \* Numune (Protein çözeltisi veya idrar)

##### **DENEYİN YAPILIŞI:**

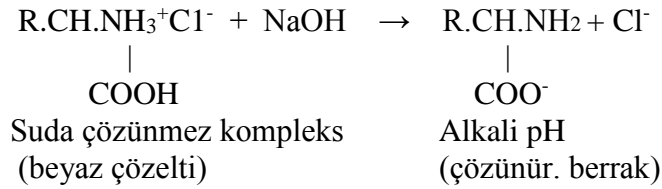
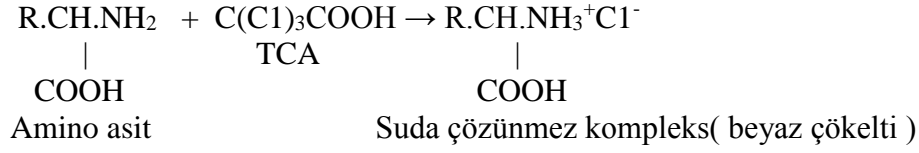
- \*Deney tüpünün 2/3'ü kadarına protein çözeltisi veya idrar alınır.
- \* 3–4 damla tanret reaktifi damlatılır.
- \* Bulanıklık izlenir.

##### **YORUM:**

## DENEY 2

### DENEYİN ADI: Zayıf Asitler ile Denatürasyon

**DENEYİN PRTENSİBİ:** Proteinlerin asit ilavesi sonucu asit PH 'da kation hali, ne geçmesi ve sonra da atomdaki negatif yüklü C1 iyonları ile nötürleşerek çökmesi esasına dayanır.



### METARYAL:

- \* Asetik asit
- \* Sülfosalisilik asit % 10'luk
- \* Sodyum hidroksit % 10'luk (NaOH)
- \* Numune (protein çözeltisi: Dilüe edilmiş yumurta akı veya serum )

**DENEYİN YAPILIŞI:** Yukarıda anlatılan bilgiler doğrultusunda aşağıdaki 6 uygulamayı yapınız ve her basamakla ilgili gözleminizi ve sebeplerini yazınız.

#### 1.Uygulama:

- \* Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- \* Üzerine 0.5 ml % 3'lük asetik asit ilave edilir.

#### 2.Uygulama:

- \* Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- \* Üzerine 0.5 ml TCA ilave edilir.

#### 3.Uygulama:

- \* Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- \* Üzerine 0.5 Sülfosalisilik asit ilave edilir.

#### 4.Uygulama:

- \* 2. Uygulamadaki tüp karışımına bulanıklık oluştuğundan sonra % 10'luk NaOH'ten damla damla ilave edilir.

#### 5.Uygulama:

- \* 1.uygulamaki deney tüpüne bir miktar NaCl ilave edilir.

#### 6.Uygulama:

- \* 5.Uygulamadaki deney tüpüne % 10'luk NaOH 'ten damla damla ilâve edilir.

### YORUM:

### **DENEY 3**

#### **DENEYİN ADI: Kuvvetli Asitlerle Denatürasyon**

##### **A- Heller Halkası**

**DENEYİN PRENSİBİ:** Proteinlerin kuvvetli asitlerle denatürasyonu esnasında dayanır. Nitrik asitin yoğunluğundan dolayı dibe çökmesini takiben iki sıvının temas yüzeyinde denatürasyondan dolayı beyaz bir bulanıklık gözlenir. Halka tarzında denatürasyondan dolayı görülen bir beyaz halkaya Heller Halkası denir.

##### **METARYAL:**

- \* Nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ )
- \* Numune(Protein çözeltisi–dilüe yumurta akı )

##### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* Deney tüpüne 2-3 ml  $\text{HNO}_3$  konur.
- \* Pipetle 2-3 ml numune tüpün kenarından sızdırılır. (Bu esnada tüp  $45^\circ$  eğik olmalı)

##### **B- Ksantoprotein Deneyi**

**PRENSİP:**Yapısında aromatik halka bulunan fenilalanin triptofan gibi amino asitler için karakteristiktir.Böyle bir amino asit veya protein çözeltisi üzerine konsantre nitrik asit ilave edildiğinde önce **beyaz bir tortu** , ısıtılırsa **sarı** bir renk meydana gelir.Daha sonra alkali ilave edilmesi halinde sarı renk **koyu portakal sarısı** veya **turuncu** diyebileceğimiz renge dönüşür.

##### **METARYAL:**

- \*  $\text{HNO}_3$  (Nitrik asit)
- \* % 40-50 NaOH
- \* Numune (aromatik amino asitten zengin amino asit çözeltisi)

##### **DENEYİN YAPILIŞI:**

- \* Heller halkası deneyinde kullanılan tüp karıştırılır veya deney tüpüne 2-3 ml  $\text{HNO}_3$  ve 2-3 ml numune konur.
- \* Bulanıklık oluşur.
- \* Tüpteki karışım alev üzerinde ısıtılır.
- \* Isıtmayı takiben sarı renk ( nitroza bileşiği) oluşur.
- \* Sarı renkli karışım üzerine 0.7 ml % 40-50 'lik NaOH eklenir.

Rengin koyulaştığı gözlenir.

##### **YORUM:**

# KOLORİMETRİ

## DENEY 1

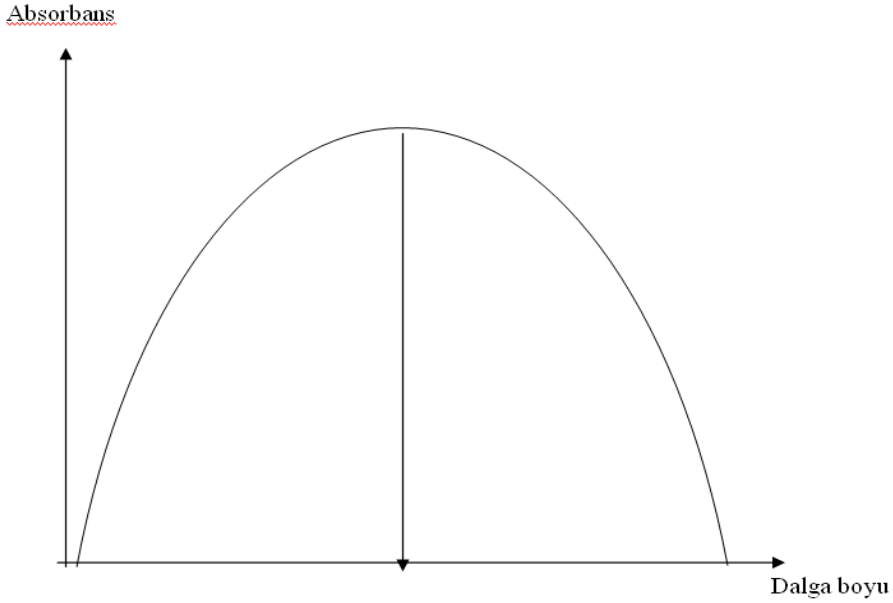
**DENEYİN AMACI:** 0,001 M  $\text{KMnO}_4$  çözeltisinin 460 nm'den başlayarak absorbansının ölçülmesi ve en yüksek absorbans verdiği dalga boyunun bulunması.

### MATERYAL:

- \*  $\text{KMnO}_4$
- \* Küvet
- \* Distile su
- \* Fotometre

### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* Bir adet küvet alınır ve içerisine distile su doldurulur, kör oluşturulur.
- \* Körle fotometrenin sıfır ayarı yapılır.
- \* Başka bir küvet alınarak içerisine  $\text{KMnO}_4$  doldurulur.
- \* Dalga boyu 460 nm'den başlanarak 20'şer nm arttırılarak absorbans ölçümü yapılır.
- \* Dalga boyu-absorbans grafiği çizilir.
- \* En yüksek absorbans verdiği dalga boyu bulunur.



### YORUM:

## DENEY 2

**DENEYİN AMACI:** Standart grafiğinden faydalanarak, bir numunenin bilinmeyen konsantrasyonunun bulunması.

### MATERYAL:

- \* % 50, % 25, % 12,5, % 6,25'lik ve konsantrasyonu bilinmeyen  $\text{KMnO}_4$  çözeltisi
- \* Distile su
- \* Küvet
- \* Fotometre

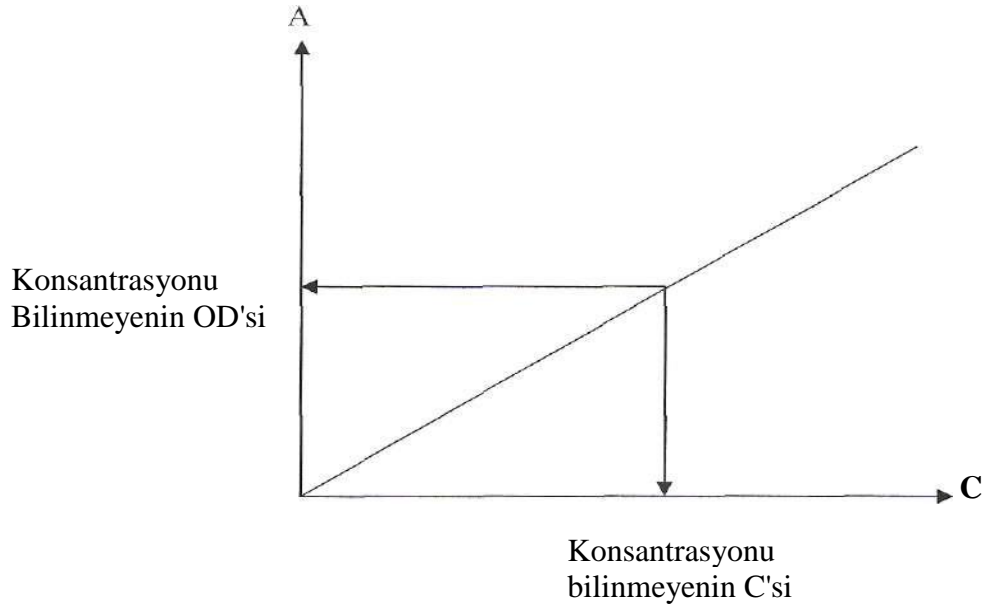
### DENEYİN PRENSİBİ:

- \* Deney, çözeltilerin küvetlere doldurularak fotometrede absorbanlarının ölçümüne ve konsantrasyonu bilinmeyen  $\text{KMnO}_4$  çözeltisinin de absorbanının ölçülerek, çizilen grafikten konsantrasyonunun bulunması esasına dayanır.
- \* Küvetler % 50, % 25, % 12,5, % 6,25'lik ve bilinmeyen konsantrasyonlu  $\text{KMnO}_4$  çözeltisi ile doldurulur.
- \* Fotometrede bu çözeltilerin absorbanları ölçülür.
- \* Elde edilen ölçülerle absorban-konsantrasyon grafiği çizilir.
- \* Grafik yardımıyla konsantrasyonu bilinmeyen numunenin konsantrasyonu bulunur.

### N.O.D

- \* **Bilinmeyen konsantrasyonu** =  $\frac{\text{N.O.D}}{\text{S.O.D}} \times \text{Std. konsantrasyonu}$

formülünden de bulunarak karşılaştırılır.



### DENEY 3

#### DENEYİN ADI: End-Point Total Protein Tayini

#### MATERYAL:

- \* Distile su
- \* Biüret reaktifi
- \* Standart
- \* Serum
- \* Vorteks
- \* Santrifüj cihazı
- \* Fotometre
- \* Otomatik pipet
- \* Deney tüpü
- \* Küvet

#### DENEYİN YAPILIŞI:

Üç adet deney tüpü alınır. Kör, standart ve numune şeklinde işaretlenir ve aşağıdaki pipetlemeler yapılır.

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Serum</b>	-	-	20 µl
<b>Standart</b>	-	20 µl	-
<b>Distile su</b>	20 µl	-	-
<b>Biüret Reaktifi</b>	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

\* Tüpler vorteksle karıştırılır. Oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. 545 nm’de köre karşı okutulur.

\*  $C_N$  değerini bulabilmek için;

$$C_N = \frac{A_N}{A_{Std}} \times C_{std} \quad \text{formülünden } C_N \text{ değeri bulunur.}$$

#### YORUM:



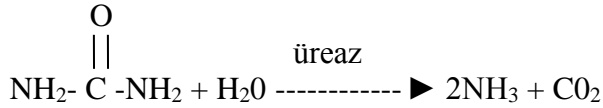
## ENZİMLE HİDROLİZ DENEYLERİ

**DENEYİN AMACI:** Çeşitli faktörlerin, üreaz enziminin katalizlediği reaksiyonun hızına etkisinin bulunması

### MATERYAL:

- \* Substrat (ÜRE) çözeltiler ( 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 mM)
- \* ÜREAZ çözeltisi
- \* HgCl<sub>2</sub> (%1)
- \* Parakloromercuri benzoat (PCMB) (7 x10<sup>-4</sup>M)
- \* 0,5 N Metil red (indikatör)
- \* Fosfat tamponu (pH=7, 0.1 M)
- \* Pipet
- \* Deney tüpü
- \* Erlenmayer
- \* HCl (0.5 N)
- \* Benmari
- \* Büret

**PRENSİP:** Üreaz enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Yukarıdaki reaksiyonun hızına etki eden çeşitli faktörler araştırılacaktır. Reaksiyon hızı ürün miktarı cinsinden ölçülecektir. Bunun için deney sonucu açığa çıkan NH<sub>3</sub>, HCl ile titre edilir. Harcanan HCl miktarı hız olarak alınır veya harcanan HCl miktarından NH<sub>3</sub> miktarı da aşağıdaki şekilde hesaplanabilir: Harcanan HCl miktarı NH<sub>3</sub> miktarına eşit olacağından; V<sub>HCl</sub> (lt) x M<sub>HCl</sub> (mol/lt) = ..... mol HCl= ..... mol NH<sub>3</sub> eder.

Buradan parçalanmış üre miktarı da bulunabilir.

NOT: Üreaz insan vücudunda bulunmaz, soya fasulyesinden elde edilir ve insanlarda kan üresi tayininde kullanılır.

### DENEY 1

**DENEYİN ADI: Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi**

### MATERYAL:

- \* 6 adet erlenmayer
- \* PCMB veya HgCl<sub>2</sub>
- \* Pipet
- \* Üreaz
- \* Benmari
- \* Büret tutucu
- \* Metil red
- \* 6 adet deney tüpü
- \* Üre
- \* HCl
- \* Büret

## DENEYİN YAPILIŞI:

- \* 6 adet erlenmayer alınır. (100 veya 250 ml'lik)
  - \* Erlenmayerlerin üzerlerine K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> yazılır.
  - \* 6 adet deney tüpü alınır.
- Hepsi yukarıdaki gibi işaretlenir ve aşağıda belirtilen pipetlemeler yapılır.

	<u>K<sub>1</sub></u>	<u>K<sub>2</sub></u>	<u>D<sub>1</sub></u>	<u>D<sub>2</sub></u>	<u>D<sub>3</sub></u>	<u>D<sub>4</sub></u>
<b>Substrat (Üre) (1M)</b>	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
<b>PCMB veya HgCl<sub>2</sub></b>	4 damla	4 damla	-	-	-	-
<b>Üreaz</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>1 ml</b>

\*Tüpler karıştırılır.

K<sub>1</sub> oda sıcaklığında

K<sub>2</sub> kaynar suda

D<sub>1</sub> oda sıcaklığında

D<sub>2</sub> 37°C'de

D<sub>3</sub> 56°C'de

D<sub>4</sub> kaynar suda

=> **30 Dakika inkübe edilir.**

- \* İnkübasyon sonunda D tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> damlatılır ve karıştırılır.
- \* Tüplerdeki reaktifler kendilerine karşılık gelen erlenlere boşaltılır ve 2'şer damla metil red ilave edilerek titrasyon yapılır.
- \* K (kör) tüplerinde harcanan HCl miktarının ortalaması alınır.
- \* Diğer tüpler için harcanan HCl miktarından çıkarılır.
- \* Çıkan sonuç 2 ile çarpılır.
- \* Sıcaklığa karşı harcanan HCl miktarı grafiğe çizilir.

\* **Optimum sıcaklık bulunur ve bundan sonraki deneyler belirlenen optimum sıcaklıkta yapılır.**

### NOT:

- \* Kör deneyleri, ortamda enzimin etkisi olmadan bulunabilen NH<sub>3</sub> miktarını veya NH<sub>3</sub>'den başka HCl'yi harcayan sebepleri ortadan kaldırmak içindir.
- \* İnkübasyonlar 30 dakika yapıldığı için sonuçlar 2 ile çarpılmalıdır. Çünkü hız ifadesinde birim zaman 1 saattir.

### SONUÇ (OPTİMUM SICAKLIK) :

Grafik çizilmelidir.

## DENEY 2

### DENEYİN ADI: pH'nın hıza etkisi

#### MATERYAL:

- \* 7 adet erlenmayer
- \* 7 adet deney tüpü
- \* PCMB veya HgCl<sub>2</sub>
- \* Metil red
- \* Üre
- \* Üreaz
- \* Büret

#### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* 7 adet erlenmayer alınır.
- \* K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* 7 adet tüp alınır.
- \* Tüpler K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* Pipetlemeler yapılır.

	K <sub>1</sub> pH=3	K <sub>2</sub> pH=9	D <sub>1</sub> pH=3	D <sub>2</sub> pH=5	D <sub>3</sub> pH=7	D <sub>4</sub> pH=9	D <sub>5</sub> pH=11
<b>Substrat (Üre 1M)</b>	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
<b>PCMB veya HgCl<sub>2</sub></b>	4 damla	4 damla	-	-	-	-	-
<b>Üreaz</b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Tüp içeriklerinin karışması sağlanır . Optimum ısıda 30 dakika inkübasyona bırakılır.							
<b>PCMB veya HgCl<sub>2</sub></b>	-	-	4 damla	4 damla	4 damla	4 damla	4 damla

- \* Karıştırılır ve bütün tüpler optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir.
- \* İnkübasyon sonunda D tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> damlatılır.
- \* Karıştırılır.
- \* Her tüp kendisine karşılık gelen eri ene boşaltılır. K<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> erlenlerine 2'şer damla metil red, K<sub>2</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> erlenlerine 2'şer damla metil oranj damlatılır.
- \* Titrasyonlar yapılır. Harcanan HCl miktarı 2 ile çarpılır.
- \* Sonuçlar, pH'ya karşılık harcanan HCl miktarı şeklinde grafiğe çizilir.

#### SONUÇ (OPTİMUM pH) :

Grafik çizilmelidir.

### DENEY 3

#### DENEYİN ADI: Enzim miktarının hızı etkisi

#### MATERYAL:

- \* 7 adet erlenmayer
- \* 7 adet deney tüpü
- \* Distile su
- \* PCMB veya HgCl<sub>2</sub>
- \* Büret tutucu
- \* Metil red
- \* Üre çözeltilisi
- \* Üreaz çözeltilisi
- \* Büret
- \* HCl

#### DENEYİN YAPILISI:

- \* 7 adet erlenmayer alınır.
- \* Üzerleri K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* 7 adet deney tüpü alınır ve aşağıdaki pipetlemeler yapılır.

	<b>K<sub>1</sub></b>	<b>K<sub>2</sub></b>	<b>D<sub>1</sub></b>	<b>D<sub>2</sub></b>	<b>D<sub>3</sub></b>	<b>D<sub>4</sub></b>	<b>D<sub>5</sub></b>
<b>Substrat (Üre) (1M)</b>	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
<b>Distile su</b>	5 ml	1 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml
<b>PCMB veya HgCl<sub>2</sub></b>	4 damla	4 damla	-	-	-	-	
<b>Üreaz</b>	1 ml	5 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5ml

- \* Tüpler karıştırılır ve hepsi optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir.
- \* İnkübasyon sonunda D tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> ilave edilir ve karıştırılır.
- \* Her tüp kendi erlenine boşaltılır ve 2'şer damla metil red ilave edilerek titrasyon yapılır.
- \* Her tüp için harcanan HCl miktarı 2 ile çarpılır.
- \* Enzim miktarına karşılık gelen HCl miktarı grafiğe çizilir.

#### SONUÇ:

Grafik çizilmelidir.

## DENEY 4

### DENEYİN ADI: Substrat miktarının enzim hızına etkisi

#### MATERYAL:

- \* Metil red
- \* 7 adet deney tüpü
- \* 7 adet erlenmayer
- \* Üreaz
- \* PCMB veya HgCl<sub>2</sub>
- \* Üre
- \* Büret

#### DENEYİN YAPILISI:

- \* Toplam 7 adet erlenmayer alınır; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* 7 adet tüp alınır; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* Bütün tüplere 4'er ml üre çözeltisi ilave edilir.
- \* K tüplerine 3'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> ilave edilir.
- \* K tüplerine 1'er ml üreaz çözeltisi ilave edilerek karıştırılır.
- \* K tüpleri optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.
- \* S tüplerine 1'er ml üreaz çözeltisi ilave edilir. Karıştırılır ve optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.
- \* İnkübasyon sonunda tüpler benmariden çıkarılırlar.
- \* S tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> damlatılır.
- \* Her tüp (K'lar dahil) kendilerine karşılık gelen erlenlere boşaltılır, her birine 2'şer damla metil red ilave edilir.
- \* Titrasyon yapılır.

	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>
Substrat (Üre)	4ml 100mM	4ml 500mM	4ml 50mM	4ml 100mM	4ml 250mM	4ml 500mM	4ml 1000mM
PCMB veya HgCl <sub>2</sub>	4damla	4damla	-	-	-	-	-
Üreaz	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

- Karıştırılır. Optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir.

PCMB veya HgCl <sub>2</sub>	-	-	4 Damla	4 Damla	4 Damla	4 Damla	4 Damla
-----------------------------	---	---	------------	------------	------------	------------	------------

- \* Karıştırılır, erlenmayere boşaltılır.
- \* Titrasyonda harcanan HC1 miktarı 2 ile çarpılır ve sonuçlar substrat konsantrasyonlarına karşı harcanan HC1 şeklinde kağıda çizilir.
- \* V<sub>max</sub> ve K<sub>M</sub> değerleri bulunur.
- \* Aynı değerler Lineweaver - Burke eğrisi çizilerek de bulunur.

#### YORUM:

Grafik çizilmelidir.

## DENEY 5

### DENEYİN ADI: Enzim İnhibisyonu

#### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* Toplam 6 adet erlenmayer alınır; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* 6 adet tüp alınır; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> şeklinde işaretlenir.
- \* Bütün tüplere 4'er ml üre çözeltisi ilave edilir.
- \* K tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> ilave edilir.
- \* K tüplerine 1 'er ml üreaz çözeltisi ve 5'er damla inhibitör ilave edilerek karıştırılır.
- \* K tüpleri optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.
- \* S tüplerine 1 'er ml üreaz çözeltisi ilave edilir. Karıştırılır ve optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.
- \* İnkübasyon sonunda tüpler benmariden çıkarılırlar.
- \* S tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl<sub>2</sub> damlatılır.
- \* Her tüp (K'lar dahil) kendilerine karşılık gelen erlenlere boşaltılır, her birine 2'şer damla metil red ilave edilir.
- \* Titrasyon yapılır.

	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
Substrat (Üre)	4ml 100mM	4ml 500mM	4ml 100mM	4ml 250mM	4ml 500mM	4ml 1000mM
PCMB veya HgCl <sub>2</sub>	4damla	4damla	-	-	-	-
Üreaz	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
İnhibitör			5 damla	5 damla	5 damla	5 damla

- Karıştırılır. Optimum ısıda 30 dakika inkübe edilir.

PCMB veya HgCl <sub>2</sub>	-	-	4 Damla	4 Damla	4 Damla	4 Damla
-----------------------------------	---	---	------------	------------	------------	------------

- \* Karıştırılır, erlenmayere boşaltılır.
- \* Titrasyonda harcanan HC1 miktarı 2 ile çarpılır ve sonuçlar substrat konsantrasyonlarına karşı harcanan HC1 şeklinde kağıda çizilir.
- \* V<sub>max</sub> ve K<sub>M</sub> değerleri bulunur.
- \* Aynı değerler Lineweaver - Burke eğrisi çizilerek de bulunur.

#### YORUM:

Grafik çizilmelidir.

## ENZİM DENEYİ (AMİLAZ DENEYİ)

Tükürükte bulunan amilaz ile nişastanın parçalanması incelenecektir. Nişasta  $\alpha$ -glukozidik zincirden oluşan ve hidrolizi sonucu sadece glukoz açığa çıkan bir polisakkarittir. Amiloz ve amilopektin olmak üzere nişastanın iki komponenti bulunur. Amiloz nişastanın %15-20'sini oluşturur ve sadece  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 bağlarından oluştuğundan dallanma göstermez. Amilopektin ise % 80-85'ini oluşturur ve  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 bağları yanında 24-30 glukoz residüsünde bir  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 bağıyla dallanma gösterir. Tükürük  $\alpha$ -amilazı  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 glukozidik bağlara etki ederek nişastayı maltoz ve oligosakkaridlere (limit dekstrin gibi) hidroliz eder.  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 bağlarına etkisizdir. İyot nişastayla karıştırıldığında, nişastanın helikal yapıları arasına iyot girerek mavi-mor renk verir. Ancak nişasta hidrolize uğradığı oranda renk mavi-mordan sarıya doğru açılır. Bu deneyle amilaz etkisinde bırakılan nişastanın hidrolizi incelenecek ve ısı, pH, substrat ve enzim konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkileri değerlendirilecektir.

### Ayrıçlar

1. Tükürük
2. %1'lik Nişasta: 2 g nişasta 15 ml saf suda süspanse edilir. 175 ml saf su bir erlende kaynatılır. Nişasta süspanasyonu yavaş yavaş kaynar suya eklenir. Tamamen homojen bir süspanasyon elde edilinceye kadar karıştırılır. 200 ml'ye saf su ile tamamlanır. Oda ısısında soğutulur.
3. Serum fizyolojik
4. %0.12'lik Sodyum klorür: 0.1 g NaCl bir miktar saf suda çözülerek, 100ml'ye tamamlanır.
5. İyot çözeltisi: 0.5 g potasyum iyodur 10 ml saf suda çözülür, üzerine 0.25 iyot eklenir. Çözülünceye kadar karıştırılır ve 100 ml'ye saf suyla tamamlanır.
6. %0.2'lik HCl: 0.2 ml HCl 100 ml saf suda hazırlanır.
7. Fosfat tamponu (pH: 6.8)

### DENEY I: Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

4 adet deney tüpüne 1'er ml %1'lik nişasta ve 1'er ml fosfat tamponu konarak iyice karıştırılır. Birinci tüp 0°C buz içine, ikinci tüp 20°C oda ısısına, üçüncü tüp 37°C su banyosuna ve dördüncü tüp kaynar su banyosu konur. 10 dakika tüp muhtevasının ortama uyum sağlaması için beklenir. Sonra her tüpe 1 ml, 1/20 oranında seyreltilmiş tükürük eklenerek karıştırılır. Bir dakika sonra her tüpteki karışımdan birer damla alınarak fayans üzerinde birer damla iyotla karıştırılır. Oluşan renk kaydedilir. Bu işlem 5, 10, 15 ve 20. dakikalarda tekrarlanır.

### YORUM:

Grafik çizilmelidir.

## DENEY II: pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

10 adet deney tüpüne aşağıdaki şekilde pipetleme yapılır.

Ayıraçlar(ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%1 Nişasta	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
%0.2 NaOH	-	-	-	-	-	-	0.2	0.5	1.0	2.5
%0.2 HCl	5	2.5	1.0	0.5	0.2	-	-	-	-	-
Saf su	4	6.5	8.0	8.5	8.8	9.0	8.8	8.5	8.0	6.5
1/20 Tükürük	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tüpler tekrar karıştırılır Bir dakika sonra her bir tüpten birer damla alınarak, önceden fayans üzerine damlatılmış iyot solüsyonu ile karıştırılır. Oluşan renkler kaydedilir. Bu işlem her tüp için 5, 10, 15 ve 20. dakikalarda tekrarlanır. Sonuçta amilaz enzimi için optimum pH bulunur.

### YORUM:

Grafik çizilmelidir.



### DENEY III: Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

6 deney tüpü alınarak tablodaki gibi pipetleme yapılır.

Ayıraçlar(ml)	Tüp No					
	1	2	3	4	5	6
Serum fizyolojik	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1/10 Tükürük	1.0	-	-	-	-	-
Seyreltme oranı	5	2.5	1.0	0.5	0.2	-

Tüplerin hepsine 1'er ml serum fizyolojik konduktan sonra, birinci tüpe 1ml 1/10 oranında seyreltilmiş tükürük eklenir, karıştırılır. Birinci tüpten 1 ml tükürük serum fizyolojik karışımı 2 nolu tüpe aktarılır ve karıştırılır. İkinci tüpten 3 nolu tüpe aktararak devam edilir ve en son altıncı tüpten 1 ml dışarı atılır. Yukarıda verilen seyreltme oranları elde edilir.

Fosfat tamponu	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
%1 nişasta	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tüpler karıştırılır. Bir dakika sonra her bir tüpten birer damla alınarak, önceden fayans üzerine damlatılmış iyot solüsyonu ile karıştırılır. Oluşan renkler kaydedilir. Bu işlem her bir tüp için 5,10,15 ve 20. dakikalarda tekrarlanır.

#### YORUM:

Grafik çizilmelidir.

#### DENEY IV: Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

7 adet deney tüpü alınarak tablodaki gibi pipetleme yapılır.

Ayıraçlar(ml)	Tüp No						
	1	2	3	4	5	6	7
%1 nişasta	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Saf su	4.8	4.5	4.0	3.0	2.0	1.0	-
Fosfat tamponu	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1/20 Tükürük	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tüpler karıştırılır. Bir dakika sonra her bir tüpten birer damla alınarak önceden fayans üzerine damlatılmış iyot solüsyonu ile karıştırılır. Oluşan renkler kaydedilir. Bu işlem her bir tüp için 5, 10, 15 ve 20. dakikalarda tekrarlanır.

#### YORUM:

Grafik çizilmelidir.

## **İDRAR ANALİZLERİ**

Tam idrar analizi,

1. İdrarın fiziksel analizi
2. İdrarın kimyasal analizi
3. İdrarın sediment analizi (mikroskopik analizi)

Olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir.

### **DENEY I. İdrarın Fiziksel Analizi**

#### **Kullanılacak Malzemeler**

İdrar örnekleri  
Deney tüpleri  
İdrar stripleri  
Dansitometre  
Dereceli silindir

İdrarın Fiziksel Analizi'nde idrarın aşağıdaki özellikleri değerlendirilir:

1. İdrarın miktarı
2. İdrarın görünümü
3. İdrarın kokusu
4. İdrarın pH'sı
5. İdrarın dansitesi
6. İdrarın ozmolaritesi

**Yorum:**

## **DENEY 2. İdrarın Kimyasal Analizi**

### **2.1. İdrarda Glukoz Ölçümü**

Normalde idrarda rutin metodlarla ölçülemeyecek kadar düşük miktarda glukoz bulunur. Kan glukozunun yüksek olduğu durumlarda glomerüler filtrata fazla miktarda glukoz geçer. Yani 160-180 mg/ dl' lik böbrek eşiği aşılmış olur. İdrarda glukoz görülmesine **glukozüri** denir.

İdrarda glukoz ölçümü **Benedict** ya da Fehling metodları (kalitatif) ya da idrar striplerinde glukoz oksidaz yöntemi ile yapılabilir.

#### **Benedict Testi**

**Prensip:** Glukozun sıcak alkali ortamda  $Cu^{+2}$  iyonlarını  $Cu^{+}$  haline indirgemesidir.

#### **Malzemeler**

İdrar örnekleri

Deney tüpleri

Benedict ayıracağı ( $CuSO_4$ , soyum sitrat, soyum karbonat)

#### **Deneyin Yapılışı**

Bir deney tübüne 5 ml Benedict reaktifi konulur ve üzerine 0,5 ml veya 8 damla idrar ilave edilip çalkalanır. 5 dakika kaynatılır. İdrarda glukozun varlığına göre yeşil, portakal sarısı, kiremit kırmızısına kadar değişen renkler görülür.

#### **Yorum:**

## 2.2. İdrarda Protein Ölçümü

İdrarda normalde protein görülmez. İdrarda protein olmasına *proteinüri* denir. Proteinüri nedenleri:

**1. Fonksiyonel nedenler:** Aşırı egzersiz, uzun süre soğuğa maruz kalma, gebelik, fazla proteinli beslenme, ortostatik etki

### 2. Organik nedenler

**a. Prerenal nedenler:** Konjestif kalp yetmezliği, ateşli hastalıklar, akut barsak tıkanmaları, renal vene tümör basısı, karaciğer hastalıkları, şok, anemi, lösemi gibi kan hastalıkları, toksik sebepler

**b. Renal nedenler:** Akut ve kronik glomerülonefrit, nefrotik sendrom, piyelonefrit, böbrek tüberkülozu, hipernefron, böbrek infarktüsü, amiloid nefroz, eklampsi, nefroskeroz, toksik sebepler, polikistik böbrek hastalıkları

**c. Postrenal nedenler:** Üreter, mesane, prostat, üretra gibi böbrek dışındaki idrar yollarındaki iltihabi veya tümöral hastalıklar

İdrarda protein ölçümünde kalitatif (*Tanret Metodu*), yarı kalitatif (**idrar stripleri**) ya da kantitatif metodlar (**Purdy, TCA, Biüret, hazır ticari kitler**) kullanılabilir.

### Tanret Deneyi

Prensip ısı ile denaturasyon ve kimyasal maddelerle presipitasyon esasına dayanır.

#### Malzemeler

İdrar örnekleri

Deney tüpleri

Asetik asit

Tanret Reaktifi (KI, HgCl<sub>2</sub>, Asetik asit)

#### Deneyin Yapılışı

İdrar pH'sı alkali ise birkaç damla asetik asit ilave edilerek idrar asitlendirilir.

Uzun bir deney tüpünün 2/3' üne kadar idrar doldurulur. Tüp alttan tutularak ve hafif eğilerek üst kısmı kaynayıncaya kadar alevde ısıtılır. Bulanıklık olursa albümin, karbonat veya fosfattan kaynaklanır. Tüp dik tutularak birkaç damla Tanret reaktifi damlatılır. Bulanıklık kaybolursa karbonat veya fosfattan artıyorsa albüminden kaynaklanmış demektir.

#### Yorum:

### 2.3. İdrarda Bilirubin Ölçümü

İdrarda bilirubin olması patolojiktir. İdrarda patolojik durumlarda sadece ***direkt bilirubin*** görülür. İdrarda hepatik ve posthepatik sarılıklarda ve kronik karaciğer hastalıklarında direkt bilirubin görülür.

Bilirubin tayininin bekletilmeden hemen yapılması gerekir. İdrarda kalitatif bilirubin tayini ***Rozin testi*** ve Fouchet testi ile yapılır.

#### **Rozin Testi**

Herhangi bir oksidasyon olmadan bilirubinün iyot ile birleşerek yeşil renkli bileşik oluşturması esasına dayanır.

#### **Malzemeler**

İdrar örnekleri

Deney tüpleri

Rozin ayıracağı (İyot, KI, % 95'lik Etanol çözeltisi)

#### **Deneyin Yapılışı**

Bir deney tübüne 5 ml idrar konur. Üzerine 2-3 ml rozin reaktifi tüpün kenarından sızdırılarak tabaka teşkil edecek şekilde eklenir. İki tabak arasında yeşil renkli halka oluşması bilirubinün pozitif olduğunu gösterir. Yeşil halkanın kalınlığına göre +, ++, +++ gibi sonuç verilir.

#### **Yorum:**

## 2.4. İdrarda Ürobilinojen Tayini

Ürobilinojen bilirübinin bağırsak bakterileri tarafından metabolize edilmesi sonucu oluşur. Bağırsaklardan bir kısmı emilerek dolaşıma geçer. Bu arada bir miktarı da idrarla atılır. Dolayısıyla idrarda normalde günlük ürobilinojen atılımı 0,1-4 mg arasındadır.

Ürobilinojen kolaylıkla ürobiline okside olacağından daima taze idrarda bakılmalıdır, idrar ışıktaki bırakılmamalıdır. İdrarda ürobilinojen olmaması safra yolları tıkanıklığını düşündürür.

### **Ehrlich Testi**

Prensibi, ürobilinojenin Ehrlich reaktifi ile (p-dimetil amino benzaldehit) reaksiyona girerek kiraz kırmızısı kompleks oluşturması esasına dayanır.

### **Malzemeler**

İdrar örnekleri

Deney tüpleri

Ehrlich ayıracağı (p-Dimetil aminobenzaldehit, HCl)

### **Deneyin Yapılışı**

Bir deney tüpüne 5 ml idrar konur. 1 ml Ehrlich reaktifi eklenerek karıştırılır. 10 dakika sonra hafif kırmızı renk oluşumu ürobilinojen varlığını, kiraz kırmızısı renk arttığını, hiç renk oluşmaması ise ürobilinojenin bulunmadığını gösterir.

### **Yorum:**

### 3. İdrarın Sediment Analizi

İdrar örneği bir tüpe alınır. Fiziksel ve kimyasal analizleri yapıldıktan sonra 1500-2000 rpm (revolution per minute)'de 5 dakika kadar santrifüj edilir.

Santrifüj sonrası süpernatant atılır. Sediment temiz bir lamın üzerine damlatılır ve üzerine lamel kapatılır.

Önce küçük bir objektifle **x10**, daha sonra da **x40** ile mikroskop altında incelenir.

İdrar sedimentinde hücresel elemanlar (eritrosit, lökosit, bakteri, epitel, sperm, maya hücreleri), silendirler (hyalin, mumsu, granül, hücresel), kristaller, parazitler ve yumurtaları ve kontaminantlar görülebilir.

#### **Yorum:**

<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/idrar/turkce/index.htm>



## ANAEROBİK GLİKOLİZ

**DENEYİN AMACI:** Anaerobik glikolizin gözlenmesi. Bunun için O<sub>2</sub>'siz ortamda glukozun yıkımı ile **oluşan laktik asit**, ortamda **azalan glikoz ve fosfor** tayini yapılacaktır.

### MATERYAL:

- \* Reaktifler => 1) Kombine Çözelti: Glukoz, Nikotinamid + Fosfat Tamponu  
Nikotinamid, beyin ekstresinde bulunan ve NAD'yi parçalayan NADaz enzimini inhibe eder. Fosfat tamponu, hem ortamın pH'sını sabit tutar, hem de glikolizin devamı için gerekli olan fosforu sağlar.
- \* KHCO<sub>3</sub>: K<sup>+</sup>, glikolizdeki kinaz enziminin aktivatörüdür.
- \* MgCl<sub>2</sub>: Mg, glikolizdeki kinaz enziminin aktivatörüdür.
- \* Beyin Ekstresi: Mitokondrileri alınmış fare beyni ekstresidir. İçerisinde glikoliz enzimleri, ATP ve NAD bulunur.
- \* Deney tüpü
- \* Pipet
- \* Kolorimetre

### DENEYİN YAPILIŞI:

- \* İki adet deney tüpü alınır.
- \* Aşağıdaki pipetlemeler yapılır. (Önce tüp 2, sonra tüp 1 hazırlanır.)

	<u>Tüp 1</u>	<u>Tüp 2</u>
<b>Kombine Çözelti</b>	0,2 ml	0,2 ml
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,05 ml	0,05 ml
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	0,05 ml	0,05 ml
<b>Beyin Ekstresi</b>	0,1 ml	0,1 ml
<b>Distile su</b>	0,1 ml	0,1 ml

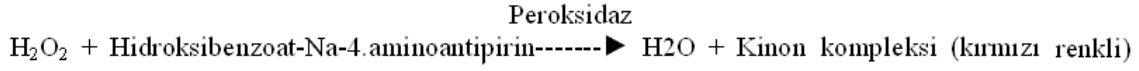
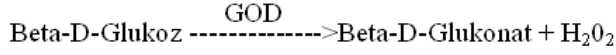
- \* Tüp 2 karıştırılır, 37°C'de 45 dakika inkübasyona bırakılır.
- \* Tüp 1 hazırlanır, karıştırılır ve bekletilmeden glukoz, fosfor ve laktik asit çalışılır.
- \* Tüp 2 için de inkübasyondan sonra aynı işlemler yapılır.

### GLUKOZ TAYİNİ:

#### Glukoz Oksidaz Metodu

Günümüzde rutin amaçlar için en çok kullanılan metoddur. Glukoz oksidaz, mantarlardan elde edilen bir enzimdir. Glukoz tayini için oldukça spesifik bir metoddur.

**Prensip:** Glukoz oksidaz, havadaki moleküler oksijeni kullanarak glukozdan, glukonik asid ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Rengin şiddeti ortamdaki glukoz miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyonlar aşağıdaki şekilde cereyan eder:



	<u>Kör tüpü</u>	<u>Standart tüpü</u>	<u>Numune tüpü</u>
<b>Tüp 1 (numune)</b>	-	-	10 µl
<b>Distile su</b>	10 µl	-	-
<b>Standart</b>	-	10µl	-
<b>Reaktif</b>	1 ml	1 ml	1 ml

\* 490 nm dalga boyunda absorbanları köre karşı okunur.

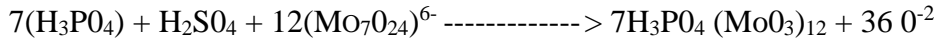
### Hesaplama:

$$\text{Glukoz (mg/dl)} = \frac{\text{NOD}}{\text{SOD}} \times \text{SK}$$

(Glukoz standart= 100 mg/dl)

## FOSFOR TAYİNİ

**PRENSİP:** İnorganik fosfor, sülfürik asit varlığında amonyum molibdatla reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur



İnorganik fosfor

Fosfomolibdat kompleksi

### **REAKTİFLER:**

**1.Renk reaktifi:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.61 mM, Amonyum molibdat 0.5 N, Sitrik asit 1.78 M

**2.Standart:** 1.615 mmol/L Monopotasylum fosfat (5mg/dl)

### **YAPILIŞI:**

	<u>Numune Tüpü</u>	<u>Kör tüpü</u>	<u>Std. Tüpü</u>
<b>Sitrik asit</b>	-	50 µl	-
<b>Tüp 1</b>	20 µl	20 µl	-
<b>Standart</b>	-	-	20µl
<b>Reaktif</b>	2 ml	2 ml	2 ml

\* Tüpler karıştırılır ve oda ısısında 5 dakika bekletilir.

\* Reaktif körüne karşı 340 nm'de absorbansları okunur. Hesaplamalar yapılır.

$$\text{Fosfor(mg/dl)} = \frac{\text{NOD}}{\text{SOD}} \times \text{SK}$$

**NOT:** Süreye dikkat edilmelidir.

### **LAKTİK ASİT TAYİNİ :**

**PRENSİP:** Laktik asit FeCl<sub>3</sub> (% 10'luk) ile muamele edildiğinde koyu sarı renkli demir laktat bileşiği meydana gelir.

### **YAPILIŞI:**

2 adet deney tüpü alınarak aşağıdaki pipetlemeler yapılır :

	<u>Kör tüpü</u>	<u>Numune tüpü</u>
<b>FeCl<sub>3</sub> (% 10'luk)</b>	2 damla	2 damla
<b>Distilesu</b>	10 ml	10 ml
<b>Tüp 1</b>	-	0.3 ml
<b>Distile su</b>	0.3 ml	-

Kör ile numune tüpleri, oluşan sarı renk tonları bakımından karşılaştırılır.

\* Numune tüpünde sarı rengin artması laktik asit oluştuğunu gösterir.

\* Bu işlem her iki inkübasyon tüpü için yapılır.

### **YORUM:**

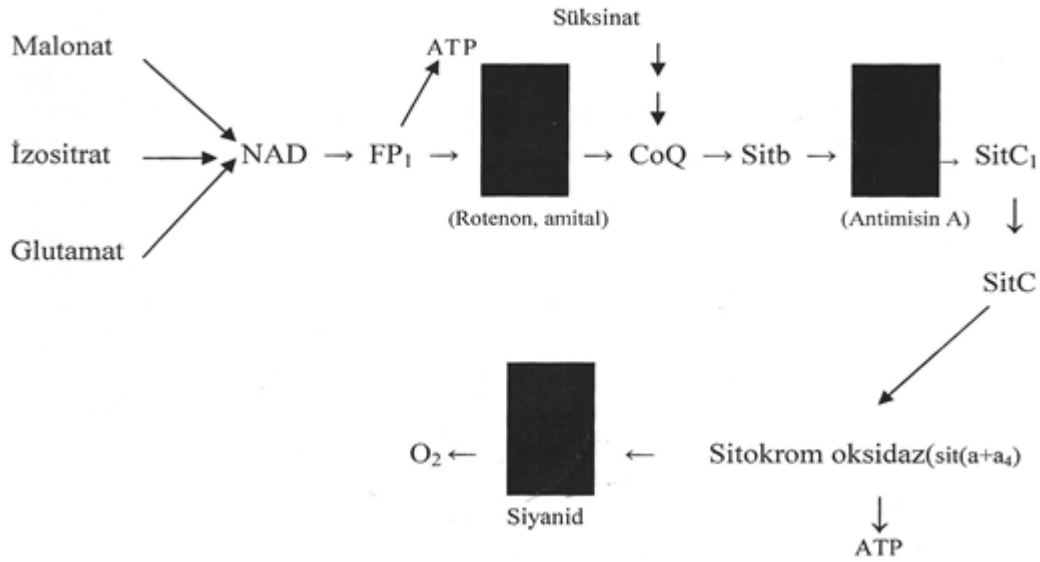
## SOLUNUM ZİNCİRİ

**DENEYİN AMACI:** Solunum zinciri reaksiyonlarının incelenmesi

**MATERYAL:**

- \* 5 adet deney tüpü
- \* KCN
- \* Glutamat
- \* Metilen mavisi
- \* Pipet
- \* Süksinat
- \* Malonat
- \* Mitokondri homojenatı
- \* Distile su
- \* Sıvı vazelin

**Deneyin çalışma şeması aşağıdaki şekildedir:**



Deneyin birinci basamağında elektronlar O<sub>2</sub> yerine metilen mavisine akar. Çünkü, O<sub>2</sub>'in reaksiyona girişi vazelinle engellenmiştir. Elektron akışı sonucu metilen mavisi indirgenir ve rengi değişir. İkinci safhada vazelin çıkarılınca elektronlar metilen mavisinden CoQ ve sitokromlar üzerinden O<sub>2</sub>'e akar. Metilen mavisi yükseltgendiğinden tekrar rengi değişir (eski rengine döner). Bu şekilde elektron akışı gözlenmiş olur.

### DENEYİN YAPILIŞI:

**Deney iki aşamalıdır:**

**1.aşama**

- \* 5 adet deney tüpü alınarak aşağıdaki pipetlemeler yapılır:

<b>Tüp No:</b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>2</u></b>	<b><u>3</u></b>	<b><u>4</u></b>	<b><u>5 (Kontrol)</u></b>
<b>Süksinat</b>	0,5ml	0,5ml	0,5ml	-	-
<b>KCN</b>	-	-	0,5ml	-	-
<b>Malonat</b>	-	0,5ml	-	-	-
<b>Glutamat</b>	-	-	-	0,5ml	-
<b>Distile Su</b>	1,5ml	1ml	1ml	1,5 ml	2,5ml
<b>Metilen mavisi</b>	0,5ml	0,5ml	0,5	0,5ml	0,1ml
<b>Mitokondri homojenatı</b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml (kaynatılmış)

## **2.aşama**

- \* Tüpler karıştırılır
- \* Tüplerin üzerine tabaka oluşturacak şekilde 1,5 ml vazelin ilave edilir.
- \* Her bir tüpteki renk değişimi kaydedilir.
- \* Deneyin 1. aşaması bittikten sonra 1 ve 3 nolu tüplerdeki vazelin atılır.
- \* Tüpler karıştırılır ve renk değişimi gözlenir.

## **NOT:**

- \* 1. Tüpte reaksiyon olur, renk açılır, vazelin alındıktan sonra elektronlar CoQ'ya verilir. Metilen mavisi elektron verdiği için yükseltgenir ve rengi koyulaşır.
- \* 2. Tüpte reaksiyon olmaz, çünkü malonat inhibisyon yapar.
- \* 3. Tüpteki oksidasyon 3. basamağa kadar devam eder. Çünkü KCN 3.basamağı inhibe eder. Vazelin alındıktan sonra metilen mavisi yükseltgendiğinden renk koyulaşır. Fakat basamağın biri inhibe edildiğinden renk farkı 1. tüpe göre daha az olur.
- \* 4. Tüpte renk değişimi olmaz. Çünkü ortamda glutamat bulunduğu halde NAD yoktur. NAD, yıkama sırasında uzaklaştırılmıştır.
- \* 5. Tüpte renk değişimi olmaz. Çünkü kaynatma esnasında enzimler denatüre olduğu için reaksiyon gerçekleşmez.

**YORUM:** (Herbir tüpteki renk değişimini ayrı ayrı yorumlayınız.)

## TRANSAMİNASYON VE KROMATOĞRAFI

### Deneyin Amacı:

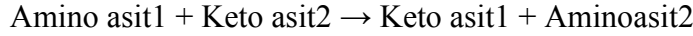
- 1) Transaminasyonun varlığını ortaya koymak
- 2) Reaksiyon sonunda meydana gelen ürünlerin kromatografi ile belirlenmesi ve böylece kromatografinin öğrenilmesi.

### MATERYAL:

Ninhidrin çözeltisi (Asetondaki % 0.2 lik çözeltisi)  
Glutamat çözeltisi  
Alanin çözeltisi  
Pirüvik asit çözeltisi  
Fosfat tamponu ( pH: 7,6 )  
Deney tüpü  
Kromatografi kağıdı  
Su banyosu  
Kurutma makinesi

### Prensip:

Amino gruplarının transferi transaminasyon olarak verilir.



**Örn: Glutamik Asit + Pirüvik asit  $\rightarrow$  ALT  $\rightarrow$   $\alpha$ -ketoglutarik asit + Alanin**

**Glutamik Asit + oksaloasetat  $\rightarrow$  AST  $\rightarrow$   $\alpha$ -ketoglutarik asit + Aspartat**

Oluşan yeni aminoasitler ince tabaka veya kağıt kromatografisi ile gösterilebilir. Uygun çözücü ile aminoasitler birbirinden ayrılır. Ayrılan aminoasitler ninhidrin reaksiyonu kullanılarak mor lekeler olarak gözlenir.

### DENEYİN YAPILIŞI:

	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4
<b>Glutamat</b>	50 $\mu$ L	-	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<b>Alanin</b>	-	50 $\mu$ L	-	-
<b>Piruvat</b>	-	-	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>ALT</b>	-	-	100 $\mu$ L	-
<b>Distile su</b>	-	-	-	50 $\mu$ L
<b>Fosfat Tamponu</b>	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L

\* 37 °C su banyosunda 15 dakika bekletilir (inkübasyon).

Kromatografi kağıdı alınarak üzerine eşit aralıklarla 4 adet nokta belirlenir;

- \* 1. noktanın üzerine tüp1 muhtevsından 1 damla damlatılır.
- \* 2. noktanın üzerine tüp2 muhtevsından 1 damla damlatılır.
- \* 3. noktanın üzerine tüp3 muhtevsından 1 damla damlatılır.
- \* 4. noktanın üzerine tüp4 muhtevsından 1 damla damlatılır.
- \* Kurutma makinesi ile kâğıt kurutulur.

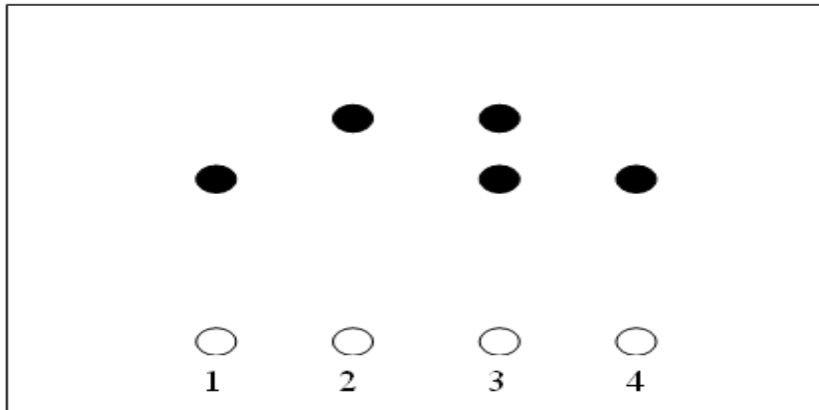
Daha sonra kâğıt solvent sistem içerisine konarak 45 dakika bekletilir (inkübasyon).

- \* Kurutma makinası ile kâğıt iyice kurutulur.
- \* Kromatografi kâğıdı, ninhidrinin asetonadaki % 0,2'lik çözeltisine daldırılır (boyama işleml).
- \* Boyama işlemlinden soma kurutma işleml yapılır.

### YORUM:

- \*Boyama işleml gerçekleştirildikten sonra, çözeltinin glutamat ve alanin muhtevasına bağlı olarak farklı yüksekliklerde bulunan mor bölgeler gözlenir.
- \*Alaninin molekül ağırlığı glutamattan daha küçük olduğundan alanin daha hızlı hareket etmiş ve daha yukarıda bir leke meydana gelmiştir.
- \*Tüp 1 ve Tüp 2 standart amino asit tüpleridir.
- \*Tüp 3'te enzim etkisiyle gerçekleşen transaminasyon reaksiyonuyla, piruvattan alanin oluşmuştur. Bu alanin kromatografik olarak yürümüştür.
- \*Tüp 4'te enzim olmadığından herhangi bir reaksiyon olmamıştır, glutamat kromatografik olarak yürümüştür.
- \*Kromatografi kâğıdı üzerinde, örnek yürüme uzaklığının solvent yürüme uzaklığına oranı olan Rf değeri de tespit edilebilir.

$$\text{Retention Factor (R}_f\text{)} = \frac{\text{Örnek yürüme uzaklığı}}{\text{Solvent yürüme uzaklığı}}$$



## KÂĞIT KROMATOĞRAFİSİ

### Kromatografi

Kromatografi, bir kimyasal karışımdaki kimyasal yapıları çok az fark gösteren bileşiklerin adsorban ortamdaki adrosorbe edilme derecelerine göre ayrılmasına dayanan bir analiz yöntemidir.

### Kâğıt Kromatografisi

Her iki fazı da sıvıdır. Atmosferde bulunan su buharı kromatografi kağıdı tarafından emilmiş ve sellüloz fiberleri arasında yerleşerek hareketsiz fazı oluşturmaktadır, ikinci faz olarak (hareketli faz) suda çözünmeyen bir diğer sıvı kullanılmaktadır. Kapiller boru etkisi ile kağıt boyunca hareket eden sıvı kâğıt üzerindeki çözüneni (çözüneni) çözerek beraberinde taşır ve iki faz arasında dağıtır. Çözünenin çözünme derecesi ile orantılı olarak hareketliliği de artar. Hareket yönüne göre yukarıya doğru yükselen (asendan) ya da aşağıya doğru alçalan (desendan) adlarını alırlar.

Örneğin (çözünen ya da çözünen) çözümlenerek hareketli fazla birlikte katettiği mesafe önemlidir

$$R_f = \frac{\text{Örneğin katettiği mesafe (cm)} \quad x}{\text{Çözücünün katettiği mesafe (cm)} \quad y}$$

### Metod

\* Whatman kâğıdı ambalaj kâğıdı üzerine konularak alt ucundan 2 cm mesafeden kurşun kalemle çizilir. Bu çizgi üzerine eşit aralıklarla uygulanarak aminoasit sayısı kadar nokta konular ve küçük daire içine alınır.

\* Uygulanacak aminoasitlerin baş harfleri belirtilir.

\* Örnek uygulaması mikropipetlerle yapılır. Kâğıtta kendisi için ayrılan yere pipet ucu değiştirildiğinde hemen emilir. Uygulanan miktar kuruduktan sonra ikinci uygulama yapılır. Bu işlem 5 kez tekrarlanır.

Amino asitler yukarıdaki gibi uygulanırken organik asitlerde her uygulama arası 2,4-Dinitrofenil hidrazin uygulanır. Organik asitlerle bu madde hidrazon oluşturur.

\* Uygulama bittikten sonra kağıtlar 15 dakika bekletilir. Sonra iki ucu birbirine karşılık gelecek şekilde silindire haline getirilir. Tel zımba ile tutturulur.

\* Bu silindirler önceden hazırlanan çözücü konulmuş beherlere konular. Amino asitler için n-Bu:Aca:H<sub>2</sub>O ve organik asitler için n-Bu:NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O kullanılır.

\* Behere ve silindire dokunulmadan çözücünün kağıdın tepesine ulaşması için beklenir.

\* Sonra kâğıt beherden çıkarılır. Çözücünün kâğıt üzerinde ulaştığı tepe kısmı kurşun kalemle çizilir. Kâğıt kurutulur. Amino asit için ninhidrin çözeltisine batırılır ya da ninhidrin dökülür. Sonra iyice kurutulur. Kuruma sonrası mor-pembe lekeler oluşur. Keto asitler için ayrıca bu işleme benzer boyama yapılmaz.

\* Amino asit ve keto asit lekeleri kurşun kalemle daire içine alınır. Uygulama yeri ile göç ettikleri noktalar arası mesafe ölçülür. Ayrıca çözücünün katettiği mesafe de ölçülerek verilen formüle göre R<sub>f</sub> değerleri bulunur.

### Tıpta Uygulama Alanları

Kan ve idrar örneklerinde kullanılmaktadır. Aminoasit metabolizma bozuklukları başta olmak üzere birçok hastalıkta kullanılan bir yöntemdir.

Karacğer koması, Fenilketonüri, Wilson hastalığı, Galaktozemi, Vitamin eksikliği, Nefroz, Fankoni sendromu, Hartnup hastalığı, Sistinüri, Kloroform zehirlenmesi, Maple syrup hastalığı vb.



