

# 13. FT-IR KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ İLE UYGULAMALI PROTEİN İKİNCİL YAPI ANALİZLERİ

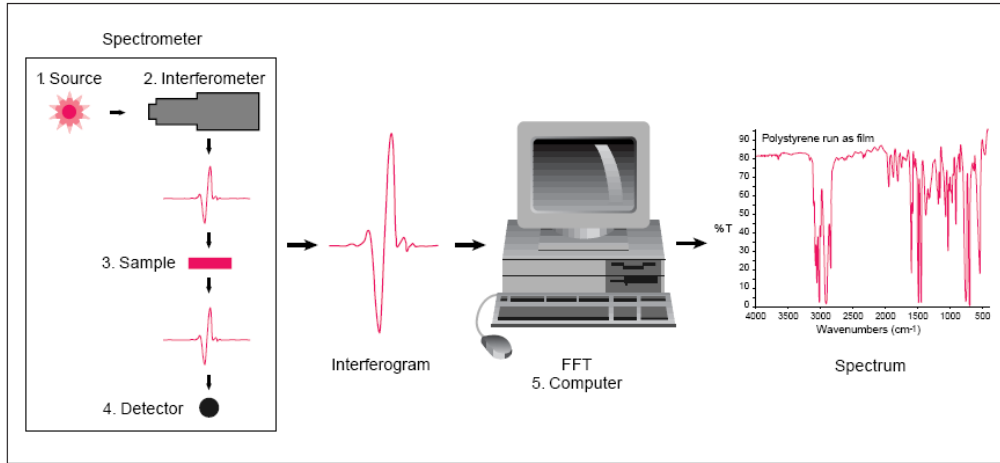
## FOURIER DÖNÜŞÜMSSEL KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ

### A. BİLGİ

Spektroskopi, çeşitli tipte ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı için kullanılan genel bir terimdir. Kızılötesi (IR) spektroskopisi de bunlardan biridir. IR spektroskopisi, IR ışınının moleküller üzerinde oluşturduğu titreşimlerin neden olduğu karakteristik frekans değerlerinin kullanılması ile moleküler düzeyde madde analizi yapılmasını sağlar. Bu titreşim şekilleri bağ açısına (makaslama, salınma, burkulma vb.) ve uzunluğuna (simetrik ve asimetrik gerilme) göre farklılık gösterebilir ve bu farklar da frekans değerlerine yansır.

Fourier dönüşüm (FT) matematiksel bir işlem olup, bir sinyal fonksiyonunun zaman serileri şeklindeki gösteriminin bazı algoritmalar ile, matematiksel olarak analiz edilebilecek frekans spektrumuna dönüştürülmesidir .

Bir kızıl ötesi spektroskopi cihazı temel olarak üç kısımdan oluşur: ışık (IR) kaynağı, interferometre ve algılayıcı (dedektör). Bunlara ek olarak ışın ayırıcı, örnek yüklenen bölüm ve verilerin işlendiği bilgisayar kısımları da vardır (Şekil 1).



Şekil 1. Temsili bir FT-IR sisteminin temel kısımları.

Bir IR spektrumu elde etmek için örneğe IR ışığı gönderilir. Bir molekülün IR ışığını soğurabilmesi için, molekülün titreşimi sonucunda molekülün doğal dipol momentinde net bir değişikliğin olması gerekir. Örneğe iletilen ışığın ne kadarının belli bir enerjide soğurulduğuna bakılır. Soğurma spektrumunda bir sinyalin (bandın) elde edildiği enerji, örnek molekülün titreşim frekansını verir (Toyran 2008).

FT-IR ile direkt olarak atomik düzeyde bilgiye ulaşıldığından, moleküllerde meydana gelen çok küçük değişimler bile tespit edilebilmektedir. Belli moleküller kızılötesi ışığa maruz kaldıklarında (lipid, protein, karbonhidrat vs.) belirli frekanslarda ( $\text{cm}^{-1}$ ) verdikleri moleküler bağ titreşimi sinyalleriyle karakterize olurlar. Bu sinyaller üzerinden farklı koşullardaki değişim FT-IR ile rahatlıkla izlenebilir.

Bu tekniğin özellikle proteomik çalışmalar için önemli olan bir diğer özelliği de proteinlerin ikincil yapı değişimlerinin hassas olarak incelenebilmesidir. Bu analizler çoğunlukla FT-IR spektrumunda  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  frekans aralığında bulunan Amid I bandı üzerinden gerçekleştirilir. Bu amaçla araştırmacıların kendi geliştirdikleri teknikler de vardır ancak bazı dezavantajları da bulunmakla beraber, genel olarak kabul gören ve programlar aracılığıyla ticari olarak da ulaşılabilen yöntem eğri-uyum (curve-fitting) yöntemidir. Bu yöntemle Amid I bandı altında kalan her biri farklı bir ikincil yapıyı temsil eden alt bantlar belirlenmektedir.

FT-IR spektroskopisi ile çok çeşitli tiplerdeki örnekler çalışılabilir. Farklı örnek yükleme aparatları sayesinde katı, sıvı veya gaz örneklerin ölçümleri yapılabilir. Ayrıca örnek hazırlanması çok masraflı olmayıp ölçümlerin çok kısa sürelerde yapılması nedeniyle de rutin kullanıma çok uygundur. Örneklerin ölçülmesinde yaygın olarak üç yöntem kullanılır: ATR yöntemi (katı veya sıvı örnekler için), KBr pellet yöntemi (katı örnekler için) ve çözelti yöntemi (sıvı örnekler için).

Elde edilen verilerin analizi FT-IR spektroskopisi tekniğinin en önemli aşamasıdır ve uzun zaman alabilir. Analizler için öncelikle üç tekrarlı olarak ölçülmüş örneklerin ortalama spektrumu elde edilir. Analizlerde spektrumlar, normalizasyon, gürültü giderimi, türev alma gibi işlemlere tabi tutulurlar. Karşılaştırmalı analizlerde bantların altlarında kalan alanlar integrasyon ile hesaplanır ve göreceli olarak miktardaki farklılıklar belirlenir. Ayrıca kümeleme analiziyle örneklerin birbirlerine olan yakınlıkları belirlenerek gruplama yapılır ve çeşitli maddelerin fizikokimyasal karakterizasyonları yapılabilir.

## **B. UYGULAMA**

Karaciğer doku örneğinin ölçülmesi (ATR).

Sıvı karaciğer lizatının ölçülmesi (ATR).

Spektrumun yorumlanması ve bazı temel analizler (OPUS programıyla).

Hazır spektrumlar üzerinden kümeleme analizi yapılması (OPUS programıyla).

### **Bruker Tensor FT-IR cihazının kullanımı:**

1. Sıvı azot ile MCP dedektör soğutulur. Bunun için; özel huni dedektöre sokulur ve sıvı azot yavaş yavaş dökülür. Sinyal sesi duyulduğunda ve cihazın üzerindeki "Status" ışığı kırmızıdan yeşile döndüğünde dedektör yeteri kadar soğumuş demektir. Ancak daha uzun süre çalışabilmek için yeşil ışık yandıktan sonra da dedektör tamamen sıvı azotla dolana kadar koyulmaya devam edilir. Azot koyulurken mutlaka özel eldiven giyilmeli,

gözlük takılmalı ve buharlaşan gaz solunmamalıdır. Dedektörün dengelenmesi için 15-20 dakika beklenir.

2. Örneğin tipine göre (katı veya sıvı) uygun olan örnek yükleme aparatı cihaza takılır ve kapak kapatılır. Cihazın yanındaki “N<sub>2</sub>” (azot) gazı önce tüpün üstündeki vanasından açılır ve daha sonra tüpe bağlı olan regülatörün altındaki vana saat yönünün tersine doğru sıkıştırılarak gazın geçişi sağlanır. Örnek yükleme aparatına gazın dolması için 5-10 dakika beklenir. Çekimler esnasında gaz sürekli açık kalır.
3. Bilgisayardan OPUS programına girilir ve genel çekimler için programın “Advanced Measurement” kısmı kullanılır.
4. Örnek yükleme aparatı ATR ise kristalin olduğu bölge alkol ve kalıntı bırakmayan peçete ile temizlenir ve kapak tekrar kapatılır.
5. Öncelikle herhangi bir örnek koymadan “Background Single Channel” tıklanarak boş hava çekilir ve işlem tamamlanana kadar beklenir. Arkaplan (background) çekimine ait spektrum ekranda gösterilmez, örnek spektrumundan otomatik olarak çıkarılır.
6. Arkaplan çekimi tamamlandıktan sonra örnek koyularak kapak kapatılır. “Sample Single Channel” tıklanır ve spektrum penceresinde “Start Measurement” butonuna basılarak çekim başlatılır.

## **Kaynaklar**

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.