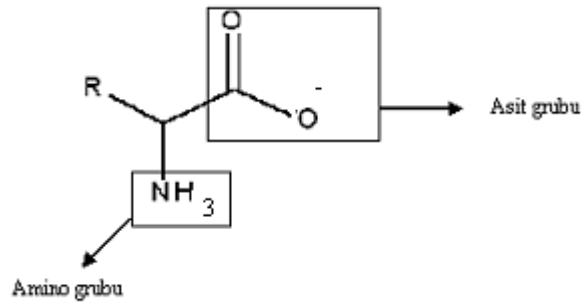


## AMİNO ASİT VE PROTEİNLERİN KALİTATİF, KANTİTATİF YÖNTEMLERİ

Amino asitler; katı, renksiz, suda çözünen fakat organik çözücülerde çözünmeyen biyomoleküllerdir. Erime noktaları çok yüksektir, uçucu değildir. Bu nedenle erime noktalarının üzerinde ısıtırlarsa bozunurlar. Amino asitler sulu çözeltilerinde iç tuz olarak bilinen, iyonlaşmış halde bulunurlar.

Amino asitlerin “standart amino asitler” olarak bilinen 20 tanesi, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir. Standart amino asitler, aynı karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler. Amino asitler R yan gruplarının polaritesine göre veya biyolojik pH’de su ile etkileşme özelliklerine göre (asidik, bazik) sınıflandırılabilirler.

“Standart olmayan amino asitler” ise standart amino asitlerin protein yapısına girdikten sonra yapılarının değişmesi sonucu oluşurlar.



Şekil 1. Amino asitlerin genel formülü

### 1 .Amino Asitlerde İzoelektrik Nokta

Amino asitler yapılarında bulunan amino (-NH<sub>2</sub>) ve karboksil (-COOH) grupları nedeniyle hem asit hem de baz özelliği taşırlar. Yani asidik ortamda baz, bazik ortamda asit gibi davranmaları nedeni ile amfoterik maddelerdir.Çözeltideki bir amino asit molekülü üzerinde net yükün sıfır olduğu pH değeri, **izoelektrik nokta (pI)** olarak adlandırılır ve her aminoasit için spesifik bir değerdir.

$$pH = pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

Asit –baz titrasyonu, protonların derece derece ilavesini veya ayrılmasını kapsar.

**Glisin**, (Gly ya da G) formülü  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  olan apolar bir aminoasittir. Yapısal olarak proteinlerde bulunan 20 amino asit arasında en basit olanıdır. Yan zincirinde sadece bir hidrojen atomundan bulunur. Glisindeki  $\alpha$ -karbon atomu da bir hidrojene bağlı olduğu için, glisin optikçe aktif değildir, diğer bir deyişle optik izomeri bulunmamaktadır. Çok düşük pH'de, glisinin hakim olan iyonik formu  $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$  yani tamamen protonlanmış formudur. Herhangi bir titrasyonda, titre olmaya başlayan protonlanmış grubun  $\text{pK}_a$  değerinin pH'ye eşit olduğu yerde orta noktaya ulaşılır. Glisin için orta noktada pH 2.34'tür. Glisin titrasyonunda bir diğer önemli nokta pH'nın 5.97'ye ulaştığı noktadır. Bu noktada ilk protonun ayrılması tamamlanmış ve ikincisinin ayrılması başlamıştır. Titrasyonun ikinci evresi glisinin  $-\text{NH}_3^+$  grubunun protonunu kaybeder ve ortamın pH'sı  $-\text{NH}_3^+$  grubunun  $\text{pK}_{a2}$  değerine eşittir.

**2. Proteinler**, Proteinler, amino asitlerin, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent ve kovalent olmayan bağlar ile bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir.

**Peptitler**, bir amino asidin  $\alpha$ -karboksil grubu ile diğer amino asidin  $\alpha$ -amino grubu arasında bir molekül  $\text{H}_2\text{O}$  çıkması ile meydana gelen peptit bağları ile oluşurlar.

İki amino asitten dipeptit, üç amino asitten tripeptit, 10'a kadar olan amino asitten oligopeptit, daha çok amino asitten ise polipeptit meydana gelir.

Proteinlerde birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapı olmak üzere dört yapı bulunur.

Proteinlerin metabolizmadaki görevleri şu şekilde sıralanabilir;

- (1) Proteinler organların ve yumuşak dokuların yapı unsurudur,
- (2) Büyüme ve erginlik dönemlerinde yeni dokuların oluşumunda etkindirler,
- (3) Yıpranan dokuların onarılması işlevine sahiptirler,
- (4) Enzimlerin ve hormonların yapılarında bulunurlar,
- (5) Sinirsel uyarıların iletiminde rol oynarlar,
- (6) Canlıya destek olma ve hareket olanağı sağlamada görev alırlar,
- (7) Vücudun hastalıklara karşı dayanıklılığında ve hastalık etkenlerine karşı korunmada kullanılırlar,
- (8) Oksijen ve diğer maddelerin vasküler yolla taşınmasında görev alırlar,
- (9) Kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar,
- (10) Su ve elektrolit dengesinin korunmasında doğrudan ya da dolaylı olarak görevleri vardır.

Patolojik hallerde idrarda en çok rastlanan protein türü albumin olduğundan klinikte idrarda protein varlığını ifade eden "proteinüri" terimi yerine çoğu kez "albuminüri" terimi kullanılır.

## 2.1. Kan Proteinleri

Kan plazması, %91 su, %8 organik maddeler ve %1 inorganik maddelerden oluşur. Organik bileşenlerin tamamına yakını, proteindir. Plazmanın üç temel proteini albumin, globulin ve fibrinojendir. 100 mililitre plazmada 4.5 g albumin, 2.5 g globulin ve 0.3 g fibrinojen bulunur.

**Albümin:** Latince "albus" (beyaz) sözcüğünden gelen "albumen" (yumurta beyazı) sözcüğünden türemiştir. Serumda bulunan en yaygın protein de bu özellikleri taşıdığından "serum albümini" adı verilmiştir. Kanın osmotik basıncının dörtte üçünü albümin sağlar. Osmotik basınç sayesinde kan-plazma oranı korunur. Albümin karaciğerde üretilir. Kan proteinlerinin %60'ını oluşturur.

**Globulin:** Plazma globulinlerinin birçok farklı türü vardır. Elektroforez metoduyla globulinler  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - türlerine ayrılabilir.

**Fibrinojen:** Kan pıhtılaşma mekanizmasının en son basamağında görev alır. Fibrinojen molekülleri fibrin liflerine dönüşerek pıhtılaşma meydana gelir.

## 3.Kromatografi

Kromatografi, özellikle fiziksel ve kimyasal nitelikleri çok benzeyen maddelerin ayrılma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kromatografi tekniğinin temel prensibi, bir karışımdaki çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilmeleri ve bu geçiş sırasında farklı hızlarla hareket etmesi esasına dayanır.

- Sabit faz: "Katı" veya "katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı tabakasından" oluşur.
- Hareketli faz: Bir "sıvı" veya "gazdan" oluşur.

**Kağıt Kromatografisi;** Bu yöntemde kalın bir süzgeç kağıdı destek; ve gözeneklerine yerleşen su ise, sabit "sıvı fazı" oluşturur. Hareketli faz bir yürütücü tank içine yerleştirilmiş uygun bir sıvı ya da sıvı karışımıdır.

Kağıt üzerinde ilerleyen çözücü, karışımdaki bileşenleri bunların sabit faza olan ilgileri ile ilişkili olarak farklı hızlarla sürükler ve birbirinden ayırır. Kağıt veya lehva üzerinde, belli bir süre sonra, bileşenlerin yol aldığı uzaklık ile çözücünün ulaştığı uzaklığın oranı, "Rf değeri" olarak bilinir ve bu değerler kalitatif analizde kullanılır.

#### 4. Deneysel Çalışmalar

##### 4.1. Amino Asitlerin Kalitatif Tayinleri

###### Deney.4.1.1. Ninhidrin Reaksiyonu

**Deneyin prensibi:** Amino asitlerin, ninhidrin ile mor renkli kompleks oluşturmaları prensibine dayanır.

###### Deneyin yapılışı:

**I.Aşama (yumurta albumini çözeltilsinin hazırlanışı):** 1 adet yumurta akı 250 mL'lik bir behere alınır, üzerine 100 mL distile su ilave edilir. Çok kısık alevde kaynatılır. Bu esnada yumurta akında bulunan avimisin çöker. Soğuduktan sonra üstteki çözelti kullanılır.

**II. Aşama:** Yumurta albumini çözeltilsinden bir deney tüpüne 2 mL alınır, 0.5 mL ninhidrin çözeltisi ilave edilir. Kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir. Tüp soğumaya bırakılır ve mavi-menekşe rengin oluşumu gözlenir.

###### Çözeltiler:

**Ninhidrin çözeltisi:** Etil alkolde %0.1'lik ninhidrin çözeltisi hazırlanır.

###### Deney 4.1.2. Ksantoprotein Deneyi

ninhidrin

**Deneyin prensibi:** Fenilalanin, tirozin, triptofan gibi aromatik halka içeren aminoasitler ve proteinlerin nitrik asit ile nitrolanarak sarı renk oluşturması, oluşan sarı renkli türevin baz ilavesi ile portakal rengine dönüşmesi esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** Bir deney tüpüne 2 mL yumurta albumini çözeltisi alınır, üzerine dikkatlice 1 mL derişik nitrik asit ilave edilir, karıştırılır ve beyaz renkli çökelek oluşumu gözlenir. Tüp su banyosunda sarı renkli bir çökelek oluşuncaya kadar ısıtılır. Daha sonra musluk suyu altında soğutulur. Damla damla %33 lük NaOH ilave edilerek, çökeleğin renginin sarıdan portakala dönüşümü gözlenir.

### **Deney 4.1.3. Biüre Deneyi**

**Deneyin prensibi:** Peptit bağları nedeni ile proteinlerin  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları ile bazik ortamda karakteristik menekşe renkli kompleksler vermesi esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** Bir deney tüpüne 3 mL yumurta albumini çözeltisi alınır. Üzerine 1 mL 2.5 N NaOH ilave edilerek karıştırılır. 2-3 damla  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi damlatılıp tekrar karıştırılır. Menekşe rengin oluşumu gözlenir.

#### **Çözeltiler:**

**2.5 N NaOH:** 10 g NaOH tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

**0.01 M  $\text{CuSO}_4$ :** 0.16 g  $\text{CuSO}_4$  tartılarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

### **Deney 4.1.4. Kağıt Kromatografisi ile Amino Asitlerin Kalitatif Tayini**

**Deneyin prensibi:** Çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** Whatman kromatografi kağıdı üzerine kısa kenardan 2 cm içeriden olacak şekilde kurşun kalemle hafifçe bir çizgi çizilir (başlangıç çizgisi). Bilinmeyen amino asit karışımını içeren örneklerden belirli bir miktar damlatılır ve kurutulur. Bu şekilde hazırlanan kurutulmuş kromatografi kağıdı başlama çizgisi dışarıda kalacak şekilde çözücü sistemine daldırılır. Çözücü sistem yürütüldükten sonra kağıt çözücü sistemden çıkartılarak tekrar kurutulur. Kurutma işlemi sonrası üzerine ninhidrin püskürtülür ve 70-80°C lik etüvde, ayrılan amino asit lekeleri oluşuncaya kadar bekletilir. Lekeler işaretlenir ve her madde için  $R_f$  değeri hesaplanır.

#### **Çözeltiler:**

**Arginin çözeltisi:** 5 mg/mL'lik çözeltisi

**Prolin çözeltisi:** 5 mg/mL'lik çözeltisi

**Fenilalanin çözeltisi:** 5 mg/mL'lik çözeltisi

**Çözücü:** n-butanol/asetik asit/su (16:4:20)

**Ninhidrin:** %0.3'lük asetonadaki çözeltisi

### **Deney 4.1.5. Glisin'in İzoelektrik Noktasının Tayini**

**Deneyin yapılışı:** 20 mL 0.1 N Glisin çözeltisinden 10 mL bir behere alınarak pH metre yardımı ile pH ölçülür. Daha sonra 0.1 N HCl ile titre edilir. Her 1 mL asit ilavesinden sonra pH ölçümü yapılır. İşleme pH göreceli olarak sabit kalıncaya kadar devam edilir. Daha sonra 0.1 N NaOH ile titre edilir. Her 1 mL baz ilavesinden sonra pH ölçümü yapılır. İşleme pH göreceli olarak sabit kalıncaya kadar devam edilir.

Milimetrik grafik kağıdı kullanarak x eksenine eklenen asit ve eklenen baz hacmini, y eksenine ise ölçülen pH değerleri yazılarak grafik çizilir ve grafikten pKa, pKb ve pI değerleri bulunur.

#### **Çözeltiler:**

**0.1 N Glisin çözeltisi:** 0.710 g glisin tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

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

**0.1 N HCl:** %37 lik HCl çözeltisinden 0.8 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanır.

## **4.2. Amino Asitlerin Kantitatif Tayinleri**

### **4.2.1. Lowry (Folin-Fenol) Yöntemi**

**Deneyin prensibi:** Alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu proteinlerdeki peptit bağları ile bir kompleks oluşturur ve  $\text{Cu}^{+}$  e indirgenir. İndirgenen bakır ve proteinlerin yan zincirinde bulunan Tirozin, Triptofan ve Sistein aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti de protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

**Deneyin yapılışı:** BSA ile tabloya göre hazırlanan standart çözeltiler 30 dk bekleddikten sonra oluşan mavi rengin yoğunluğu 750 nm de ölçülür. Metodun hassasiyeti yaklaşık 10-200  $\mu\text{g}$  protein/mL'dir.

Standartların  $A_{750}$  değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizilerek bilinmeyen numunenin konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bulunur.

### Standart kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Tüp	Standart protein mL	H <sub>2</sub> O mL	Low. Reak. (C)	Low. Reak. (D)
Kör	0.00	0.50	2.5	0.25
Standart 1	0.10	0.40	2.5	0.25
Standart 2	0.15	0.35	2.5	0.25
Standart 3	0.20	0.30	2.5	0.25
Standart 4	0.25	0.25	2.5	0.25

### Numunenin konsantrasyonunun belirlenmesi

Tüp	Numune mL	H <sub>2</sub> O mL	Low. Reak. (C)	Low. Reak. (D)
Numune	0.20	0.30	2.5	0.25

#### Çözeltiler:

**Standart protein:** 0.4 µg BSA / mL

**Lowry reaktif (A):** 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1L 0.1 N NaOH (4 g NaOH/L) içerisinde çözülür. 4°C'de polietilen şişede saklanır.

**Lowry reaktif (B<sub>1</sub>):** 2 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 100 mL H<sub>2</sub>O 4 °C'de saklanır.

**Lowry reaktif (B<sub>2</sub>):** 2 g NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O 100 mL H<sub>2</sub>O 4 °C'de saklanır.

**Lowry reaktif (C):** B<sub>2</sub>: B<sub>1</sub>: A 1:1:100 oranında karıştırılır (Taze hazırlanmalıdır).

**Lowry reaktif (D):** 2 N Folin reaktifi su ile 1 N'e seyreltilir (Koyu renkli şişede saklanır).

#### 4.2.2. Biüre Deneyi

**Deneyin prensibi:** Bazik ortamda Cu<sup>2+</sup> iyonlarının amonyumlu bileşiklerle (amino asitler, peptitler, proteinler ve biüre) mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** Üç adet deney tüpü alınır. Bunlar, kör, standart ve örnek tüpleri olarak işaretlenir ve aşağıdaki gibi hazırlanır.

Çözeltiler	Kör	Standart tüpü	Örnek tüpü
Standart çöz.	-	0.1 mL	-
Çalışma çöz.	5 mL	5 mL	5 mL
Serum	-	-	0.1 mL

Tüpler ayrı ayrı karıştırılır, 30 dk oda sıcaklığında bekletilir ve spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda optik yoğunluklar ölçülür (Rengin kalıcılığı 30 dk'dır).

**Hesaplama:**

$$\text{g/L protein} = \frac{\text{OD örnek}}{\text{OD standart}} \times 100$$

**Çözeltiler**

**Standart çözelti:** Kazeinin sodyum tuzu (100 g/L)

**Bazik ayıraç:** 9 g sodyum potasyum tartarat, 0.2 g sodyum hidroksit ve 5 g potasyum iyodür 1 L suda çözünür.

**Renk ayıracı:** Bakır sülfat çözeltisi (150 g/L)

**Çalışma çözeltisi:** 5 mL renk ayıracı 1 L bazik ayıraç ile tamamlanır.



## KAYNAKLAR

- (1) [www.cerlabs.com](http://www.cerlabs.com), Qualitative testing for amino acids and proteins
- (2) [www.chemistry-ccsu.edu](http://www.chemistry-ccsu.edu), Ninhydrin test page
- (3) [www.Library.cu.edu](http://www.Library.cu.edu)
- (4) Enstrumental Analiz Hacettepe Üniversitesi Yayınları A.Yıldız Ö.Genç
- (5) [www.aof.anadolu.edu.tr](http://www.aof.anadolu.edu.tr)
- (6) [www.biyologlar.com](http://www.biyologlar.com), Amino asit tanıma reaksiyonları
- (7) Amino acid review ([hcc.mnscu.edu/amino.acid](http://hcc.mnscu.edu/amino.acid) structure).
- (8) Biyokimya Laboratuvarı I (Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü  
Biyokimya Anabilimdalı)
- (9) Journal of Biological Chemistry 193: 265-27
- (10) Biochemistry Laboratory Manual Second Edition Middle East Technical University  
Department Of Biological Sciences Ankara-2008