

Biyokimya Laboratuvarı

Hikmet Geçkil

1. Hafta: Giriş ve Bilimsel notasyon
- 2 Hafta: Temel kavramlar
3. Hafta: Tamponlar, asit-baz ve pH kavramı
4. Hafta: Amino Asitler ve asit-baz özellikleri
5. Hafta: Proteinler, kalitatif ve kantitatif çalışmalar
6. Hafta: Protein Pürifikasyonu I: Tayinler, Spesifik Aktivite, Fraksiyasyon

Hikmet Geçkil
İnönü Üniversitesi
Biyoloji Bölümü



1. Hafta: Giriş ve Bilimsel notasyon

Bilim insanları çoğu zaman çok büyük veya çok küçük yapılarla uğraşırlar. Ör. Bizler gibi biyolojik bilimlerle uğraşan insanlar metrenin milyonda biri olan hücrelerle uğraşırken, bir astronom genellikle milyar yıldız veya milyarlarca ışık yılı uzaktaki bir gök cisminde bahseder. Kısaca, bilim adamları hem çok büyük ve hem de çok küçük rakamlarla uğraşmak zorundadırlar.

Bu nedenle bilim adamları böyle rakamları “bilimsel notasyon” denen bir düzenleme ile gösterirler. Böylece, yazılması ve işlem yapılması zor rakamlar daha kolay bir kullanıma kavuşturulur

Bilim adamları çoğu zaman çok küçük veya çok büyük sayılarla çalışmak zorundadırlar. Bu nedenle, rakamların daha anlaşılır formlara dönüştürülerek ifade edilmesi gerekir. Bunun için bilim adamları bu çok büyük veya çok küçük rakamları üslü şekilde göstermeyi tercih ederler. Örn., 300,000,000 m/saniye. Bildiğiniz gibi bu ışığın yaklaşık hızıdır. Ancak, bilim adamları, bu değeri 3×10^8 m/saniye olarak göstermeyi tercih ederler. Bir başka örnek, 6,000,000,000 baz çifti. Bu insan hücresindeki 46 kromozomu yapan toplam baz çifti (A-T, G-C) sayısıdır ve bilimsel notasyonda 6×10^9 baz çifti olarak ifade edilir. Yine, 0.0000001 M hidrojen iyonu. Bu saf udaki hidrojen iyonu konantrasyonu olup 1×10^{-7} M olarak ifade edilir. Daha yaygın bir örnek olarak Avagadro sayısını 602,000,000,000,000,000,000 verebiliriz. Bu sayının bilimsel notasyonu basitçe $6.02(10)^{23}$ şeklindedir. Bir bardak suyun (yaklaşık 250 ml) bundan 10 kat daha fazla molekül içerdiğini düşünürsek, bu rakamın bu bağlamda o kadar da büyük olmadığını görürüz. Ancak, her biri 1 mm kalınlığında olan demir paralardan $6.02(10)^{23}$ dik olarak arka arkaya dizdiğimizde bir başından diğer başa gitmenin yaklaşık 150,000 ışık yılı alacağını hesapladığımızda ise bu rakamın oldukça büyük olduğu ortaya çıkar. Tüm evrende 10^{85} adet molekül bulunduğu kabul edilmektedir!!!!. Rakamlar bizler için bazen çok büyük bazen ise çok küçük görünebilirler. Örneğin, 1 yılda saniye hızı ile sürekli sayı sayarsak en fazla kaç kadar sayabileceğimizi bir düşünün! 20 dakikada bir bölünen bir bakteri uygun ortamda 24 saatte kaç bakteriye çoğalır?

Diğer bir deyimle bilimsel notasyon ondalık bir sayının en az 1 ve 10’dan küçük bir sayının 10 üslü bir sayı ile çarpımıdır. Örneğin, aşağıdaki sayıların hepsi esasen aynı şeyi ifade eder:

541.312
 54.1312×10^1
 5.41312×10^2
 0.541312×10^3
 0.0541312×10^4

Her birinde ondalık kısmı bir geriye çektik ve 10 üssünü ise 1 büyüttük. Ancak, burada tercih edilen gösterim şekli 5.41312×10^2 ’dir.

Örneğin, 11,000,000,000,000 ila 0.00000000003’ü çarptığımızı düşünelim. Bu rakamların bu şekilde yazılarak çarpılması hesap makinesinde bile zaman alacak ve dikkatsiz bir giriş sonucun hatalı olmasına sebep olacaktır. Halbuki, bu sayıları önce bilimsel notasyona çevirir daha sonra biri biri ile çarparsak, işlemi kısaltmış ve aynı zamanda doğru yapmış oluruz. Burada, ilk sayıda birden sonra 13 basamak olduğundan 1.1×10^{13} şeklinde, ikinci sayıda ise kesirden sonra 11 basamak olduğundan 3×10^{-11} şeklinde belirtebiliriz. Bu iki rakamın çarpımı ise 3.3×10^2 olacaktır.

Kesirli sayıların uygun ifadesi

0.341 için en yakın onluk ifadesi 0.3 iken, bu sayının en yakın yüzölçüm ifadesi 0.34 olacaktır. 0.346 için ise en yakın yüzölçüm ifadesi 0.35 olacaktır. 0.362 için en yakın onluk ifadesi ise 0.4 olacaktır.

Ondalık kesirlerde, kesirden sonraki rakamların önemi

0.3451 sayısında ondalık kesirden sonra 4 rakam vardır. Bu rakam 0.345 olarak ifade edilebileceği gibi 0.35 olarak da gösterilebilir. İhmal edilen kısım 0.3451'in % 2'sinden azdır ki bu da istatistiksel bir değere sahip değildir.

Ör.

$1=10^0$; $10=1 \cdot 10^1$; $100=1 \cdot 10^2$; $1000=1 \cdot 10^3$; $1,000,000,000=1 \cdot 10^9$; $125,000,000=1.25 \cdot 10^8$ şeklinde ifade edilebilir. Böylece çok büyük sayılar daha kabul edilebilir bir formda yazılabilir.

Benzer şekilde,

$0.1=10^{-1}$; $0.01=1 \cdot 10^{-2}$; $0.001=1 \cdot 10^{-3}$; $0.000000001=1 \cdot 10^{-9}$; $0.0000000125=1.25 \cdot 10^{-8}$ şeklinde ifade edilebilir.

10^{-5} aynı zamanda $1/10^5$ şeklinde yazılabilir

Bilimsel notasyonda üslü sayıların çarpımı: $(N \cdot 10^x) (M \cdot 10^y) = (N) (M) \cdot 10^{x+y}$

Örnek 1. $3 \cdot 10^4$ ile $1 \cdot 10^2$ sayısını çarpalım,

$(3 \cdot 10^4) (1 \cdot 10^2)$,

$3 \cdot 1=3$

$(10^4) (10^2) = 10^{4+2} = 10^6$

$3 \cdot 10^6$

Örnek 2. $(4 \cdot 10^3) (2 \cdot 10^{-4}) = ?$

$8 \cdot 10^{3+(-4)} = 8 \cdot 10^{-1}$

Bilimsel notasyonda üslü sayıların bölünmesi: $N \cdot 10^x / M \cdot 10^y = N/M \cdot 10^{x-y}$

Örnek 1. $6 \cdot 10^5 / 2 \cdot 10^2 = ?$

$6/2 = 3$

$10^5 / 10^2 = 10^{5-2} = 10^3$

$3 \cdot 10^3$

Örnek 2. $8 \cdot 10^{-3} / 2 \cdot 10^{-2} = ?$

$8 / 2 = 4$

$10^{-3} / 10^{-2} = 10^{-3-(-2)}$

$4 \cdot 10^{-1}$

Bilimsel notasyonda üslü sayıların toplanması: $(N \cdot 10^x) + (M \cdot 10^x) = (N + M) \cdot 10^x$

Örnek 1. $(2.3 \cdot 10^{-2}) + (3.1 \cdot 10^{-3}) = ?$

Burada sayıların üslerinin eşit olmadığını görüyoruz. Bu nedenle, ya birinci sayıya ait -2 üssü -3 ya da ikinci sayıya ait -3 üssü -2'ye çevrilmelidir. Bu örneğimizde ilk sayının -2 üssünü -3 yapmamız için bilimsel notasyondan şu ana kadar öğrendiklerimizden $2.3 \cdot 10^{-2}$ değerini $23 \cdot 10^{-3}$ şeklinde yazabiliriz.

Böylece,

$(23 \cdot 10^{-3}) + (3.1 \cdot 10^{-3}) = (23 + 3.1) \cdot 10^{-3} = 26.1 \cdot 10^{-3}$

Örnek 2. $(2.3 \times 10^2) + (3.1 \times 10^3) = ?$
 $(0.23 \cdot 10^3) + (3.1 \cdot 10^3)$
 $3.33 \cdot 10^3$

Bilimsel notasyonda üslü sayıların çıkarılması: $(N \cdot 10^y) - (M \cdot 10^y) = (N - M) \cdot 10^y$

Örnek 1. $(4.2 \cdot 10^4) - (2.7 \cdot 10^2) = ?$
 $2.7 \cdot 10^2 = 0.027 \cdot 10^4$
 $4.2 - 0.027 = 4.173$
 $4.173 \cdot 10^4$

Örnek 2. $(4.2 \cdot 10^{-4}) - (2.7 \cdot 10^{-2}) = ?$
 270×10^{-4}

Örnek 3. $(5.29 \cdot 10^6)(1.17 \cdot 10^{-4})/2.35 \cdot 10^{-2}$
 $(5.29) \cdot (1.17)/2.35 = 2.63$
 $106 \cdot 10^{-4}/10^{-2} = 10^4$
 $2.63 \cdot 10^4$

2 Hafta: Temel kavramlar

Biyokimya biyolojik molekullerin yapılarını, birbiri ile olan ilişkisini ve transformasyonlarını çalışarak bir bilim dalıdır. Diğer bir deyimle bu bilim dalına **hayatin kimyası** diyebiliriz. Butun canlı organizmalar cansız molekullerden oluşmuşlardır. Bu molekuller tek tek izole edilip araştırılırlarsa, cansız maddenin özelliklerini gösterdikleri gözlenir. Ancak, bu molekullerin canlı organizmalardaki dizinimi cansızlardaki gelişigüzelinin tersine, oldukça mükemmeldir. Dolayısı ile canlı organizmaları cansız maddelerden ayıran özelliklerin basında, canlıların yapı olarak karmaşık ve oldukça organize olmaları gelir. Canlılar oldukça hassas iç dengelere ve bir çok çeşitte kompleks moleküllere sahiptirler. Tersine, cansız madde (toprak, kaya, su, hava, vb.) genellikle birkaç basit bileşimden oluşur. İkinci en önemli özellik, canlılar çevrelerinden enerji (besin veya güneş enerjisi şeklinde) alıp kullanır ve başka bir enerji çeşidine çevirebilirler. Böylece, canlı sistem organize yapısını enerji harcayarak sağlar ve korur (ölünceye kadar). Cansızların böyle bir durumu söz konusu değildir ve sürekli yıkım, asınma sonucu çevre ile denge haline girer. Canlıların üçüncü ve en önemli özelliği kendi kendilerine çoğalma ve bir yapı oluşturmalarıdır. Uygun bir besi ortamına konan tek bir bakteri hücre 24 saat sonra 1,000,000,000 (1×10^9 , bir milyar) benzer yavru hücre oluşturabilir. Her hücre, kimisi oldukça kompleks binlerce farklı molekül içerir ve bunların hepsi en fazla kullanılan tek hücrenin genetik yapısından orijin almışlardır. Cansızlarda üreme ve büyüme diye bir şey söz konusu olmaz. Kristaller her ne kadar zaman içinde büyürlerse de, bunların yapısı statik olup, canlılardaki gibi dinamik değildir.

Bir canlı organizmadaki her komponent özel bir fonksiyona sahiptir. Bu durum sadece yaprak, kalp, dalak gibi makroskopik yapılar için değil, nükleus, kloroplast, mitokondri gibi mikroskopik yapılar için de geçerlidir. Mikroskopik ve makroskopik yapıyı oluşturan molekullerin belli bir program içinde hareket etmeleri, canlının oluşumu, çoğalması için bir gerekliliktir.

Biyokimya aynı zamanda kantitatif yani hesaplamalara ve sayılara dayanan bir bilimdir. Biyolojik bilimlerde kullanılan bir çok ölçme, hesaplama metodları Biyokimya dersi ve Biyokimya laboratuvarlarında öğretilir ve uygulamaları yapılır. Hemen bütün biyologlar çalışmalarının en azından bir bölümünde bu metodlardan yararlanırlar. Biyolojik molekullerin (amino asit, nükleotid, protein, nükleik asit, karbohidrat, lipid gibi) nitelik (kalitatif) ve nicelik (kantitatif) analizlerinin en yoğun işlendiği ders Biyokimya ve laboratuvarıdır.

Bir kere yukarıda sayılan biyomoleküller hücre gibi bir yapıda bulunduklarından hem boyutları küçüktür ve hem de hücre içi konsantrasyonları oldukça küçük birimlerle ifade edilir. Bu tür moleküllerle çalışırken, genellikle gözle görülebilecek veya gramlarla ölçülecek birimler kullanılmaz. Canlıyı yapan en büyük molekül olarak hücreyi kabul etsek bile (hücre bir molekül değildir) yine de gözle görülemeyeceğini biliriz. Hücreler çeşitli büyüklüklerde olsalar da, bunların ciplak gözle görünmeleri mümkün değildir. (Bakteri hücreleri hayvan veya bitki hücrelerinden yaklaşık 100 kat daha küçüktür). Bir bakteri hücre 1 mikroskop altında yaklaşık 1000 kez büyütülerek ancak görülebilir. Moleküller bir araya gelerek hücreyi, hücrelerde bir araya gelerek organizmayı oluşturur (örneğin ergin bir insanda yaklaşık 100 trilyon yani 10^{12} çekirdekli hücre vardır). Ancak, illa da bir canlı hücreler topluluğundan oluşur diye bir kaidе yoktur. Bir protozoonun (örneğin, paramesyum) veya bir bakterinin (örneğin, *Escherichia coli*) her hücre 1 bagimsiz bir canlı varlıktır (aynen bizler gibi).

Şimdi, biyokimyada en yaygın kullanılan bazı birim ve trimler üzerinde duralım. Başlangıç olarak, şu ana kadar bahsettiğimiz **mol** ve **molekül** terimlerini açıklayalım. Biyokimyasal anlamda moleküller (belli spesifik atomların elektron paylaşımı ile yani kovalent bağlarla bir arada tutulduğu yapılar) soluduğumuz oksijen (O_2) gibi küçük bir yapıdan amino asitlere, nükleotidlere ve hatta protein ve nükleik asitler gibi yapılar için kullanılır. Mol terimi de aynı yapılar için kullanılır. Ancak mol moleküle göre çok daha büyük bir niceliği ifade eder ve her maddenin bir molünde sabit sayıda molekül bulunur. Buna, **Avagadro sayısı** denir. Yani her türlü maddenin 1 molünde Avagadro sayısı (6.02×10^{23}) kadar molekül vardır (yani, 1 mol glukozda 6.02×10^{23} adet glukoz molekülü, 1 mol H^+ iyonunda 6.02×10^{23} adet H^+ iyonu, 1 mol e^- (elektronda) 6.02×10^{23} adet e^- bulunur). Bu sayede bir elementin veya molekülün gerçek ağırlığı saptanabilir. Örneğin, soluduğumuz bir oksijen (O_2) molekülünün gerçek ağırlığı 32 g/ 6.02×10^{23} molekül $O_2 = 5.316 \times 10^{-23}$ g/molekül O_2 'dir. Bu rakamın küçüklüğünü veya Avagadro sabitesinin

buyuklugunu tahayyul edebilemek icin soyle bir ornek dusununuz. Eni 1 mm olan demir paralardan 6.02×10^{23} dikey olarak dizseniz, bir ucundan otekine isik hizi (300,000 km/saniye) ile gitseniz ne kadar surede ulasabilirsiniz? Bunu hesaplayin!!!! Molekullerin ne kadar kucuk veya buyuk degerlerle ifade edilebilecegini diger bir ornekle dusunelim: Ergin bir insanda yaklasik 100 trilyon (100×10^{12}) cekirdekli hucre oldugu sanilmaktadir ve yine her hucredeki 46 kromozomun toplam 6 milyar (6×10^9) baz cifti (bc)'den olustugu tahmin edilmekte ve iki baz cifti arasindaki mesafenin 0.34 nm (nanometre) oldugu bilinmektedir ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9}$ metre). Yine bilgilerimizden bir baz-ciftinin yaklasik 660 dalton oldugunu ($\text{dalton} = 1\text{g}/6.02 \times 10^{23} = 1.66 \times 10^{-24}$ gram) biliyoruz (kimyacılar tarafından agirlik birimi olarak kullanilmayan dalton biyokimyacılar tarafından DNA gibi buyuk molekuller icin pekala kullanılabilir. Neden?). Tum yukaridaki bilgilerden ergin bir insan DNA molekullerinin hepsini uc uca baglarsaniz ceveresi 40,000 km olan dunyayi 5 milyon (5×10^6) kez DNA'mizla sarabilirsiniz. Ancak, bu kadar muazzam uzunluktaki DNA'nin agirligi ise sadece 65 gram kadardir (bunlari gosterebilirmisiniz?).

Biyokimya Laboratuvarında deney hazırlıklarında en çok kullanılan sozcukler arasında **cozelti** (solusyon), **konsantrasyon** gibi terimler en onde gelir. Bir solusyon iki kisimden olusur: **solut** (cozenen) ve **solvent** (cozen, cozenen). Dolayisi ile seker solut iken, su solventtir ve sekerin suya katilari eritilmesi ile sekerli **solusyon** ortaya cilar. Biyokimyada solvent denince en cok su akla gelse de, bircok polar olamayan molekul icin (ornegin yaglar, hidrokarbon bilesikler) yine polar olmayan solventler (ornegin, ethanol, methanol, benzen, toluen, hekzan) cozucu ortam olarak kullanilir. Konsantrasyonlar degisik bicimlerde ifade edilebilir. Bunlar arasında **molar konsantrasyon (M)**, **normal konsantrasyon (N)**, **% konsantrasyonlar (v/v; w/v; w/w)** en yaygin kullanilanlaridir.

Molar konsantrasyon (M) bir litre solusyondaki mol solut sayisidir (**M = mol/L**, yani, mol solut/L solusyon). Dolayisi ile,

$M \times L = \text{mole}$

$M \times \text{ml} = \text{mmol}$

$\text{mM (milimolar)} \times \text{ml} = \mu\text{mol (mikromol)}$

$\mu\text{M} \times \text{ml} = \text{nmol (nanomol)}$

$1 \text{ L} = 1000 \text{ ml (mililitre)}$

$1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l (mikrolitre)}$

$1 \text{ mol} = 1000 \text{ mmol}$

$1 \text{ mmol} = 1000 \mu\text{mol}$

$1 \mu\text{mol} = 1000 \text{ nmol}$

$1 \text{ nmol} = 1 \times 10^{-9} \text{ mol}$

(ayni iliski M-mM-μM arasinda da vardir)

Bazi ornekler:

Ornek 1. 200 ml 0.5 M NaOH solusyonunda kac mol NaOH vardir?

$0.5 \text{ mol/L} \times 0.2 \text{ L} = 0.1 \text{ mol}$

Ornek 2. 200 ml 0.5 M NaOH solusyonunda kac gram (g) NaOH vardir? (NaOH, 40 g/mol).

$0.5 \text{ mol/L} \times 0.2 \text{ L} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \text{ g NaOH}$

Ornek 3. Litresinde 60 g glukoz bulunan solusyonun molar konsantrasyonu nedir? (Glukoz, 180 g/mol).

$60 \text{ g/L} \times 1 \text{ mol}/180 \text{ g} = 0.333 \text{ mol/L} = 0.333 \text{ M}$

Ornek 4. Litresinde 60 g glukoz bulunan solusyonun 100 ml'si kac molardir ve kac mol glukoz icerir.

Molar konsantrasyon ayni (yani 0.333 M) kalirken, 100 ml'deki mol glukoz 10 kat azalacaktır (yani 0.0333 mol). $60 \text{ g/L} \times 1 \text{ mol}/180 \text{ g} = 0.333 \text{ mol/L} \times 0.1 \text{ L} = 0.0333 \text{ mol}$, $0.0333 \text{ mol}/0.1 \text{ L} = 0.333 \text{ mol/L} = 0.333 \text{ M}$

Ornek 5. 500 ml 1 M glukoz solusyonuna 500 ml su eklerseniz yeni karisimin mol sayisi ve molar konsantrasyonu ne olur?

Mol sayisi ayni (yani 1 mol/L x 0.5 l= 0.5 mol, toplam hacmi 1 L yapsaniz bile yine 0.5 mol madde olacaktır) kalirken, yeni karisimin molaritesi 2 kat dusecektir (1 mol/L x 0.5 l= 0.5 mol, 0.5 mol/2 L= 0.25 mol/l= 0.25 M).

Ornek 6. Konsantre (yogun) HCl (% 35 HCl, d (yogunluk)= 1.15 g/ml, HCl= 36.5 g/mol) solusyonundan 2 litre 0.4 M HCl solusyonu nasil hazirlarsiniz?

Konsantre HCl= 1.15 g/ml x 1000 ml=1150 g (yani 1 litre HCl= 1150 g).

1 mol HCl/36.5 g x 1150 g/L= 31.51 mol/L, ancak HCl % 35 saflikta olduguna gore,

0.35 x 31.51 mol/L= 11.03 mol/L= 11.03 M

Bu konsantrasyondaki HCl'den 2 litre 0.4 M yeni HCl solusyonu hazirlamak icin,

(2 L x 0.4 M)/ 11.03 M= 0.073 L (yani 73 ml) konsantre HCl alinir uzerine uygun miktarda (1.927 L veya 1927 ml) su eklenerek 2 L'ye tamamlanmis olursa, solusyon 0.4 M olur.

Normal (N) konsantrasyon solusyonun 1 litresindeki esdeger-mol soluttur (**N= esdeger-mol/L**). Biyokimyada esdeger mol daha cok ortama verilebilen asit (H^+) veya baz (OH^-) gruplari ile iliskilidir. Ornegin, HCl icin esdeger sayisi veya tesir degerligi 1 iken, H_2SO_4 icin 2'dir (HCl'de iyonize olan bir hidrojen bulunurken, H_2SO_4 'de 2'dir, $H^+ + H^+ + SO_4^{2-}$). Dolayisi ile HCl'in esdeger mol ağırligi 36.5 g iken, H_2SO_4 'un esdeger mol ağırligi 49 g'dir). Dolayisi ile **N=nM** olarak tarif edilebilir. n= esdeger sayisi (Yani HCl'in normalitesi molaritesine esitken, H_2SO_4 'un normalitesi molaritesinin 2 katidir). Asagida bazi kimyasalların toplam oksidasyon sayilari, esdeger gram ve bir molunun gram esdegerleri verilmistir:

Kimyasal	1 mol	Oksidasyon sayisi	Esdeger-gram ağırlık	Gram-esdeger/mol
HCl	36.5 g	1	36.5 g	1
H_2SO_4	98 g	2	49 g	2
HNO_3	63 g	1	63 g	1
H_3PO_4	98 g	3	32.7 g	3
$Ca(OH)_2$	74 g	2	37 g	2
$AlCl_3$	133.5 g	3	44.5 g	3
$Al_2(SO_4)_3$	342 g	6	57 g	6

Ornek 7. HCl, H_2SO_4 ve H_3PO_4 'un her birinden 1 mol alip toplam hacim 1 litre olacak sekilde bir karisim hazirlarsak, bu karisimin bu maddeler bakımından normalitesi ne olur?

Karisim bu kimyasalar bakımından 1 N HCl, 2 N H_2SO_4 ve 3 N H_3PO_4 olacaktır.

Ornek 8. 2 litre 3 N NaOH solusyonunda kac esdeger-gram solut (yani NaOH) vardır?

N= esdeger-gram sayisi/ L solusyon

3 esdeger-gram/L=esdeger-gram sayisi/2 L

Esdeger-gram= 6 esdeger-gram NaOH (veya 6 x 40 g/mol= 240 g NaOH/2 L solusyon= 120 g/L x 1 mol/40 g= 3 mol/L= 3 M= 3 N)

Ornek 9. 200 ml'sinde 14 g sulfurik asit olan solusyonun N?

14 g/0.2 L x 1 L x (1 mol esdeger-gram sulfurik asit/49 g)= 1.43 esdeger-gram H_2SO_4 /L

Ornek 10. Iki asit solusyonundan A'nin konsantrasyonu 1.5 N, B'ninki ise 2.1 N'dir. Bu iki asitten kac ml almaliyiz ki 250 ml 1.65 N solusyon hazirlamis olalim?

A'dan X ml alirsak, B'den 250-X ml almamız gerekir. En son hacim ve konsantrasyon 250 ml 1.65 N olacagından,

$(X)(1.5) + (250-X)(2.1) = (250)(1.65)$

X=A=187.5 ml, B=62.5 ml

% konsantrasyonlar 100 kisim solusyondaki solut sayisi.

a. Hacim/hacim % konsantrasyon (v/v): 100 ml solusyonda bulunan ml solut.

b. Agirlik/hacim % konsantrasyon (w/v): 100 ml solusyonda bulunan g solut.

c. Agirlik/agirlik % konsantrasyon (w/w): 100 g solusyonda bulunan g solut.

d. % miligram:100 ml solusyonda bulunan mg solut.

Ayrica cok dilut (seyrelik) solusyonlar icin **ppm** ve **ppb** terimleri de kullanilir.

ppm (parts per million): milyonda bir kisim anlamina gelir. Ornegin, 1 ppm 1mg/L'ye denk gelir.

(yani 1 mg glukozu 1 litre suda cozerseniz bu cozelti veya solusyon glukoz bakımından 1 ppm olur). ppb ppm'in 1000 kat daha dilue seklidir.

Ornek 11 . % 5'lik (w/v) 500 ml seker solusyonu nasil hazirlarsiniz?

5 g/100 ml solusyon x 500 ml solusyon= 25 g seker (yani, 25 g seker alip bir miktar suda cozerim ve uzerine 500 ml oluncaya kadar su eklerim).

Ornek 12. % 2.5'lik (w/w) 22 g NaCl solusyonunda kac g NaCl vardir?

2.5 g NaCl/ 100 g solusyon x 22g solusyon= 0.55 g NaCl

Ornek 13. % 10'luk (w/w) 200 g NaOH solusyonu nasil hazirlarsiniz?

10 g NaOH/ 100 g solusyon x 200 g solusyon= 20 g NaOH/ 200 g solusyon (diger bir deyimle, 20 g NaOH 180 g solvent (ornegin su veya baska bir solvent)'e ilave edilir. Dolayisi ile burada toplam 200 g solusyonda 20 g NaOH olur. **Toplam hacim 200 ml olmaz**).

Ornek 14. 200 ml % 10'luk (v/v) etanol solusyonu?

10 ml etanol/ 100 ml solusyon x 200 ml solusyon= 20 ml etanol (20 ml etanol alinir toplam hacim 200 ml olacak sekilde su ilave edilir).

Ornek 15. 0.2 g/ml stok solusyonundan 100 ml 10 mg/ml solusyon nasil hazirlarsaniz?

(100 ml x 10 mg/ml)/ 200 mg/ml= 5 ml stok solusyonu uzerine 95 ml su eklenir.

Ornek 16. % 95'lik (v/v) alkolden, % 70'lik (v/v) 300 ml alkol nasil hazirlarsiniz?

(300 ml x 0.7)/0.95= 221 ml % 95'lik alkol alinip uzerine toplam hacim 300 ml olacak sekilde su eklenir (yani, 79 ml).

Dilusyon: Konsantre (yogun, derisik) solusyonlardan dilut (daha az yogun, seyreltik) solusyonlarin hazirlanmasidir. Dilue edilmiş solusyon icin bulunan degerden hareket ederek orijinal solusyonun konsantrasyonunun hesaplanmasi kullanim dilusyon faktorlerinin kullanimi ile mumkundur. Ornegin, 1000 defa dilue olan bir solusyonda madde konsantrasyonu 0.1 mg/ ml ise, orijinal solusyondaki bu maddenin konsantrasyonu 0.1 mg/ml x 1000= 100 mg/ml'dir.

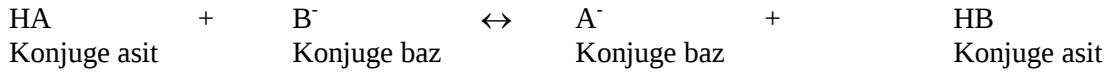
SORULAR

1. 0.5 mol solut içeren 2 M solusyonun hacmi ne kadardır?
2. 3 litre 0.5 M solusyondaki solutun mol sayısı nedir?
3. 0.4 M 575 ml KCl solusyonunda kaç gram KCl vardır?
4. 658 ml'sinde 14.63 g NaOH içeren solusyonun molaritesi nedir?
5. % 12'lik (w/v) 55 ml glukoz solusyonunda kaç gram glukoz vardır?
6. % 0.00175'lik seker solusyonunda kaç ppm seker vardır?
7. Eger 1 litre solusyon 189 g nitrik asit (HNO_3) içeriyorsa, bu solusyonun molaritesi nedir?
8. Yoğunluğu (d)= 1.42 olan % 69'luk (w/w) nitrik asitten kaç ml alınmalıdır ki 1 litre 2 M nitrik asit solusyonu hazırlanmış olsun?
9. 500 ml 3 M seker solusyonunda kaç mol ve kaç molekül seker vardır?
10. % 29'luk (w/w) KOH solusyonunun ($d= 1.28$) molaritesi nedir?
11. 1 litre 3 N KOH solusyonunda kaç gram KOH vardır?
12. 490 gram H_3PO_4 içeren 1500 ml solusyonun N?
13. 750 ml 0.3 N H_2SO_4 solusyonunda kaç gram solut (H_2SO_4) vardır?
14. 500 ml 0.05 M KOH solusyonunu notralize etmek için 0.025 M H_2SO_4 'ten ne kadar ilave etmemiz gerekir?
15. 0.25 N NaOH'dan 100 ml alıp 0.1 N 500 ml NaOH'ya eklersek yeni karışımın normalitesi ne olur?
16. 12 g NaOH'i notralize etmek için 0.04 M HCl'den kaç ml ilave etmemiz gerekir?
17. 10 mg/ml madde içeren solusyondan 0.02 ml alıp 0.980 ml suya ilave ettiniz ve bundan da 0.01 ml alıp 1.990 ml suya ilav ettiniz. Bu son solusyondaki madde konsantrasyonu nedir?

3. Hafta: Tamponlar, asit-baz ve pH kavramı

Biyolojik moleküllerin aktivitelerinin, yapılarının tam olarak anlasılması ancak asit-baz kimyasını anlamakla olur. Çünkü, hücredeki bir çok yapıtaşı molekül (amino asitler, nükleotidler) ve makromolekül (proteinler, nükleik asitler) asidik veya bazik karakterde olup iyonize olabilirler. Bu molekül ve makromoleküllerin taşıdıkları elektrik yük (elektro pozitif veya negatif) onların enzimlerle katalize edilen reaksiyonlarda, proteinlerin konformasyonlarının (özel yapı kazanma) kararlı halde kalmasında ve diğer moleküllerle ilişkilerinde (örneğin, bazı spesifik proteinlerin DNA'ya bağlanması) önemli rol oynar. Ayrıca, bu molekül ve makromoleküllerin saflaştırılarak çalışılması da onların iyonizasyon özelliklerinin bilinmesinden geçer.

Bronsted asit-baz kuramına göre **asit** hidrojen iyonu (proton) veren bir madde iken, **baz** hidrojen alan bir maddedir. Dolayısı ile proton veren bir asit ortamda bir baz oluşumuna neden olur. Böylece orijinal asit ve yeni oluşan baza konjuge asit-konjuge baz çifti denir. Protonu alıp asit forma dönüşen baz başka bir bazdır:



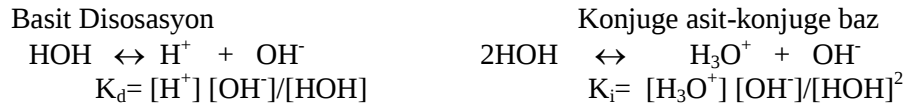
Boylece her iyonizasyon reaksiyonunda iki konjuge asit-konjuge baz çifti vardır. Kuvvetli bir asit veya kuvvetli bir sulu bir ortamda % 100 iyonize olur. Örneğin, HCl solusyonunda % 100 H_3O^+ ve Cl^- iyonlarına iyonize olur:



Sulu çözeltilerde H_3O^+ (hidronyum iyonu veya diğer bir deyimle suyun konjuge asiti) hidrojen iyonu (proton)'un gerçek formudur. Bu nedenle yukarıdaki reaksiyon daha basit şekilde,



şeklinde ifade edilebilir (yani $\text{H}_3\text{O}^+ = \text{H}^+$). Suyun iyonizasyonu iki şekilde ele alınabilir: su basit bir ayrışma H^+ ve OH^- 'ye veya bir konjuge asit-baz çifti olarak. Her iki durumda da suyun amfoterik bir madde olduğu görülür (yani hem asit ve hem de bazik iyon üretir). Yani, hem proton verebilir ve hem de alabilir. Suyun iyonizasyonu aşağıda verildiği gibi bir ayrışma (disosiyasyon) sabitesi (K_d), iyonizasyon sabitesi (K_i) veya su için spesifik bir sabite ile (K_{su}) ifade edilebilir:



Dolayısı ile her mol H^+ için (veya H_3O^+) 1 mol OH^- üretilir. Saf suda, hidrojen iyon konsantrasyonu ($[\text{H}^+]$) = 10^{-7} M olduğundan, hidroksil iyon konsantrasyonu da $[\text{OH}^-]$ = 10^{-7} M'dir.

Suyun molaritesi (d_{su} = 1 g/ml, MA_{su} = 18 g/mol),

$$1 \text{ g/ml} \times 1000 \text{ ml/litre} \times 1 \text{ mol}/18 \text{ g} = 55.56 \text{ M}$$

Dolayısı ile K_d ve K_i ,

$$K_d = (10^{-7})(10^{-7})/55.56 = 10^{-14}/55.56 = 1.8 \times 10^{-16} \quad K_i = (10^{-7})(10^{-7})/(55.56)^2 = 3.24 \times 10^{-18}$$

$K_{su} = K_d \times [\text{H}_2\text{O}]$ veya $K_{su} = K_i \times [\text{H}_2\text{O}]^2$ olarak ifade edilebilir.

Bu her iki eşitlikten, $K_{su} = 1 \times 10^{-14} = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$ olarak elde edilir. Sulu çözeltilerde dolayısı ile daima $[\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-14}$ olup, hidrojen iyonu azalır, hidroksil iyonu ise aynı oranda artarak bu denge korunmuş olur.

pH hidrojen iyon konsantrasyonunun (veya aktivitesinin) kısa ifadesidir. pH hidrojen iyon konsantrasyonunun negatif logaritması olarak tanımlanabilir. Benzer şekilde pOH ise hidroksil iyon konsantrasyonunun negatif logaritmasıdır ($pH = -\log [H^+]$, $pOH = -\log [OH^-]$). Sulu solusyonlarda daima

$K_{su} = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$ olduğundan, $pK_{su} = pH + pOH = 14$ 'tur.

Ornek 1. 0.001 M HCl solusyonunun hidrojen iyon konsantrasyonu, pH, hidroksil iyon konsantrasyonu ve pOH?

HCl kuvvetli bir asit olduğundan % 100 iyonlarına ayrışır: $HCl \leftrightarrow H^+ + Cl^-$

Dolayısı ile 0.001 M HCl, 0.001 M H^+ ve 0.001 M Cl^- iyonlarına ayrışır.

$pH = -\log [H^+] = -\log 10^{-3} = 3$

$[H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$ olduğundan, $[OH^-] = 1 \times 10^{-14} / 1 \times 10^{-3} = 1 \times 10^{-11}$, $pOH = -\log [OH^-] = 11$

veya kısaca $pH + pOH = 14$ olduğundan, $pOH = 14 - 3 = 11$

Ornek 2. 0.04 M NaOH'in pH?

$pOH = -\log 4 \times 10^{-2} = 1.4$, $pH = 14 - 1.4 = 12.6$

Ornek 3. 1×10^{-8} M HCl'in pH?

Hepimizin hemen cevap vereceği gibi böyle bir sorunun cevabı $pH = 8$ değildir. Çünkü bir asit ne kadar seyreltik olursa olsun pH 'i 7'den büyük olamaz. Çünkü saf suyun pH 'i zaten 7'dir ve bir miktar hidrojen iyonu da HCl'den geldiğinden, toplam proton miktarında biraz daha artış olacak ve dolayısı ile pH 'da da düşüş görülecektir (hidrojen iyon konsantrasyonu arttıkça pH 'nin düştüğünü hatırlayınız). Dolayısı ile yukarıdaki gibi bir solusyonda X M hidrojen iyonu sudan, 10^{-8} M hidrojen iyonu da HCl den gelir. Dolayısı ile toplam hidrojen iyonu ($[H^+]$) = $X + 10^{-8}$ M'dir. Hidroksil iyonu ise sadece sudan gelir ve onu da X M olarak ifade edelim.

Biliyoruz ki, $[H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$, $(X + 10^{-8})(X) = 1 \times 10^{-14}$, $X^2 + 10^{-8}X - 1 \times 10^{-14} = 0$

$X = (-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}) / 2a$ (negatif değeri hesaba almayınız). Geri kalan çözümü yaparak pH 'yi hesaplayınız.

Canlı sistemde bulunan asit ve bazların hepsi yukarıda bahsettiğimiz kuvvetli asit veya kuvvetli bazlar gibi % 100 iyonize olmazlar. Bu çeşit asit ve bazlar genellikle kısmen (% 10 veya daha az) iyonize olurlar:



Bu çeşit asit ve bazlara zayıf asit veya zayıf bazlar denir. pH değişimlerine karşı koyduklarından, bu çeşit maddeler esasen tampon maddeleri olarak kullanılırlar. Dolayısı ile bu maddeler farklı iyonizasyon sabitelerine (K_a) sahiptirler.

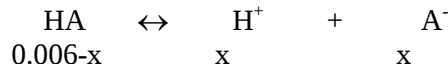
$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$, $[H^+] = K_a ([HA]/[A^-])$, her iki tarafın logaritmasını alırsak,

$\log [H^+] = \log K_a + \log ([HA]/[A^-])$, her iki tarafı -1 ile çarparsak,

$-\log [H^+] = -\log K_a - \log ([HA]/[A^-])$, $pH = pK_a - \log [HA]/[A^-]$, **$pH = pK_a + \log [A^-]/[HA]$**

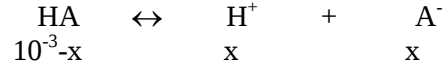
bu son formül Henderson-Hasselbalch eşitliği olarak bilinir. Bu kullanışlı formülle pK_a 'si ve iyonik konsantrasyonu bilinen bir asit veya bazın pH 'si veya pH 'si ve iyon konsantrasyonu bilinen asit veya bazın pK_a 'si hesaplanabilir.

Ornek 4. Biyolojide en yaygın olarak verilen zayıf asitlerden biri asetik asittir. Bu zayıf asidin pK_a 'si 4.76'dir. Molar konsantrasyonu 0.006 olan asetik asit solusyonunun pH 'i nedir?



$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$, $K_a = x \cdot x / 0.006 - x$, % 10 kadari iyonize olan ($K_a/0.006$) böyle bir asit için $0.006 - x$ degerindeki x 'i ihmal edebiliriz. Böylece, $x^2/0.006$, $x = [H^+] =$

Ornek 5. K_a degeri 1.6×10^{-6} olan zayıf bir asidin pH 'i, 10^{-3} M solusyondaki iyonizasyonu, pK_a ve pK_b degerleri nedir?



$$K_a = [H^+][A^-]/[HA], \quad (x)(x)/10^{-3} - x = 1.6 \cdot 10^{-6}, \quad x = [H^+] = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}, \quad pH = 4.398$$

$$\% \text{ iyonizasyonu} = [H^+]/[HA] = 4 \cdot 10^{-5}/10^{-3} = 0.04 = \% 4$$

$$pK_a, K_a \text{'nin negatif logaritması olduğundan, } pK_a = -\log K_a = 5.8$$

$$pK_a + pK_b = 14 \text{ olduğundan, } pK_b = 8.2$$

Ornek 6. Eger 0.16 M 25 ml NaOH solusyonuna 0.34 M 10 ml NaOH eklersek yeni solusyonun molaritesi ne olur?

$$0.16 \text{ mol/l} \times 0.025 \text{ litre} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} = 4 \text{ mmol}$$

$$0.34 \text{ mol/l} \times 0.010 \text{ litre} = 3.4 \times 10^{-3} \text{ mol} = 3.4 \text{ mmol}$$

$$\text{Toplam } 0.035 \text{ litre (35 ml)} = 7.4 \text{ mmol}$$

$$7.4 \text{ mmol}/35 \text{ ml} = 0.21 \text{ mmol/ml} = 0.21 \text{ mol/l} = 0.21 \text{ M}$$

Ornek 7. Yukarıda verilen karışımın pH ?

$$pOH = -\log [OH^-] = 0.68, \quad pH = 13.32$$

Ornek 8. Eger 0.16 M 25 ml NaOH solusyonuna 0.34 M 25 ml HCl eklersek yeni solusyonun pH ?

$$0.16 \text{ mol/l} \times 0.025 \text{ litre} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} = 4 \text{ mmol NaOH}$$

$$0.34 \text{ mol/l} \times 0.025 \text{ litre} = 8.5 \times 10^{-3} \text{ mol} = 8.5 \text{ mmol HCl}$$

$$\text{Toplam } 0.050 \text{ litre (50 ml)} = 4.5 \text{ mmol fazla HCl var demektir.}$$

$$4.5 \text{ mmol}/50 \text{ ml} = 0.09 \text{ mmol/ml} = 0.09 \text{ mol/l} = 0.09 \text{ M HCl}$$

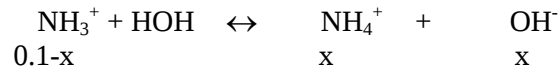
$$pH = -\log [H^+] = 1.046$$

Ornek 9. 200 ml suya kaç gram NaOH eklemeliyiz ki solusyonun pH 'i 11.5 olsun?

$pH = 14 - pOH$, $pOH = 2.5$, Hidroksil iyon konsantrasyonu ($[OH^-]$) bulmak için bu degerin anti logaritmasını (ters logaritmasını) alalım; $[OH^-] = 3.16 \times 10^{-3} \text{ M}$

$$3.16 \times 10^{-3} \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ litre} \times 40 \text{ g/mol} = 0.025 \text{ g NaOH}$$

Ornek 10. Biyolojide en yaygın olarak verilen zayıf bazlardan NH_3^+ 'un K_a degeri 1.74×10^{-5} 'tir. Bu bazın 0.1 M solusyonunun pH ?



$$K_a = [NH_4^+][OH^-]/[NH_3^+], \quad 1.74 \times 10^{-5} = x^2/0.1 \quad x^2 = 1.74 \cdot 10^{-6} \quad x = [OH^-] = 1.32 \cdot 10^{-3}$$

$$pOH = 2.88 \quad pH = 14 - 2.88 = 11.12$$

Ornek 11. Asetik asit ve sodyum asetatın her birinden 1 mol/l içeren bir solusyonun pH ? ($K_a = 1.74 \times 10^{-5}$).



$$K_a = [NaCH_2COO^-][H^+]/[CH_3COOH]$$

$$[H^+] = K_a ([CH_3COOH] / [NaCH_2COO^-]) = 1.74 \times 10^{-5} (1/1) = 1.74 \times 10^{-5}, \quad pH = 4.76$$

veya

$$pH = pK_a + \log (tuz/asit)$$

$$= 4.76 + \log (1/1) = 4.76$$

Ornek 12. Yukarıdaki solusyona 0.1 mol HCl ilave edilirse yeni tamponun pH?

$$\text{Toplam } CH_3COOH = 1 + 0.1 = 1.1 \text{ mol}$$

$$\text{Toplam } NaCH_2COO^- = 1 - 0.1 = 0.9 \text{ mol}$$

$$pH = pK_a + \log (tuz/asit)$$

$$= 4.76 + \log (1.1/0.9) = 4.67$$

Ornek 13. 50 ml 0.1 M asetik asite 20 ml 0.2 M NaOH eklenirse yeni karışımın pH?

$$pH = pK_a + \log [A^-] / [HA]$$

$$A^- = 20 \text{ ml} \times 0.2 \text{ M} = 4 \text{ mmol konjuge baz}$$

$$HA = 50 \text{ ml} \times 0.1 \text{ M} = 5 \text{ mmol konjuge asit (5 mmol asitin 4 mmolu baza donusur)}$$

$$\text{Toplam 70 ml} \quad 1 \text{ mmol fazla asit}$$

$$pH = pK_a + \log (baz/asit) = pK_a + \log [A^-] / [HA] = 4.76 + \log (4/1) = 5.36$$

Ornek 14. 250 ml 0.2 M asetik asit tamponuna kaç gram sodyum asetat ilave etmeliyiz ki pH= 5.0 olsun?

$$(NaCH_2COO^- = 82 \text{ g/mol}).$$

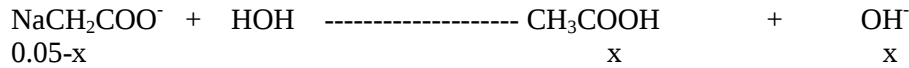
$$pH = pK_a + \log [A^-] / [HA], \quad 5.0 = 4.76 + \log [A^-] / [HA], \quad 0.24 = \log [A^-] / [HA] \text{ logaritmadan kurtarmak}$$

$$\text{icin esitligin ters logaritmasini alirsak, } 1.74 = [A^-] / [HA], \quad HA = 0.2 \times 250 = 50 \text{ mmol,}$$

$$1.74 = [A^-] / 50, \quad A^- = 87 \text{ mmol,} \quad 87 \text{ mmol} / 250 \text{ ml} = 0.348 \text{ M,}$$

$$0.348 \text{ mol/l} \times 0.250 \text{ litre} \times 82 \text{ g/mol} = 7.13 \text{ g } NaCH_2COO^-$$

Ornek 15. 0.05 M $NaCH_2COO^-$ tuz solusyonunun pH?



$$K_h = K_{su} / K_a = 1 \times 10^{-14} / 1.74 \times 10^{-5} = 5.75 \times 10^{-10} = x^2 / 0.05 - x, \quad (x \text{ ihmal edilebilir})$$

$$x^2 = 2.88 \times 10^{-11}, \quad x = [OH^-] = 5.36 \times 10^{-6} \text{ M,} \quad pOH = 5.27, \quad pH = 8.73$$

Bu örneklerden de anlaşılabileceği üzere, sulu çözeltilerin pH'ları aşağıdaki şekillerde özetlenebilir:

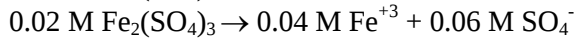
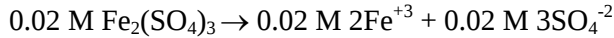
- a.** saf su için, $\text{HOH} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$, $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$
b. kuvvetli asitler için, örneğin 10^{-3} M HCl , $[\text{H}^+] = 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 3.0$
c. kuvvetli bazlar için, örneğin 10^{-3} M NaOH , $[\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pOH} = 3.0$, $\text{pH} = 11.0$
d. zayıf asit için, $\text{HA} \leftrightarrow \text{A}^- + \text{H}^+$, $K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-]/[\text{HA}]$, $[\text{H}^+] = K_a ([\text{HA}]/[\text{A}^-])$, buradan bulunan değerin negatif logaritması alınarak pH bulunur.
e. zayıf baz için, $\text{B} + \text{HOH} \leftrightarrow \text{OH}^- + \text{BH}^+$, $K_b = [\text{BH}^+][\text{OH}^-]/[\text{B}]$, $[\text{OH}^-] = K_b ([\text{B}]/[\text{BH}^+])$, buradan bulunan değerin negatif logaritması alınarak pOH bulunur ve 14'ten çıkarılarak pH hesaplanır.
f. zayıf asit ve onun tuzu veya zayıf baz ve onun tuzu,
 $\text{pH} = \text{pK}_a + \log (\text{baz/asit})$, $\text{pOH} = \text{pK}_b + \log (\text{asit/baz})$
g. zayıf bir asit ve kuvvetli bazdan oluşan tuzun (hidroliz), örneğin asetik asite NaOH ilavesi ile meydana gelen sodyum asetatın hidrolizi, $\text{NaCH}_2\text{COO}^- + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{OH}^-$
burada $\text{CH}_3\text{COOH} = \text{OH}^-$ olduğundan, $K_h = [\text{OH}^-]^2 / [\text{NaCH}_2\text{COO}^-]$, $K_h = K_{\text{su}} / K_a$ olduğunu biliyoruz, dolayısı ile $K_{\text{su}} = 1 \times 10^{-14} / 1.74 \times 10^{-5} = 5.75 \times 10^{-10}$, eğer sodyum asetatın konsantrasyonunu biliyorsak $K_h = [\text{OH}^-]^2 / [\text{NaCH}_2\text{COO}^-]$ 'dan hidroksil iyon konsantrasyonunu hesaplar ve onun da negatif logaritmasını alarak pOH ve dolayısı ile pH'yi da hesaplayabiliriz.
h. zayıf bir baz ve kuvvetli bir asitten oluşan tuzun hidrolizi de aynen yukarıdaki gibi bulunur ve pH'i hesaplanır. Sadece, burada pK_a yerine pK_b değeri kullanılır. Örneğin yukarıdaki gibi bir örneğin pK_b değeri, $\text{pK}_b = K_{\text{su}} / K_a$.

Örnek 16. 0.2 M NH₃ ve 0.3 M NH₄Cl içeren solüsyonun pH? (NH₄ için $K_a = 5.7 \times 10^{-10}$).

$\text{NH}_4^+ + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ (\text{H}^+)$, $K_a = 5.7 \times 10^{-10}$
 $\text{NH}_3 + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$, $K_b = K_{\text{su}} / K_a = 1.75 \times 10^{-5}$
Hidroksil iyon konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, hidrojen iyon konsantrasyonu çok küçük kaldığından,
 $K_b = [\text{OH}^-][\text{NH}_4^+] / [\text{NH}_3]$, $[\text{OH}^-] = K_b [\text{NH}_3] / [\text{NH}_4^+] = 1.75 \times 10^{-5} (0.2) / 0.3 = 1.17 \times 10^{-5} \text{ M}$
 $\text{pOH} = 4.93$, $\text{pH} = 9.07$

İyonik güç (μ), bir tamponun iyonik gücü (aktivitesi veya etkin konsantrasyonu) molar konsantrasyonundan farklılık gösterebilir. Çok seyreltik solüsyonlarda bir maddenin aktivitesi konsantrasyonuna eşdeğer olsa da, yoğun solüsyonlar için bu durum söz konusudur ve solütün aktivitesi yoğunluğuna eşit değildir. Bir solüsyonun iyonik gücü,

$\mu = \frac{1}{2} \sum MZ^2$ şeklinde ifade edilebilir. Burada,
M= ortamdaki iyonların gerçek molaritesi, Z= iyonun yuku. Örneğin, 0.02 M Fe₂(SO₄)₃ 'un iyonik kuvveti:



$$\text{iyonik güç} = \frac{1}{2} \sum [(0.04)(3)^2 + (0.06)(-2)^2] = \frac{1}{2} (0.60) = 0.30 \text{ M}$$

bir adet +1 anyon ve bir adet -1 katyon içeren bir solut için (örneğin, NaCl,) $\mu = M$ olur.

Örnek 17. 25 ml 0.12 M MnCl solüsyonu ve 35 ml 0.06 M KCl solüsyonunun karışımındaki bütün iyonların konsantrasyonunu ve bu karışımın iyonik gücünü hesaplayınız.

$$\text{Mn}^{+2} \text{ konsantrasyonu } 25 \text{ ml} \times 0.12 \text{ M} / (25 \text{ ml} + 35 \text{ ml}) = 0.05 \text{ mol/l} = 0.05 \text{ M}$$

$$\text{K}^+ \text{ konsantrasyonu } 35 \times 0.06 \text{ M} / (25 \text{ ml} + 35 \text{ ml}) = 0.035 \text{ mol/l} = 0.035 \text{ M}$$

$$\text{Cl}^- \text{ konsantrasyonu } (25 \text{ ml} \times 0.24 \text{ M}) + (35 \times 0.06 \text{ M}) / (25 \text{ ml} + 35 \text{ ml}) = 0.135 \text{ M}$$

$$\text{Etkin konsantrasyon } (\mu) = \frac{1}{2} (M_{\text{Mn}^{+2}} \times Z^2_{\text{Mn}^{+2}} + M_{\text{K}^+} \times Z^2_{\text{K}^+} + M_{\text{Cl}^-} \times Z^2_{\text{Cl}^-})$$

$$\frac{1}{2} [0.05 \times (2)^2 + 0.035 \times (1)^2 + 0.135 \times (1)^2] = 0.185 \text{ M}$$

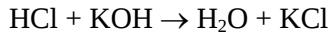
Ornek 18. Ka degeri 1.6×10^{-6} olan 1×10^{-3} M zayif bir asitin pH? % iyonizasyonu, pKa?, pKb?



$$\begin{aligned} K_a &= \frac{x^2}{1 \times 10^{-3} - x}, & x &= [\text{H}^+] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}, & \text{pH} &= 4.4 \\ \% \text{ iyonizasyon} &= \frac{4 \times 10^{-5}}{1 \times 10^{-3}} \times 100 = 4\% \\ \text{pKa} &= -\log K_a = 5.8, & \text{pKb} &= 14 - 5.8 = 8.2 \end{aligned}$$

Hucre veya dokularda olusan prosesler belli hidrojen iyon konsantrasyonlari altinda ancak olusabilirler. Canli sistemin hucre ici ve hucre disi pH'si dokudan dokuya farklılık gösterebilir. Hatta bir hucredeki farklı organeller farklı pH'lara sahip olabilirler. Doku, hucre veya organel ancak kendine özgü pH'larda çalışırlar. Dolayısı ile vucut veya hucre pH'sinin hemen hemen sabit tutlması gerekir. Olabilecek en küçük pH değisimleri önemli malfonksiyonlara neden olabilir. Tüm canlılar hucrelerinde veya vucut sıvılarında belli bir asit-baz dengesini korumak zorundadırlar. Bu nedenledir ki, biyolojik pH'lar doğal olarak organizmada bulunan tamponlarla belli bir ayarda tutulurlar. Bu dersimizde göreceğimiz gibi, tamponlar öyle maddelerdir ki iyonik ortamı eklenen baz veya asit iyonlarına karşı dirençli kılarlar. Vucudumuzdaki önemli tampon sisteminden ikisi fosfat ve karbonat tamponlarıdır. Karbon dioksit eritrosite girdiği zaman hızlıca karbonik asite donusturulur.

Ornek 19. 500 ml 0.01 N HCl'in 0.01 N KOH ile titrasyonunu bir eğri yardımı ile gösteriniz (yani eklenen baz (y eksenı) miktarına karşılık gelen pH değerlerini x ekseninde göstererek). Başlangıçta hiç KOH eklenmediği zaman yukarıdaki konsantrasyondaki asit $\text{pH} = -\log 0.01 = 2.00$ 'dir. KOH ilavesinde,



Asit ve baz iyonları eşit oluncaya kadar solusyonun pH'i ortamdaki fazla asit iyonları (titre olmayan) tarafından belirlenir:

100 ml KOH ilavesinde H^+ iyon konsantrasyonu,

$$\text{H}^+ = \frac{[\text{HCl}]V_{\text{HCl}} - [\text{KOH}]V_{\text{KOH}}}{V_{\text{HCl}} + V_{\text{KOH}}} = 0.004 \text{ M} \quad \text{pH} = 2.18$$

benzer şekilde,

200 ml KOH ilavesinde $\text{pH} = 2.39$

300 ml KOH ilavesinde $\text{pH} = 2.60$

400 ml KOH ilavesinde $\text{pH} = 2.95$

Esdeğer miktar ve konsantrasyonda baz ilavesi halinde ise, yani,

500 ml KOH ilavesinde $\text{pH} = 7.00$ ($[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = 10^{-14}$, burada $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-]$ 'dir) olur (çünkü ikisi de % 100 iyonize olabilen monobazik ve monoasidik türler olduğundan, ortamdaki bazik ve asidik iyon konsantrasyonları eşit olur. Yani solusyonun pH'i nötr olur).

KOH eklemeye devam edersek, titrasyonun üçüncü kısmında hidroksil iyon konsantrasyonu hidrojen iyon konsantrasyonunu geçecektir. Dolayısı ile, 600 ml KOH ilavesinde OH^- konsantrasyonu,

$$\text{OH}^- = \frac{[\text{KOH}]V_{\text{KOH}} - [\text{HCl}]V_{\text{HCl}}}{V_{\text{KOH}} + V_{\text{HCl}}} = 0.00091 \text{ M}$$

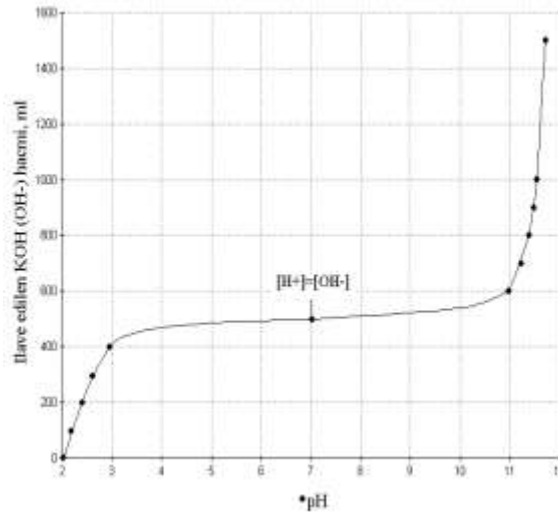
$\text{pOH} = 3.04$, $\text{pH} = 10.96$

700 ml KOH ilavesinde $\text{pH} = 11.22$

800 ml KOH ilavesinde pH= 11.36
900 ml KOH ilavesinde pH= 11.46
1000 ml KOH ilavesinde pH=11.52
1500 ml KOH ilavesinde pH= 11.70

Bu konsantrasyonda (0.01 M) ne kadar KOH eklersek ekleyelim solusyonun pH'i 12'yi gecmez. Cunku, bu bazin kendisinin (asit olmadan) pH'i 12.00'dir. pH 12 veya daha yuksek pH'lar elde temek icin yuksek konsantrasyonda KOH kullanmak gerekir.

Titrasyon egrileri bir solusyondaki asit (veya baz) 'in miktarini ve o asitin pKa'sini bulmaya yarar. Belli hacimdeki asite belli konsantrasyondaki bir baz (genellikle (NaOH) notralize oluncaya kadar ilave edilir Asitin konsantrasyonu ve pKa'si harcanan ve konsantrasyonu bilinen bazin yardimi ile hesaplanir (bu konuya laboratuvarimizda detayli giris yapılacaktır). Yukaridaki ornegin titrasyon egrisi asagidaki gibi gosterilebilir:



Örnek 20. Simdi de 500 ml 0.1 M zayif asidin 0.1 M KOH ile titrasyon egrisini saptamaya calisalim (pKa= 5.0).

Yukaridaki orneklerden de anlasilacagi uzere, bir zayif aside kuvvetli baz ilavesi 4 ana basam icinde irdelenebilir ve pH hesaplanabilir:

A. Baslangic bolgesi (henuz kuvvetli baz ilavesi olmadan):



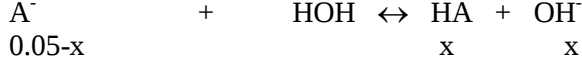
B. Ayni esdeger mol kuvvetli baz ilavesi noktasina gelineye kadar:

Herndersson-Hasselbalch esitligi ile pH hesaplanir.

Ornegin, 100 ml KOH ilavesi halinde pH, 0.1 mol/l x 0.1 litre= 0.01 mol OH⁻ ilavesi yapilmis demektir, Boylece, zayif asitin 0.01 molu notralize olacaktir ve ortamda, 0.1 mol asit/l x 0.5 litre- 0.01 mol notralize olacak= 0.04 mol asit kalacaktır. Dolayisi ile pH, pH= 5 + log (0.01/0.04)= 4.4

C. Esit molar konsantrasyonda kuvvetli bazin ekendigi bolge (Denge noktasi):

Eger 500 ml 0.1 M KOH ilave edilirse, teorik olarak asitin hepsi notralize edilmiş olacaktır. Yani teorik olarak tüm HA A⁻'ya dönüşmüş olur. Ancak bu noktada, kuvvetli asit ve baz titrasyonunda olduğu gibi pH 7.0 değildir. Çünkü, bir kısım tuz (A⁻) veya konjuge baz iyonize olur.



bu nedenle 1 mol KOH ilave etmek 1 mol A⁻ açığa çıkarmaz,

$$\text{A}^- = 500 \times 0.1 / 500 + 500 = 0.05 \text{ M}$$

$$\begin{aligned} K_h = K_{su}/K_a = 10^{-14}/1 \times 10^{-5} = 1 \times 10^{-9}, \quad K_h \text{ aynı zamanda} &= [\text{HA}][\text{OH}^-]/[\text{A}^-] = x^2/0.05-x \\ 1 \times 10^{-9} = x^2/0.05, & \quad x = [\text{OH}^-] = 1.58 \times 10^{-6}, \quad \text{pOH} = 5.15, \quad \text{pH} = 8.85 \end{aligned}$$

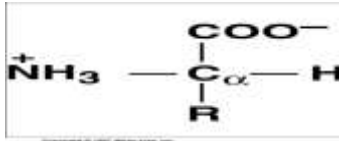
D. Denge noktasından sonraki pH:

Burada eklenmiş olan KOH molar konsantrasyonu zayıf asitinkini geçer. Örneğin, 600 ml KOH ilavesi halinde, 600 ml x 0.1 M = 60 mmol OH⁻

$$500 \text{ ml} \times 0.1 \text{ M} = 50 \text{ mmol HA}$$

Dolayısı ile daha fazla (10 mmol) hidroksil iyonu bulunur. Toplam hacim 1100 ml olduğundan, [OH⁻] = 10 mmol / 1100 ml = 9.091 x 10⁻³ M, pOH = 2.04, pH = 11.96

Biyolojik sistemler laboratuvar ortamında daha çok parçalanarak çalıştırılırlar. Ancak, hücre içindeki benzer (suni) bir ortamın yapılması gerekir ki çalıştığımız madde aktivitesini kaybetmesin. Bu tür çalışmalara *in vitro* (örneğin tüp içinde olan) çalışmalar denir. Eğer, çalışmamızda direkt bir canlıyı öldürmeden kullanıyorsak buna da *in vivo* çalışma denir. Biyokimyasal reaksiyonlar ortam pH'sına bağlı olduklarından, hidrojen iyon konsantrasyonunun doğru olarak belirlenmesi bu tür çalışmalarda her zaman önemli yer tutar.

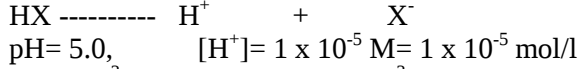


Butun amino asitler iyonize olabilen gruplara (amino ve karboksil) sahip olduklarından, ortam pH'sına bağlı olarak asit veya bazik karaktere sahip olabilirler. Bildiğiniz gibi butun amino asitler genel formülüne sahiptirler. Glisin en basit amino asit olup R'in pozisyonunda ikinci bir hidrojen atomu tasir. Dolayısı ile en basit amino asitte bile iki adet pK_a değeri vardır.

Birincisi, karboksil grubunun iyonizasyonuna denk gelen asidik pK_{a1}, ikincisi ise amino grubunun iyonizasyonunda olan bazik tabiyatlı pK_{a2} (Glisin için pK_{a1} = 2.4, pK_{a2} = 9.6'dır). Dolayısı ile butun amino asitler için bu pK_a değerleri benzer (ancak aynı olmayan) değerler gösteririr. Ancak, bazı amino asitler (örneğin, asidik ve bazik amino asitler) birden fazla amino veya karboksil grubu tasidiklerinden, ikiden fazla pK_a değerlerine sahiptirler. Ancak, bilmekteyiz ki peptid bağ yapımına girmeyen bu gruplar proteine belli bir iyonik karakter gösterme özelliğindedirler. Dolayısı ile glisin, valin, lösin, izölosin gibi amino asitleri yüksek oranlarda içeren proteinler (örneğin: kollojen, keratin) zayıf iyonizasyon gösterirler. Neden? Amino asitlerin asit-baz karakteristikleri, pK_a'ları, pI'ları ve tampon özellikleri üzerinde laboratuvarında daha detaylı durulacaktır.

SORULAR

1. 1.6 mg HX kuvvetli asidi 1.250 litre suda cozundugunde pH= 5.0 olmaktadır. HX'in molekul agirligi nedir? (H=1).



$$1.6 \times 10^{-3} \text{ g/1.25 litre} = 1.28 \times 10^{-3} \text{ g/l}$$

her iki molekul (H ve X) esit mol konsantrasyonda bulunduklarından, $1 \times 10^{-5} \text{ mol}$ madde $1.28 \times 10^{-3} \text{ g}$ maddeye denk gelir. Dolayisi ile 1 mol madde 128 g'a denk gelir ($1.28 \times 10^{-3} \text{ g/} 1 \times 10^{-5} \text{ mol}$). H=1 oldugundan, X=127 g/mol olarak bulunur.

2. 10 M HCl'den 100 µl alip 100 ml suya eklerseniz, solusunun pH?

Dilasyon faktoru= $100/0.1=1000$, dolayisi ile 10 M'lik HCl'i 1000 defa seyreltmis oluruz ve $10/1000=0.01 \text{ M}$ HCl olur. pH= 2.0

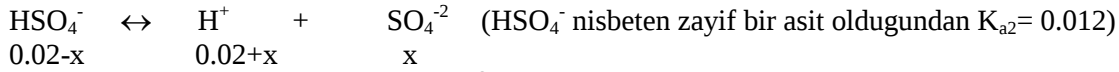
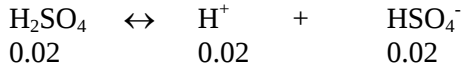
Diger bir sekilde cozersek, $0.1 \text{ ml} \times 10 \text{ M} = 1 \text{ mmol HCl}$, $1 \text{ mmol HCl}/100 \text{ ml} = 1 \text{ mol}/100 \text{ litre} = 0.01 \text{ mol/litre} = 0.01 \text{ M}$

3. pH degri 2.0 olan kuvvetli bir asiti esit hacimdeki ve pH degeri 13.0 olan kuvvetli bazla karistirirsaniz, yeni karisimin pH?

$$\text{pH} = 2.0, \quad [\text{H}^+] = 0.01 \text{ M}$$

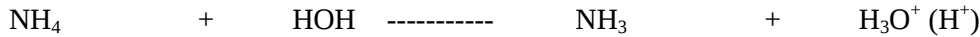
pH= 13.0 ise pOH= 1'dir ve dolayisi ile $[\text{OH}^-] = 0.1 \text{ M}$
boyle bir karisimde dolayisi ile 0.09 M fazla hidroksil iyonu vardir. Boylece, iki hacimde $0.09/2 = 0.045 \text{ M}$ hidroksil iyonu bulunur, bunun pOH= 1.35, pH=12.65 olarak bulunur.

4. 0.02 M H_2SO_4 solusyonundaki tum iyonlari konsantrasyonunu ve pH'sini hesaplayiniz. Sulfurik asit kuvvetli bir asit oldugundan tamamen iyonize olur (ancak iki basamakta);



$$K_{a2} = (0.02 + x)(x)/0.02 - x, \quad x = \text{SO}_4^{2-} = 0.0063 \text{ M}, \quad \text{HSO}_4^- = 0.02 - 0.0063 = 0.0137 \text{ M}$$
$$[\text{H}^+] = 0.02 + 0.0063 = 0.263 \text{ M}, \text{ pH} = 0.58, \quad [\text{OH}^-] = 10^{-14}/0.263 = 3.8 \times 10^{-14}, \text{ pOH} = 13.42$$

5. pH degri 8.0 olan 200 ml bir tampon hazirlamak icin 0.5 M amonyum klorur ve 0.5 M amonyaktan kacar ml almamiz gerekir (amonyum klorur icin $K_b = 1.8 \times 10^{-5}$)?



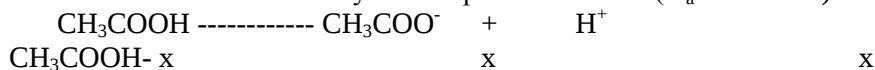
$$K_a = K_{su}/K_b = 1 \times 10^{-14}/1.8 \times 10^{-5} = 5.6 \times 10^{-10}, \quad \text{p}K_a = 9.25$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}], \quad 8.0 = 9.25 + \log (0.5 \text{ M} \times X \text{ ml}/0.5 \text{ m} (200 - X \text{ ml})),$$
$$-1.25 = \log (0.5X/100 - 0.5X), \text{ logaritmadan kurtarmak icin ters logaritmasini alalim,}$$
$$0.5X/100 - 0.5X = 0.056, \quad X = [\text{NH}_3] = 11 \text{ ml}, \quad 187 \text{ ml } \text{NH}_4\text{Cl}$$

6. 50 ml 0.2 M astik asitle 150 ml 0.4 M NaOH'in karisimindan cikan solusyonun pH? ($\text{p}K_a = 4.74$).

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}], \quad \text{pH} = 4.74 + \log (150 \times 0.4/(500 \times 0.2) - (150 \times 0.4)) = 4.91$$

7. Kac molar asetik asit solusyonunun pH'i= 3.50'dir? ($K_a = 1.76 \times 10^{-5}$).



$K_a = x^2 / CH_3COOH - x$, $1.76 \cdot 10^{-5} = x^2 / CH_3COOH - x$
 $pH = 3.5$ ise, $[H^+] = x = 3.16 \cdot 10^{-4} M$, dolayisi ile $1.76 \cdot 10^{-5} = (3.16 \cdot 10^{-4})^2 / CH_3COOH - x$,
 x 'i ihmal edersek, $CH_3COOH = 5.68 \cdot 10^{-3} M$.

8. Kac ml 0.0105 M NaOH ile pH'i 2.8 olan 50 ml asetik asiti notr hale getirebiliriz?

$pH = 2.8$, $[H^+] = 1.58 \cdot 10^{-3} M = 1.58 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$, $1.58 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \times 0.05 l = 7.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$

bir mol NaOH 1 mol asetik asiti notralize edeceginden, $7.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ NaOH eklememiz gerekir. Elimizdeki NaOH solusyonu 0.0105 mol/l oldugundan,
 $7.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / 0.0105 \text{ mol/l} = 7.5 \cdot 10^{-3} \text{ litre} = 7.5 \text{ ml}$

9. Eger 50 ml 0.1 M CH_3COOH solusyonuna 25 ml 0.2 M NaOH eklerseniz pH?

NaOH 25 ml $\times$ 0.2M = 5 mmol

CH_3COOH 50 ml $\times$ 0.1M = 5 mmol

Her ikisi de ayni esdeger miktarda olduklarinda ortamda sadece bunlarin tuzu (sodyum asetat) bulunur, 5 mmol tuz/75 ml = 0.067 M

$CH_3COO^- + HOH \rightleftharpoons CH_3COOH + OH^-$

0.067-x

x

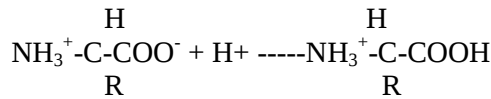
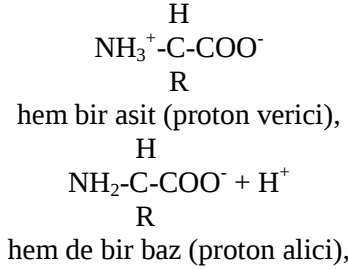
x

$K_h = 5.75 \cdot 10^{-10} = x^2 / 0.067$, $x = [OH^-] = 6.19 \cdot 10^{-6} M$, $pOH = 5.21$, $pH = 8.79$

10. 0.02 M 100 ml asetik asitin 0.01 M NaOH ile titrasyonundan cikan titrasyon egrisini gosteriniz (NaOH istenilen miktarlarda alinip titrasyon egrisi cizilebilir).

4. Hafta: Amino Asitler ve asit-baz ozellikleri

Amino asitler hem asit ve hem de baz gibi davranabilirler. Cunku her amino asit en az bir asidik (COOH) ve en az bir bazik (NH₂) grup tasir. Asidik grup asidik pH'da (pH < 7.0) iyonizasyon sabitesi (pK_{a1}), bazik grup bazik pH'da (pH > 7.0) iyonizasyon sabitesine (pK_{a2}) sahiptir. Ancak her iki grup da fizyolojik pH'ya yakin pH'larda (pH = 7) iyonize durumda bulunurlar. Bu sekilde birer asit ve baz grubu bulunduran amino asitler dolayisi ile pH = 7.0'de notr (zwitteryon) formda bulunurlar ve elektrik alanda hareket etmezler (elektro pozitif yuk bir elektro negatif yuku dengelediginden molekulun net yuku sifirdir ve elektrik alanda boyle bir molekul ne pozitif ve ne de negatif kutba dogru hareket eder). Bu noktaya izoelektrik nokta (pI) denir. Ornegin, alaninin zwitteryon formu (notr hali),

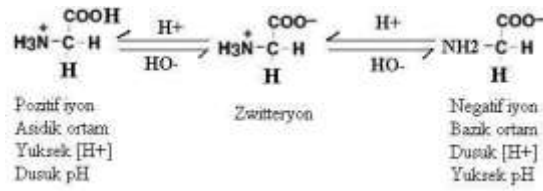


olarak davranabilir. Bu cesit ikili ozellik gosteren maddelere **amfoterik** veya **amfolit** adi verilir.

Amino asitler bu asit ve baz gruplarından dolayı karakteristik titrasyon egrilerine sahiptirler. Titrasyon, ortama azar azar proton ilavesi veya ortamdan proton alınması ile olur. Her molekul baz eklenmesine karşılık amino asit molekulundan bir adet proton ayrılır. Ornegin glisinini ele alırsak, asetik asit gibi monoprotonik asit olan bu amino asit dusuk pH (yuksek H⁺ iyon konsantrasyonlu bir ortamda) tamamen protone halde bulunur: NH₃-CH₂-COOH. Titrasyon egrisinin ilk basamaginin ortasında COOH grubu protonunu kaybeder ve dolayisi ile esit mol konsantrasyonda NH₃-CH₂-COOH ve NH₃-CH₂-COO⁻ bulunur. Bu nokta ayni zamanda tamponlama kapasitesinin yuksek oldugu ilk pK_a degerini verir ve pH titre edilen grubun pK_a'sina esittir. (pK_a'nin iyonizasyon reaksiyonunun denge sabitesi oldugunu hatirlayiniz ve ayni zamanda bir grubun proton verme egilimini ifade eder. pK_a'da 1 unitelik artis, ornegin, 4.8'den 5.8'e cikmasi deprotonasyonda 10 kat etki yapar). Titrasyona devam edersek, yani baz ekelemeye (ornegin NaOH) devam edersek, ikinci bir noktaya ulasiriz ki, bu noktada glisin hemen hemen tamamen NH₃⁻CH₂⁻COO⁻ formunda bulunur, yani dipolar bir iyon seklinde. Iki pK_a arasindaki bu nokta izoelektrik nokta veya izoelektrik pH olarak bilinir ve pI seklinde ifade edilir. Bu noktada glisin tamamen iyonize formda bulunur ancak bir adet negatif ve bir adet pozitif yuk tasidigindan, net bir elektrik yuku tasimaz (zwitteryon formunu hatirlayiniz). Izoelektrik nokta (pI) degeri iki pK_a'nin aritmetik ortalamasi alinarak bulunur. Ornegin glisin icin pK_{a1} = 2.34 ve pK_{a2} = 9.60 oldugundan, bu amino asitin pI'si,

$$pI = (pK_{a1} + pK_{a2}) / 2 = 5.97 \text{ dir.}$$

Titrasyon egrisinin ikinci basamaginda glisinin NH₃⁺ grubundan bir proton ayrilir ki bu noktada ikinci tamponlama bolgesi (pK_{a2}) bulunur. Titrasyon yaklasik pH = 12'de tamamlanir. Burada en yogun bulunan iyonik bileşik NH₂-CH₂-COO⁻dur.



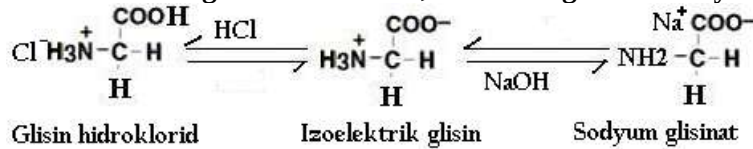
Amino asitlerin hepsinde alfa karbon atomuna bagli bulunan karboksil ve amino grubu benzer fakat ayni olamayan pKa degerlerine sahiptir ($\text{pK}_{\text{COOH}} = 2-3$ arasinda, $\text{pK}_{\text{NH}_3^+} = 9-10$ arasi). Degisik pH ortamlarinda glisin amino asitinin bulunduğu 3 durum (asidik, bazik, ve neutr) esasen butun amino asitler icin gecerlidir. Ancak, neutr amino asitler iyonize olabilen birer amino ve karboksil gruplarina sahipken, bazik amino asitler bir karboksil ve en az iki amino grubu, asidik amino asitler ise bir amino ve en az iki karboksil grubuna sahiptirler. Dolayisi ile neutr amino asitler (tirozin ve sistein haric) 2 adet pKa degerine (biri asidik digeri bazik), asidik ve bazik amino asitler ise en az 3 adet pKa degerine sahiptirler (bulundurduklari ikinci amino veya karboksil gruplarindan dolayi). **Proteinlerin iyonik ozellikleri de esasen bu yan zincirdeki asit (CCOH) veya baz (NH₂) grubu ile belirlenir** (cunku, alfa karbon atomuna bagli amino ve karboksil gruplari peptid baginin yapimina girdiklerinden, iyonizasyon gostermezler). Amino asitler bulunduklari ortama gore hem asidik ve hem bazik karakter gosterebilirler. Bu formun ortamdaki miktarlari ortam pH'sina baglidir. Amino asitlerin zwitteryon formunda bulunduğu (neutr) bolge onlari ayni zamanda izolektrik noktasini (pI) verir. Burada amino asitler net negatif veya pozitif yuk tasimadiklarindan elektrik ortamda hareket etmezler (pozitif yuk= negatif yuk oldugundan). Asidik ortamda ($\text{pH} < \text{pI}$), pozitif iyon tasiyan turlerin konsantrasyonu artarken, zwitteryon formunda bulunan molekullerin konsantrasyonu azalir (denge sola kayar). Ancak, bazik bir ortamda ($\text{pH} > \text{pI}$) negatif iyonun konsantrasyonu artarken yine zwitteryon formun konsantrasyonu azalir (denge saga kayar). Neutr amino asitler icin bu yapisal degisimler pH degisimlerine direnc gosterir (yani tampon gibi davranirlar). pI degerinin 2 pH birimi altindaki ve 2 pH uzerindeki pH'larda amino asitin % 98'inden fazlasi zwitteryon formunda bulunurken, oldukca asidik ortamda ($\text{pH} \approx 1.0$) neutr amino asitler % 90'in uzerinde pozitif iyon olarak bulunur. Oldukca bazik ortamda ($\text{pH} \approx 12.0$) neutr amino asitler % 90'in uzerinde negatif iyon seklinde bulunurlar. Bir neutr amino asit icin:

$\text{pH} = \text{pI} \pm 2.0$ ise > % 98 zwitteryon

$\text{pH} \approx 1.0$ ise > % 90 pozitif iyon

$\text{pH} \approx 12.0$ ise > % 90 negatif iyon

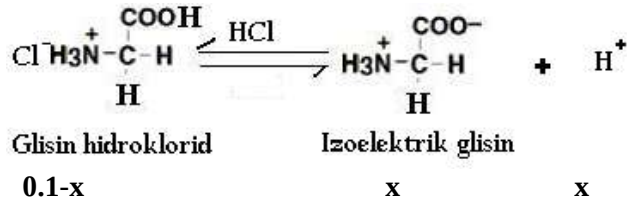
Ornek 1. Asidik veya bazik ortamda (HCl ve NaOH) glisin hangi formlarda bulunur? Boyle bir ortamda glisin uc formda bulunur: glisin hidroklorid, izoelektrik glisin ve sodyum glisinat:



Asidik ve bazik amino asitlerin yapisi pH degisimlerinden daha degisik (hizli) etkilenir. $\text{pH} = \text{pI}$ olduğu zaman bu amino asitlerde bir amin veya karboksil grubu yuksuz bulunurken amino asit zwitteryon formunda bulunur (genellikle once alfa karbon atomuna bagli amino veya karboksil gruplari iyonize olur). Ortam pH'i daha da artarsa (H^+ iyon konsantrasyonu dusurse) asidik amino asitlerin ikinci karboksili de COO^- iyonize olur ve amino asit net negatif yuk tasir. Ancak, ortam pH'i dusurse (H^+ iyon konsantrasyonu artarsa) bazik amino asitlerin ikinci amino grubuna da bir proton (H^+) baglanir ve amino asit net pozitif yuk tasir. Neutr amino asitlerin tersine, pI degerinin 2.0 birim altindaki veya ustundeki pH'larda bu amino asitlerin % 90 fazlasi net yuklu iyonlara donusmus haldedirler (zwitteryon degil). Hatirlanmasi gereken onemli bir nokta, **butun amino asitlerin (asidik, bazik veya neutr) amino ve karboksil gruplari fizyolojik pH'da ($\text{pH} \approx 7.0$) iyonize halde bulunurlar.**

Ornek 2. İlk soruda verilen glisin formlarının 0.1 M solusyonlarının pH'leri nedir?

Glisin hidroklorid formunda karboksil grubu yuklu amonium iyonundan cok daha kuvvetli bir asittir ($pK_{a(COOH)} = 2.34$ iken, $pK_{a(NH_4^+)} = 9.6$). Bu nedenle solusyonun pH'si esas olarak COOH grubunun iyonizasyon derecesi ile belirlenir:



$$K_a = x^2 / 0.1 - x = 4.57 \cdot 10^{-3}$$

Karboksil ve amino grubunun biri birine yakin pozisyonunda olamalarından dolayi, karboksil grubu asetik asitten daha kuvvetli bir asidik karakter tasir ve dolayisi ile asetik asit solusyonu icin ihmal edilebilecek x deger (0.1-x'teki) burada ihmal edilemez. Dolayisi ile,

$$4.57 \cdot 10^{-3} - 4.57 \cdot 10^{-3}x = x^2, \quad x^2 + 4.57 \cdot 10^{-3}x - 4.57 \cdot 10^{-3} = 0$$

kuadrik formül ile ($x = (-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}) / 2a$) bu esitligi x degeri icin cozersek, hidrojen iyon konsantrasyonunu bulmus oluruz. Onun da negatif logaritmasini alarak pH'yi hesaplayabiliriz. Bu islemleri sizler yapiniz.

$$x = [\text{H}^+] = 1.92 \cdot 10^{-2} \text{ M}, \quad \text{pH} = 1.72$$

boylece, glisin hidroklorid 0.1 M solusyonda % 19.2 iyonize olur ($1.92 \cdot 10^{-2} / 0.1 = 0.192 = \% 19.2$).

Izoelektrik glisin icin pH'nin pI'ya esit oldugunu ve onun da iki pKa degerinin aritmetik ortalamasin esit oldugunu bildigimizden, $\text{pH} = \text{pI} = pK_{a1} + pK_{a2} / 2 = 2.34 + 9.6 / 2 = 5.97$.

0.1 M sodyum glisinat solusyonunda esas pH esas olarak daha bazik olan amino (NH_2) grubu tarafından belirlenir (cunku, amino grubu karboksilat yani COO^- dan daha kuvvetli bir bazdir). Dolayisi ile boyle bir solusyonun pH'inin hesaplanmasinda ikinci pKa (pK_{a2}) kullanilir. Bu noktada ortamda daha fazla OH^- iyonu bulunacagindan, ilgili $K_b = K_{su} / K_{a2} = 3.98 \cdot 10^{-5}$.

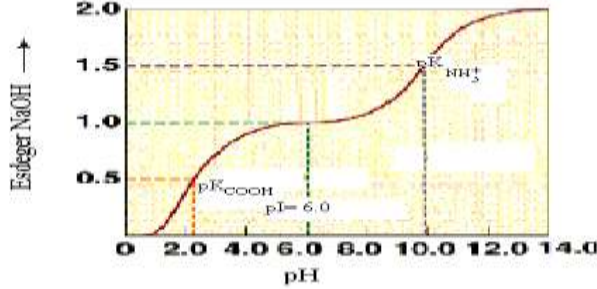
$$K_b = x^2 / 0.1 - x = 3.98 \cdot 10^{-5}, \quad x \text{ ihmal edilebilir (cunku } K_b \text{ ile asidin } 0.1 \text{ M konsantrasyonu oldukca farklidir)}, [\text{OH}^-] = x = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}, \quad \text{pOH} = 2.7, \quad \text{pH} = 11.3$$

Bir sonraki sayfadaki gibi bir titrasyon egrisinden onemli bilgiler saglanabilir. Iyonize olabilen gruplarin (or, NH_3 ve COOH) pK_a 'larinin hesaplanmasinin yaninda, bu gruplarin ozellikleri hakkında da bize bilgi verir. Ornegin, pK_a 'si 2.34 olan glisinin COOH grubu, pK_a 'si 4.76 olan astik asitin COOH grubundan 100 kattan daha fazla asidiktir (yani daha kolay iyonize olur). Bunu nedeni, amino asitte COOH 'a yakin bolgede bulunan pozitif yuklu amino (NH_3^+) grubundan kaynaklanir. Titrasyon egrisinden sagalanabilecek ikinci onemli bilgi ise titre edilen maddenin tamponlama ozelliginin bulunmasidir. Ornegimizde glisin icin iki tamponlama bolgesi vardir (iki adet iyonize grup icerdiginden). Bir tanesi pK_{a1} bolgesinde ikincisi ise pK_{a2} bolgesindedir. $pK_a \pm 1.0$ tamponlamanin en iyi yapildigi bolgeye denk gelir (yani 2.34 ± 1.0 ve 9.60 ± 1.0). Bu araliklarda, tampon ilave edilecek asit veya baza karsi maksimum direnc gostererek pH'nin buyuk olcude degismemesini saglar. **pH > pI ise amino asit negatif yuklu, pH < pI ise amino asit pozitif yuklu duruma gecir** (bu durum proteinler icin de gecerlidir). Ornegin, arjinin ve lizin yan zincirinde bulunan bazik gruplardan (NH_2) dolayi fizyolojik pH'da ($\text{pH} = 7.5$) pozitif yukludurler (NH_3^+).

Bir adet karboksil ve bira adet amino grubu iceren amino asitlerin hepsi, glisine benzer titrasyon egrilerine sahiptir. Ancak, R grubu da iyonize olabilen amino asitler daha kompleks titrasyon egrilerine sahiptirler. Bu cesit amino asitlerde iki yerine uc titrasyon basamagi ve dolayisi ile uc adet pK_a 'ya sahiptirler. Cunku

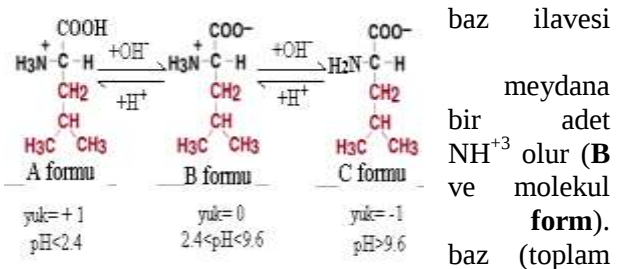
boyle amino asitlerde (ornegin asidik ve bazik amino asitler), R grubunda bir veya daha fazla NH_3^+ veya COOH bulunur. **Bir amino asitin veya proteinin iyonik formu herhangi bir pH degerinde belirlenebilir.**

Amino asitlerden losin icin asagida verilen titrasyon egrisinden anliyoruz ki, bu amino asitin $\alpha\text{-COOH}$ grubu $\text{pK}_{a1} = 2.4$, $\alpha\text{-NH}_3^+$ grubu ise $\text{pK}_{a2} = 9.6$ degerine sahiptir.



Dusuk pH'da (pH= 1) en cok bulunacak iyonik form **A formu** olup +1 yuke sahiptir ve elektrik alanda katoda (negatif kutba) dogru hareket eder. 0.5 esdeger baz ilavesi halinde karboksil gruplarin yarisı titre edilmiş olur (yani, $[\text{COO}^-]/[\text{COOH}] = 1$) ve dolayisi ile Henderson-Hasselbalch esitligine gore $\text{pH} = \text{pK}_{a1} = 2.4$ olur.

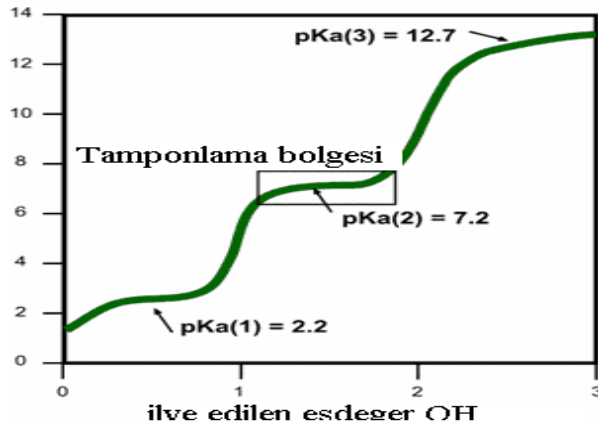
Amino asitin esdegeri miktarda (yani 1.0 esdeger) halinde butun karboksil gruplari titre olur ($\text{COO}^- \gg \text{COOH}$)'ken, NH_3^+ gruplarinda yine bir degisim gelmez. Bu amino asit sadece bir adet karboksil ve amino grubuna sahip oldugundan burada COO^- **formu**). Dolayisi ile net yuk sifir (zwitteryon) olur elektrik alanda hareket etmez (diger bir deyimle **notr** Ortama (yani zwitteryon formuna) 0.5 esdeger daha 1.5 esdeger) ilavesi halinde, $\alpha\text{-NH}_3^+$ gruplarinin yarisı titre edilmiş olur (yani, $[\text{NH}_2]/[\text{NH}_3^+] = 1$) ve dolayisi ile $\text{pH} = \text{pK}_{a2} = 9.6$ olur. Ortama 0.5 esdeger baz daha ilavesi halinde (toplam 2 esdeger baz) ise yuklu amino gruplarinin hemen hepsi bazik karakterli NH_2 'ye titre olur (**C formu**). Bu formda ortam pH'si 11'den buyuk olup amino asit net negatif (-1) yuk (NH_2 ve COO^-) tasir ve elektrik alanda anoda dogru hareket eder.



Bir amino asitin notr (zwitteryon) oldugu pH'yi tam olarak bilmek onemlidir. Cunku bu pH degeri **izoelektrik pH (pI)** olarak bilinir. Yukaridaki losin gibi basit molekuller icin pI degeri basit olarak iki pK_a degerinin ortalamasidir (yani, $\text{pI} = (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2})/2 = 2.4 + 9.6/2 = 6.0$). Bazi amino asitler 3 adet pK_a degerine sahiptirler (ornegin, bazik, asidik amino asitler, tirozin ve sistein). Boyle amino asitlerde pI ya asidik pK_a 'larin ya da en bazik pK_a 'larin ortalamasidir.

AMINO ASITERIN CALISILMASI

Protein biyokimyasi calismalarinda, bir protein izole edilip saflastirildiginda ilk is onun amino asit icerigini ve amino asit dizisini saptamaktır. Bunun icin protein once asitle hidrolize edilir ve aciga cikan



amino asitler nitelik (kalitatif) ve nicelik (kantitatif) olarak analiz edilir. Bu sekilde bu proteinde hangi amino asitlerin hangi sayida bulunduklari belirlanir. Yirmi cesit benzer kucuk molekulden olusmus bir karisimdan bu analizi yapmak bazi metodlarla kolaylikla basarilabilir. Bu metodlardan en onemli 3 tanesi **kromatografi**, **elektroforez** ve **santrifugasyondur**. Molekullerin yogunluk ve boyutlarina gore calisan santrifuj metodu bu ozellikleri birbirine benzeyen boyle kucuk molekulleri ayirt etmek icin pek uygun degildir. Ancak, amino asitlerin hemen hepsi her pH'da iyonize olduklarindan elektroforez gibi molekulleri elektrik yuk ve bu yukun buyuklugune gore ayirt eden bir metodla ayirt

edilebilirler. Ornegin, pH 1.0' da 20 amino asitten bazik olanlar (lizin, histidin, arjinin) katoda (negatif kutba) yakin bulunurken, diger 17 amino asit bu amino asitlerle jelin uygulama orijini arasinda bir yerde bulunurlar. Amino asitler arasindaki en onemli farkliliklar onlari yuk ve polarliginda oldugundan, bu ozellikleri goz onune alarak yapilan kromatografik ayirim islemleri en uygun metodlardandir. Kromatografik metodlardan en iyi bilinenleri, **kagit kromatografisi, ince-tabaka kromatografisi, iyon-degisim kromatografisi, gaz kromatografisi ve yuksek-performans likid kromatografisi**dir. Bunlardan ozellikle son ikisi pahali bir enstrumantasyon gosterse de profesyonel amino asit calsmalarinda en yaygin kullanim hassas metodlardandir. Bunlari yerine ogrenci laboratuvarinda daha kolay olan iyon-degisim kromatografisi tercih edilebilir. Bunun icin belli bir pH'da amino asitlerin tasidigi yuk saptanir. Ancak, spesifik bir pH'da butun amino asitler benzer yuklere sahip olabilirler.

Ornegin, amino asitlerin cogu pH < 4.0 da katyonik (pozitif yuklu) iken, pH > 8.0 ise amino asitlerin cogu anyonik (negatif yuklu) karakter gosterirler. Fakat, her amino asit kendine has bir iyonizasyon sabitesine sahip oldugundan bu yuklerin buyuklugu de farkli olacaktır. Ornegin, hem glutamik ve hem de aspartik asit pH 3.25'te hemen hemen ayni net yuke sahipken, bir katyon-degisim kromatografisinde bu iki amino asit biri birinden iyi bir sekilde ayrilabilirler. Ancak, net yukteki az bir fark bile onlari ayirmayi saglar. Aspartik asitin pI degeri 2.98 iken ($pI = pK_{a1} + pK_{a2}/2 = 2.09 + 3.86/2$), glutamik asit icin pI degeri 3.22 ($pI = 2.19 + 4.25/2$)'dir. Bunun anlami, pH = 3.25'de aspartik asitin net yuku yaklasik 0 iken, glutamik asitin ise 0 ila +1 arasinda bir yerdedir ve glutamik asitin bu kısmi pozitif yuku onu kolonda bulunan ve anyonik gruplar iceren kolon maddesine (cesitli recineler) daha siki baglanmasini saglarken, aspartik asit baglanamaz ve dolayisi ile kolondan daha kolay ayrilir. Yani daha polar olan amino asit (aspartik asit) daha hizlica kolondan ayrilir (bildiginiz gibi aspartik asit glutamik asitten bir adet daha az metilen grubu icerir. Bu durum aspartik asitin daha polar olmasina neden olur). Sonuc olarak, amino asitlerin katyon-degisim kromatografisi (ornegin, Na⁺ yuklu recine) ile ayrimi iki esas faktor tarfindan belirlenir: **1. yuk:** spesifik bir pH'da pozitif yuk ne kadar buyukse o amino asit o derece kolondan yavas ayrilir, **2. polarlik:** amino asidin yan zinciri (R) ne kadar polar ise o amino asit o derece hizlica kolondan ayrilir (ornegin, serinin hidroksil grubu -CH₂OH, alaninin metil -CH₃ grubundan daha polardir).

Amino asitlerin bir karisimdan izolasyonu, miktarlarinin belirlenmesi icin en genis sekilde kullanim teknik **iyon-degisim kromatografisi**'dir (digerleri, kagit kromatografisi, ince-tabaka kromatografisi, vs). Bu teknikle amino asitler tasidiklari yuk ve elektrik ozelliklerine gore digerlerinden ayrilir. Bir amino asitin yuku ve net elektrik yuku onun titrasyon egrisinden elde edilen pKa'sindan belirlenir. Kromatografik kolonlar, belli sentetik recinelerle doldurulur, pH'lari ayarlanir. Anyonik gruplari iceren kolonlara katyon-degisim, katyonik gruplari iceren kolonlara ise anyon-degisim kromatografisi denir. Her amini asitin bu kolondaki recineye ilgisi farklidir. Bu ilgi ortamın pH'si ile veya tuz konsantrasyonu ile hem arttirilabilir ve hem de azaltilabilir. Amino asidin nasil bir yuke sahip oldugu basitce amino asidin pI'si ile tamponun pH'sindan saptanir:

$$\Delta p = pI - pH$$

Δp pozitif ise ilgili amino asit net pozitif yuk tasir. Dolayisi ile boyle bir amino asit katyon-degisim kromatografisinde recineye daha kuvvetli baglanir. Eger Δp negatif ise amino asit net negatif yuke sahiptir ve bu kolona daha az ilgi duyar ve dolayisi ile kolondan en erken bu amino asit ayrilir.

Amino asit gibi yuklu molekuller onlari bir elektrik alandaki hareket farklilikklarina gore de ayirt edilir. Buna elektroforetik hareket (EH) denir. Tamponlanmis yari kati (jel) bir ortamda bu cesit molekullerin hareketi yuk/kutle oranina baglidir:

$$EH = -\Delta p / MA, \quad (MA = \text{Molekul agirlik})$$

Eger EH pozitif bir degere sahipse, molekul yani amino asit veya protein pozitif kutba dogru hareket eder, tersi durumda negatif kutba dogru hareket eder.

Ornek: pI degeri 9.74, MA'si 146 olan lizin ile pI degeri 3.22 ve MA'si 147 olan glutamik asit pH 4.7 olan bir ortamdaki hareketleri (EH) nasil olacaktir? Yukaridaki esitlikten gorebiliriz ki, $EH_{\text{lizin}} = -0.0345$ iken $(-(9.74-4.7))/146 = -0.0345$, $EH_{\text{glut}} = +0.01$ dir $(-(3.22-4.7))/147 = +0.01$. Dolayisi ile buradan cikrabiliriz ki, lizin negatif kutba dogru hizlica hareket edecekken, glutamik asit pozitif kutba dogru gidecektir. Bu teknigin en gelismis sekli yuksek performansli sivi kromatografisi veya ingilizce deymi ile high-performance liquid chromatography (HPLC)'dir. Bu teknik daha kuvvetli recinelerle yuksek basinc altinda madde ayrimina dayanir.

Tum amino asitler karboksil ve amino grubu tasidiklarindan, kimyasal reaksiyonlara ugrayabilirler. Amino gruplari asetil ve formillenirken, karboksil gruplari esterlesebilir. **Ninhidrin reaksiyonu** en yayginidir. Bu reaksiyonla mikrogram miktarinda amino asit belirlenebilir. Amino asitler ninhidrinle beraber isitildikleri zaman, serbest amino grubu tasiyan amino asitlerin hepsi menekse renk alirlar. Prolin serbest bir amino grubu icermediginden (bu amino asit bir imino grubu icerir) sari renk alır. Olusan rengin yapmis oldugu absorpsiyon ortamdaki amino asit konsantrasyonu ile direkt orantilidir (bu tekniği, 260 nm'de protein konsantrasyonun bulmaya yarayan ve aromatik amino asitlere dayanan yontemle karistirmayiniz).

SORULAR

1. Asagida verilen amino asitlerin bulunduklari pH'daki net yuklerini belirtiniz.
Alanin pH= 3.0, aspartik asit pH= 4.0, lizin pH= 8.0 serin pH= 6.0, histidin pH= 9.0
2. Lizin amino asidi pH 2, 5 ve 10'da en cok hangi iyonik formlarda bulunur?
3. Amino asitler bazan tampon maddesi olarak kullanilirlar. Aspartik asit, histidin ve serin iceren bir tamponun uygun tamponlama pH'lari nedir?
4. Alanin, glutamik asit ve arjinin iceren bir karisim (pH 6.1) zayif bazik bir iyon-degisim kromatografisinde (pozitif yuklu) hangi sira ile bu amino asitlerin ayrilmasi saglanir? Neden? Ayni islem negatif yuklu (asidik anyon-degisim kromatografisi) iyon-degisim kromatografisi ile olsaydi, bu amino asitlerin ayrilma sirasi ne olurdu?
5. pI degerleri verilen amino asitler pH= 3.0 olan bir tamponda cozunmusler ve ayni tamponla ayrilanan bir katyon-degisim kromatografi kolonuna yuklenerek ayirt edilmislerdir. Amino asitler kolondan hangi sira ile ayrilirlar? ($pI_{\text{asp}} = 2.98$, $pI_{\text{glisin}} = 5.97$, $pI_{\text{tre}} = 6.53$, $pI_{\text{los}} = 5.98$, $pI_{\text{liz}} = 9.74$).

5. Hafta: Proteinler, kalitatif ve kantitatif calismalar

Bir proteinin fonksiyonunu anlamadan anahtarı onun yapısını anlamaktan geçer. Nükleik asitlerin tersine, proteinler uniform, düzenli yapılar göstermezler. Bunun nedeni 20 çeşit amino asidin proteinden proteine farklı sayı, dizin ve çeşitte bulunmalarıdır. Bu amino asitlerin birbirine bağlanma özelliklerine bakarak (hem primer ve hem de daha ileriki yapılarda) bir proteinin fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında fikir sahibi olabiliriz (örneğin, onların erime özellikleri, zincir yapıları, vs.).

Teorik olarak polipeptitlerin çeşitliliği sonsuz sayıda olabilir. Bir protein zincirindeki herhangi bir amino asidin 20 farklı amino asitten biri olabileceğini düşünürsek bunun sebebi anlaşılar. n sayıda amino asit içeren bir proteinin 20^n sayıda farklı zinciri olabilir. Örneğin, 100 amino asitten oluşan normal büyüklükteki bir protein için 20^{100} (veya 1.27×10^{130} , yani 127'nin arkasında 128 tane sıfır) adet farklı zincir yapılabilirliği teorik olarak mümkündür. Bu değer evrenin toplam 9×10^{78} olan atom sayısından daha büyüktür. Bir proteinin kendine has özelliği onun amino asit sayısından çok, bu amino asitlerin dizilim sırası ile belirlenir. Örneğin, her harf bir amino asite denk gelmek kaydı ile KAÇMAK ve ÇAKMAK kelimeleri aynı amino asit türlerine eşit sayıda sahipken, bu amino asitlerin farklı sıralarda dizilmesi bu iki kelimemin tamamen farklı anlamlara gelmesine neden olmuştur. Bu durumun aynısı proteinler için de geçerlidir. Dolayısıyla iki protein benzer amino asit içerigine sahip olsa bile, bu amino asitlerin zincirde değişik pozisyonlarda olmasından dolayı çok farklı karakter gösterebilirler.

Örneğin, biri enzimatik bir özellik kazanırken, diğeri membranda yerleşecek bir protein özelliği kazanabilir. Dolayısıyla hem bu farklı dizilimler ve farklı amino asit içeriği ve hem de zincirlerin farklı büyüklüklerde olması sayesinde bir proteini diğer binlerce proteinden saflastırmak (purifikasyon) mümkündür. Makromoleküllerin bireysel özelliklerini çalışmak için saflastırma işlemi zor bir olay olsa da önemli bir gerekliliktir. Bu işlem zordur, çünkü toplamın kuru ağırlığının % 0.1'inden daha az miktarda bulunan bir maddeyi (proteini) yaklaşık % 98 oranında saflastırmak gerekir. Bu nedenle, ilk zamanlar saflastırılan proteinler genellikle hücrede büyük oranlarda bulunanlardı. Örneğin, hemoglobin kırmızı kan hücrelerinin ağırlığının 1/3'ünü oluşturur. Dolayısıyla bu proteinin bol miktarlarda saflastırılması nispeten çok daha az miktarlarda bulunan hücre proteinlerine göre daha kolaydır. Ancak, günümüzde moleküler klonlama teknikleri sayesinde, hücrede çok az miktarda üretilen bir protein bile rekombinant hücreler tarafından büyük oranlarda yapılarak çalıştırılabilir. Protein saflastırma işlemlerinde ilk basamak genellikle proteini hücre dışına çıkarmakla başlar. Bu da mekanik, fiziksel (havanda ezme, ultrason) veya kimyasal ve enzimatik yollarla olabilir. Bütün bu metodlarla hücreler parçalanır ve sitoplazmik içerik dışarı çıkarılır. Eğer çalışılacak protein membranda yerleşik bir protein ise, öncelikle organik bir solventle (etanol, metanol, benzen, kloroform) eritilmesi gerekir. Bu şekilde hücre dışına çıkarılan binlerce protein içinden bizim çalışacağımız protein çeşitli fraksiyasyon yöntemleri ile o proteinin çeşitli fiziko-kimyasal özellikleri göz önüne alınarak, basamak basamak diğer proteinlerden ve maddelerden saflastırılır. Burada, amaç istenen proteini diğer maddelerin içinden alıp saflastırmaktır. Bu saflastırma için göz önüne alınması gereken bazı parametreler ve bu parametreler için kullanılacak saflastırma yöntemleri aşağıdaki gibi sayılabilir:

Protein için göz önüne alınacak özellik

Yük (elektrik yük)

Polarlık

Büyüklük

Özgül bağlanma

Yöntem

İyon-değişim kromatografisi ve elektroforez

Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi), Ultrasantrifugasyon

Affinite kromatografisi

Bir protein çok sayıda yüklü grup içerdiğinden eririliği ortamdaki tuz konsantrasyonu, solventin polarlığı, ortam pH ve ısıya bağlıdır. Düşük iyon konsantrasyonlu bir ortamda bulunan bir proteine tuz eklenirse, bu proteinin eririliği artar. Bunun nedeni, ilave edilmiş olan iyonlar proteindeki çok sayıda bulunan iyonik yükleri kapsama alanına alarak onların diğer proteinler veya moleküller üzerindeki zıt yüklü gruplarla bir araya gelmesini engeller (eğer bu olmasa idi bir çok grup bu proteinler arasında bir araya gelecek ve onların agregasyonuna veya diğer bir deyişle presipitasyonuna neden olacaktı). Ancak, tuz eklenmeye devam edilirse (yüksek tuz iyonları sağlandığında) bu defa da eririlik azalır ve protein presipite olmaya başlar (yani çöker). Bunun ise nedeni, tuz iyonları ile protein ve diğer erimis maddelerin solvent (örneğin, su) için yarışmalarıdır.

Çok yüksek tuz iyonları içeren bir ortamda suyun hemen hepsi tuzu eritmede kullanıldığı için, proteinler ve diğer maddeler için onları erir halde tutacak su miktarı yeterli olmadığından, bunlar presipite olurlar. Bu durum proteinleri saflastırmak için önemli bir uygulama alanı bulur. Çünkü, **her protein farklı iyonik karakterinden dolayı farklı tuz konsantrasyonunda presipite olur. Amonyum sulfat tuzu** ile presipitasyon en yaygın olarak kullanılanıdır (yüksek eririliğinden dolayı, 0 °C’de 4 M, bu nedenle yüksek iyonik kuvvette solüsyonlar hazırlanabilir). İzoelektrik noktasını (pI) bildiğimiz bir proteinde ortam pH’i pI’ya yakın alınabilir ve böylece net yükün sıfır olduğu bu durumda altında proteinin eririliği minimum seviyede olur.

Bazı proteinlerin izoelektrik noktaları:

Protein	pI	Protein	pI
Pepsin	1.0	Miyogloblin	7.0
Ovalbumin (yumurta)	4.6	Hemogloblin	7.1
Serum albumin	4.9	Sitokrom c	10.6
Insulin	5.4	Histon	10.8
Kollojen	6.6	Lizozim (yumurta aki)	11.0

Cesitli **kromatografik metodlar** proteinlerin saflastırılmasında vazgeçilmez yöntemlerdir. Bunlarda genellikle saflastırılacak proteini içeren karışım (**hareketli faz**), porlu kati bir matriks ile dolu bir kolon (**duragan faz**) üzerine uygulanır. Çözünmüş maddeler (örneğin, proteinler) kolondan aşağı akarken, tasimis oldukları yük veya büyüklüklerine göre duragan faz tarafından tutulurlar veya salıverilirler. Protein ile kromatografik kolon dolgu maddesi arasındaki etkileşime göre cesitli kromatografik metodlar olabilir. En yaygın kullanılanları:

A. İyon-degisim kromatografisi: Yüklü moleküllerin kendilerine zıt yük taşıyan duragan ortama bağlanmalarına dayanır. *Anyonlar anyon-degisim kromatografisinde katyonik gruplara bağlanırken, katyonlar katyon-degisim kromatografisinde duragan faza bağlı olan anyonik gruplara bağlanırlar.* En yaygın kullanılan anyon degistirici **diethylaminoetil** (DEAE)’in bağlandığı matrikslerken: Matriks-CH₂-CH₂-NH(CH₂CH₃)₂⁺, en yaygın kullanılan katyon degistirici ise **karboksimetil** (CM)’in bağlandığı matrikslerdir: Matriks-CH₂-COO⁻. Matriks materyali olarak ise selüloz ve agarozdan yapılan reçineler en yaygın kullanılanlarıdır. Hem pozitif ve hem de negatif yük taşıyan proteinler gibi moleküller hem anyon (-) ve hem de katyon (+) degisim kromatografi materyaline bağlanabilirler. Proteinlerin kuvvetli veya zayıf bağlanmaları tamamen onların taşıdıkları pozitif ve negatif yüklerle ve bu yüklerin ortaya çıkmasını sağlayan ortam pH’i ile belirlenir. Proteinler önce uygun pH ve tuz konsantrasyonuna sahip bir tamponda çözünürler ve kolona yüklenirler. Aynı tamponla kolon yıkanarak zayıf bağlanmış proteinlerin kolondan yıkanması (elüsyon) sağlanır. İlgilenilen protein veya proteinler ise kolona daha sıkı bağlandıklarından bunların yıkanması ancak daha yüksek pH ve tuz konsantrasyonuna sahip bir tamponla yıkamakla olur. Yüksek pH ve tuz konsantrasyonu proteinin matrikse bağlı iyon-degisim maddesine olan ilgisini azaltarak oradan kopmasını sağlar. Elüsyon edilmiş proteinlerin konsantrasyonları basitçe 280 nm dalga boyunda vermiş oldukları absorbanlardan yararlanılarak bulunur. Bu dalga boyunda esas olarak üç aromatik amino

asit (tirozin, triptofan ve fenilalanin) isigi absorbe eder. Absorbe olan isik miktarı konsantrasyonla direkt iliskililidir.

Ornek 1. Arjinin, histidin ve losin amino asitlerini iceren bir solusyon pH=6.0'daki bir karboksimetil kolonuna yuklenirse, bu amino asitler hangi sıra ile ayrilirilar?

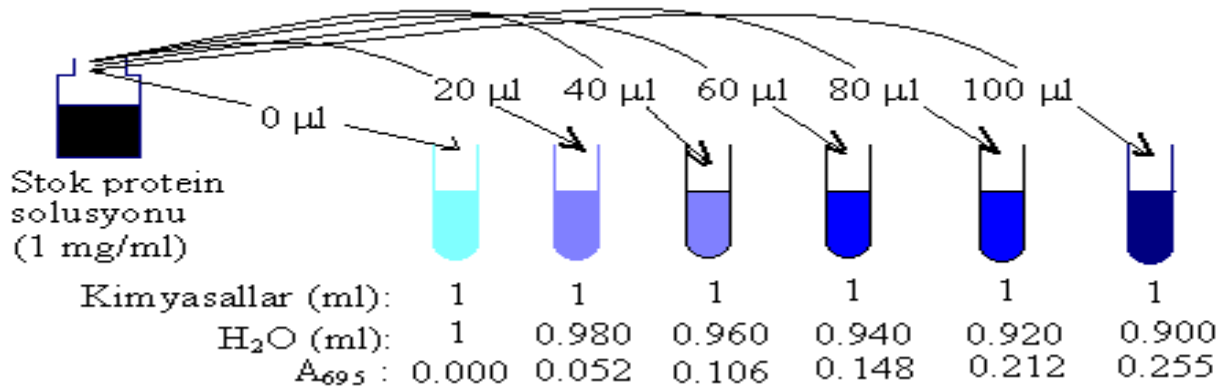
Once daha az katyonik (+) olan losin, daha sonra histidin ve en son da kuvvetli katyonik formda olan arjinin ayrilir.

B. Hidrofobik etkileşim kromatografisi: Matriks materyaline bir miktar oktil veya fenil gruplari ilavesi ile olur. Bu hidrofobik gruplar proteinin yuzeyindeki polar olmayan gruplarla etkilesime girer (her iki grup da polar olan solvent tarafından itilir). Bagli proteinler basitce azalan tuz konsantrasyonu iceren bir tamponla yikanarak ayrilirilar.

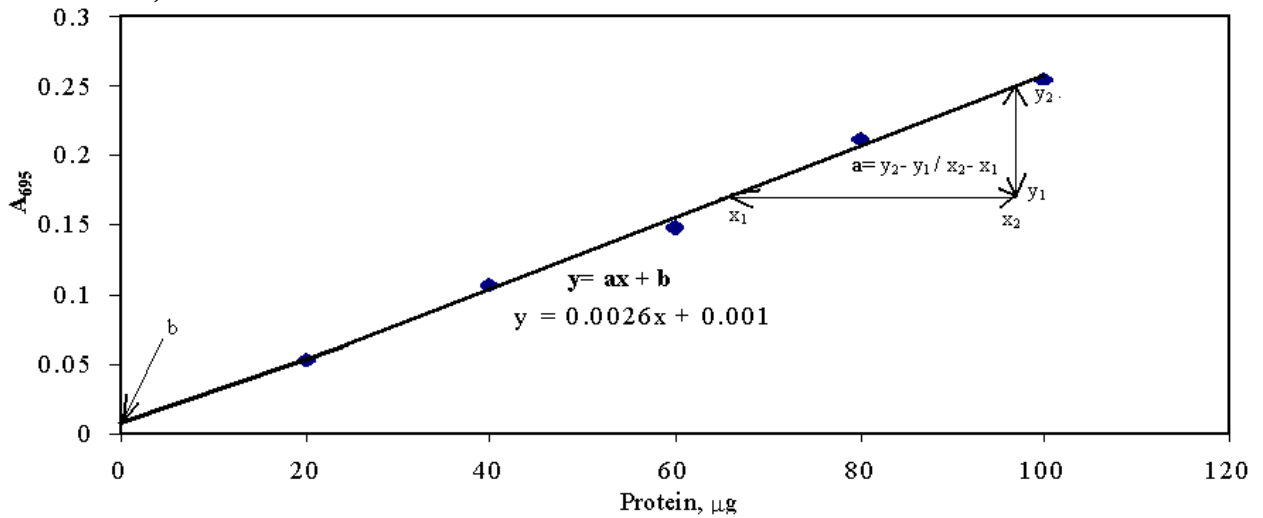
C. Jel filtrasyon kromatografisi: Bu metoda **buyukluge gore ayirim** veya **molekuler eleme kromatografisi** de denir. Burada molekullerin ayrimi yapı ve buyukluklerine gore olur. Duragan faz belli buyuklukteki molekkullerin iceri girmesini saglayan porlu bir matrikstir. Tipik olarak caplari bu porlardan daha kucuk olan proteinler boncuklari icine girip zaman kaybederken, caplari por caplarindan daha buyuk proteinler porlar arasindan hizlica gecerek ayrilirilar. Degisik por caplarına sahip matriksler kullanilarak veya matriks karisimleri yaparak istenen proteinlerin en azindan kismen saflastirilmaları mumkun olur.

D. Affinite kromatografisi: Proteinlerin ilginc bir ozelligi ise ozel molekullere kovalent olmayan bir sekilde kuvvetli baglanmalarıdır. Bu olaya affinite denir. Bu yontemde, duragan matrikse bu ozel molekuller (**ligand**) baglanir. Protein karisimi yuklenen bu kolonda, sadece o liganda ozgun protein matrikse bagli liganda baglanirken, digerleri kolondan kolayca ayrilirilar. **Immunoaffinite kromatografisinde** bir proteine karsi yapilan bir antikor matrikse baglanir ve protein karisimi bu ortama uygulandiginda sadece o ozel protein antikora baglanirken diger spesifik olmayanlar kolayca yikanip alinirlar. Bagli protein ise ortama yuksek konsantrasyonda ligand verilmesi sureti ile kolondan ayilabilir.

E. Yuksek performans likid kromatografisi (HPLC):Bu otomatik sistede 3-300 µm capindaki cam veya plastik kromatografik matriksten akis orani ve yuksek basinc ayarlanarak molekullerin ayrilmasi saglanir. Standart molekuller kullanilarak sistem standardize edilir ve bilinmeyen molekullerin boyutlari ve miktarlari belirlenebilir.Pahali bir sistem olmasına karsin en verimli ayrim metodudur.

TOTAL HUCRE PROTEİNİ TAYİNİ:

Calismakta oldugumuz bir hucre veya doku ekstresindeki protein konsantrasyonunu belirlemek icin yukaridaki gibi bir deney rutin olarak laboratuvarda yapilir. Burada, konsantrasyonunu bildigimiz bir protein solusyonu hazirlanir (ornegin burada 1 mg/ml). Bu solusyondan degisik miktarlarda alinarak tuplere aktarilir ve toplam hacim her tup icin ayni miktara ayarlanir (ornegin burada, 1. tupe protein solusyonu alinmamis ve kör olarak kullanilirken, diger tüplere degisik volümlerde protein solusyonu eklenmiş ve toplam hacim her tüp için 2 ml'ye tamamlanmistir). Birinci tüp 695 nm'deki absorbansi sifirlamak icin kullanildiktan sonra, diger tüplerin verdigi absorbans ayni dalga boyunda olculerek her tüpün icindeki protein miktarina karsi grafiklendirilmistir (protein stoku 1 mg/ml veya diger bir deyimle 1 μ g/ml oldugundan, tüplerde sirasi ile 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 μ g protein bulunacaktır):



Grafik veya verilerden de anlasilacagi uzere, **protein konsantrasyonu** ile **absorbans** arasinda lineer bir iliski vardir (butun noktalara en yakin gecen bir egri cizilir, lineer regrasyon). Egrininin **egimi (a)** ve **y** eksenini kestigi bolgeden (**b**), **y**'nin **x** ile iliskisini gosteren $y = ax + b$ esitligini elde edebiliriz. Bu ornegimizde, $b=0.001$, $a= 0.0026$, dolayisi ile $y=0.0026x + 0.001$ Boylece, protein konsantrasyonu bilmedigimiz calisma ektermizin verdigi absorbans (**y**) ne konsantrasyonda (**x**) bir protein solusyonuna sahip oldugumuzu hesaplayabiliriz. Lineer formulumuzun gercekten bu verileri yansitip yansitmadigini kontrol etmek icin her hangi bir y degerine karsilik yaklasik x degerini bulamilmemiz gerekir.

Ornegin, 0.10 absorbans, x ekseninde yaklasik 40 μg proteine denk gelmeli:

$0.10 = 0.0026x + 0.001$, burada $x = 38 \mu\text{g}$ bulunur ki, bu da egrinin tum noktalara en yakin gecen (veri noktalarinin uzerinden gecmeyebilir) bir ozellikle olmasindan kaynaklanir ve kabul edilebilir bir degerdir. Sunu unutmayin ki, 38 μg bize proetin solusyondaki gercek konsantrasyonu hakkında bilgi vermez. Protein solusyonun ml'sinde kac mg protein oldugunu belirlemek icin bu degeri gelmis oldugu volume (yani, 40 μl veya 0.04 ml'ye) bolmemiz gerekir: $38 \mu\text{g} / 0.04 \text{ ml} = 950 \mu\text{g/ml}$ 'e denk gelir (orijinal stok slusyonumuzda da proteinin 1 mg/ml veya 1000 $\mu\text{g/ml}$ oldugunu hatirlayiniz). Dolayisi ile bulunan deger (950 $\mu\text{g/ml}$) beklenen degere (1000 $\mu\text{g/ml}$) uygunluk gostermektedir.

Ornek 2. Yukaridaki standarda gore konsantrasyonunu bilmediginiz bir protein solusyonundan 0.25 ml aliyorsunuz ve standarttaki gibi toplam hacmi su (0.750 ml) ve kimyasallarla (1 ml) toplam 2 ml yapıyorsunuz. Bu tupteki solusyonun verdigi absorbansi (A_{595}) 0.657 olarak okuyorsunuz. Bu proteinin orijinal solusyondaki konsantrasyonu nedir?

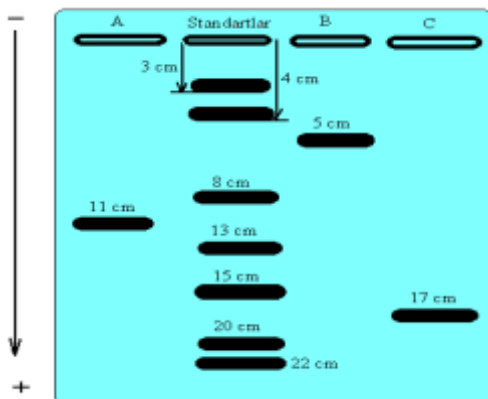
Hesplanan lineer egri formulunde y degeri yerine 0.657 konulursa; $0.657 = 0.0026x + 0.001$, $x = 252 \mu\text{g}$ bulunur. Fakat bu absorbası okunan tupteki protein miktarıdır. Bu kadar protein orijinal solusyonun 0.25 ml'sinden geldiginden, orijinal solusyonda; $252 \mu\text{g} / 0.25 \text{ ml} = 1008 \mu\text{g/ml}$ protein var demektir.

Uygulama: Proteinlerin absorpsiyon karakteristikleri, spektrofotometrik olarak kantitasyonu (miktarı) ve kalitatif (niteliği) analizleri, standart egri olusturma gibi konular uygulamalı olarak verilecektir. Bunun icin Asistanınız'ın size verecegi materyal ve metodlar kullanılacaktır.

PROTEINLERİN ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİ:

Elektroforez, iyonik molekullerin elektrik alanda yurumesidir. Elektrik alanda molekuller yuklerinin tersi tarafa dogru yuk ve buyukluklerine gore yururler. Proteinlerin molekul agirliklarinin belirlenmesinin yaninda, bu metod ayni zamanda protein purifikasyonu (saflastirma) icin de kullanılabilir. Proteinler icin en yaygin kullanılan jel matriksi **poliakrilamid** jellerdir. Jelin konsantrasyonu ayarlanarak por buyuklukleri amaca uygun hale getirilebilir. Yuksek konsantrasyonlu jeller kucuk porlu bir matriks olustururlar. Yuksek pH'li (> 9.0) ortamda hemen tum proteinler negatif yuklu olduklarindan elektrik alanda anoda (+) dogru hareket ederler. Dolayisi ile ayni yuk ve buyukluge sahip proteinler ayni bolgeye yuruyup bir bant olustururken, farklılar farklı pozisyonlarda kalirlar. Uygun protein boyalari ile boyandiklarinda bu bantlar jel uzerinde gozle gorunur duruma gelecek sekilde boyanirlar. Saflastirma islemi icin proteinler genellikle boyanmadan jelin ilgili bolgesinin keseilip eritilmesi ile olur.

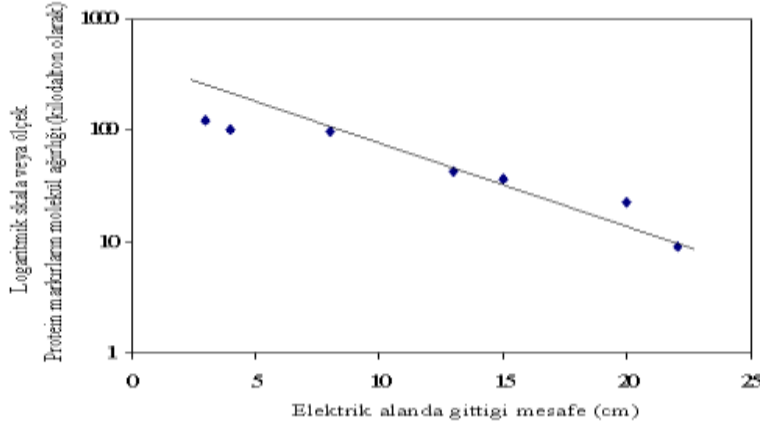
SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi): Yukaridaki metodun aynisidir. Sadece farklı olarak burada proteinler SDS (bir cesit deterjan, $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-] \text{Na}^+$) gibi denature edici maddelerle denature edilirler. Bu amfifilik deterjan proteinleri kararlı hale sokan hidrofobik etkilesimleri bozarak onlari zincir sekline (primer yapı) sokar. Bir cok protein mg basına 1.4 mg SDS baglar (diger bir deyimle iki amino asit icin bir molekul SDS). SDS'in tasidigi buyuk negatif yuk proteinlerin ic dinamiklerini saglayan yAlt uniteleri disulfid (-S-S-) baglari ile birbirine bagli proteinlerin bu alt unitelerini birbirlerinden ayirmak icin ayrıca ortama indirgeyici bir madde olan **2-merkaptotanol** ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ilave edilir. Bu nedenle bu yontemjel filtrasyon yontemindeki gibi proteinlerin buyukluklerine gore ayirimini saglar.



Yandaki gibi bir jel (jole gibi bir madde) tipik olarak protein ve nukleik asitleri birbirinden ayirt etmek icin kullanirlar. Proteinler ve nukleik asitler bu elektrik akimi uygulanan matriks ortamda yuklerinin tersi yone dogru ve molekul agirliklarinin logaritmik fonksiyonu olarak ayrilirlar. Proteinler icin genel olarak polimerize olan **akrilamid jeller** kullanilirken (dolayisi ile bunlara poliakrilamid jeller denir), nukleik asitler (DNA ve RNA) icin daha cok **agaroj jeller** kullanilir. Ticari

olarak satılan ve molekul ağırlığını bildiğimiz ve konsantrasyonunu ayarlayabileceğimiz standart (markir) protein ve nükleik asitler kullanılarak, bilinmeyen örneklerimizin molekul ağırlıklarını ve de hücre içi konsantrasyonlarını bulabiliriz. Yani bu teknik güçlü bir kalitatif ve kantitatif analiz metodudur.

Örnek 3. Yukarıdaki jelde A, B ve C proteinlerinin yaklaşık molekul ağırlıklarını hesaplayınız. Bu sorunun cevabı da örnek 1'deki çözüme benzer yolla elde edilebilir...



ULTRASANTRIFUGASYON

Bir bardak içine su ve kum koyup calalayip bırakırsanız yerçekimi (9.8 m/s^2 hız veya xg) etkisinden dolayı zamanla kumun hepsi dibе çöker. Aynı gravitasyonel çekim kuvvetine maruz kalan makromoleküller ise solusyonda böyle bir durum göstermezler. Bunun nedeni, bu moleküllerin gelişigüzel termal hareketleri

(Brownian

hareketler) bu şekilde bir presipitasyon olmasına engel olarak onların solusyon içinde homojen olarak dağılı kalmasını sağlar. Ancak, bu makromolekülleri içeren solusyonlar çok yüksek hızlarla çevrildiklerinde (dakikada binlerce dönme) aynen kum örneğindeki gibi bunlarda dibе çökerler. Ultrasantrifuj aleti 1923 yılında Svedberg tarafından geliştirildi. Yüksek hızlı ultrasantrifujlerle dakikada 80,000 defa (rpm) dönüş ve dolayısı 600,000 xg 'ye ulaşan (yerçekimi hızının 60 bin katından fazla) gravite uygulanabilir. Bu çeşit santrifugasyon hız ve süresinin ayarlanması ile hücreden organellere onlardan da nükleik asitlere, proteinlere kadar bir çok yapı ve molekulun presipitasyonu (çöktürülmesi veya sedimentasyonu) mümkündür. Herhangi bir makromolekulun veya hücresel komponentin sedimentasyon oranı o maddenin büyüklüğüne bağlıdır (ayrıca maddenin içinde bulunduğu solusyonun konsantrasyonu ve çözünen maddenin moleküller yapısı da sedimentasyonda önemli rol oynar). Bir birim santrifuj kuvveti basına olan sedimentasyon hızı bir proteinin sedimentasyon sabitesini (10^{-13} saniye=Svedberg sabitesi) verir.

Bazı proteinlerin sedimentasyon katsayıları(S):

Protein	Molekul ağırlığı(kD)	S ($\times 10^{-13}$ saniye)
Lipaz	6.7	1.14
Sitokrom c	13.4	1.71
Miyoglobin	16.9	2.04
Laktat dehidrogenaz	150	7.31
Katalaz	222	11.2

Burada dikkat edilmesi gereken şey, molekul ağırlığı ile sedimentasyon oranı arasındaki ilişki lineer değildir (yani, S değerleri aritmetik olarak eklenerek bulunmaz). Bunu nedeninin de yukarıda açıkladığımız gibi, moleküllerin molekul ağırlığının yanında onların yapılarının da S'yi belirlemede rol oynamalarıdır. Proteinlerin sedimentasyon sabiteleri 1 S ile 50 S arasında değişir (ribozomlar ki bunlar birçok protein ve RNA'dan meydana gelmişlerdir 80 S büyüklükle ifade edildiklerini hatırlayınız). Daha büyük partiküller daha büyük sedimentasyon katsayılarına sahiptirler. Örneğin, virüsler için bu değerler 40 S ile 1000 S arasında değişir.

SORULAR

1. pH = 8.0 olan bir DEAE kolunundan glutamik asit, lizin ve valin hangi sıra ile ayrılır? Neden?
2. 280 nm dalga boyunda hangi peptid daha yuksek absorbens gosterir? Neden?
 - a. Glutamik asit-losin-glutamik asit-fenilalanin-treonin-losin-aspartik asit-glisin-tirozin
 - b. Serin-valin-triptofan-aspartik asit-fenilalanin-glisin-tirozin-triptofan-alanin
3. Iyon degisim kromatografisinin affinite kromatografisinden farki nedir?
4. Asagidaki bilgilerden bir proteinin alt unite kompozisyonunu belirleyiniz: jel filtrasyonla proteinin molekul agirligi 200 kD olarak belirlenmistir. Ayni protein SDS-PAGE ile 100 kD olarak belirlenmistir. Yine ayni protein merkaptotanol ile muamele edildikten sonra SDS-PAGE'de 40 ve 60 kD olarak iki farkli molekul agirlikta belirlenmistir. Bu proteinin muhtemel molekuler yapisini (alt uniteler bakimindan) aciklayiniz.
5. 0.1 M NaCl solusyonunda 2.6 S'lik sedimentasyon katsayisina sahip bir proteinin 1 M NaCl solusyonundaki sedimentasyon katsayisi 4.3 S olarak bulunmustur. Neden?

6. Hafta: Protein Pürifikasyonu I: Esseyler, Spesifik Aktivite, Fraksinasyon

Ökaryotik veya prokaryotik olsun herhangi bir hücre veya doku proteinlerini çalışırken başlangıçta gram miktarlarda protein elinizde bulunabilir. İstenilen bir protein bu kompleks binlerce farklı molekül ve yapıdaki proteinler arasından saflaştırıldığında elinizde sadece mg, hatta µg miktarlarda protein (saflaştırılmış protein) kaldığını görürsünüz.

Pürifikasyonda ilk basamak istenen proteine göre spesifik bir protein pürifikasyon metodunun seçilmesidir.

Spesifik bir essay ilgili proteinin karakteristiklerine göre seçilir. Bunlar:

- Enzimatik aktivite
- İmmünolojik aktivite
- Fiziksel karakteristikler (örneğin, moleküler ağırlık, spektroskopik özellikler, vs.)
- Biolojik aktivite

İmmünolojik olarak *Western blot* (protein hibridizasyonu) adı verilen bir yöntemle antikorlar kullanılarak bir proteinin hem hücredeki ekspresyon seviyesi ve hem de pürifikasyon sonucu istenen proteinin saflaştırılıp saflaştırılmadığı anlaşılır. Bu metot genellikle aşağıdaki basamakları içerir:

1. Saflaştırılmış protein PAGE'e tabi tutulur.
2. Jel nitrosellüloz membran üzerine konur ve yine elektroforetik olarak jeldeki proteinler nitrosellüloz filtrenin üzerine transfer edilir.
3. Nitrosellüloz filtre sıvı jelatine sokularak "bloke" edilir. Bunun nedeni membran yüzeyine spesifik olamayan proteinlerin bağlanmasını engellemek içindir.
4. Membran daha sonra özel proteinimize karşı geliştirdiğimiz bir antikorla inkübe edilir.
5. Nitrosellüloz membran daha sonra 4. basamakta kullandığımız antikora karşı oluşturulan başka bir antikorla muamele edilir. Örneğin, eğer 4. basamaktaki ilk antikorumuzu tavşanda oluşturup kullandıysak, bu basamakta kullanılan antikor "koyun anti-tavşan immünoglobini" olarak adlandırılabilir. Bunun anlamı tavşanda oluşturulan antikora karşı antikorun koyunda oluşturulduğudur. Dolayısı ile koyun antikorları tavşanda oluşturulan antikorların korunmuş özel bölgelerini (domain) tanırlar ve tavşan antikorlarının koyunda kullanılması bir immün cevaba neden olur ve **poliklon** olarak adlandırılan koyun antikorlarının yapımı indüklenir. Dolayısı ile membran üzerinde istediğimiz proteine bağlanmış tavşan antikorlarının bu korunmuş bölgeleri koyun antikorları tarafından bağlanır (sandviç).
6. Koyun antikorunun diğer bir özelliği onun kromojenik (renk veren) bir substratı ürüne çevirecek özel bir enzimi de kovalanet olarak bağlamış halde taşımasıdır. Bu enzim sayesinde nitrosellüloz filtre substratı içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, enzim kromojenik substratı renkli bir ürüne çevirecek ve oluşan ürünün membrana bağlı proteinimizin olduğu bölgeye yoğunlaşması ile saflaştırılan proteinin varlığı (veya yokluğu) belirlenir.
7. Böylece binlerce protein içinden (örneğin ekstraktaki veya lizattaki tüm proteinler arasından) istenen bir proteinin hem moleküler ağırlığı (jeldeki pozisyonları kıyaslanarak) ve hem de miktarı belirlenmiş olur.

Dot blot (nokta hibridizasyon) denen metotla PAGE yapılmadan da bir proteinin ekstrakt (lizat) içindeki varlığı belirlenebilir. Ancak bunun için **poliklonal antikorların** tersine, istediğimiz proteinin üç boyutlu yapısında oldukça özelleşmiş (epitop) bir bölgeyi tanıyacak **monoklonal antikorlar** kullanılır. SDS-PAGE proteini denatüre edip bu yapıyı (epitop) bozacağından, bu metot dot blot için kullanılmaz.

Değişik alanlardaki kullanımlarının yanında antikorlar protein saflaştırmalarında da kullanılırlar.

- Eğer özel bir proteine karşı oluşturulmuş yeterli miktarda antikor elde etmiş isek, bunlar kovalent olarak bir kromatografi matriksine (örneğin, sefadeks) bağlanabilir.
- Hücre ekstraktını böyle bir kolona uygularsak, istediğimiz protein matrikse bağlanmış antikorlar tarafından bağlanacak geriye kalan proteinler ise serbestçe aşağı akacaklardır.
- Kolona bağlanmış protein, kolon pH'sının hafif düşürülmesi (asetik asit) ile kolayca elüe (elde) edilir.

Protein pürifikasyonun bir seri fraksinasyonla olur: Burada,

- İstenilen protein esas olarak belli fraksiyonlarda yoğun bulunur (bu iş bir fraksiyon kollektörü ile yapılır).
- Diğer fraksiyonlarda bizim istediğimiz protein bulunsun da bu az miktarlarda olacak ve daha çok diğer proteinlerle kontamine durumda bulunacaktır.

Saflaştırma sırasında izlenmesi gereken bazı parametreler:

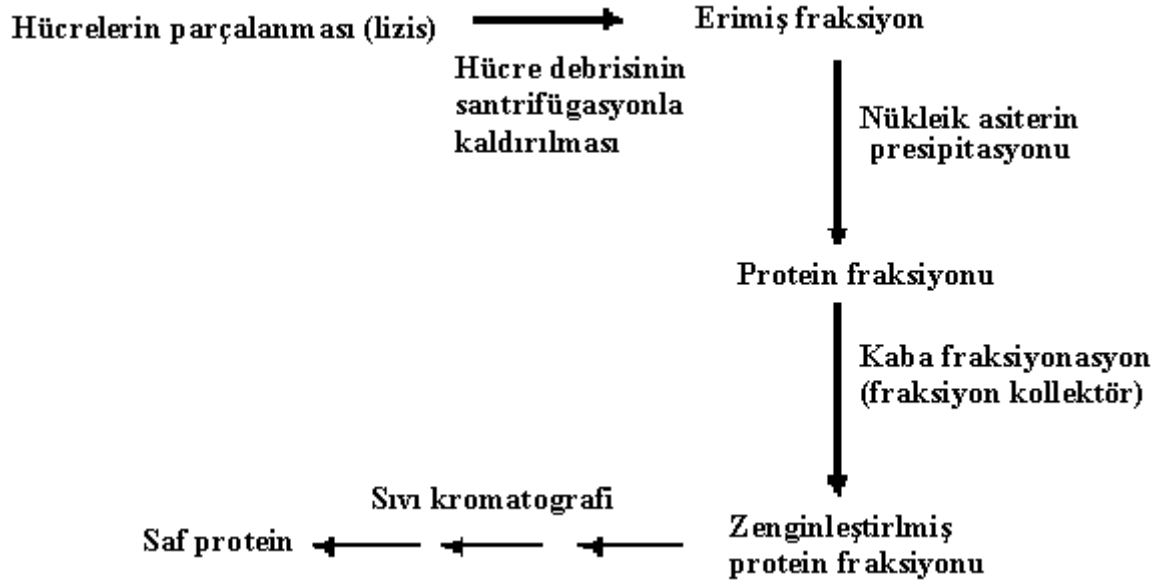
1. *Toplam örnek hacmi*
2. *Toplam istenen protein* (bu $A_{280} = 1.0$ mg/ml dikkate alınarak kabaca saptanabilir)
3. *O proteine veya enzime özgü metot kullanılarak birim aktivitenin (ünite) bulunması*

Yukarıdaki bilgiler bize her basamak pürifikasyonda,

1. *O basamaktaki % ürün (protein) miktarı*
2. *Spesifik aktivite* (ünite/mg total protein), 1 ünite enzimin dakikada 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı olduğunu hatırlayınız.
3. Her basamağın *saflaştırma verimi veya yüzdesi* (örneğin, bir protein ekstraktındaki veya lizattaki miktarına göre 5 kat zenginleştirilmiş ise bu 5x saflaştırma olarak gösterilir).

Protein saflaştırma basamakları boyunca sürekli olarak istediğimiz proteinin miktarında azalma ancak saflaştırma yüzdesinde artış görülecektir. Bazı durumlarda bol miktarda ancak saflık derecesi düşük proteinlerin saflaştırılması arzu edilebilirken, diğer bazı durumlarda ise proteinin yüksek oranlarda saf olması ancak miktarının az olabilirliği kabul edilebilir. Diğer bazı durumlarda ise proteinin hem bol miktarda ve hem de yüksek oranda saf olması arzu edilir. Bu durumlardan hangilerinin hangi amaçlar için geçerli olduğunu sizler araştırınız.....

Protein saflaştırmasında başlangıç basamakları



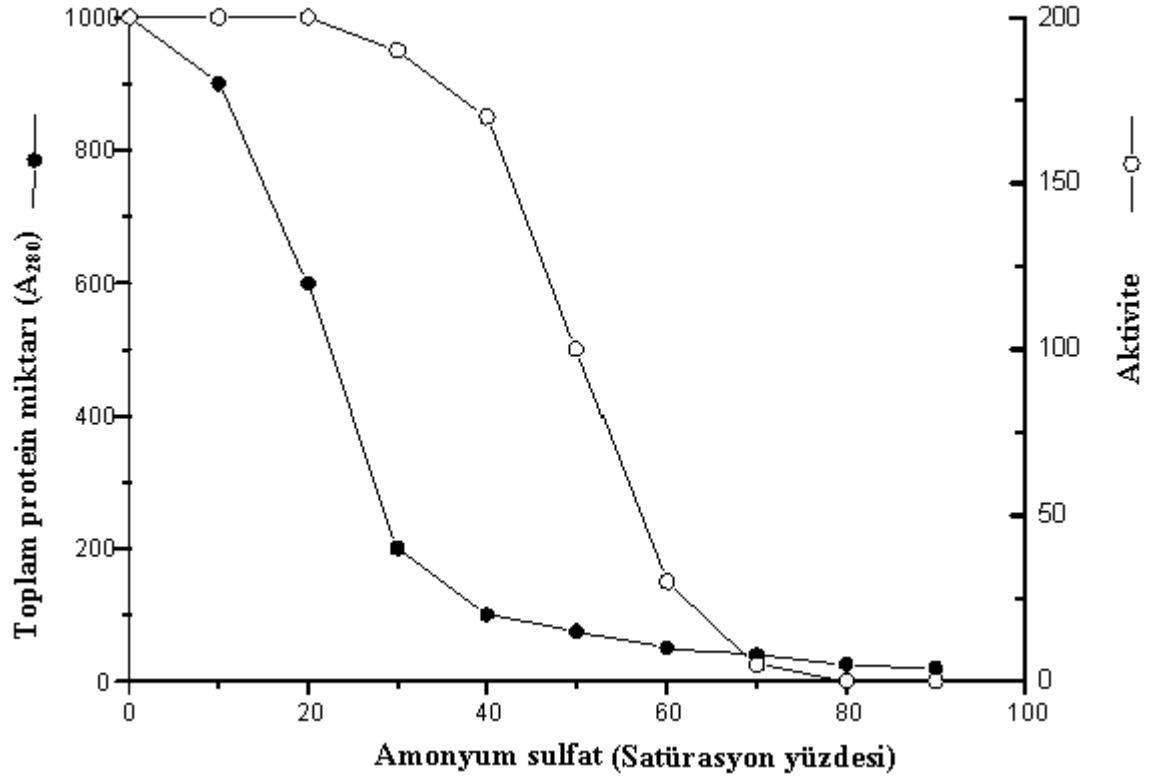
- Genel fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanında bir proteini saflaştırmak bazen de onun içinde bulunduğu kimyasal maddelerin ve diğer proteinlerin özelliklerini bilmek faydalı olur.
- Örneğin, *E. coli* proteinlerinin çoğu <50,000 Da veya daha düşük moleküler ağırlığa sahip olup izoelektrik noktalarında asidiktirler.

Lizattaki kontaminantlardan nükleik asitler *polyetilen imin*, veya *streptomisin sulfat* gibi büyük katyonik maddeler kullanılarak uzaklaştırılabilirler.

Proteinlerin kaba bir fraksiyonasyonu *amonyum sulfat* veya *poletilen glikol* presipitasyonu ile yapılır.

Amonyum sulfatulfate (% doyunluk)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
A ₂₈₀	1000	900	600	200	100	75	50	40	25	20
Aktivite (ünite)	200	200	200	190	170	100	30	5	0	0

Yukarıdaki tabloyu aşağıdaki gibi bir grafikte şematize edebiliriz. Bu grafiğin açıklamasını çalışınız!!!



- Örneğin yukarıdaki grafikten % 30 amonyum sulfatta lizattaki toplam proteinin yaklaşık % 80'ini presipite edebilirizki bu fraksiyonda istediğimiz proteinin aktivitesi % 95 civarındadır.
- % 80 amonyum sulfatla ise saflaştırmak istediğimiz proteinin hemen hepsinin presipite olduğunu ancak aktivitesinin oldukça azaldığı görülür. Bunları sizlerin grafik üzerinde okuyabilmeniz gerekir...

Böylece bizim istenen proteini saflaştırmak için,

1. Amonyum sulfatı % 30 satürasyon konsantrasyonunda ekleriz
2. Karışımı santrifüj eder ve pelleti atarız
3. Tekrar amonyum sulfatı % 80 satürasyon konsantrasyonunda ekleriz
4. Karışımı tekrar santrifüj eder ve pelleti koruruz. Pelleti uygun tamponda eritir diğer işlemlere (aktivite tayini ve ileri saflaştırma basamakları) geçeriz.

Buradan yaklaşık 5x saflaştırma ile % 97 oranında ürün (saf protein) eldesi bekleriz...

Protein Pürifikasyonu II: Kolon kromatografisi-İyon değişimi, Dializ ve Konsantrasyon

Kolon kromatografisi

Yukarıda bahsedilen başlangıç fraksinasyon basamaklarından sonra protein saflaştırmalarında tipik olarak kolon kromatografisine geçilir.

- Kolon kromatografisinde genel olarak bir cam boruya özel fiziksel ve kimyasal karakteristiklere sahip kolon matriksi (reçine) doldurulur.
- Bu karakteristikler farklı proteinlerle farklı şekillerde bağlanmalar meydana getirirler.
- Kromatografik reçinelerin bazıları:
 - İyon değişimi
 - Hidrofobik
 - Jel filtrasyonu
 - Afinite gibi özellikleri ile kullanılırlar

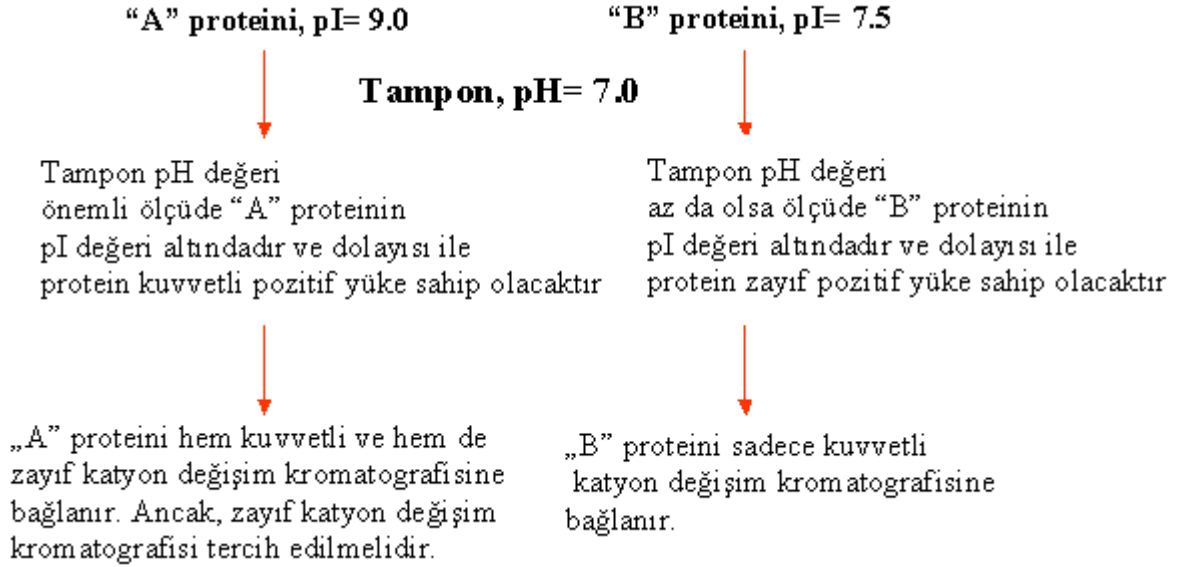
İyon değişimi

İyon değişim reçineleri üzerlerinde yüklü gruplar taşırlar.

- Bu gruplar asidik karakterli olabilirler ki bunlarda kolon bir katyon (+) değiştiricidir.
- Bazik karakterli gruplar ise anyon (-) değiştiriciler olarak bilinirler. Anyon ve katyonları, anod ve katodla karıştırmayınız (anod +, katod ise – kutuptur).

Anyon-Katyon tipleri	Fonksiyonel grup	Örnek
Zayıf katyon değiştiriciler	Karboksimetil	CM sellüloz/sefadex
Kuvvetli katyon değiştiriciler	Sulfopropil	SP sefadex
Zayıf anyon değiştiriciler	Dietilaminoetil	DE sellüloz/sefadex
Kuvvetli anyon değiştiriciler	Aminler	QAE sefadex

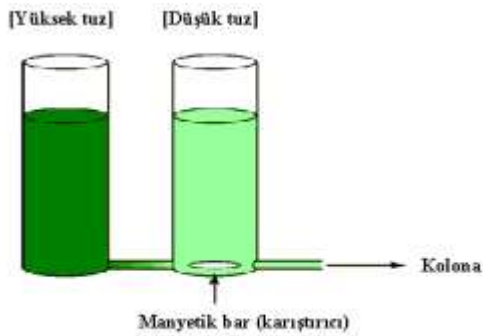
- Kolonlara örnekler genellikle düşük kuvvetli iyonik şartlarda (yani yüksek pH) uygulanır ve kolon matriksine bağlanırlar. Örneklerin kolondan yıkanması ve arıtılması ise daha yüksek iyonik konsantrasyonlar (düşük pH) yardımıyla yapılır.
- Örnek vermek gerekirse, bir protein kendi izoelektrik noktasından (pI) daha düşük pH'ya sahip bir tamponla kalibre olmuş katyon değişim kolon materyaline kolayca bağlanır, tersi durumda ise bağlanma gerçekleşmez. Ancak bu tersi durumda proteinimiz anyon değişim matriksine rahat bağlanabilir (yani kolon pH'sı proteinimizin pI'sından yüksek ise). Bunları amino asit ve proteinlerin asit baz karakterlerini göz önüne alarak ayrıntılı olarak anlamaya çalışınız!!..



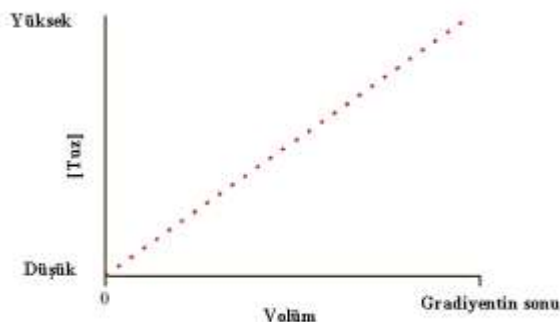
- Bu nedenle bir proteinin pI değerini bilmemiz onun saflaştırılmasında hangi yolları izleyeceğimiz konusunda bize önemli bilgiler verir.

Proteinlerin iyon değişim kolonlarından arıtımı (elüsyon)

- Proteinler iyon değişim kromatografilerine genellikle kovalent olmayan iyonik tuz köprüleri ile bağlanırlar. Böylece bu gruplara bağlanmak için uygun olan tuzlarla elüsyonlar gerçekleştirilebilir.
- Yukarıdaki işlem (yani tuzla yıkama) iki metotla gerçekleştirilebilir: 1. **Gradient** elüsyon 2. **Tek basamakta** elüsyon
- Gradient elüsyonda düşük tuz konsantrasyonundan yüksek tuz konsantrasyonuna yavaş yavaş gidilerek, ilkin zayıf bağlanan en sonra da en kuvvetli bağlanan proteinlerin elüsyonu gerçekleştirilir.
- Böyle bir tuz gradiyenti alt tarafta biri birlerine bir hortumla bağlı iki kabın kullanımı ile yaratılabilir. Kaplardan biri düşük konsantrasyonda tuz içeren tampon içerirken, diğeri yüksek tuz konsantrasyonlu tampon içerir:



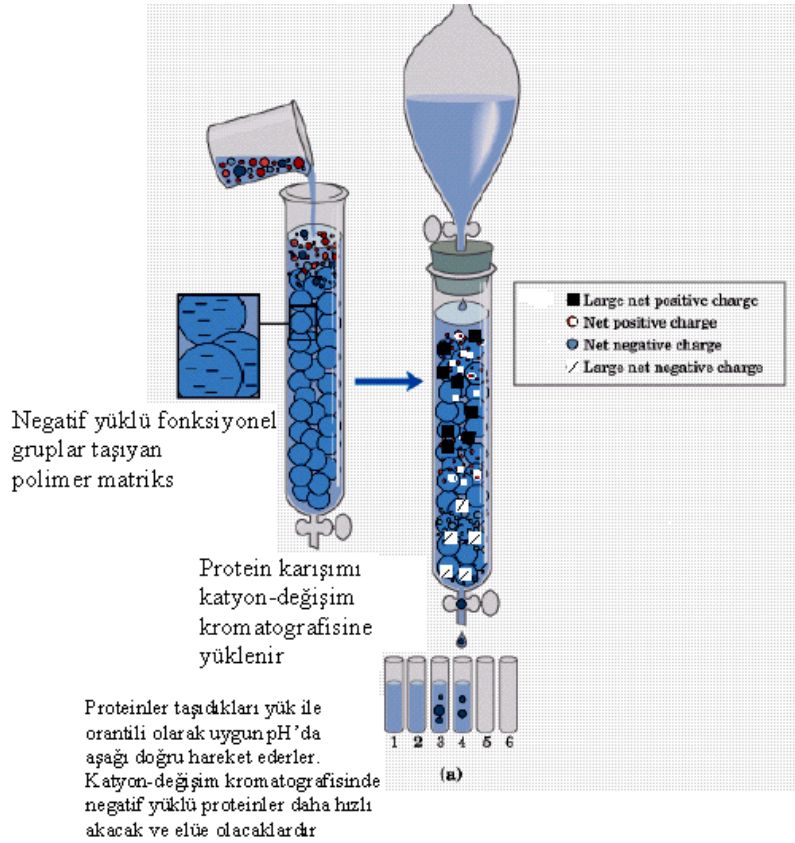
- Bu şekildeki bir sistem düşükten yükseğe doğru lineer bir tuz gradiyentinin oluşmasına sebep olacak ve en zayıf bağlanan proteinler en önce en kuvvetli bağlanan proteinler ise en son elüe edilmiş olacaklardır:



- Eğer daha önceden örnek proteinimizin hangi konsantrasyondaki tuzla elüe edildiğini biliyorsak, direk olarak o konsantrasyondaki tuzu tek bir kapta hazırlayıp tek bir basamakta proteinimizi elüe edebiliriz. Buna **tek basamakta elüsyon** denir.

- Bu çeşit bir elüsyon daha hızlı olmakta ve nispeten daha az miktarda protein solüsyonu gerektirmektedir.

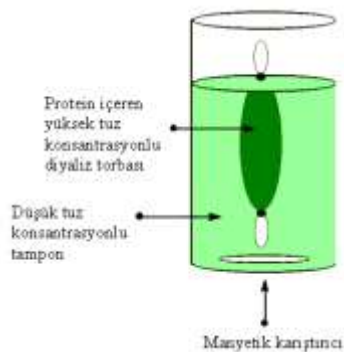
İyon değişim kromatografisinden elüe edilen bir proteinin oldukça yüksek tuz konsantrasyonlu bir ortamda bulunduğu unutulmamalıdır. Daha ileriki saflaştırma basamaklarına bu durum göz önüne alınarak geçilmelidir.



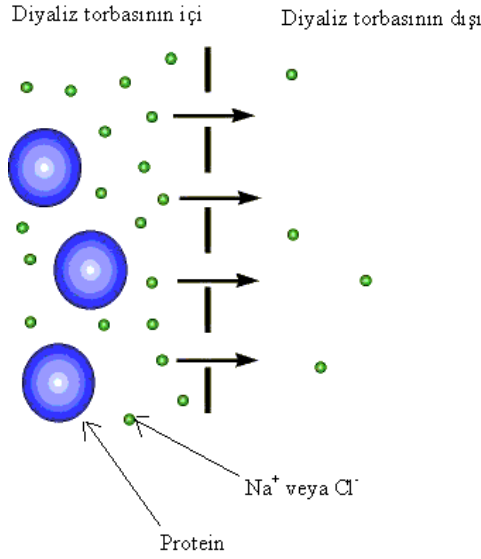
Dializ, jel filtrasyonu, likid, affinite kromatografisi gibi protein saflaştırma metotları önümüzdeki hafta dersinin konusunu oluşturacaktır...

Diyaliz

- Amonyum sulfat presipitasyonu veya iyon-değişim kromatografisi ile elde edilen bir protein çok yüksek miktarda tuz iyonları taşıyacaktır. Bu da istenmeyen bir durumdur, çünkü, protein bu hali ile inaktif formda bulunur ve dolayısı ile ortamdan tuzun uzaklaştırılması gerekir.
- Ortamdaki tuzu uzaklaştırmak için en yaygın metot **diyalizdir**.
- Bu metotta **semi-permeabl membranlar** kullanılır.
- Bu membranın esas özelliği tuz iyonlarının serbestçe geçişine izin verirken, porlarının çapından dolayı protein gibi makromoleküller içeride tutuklu kalırlar.
- Bu duruma genellikle membran **cutoff** değeri olarak bilinir ve değişik amaçlar için değişik cutoff değerine sahip membranlar kullanılır.
- Diyaliz böyle yüksek tuz konsantrasyonuna sahip protein karışımının membrana konması ve düşük tuz konsantrasyonlu bir tampona karşı kalibre edilmesi ile olur:



- Zamanla (örneğin, gece boyunca, 4 °C'de) torba içi torba dışı düşük moleküler ağırlığa sahip solüt (çözünen) dengeye ulaşır.



konsantrasyonu genellikle sıfır alınır.

- Denge halinde örnekteki tuz konsantrasyonu aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$(\text{örneğin volümü}) \times (\text{örneğin tuz konsantrasyonu}) + (\text{tamponun volümü}) \times (\text{tamponun tuz konsantrasyonu}) / \text{toplam volüm} = [\text{örnekteki tuz}]$$

- Bu şekilde, protein örneğimizde tuz konsantrasyonunu hangi dereceye indirmek istiyorsak, o ölçüde tamponla diyaliz başlatılır.
- Burada başlangıç tampon tuz

Örneğin,

İyon değişim kromatografisi sonunda 10 ml kadar protein karışımımızın olduğunu varsayalım. Bunu kolondan ayırmak için son konsantrasyon 1.0 M NaCl olacak şekilde tuzla yıkadığımızı farzedelim ve daha sonraki saflaştırma basamağı için tuz konsantrasyonunun 1.0 mM'dan büyük olmaması gerektiğini kabul edelim;

$$(0.01 \text{ litre}) \times (1.0 \text{ M}) + (\text{tampon hacmi}) \times (0) / \text{toplam volüm} = 0.001 \text{ M}$$

$$(0.01 \text{ litre}) \times (1.0 \text{ M}) + (\text{tampon hacmi}) / 0.001 \text{ M} = \text{toplam hacim}$$

$$(0.02 \text{ Toplam hacim} = 10 \text{ L tampon})$$

Böylece, bu iş için alınması gereken toplam tampon (toplam hacim-örnek hacmi)= 9.990 litre olacaktır.

- Sonuç olarak tuz konsantrasyonu bakımından 1 M olan 10 ml örneğimizi yaklaşık 10 litre tampona karşı diyaliz edersek, örnekteki tuz konsantrasyonu 1.0 mM'a inecektir.
- Buna genel olarak 1:1,000 dyaliz denir.
- Eğer 10 Litre tampon harcamak istemiyrsak peş peşe ik kez 1:32 diyalizle de aynı iş başarılabılır. Diğer bir deyimle 1:32 x 1:32= yine yaklaşık 1:1,000 diyalize denk gelecektir.

İlk diyalizde 310 ml tampon: 1 M NaCl'ye karşı $10 \times 1.0 / (320) = 31 \text{ mM NaCl}$

İkinci diyalizde 310 ml tampon: 31 mM NaCl'ye karşı $10 \times 0.031 / (320) = 0.97 \text{ mM}$ (yani yaklaşık 1.0 mM)

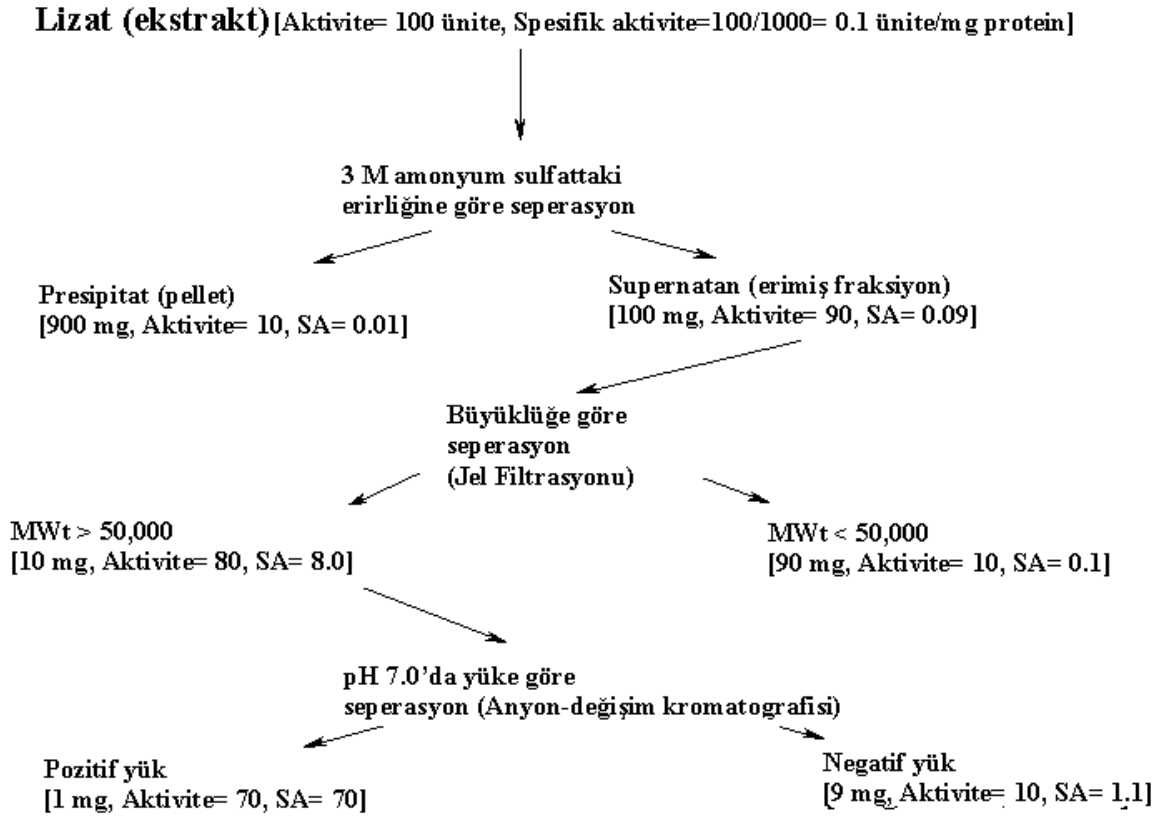
Böylece 10L tampon yerine 620 ml tamponla da aynı iş başarılmış olur.

Bir çok diyaliz olayında diyaliz işleminin % 80'i 4 saat içinde olur.

- Diyaliz olayında dikkate alınması gereken olaylardan biri, tuz iyonları tamponun içine geçerken yani diyaliz torbasından dışarı çıkarken, su tam tersine diyaliz torbasına girer ve torbadaki solüzyonun vümü artar. Böylece, torbadaki protein daha dilüe olur.
- Bu nedenle diyaliz torbası bu durum göz önüne alınarak örnekle doldurulmalıdır. Genel olarak Torbanın % 50'si kadar örnek konur, hava üflenerek şişilir ve ağzı bağlanır.

Proteini konsantre hale getirmek:

- Bu amaç için de semi-permeabl bir mebran kullanılır.
- Bunun için en etkili metotlardan biri, diyaliz torbamızı 20.000 Da ve daha yüksek moleküler ağırlıklı (örneğin, polietilenglikoller) kuru bir madde ile sıvamak ve içereideki suyun dışarıya emilimini sağlamaktan geçer.
- Böylece torbadaki suyun mikatrında azalma, protein konsantrasyonunda ise artış olacaktır.
- Aynı iş uygun membranlar (filtreler) kullanılarak belli bir basınçla örnekteki susyun alınması şeklinde de gerçekleştirilebilir.



1 ünite enzim: dakikada 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı, ($\mu\text{mol S} \rightarrow \text{P}/\text{dak}$).

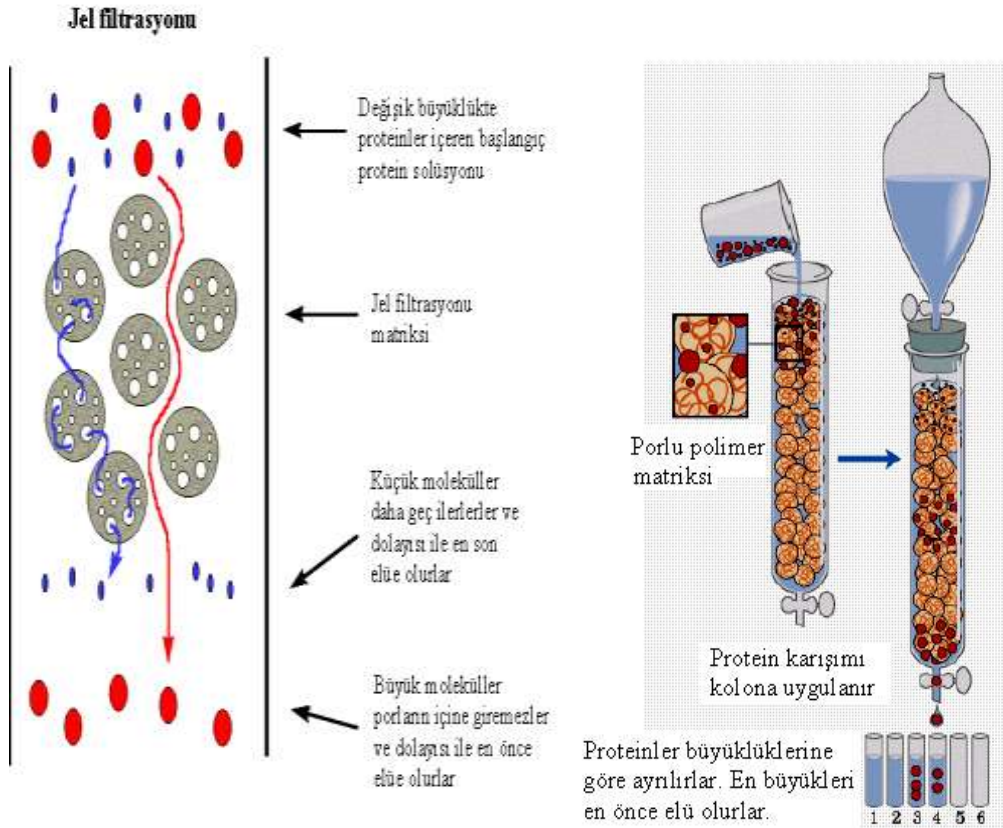
Yukarıdaki protein purifikasyon şemasını okumaya çalışalım; bu basamaklardan sonar elde ettiğimiz saf proteinin miktarı 1 mg olup 70 ünite/mg spesifik aktiviteye sahiptir. Toplam aktivite 70 ünite olduğundan, bu basamaklar sonucu purifikasyon oranı % 70 (70 ünite/100 ünite). Bu nedenle proteinimizin saflığı 700 kat artmıştır (başlangıçtaki SA= 0.1 ünite/mg, en son elde edilen SA= 70 ünite/mg). Bu şemayı daha detaylı okuyarak her basamağın proteinin saflaştırılmasındaki rolünü analiz ediniz...

Protein Pürifikasyonu III: Jel Filtrasyonu, affinite ve hidrofobik reçineler, reçinelerin ve cihazların kurulumu

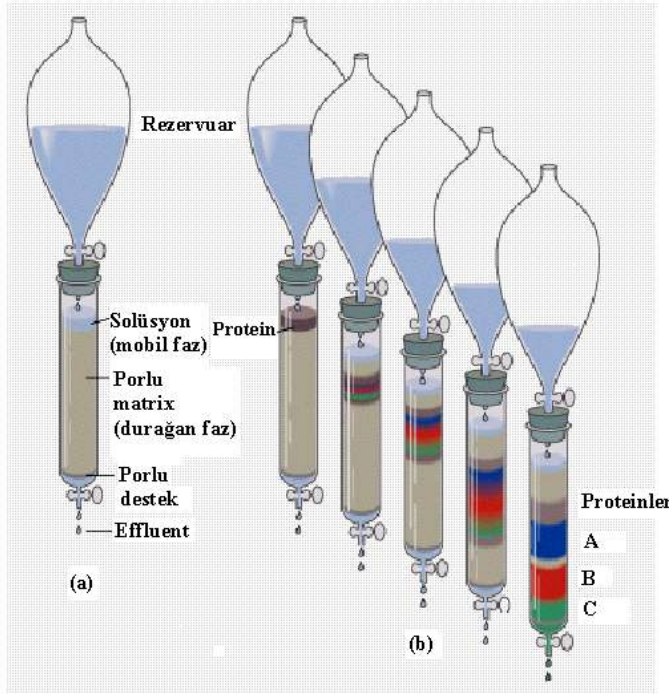
Jel Filtrasyonu (Büyükliğe göre ayırım kromatografisi)

Jel filtrasyonu metodu proteinle herhangi bir kimyasal bağlanma ile gerçekleştirilmez. Bu metotta, proteininin fiziksel özellikleri (boyutları) kullanılarak işlemler yapılır.

- Jel filtrasyonunda kullanılan reçine veya boncuksu matryal (buna matriks de diyoruz) belli büyüklükte porları olana bir seri büyüklükte olabilirler (biz bunları çıplak gözle göremeyiz).
- Örneğin, belli çapta porları olan bir matrikse bu porlara sığmayacak büyüklükteki proteinleri uygulayarak, proteinler porlardan değil, fakat porlar arasındaki boşluklardan akarak daha hızlı biçimde kolunun alt musluğuna gelecek ve elüe olacaktırlar. Por çaplarından daha küçük boyutlu proteinler için ise tam tersi durum söz konusu olur. Bu küçük proteinler boncuksu materyalin porları içine girecek ve orada dolaşıp daha fazla zaman kaybedeceklerinden,, bu tür proteinler daha geç elü olurlar.
- Böylece, bu şekildeki bir sisteme yüklenmiş olan protein karışımı moleküler büyüklüklerine göre bir elüsyon profili göstereceklerdir. Diğer bir deyimle elüsyon sıra ile önce büyük proteinler → orta boy proteinler → küçük proteinler olacaktır.



- Jel filtrasyonu en iyi eğer çalıştığımız protein diğer bir çok proteine göre çok küçük veya çok büyükse kullanışlı bir metot olarak kullanılır.



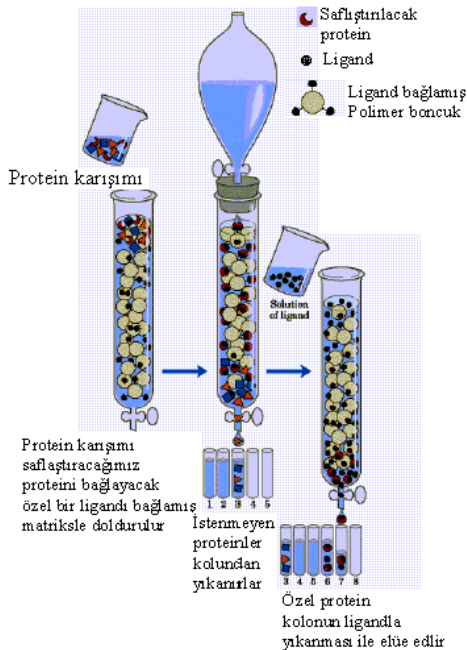
- (a) kolon kalibrasyonu
- (b) Jel filtrasyon (büyüklüğe göre ayırım), örneğin burada C proteinini B proteininden, o da A proteininden daha büyük bir proteindir.

Affinite kromatografisi

Affinite kromatografisi terimi çok sayıda kromatografik materyal için kullanılır. Basit bir ifade ile saflaştıracağımız proteine özgü bir affinite gösteren bir bileşiği bağlamış reçine kolonlarının kullanılması yöntemidir.

- Yine, matriks bağlanmış özel bir proteaz inhibitörü de başka bir affinite kromatografisi çeşididir.
- Özel bir enzime bağlanan bir kofaktör bağlamış kromatografisi,
- Belli bir proteinin kilasyonunu yapan bir metali bağlamış kromatografi matriksi de birer affinite kromatografisidirler.
- Yine, bundan önceki dersimizde gördüğümüz “his etiket” li proteinler de affinite kromatografisi ile kolayca elüe edilebilirler. Örneğin, metal Ni bağlı matriksler kullanılarak...

Hemen her durumda affinite kromatografisine bağlanmış özel proteinin elüsyonu, ona has kofaktör, inhibitör, antikor vs. konsantrasyonun artırılması ile olur. Bu durumda, kolona eklenmiş olan fazla affinite bileşikler matriks üzerinde bağlanacak yer bulamayacaklarından, proteinlerin matriksten disosyasyonuna ve kendilerine bağlanıp elüe olmalarına imkana tanıyacaklardır.



Çoğu durumda tek bir basamakta (amonyum sulfat presipitasyonu ve jel filtrasyonu gibi metotlar kullanmadan) affinite kromatografisi ile özelliklerini bildiğimiz proteininin binlerce contaminant protein içinden saflaştırılması mümkündür.

Hidrofobik matriksler

Hidrofobik reçineler bir alkan veya aromatik grup gibi polar olmayan fonksiyonel bir gruba sahiptirler.

- Bir çok protein yüzeylerindeki veya hidrofobik domainleri ile bu fonksiyonel gruplara bağlanırlar (hidrofobik etki).
- Bu çeşit hidrofobik etkileşim ortam iyonik kuvvetinin artırılması ile artar. Yani, proteinler yüksek tuz konsantrasyonunda böyle bir kolona bağlanırken, tuz konsantrasyonu düşürüldüğünde elüe olurlar.

- Dolayısı ile bu çeşit bir kolon kromatografisi, sadece protein saflaştırma için değil aynı zamanda proteinlerden fazla tuzun uzaklaştırılmasında (diyaliz gibi) de kullanılabilir.
- Alkan veya aromatik bileşiğin büyüklüğü arttıkça bağlanma daha kuvvetli olur.

Hidrofobik etkileşim ve iyonik kuvvetin doğasından dolayı, bu her iki teknik peş peşe kullanılabilir. Örneğin, iyon değişim kromatografisinden sonra protein örneğimiz yüksek tuz iyonu konsantrasyonuna sahip olacağından hemen hidrofobik bir kolona uygulanarak yıkanabilir. Bunun tersi durumunda is, yani protein örneğimiz önce hidrofobik kolondan geçirilmiş ise düşük tuz iyonu konsantrasyonun gereklilik olduğu iyon değişim kromatografisine tabi tutulabilir.

Burada hidrofobik etkileşim kromatografisi ile **revers faz kromatografisi** arasındaki önemli bir farka değinmemiz gerekir:

- Hidrofobik etkileşim kromatografisi genellikle sulu ortamlarda gerçekleştirilir ve iyonik güçte yapılan değişikliklerle de protein elü edilir. Tipik olarak protein, yüzeyindeki hidrofobik gruplar (domain) aracılığı ile hidrofobik matrikse bağlanır ve elüsyon sonucu protein aktif formunda (tersiyer) elü edilir.
- Revers faz kromatografisi hidrofobik bir solvent (ör, asetonitril) kullanılarak gerçekleştirilir. Bu durumda proteinler denatüre olurlar ve hidrofobik karakter kazanmış polipeptid kolonun hidrofobik fonksiyonel gruplarına (ligand) bağlanır. Globüler proteinlerde hidrofobik kısımlar genellikle protein korunda bulunduklarından (çevredeki sudan uzakta), denatürasyon sonucu bu bölgelerin açılarak bu hidrofobik grupların kolona bağlanması sağlanır. Dolayısı ile böyle bir sistemle saflaştırılan proteinlerin tekrar fonksiyonel duruma gelmeleri için uygun reanürasyon şartlarının sağlanması gerekir.

Kolon kromatografisi matrikslerinin hazırlanması

Kolon kromatografisi matrikslerinin hazırlanması genellikle aşağıdaki basamakları içerir:

1. Reçinenin hidrasyonu (tamponla şişirilmesi)
 2. Reçine üzerinde toplanmış küçük reçine parçalarının uzaklaştırılması
 3. Reçinenin tamponla kalibre edilmesi (tamponla defalarca reçinenein yıkanması ve en son yıkama tamponu ile yıkamada kullanılan tamponun pH değerinin aynı olması sağlanıncaya kadar devam eder) ve bulamaçın hazırlanışı.
 4. Bulamaçın gaz ve kabarcıklarının bir vakum pompa ile (gerekirse) alınması.
- Bazı reçineler hazır biçimde (yani uygun tamponla şişirilmiş ve kalibre edilmiş halde) gelir. Ancak, çoğu durumda ticari reçineler kuru halde gelir ve bizim amacımıza göre onları sulandırıp gece boyunca bekletip şişmeleri sağlamak ve daha sonra da tamponla kalibre etmemiz gerekir.
 - Reçineler gece boyunca böyle bir işleme tabi tutulduklarında küçük çaptaki reçine boncukları üstte toplanır. Bunları ortamdan uzaklaştırmamız gerekir. Aksi halde, proteinin kolondan akış hızı oldukça yavaşlayacaktır.

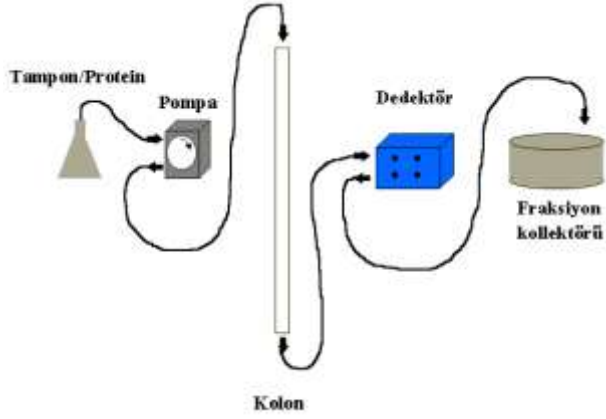
Cihazların kurulumu

Kromatografik sistemler genellikle bir cam boruda maddelerin yerçekimi yönünde akışı şeklinde gerçekleşir ve bu maddeler kolonun alt ucuna konmuş bir erleninde toplanır. Dolayısı ile kolon kromatografisi pahalı malzeme gerektirmez. Ancak, bazı durumlarda (özel amaçlar için), bu sistem aşağıdaki cihazların da kullanılması ile daha etkili hale dönüştürülebilir.

- *Pompa*: Kolondan sıvı akışını kontrol etmek için kullanılır.
- *Dedektör (densitometre)*: Bu genellikle bir UV (A_{280}) detektörü olup hangi fraksiyonda ne kadar protein olduğunu bulmamız için kullanılır. (proteinlerin 280 nm'de max absorbanans

verdiklerini hatırlayınız). Bu dedektör sayesinde grafik kağıdı üzerinde çizilmiş piklerden protein akış şemasını anlayabiliriz.

- *Fraksiyon kollektörü:* Uzerinde 50-100 kadar tüp taşıyan döner bir tablaya sahip alet. Optik okuyucusu sayesinde tüpe düşen damla sayısını okur ve belli bir damla sayısından sonra başka bir tüpe geçer. Böyle bir sistemin makinesine dakikada kaç adet damla istediğimiz ve her tüpe kaç damla isediğimiz gibi veriler girilerek, gece boyunca işlemin kendiliğinden sürmesi gerçekleştirilir.



Aşağıdaki tablo bir proteinin saflaştırılmasındaki basamakları ve her basamaktaki verileri göstermektedir:

Basamk	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (ünite)	Spesifik aktivite (ünite/mg)	Saflaştırma faktörü	% Protein
Ekstrakt	5500	6600	1.2		
% 30-70 Amonyum sulfat	1020	5910	5.8	4.8	89.5
DEAE Sefadeks	187	5070	27.1	4.7	85.8
CM Sefadeks	102	4420	43.3	1.6	87.2
Fenil safaroz	56	3930	70.2	1.6	88.9
Jel filtrasyonu	32	2970	92.8	1.3	75.6
Affinite 1	5.8	2520	434.5	4.7	84.8
Affinite 2	5.3	2390	450.9	1.0	94.8
Toplam saflaştırma	376				
Protein elde %'si	36				

Proteinimizin moleküler ağırlığının belirlenmesi

Bütün yukarıdaki basamaklar sonucu oldukça saf olarak (> % 98) elde ettiğimiz proteinimizin molekül ağırlığının da hassas biçimde belirlenmesi gerekir. Bunun için, yukarıdabahsettiğimiz SDS-PAGE sistemi kullanılır. Örnek olarak :

