

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ÖĞRENCİ LABORATUVARI UYGULAMALARI

(Tıp Fakültesi Dönem I ve II)



KONYA

2016

Genç Tıbbiyeliler;

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Dönem I ve Dönem II Öğrenci Laboratuvarı Pratik Kitapçığı, aşağıdaki konularda pratik çalışmalarını içerir.

DÖNEM 1 DENEYLERİ

Laboratuvarda uyulması gereken kurallar

Cam malzemelerin tanıtılması

Çözeltiler, konsantrasyon kavramları ve tamponlar

Karbonhidrat tanıma deneyleri

Protein, amino asit ve lipid tanıma reaksiyonları

Kolorimetri

Enzimle hidroliz

Enzim kinetiği

DÖNEM 2 DENEYLERİ

Transaminasyon ve Kromatografi

Solunum zinciri

Anaerobik glikoliz

İdrar Biyokimyası,

Yukarıda belirtilen her bir deneyin; Adı, amacı, prensibi, materyal-metodu ve, yapılan deneylerin preanalitik süreçlerinde kullanılan cam ve plastik malzemeler, numunenin hazırlanması aşamasında kullanılan santrifüj, vorteks gibi cihazların, deneyin yapılması aşamasında kullanılan kimyasal maddeler ve analiz işleminin gerçekleştiği deneyin süreçleri anlatılmaktadır.

Başarılı bir laboratuvar sürecini devam ettirmek ve sonuçlandırmak laboratuvar kuralları ve laboratuvar güvenliği ile ilgili konulara titizlikle uyulması ile birlikte yürür. Özellikle sağlığın korunması görünmez kazaların önlenmesi açısından çok önemlidir. Bu konuda tecrübeli Araştırma Görevlisi, Uzman ve Öğretim elemanlarına sorarak deney aşamalarını sürdürebilirsiniz.

Öğrenci Laboratuvarı Pratik Kitapçığını her uygulama öncesinde okuyarak gelmeniz gerekmektedir. Laboratuvar çalışmaları sonunda deney sonuçlarınızı yorum kısmına not ediniz, yıl sonu sınavlarında değerlendirilecektir.

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Elemanları olarak başarılar dileriz.

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Mehmet Gürbilek

Prof.Dr. Ali Muhtar Tiftik

Doç.Dr. F.Hümeyra Yerlikaya

Prof.Dr. Mehmet Aköz

Yard.Doç.Dr. İbrahim Kılınc

Doç.Dr. Sevil Kurban

Öğr.Gör.Dr. Cemile Topcu

LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

1. Laboratuvarda sessiz çalışılmalıdır.
2. Laboratuvara önlükle gelinir. Laboratuvar süresince önlük çıkarılmaz. Çalışırken önlüğün önü ilikli olmalıdır.
3. Her öğrenci kendisine ayrılan bölümü ve malzemeleri kullanmalıdır.
4. Çalışmanın bitiminde, her öğrenci kullandığı malzemeleri temizlemeli ve görevlilere temiz ve düzenli olarak teslim etmelidir.
5. Laboratuvar içerisinde şakalaşmak, özellikle kimyasal maddelerle şakalaşmak çok sakıncalı ve yasaktır.
6. **Laboratuvarda kimyasal maddelere el sürülmez, koklanmaz, tadına bakılmaz.**
7. Deneylerde mümkün olduğu kadar az madde kullanılmalı ve madde israfından kaçınılmalıdır. Stok şişelerinden gereği kadar madde alınmalı, artanlar stok şişesine boşaltılmamalıdır.
8. Çalışmalarda kirli malzeme kullanılmamalıdır.

9. Uçucu, yanıcı ve patlayıcı (eter, alkol, kloroform vb.) madde şişelerinin ağızları devamlı kapalı tutulmalı, yanında çakmak, kibrit gibi yakıcı maddeler kullanılmamalıdır.
10. Çözelti hazırlanıyorsa onun uygun şartlarda saklanması gerekir. Reaktiflerin üzerlerine reaktiflerin adı, hazırlayanın adı, hazırlanma tarihi ve biliniyorsa son kullanma tarihi yazılır. Son kullanma tarihi geçmiş reaktifler kullanılmamalıdır.
11. Saf su yerine kesinlikle çeşme suyu kullanılmamalıdır.
12. Kimyasal bir madde ile özellikle asit ve alkalilerle temasta, temas bölgesi bol su ile yıkanmalı ve derhal ilgililere haber verilmelidir.
13. Her çalışmadan sonra eller sabunla yıkanmalıdır.
14. Kan ve kan ürünleriyle çalışırken eldiven kullanılmalıdır.
15. Kullanımı bilinmeyen cihazlar kullanılmamalıdır.
16. Çalışma bitince her grup aldığı malzemeyi sağlam ve temiz olarak teslim etmelidir.
17. Görevliden izinsiz laboratuvarı terketmek yasaktır.
18. Her laboratuvar çalışması sonunda yoklama kağıdı mutlaka imzalanmalıdır.

I.CAM MALZEMELER VE CİHAZLAR

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



Deney tüpü



Tüp Şoru



Temizleme fırçası

Tüp Sporu: Tüplerin, kendi icerindeki deliklere yerleştirilmesiyle dik durmalarını sağlar. Tüplerin muhafazası ve taşınmasında kullanılır.

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

Pipet:

a) Cam pipetler

Belli ölçülerdeki sıvıların bir kaptan diğerine aktarılmasında kullanılan dar cam borulardır. Alt ve üst kısımları açıktır. Pipetin en üstündeki rakam toplam hacmini gösterir. Pipet içine sıvı alınması içindeki havanın emilmesiyle olur. Emme işlemi lastik puarla veya pipet pompası ile mümkündür.



Cam pipet



Puar



Pipet pompası

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

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

b) Otomatik pipetler (Mikrokropipet):

İstenen hacmi sabit olarak çekebilen ve çok daha küçük hacimlerin pipetlenmesini sağlayan pipetlerdir. Bu pipetlerle 1-5000 µl arası sıvı pipetlenebilir.

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

Mikropipet ucu: Otomatik pipet uçlarıdır.



Otomatik pipet



Pipet ucu

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

Bunzen Beki: Isı kaynağıdır. Kaynatma deneylerinde kullanılır. Isıtma işlemleri mutlaka uzun tüpte ve alevin mavi kısmında yapılmalıdır.

Üçlü Sac Ayağı: Isıtma işleminde kullanılır. Üstüne amyantlı tel konularak bunzen bekinin üzerine yerleştirilir.

Amyantlı Tel: Isıtma işlemlerinde üçlü sac ayağın üzerine konulan normal ve emniyetli ısınmayı sağlayan, orta kısmı ısıya dayanıklı kille sıvanmış tel kafeslerdir. Isıyı yayarak homojenlik sağlar.



Tahta maşa



Bunzen beki



Üçlü sac ayağı



Amyantlı tel

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

Damlalık şişe: Oluklu kapağa sahip şişelerdir. İçlerindeki solusyonun damla damla akmasını sağlarlar.

Titration deneyinde indikatör damlatmak için kullanılırlar. İki tipi vardır:

- Reaktif şişe ağzı damlatmaya uygundur. Reaktif şişe ağzı sıkıca kapatılamaz.
- Reaktif şişe ağzı kapağı damlalıktır. Reaktif şişe ağzı sıkıca kapatılabilir.



Reaktif şişesi



Damlalık şişe



Piset

Piset: Sıvı tamamlamaya yarar. Az miktarda sıvı ilavelerinde kullanılır.

Vorteks (Çalkalayıcı): Deney tüpü içerisindeki maddelerin karıştırılmasına yarar.



Vorteks (Karıştırıcı)



Manyetik Karıştırıcı



Manyetik bar

Manyetik Karıştırıcı: Çözelti karıştırmaya yarar

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

Spatül: Katı maddelerin tartımı sırasında madde transferini sağlar. Metal ve porselen olmak üzere değişik tipleri vardır. Bazılarının ucu düz, bazılarının ise yuvaraktır.

Baget: Uçları kütleştirilmiş cam çubuktur. (Çözeltilerin karıştırılmasında kullanılır.)



Baget



Spatül



Beher

Beher: Buharlaştırılması istenen çözeltilerin hazırlanmasında, karıştırılmasında ve sıvıların naklinde kullanılan geniş, silindirik, dibi düz cam kaplardır.



Erlen



Mezür



Balon joje

Erlenmayer: Buharlaştırılması istenilmeyen çözeltilerin hazırlanmasında ve titrasyon deneyinde kullanılan konik cam kaplardır.

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

Balon Joje: Adi balona benzeyen cam kaptır. Üzerinde miktar bildiren çizgiler bulunur. Çözelti hazırlanmasında kullanılır. En hassas volumetrik kaptır. Daha sonra adi balon veya reaktif şişesine aktarılır.



Adi balon



Büret ve büret sporu



Dispensör

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

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

Büret: Titrasyon deneyinde kullanılan alt ucu musluklu borulardır.

Büret sporu ve sehpa: Büret ile ilgili düzeneği dik tutmaya yarayan araçtır.



Parafilm



Flaster



Laboratuvar saati

Parafilm: Cam malzeme ağzının kapatılmasına yarar. Malzeme ağzında gerilerek yapıştırılır.

Flaster: Reaktif şişesinin üzerine yapıştırılarak etiketlemede kullanılır.

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



Huni



Süzgeç kağıdı



Havan



Desikatör

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

Süzgeç kağıdı: Süzme yapılırken huninin üzerine konularak kullanılır. Süzgeç kağıdını geçip tüpte biriken sıvıya filtrat denir. Süzgeç kağıdında da partiküller kalır.

Havan: Katı maddeleri ezmede kullanılır (Örnek: maya).



pH metre



Dansitometre



Refraktometre

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

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

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

Spektrofotometre ve küveti: Spektrofotometrik ölçümlerin (renkli çözeltilerden belirli dalga boyundaki ışık geçirilerek) yapıldığı cihazlardır. Cihazların küvetleri kristal veya plastikten yapıldır.



Spektrofotometre



Spektrofotometre küveti



Hassas Terazi

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

Desikatör: Özellikle kimyasal maddeleri nemden korumak için kullanılırlar.

Nemi tutmak için içerisinde susuz kalsiyum klorür ve silika jel gibi nem emici maddeler bulunur. Kapağın kenarına vazelin sürülerek kapatılır. Böylece hava alması engellenir. (Örnek: sodyum klorür, sodyum hidroksit).



Benmari (Su banyosu)



Santrifüj



Dengeleme terazisi

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

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

Santrifüj: Santrifüj makinesinin adıdır. Santrifüj makinesi bir çözeltilerdeki partikülleri yüksek hızla çevirerek ayırır. Tüpün alt kısmında birikene **çökelti**, üstte kalan sıvı kısma **süpernatant** denir.

SANTRİFÜJ YAPILMASI

Santrifüj hızı rpm veya RCF şeklinde verilir.

rpm(revolution per minute): Dakikada dönme sayısı demektir.

RCF (relative centrifugal force), oransal santrifüjleme kuvveti demektir.

RCF yerçekiminin (g) katları şeklinde ifade edilir. Santrifuj hızını g'nin katları şeklinde belirtmek daha doğrudur. Çünkü yarıçapları farklı olan iki santrifuj de aynı derecede ayırım sağlanamaz. İşte bu mahsur ortadan kaldırmak için g kuvveti (veya RCF) kullanılır. Aynı RCF kuvveti, farklı santrifujler de farklı rpm değerlerine karşılık gelir. RCF ile rpm arasında aşağıdaki gibi bir eşitlik vardır.

$RCF = (rpm)^2 \times r \times 1,118 \cdot 10^{-5}$ r: Santrifuj yarıçapıdır.

$rpm = 1000 \times \sqrt{RCF}$

$\sqrt{11,18 \times r}$

2 tip santrifuj vardır: 1. Açılır başlıklı 2. Sabit başlıklı



MALZEME TEMİZLİĞİ ve BİYOKİMYADA KULLANILAN SULAR

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

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

MALZEME TEMİZLİĞİ

Cam ve plastik malzemeler kullanılmayı müteakip bırakılırlarsa içerisinde organik ve inorganik maddelerin kurumasından dolayı zor temizlenirler. Bunun önlenmesi bakımından, kullanılır kullanılmaz hemen

saklanmalı ve içerisinde su bulunan bir kap içerisine bırakılmalıdır. En ideal olan deterjanlı su içerisinde yıkamaya kadar bekletilmesidir.

1-Malzemelerin deterjanlı suya konulmadan önce uygun bir fırça ile musluk altında temizlenmelerinden daha da iyi netice alınır. Spesifik çalışmalarda kullanılmayacak olan malzemeler, fırça ve deterjan yardımı ile iyice temizlendikten sonra distile su ile birkaç kez durulanır ve uygun ısıdaki kurutma dolabına (100 °C nin altında) içlerindeki su akacak pozisyonda konulur.

2-Durulamayı takiben ince bir film tabakası şeklinde su kalacağından, içlerindeki su akacak pozisyonda kurutma dolabına konulmayan malzemelerde su lekeleri görülür. Su lekeleri, özellikle distile su ile iyi durulanmayanlarda veya distile suyun temiz olmadığı durumlarda daha da belirginleşir.

3-Cam malzemelerin temizlenmesi amacıyla uygun yıkama ve durulama yapan makineler kullanılabilir. Polietilen, polipropilen, teflon, polimetilpenten ve polikarbonat malzemeler de cam malzemelerin temizlendikleri makinalara konulabilirler.

4-Otomatik yıkama makinelerinde alkaliliği yüksek olmayan, metal ihtiva etmeyen ve iyonik olmayan deterjanlar öncelikle tercih edilmelidir.

5-Pipetin temizlenmesi işleminde bikromat solüsyonu kullanılır. Kirli alet bikromat solüsyonu içerisinde bekletilir. Solüsyon içerisinden çıkarıldıktan sonra çeşme suyundan ve daha sonra da distile sudan geçirilerek kurumaya bırakılır.

Solüsyonun hazırlanması:

1. 1000 ml'lik balon joje alınır.
2. İçerisine 500 ml distile su konur.
3. Distile su üzerine yavaş yavaş, 250 ml konsantre sülfirik asit konur.
4. Çeşme suyu ile soğutma işlemi yapılır.
5. Üzerine 100 g potasyum bikromat ilave edilir.
6. Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

II. ÇÖZELTİLER ve TAMPONLAR

DENEY NO:1

DENEYİN ADI: Çözelti Hazırlama

Aşağıdaki çözeltileri hazırlayınız.

1. 0.1N H_2SO_4 50ml.
2. 0.3osmolar NaCl 250ml.
3. 0.5 N $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 ml.
4. 0.5 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 ml.
5. İzotonik glukoz çözeltisi 200 ml.
6. % 5'lik NaCl çözeltisinden, izotonik NaCl çözeltisi 50 ml.

7. % 5'lik NaCl çözeltisinden, 20 mEg/L NaCl çözeltisi 100 ml.

8. Doymun tuz çözeltisi 100 ml.

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

MATERYAL:

A-Kimyasallar

1.H₂SO₄

2.NaCl

3.CuSO₄.5H₂O

4.Glukoz

5.Balonjoje

B-Malzeme ve Ekipman

1.Beher

2.Terazi

3.Spatül

4. Manyetik karıştırıcı

5. Pipet

Kullanılan kimyasalların moleköl ağırlıkları ve yoğunluk değerleri stok şişelerin üzerindeki etikette yer almaktadır.

DENEY NO:2

DENEYİN ADI: Tampon Çözelti

1. pH=5 ve pK= 4.77 olan 0.2 M 100 ml Asetat tamponu hazırlayınız. (d=1 gr/ml, %=100, M_AAsetik asit =60 gr/mol, M_A Sodyum asetat =82 gr/mol, antilog 0,23=1,7).

2. pH=7 olan 0.1 M 100 ml Tris tamponu hazırlayınız. M_A Tris = 121 gr/mol

Henderson –Hasselbalch denklemi

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

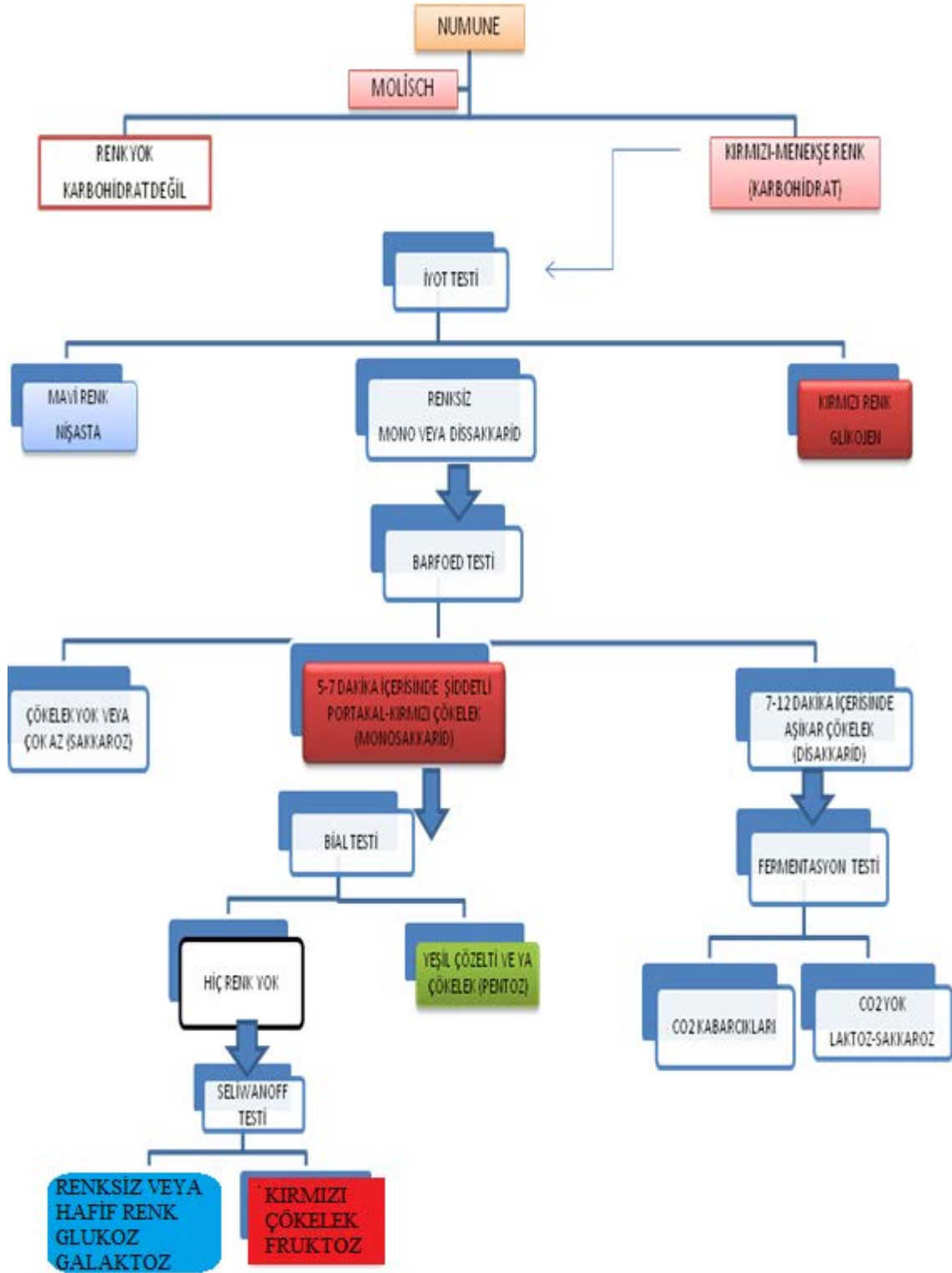
A-Kimyasallar

1. Asetik asit
2. Sodyum asetat
3. Tris

B-Malzeme ve Ekipman

1. Terazı
2. Spatül
3. Beher
4. Balon joje
5. Pipet
6. Manyetik karıştırıcı
7. pH metre

III.KARBONHİDRAT TANIMA DENEYLERİ



DENEY NO:1

DENEY ADI: Kömürleşme

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

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

MATERYAL:

1. Yoğun H_2SO_4
2. 1 adet kesme şeker

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 1 kesme şeker alınır.
2. Üzerine birkaç damla yoğun H_2SO_4 damlatılır.
3. Beklemeye bırakılır ve gözlemlenir.

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

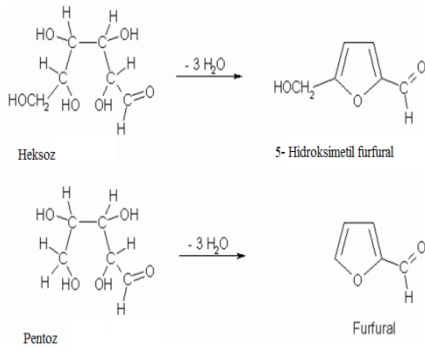
YORUM:

DENEY 2:

DENEY ADI: Molisch Deneyi

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

PRENSİP: Kömürleşmede bahsedilen olay sulu çözeltide gerçekleştirilirse karbonhidrat sadece 3 mol su kaybeder ve furfural oluşur. Elimizdeki karbonhidrat 5 karbonlu şeker (pentoz) ise furfural, 6 karbonlu şeker (heksoz) ise furfural türevi olan 5 hidroksi metil furfural oluşur. Karbonhidratların asit tesiri ile furfurale dönüşüp α -naftol ile de renk vermeleri ortamda karbonhidrat olduğunu tanımlayan Molish deneyi ile olur. Amino şekerler, şeker alkollerini ve karboksilik asitler hariç bütün karbonhidratlar bu deneye pozitif cevap verir.



MATERYAL:

- 1.Molish ayırıcı (α -naftolun alkolde hazırlanmış çözeltisi)
- 2.Konsantre H_2SO_4
- 3.Bilinmeyen bir çözelti
- 4.Deney tüpü, Pipet

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Bir adet deney tüpü alınarak içerisine 1-2 ml kadar bilinmeyen çözelti koyulur.
2. Üzerine 1-2 damla molish ayırıcı damlatılıp karıştırılır.
3. Deney tüpü 45° açı yapacak şekilde tutularak tüpün kenarından 2 ml yoğun H_2SO_4 ilave edilir.
4. H_2SO_4 yoğun olduğundan dibe çöker ve iki sıvının temas yüzeyinde mor-kırmızı renkte halka şekillenmesi deneyin (+) olduğunu gösterir.
5. Daha sonra tüp çalkalanacak olursa asit ile tamamen karıştığından bütün sıvının renklendiği gözlenir.

YORUM:

DENEY NO:3

DENEY ADI: İyot Testi**DENEYİN AMACI:** Nişastanın iyotla renk vermesi**PRENSİP:** İyot polisakkaritlerle renki kompleksler oluştur. Nişasta molekülündeki bağlara girerek fiziksel özelliğini değiştirir ve mavi bir renk oluşturur.**MATERYAL:**

1. Nişasta çözeltisi
2. İyot
3. Deney tüpü

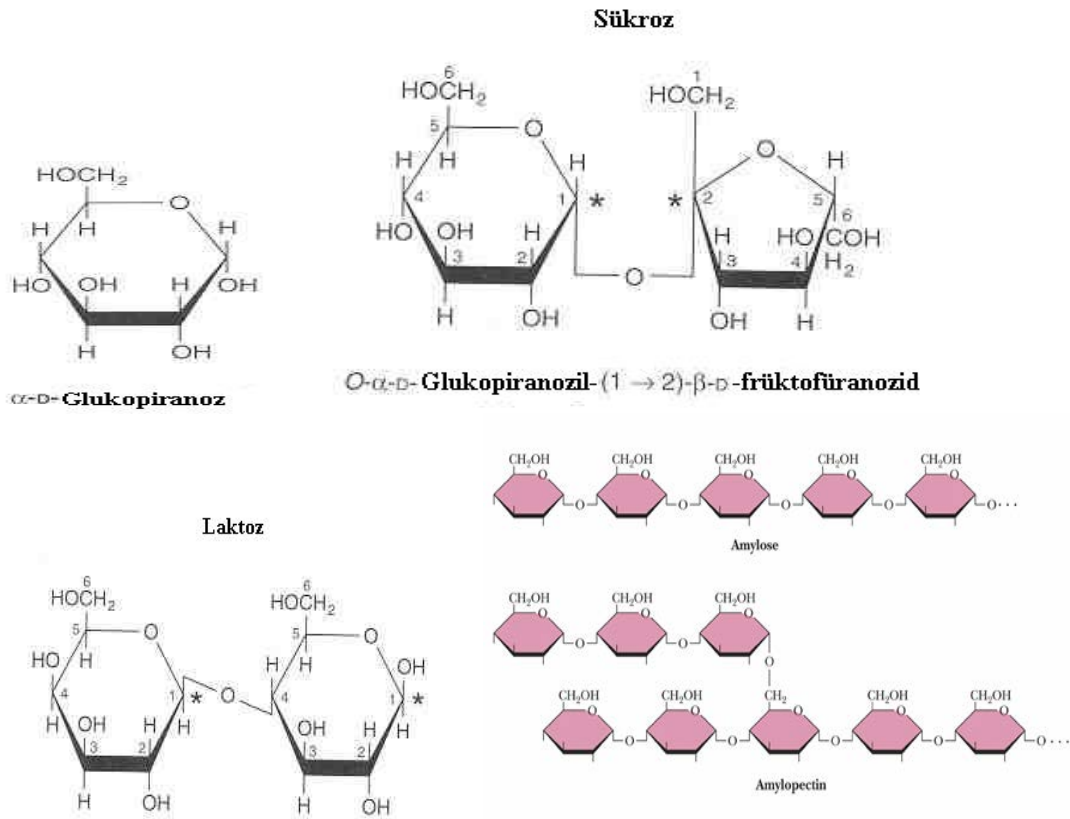
DENEYİN YAPILIŞI:

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

YORUM:**DENEY NO:4****DENEY ADI:** Benedict Deneyi

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

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



MATERYAL:

- 1.Kaynar su banyosu
- 2.Deney tüpü
- 3.Pipet
- 4.Benedict ayırıcı (CuSO_4 + Sodyum sitrat, Na_2CO_3)
5. Karbonhidrat çözeltileri (glukoz, sakkaroz, nişasta, laktöz)

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Bir adet deney tüpü alınarak içerisine 2,5 ml benedict ayırıcı koyulur.

2. Üzerine 4-5 damla karbonhidrat çözeltisi ilave edilir.
3. Tüp kaynar su banyosunda 4-5 dakika bekletilir ve takip edilir.
4. İdrar kullanıldığında şekillenecek renkler ve yorumları şöyledir:

Mavi veya çok açık yeşil => (-)

Yeşil (tortulu) => (+)

Yeşil - sarı (tortulu) => (+ +)

Sarı - portakal (tortulu) => (+ + +)

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



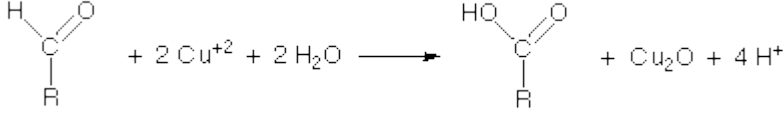
YORUM:

DENEY NO: 5

DENEY ADI: Barfoed deneyi

DENEYİN AMACI: İndirgeyici olduğu bilinen şekerin monosakkarit mi, disakkarit mi olduğunu anlama.

PRENSİP: Monosakkaritler zayıf asit ortamda da indirgeyici güç göstermesine karşın disakkaritlerin böyle bir özelliğe sahip olmaması veya çok uzun sürede çok az bir indirgeyici özellik göstermesi sebebiyle bu deney monosakkaritlerin ve disakkaritlerin ayırımında kullanılır, indirgenme reaksiyonları içinde sadece bu deney zayıf asit ortamda gerçekleşir.



MATERYAL

1. Barfoed ayırıcı (Bakır asetat + Glasiyal asetik asit)
2. Glukoz çözeltisi
3. Laktoz çözeltisi
4. 2 adet deney tüpü
5. Kaynar su banyosu

DENEYİN YAPILIŞI:

1. İki adet deney tüpü alınarak biri G (glukoz), diğeri L (laktoz) olarak işaretlenir.
2. Her iki tüpe 2 ml barfoed ayırıcı konur.
3. G tüpüne 0,5 ml glukoz, L tüpüne 0,5 ml laktoz ilave edilir.
4. Her iki tüp kaynar su banyosuna konur ve gözlem yapılır.
5. G tüpünde 5 dakika içerisinde kırmızı bir tortu oluşur. L tüpünde ise çok daha uzun bir sürede çökelek oluşumu gözlenir.

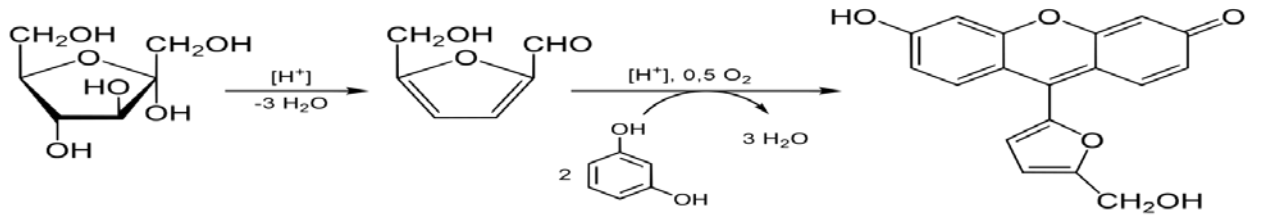
YORUM:

DENEY 6

DENEY ADI: Seliwanoff Deneyi

DENEYİN AMACI: İndirgeyici olduğu bilinen monosakkaritin aldoşeker mi, ketoşeker mi olduğunun anlaşılması.

PRENSİP: Seliwanoff keton grubu taşıyan şekerlerin tanınması için uygulanan bir deneydir. Çözelti içerisindeki şekerin aldoşeker mi yoksa ketoşeker mi olduğu bu deneyle anlaşılır. Deneyde kullanılan reaktif içerisindeki rezorsin ile keton grubu taşıyan karbonhidrat ünitesi arasında şekillenen (reaksiyon neticesinde kırmızı bir renk ortaya çıkar) bu durumun görülmesi ketoz şekerler için pozitifdir. Aldoz şekerler de bu deneyde pozitif sonuç verebilir. Fakat bunun anlaşılması için uzun süre beklemek gerekir. Renk yoğun ve net olmayabilir.



MATERYAL:

1. Seliwanoff ayracı
2. Fruktöz çözeltisi,
3. Glukoz çözeltisi
4. Kaynar su banyosu

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 3 adet deney tüpü alınır. Birinci tüpe 2 ml fruktoz ve ikinci tüpe 2 ml glukoz, üçüncü tüpe de kontrol amacıyla 2 ml seliwanoff reaktifi koyulur.
2. İlk iki tüpe 1-2 ml seliwanoff ayracı ilave edilir ve karıştırılır.
3. Bütün tüpler kaynar su banyosuna konur.
4. 5-10 dakika içerisinde fruktoz bulunan çözeltide kırmızı rengin şekillendiği görülür. Daha uzun süre beklenildiğinde, daha açık renkte olmak üzere, glukoz bulunan tüpte de renk şekillenir. 3. tüpteki reaktifin kendi renginde ise bir değişme meydana gelmez.

YORUM:

DENEY NO: 7

DENEY ADI: Moore deneyi

PRENSİP: Yoğun alkalilerin tesiri ile şekerler polimerize olurlar ve aynı zamanda redükthanlar meydana getirirler. Glukoz çözeltisi üzerine NaOH çözeltisi ilave edilerek ısıtılırsa bahsedilen etkiler neticesinde karışımın rengi önce sarı, sonra da kahverengiye dönüşür ve karamela kokusu duyulur.

MATERYAL:

1. Bunzen beki
2. Glukoz çözeltisi
3. NaOH çözeltisi
4. Maşa
5. Deney tüpü
6. Pipet

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Bir deney tüpü alınarak içerisine 2 ml glukoz çözeltisi konur ve üzerine 1 ml NaOH ilave edilir.
2. Deney tüpü eğik tutularak ve karıştırılarak bunzen bekinin alevinde ısıtılır.
3. Karışımın rengi değişir ve karamela kokusu oluşursa deney pozitif sonuç vermiştir.

YORUM:

DENEY NO: 8

DENEY ADI: Nişastanın enzimle hidrolizi

DENEYİN AMACI: Nişastanın tükürük ile hidrolizi

PRENSİP: İyot ile maviye boyanmış nişasta çözeltisi tükürük ile karıştırıldığında tükürükte bulunan alfa amilaz enzimi nişasta moleküllerini parçalar.

MATERYAL:

1. Nişasta süspansiyonu
2. İki deney tüpü
3. İyot
4. Tükürük

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Tüpe 5 ml nişasta süspansiyonu alınır.
2. 1 damla iyot çözeltisi ile mavi rengin teşekkül etmesi sağlanır.
3. Bu karışım içinde tükürük bulunan ikinci tüpe dökülüp karıştırılır.
4. Rengin açılması izlenir.
5. Rengin açılmasını takiben benedict testi yapılırsa ne olur?

YORUM:

DENEY NO: 9**DENEYİN ADI: Nişastanın HCl ile hidrolizi**

PRENSİP: HCl, nişastayı glukoz ünitelerine hidrolize eder.

MATERYAL:

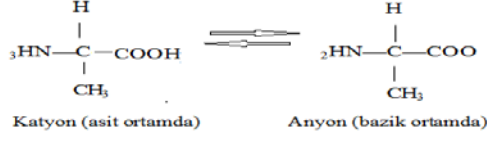
1. Nişasta süspansiyonu
2. HCl
3. Kaynar su banyosu
4. Deney tüpü

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 5-6 ml nişasta süspansiyonu alınır,
2. Üzerine 1 ml HCl ilave edilir.
3. Kaynar su banyosuna konur.
4. Birkaç dakikalık aralarla bu tüpten diğer tüpe 0,5 ml karışım alınıp çeşme altında soutilur. Üzerine 1 damla iyot damlatılır ve rengine bakılır.
5. Hidroliz süresince iyot ile renk kontrolünde sırası ile şu renkler takip edilir:
Koyu mavi → Hidroliz öncesi
Açık mavi → Amilodekstrin (hidroliz başlangıcında)
Kırmızı → Eritrodekstrin
Renksiz → Ortamda 50 üniteden büyük glukoz molekülü yoktur.
6. Renksiz aşamaya gelindiğinde nişastanın hidrolizi tamamlanmıştır. Bu aşamada NaOH ile nötürleştirilerek benedict testi uygulanırsa ne olur?

IV. PROTEİN, AMİNO ASİT ve LİPİD TANIMA REAKSİYONLARI

Genel Açıklama: Amino asit ve proteinler çözüdüğü ortamın pH'sına göre anyon ya da katyon halini alırlar. Basit bir amino asit formülü üzerinde bu durum aşağıdaki şekilde izah edilebilir:



Her amino asit ve protein için özel bir pH noktası vardır ve bu noktada zwitter iyon formuna geçerler. Bu formda hem anyon hem de katyon özelliği gösteren yapılar net elektriksel yük bakımından nötrdürler ve çökerler.

Katyon formuna geçen (asit ortamda) amino asit ve proteinler ortamdaki anyonlar ile, anyon formuna geçenler de (alkali ortamda) katyonlar ile (ağır metaller) birleşerek suda çözünmez metal tuzu teşkil ederler. Zayıf alkali ve asitlerle oluşan denatürasyonun prensibi bu şekildedir.

Isı ile koagülasyonda ısının çözülmüş proteinlerle su molekülleri arasındaki ilişkisini bozmasından kaynaklanan beyaz bulanıklık gözlenir.

Proteinlerde denatürasyon iki şekilde gerçekleşir: Reversibl ve irreversibl. Reversibl denatürasyon zayıf asitlerle şekillenir. Zayıf asit olan asetik asitle denatürasyon oluşmazken, triklorasetikasit (TCA) ile oluşan denatürasyon TCA'nın anyon kökünün (Cl⁻) katyon halindeki proteini notralize etmesi esasına dayanır. Seyreltik NaOH ilavesi ile denatüre olan tüpteki proteinlerin renature olması bu durumu gösterir.

HCl, HNO₃ gibi kuvvetli asitler ise proteinlerin irreversibl denatürasyonunu sağlar. Bu şekilde denatüre olan protein bulunan tüpün, NaOH ilavesiyle notralizasyonu sonucu denatürasyon kaybolmaz.

Aromatik amino asitler ise HNO₃ ile özel bir reaksiyona girerek nitroza bileşiklerini oluştururlar. Protein çözeltisine HNO₃ ilavesi neticesinde şekillenen beyaz bulanıklık irreversibl denatürasyonu gösterir. Şayet proteinlerde aromatik amino asit varsa, ısı uygulanmasıyla sarı renk oluşumu gözlenir. Sarı renk nitroza bileşiğinin rengidir. Karışıma NaOH gibi alkali bileşik ilave edilirse renk koyulaşarak portakal sarısı rengini alır. Rengin koyulaşması ise nitroza tuzlarının oluştuğunu gösterir.

PROTEİN ve AMİNOASİT DENEYLERİ

1. Isı ile koagülasyon

Kaynatma deneyi

Tanret deneyi

2. Zayıf asitler ile denatürasyon

3. Kuvvetli asitlerle denatürasyon

Heller halkas

Ksantoprotein

4. Ninhidrin deneyi

DENEY NO:1

DENEYİN ADI: Isı ile Koagülasyon

A. Kaynatma Deneyi

MATERYAL:

1. Asetik asit % 3
2. Numune (protein çözeltisi ve idrar)
3. Deney tüpü
4. Pipet
5. Maşa
6. Bunzen beki

DENEYİN YAPILIŞI:

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

YORUM:

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

B. Tanret Deneyi

MATERYAL:

1. Tanret reaktifi:(KI + HgCl₂ + asetik asit % 20)
2. Numune (Protein çözeltisi veya idrar)

DENEYİN YAPILIŞI:

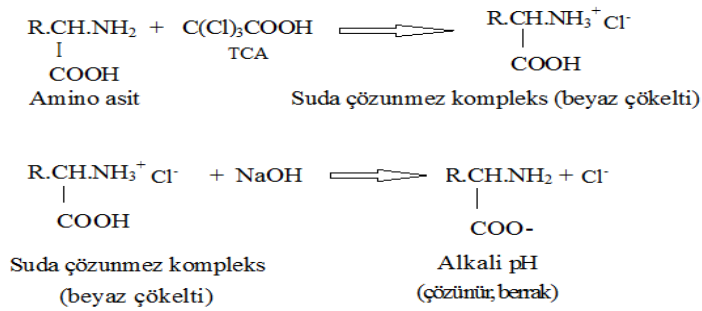
1. Deney tüpünün 2/3' ü kadarına protein çözeltisi veya idrar alınır.
2. Tüp tahta maşayla tutularak ve 45°C'lik açıyla eğilerek tüpteki çözeltinin üst kısmı kaynayınca kadar alevde ısıtılır.
3. 3-4 damla tanret reaktifi damlatılır
4. Bulanıklık izlenir.

YORUM:

DENEYNO: 2

DENEYİN ADI: Zayıf asitler ile denatürasyon

DENEYİN PRENSİBİ: Proteinlerin asit ilavesi sonucu asit pH'da kation haline geçmesi ve sonra da atomdaki negatif yüklü Cl⁻ iyonları ile nötürleşerek çökmesi esasına dayanır.



MATERYAL:

1. Asetik asit
2. Triklorasetik asit % 20'lik (TCA)
3. Sülfosalisilikasit % 10'luk
4. Sodyum hidroksit % 10'luk (NaOH)
5. Numune (protein çözeltisi: dilüe edilmiş yumurta beyazı)

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

1.Uygulama:

- a. Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- b. Üzerine 0.5 ml % 3'lik asetik asit ilave edilir.

2.Uygulama:

- a. Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- b. Üzerine 0.5 ml TCA ilave edilir.

3.Uygulama:

- a. Deney tüpüne dilüe edilmiş yumurta beyazı alınır.
- b. Üzerine 0.5 ml sülfosalisilik asit ilave edilir.

4.Uygulama:

2. Uygulamadaki tüp kaşımına bulnıklık oluştuktan sonra % 10'lukNaOH' ten damla damla ilave edilir.

5.Uygulama:

- a. 1. Uygulamadaki deney tüpüne bir miktar NaCl ilave edilir.
- b. 5. Uygulamadaki deney tüpüne % 10' luk NaOH' ten damla damla ilave edilir.

YORUM:

DENEY NO: 3

DENEYİN ADI: Kuvvetli asitler ile denatürasyon

A. Heller Halkası

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

METARYAL:

- * Nitrik asit (HNO_3)
- * Numune(Protein çözeltisi–dilüe yumurta akı)

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Deney tüpüne 2-3 ml HNO_3 konur.
2. Pipetle 2-3 ml numune tüpün kenarından sızdırılır. (Bu esnada tüp 45° eğik olmalı)

B- Ksantoprotein Deneyi

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

MATERYAL:

1. HNO_3 (Nitrik asit)
2. % 40-50 NaOH
3. Numune (Aromatik amino asitten zengin amino asit çözeltisi)

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Heller halkası deneyinde kullanılan tüp karıştırılır veya deney tüpüne 2-3 ml HNO_3 ve 2-3 ml numune konur.
2. Bulanıklık oluşur.
3. Tüpteki karışım alev üzerinde ısıtılır. Isıtmayı takiben sarı renk (nitroza bileşiği) oluşur.
4. Sarı renkli karışım üzerine 0.7 ml % 40-50 'lik NaOH eklenir. Rengin koyulaştığı gözlenir.

YORUM:

DENEY NO: 4**DENEYİN ADI: Ninhidrin Deneyi**

PRENSİP: Güçlü bir okside edici madde olan ninhidrin, amino asitlerin oksidatif dekarboksilasyonuna neden olarak CO₂, NH₃ ve aldehit meydana getirir. Daha sonra indirgenmiş ninhidrin serbest hale gelen amonyak ile reaksiyon vererek mor-mavi renkli kompleks oluşur. Prolin ve hidroksprolin ise ninhidrin ile sarı renk verirler.

1. Ninhidrin + Aminoasit → Hidrindantin + Aldehit + CO₂ + NH₃
2. Hidrindantin + NH₃ + Ninhidrin → Mor-mavi renkli kompleks + 3 H₂O

MATERYAL:

1. Ninhidrin çözeltisi
2. Bunzen beki
3. Numune (aminoasit çözeltisi)

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Deney tüpüne 1 ml. amino asit çözeltisi pipetle konur.
2. Üzerine 5 damla ninhidrin eklenir.
3. Tüp bunzen bekinde 2 dakika kaynatılır.
4. Tahta maşayla tutulan tüp soğutularak (Buzlu su veya çeşme suyu ile), tüpteki karışımın rengi takip edilir (Ne kadar zaman geçiyor ve renk tonu şiddeti nasıl değişiyor ?)

YORUM:

LİPİD DENEYLERİ

DENEY NO: 1

DENEYİN ADI: Kunkel Fenol Deneyi

PRENSİP: NaCl nin fenol eriyiği ile serumun karıştırılması, β -lipoproteinlerin bir kısmının kaba parçalı çökelekler oluşturmalarına neden olur. Bu veriye dayanılarak alınan numune içerisinde lipid tayini yapılır.

MATERYAL:

1. Deney tüpü
2. Pipet
3. Serum
4. Kunkel fenol reaktifi (Fenol + NaCl)

DENEYİN YAPILISI:

1. Bir deney tüpü alınarak içerisine 3,5 ml kunkel fenol reaktifi konur.
2. Üzerine pipetle alınmış olan 0,2 ml serum ilave edilir.
3. Tüp iyice çalkalanır.
4. 30 dakika beklemeye bırakılır

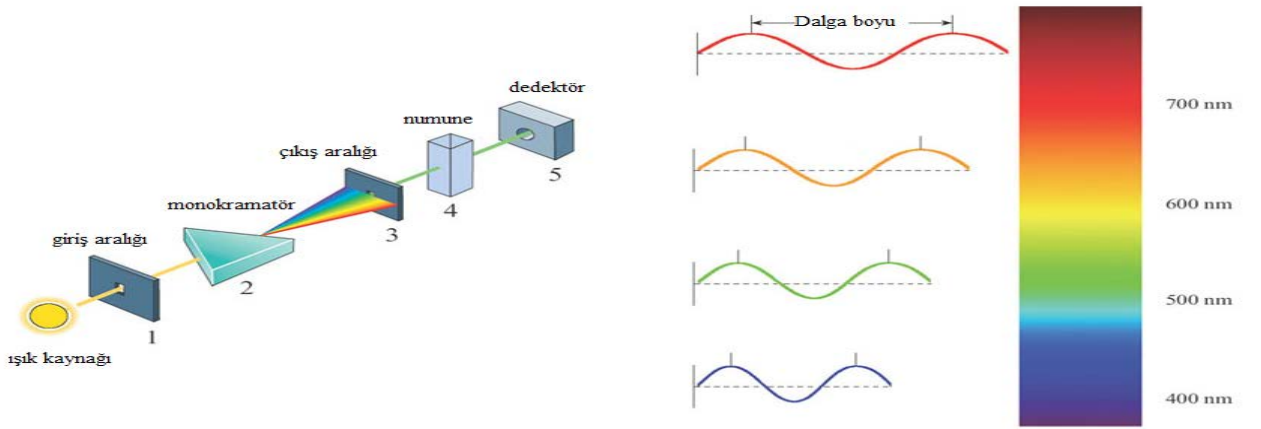
YORUM:

V. KOLORİMETRİ

Çözelti içindeki madde miktarını çözeltinin renginden faydalanarak ölçme işlemine *kolorimetri*, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da *kolorimetre* denir. Kolorimetrik ölçümde, konsantrasyonu ölçülecek çözeltinin rengi değişik konsantrasyonlardaki standartların rengiyle karşılaştırılarak değerlendirilir.

Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine *fotometri*, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da *fotometre* denir.

Fotometrik ölçümde, renksiz çözümlerin konsantrasyonu da ölçülebilir. Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler *kolorimetre* veya *fotometre* olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler *spektrofotometre* olarak adlandırılırlar.



DENEY NO:1

DENEYİN AMACI: 0,001 M KMnO_4 çözeltisinin 400 nm'den başlayarak absorbansının ölçülmesi ve en yüksek absorbans verdiği dalga boyunun bulunması

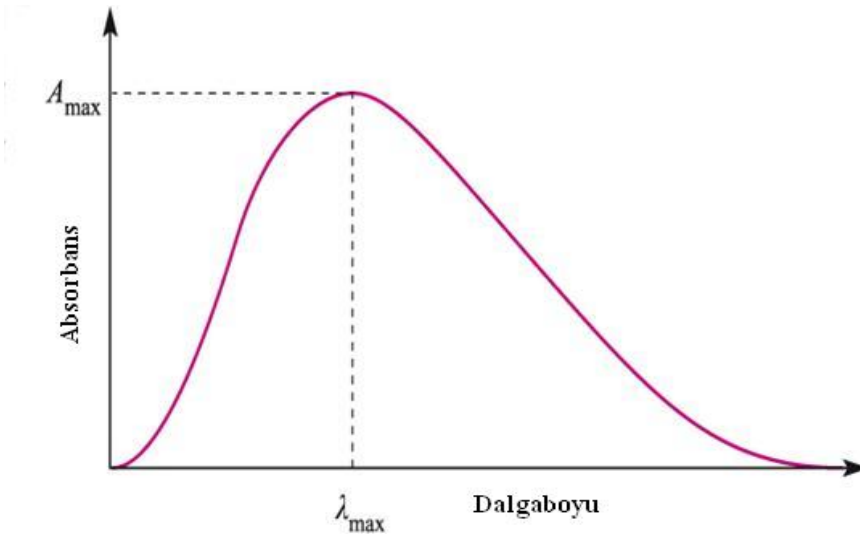
MATERYAL:

1. KMnO_4
2. Küvet
3. Distile su
4. Fotometre

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Bir adet küvet alınır ve içerisine distile su doldurulur, kör oluşturulur
2. Körle fotometrenin sıfır ayarı yapılır.
3. Başka bir küvet alınarak içerisine KMnO_4 doldurulur.
4. Dalga boyu 400 nm'den başlanarak 20'şer nm arttırılarak absorbands ölçümü yapılır.
5. Dalga boyu-absorbans grafiği çizilir.
6. En yüksek absorbands verdiği dalga boyu bulunur.

	Dalga Boyu	Absorbans		Dalga Boyu	Absorbans
1	400			520	
2	420			540	
3	440			560	
4	460			580	
5	480			600	
6	500				



DENEY NO: 2

DENEYİN AMACI: Standart grafiğinden faydalanarak numunenin bilinmeyen konsantrasyonunu bulma

DENEYİN PRENSİBİ: Deney, çözeltilerin küvetlere doldurularak fotometrede absorbanlarının ölçümüne ve konsantrasyonu bilinmeyen KMnO_4 çözeltisinin de absorbanının ölçülerek, çizilen grafikten konsantrasyonunun bulunması esasına dayanır.

MATERYAL:

1. %50, %25,%12.5,%6.25'lik ve konsantrasyonu bilinmeyen KMnO_4 çözeltisi
2. Küvet
3. Distile su
4. Fotometre

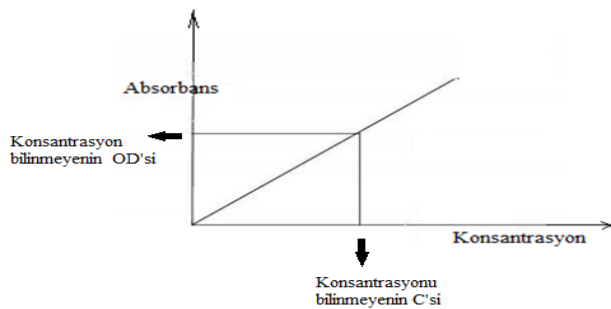
DENEYİN YAPILIŞI:

Standart	Konsantrasyon	Absorbans
1		
2		
3		
4		
5		

1. Küvetler % 50, % 25, % 12,5, % 6,25'lik ve bilinmeyen konsantrasyonlu KMnO_4 çözeltisi ile doldurulur.
2. Fotometrede bu çözeltilerin absorbanları ölçülür. Elde edilen ölçümlerle absorban-konsantrasyon grafiği çizilir.
3. Grafik yardımıyla konsantrasyonu bilinmeyen numunenin konsantrasyonu bulunur.

$$\text{Bilinmeyen konsantrasyonu} = \frac{\text{NOD}}{\text{SOD}} * \text{S.Konsantrasyonu}$$

formülünden de bulunarak karşılaştırılır.



DENEY NO: 3

DeneyinAdı: End-Point Kreatinin tayini

MATERYAL:

1. Distile su
2. TCA
3. Renk reaktifi
4. Standart
5. Serum
6. Santrifüj cihazı
7. Küvet
8. Fotometre
9. Otomatik pipet
10. Deney tüpü
11. Vorteks

DENEYİN YAPILIŞI:

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

	Kör	Standart	Numune
Serum	-	-	1 ml
Standart	-	0.1 ml	-
Distile su	0.5ml	0.4 ml	-
TCA	1ml	1 ml	2 ml

2. Tüpler vorteksle karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilir. Numune tüpü 4000 devirde 10 dk santrifüj edilir. Daha sonra aşağıdaki işlemler yapılır

	Kör	Standart	Numune
Süpernatant	-	-	1.5 ml
Renk reaktifi	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

3. Tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
4. Beklemeden sonra Kör, Standart, Numune küvetleri hazırlanır.
5. Fotometrede küvetlerin 530 nm'de köre karşı absorban değerleri okunur.
6. CN degerini bulabilmek için;

AN

CN= _____ x Cstd formülü kullanılır.

Astd

YORUM

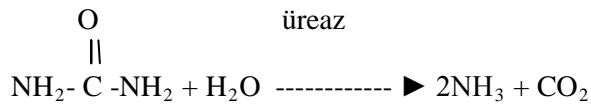
VI. ENZİMLE HİDROLİZ

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

MATERYAL:

1. Substrat (ÜRE) çözeltiler (50, 100, 250, 500, 1000, 1500 mM)
2. ÜREAZ çözeltisi
3. HgCl₂ (% 1)
4. Parakloromerkuribenzoat (PCMB) (7x10⁻⁴ M)
5. 0,5 N Metil red (indikatör)
6. Fosfat tamponu (pH=7, 0.1 M)
7. Pipet
8. Deney tüpü
9. Erlenmayer
10. HCl (0.5 N)
11. Benmari
12. Büret

PRENSİP: Üreaz enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Yukarıdaki reaksiyonun hızına etki eden çeşitli faktörler araştırılacaktır. Reaksiyon hızı ürün miktarı cinsinden ölçülecektir. Bunun için deney sonucu açığa çıkan NH₃, HCl ile titre edilir. Harcanan HCl miktarı hız olarak alınır veya harcanan HCl miktarından NH₃ miktarı da aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

Harcanan HCl miktarı NH₃ miktarına eşit olduğundan;

$$V_{\text{HCl}} \cdot (It) \times M_{\text{HCl}} \text{ (mol/It)} = \dots\dots\dots \text{mol}_{\text{HCl}} = \dots\dots \text{mol}_{\text{NH}_3} \text{ eder.}$$

Buradan parçalanmış üre miktarı da bulunabilir.

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

DENEY NO: 1

DENEYİN ADI: Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

MATERYAL:

1. 7 adet erlenmayer
2. Pipet
3. HCl
4. Metil red
5. Üre
6. Büret
7. PCMB veya HgCl₂
8. Üreaz
9. Büret tutucu
10. 7 adet deney tüpü
11. Benmari

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 7 adet erlenmayer alınır. (100 veya 250 ml'lik)
2. Erlenmayerlerin üzerlerine K₁, K₂, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ yazılır.
3. 7 adet deney tüpü alınır, hepsi yukarıdaki gibi işaretlenir ve aşağıda belirtilen pipetlemeler yapılır.

	K ₁	K ₂	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Substrat (Üre) (1M)	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
PCMB veya HgCl₂	4 damla	4 damla	-	-	-	-	-
Üreaz	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

4. Tüpler karıştırılır.

K₁ oda sıcaklığında

K₂ kaynar suda

D₁ oda sıcaklığında

*Tüm tüpler 30 Dakika inkübe edilir.

D₂ 37°C'de

D₃ 56°C'de

D₄ 75°C'de

D₅ kaynar suda

5. İnkübasyon sonunda D tüplerine 3'er damla PCMB veya HgCl₂ damlatılır ve karıştırılır.

6. Tüplerdeki reaktifler kendilerine karşılık gelen erlenlere boşaltılır ve 2'şer damla metil red ilave edilerek titrasyon yapılır.

7. K (kör) tüplerinde harcanan HCl miktarının ortalaması alınır.

8. Diğer tüpler için harcanan HCl miktarından çıkarılır.

9. Çıkan sonuç 2 ile çarpılır.

10. Sıcaklığa karşı harcanan HCl miktarı grafiğe çizilir.

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

NOT:

a) Kör deneyleri, ortamda enzimin etkisi olmadan bulunabilen NH_3 miktarını veya NH_3 'den başka HCl'yi harcayan sebepleri ortadan kaldırmak içindir.

b) İnkübasyonlar 30 dakika yapıldığı için sonuçlar 2 ile çarpılmalıdır. Çünkü hız ifadesinde birim zaman 1 saattir.

SONUÇ: (Optimum sıcaklık)

DENEY NO: 2**DENEYİN ADI: Enzim miktarının hızı etkisi****MATERYAL:**

1. 7 adet erlenmayer
2. 7 adet deney tüpü
3. PCMB veya HgCl₂
4. Büret
5. Metil red
6. Üre çözeltisi
7. Üreaz çözeltisi
8. Vorteks
9. Büret tutucu
- 10.HCl
- 11.Distile su

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 7 adet erlenmayer alınır.
2. Üzerleri K₁, K₂, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ şeklinde işaretlenir.
3. 7 adet deney tüpü alınır, hepsi yukarıdaki gibi işaretlenir ve aşağıdaki pipetlemeler yapılır.

	K₁	K₂	D₁	D₂	D₃	D₄	D₅
Substrat (Üre) (1M)	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
Distile su	5ml	1 ml	5ml	4ml	3ml	2ml	1ml
PCMB veya HgCl₂	4 damla	4 damla	-	-	-	-	-
Üreaz	1ml	5ml	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml

4. Tüpler karıştırılır ve hepsi optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonunda D tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl₂ ilave edilir ve karıştırılır.
6. Her tüp kendi erlenine boşaltılır ve 2'şer damla metil red ilave edilerek titrasyon yapılır.
7. Her tüp için harcanan HCl miktarı 2 ile çarpılır.
8. Enzim miktarına karşılık gelen HCl miktarı grafiğe çizilir.

SONUÇ:

DENEY NO: 3**DENEYİN ADI: pH'nın hıza etkisi****MATERYAL:**

1. 7 adet erlenmayer
2. 7 adet deney tüpü
3. PCMB veya HgCl₂
4. Büret
5. Metil red
6. Üre çözeltisi
7. Üreaz çözeltisi
8. Vorteks
9. Büret tutucu
10. HCl

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 7 adet erlenmayer alınır. K₁, K₂, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ şeklinde işaretlenir.
2. 7 adet tüp alınır. K₁, K₂, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ şeklinde işaretlenir.
3. Pipetlemeler yapılır.

	K ₁	K ₂	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Substrat (Üre) (750mM)	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
pH	3	9	3	5	7	9	11
PCMB veya HgCl₂	4 damla	4 damla	-	-	-	-	-
Üreaz	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

4. Karıştırılır ve bütün tüpler optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonunda D tüplerine 4'er damla PCMB veya HgCl₂ damlatılır.
6. Karıştırılır.
7. Her tüp kendisine karşılık gelen erlene boşaltılır. K₁, D₁, D₂, D₃ erlenlerine 2'şer damla metil red, K₂, D₄, D₅ erlenlerine 2'şer damla metil oranj damlatılır.
8. Titrasyonlar yapılır. Harcanan HCl miktarı 2 ile çarpılır.
9. Sonuçlar, pH'ya karşılık harcanan HCl miktarı şeklinde grafiğe çizilir.

SONUÇ: (Optimum pH)

VII. ENZİM KİNETİĞİ

DENEY NO: 1

DENEYİN ADI: Substrat miktarının enzim hızına etkisi

MATERYAL:

- 10 adet erlenmayer
- 10 adet deney tüpü
- PCMB veya $HgCl_2$
- Büret
- Metil red
- 10.HCl
- Üre çözeltisi
- Üreaz çözeltisi
- Vorteks
- Büret tutucu

DENEYİN YAPILISI:

- Toplam 10 adet erlenmayer alınır.
- $K_1, K_2, K_3, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7$ şeklinde işaretlenir.
- 10 adet tüp alınır.
- $K_1, K_2, K_3, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7$ şeklinde işaretlenir.
- Bütün tüplere 4'er ml üre çözeltisi ilave edilir.
- K tüplerine 3'er damla PCMB veya $HgCl_2$ ilave edilir.
- K tüplerine 1'er ml üreaz çözeltisi ilave edilerek karıştırılır.
- K tüpleri optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.
- S tüplerine 5'er dakika ara ile 1'er ml üreaz çözeltisi ilave edilir.

	K_1	K_2	K_3	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7
Substrat (Üre mM)	4ml 100	4ml 500	4ml 1000	4ml 50	4ml 100	4ml 250	4ml 500	4ml 750	4ml 1000	4ml 1500
PCMB veya $HgCl_2$	4 damla	4 damla	4damla	-	-	-	-	-		
Üreaz	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

- Karıştırılır ve optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilirler.

	K₁	K₂	K₃	S₁	S₂	S₃	S₄	S₅	S₆	S₇
PCMB veya HgCl₂	-	-	-	2 damla	2 damla	2 damla	2 damla	2 damla	2 damla	2 damla

11. İnkübasyon sonunda tüpler tekrar 5'er dakika ara ile benmariden çıkarılır.

12. S tüplerine 2'şer damla PCMB veya HgCl₂ damlatılır

13. Her tüp (K'lar dahil) kendilerine karşılık gelen erlenlere boşaltılır, her birine 2'şer damla metil red ilave edilir.

14. Titrasyon yapılır.

15. Titrasyonda harcanan HCl miktarı 2 ile çarpılır ve sonuçlar substrat konsantrasyonlarına karşı harcanan HCl şeklinde grafik kağıdına çizilir.

16. V_{max} ve K_M değerleri bulunur.

17. Aynı değerler Lineweaver - Burke eğrisi çizilerek de bulunur.

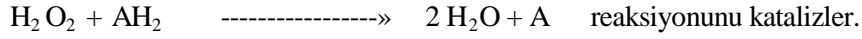
YORUM:

DENEY NO: 2 Peroksidaz ve Katalaz Enzimi

DENEYİN ADI ve AMACI: Peroksidazın etkisinin görülmesi

Peroksidaz enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler.

Peroksidaz



MATERYAL:

1. Deney tüpü
2. Damlalık
3. % 10'luk benzidin
4. Hemolizat (5 ml distile su + 0.5 ml kan)
5. %3'lük H_2O_2

DENEYİN YAPILIŞI:

Deney no: 1

1. Bir deney tüpüne 0.5 ml H_2O_2 ve 2 damla benzidin alınır.
2. Daha sonra hemolizat ilave edilir (hemolizatta peroksidaz enzimi bulunur).
3. Reaksiyon sonunda renk değişimi ve gaz çıkışı gözlenir

Deney no: 2

1. Bir deney tüpüne hemolizat alınır.5 dakika bek alevinde kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılır.
2. Üzerine 0.5 ml H_2O_2 ve 2 damla benzidin ilave edilir.
3. Reaksiyon sonucu gözlenir.

YORUM:

DENEY NO: 3

DENEYİN ADI ve AMACI: Katalaz enziminin etkisinin görülmesi

Katalaz

PRENSİP: H_2O_2 - > $H_2O + 1/2 O_2$ reaksiyonunu katalizler.

MATERYAL:

1. Deney tüpü
2. Hemolizat (Bir deney tüpüne 0.5 ml EDTA'lı kan konur, üzerine 5 ml soğuk distile su ilave edilir. Şiddetle çalkalanır.)
3. %3 lük H_2O_2

DENEYİN YAPILIŞI:

Deney No: 1

1. Bir deney tüpü içerisine hazırlanan hemolizat konur. Üzerine 0.5 ml H_2O_2 ilave edilir.
2. Reaksiyon sonucu oluşan gaz çıkışı gözlenir.

Deney no: 2

1. Bir deney tüpü içerisine hazırlanan hemolizat konur.
2. 5 dakika bek alevinde kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılır.
3. Üzerine 0.5 ml H_2O_2 ilave edilir.
4. Reaksiyonun sonucu gözlenir.

YORUM:

VIII. ANAEROBİK GLİKOLİZ

Deneyin Amacı: Anaerobik glikolizin gözlenmesi. Bunun için O₂'siz ortamda glukozun yıkımı ile oluşan laktik asit, ortamda azalan glukoz ve fosfor tayini yapılacaktır.

MATERYAL:

1. Reaktifler

A.Kombine Çözelti: Glukoz, Nikotinamid + Fosfat Tamponu

(Nikotinamid, beyin ekstresinde bulunan ve NAD'yi parçalayan NADaz enzimini inhibe eder.Fosfat tamponu, hem ortamın pH'sını sabit tutar, hem de glikolizin devamı için gerekli olan fosforu sağlar.)

B. KHCO₃: K⁺, glikolizdeki kinaz enziminin aktivatörüdür.

C. MgCl₂: Mg, glikolizdeki kinaz enziminin aktivatörüdür

D. Beyin Ekstresi: Mitokondrileri alınmış fare beyini ekstresidir. İçerisinde glikoliz enzimleri, ATP ve NAD bulunur.

2. Deney tüpü

3. Pipet

4.Kolorimetre

DENEYİN YAPILIŞI:

1. İki adet deney tüpü alınır.

2. Aşağıdaki pipetlemeler yapılır. (Önce tüp 2, sonra tüp 1 hazırlanır.)

	Tüp 1	Tüp 2
Kombine Çözelti	0,2 ml	0,2 ml
MgCl₂	0,05 ml	0,05 ml
KHCO₃	0,05 ml	0,05 ml
Beyin Ekstresi	0,1 ml	0,1 ml
Distile su	0,1 ml	0,1 ml

3. Tüp 2 karıştırılır, 37°C'de 45 dakika inkübasyona bırakılır.

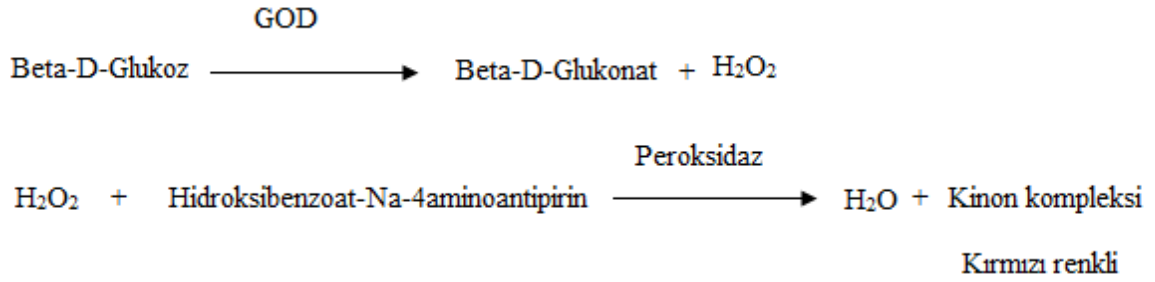
4. Tüp 1 hazırlanır, karıştırılır ve bekletilmeden glukoz, fosfor ve laktik asit çalışılır.

5. Tüp 2 için de inkübasyondan sonra aynı işlemler yapılır.

GLUKOZ TAYİNİ:

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

Prensip: Glukoz oksidaz, havadaki moleküler oksijeni kullanarak glukozdan, glukonik asid ve H₂O₂ oluşturur. H₂O₂, fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Rengin şiddeti ortamdaki glukoz miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyonlar aşağıdaki şekilde cereyan eder:



DENEYİN YAPILIŞI:

1. Aşağıdaki pipetlemeler yapılır.

	Kör tüpü	Standart tüpü	Numune tüpü
Numune	-	-	10 µl
Distile su	10 µl	-	-
Standart	-	10µl	-
Reaktif	1 ml	1 ml	1 ml

2. 490 nm dalga boyunda absorbanları köre karşı okunur.

Hesaplama:

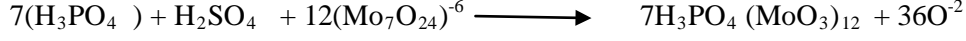
NOD

Glukoz (mg/dl) = -----X SK

SOD

FOSFOR TAYİNİ

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



İnorganik fosfor

Fosfomolibdat kompleksi

REAKTİFLER:

1.Renk reaktifi: H_2SO_4 (0.61 mM), Amonyum molibdat (0.5 N), Sitrik asit (1.78 M)

2.Standart: 1.615 mmol/L monopotasyum fosfat

DENEYİN YAPILIŞI:

1. Aşağıdaki pipetlemeler yapılır.

	Reaktif Körü Tüpü	Numune Tüpü	Numune Körü Tüpü	Std. Tüpü
Sitrik asit	-	-	50 µl	-
Karışım	-	20 µl	20 µl	-
Standart	-	-	-	20 µl
Distile su	20 µl	-	-	-
Reaktif	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

2. Tüpler karıştırılır ve oda ısısında 5 dakika bekletilir.

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

NOD

Fosfor(mg/dl)= ----- x SK

SOD

NOT: Süreye dikkat edilmelidir.

LAKTİK ASİT TAYİNİ :

PRENSİP: Laktik asit FeCl_3 (% 10'luk) ile muamele edildiğinde koyu sarı renkli demir laktat bileşiği meydana gelir.

DENEYİN YAPILIŞI:

1. 2 adet deney tüpü alınarak aşağıdaki pipetlemeler yapılır:

	Kör tüpü	Numune tüpü
FeCl_3 (% 10'luk)	2 damla	2 damla
Distile su	10 ml	10 ml
Reaksiyon karışımı	-	0.3ml
Distile su	0.3ml	-

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

3. Numune tüpünde sarı rengin artması laktik asit oluştuğunu gösterir.

4. Bu işlem her iki inkübasyon tüpü için yapılır.

YORUM:

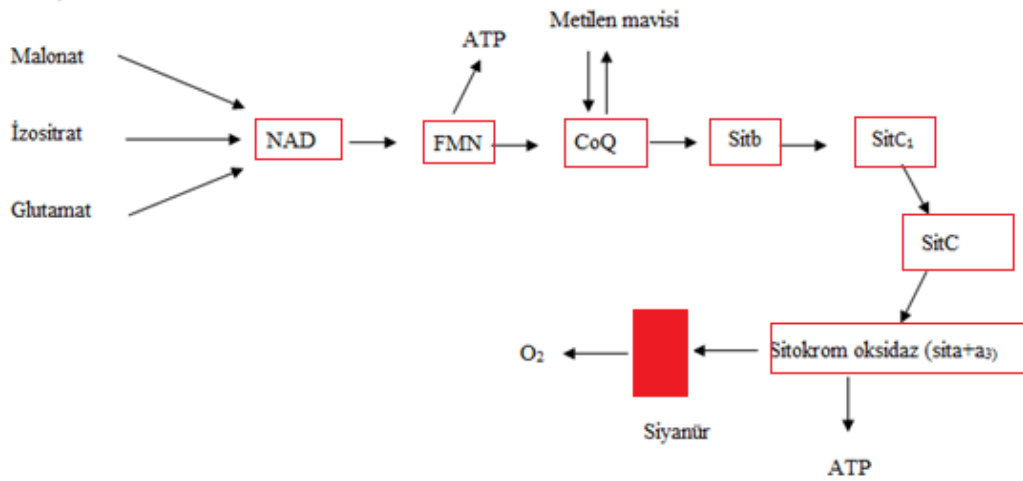
IX. SOLUNUM ZİNCİRİ

Deneyin Amacı : Solunum zinciri reaksiyonlarının incelenmesi.

MATERYAL:

1. 5 adet deney tüpü
2. Süksinat
3. KCN
4. Malonat
5. Glutamat
6. Mitokondri homojenatı
7. Metilen mavisi
8. Distile su
9. Pipet
10. Sıvı vazelin

Solunum zinciri ve deneyin çalışma şeması aşağıdaki gibidir:



Deneyin birinci basamağında elektronlar O_2 yerine metilen mavisine akar. Çünkü, O_2 'in reaksiyona girişi vazelinle engellenmiştir. Elektron akışı sonucu metilen mavisi indirgenir ve rengi değişir. İkinci safhada vazelin çıkarılınca elektronlar metilen mavisinden CoQ ve sitokromlar üzerinden O_2 'e akar. Metilen mavisi yükseltgendiğinden tekrar rengi değişir (eski rengine döner). Bu şekilde elektron akışı gözlenmiş olur.

DENEYİN YAPILIŞI: Deney iki aşamalıdır:

1.aşama

Tüp No	1	2	3	4	5(Kontrol)
Süksinat	0.5	0.5	0.5	-	-
KCN	-	-	0.5	-	-
Malonat	-	0.5	-	-	-
Glutamat	-	-	-	0.5	-
Distile Su	1.5ml	1ml	1ml	1.5ml	2.5ml
Metilen mavisi	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.1ml
Mitokondri homojenatı	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml (kaynatılmış)

2.aşama

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

NOT:

1. Tüpte reaksiyon olur, renk açılır, vazelin alındıktan sonra elektronlar O_2 ' ye verilir. Metilen mavisi elektron verdiği için yükseltgenir ve rengi koyulaşır.
2. Tüpte reaksiyon olmaz, çünkü malonat inhibisyon yapar.
3. Tüpteki oksidasyon 3. basamağa kadar devam eder. Çünkü KCN 3.basamağı inhibe eder. Vazelin alındıktan sonra metilen mavisi yükseltgendiğinden renk koyulaşır. Fakat basamağın biri inhibe edildiğinden renk farkı 1. tüpe göre daha az olur.
4. Tüpte renk değişimi olmaz. Çünkü ortamda glutamat bulunduğu halde NAD yoktur. NAD, yıkama sırasında uzaklaştırılmıştır.

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

X. TRANSAMİNASYON ve KROMATOĞRAFİ

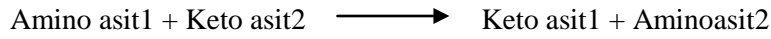
Deneyin Amacı: 1. Transaminasyonun varlığını ortaya koymak

2. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürünlerin kromatografi ile belirlenmesi ve böylece kromatografinin öğrenilmesi.

MATERYAL:

1. Ninhidrin çözeltisi (Asetondaki % 0.2 lik çözeltisi)
2. Glutamat çözeltisi
3. Alanin çözeltisi
4. Pirüvik asit çözeltisi
5. Fosfat tamponu (pH: 7,6)
6. Deney tüpü
7. Kromatografi kağıdı
8. Su banyosu
9. Kurutma makinesi

PRENSİP: Amino gruplarının transferi transaminasyon olarak adlandırılır.



Örn: **Glutamik Asit + Pirüvik asit** $\xrightarrow{\text{GPT=ALT}}$ **α -ketoglutarik asit + Alanin**

Glutamik Asit + Oksaloasetat $\xrightarrow{\text{GOT=AST}}$ **α -ketoglutarik asit + Aspartat**

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

DENEYİN YAPILIŞI:

	Tüp1	Tüp2	Tüp3	Tüp4
Glutamat	50µl	-	100 µl	150 µl
Alanin	-	50 µl	-	-
Pirüvat	-	-	100 µl	50 µl
ALT	-	-	100 µl	-
Distile su	-	-	-	50 µl
Fosfat tamponu	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

1. 37 °C su banyosunda 15 dakika bekletilir (inkübasyon).
2. Kromatografi kağıdı alınarak üzerine eşit aralıklarla 4 adet nokta belirlenir.
3. 1. noktanın üzerine Tüp1 muhtevassından 1 damla damlatılır.
4. 2. noktanın üzerine Tüp2 muhtevassından 1 damla damlatılır.

5. 3. noktanın üzerine Tüp3 muhtevsından 1 damla damlatılır.
6. 4. noktanın üzerine Tüp4 muhtevsından 1 damla damlatılır.
7. Kurutma makinesi ile kâğıt kurutulur.
8. Daha sonra kâğıt solvent sistem (% 70 n-Propanol + %30 NH₃) içerisine konarak 45 dakika bekletilir (inkübasyon).
9. Kurutma makinası ile kâğıt iyice kurutulur.
10. Kromatografi kâğıdı, ninhidrinin asetondaki % 0,2'lik çözeltisine daldırılır (boyama işlemi).
11. Boyama işleminden sonra kurutma işlemi yapılır.

YORUM:

*Boyama işlemi gerçekleştirildikten sonra, çözeltinin glutamat ve alanin muhtevasına bağlı olarak farklı yüksekliklerde bulunan mor bölgeler gözlenir.

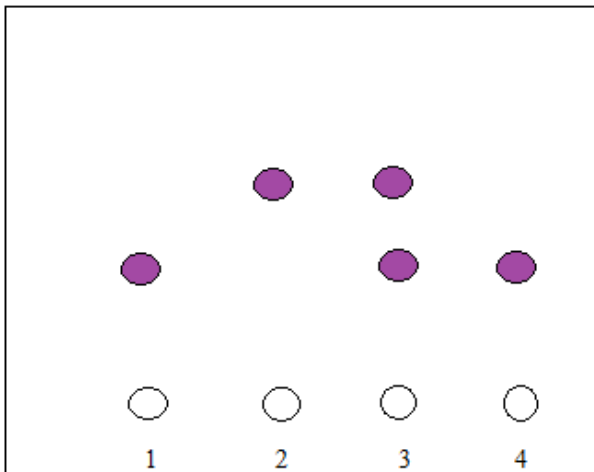
*Alaninin molekül ağırlığı glutamattan daha küçük olduğundan alanin daha hızlı hareket etmiş ve daha yukarıda bir leke meydana gelmiştir.

*Tüp 1 ve Tüp 2 standart amino asit tüpleridir.

*Tüp 3'te enzim etkisiyle gerçekleşen transaminasyon reaksiyonuyla, piruvattan alanin oluşmuştur. Bu alanin kromatografik olarak yürümüştür.

*Tüp 4'te enzim olmadığından herhangi bir reaksiyon olmamıştır, glutamat kromatografik olarak yürümüştür.

*Kromatografi kâğıdı üzerinde, örnek yürüme uzaklığının solvent yürüme uzaklığına oranı olan R_f değeri de tespit edilebilir.



$$R_f = \frac{\text{Örnek yürüme uzaklığı}}{\text{Solvent yürüme uzaklığı}}$$

XI. İDRAR BİYOKİMYASI

DENEY 1. İDRARIN FİZİKSEL ANALİZİ

MALZEMELER:

1. Deney tüpü
2. İdrar örneği
3. Mezür
4. Dansitometre
5. İdrar stribi

Deneyin amacı: İdrarın önemli fiziksel özellikleri incelenecektir.

1.Renk:

2.Görünüm:

3.Koku:

4.Miktar (volüm):

5. Dansite:

6.Osmolarite:

DENEY 2. İDRARIN KİMYASAL ANALİZİ

İdrarda Glukoz Tayini

Deneyin Aşamaları:

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

Mavi veya çok açık yeşil => (-)

Yeşil (tortulu) => (+)

Yeşil - sarı (tortulu) => (+ +)

Sarı - portakal (tortulu) => (+ + +)

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

İdrarda Protein Tayini

Deneyin Aşamaları:

1. Deney tüpünün 2/3' ü kadarına idrar alınır.
2. Tüp tahta maşayla tutularak ve 45°C'lik açıyla eğilerek tüpteki çözeltinin üst kısmı kaynayınca kadar alevde ısıtılır.
3. 3-4 damla tanret reaktifi damlatılır
4. Bulanıklık izlenir.

İdrarda Bilurubin Tayini

Deneyin Aşamaları:

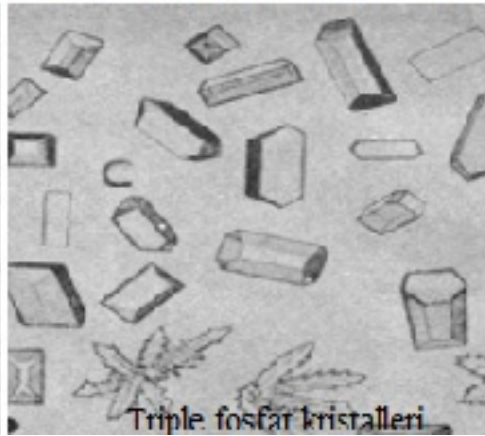
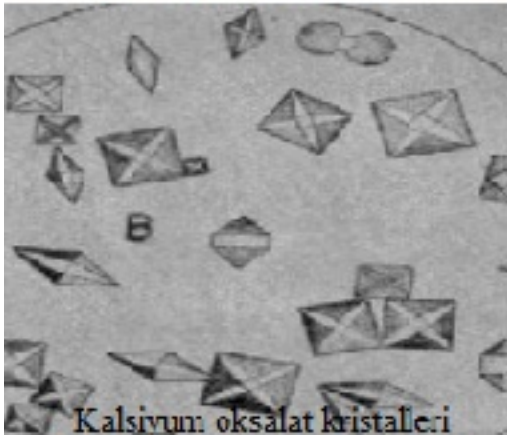
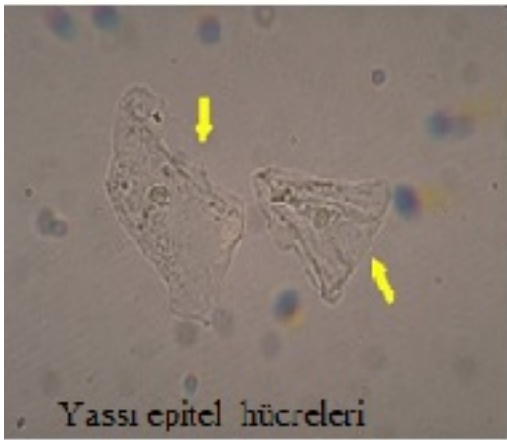
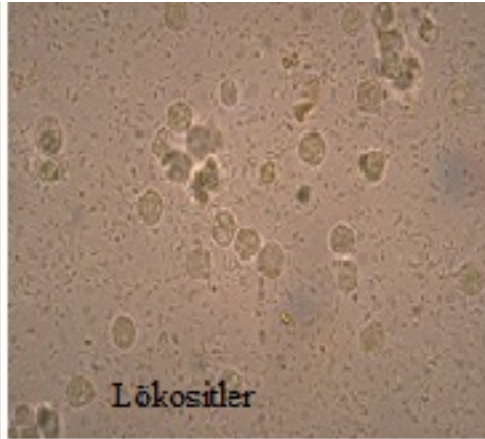
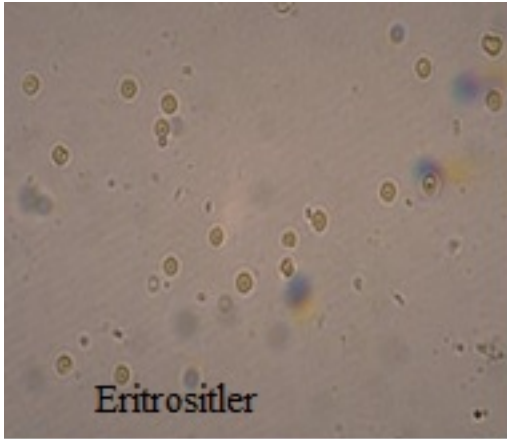
1. Deney tüpüne 5ml idrar alınır.
2. Üzerine 2-3ml Rozin reaktifi konur, yeşil halka meydana gelmesi bilurubinin (+) olduğunu gösterir.

İdrarda Ürobilinojen Tayini

1. Bir deney tüpüne 5 ml idrar konur.
2. 1 ml Ehrlich reaktifi eklenerek karıştırılır. 10 dakika sonra hafif kırmızı renk oluşumu ürobilinojen varlığını, kiraz kırmızısı renk arttığını, hiç renk oluşmaması ise ürobilinojenin bulunmadığını gösterir.

DENEY 3. İDRARIN MİKROSKOBİK ANALİZİ

1500-2000 devir/dakikalık santrifüjde 3-5 dakika santrifüj önce mikroskopun küçük objektifi (10X) ile şekilli elemanların bol olduğu yerler büyük objektif (40X) ile eritrositler, lökositler, epitel hücreleri, silendirler, kristaller, bakteri, mantar ve parazit hücreleri araştırılır ve incelenir



İDRAR KİMYASAL ANALİZ

Görünüm:	Berrak
Dansite (özgül ağırlık)	1,015- 1,025
pH	5-8
Kan (Hemoglobin)	Negatif
Bilurubin	Negatif
Ürobilinojen	Normal
Nitrit	Negatif
Protein	Negatif
Glikoz	Negatif
Keton	Negatif
Eritrosit	Negatif
Lökosit	Negatif



KETONES mmol/l	NEG	1.5	3	7.5	≥15
GLUCOSE mg/dl	NEG	100	300	1000	3000
PROTEIN g/l	NEG	0.3	1.0	3.0	≥10
pH	5	6	7	8	9

İDRAR MİKROSKOBİK ANALİZ

Lökosit	Normal (0-3)	0-3 Normal 3-12 + 12-45 ++ 45-90 +++ 90'dan büyük ++++
Eritrosit	Normal (0-5)	0-5 Normal 5-10 + 10-30 ++ 30-50 +++ 50'den büyük ++++
Mum silendir	0 (hpf)	
Granüler silendir	0 (hpf)	
Hyalen silendir	0 (hpf)	
Lökosit kümesi	0 (hpf)	
Epitel	0 (hpf)	
Böbrek epiteli	0 (hpf)	
Kalsiyum oksalat kristali	0 (hpf)	
Triple fosfat kristali	0 (hpf)	
Ürik asit kristali	0 (hpf)	
Amorf kristali	0 (hpf)	
Bakteri	0 (hpf)	
Hif maya	0 (hpf)	
Tomurcuk maya	0 (hpf)	

Hpf: High power field. (Büyük büyütme alanı)