

## AMİNOASİT ANALİZATÖRÜ ÇALIŞMA ESASI VE BİTKİ FİZYOLOJİSİ ARAŞTIRMALARINDA SAĞLADIĞI İMKANLAR

Bilkân CİRELİ

(Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Botanik Kürsüsü)

Son yıllarda Biyolojik şifre ve Protein sentezinin anlamının daha iyi anlaşılması ile protein sentezinin esas yapı taşı amino asitlerin, çeşitli metabolik ilişkilere göre analizlerini ve değişimlerinin tatbiki için ince analizlerinin yapılması ön plana çıkmıştır. Bu bakımdan amino asitlerin çok hassas ve ince analizleri yapılacak metod ve cihazlar geliştirilmiştir. İşte bu analizlere imkân veren önemli ve son yılların modern cihazlarından biri amino asit analizatörüdür. Aynı prensip içinde çeşitli firmalardan farklı tip ve modeller halinde geliştirilmişleri vardır. Biz bu yazımızda özellikle Giessen Üniversitesi Bitki Besleme Kürsüsünde üzerinde çalıştığımız Model 120 B Beckman tipi amino asit analizatörünün kısaca tanımını ve bu cihazın Bitki Fizyolojisi çalışmalarında açtığı yeni imkânları açıklamaya çalışacağız.

Model 120 B Beckman amino asit analizatörü bir karışımın ihtiva ettiği amino asitleri kendi kendine separe eder ve kantitatif olarak ölçer. Bu tip amino asit analizatöründe kolorimetrik olarak ninhidrin reaksiyonu ile komponentin seperasyonunun tesbiti, kolonlardaki mevcut tampon solüsyondan dolayı birbirini takip eden iyon değişimleri ile olan kromatografi ayırımı, analizinin esas prensipleri üzerinde rol oynar. Alet bu tesbit ve ayırma işi için bir pompa sistemine, birçok noktalı işaretleyiciye umumî renk reaksiyonu ve kantitatif analiz için bir kolorimetreye sahiptir. Aynı zamanda alet, analizinin devamı esnasında kullanılan bütün araçları kolayca içinde depolayabilmektedir. Bu bakımdan Model 120 B Beckman amino asit analizatörü muhtelif solüsyonların amino asitlerini kantitatif olarak tesbit eden başlı başına bir laboratuvar gibidir.

Analizatör peptit hidrolidaz ve protein içindeki bileşiklerde fizyolojik sıvılarda, urin ve kan plazmasında, doku ekstrelerindeki bazik, nötral, asit tipteki amino asitlerin analizinde kullanılmaktadır. Elektroferezde hazırlanmış tecrübe materyellerinin amino asitleri de az farklı bir muamele tatbik edilmek sureti ile analizatörde ölçülebilir.

Kullanılacak materyelin vasfına göre değirmende veya döğülerek elde edilen un halindeki numuneden 100 mg. tartılıp buna 100 ml. 6n HCl ilâve edilir ve 110° C de 22 saat müddetle hidrolize terkedilir. (Alet çalışırken amino asitlere ait eğrilerin çok büyük veya küçük olmasına göre bu kuru ağırlık miktarı, paralel yapılacak tecrübeye değıştirilebilir). Bu hidroliz neticesinde proteinler amino asitlere parçalanmaktadır. Eğer serbest amino asitlerle çalışılmak isteniyorsa materyel taze halde iken ethanol ile ekstre edilir ve alette burada elde edilecek solüsyon kullanılır. Hidrolizden ayrılan solüsyona soğuduktan sonra spatül ucu ile biraz aktif karbon ilâve edilir, filtre kâğıdından süzülür. Süzünüye birkaç tane cam inci atılarak rotasyon aparatında 45° de asitin çıkması beklenir. Tamamı ile kuru kalan balona 10-15 ml PH = 2,2 tampon solüsyonundan konarak, (bu tampon solüsyonların hazırlanması alete ait katalogda verilmiştir) iyice çalkalanır. İç içe konan iki özel filtre kâğıdından süzülür (589<sup>3</sup> band filtr 0,0005 gr.). Bu tip filtre kâğıdı amino asitler için en elverişli olanıdır. Ağzı kapalı şişeler içine konan solüsyon frijderde muhafaza edilir. İçinde bakteri üremediği müddetçe kullanılabilir. Fakat iki paralel tecrübe arasındaki zamanı fazla uzatmamak lâzımdır. Alette iki tip kolon mevcuttur. Bu kolonlar firmadan özel olarak gönderilen bir reçine ile doldurulmuştur. Bunların kat'iyen kuru kalması lâzımdır. Devamlı olarak üzerlerinde muayyen tampon solüsyonlar bulunmalıdır. Her iki kolonda reçinenin üzerinde özel bir filtre bulunur. Kolonlara verilen solüsyonlar bu filtreden süzülerek reçineye gelirler. Normal olarak bu filtrelerin de altı ayda bir değıştirilmesi lâzımdır. Eğer bu filtrelerden yoksa o zaman bir metal filtre ile bunun üzerine üç normal filtre kâğıdı konur. Bunların da hiç olmazsa haftada bir değıştirilmesi lâzımdır. Alet bu tip bitkisel tecrübeler için daimî sabit olan 50°C de çalışır. Fakat kan plazması veya diğeri fizyolojik sıvılar için bu temperatür yükseltilmektedir.

Deneye başlamadan önce kolondaki tampon solüsyon çekilir. Önce deney solüsyonumuzdan 0,5-1 ml. verilir ve bu kolona hava pompası bağlanarak reçineye emdirilir. İki defada 0,5 ml. den ibaret PH: 5,28 tampon solüsyon verilir. Bu da reçineye yine hava pompası ile emdirilir ve küçük kolonun çalışmasının 22 inci dakikasında büyük kolonda tec-

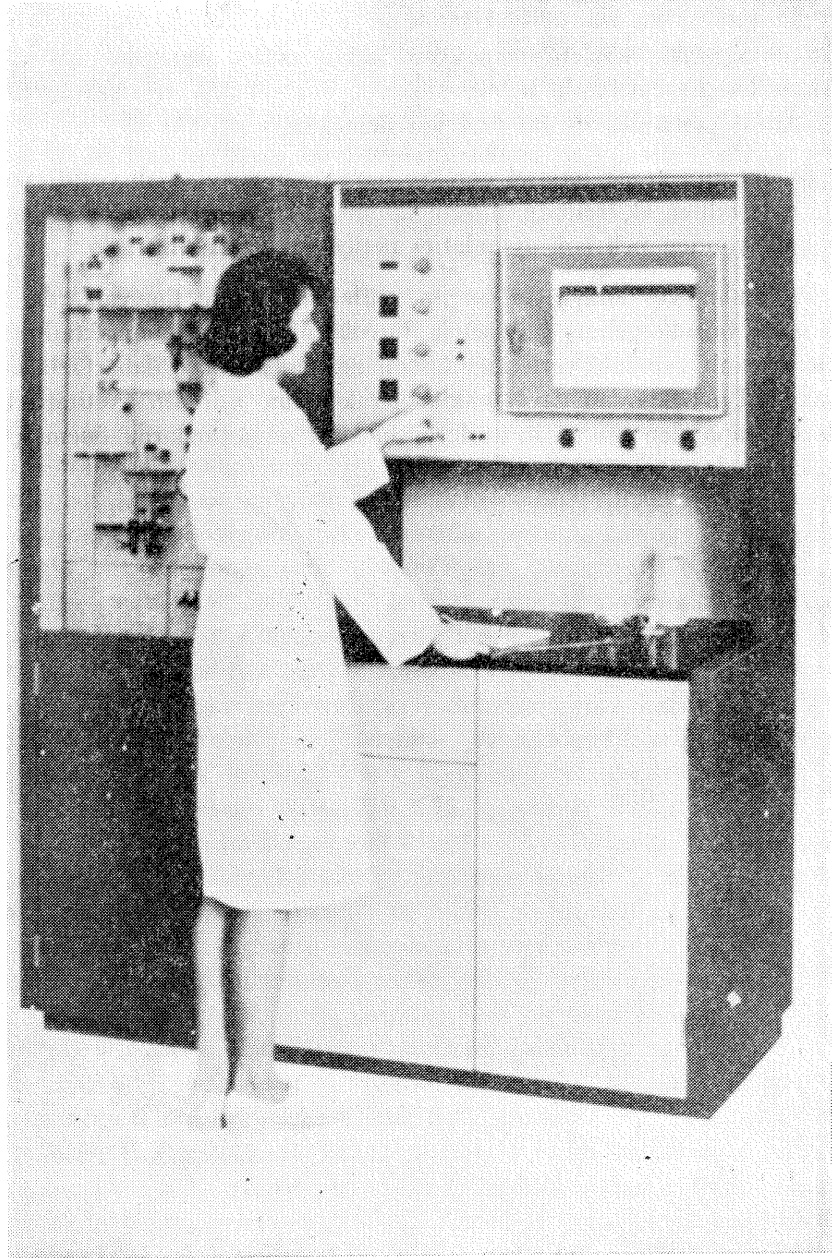
rübeye başlanır. Tecrübe solüsyonu ya küçük kolonda olduğu gibi 1 ml. veya daha fazla verilir. Bu miktar çizilen amino asit eğrilerinin büyük veya küçük oluşuna göre değiştirilebilir. Büyük kolon için kullanılan tampon solüsyon PH: 3,28 dir. Küçük kolon çalışırken buna ait manometrenin 30-60 büyük kolonun ise 150-180 arasını göstermesi lâzımdır. Bunlarda aletteki herhangi bir bozukluk sebebi ile yükselme olursa grafik değerlendirilmemelidir. Çünkü tampon solüsyonun hızlı ilerlemesi yüzünden farklı amino asitler aynı orijinden gelebilirler ve neticeler hatalı olur. Devamlı gelen tampon solüsyondan dolayı reçineye absorbe olan deney solüsyonundaki amino asitler muayyen iyon değişmelerine uğrayarak aşağıya itilir. Aşağıda mevcut bir su banyosunda ninhidrin ile kolorimetrik olarak reaksiyon verir. Bu renk reaksiyonu çizdirici kol vasıtası ile logaritmik işaretlenmiş grafik kâğıdı üzerinde renkli noktalar halinde amino asit eğrilerini çizer. Amino asit eğrileri kâğıt üzerinde yan dallarının büyüklüğüne göre bir sıra takip ederler. Gerek büyük, gerekse küçük kolondaki ilk çizilen eğri daima atılır. Küçük kolonda mevcut tampon solüsyona göre lysin, histidin, arginin, büyük kolonda ise asparagin asit, thereonin, serin glutamin asit, prolin, glycin, alanin cys-tin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin, phenylalanin eğrileri alet tarafından çizilir. Küçük ve büyük kolonun çalışması 3,5-4 saat devam eder. Son amino asit eğrisi çizildikten bir müddet sonra alet otomatik olarak durur veya çizdirici durdurulduktan sonra küçük kolon için 10 dakika, büyük kolon için 15 dakika sonra alet bizim tarafımızdan durdurulur. Tecrübe bittikten sonra kolon 3-4 tecrübeden sonra yarım saat 0,2n NaOH ve yarım saatte PH: 5,28 ile yıkanır. Büyük kolon ise her tecrübenin bitiminde bir buçuk saat 0,2n NaOH ve üç saatte PH: 3,28 tampon solüsyon ile yıkanır. Bu süreler minimum sürelerdir. Daha uzun olması muhakkak çok daha iyidir. 0,2n NaOH reçinedeki arta kalan farklı iyonları nötürleştirir. Bu süre sonunda alet yeni bir tecrübeye hazır demektir. Grafik kâğıdı üzerindeki amino asit eğrilerinin boyu ile eni ölçülür. Bunlar toplum hacim ile çarpılır, belli bir C sabitine bölünür. Bu C sabiti de standart mahlüle göre hesaplanır. Çıkan sayı, hangi amino asitini hesaplıyorsak onun mol gr. ağırlığı ile çarpılır. Alınan kuru madde-deki amino asit miktarı yüzde olarak hesaplanır.

Giessen Üniversitesinde kaldığım sürede farklı reaksiyonlara uğratan genç *Lens culinaris* ve *Vicia faba* köklerinin amino asitlerini bu tip analizatörde ölçme imkânını buldum. Dekapitasyona uğratan, Colchisin, Cumarin ile muamele edilen köklerde ve dolayısı ile bu köklerin epidermis ve korteks hücrelerinde boyuna uzamalarının tipik inhibisyonuna mukabil enine gelişmelerinin stimüle edilişi müşahede edilmiş-

tir. Acaba bu şekilde farklılaşmış köklerde amino asitler yönünden de bir fark olabilir mi sorusu bizi bu tecrübeye sevk etmiştir. Neticede reaksiyona uğratılan köklerde muayyen amino asitler yönünden bir artış tesbit edilmiştir. Şu halde bu tip köklerde kontrol köklere nazaran protein sentezi yönünden de bir fark var demektir.

Bunun gibi gerek bitkisel gerekse hayvansal dokulardan çeşitli şartlarda elde edilen ekstrelerde mevcut amino asit miktarları tayin edilerek fizyolojik yönden pek çok aydınlatıcı neticelere varılabilir.

Proteinler ve dolayısıyla amino asitler bitkilerde, hayvanlarda ve bunlardan husule gelmiş her şeyde büyük miktarda bulunmaktadır ve bunların canlı yapıdaki yerlerinin önemi de gün geçtikçe daha fazla artmaktadır. Bu bakımdan gayet dakik olarak amino asitlerin kantitatif tayinlerini yapabilen bu analizatörlerin biyolojik araştırmalarda önemi çok büyük olacaktır.



Amino asit analizatörünün genel görünüşü.

Model 120B Beckman amino Asit analizatörü  
Çalışmasını gösterir şema

