

PROTEİNLER

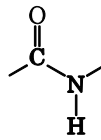
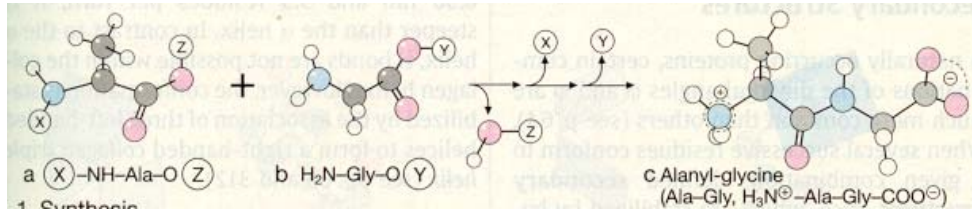
Protein tanımı ve proteinlerin yapılarındaki bağlar

Proteinler, amino asitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir. Proteinler, amino asitlerin polimerleridirler. 20 standart amino asit, protein yapısının dilinin yazıldığı bir alfabe gibi düşünülebilir; böylece tür olarak çok sayıda protein olduğu anlaşılır ki yeryüzünde bütün canlılardaki protein türlerinin bir milyon kadar olduğu tahmin edilmektedir.

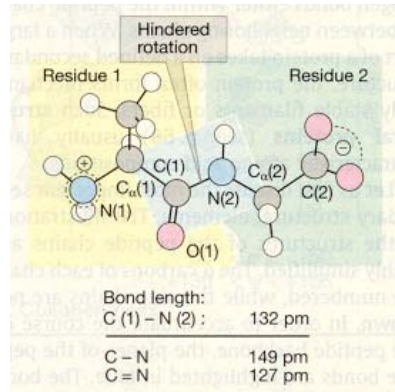
Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar; bir bakteri hücresinde yaklaşık 4000 tür protein bulunmaktadır. Proteinler, inanılmaz derecede birçok işlev görürler; yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Enzimler ve polipeptit hormonlar, metabolizmanın düzenlenmesinde önemlidirler. Kastaki kontraktıl proteinler hareketi sağlarlar. Kemikte kollajen, kalsiyum fosfat kristallerinin depolanmasını sağlar. Kanda albümin ve hemoglobin taşıma görevi alırken; immünoglobülinler bakteri ve virüslerin yıkılmasında görev alırlar.

Proteinlerin yapılarında kovalent bağlar ve kovalent olmayan bağlar vardır. Proteinlerin yapılarındaki **kovalent bağlar**, peptit bağları ve disülfid bağlarıdır; **kovalent olmayan bağlar** ise hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar)'dır.

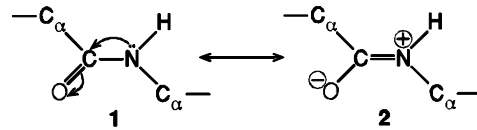
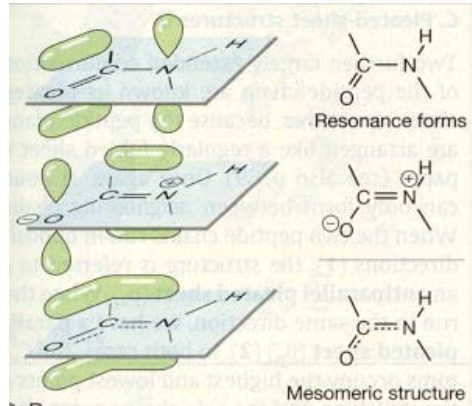
1) Peptit bağları: Bir amino asidin α -karboksil karbonu ile bir başka amino asidin α -amino azotu arasında oluşan C—N bağlarıdır:



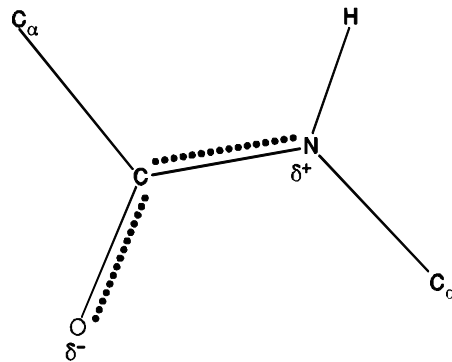
Bir C—N tek bağının uzunluğu 1,49 Å^o (149 pm) ve bir C=N çift bağının uzunluğu 1,27 Å^o (127 pm) olduğu halde peptit bağının uzunluğu 1,32 Å^o (132 pm) kadardır:



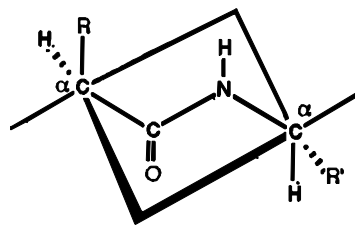
Peptit bağının uzunluğunun C=N çift bağının uzunluğundan büyük C-N tek bağının uzunluğundan küçük olması nedeniyle peptit bağının kısmen çift bağ olduğu kabul edilir. Bunun da nedeni, peptit bağlarında rezonans veya mezomeri denen durumdur:



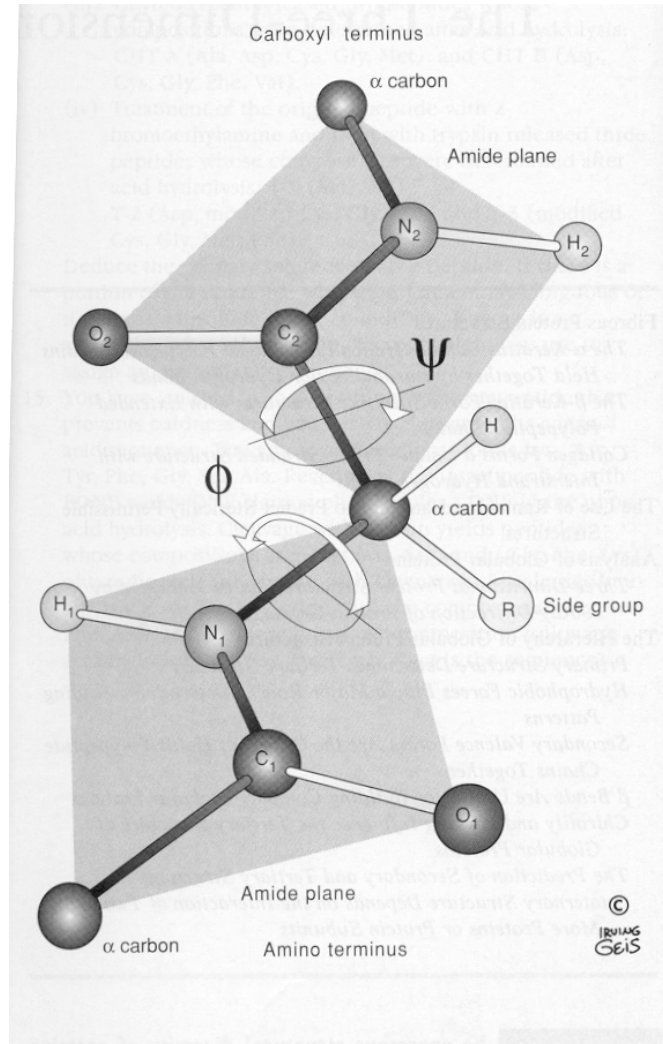
Peptit bağlarındaki rezonans veya mezomeri nedeniyle OC—N bağı %50 çift bağ niteliği kazanmıştır:



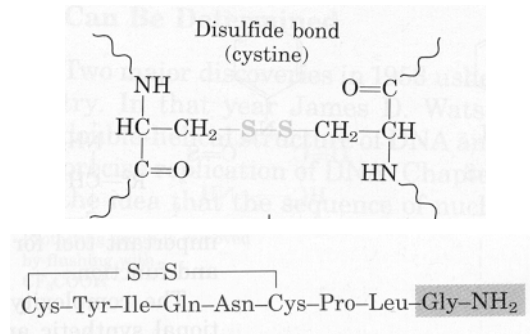
Çift bağların eksen etrafında dönmeleri sınırlı olduğundan, peptit bağı oluşumuna katılan grupların atomları (3C, O, N ve H atomları) bir düzlemde bulunurlar; peptit bağı, rijit ve düzlemseldir:



Peptit bağının iki yanındaki α -karbon atomları, tek bağ etrafında ϕ ve ψ ile gösterilen açılarla dönüş yapabilirler. ϕ , α C—N bağının dönüş açısıdır; ψ ise α C—C bağının dönüş açısıdır:



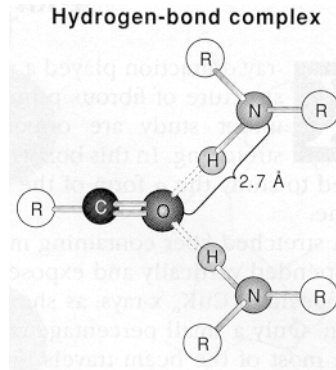
2) Disülfid bağları: İki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, —SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S—S bağlarıdır.



Disülfid bağlarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır. Disülfid bağları, bir polipeptit zinciri içerisinde kurulabilir veya çeşitli polipeptit zincirlerinin birbirine bağlanmasını sağlayabilir. Disülfid bağları, ribonükleaz, oksitosin ve vazopressinde aynı polipeptit zincirinde bulunur; insülinde ise iki ayrı polipeptit zincirini birbirine bağlar.

3) Hidrojen bağları: Polipeptit zinciri oluşturan peptit bağlarındaki rezonans veya mezomeri durumundan dolayı, oksijenlerin bilinen keto gruplarından daha negatif, azotların ise pozitif özellik taşımasının sonucu olarak, bir polipeptit zincirdeki bir peptit düzleminde bulunan

oksijen atomu ile bir başka peptit bağı veya düzlemindeki azot atomu arasında, aradaki uzaklık yaklaşık $2,7 \text{ \AA}$ olduğunda, hidrojen köprüsü şeklinde ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{N}$) oluşan bağlardır:



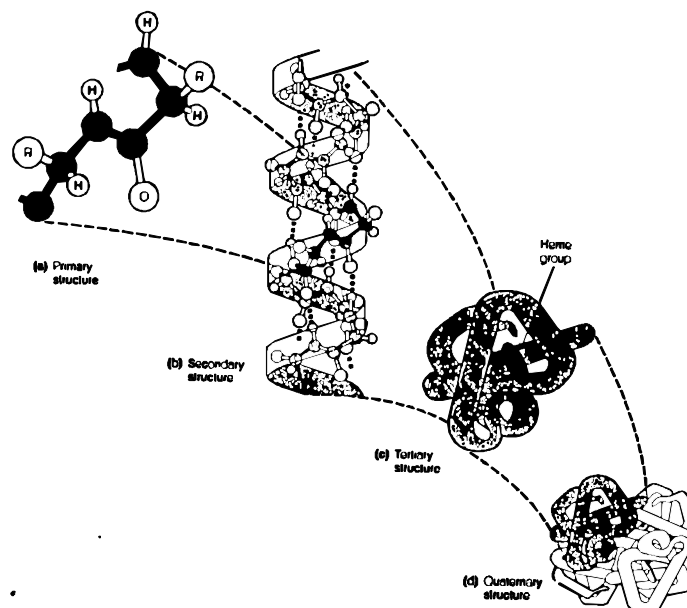
4) İyon bağları: Polipeptit zincirlerindeki asidik ve bazik amino asit kalıntılarının fonksiyonel gruplarının fizyolojik pH'da tamamen veya kısmen iyonlaşmış halde bulunmalarının sonucu olarak, elektronegatif ve elektropozitif gruplar arasında gelişen *elektrostatik çekim kuvveti* ile ($\text{COO}^- \cdots \cdots \text{H}_3\text{N}^+$) oluşan bağlardır.

5) Apolar bağlar (hidrofob bağlar): Polipeptit zincirindeki amino asit kalıntılarının metil grubu, alifatik grup, siklik grup gibi apolar kısımlarının birbirlerine yeter derecede yakın olmaları halinde geçici bir polarite göstermelerinin sonucu ortaya çıkan ve *Van der Waals-London çekme kuvveti* diye bilinen zayıf çekme kuvveti ile ($\text{CH}_3 \cdots \cdots \text{CH}_3$) oluşan bağlardır. Hidrofobik etkileşimler gerçek bağ değildirler; elektron paylaşımı yoktur. Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin iç kısımlarının kararlı olarak devamlılığının sağlanmasında rol oynar.

Proteinlerin yapısında itici güçler de bulunmaktadır: 1) Aynı yükü taşıyan gruplar arasında, iyonik güçlerin tersi olan, elektrostatik itme olur. 2) Çok yakın duran atomlar arasında Van der Waals itici güçleri vardır.

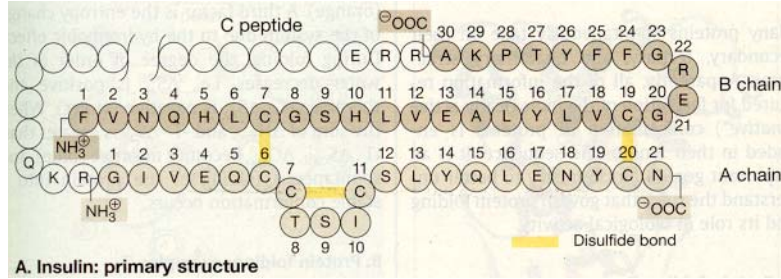
Protein moleküllerinin yapısı ve konformasyonu

Proteinlerde birinci (primer), ikinci (sekonder), üçüncü (tersiyer) ve dördüncü (kuarterner) yapı diye dört yapı tanımlanır:

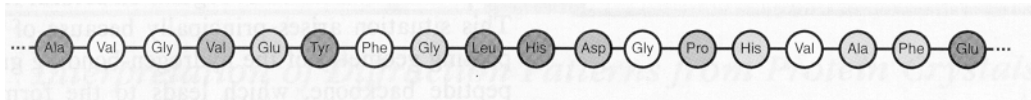
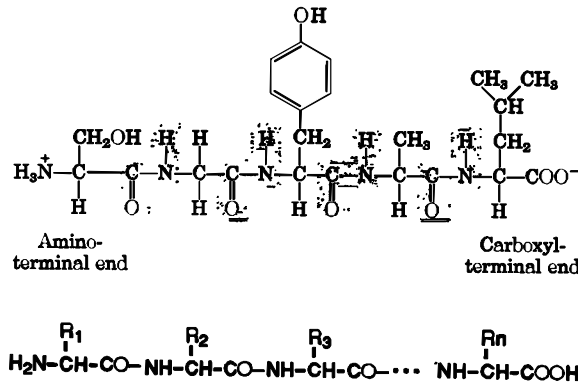


Bir proteinin primer (birinci) yapısı

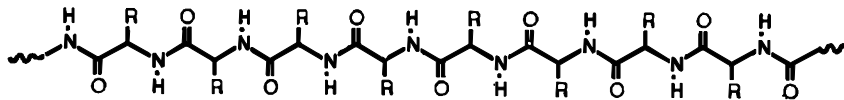
Bir proteinin primer (birinci) yapısı, bir protein için karakteristik ve genetik olarak tespit edilmiş olan amino asit dizilişidir; belirli türde, belirli sayıda, belirli diziliş sırasında amino asitlerin birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları bir polipeptit zinciri biçimindeki yapısıdır:



Bir polipeptitteki amino asit üniteleri, sıklıkla **amino asit kalıntıları** olarak isimlendirilirler. Basit olarak bir polipeptit zincirden ibaret olan protein, zincir başındaki amino asit kalıntısında serbest bir α -amino grubuna sahiptir; zincir sonundaki amino asit kalıntısında ise serbest bir α -karboksil grubuna sahiptir. Buna göre bir protein polipeptit zincirinin bir ucu **amino terminal uç** veya **N-terminal uç**; diğer ucu **karboksil terminal uç** veya **C-terminal uç** olarak isimlendirilir:

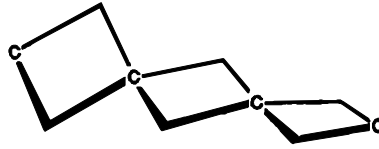


Bir proteinin primer yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, peptit bağlarıdır. Bir proteinin primer yapısında, peptit bağları ile birbirine tek bağlarla bağlı bir atomlar zinciri oluşmuştur; diğer atom ve kalıntılar bu atomlar zincirinin dışında ve değişik yönlerde bulunurlar:



Peptit bağındaki rezonans veya mezomeri nedeniyle OC—N bağı %50 çift bağ niteliği kazanmıştır; çift bağların eksen etrafında dönmeleri sınırlı olduğundan peptit bağı oluşumuna katılan grupların atomları (3C, O, N ve H atomları) bir düzlemde bulunurlar. Peptit bağının iki yanındaki α -karbon atomları, tek bağ etrafında ϕ ve ψ ile gösterilen açılarla dönüş yapabilirler; ϕ , α C—N bağının dönüş açısıdır; ψ ise α C—C bağının dönüş açısıdır. Polipeptit zincirinin omurgasının uzaydaki düzeni, bu iki dönüş açısıyla belirlenir. Peptit bağının iki yanındaki α -karbon atomlarının tek bağ etrafında ϕ ve ψ ile gösterilen açılarla dönüş

yapmalarının sonucu olarak polipeptit zincirde art arda gelen küçük peptit düzlemleri aynı düzlemde bulunmazlar:



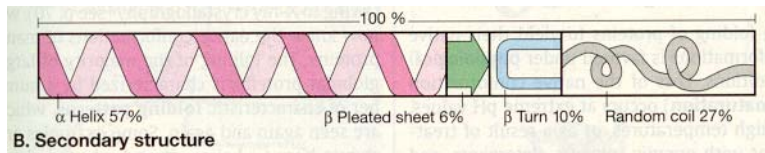
Polipeptit zincirinin omurgasındaki atomların 1/3'ünün hareketli, 2/3'ünün hareketsiz oluşu yüzünden omurgada bir yarı sertlik vardır.

Bir proteinin sekonder (ikinci) yapısı

Bir proteinin sekonder (ikinci) yapısı, yarı sertleşmiş polipeptit zincirlerinin bükülmeler ve katlanmalarla oluşturdukları özgün kangallar biçimindeki yapısıdır.

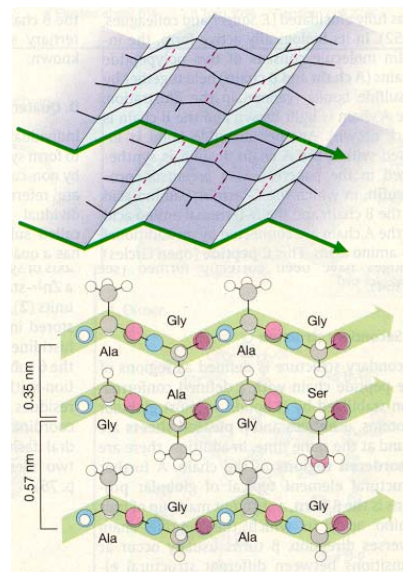
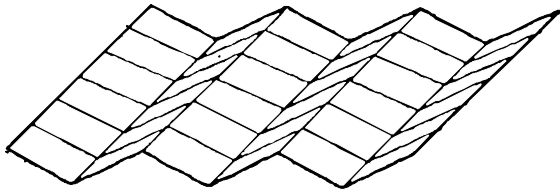
Bir proteinin sekonder yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, primer yapı ile meydana gelen polipeptit omurgasının özelliği ve yan bağlardan özellikle hidrojen bağlarıdır.

Bir proteinin primer yapısı yani polipeptit zinciri omurgası oluşur oluşmaz, özgün diziliş sırasındaki amino asit kalıntılarının R- yan gruplarından uzanan özel kimyasal gruplar, özgün katlanmalar yönetirler. Proteinler için, *gelişigüzel kangallanım*, *α-heliks yapısı* ve *β-konformasyonu* veya *kırmalı tabaka yapısı* olmak üzere üç değişik sekonder yapı tanımlanır:

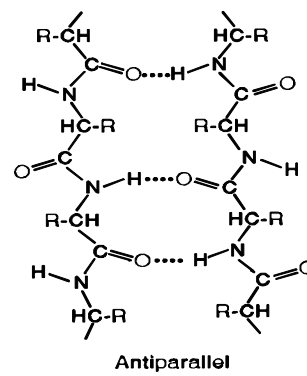
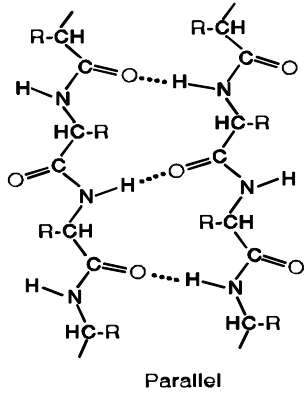
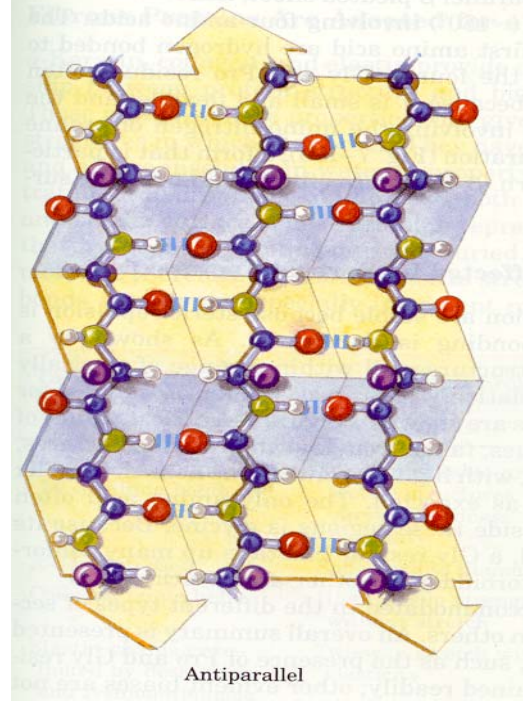
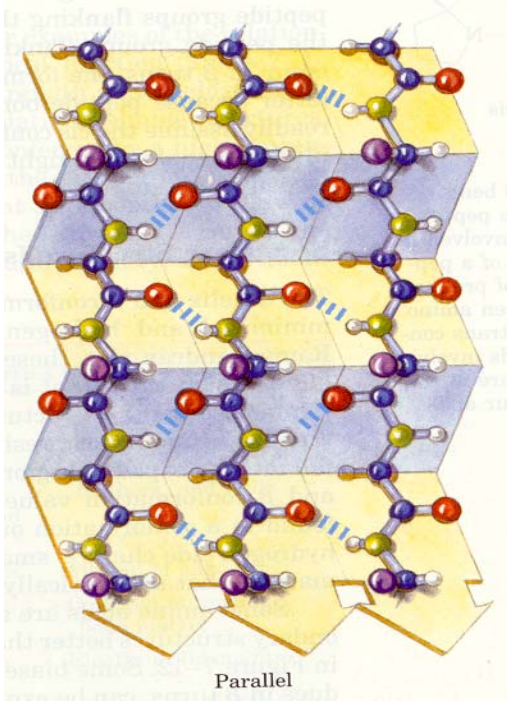


Proteinlerin gelişigüzel kangallanım tipi sekonder yapısında, polipeptit zincirin R-kalıntıları, α-karbonlar etrafında dönüşler yaparlar; fakat polipeptit zinciri boyunca tekrarlanmış bir örneğine rastlanmayacak biçimde davranışlar olur. *Gelişigüzel kangallanımında hidrojen bağları ve diğer yan bağlar rol almaz; peptit bağları düzlemleri arasında kurucu bir ilişki yoktur.*

Proteinlerin β-konformasyonu veya kırmalı tabaka yapısı tipi sekonder yapısında, molekülün şekli, kırmalı tabakalı görünümdedir:

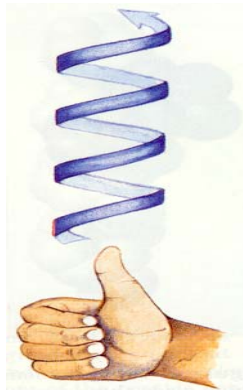


Proteinlerin kırmalı tabaka yapısı tipi sekonder yapısında, polipeptit zincirdeki amino asit kalıntılarının R- grupları, ya aynı yönde sıralanma ile paralel dizilme gösterirler, ya da zıt yönlerde sıralanma ile antiparalel dizilme gösterirler:

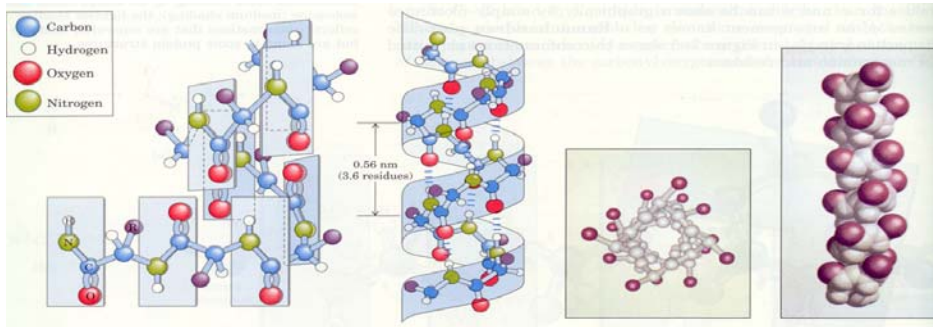


Proteinlerin kırmalı tabaka yapısı tipi sekonder yapısında, hidrojen bağları önemli rol almıştır.

Proteinlerin α -heliks yapısı tipi sekonder yapısında, polipeptit omurgası, oluşması mümkün olan bütün hidrojen bağlarının oluşması için, kıvrımları sağa dönen bir heliks biçiminde bükülmüştür:

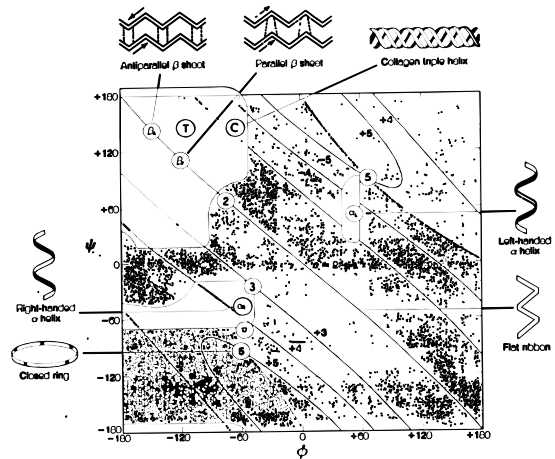
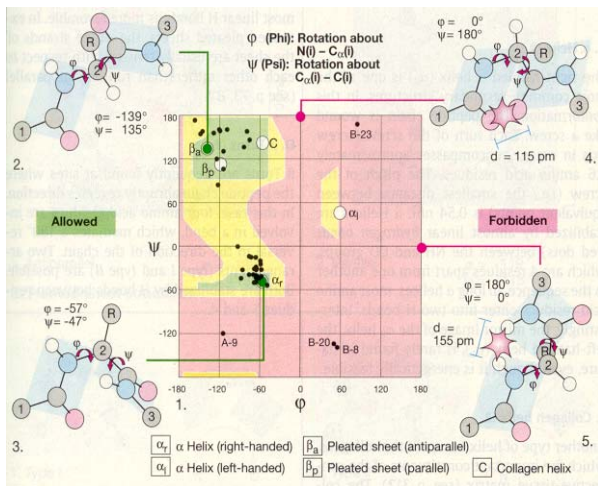


Proteinlerin α -heliks yapısı tipi sekonder yapısında, α -heliksin her kıvrımında 3,6 amino asit kalıntısı bulunur ve bir kıvrımın yüksekliği 0,56 nm kadardır; polipeptit zincirdeki amino asit kalıntılarının R- grupları, heliks yüzeyinden dışarı sarkmışlardır:



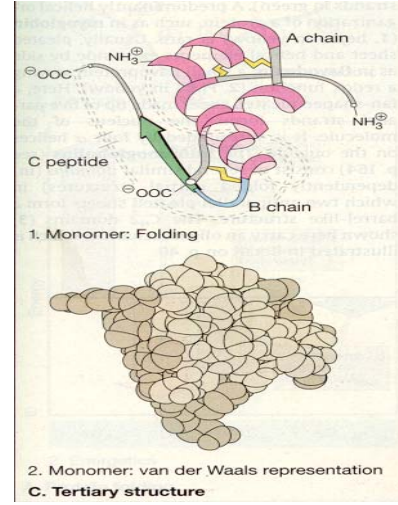
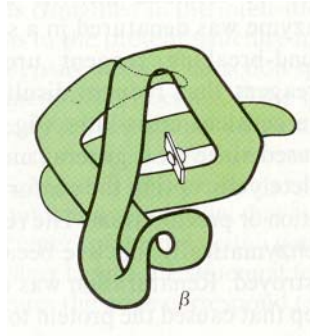
Polipeptit zincirdeki bazı amino asit kalıntıları, aynı zincirin iç hidrojen bağlarının oluşumuna, yapısı ve bulunduğu koşullar nedeniyle olanak vermez; heliks oluşumuna engel olabilir. Yüklü bazı amino asitler heliks oluşumunu engellerler. Glutamik asitten zengin bölgeler, komşu glutamik asitlerin negatif yüklü karboksil gruplarının birbirini itmesi nedeniyle hidrojen bağlarını stabilize edemez ve α -heliks oluşturamaz. Aynı şekilde, pozitif yüklü R grupları olan lizin ve arjinin de α -heliks oluşumunu önler. α -heliks yapısında genellikle pozitif yüklü amino asitler, negatif yüklü amino asitlerden üç kalıntı uzakta bulunur; iki aromatik halkalı amino asit sıklıkla üç kalıntı uzaklıktadırlar ve hidrofobik etkileşime neden olurlar. Prolinin peptit bağına giren azot atomu rijit halka yapısının bir parçası olduğundan, α -heliks oluşumunda prolin, N-C bağının dönüşünü engeller; bu nedenle prolin, nadiren α -heliks içinde yer alır. Heliks kıran veya kalıcılığını bozan glisin, prolin, serin, treonin, asparajin gibi amino asit kalıntılarının bulunduğu yerlerde gelişigüzel kangallanım meydana gelir.

Peptit bağının iki yanındaki α -karbon atomlarının, tek bağ etrafında ϕ ve ψ ile gösterilen açılarla dönüş yapabildiklerini, $\alpha C-N$ bağının dönüş açısının ϕ olduğunu ve $\alpha C-C$ bağının dönüş açısının ise ψ olduğunu biliyoruz. Bir proteinin sekonder yapısı içinde ϕ ve ψ açıları, $+180^\circ$ ile -180° arasında bir değerde olabilir. Bir proteinin sekonder yapısındaki ϕ değerlerine karşılık ψ değerlerinin noktalanması ile elde edilen grafiğe **Ramachadran plot** denmektedir. Bilinen proteinlerin α -heliks, β -kırmalı tabaka yapısı gibi sekonder yapılarında yer alan ϕ ve ψ açıları hesaplanarak **Ramachadran plot** grafiğinde gösterilmiştir. Buna göre, sekonder yapısı bilinmeyen bir proteinin ϕ ve ψ açıları saptanarak bu grafikten sekonder yapısı hakkında fikir edinilebilir:



Bir proteinin tersiyer (üçüncü) yapısı

Bir proteinin tersiyer (üçüncü) yapısı, polipeptit zincirinin, sekonder yapı oluşumundan sonra, daha önce açıklanan bağlayıcı güçlerin hepsinin toplamı ile uzayda daha ileri katlanmalar veya lifler halinde düzenlenme sonucu oluşan globüler veya fibriler yapısıdır:

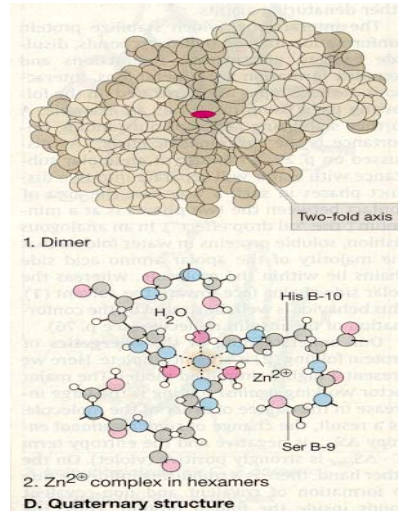
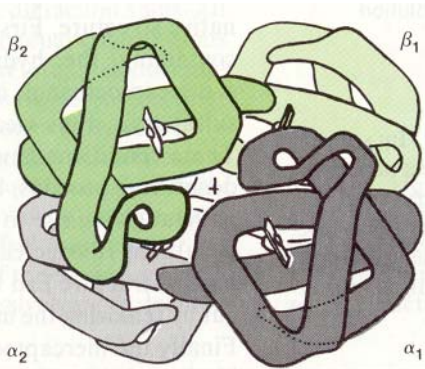


Bir proteinin tersiyer yapısının oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van der Waals çekimleri ve iyon bağları da katılır. Böylece, üç boyutlu, tam konformasyonlu ve yoğunlaşmış protein molekülü meydana gelir.

Bir proteinin üç boyutlu yapı şekli, sulu çözeltide çeşitlilik gösterir. Globüler proteinlerde eksenleri arasındaki oran 2:1'e varan rotasyon elipsoid şekil karakteristiktir. Fibriler proteinlerde eksenleri arasındaki oran 30:1'e varan çok gerilmiş elipsoid şekil karakteristiktir. Kan serumundaki lipoproteinlerde küre şeklinde yapı gözlenir.

Bir proteinin kuarterner (dördüncü) yapısı

Bir proteinin kuarterner (dördüncü) yapısı, primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapıları agregatlar halinde bir araya gelmesiyle oluşan yapıdır:

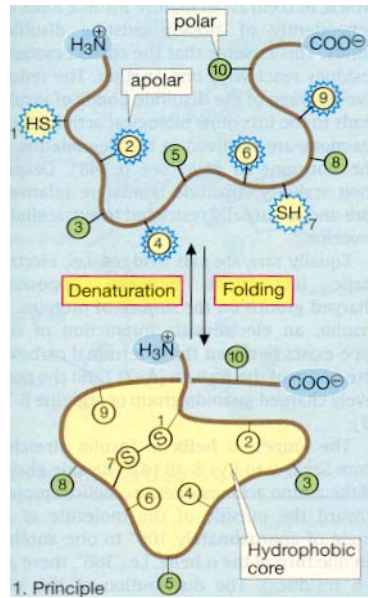


Her proteinin kuarterner yapısı olmayabilir, fakat molekül ağırlığı 100.000'nin üzerinde olan bir protein genellikle kuarterner yapıya sahiptir. Bir proteinin kuarterner yapısını oluşturan polipeptit zincirlerinin her birine alt birim veya **monomer** denir; bu monomerler, hidrojen bağları, Van der Waals çekmeleri ve iyon bağları etkisiyle polimerize olmuşlardır. Bir proteinin kuarterner yapısını oluşturan monomerlerin reverzibl düzleşmeleri veya ayrılmaları, konformasyon değişikliğine yol açar. Proteinlerin spesifik biyolojik fonksiyonları bunların konformasyonlarına bağlı olduğundan, konformasyonda meydana gelen değişiklik, proteinin biyolojik aktivitesinin kaybolmasına neden olabilir.

Proteinlerin özellikleri

1) Proteinler, çeşitli etkilerle denatüre olurlar. Bir proteinin denatürasyonu, molekülündeki yan bağların yıkılması ile polipeptit zincirin katlarının açılması, gelişigüzel kangallanım yapısına dönüşmesi, sonra yeni bir biçimde yeniden katlanması olaydır.

Bir proteinin denatürasyonu, proteinin tersiyer yapısının bozulması, sekonder ve primer yapısının korunması biçiminde olursa **reversibl** (geri dönüşümlü)'dür. *Denatüre olmuş bir proteinin tekrar eski haline dönmesine renatürasyon denir:*



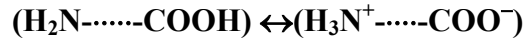
Bir proteinin denatürasyonu, proteinin tersiyer ve sekonder yapısının bozulması, yalnızca primer yapısının korunması biçiminde olursa **irreversibl** (geri dönüşümsüz)'dür.

Bir proteinin denatüre olmasıyla fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişimler görülür. Proteinin çözünürlüğü çok azalır, biyolojik aktivitesi kaybolur.

Bir proteinin denatürasyonu, çoğu kez hidrojen bağlarını yıkan etkilerle olur. Bir proteinin denatürasyonuna neden olan etkiler şunlardır: Isı, X-ışını ve UV ışınlar, ultrason, uzun süreli çalkalamalar, tekrar tekrar dondurup eritmeler, asit etkisi, alkali etkisi, organik çözücülerin etkisi, derişik üre ve guanidin-HCl etkisi, salisilik asit gibi aromatik asitlerin etkisi, dodesil sülfat gibi deterjanların etkisi.

2) Proteinler, amfoter maddeler yani amfoter elektrolit veya amfolittirler; hem asit hem baz gibi davranma özellikleri vardır.

Bir protein molekülü, her protein için farklı ve karakteristik olan, proteindeki elektriksel yüke sahip R- gruplarının sayıları ve elektriksel yüklerinin çeşidi tarafından belirlenen ve **izoelektrik nokta** diye tanımlanan bir pH değerinde iyonlaşmış fakat dış ortama karşı elektriksel yönden nötral bir yapıdadır:



Bir protein molekülü, izoelektrik noktasından düşük pH ortamında pozitif yüklü kation ($H_3N^+\text{-----}COOH$) şeklinde bulunur; izoelektrik noktasından yüksek pH ortamında ise negatif yüklü anyon ($H_2N\text{-----}COO^-$) şeklinde bulunur.

Proteinler, amfolit olma özellikleriyle ilgili olarak da çeşitli özelliklere sahiptirler:

a) Proteinlerin hem baz hem asit bağlama özellikleri vardır. Bir proteinin baz bağlama yeteneği, amino asit kalıntılarının R- yan zincirlerindeki asidik grupların sayısına bağlıdır; asit bağlama yeteneği de amino asit kalıntılarının R- yan zincirlerindeki bazik grupların sayısına bağlıdır.

b) Proteinlerin hem negatif iyon hem pozitif iyon bağlama özellikleri vardır. Proteinlere bağlanan birçok iyon suda çözünmez tuz oluşturur ve protein çöktürücü olarak etkilidirler.

Triklor asetik asit, pikrik asit, tungstik asit gibi çok kullanılan protein çöktürücülerinde asitlerin anyonu, kationlaşmış proteinlerle birleşir.

Hg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} gibi ağır metal kationları anyonlaşmış proteinlerle birleşir ve protein çöktürücü olarak etki ederler.

Cu^{2+} , Ni^{2+} gibi bazı ağır metal kationları, geleneksel tuz oluşumu yerine proteinle koordinasyon kompleksleri oluştururlar.

c) Proteinlerin su bağlama ve bağlı suyu verme yetenekleri vardır. 1g protein, yaklaşık 0,3-0,5 g su bağlar.

Etanol, aseton, nötral tuzlar gibi çok hidrofil maddeler, bir proteinin bağladığı suyu çekerek protein çöktürücü olarak etki ederler.

d) Proteinler, elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederler. Bu göç, izoelektrik noktalarından düşük pH'larda katoda; izoelektrik noktalarından yüksek pH'larda anodadır. Proteinlerin elektriksel alanda göçme hızı, net elektrik yüklerine ve ortamın pH değerine bağlıdır. Bir protein, elektriksel alanda, izoelektrik noktasına eşit pH ortamında her iki kutup tarafından eşit kuvvetlerle çekilir; hiç bir kutba göç etmez; hareketsiz kalır.

3) Proteinler, polipeptit zincirindeki peptit bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar. Proteinlerin kısmi hidrolizi ile proteozlar, peptonlar ve peptitler oluşur; tam hidrolizi ile amino asitler oluşur.

Proteinlerin hidrolizi, kaynatma, asit etkisi ve enzim etkisiyle olabilir.

Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılmaları

Basit proteinler

Basit proteinler, yalnızca amino asitlerden oluşmuş; hidroliz olduklarında sadece amino asitleri veren, polipeptit zincirleri yapısındaki proteinlerdir. Basit proteinler, değişik niteliklerine göre alt gruplara ayrılarak incelenirler:

1) Globüler proteinler: Molekülünün üç boyutlu şekli rotasyon elipsoid biçiminde olan proteinlerdir. Globüler proteinler de albüminler, globülinler, globinler, glutelinler, prolaminler, protaminler, histonlar gibi alt gruplara ayrılırlar.

Albüminler, suda ve sulu tuz çözeltilerinde çözünürler; ısı ile denatüre olurlar; sulu çözeltilerde amonyum sülfat ile doyurulmuş bir ortamda çökerler; molekül ağırlıkları genel olarak 100.000'in altındadır; glisince fakirdirler. *Yumurta akında bulunan ovalbümin, kandaki*

serum albümin ve *sütteki laktalbümin*, hayvansal kökenli albüminlerdir; *baklagillerdeki legumelin*, *hububattaki lökysin* ise bitkisel kaynaklı albüminlerdir.

Globülinler, suda çözünmezler; sulu nötr tuz çözeltilerinde çözünürler; sulu çözeltilerinden, çözeltilinin amonyum sülfat ile yarı doyurulması suretiyle çöktürme suretiyle ayrılabilirler; ısı ile de denatüre olurlar; molekül ağırlıkları 100.000'den yüksektir; glisince zengindirler. *Yumurtadaki ovglobülin*, *sütteki laktoglobülin*, *kan plazmasındaki α , β , γ globülinler* hayvansal kökenli globülinlerdir; *kendir tohumundaki edestin*, *baklagillerdeki legumin*, *fasülyedeki faseolin* ise bitkisel kaynaklı globülinlerdir.

Globinler, Genellikle bileşik halde, başlıca hemoglobin yapısında bulunurlar.

Glutelinler, bitkisel kökenli basit proteinlerdir; suda ve sulu nötr tuz çözeltilerinde çözünmezler; çok sulu asit ve alkalilerde çözünürler; ısı ile denatüre olurlar. *Buğdayda bulunan glutenin*, *arpada bulunan hordenin* ve *pirinçte bulunan orizenin* tipik glutelinlerdir; *glutenin* molekül ağırlığı 2-3 milyon kadardır.

Prolaminler, bitkisel kökenli basit proteinlerdir; suda, nötr tuzlarda ve alkolde çözünmezler; ancak %70-80'lik alkolde çözünürler; adlarını, çok fazla içerdikleri prolin amino asidinden alırlar; sistin ve lizin yönünden fakirdirler. *Prolaminler*, özellikle *taneli bitkilerde çok bulunurlar*; *buğdayda bulunan gliyadin*, *mısırda bulunan zein*, *arpadaki hordein*, önemli *prolaminlerdir*. Buğday unu hamuru akar su altında nişastasını kaybedince, geriye çok elastik bir madde kalır; **Gluten** adını alan bu madde, *gliyadin* ve *glutenin* karışımıdır.

Protaminler, suda, seyreltik asit ve alkalilerde, seyreltik amonyum hidroksit çözeltilerinde çözünürler; fazla miktarda arjinin içermelerinden dolayı kuvvetli bazik karakterde basit proteinlerdir; tirozin, triptofan ve kükürtlü amino asit içermezler. Protaminler, proteinlerin en kısa zincirli olanlarıdır; molekül ağırlığı 1000-5000 arasındadır. Protaminler, dokularda asitlerle, özellikle nükleik asitlerle birleşmiş olarak bulunurlar; türlü protaminler, balık spermalarından büyük miktarlarda elde edilmişlerdir; *uskumrudan skombrin*, *som balığından salmin*, *ringa balığından klüpein* bunlara örnektir.

Histonlar, protaminler gibi, fakat daha büyük molekülü, daha az bazik basit proteinlerdir. *Uskumru balığındaki skombron*, *timus bezinden elde edilen timohiston* önemli örneklerdir.

2) Fibriler proteinler: Molekülünün üç boyutlu şekli çok gerilmiş elipsoid biçiminde olan proteinlerdir.

Skleroproteinler (Albüminoidler), suda, nötr tuz çözeltilerinde, seyreltik asit ve alkalilerde ve saf alkolde çözünmezler; pepsin ve tripsin gibi enzimlere dirençlidirler; hayvansal kaynaklıdır. *Boynuz, kıl, yün, saç ve tırnaklarda bulunan keratin*; *bağ doku, kemik, kıkırdak ve tendonlarda bulunan, organizma proteinlerinin yarısından çoğunu oluşturan kollajen*; *ligament ve diğer destek dokularında bulunan elastin*; *ipek fibroini*, önemli *skleroproteinlerdir*. Keratin, bir sistein dimeri olan sistin bakımından zengindir; normalde α -heliks yapısına sahiptir, fakat ıslak durumda β -kırmalı tabaka yapısını alır. Kollajen, glisin, prolin ve 4-hidroksiprolince zengindir; triptofan içermez. İpek fibroini, glisin, prolin, serin ve tirozince zengindir.

Fibrinojen, kan plazması içinde çözülmüş olarak bulunur; kanın pıhtılaşması sırasında görev alır.

Miyozin, kasta bulunur; kasın kasılmasında görev alır.

Bileşik proteinler (Konjuge proteinler)

Bileşik proteinler (konjuge proteinler), amino asitlerden oluşmuş polipeptit zincirlerinin prostetik grup denen yapılara bağlanmasıyla oluşmuş; hidroliz edildiklerinde amino asitlerden başka değişik nitelikte kimyasal maddeler de veren proteinlerdir.

1) Glikoproteinler: Prostetik grubu karbonhidrat olan bileşik proteinlerdir; %1-80 arasında değişen oranda karbonhidrat içerirler. Glikoproteinlerin genellikle karbonhidrat oranı %4'ten az olanlarına **glikoprotein**; %10-20 arasında değişenlere **mukoprotein**, karbonhidrat oranı proteinden fazla olanlarına **mukoid** adı verilir.

Kan plazması proteinlerinden bazı taşıyıcı proteinler ve immunoglobülinler; kemikteki osseomukoprotein, tendonlardaki tendomukoprotein, kıkırdaktaki kartilagomukoprotein, tükürükteki müsin, prostetik grupları karbonhidrat olan proteinler yani glikoproteinlerdir.

2) Proteoglikanlar: %80-95 gibi çok yüksek oranda karbonhidrat içeren bileşik proteinlerdir; polisakaritler konusunda ayrıntılı olarak incelenmiştir.

3) Lipoproteinler: Proteinlerin lipidlerle oluşturdukları bileşik proteinlerdir; değişik oranlarda trigliserid, kolesterol ve fosfolipid içerirler. Lipoproteinler, önemli oranlarda lipid içermelerine karşın suda çözünürler; böylece kandaki lipidleri taşırlar. Lipoproteinin protein kısmına **apolipoprotein** veya **apoprotein** denir. Lipoproteinler, lipidler konusunda ayrıntılı olarak inceleneceklerdir.

Proteinlerin fosfolipidlerle oluşturdukları suda çözünmeyen bileşik proteinler, proteolipidlerdir; özellikle miyelinin yapısında bulunurlar.

4) Fosfoproteinler: Prostetik grup olarak fosfat içeren bileşik proteinlerdir. Fosfoproteinlerde, proteinin yapısındaki serin, tirozin ve treonin gibi amino asidi kalıntılarının hidroksil grupları fosforik asitle esterleşmiştir. Sütte **kazein**; yumurtada **vitellin**, **livetin** ve **fosvitin**; balık yumurtasında **ihtulin** önemli fosfoprotein örnekleridirler.

5) Nükleoproteinler: Protaminler, histonlar ve diğer basit proteinlerin nükleik asitlerle bağlanması sonucu oluşmuş bileşik proteinlerdir. Nükleoprotaminler, en basit nükleoproteinlerdir; nükleik asit ile proteinler, arjinin-fosfat bağı ile bağlanmıştır; balık spermalarında boldurlar. Nükleohistonlarda da nükleik asit ile proteinler, arjinin-fosfat bağı ile bağlanmıştır; balık spermalarında ve kuş eritrositlerinde boldur. Yüksek nükleoproteinler, ribozomlar, kovalent bağlı RNA-protein, DNA-protein bileşiminde sitoplazma ve mitokondrilerde bulunurlar.

6) Metalloproteinler: Prostetik grup olarak Fe, Cu, Zn gibi ağır metalleri içeren bileşik proteinlerdir. *Demirli metalloproteinlerden ferritin ve transferrin, bakırlı metalloproteinlerden seruloplazmin, önemli metalloprotein örnekleridirler.*

7) Kromoproteinler: Metal-porfirin kompleks sistemleri ile oluşmuş bileşik proteinlerdir. Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar, peroksidaz, demir içeren önemli kromoprotein örnekleridirler. Kromoproteinler, porfirinler konusunda anlatılacaklardır.

Türev proteinler

Türev proteinler, ilk iki protein grubunda yer alan proteinlerin belirli etkilerle değişmeleri sonucu oluşan proteinlerdir; primer türev proteinler ve sekonder türev proteinler olmak üzere iki alt grupta incelenirler.

1) Primer türev proteinler: Peptit bağlarına dokunmadan, asit, baz ve ısı gibi etkilerle protein moleküllerinin değişmesi sonucu oluşmuş türev proteinlerdir; **denatüre tip proteinler** olarak da adlandırılırlar. Suda çözünmeyen bu proteinlerin seyreltik asitler ve enzim etkisiyle

oluşanlarına **protean** denir; asit ve alkalilerin sürekli etkisiyle oluşanlarına **metaprotein** denir; kaynatma, çalkalama, UV ışınları ve etanol etkisiyle oluşanlarına **pıhtılaşmış protein** veya **koagule proteinler** denir.

2) **Sekonder türev proteinler:** Peptit bağlarını kısmen yıkan asit veya enzimlerin etkisiyle oluşan türev proteinlerdir. Peptit bağlarının bu şekilde parçalanmasıyla protein molekülleri, gitgide daha küçük parçalara bölünürler. Böyle bir parçalanmada büyük parçalara **proteoz (albüminoz)** denir; küçük parçalara **pepton** denir; daha küçük zincirler de **polipeptitler** ve **peptitler**dir. Sekonder türev proteinler, kaynatmakla çökelmez veya ısı ile pıhtılaşmazlar.

Proteinlerin biyolojik rollerine göre veya fonksiyonel olarak sınıflandırılmaları

1) **Katalitik proteinler:** Biyokimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler, yüksek derecede spesialize proteinlerdir. **Amilaz, pepsin, lipaz** önemli katalitik protein veya enzim örnekleridirler.

2) **Taşıyıcı proteinler (transport proteinleri):** Spesifik molekülleri veya iyonları bağlayıp bir organdan bir başka organa veya hücre membranının bir tarafından diğer tarafına transport eden proteinlerdir. **Serum albümin**, en iyi bilinen taşıyıcı proteindir; bilirubin, kalsiyum, yağ asitleri ve birçok ilaç serum albümine bağlanarak taşınır. **Hemoglobin**, oksijen taşıyan; **lipoproteinler**, lipid taşıyan; **transferrin**, demir taşıyan önemli taşıyıcı protein örnekleridirler. *Bütün organizmaların plazma membranlarında ve intrasellüler membranlarında bulunan taşıyıcı proteinler, glukoz, amino asitler ve diğer maddeleri bağlarlar; bunları membranın bir tarafından diğer tarafına taşırlar.*

3) **Besleyici ve depo proteinler:** Yumurta akının esas proteini **ovalbümin**, sütün esas proteini **kazein** besleyici proteinlerdir; bir çok bitki tohumu da çimlenen tohumun büyümesi için gerekli besleyici proteinleri depolamıştır. **Ferritin**, demir depolayan proteindir.

4) **Kontraktıl proteinler:** Kasılabilen veya kendiliğinden hareket edebilen proteinlerdir. **Miyozin** ve **aktin**, iskelet kaslarının kontraktıl sisteminde ve aynı zamanda bir çok kas olmayan hücrede işlev görür. **Tubulin**, mikrotubilleri oluşturan proteindir. *Hücrelerde bulunan mikrotubuller, hücreleri yürütmek için kamçı ve kirpiklerdeki dynein proteini ile birlikte hareket eder.*

5) **Yapısal proteinler:** Tendonların ve kıkırdağın esas yapısını, çok yüksek gerilme gücüne sahip **kollajen** oluşturmuştur; kösele, hemen hemen saf kollajendir. Ligamentler, iki boyutta gerilme yeteneğinde bir yapısal protein olan **elastin** içerirler. Saç, tırnak ve tüyler, **keratin** içerirler. İpek liflerinin ve örümcek ağlarının esas komponenti **fibroin**dir. Bazı böceklerin kanat eksenleri, **resilin**den yapılmıştır.

6) **Savunma (defans) proteinleri:** Organizmaları diğer türler tarafından istilaya karşı savunan, organizmayı hasardan koruyan proteinlerdir. **İmmünoglobülinler**, omurgalıların lenfositleri tarafından yapılan, spesialize (özümlenmiş) proteinlerdir; organizmayı istila eden bakterileri, virüsleri veya başka türe ait yabancı proteinleri (antijenler) tanıyabilirler ve presipite edebilirler (çöktürebilirler) veya nötralize edebilirler. **Fibrinojen** ve **trombin** gibi **kan pıhtılaşma proteinleri**, vasküler sistem yaralandığında yaralanan yerin kan pıhtısı ile kapatılarak kan kaybının önlenmesini sağlarlar. **Yılan zehirleri, bakteriyel toksinler** ve **risin** gibi toksik bitki proteinleri, aynı zamanda savunucu fonksiyonlara sahip gibi görünmektedirler.

Savunma proteinlerinin fibrinojen, trombin ve bazı zehirler dahil bazıları, aynı zamanda enzimdirler.

7) **Düzenleyici proteinler:** Sellüler düzenleme veya fizyolojik aktiviteye yardım eden proteinlerdir. **İnsülin, büyüme hormonu** gibi bazı hormonlar, düzenleyici proteinlerdir;

insülin, şeker metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir; büyüme hormonu ise büyümenin düzenlenmesinde etkilidir. Bir çok hormonal sinyal için sellüler yanıtta, sıklıkla G proteinler denen, GTP-bağlayan proteinler sınıfı aracı olur. Bazı düzenleyici proteinler, DNA'yı sarar; enzimlerin ve RNA moleküllerinin biyosentezini düzenlerler.

8) Diğer proteinler: Fonksiyonları henüz daha fazla bilinmeyen ve kolayca sınıflandırılmayan çok sayıda proteindir.

Proteinleri tanımlama deneyleri

Proteinleri denatürasyon ve çökme tepkimeleri ile tanımlama deneyleri

Proteinleri sülfosalisilik asit ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

Proteinlerdeki serbest bazik grupların, sülfosalisilik asit ile, suda çözünmeyen bileşik oluşturmaları prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 1-2 damla %20'lik sülfosalisilik asit çözeltisi damlatılır. Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan proteinlerdeki serbest amino grupları gibi bazik gruplar, sülfosalisilik asit ile birleşirler ve protein-sülfosalisilik asit bileşiği oluşur. Oluşan protein-sülfosalisilik asit bileşiği suda çözünmediğinden çöker. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çöken protein-sülfosalisilik asit bileşiğinden ileri gelmektedir.

Proteinleri konsantre nitrik asit ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi (Heller'in halka deneyi)

Proteinlerin, nitrik asit ile, asit-metaprotein (asit-albümin) bileşiği oluşturmaları prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1-2 mL konsantre HNO₃ konur. Deney tüpündeki konsantre HNO₃ üzerine 1 mL seyreltik serum tabakalandırılır. Deney tüpünde HNO₃ ve serumun temas yerinde beyaz bir halka oluştuğu gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan proteinler, nitrik asit ile birleşirler ve beyaz renkli asit-metaprotein (asit-albümin) bileşiği oluştururlar. Deney tüpünde gözlenen beyaz halka, asit-metaprotein (asit-albümin) bileşiğinden ileri gelmektedir.

Proteinleri triklorasetik asit (TCA) ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

Proteinlerin, triklorasetik asit (TCA) anyonları ile bağlanarak suda çözünmeyen tuzlar oluşturmaları prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 1-2 damla %20'lik TCA çözeltisi damlatılır. Deney tüpünde bulanıklık oluştuğu gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan proteinler, TCA'nın anyonları ile bağlanarak suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar. Gözlenen bulanıklık, bu tuzların çökmesinden ileri gelmektedir.

Proteinleri ısıtma ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

Proteinlerin, ısı etkisiyle denatüre olmaları prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. Deney tüpü dikkatli bir şekilde ısıtılır. Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan proteinler ısı etkisiyle denatüre olurlar ve çözünürlükleri azalır. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çözünürlükleri azalan proteinlerin çökmesinden ileri gelmektedir.

Proteinleri kaynatma-asetik asitle çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

Proteinlerin, ısı etkisiyle denatüre olmaları ve asetik asitin proteinlerin denatürasyonunu artırması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. Deney tüpü dikkatli bir şekilde ısıtılır. Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık olduğu gözlenir. Deney tüpündeki bulanıklık üzerine birkaç damla asetik asit damlatılır; bulanıklığın arttığı veya değişmediği gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan proteinler ısı etkisiyle denatüre olurlar ve çözünürlükleri azalır. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çözünürlükleri azalan proteinlerin çökmesinden ileri gelmektedir. Asetik asit, proteinlerin denatürasyonunu artırır.

Proteinleri renk tepkimeleri ile tanımlanma deneyleri

Proteinleri biüret tepkimesi ile tanımlama deneyi

Proteinlerin, biüret reaktifi ile mor renkli kompleks oluşturmaları prensibine dayanır.

Beş deney tüpü alınarak numaralandırılır. 1.tüpe 1-2 mL protein çözeltisi konur; 2.tüpe 1-2 mL glisin çözeltisi konur; 3.tüpe 1-2 mL su konur; 4.tüpe spatül ucu ile üre konur ve bu, 1-2 mL suda çözülür; 5.tüpe spatül ucu ile üre konur ve bu, amonyak kokusu hissedilinceye kadar ısıtılıp soğutulduktan sonra 1-2 mL suda çözülür. Beş deney tüpüne de 1-2 mL biüret reaktifi (*Biüret reaktifi: 6 g Na-K tartrat, 1,5 g kristalize bakır sülfat, 300 mL %10'luk NaOH, volüm distile suyla 1 litreye tamamlanarak karıştırılıp çözülür.*) eklenip karıştırılır. 1.ve 5.tüplerde biüret reaktifinin renginin mora dönüştüğü gözlenir.

Açıklama: Biüret reaktifindeki Cu^{2+} iyonları, alkalik ortamda, en az iki peptit bağı içeren maddelerle mor renkli kompleksler oluştururlar. Proteinlerin yapısında en az iki peptit bağı bulunduğundan proteinler, biüret reaktifindeki Cu^{2+} iyonları ile alkalik ortamda, mor renkli kompleksler oluşturmakta ve 1.tüpte mor renk oluşumu gözlenmektedir. Glisin ve ürenin yapısında en az iki peptit bağı bulunmadığından 2., 3.ve 4.tüplerde ise mor renkli kompleks oluşmaz ve bu tüplerde biüret reaktifinin rengi değişmez; su içeren 3.tüp, renkleri karşılaştırma içindir. 5.tüpte ürenin kuru kuruya ısıtılmasıyla iki peptit bağı içeren biüret yapısı olduğundan bu tüpte de Cu^{2+} iyonları ile mor renkli kompleks oluşumuna bağlı olarak mor renk gözlenmektedir.

**Biüret tepkimesi, biyolojik materyalde proteinlerin kantitatif tayini için de sıklıkla kullanılmaktadır.*

Proteinleri ksantoprotein tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik yan zincirli amino asitlerle ilgilidir; amino asitleri tanımlama deneyi olarak yapılacaktır.

Proteinleri kurşun asetat tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan ve sülfhidril (tiyol; $-SH$) veya disülfid ($-S-S-$) grubu içeren amino asitlerle ilgilidir; amino asitleri tanımlama deneyi olarak yapılacaktır.

Proteinleri Sakagucchi tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan ve guanidino grubu içeren arjinin amino asidi ile ilgilidir.

Proteinleri ayırma ve saflaştırma yöntemleri

Proteinleri, çözünürlüklerine göre ayırıp saflaştırma yöntemleri

Proteinler, çözünürlüklerine göre ayrılıp saflaştırılabilirler. Sodyum sülfat veya amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri, proteinlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılan en eski yöntemlerdir. 38°C’de %22,2’lik Na₂SO₄ (doymuş sodyum sülfat) çözeltisi, ve yarı doymuş konsantrasyonda (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) çözeltisi globülini çöktürür; tam doymuş konsantrasyonda (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) çözeltisi albümini çöktürür.

Tuzların protein çöktürücü etkisi, protein moleküllerinin bağladığı suyu çekmelerinden ileri gelir. Ayırma işlemi

sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürmeler soğukta yapılmalıdır. Ayrıca çözeltinin pH değeri

değiştirilerek yöntem iyileştirilebilir; proteinin izoelektrik noktasına eşit pH’da çözünürlük en azdır.

Amonyum sülfat ile çöktürme suretiyle serumdaki globülinlerle albüminlerin ayrılması deneyi

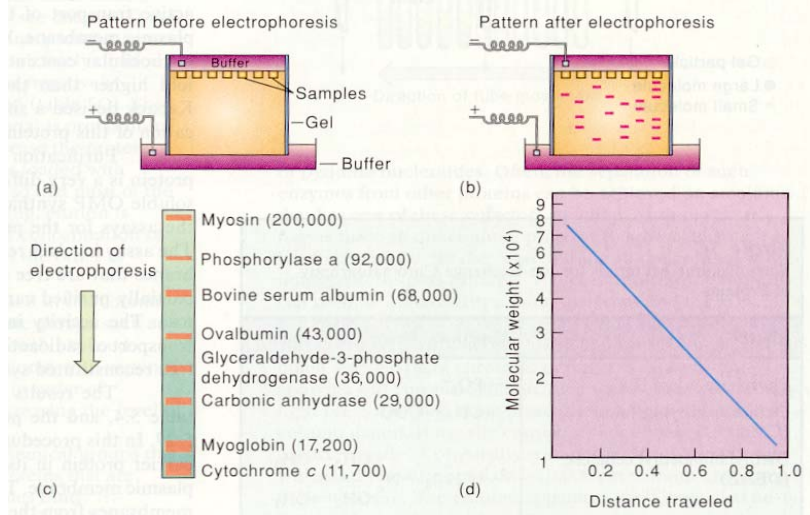
Globülinlerin, yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökmeleri; albüminlerin ise tam doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökmeleri prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 2 mL serum konur. Deney tüpündeki serum üzerine 2 mL su eklenerek karıştırılır ve böylece serum seyreltilir. Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 4 mL doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklenerek karıştırılır. Böylece oluşan yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir. Deney tüpündeki bulanık karışım süzülür. Berrak olan süzüntüye azar azar amonyum sülfat kristalleri atılıp karıştırılarak doymuş amonyum sülfat çözeltisi elde edilir. Doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde yeniden bulanıklık oluştuğu gözlenir.

Açıklama: Serumda bulunan globülinler ve albüminler, seyreltik çözeltide çözünmüş haldedirler. Seyreltik çözeltinin yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle globülinler çökerler; yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökme, globülinlerin özelliğidir. Süzme sırasında globülinler süzgeç kağıdının üzerinde kalırken albüminler çözünmüş halde süzgeç kağıdından süzüntüye geçerler ve böylece globülinlerle albüminler birbirlerinden ayrılmış olurlar. Süzüntünün tam doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle de albüminler çökerler; tam doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökme, albüminlerin özelliğidir. Çözünmüş proteinlerin amonyum sülfat gibi nötral tuzların etkisiyle çökmelerinin nedeni, protein moleküllerindeki bağlı suyun çekilmesidir.

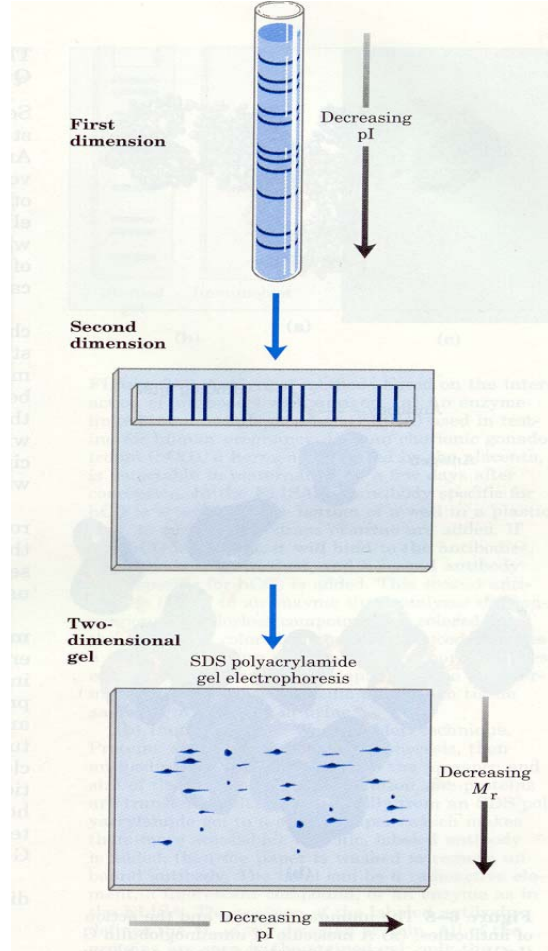
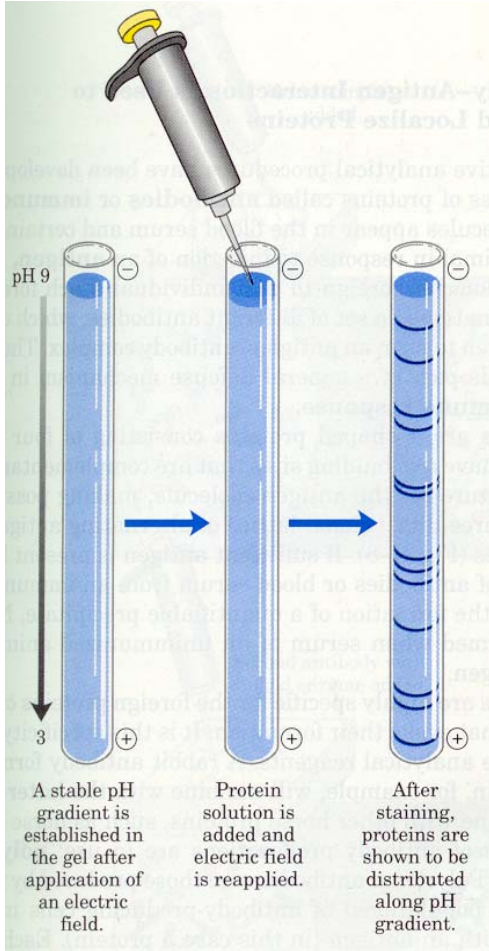
Proteinleri elektrik yüklerine göre ayırma ve saflaştırma yöntemleri

Elektroforez, proteinleri, izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak ayırma yöntemidir. Elektroforez işleminde proteinler, pH’ı belli bir tampon çözelti içinde ve bir taşıyıcı materyal üzerinde genellikle anoda doğru göç ettirilirlir. Farklı göçme hızlarına göre taşıyıcı materyal üzerinde ayrılan proteinler, boyanarak görünür hale getirilir ve elde edilen elektroforegram, kantitatif olarak değerlendirilir:



Elektroforezde kullanılan taşıyıcı materyal, kağıt, sellüloz asetat tabakası, nişasta jeli, poliakrilamid jeli, agar jeli gibi maddeler olabilir; taşıyıcı materyalin çeşidine göre de farklı elektroforez yöntemleri tanımlanır.

İzoelektrik fokusyon yöntemi, proteinleri izoelektrik noktalarının farklılığına göre ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, yapay elektrolitler kullanılarak elektriksel alanda bir pH gradienti oluşturulur. Elektriksel alandaki pH gradientinde her protein molekülü, izoelektrik noktasına göre uygun bir yere doğru hareket eder; iki yönde etki eden kuvvetlerin eşit olduğu, pH'ın proteinin izoelektrik noktasına eşit olduğu yerde hareketsiz kalır:

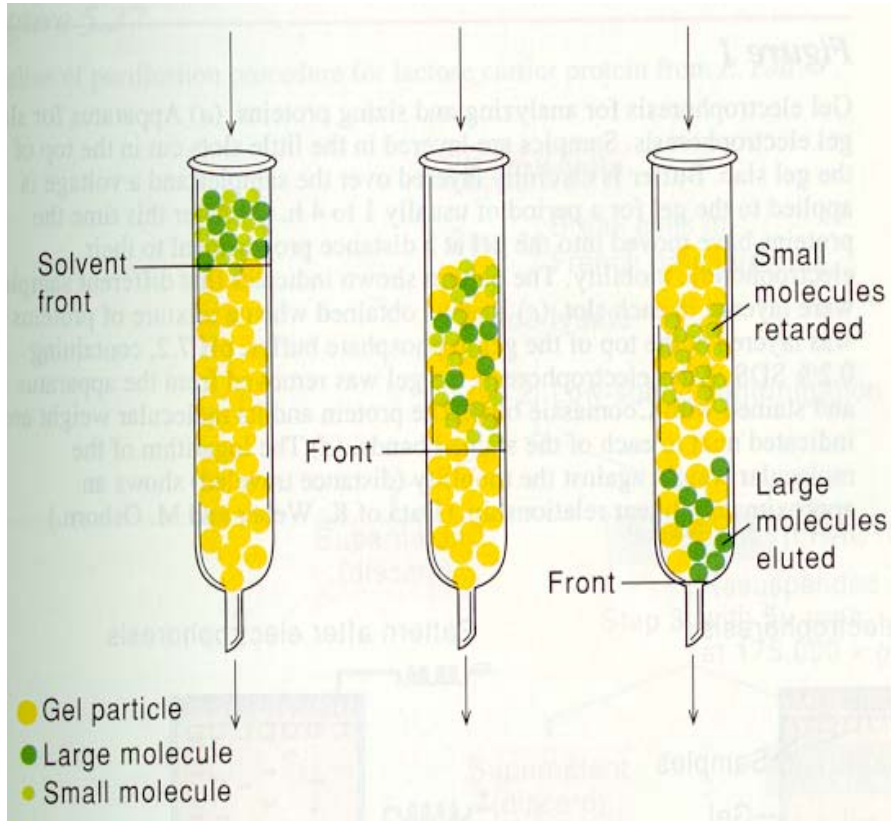


İyon değiştirici kolon kromatografisi, sabit faz olarak pozitif yüklü *dietilaminoetil* grupları veya negatif yüklü *karboksimetil* grupları ile donatılmış sellüloz preparat içeren bir kolona, karşıt iyonlar içeren hareketli faz içinde proteinler konur. Hareketli faza katılan proteinler, yk durumlarına göre buradaki karşıt iyonlar ile değiştirilir ve sabit faz tarafından kolonda tutulurlar. Daha sonra hareketli fazın pH'ı değiştirilerek ayrılmak istenen proteinin izoelektrik noktasına eşit yapılır. Bu durumda kolondaki proteinler dışarıdan yüksüz gibi görünen formda olduklarından kolonun altındaki musluğun açılmasıyla eluata geçerek ayrılırlar. Eluattaki protein konsantrasyonu, UV-absorpsiyon ölçümleri yardımıyla tayin edilir.

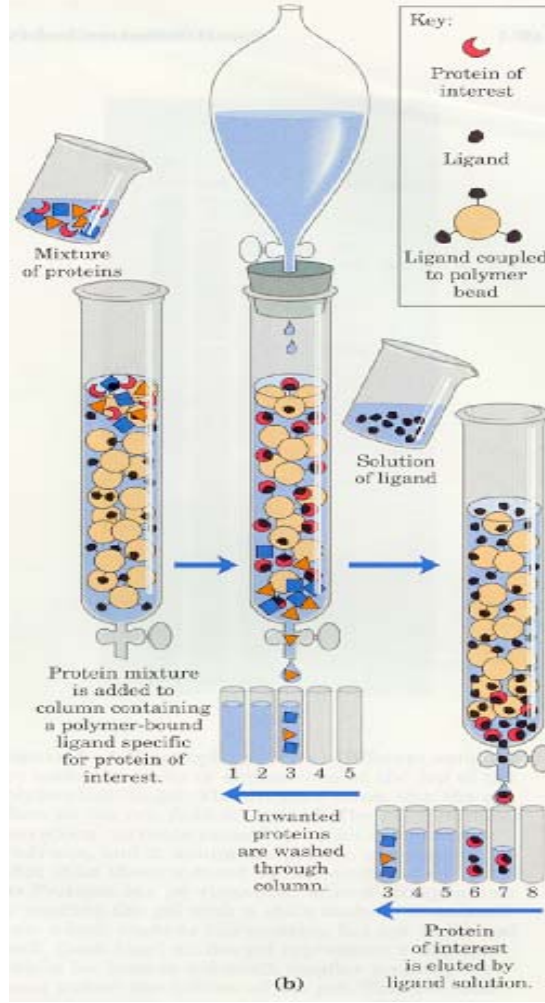
Proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırma yöntemleri

Ultrasantrifgasyon, yer çekimi ivmesinin binlerce katına ulaşan çekim alanlarında büyük moleküllerin sedimente olarak (kerek) ayrılmalarına dayanan yöntemdir.

Jel filtrasyon kromatografisi (dışlama kromatografisi), küçük ve orta büyüklükte protein moleküllerinin, bir kolonda moleküler elek olarak işlev gören bir jelin partiküllerinin oyuklarına girmeleri, daha sonra kolonu uygun bir çözgen yardımıyla yıkama suretiyle dışarı çıkarılmalarına dayanan ayırma yöntemidir:



Affinite kromatografisi, proteinlerin çok küçük molekülleri çok spesifik bir şekilde bağlamaları özelliklerine dayanan ayırma yöntemidir. Bu yöntemde bir substrat molekülü, kimyasal bir reaksiyon vasıtasıyla çoğunlukla agaroz gibi bir polisakkarit olan bir taşıyıcı materyale bağlanır ve bir kolona yerleştirilir. Kolondan bir protein karışımı geerildiğinde substrat, karışımda bulunan kendine spesifik proteini yakalar ve tutar; diğer proteinler kolondan geçerler. Daha sonra kolondan substrat geçirilmesiyle protein kolondan sklr ve eluat içinde ayrılır.



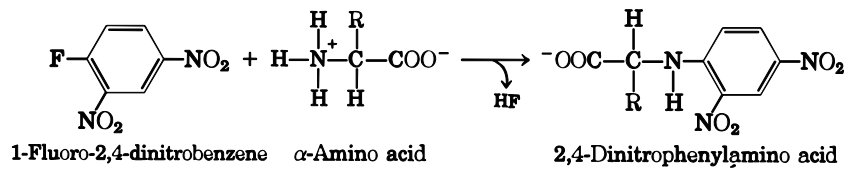
Proteinlerin amino asit sıralarının aydınlatılması

Proteinlerin amino asit sıralarının aydınlatılması için önce, protein tamamen saf hale getirilir, sonra bir proteolitik enzimle çeşitli peptidlere parçalanır; en son olarak da her peptidin amino asit sırası tayin edilir.

Bir peptit molekülündeki amino asitlerin diziliş sırasını aydınlatmak için çeşitli yöntemlerde peptit zincirinin uçlarındaki serbest amino grubu veya serbest karboksil gruplarından yararlanılır.

Bir protein veya peptidin amino-terminal amino asidinin tayini yöntemleri

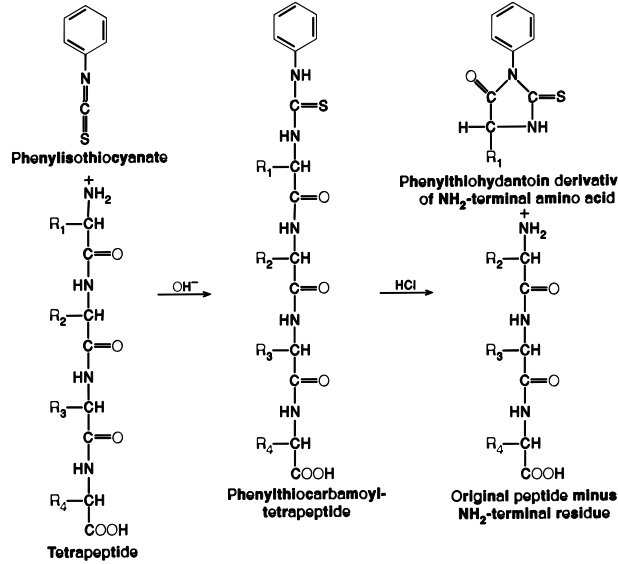
Sanger yöntemi ile bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini için protein veya peptit, *1-fluoro-2,4-dinitrobenzen* ile reaksiyona sokulur. Bu reaksiyon sırasında, dinitrofenil kalıntısı, peptidin N-terminalindeki serbest amino grubuna, hidrolize dayanaklı bir bağ oluşturarak bağlanır:



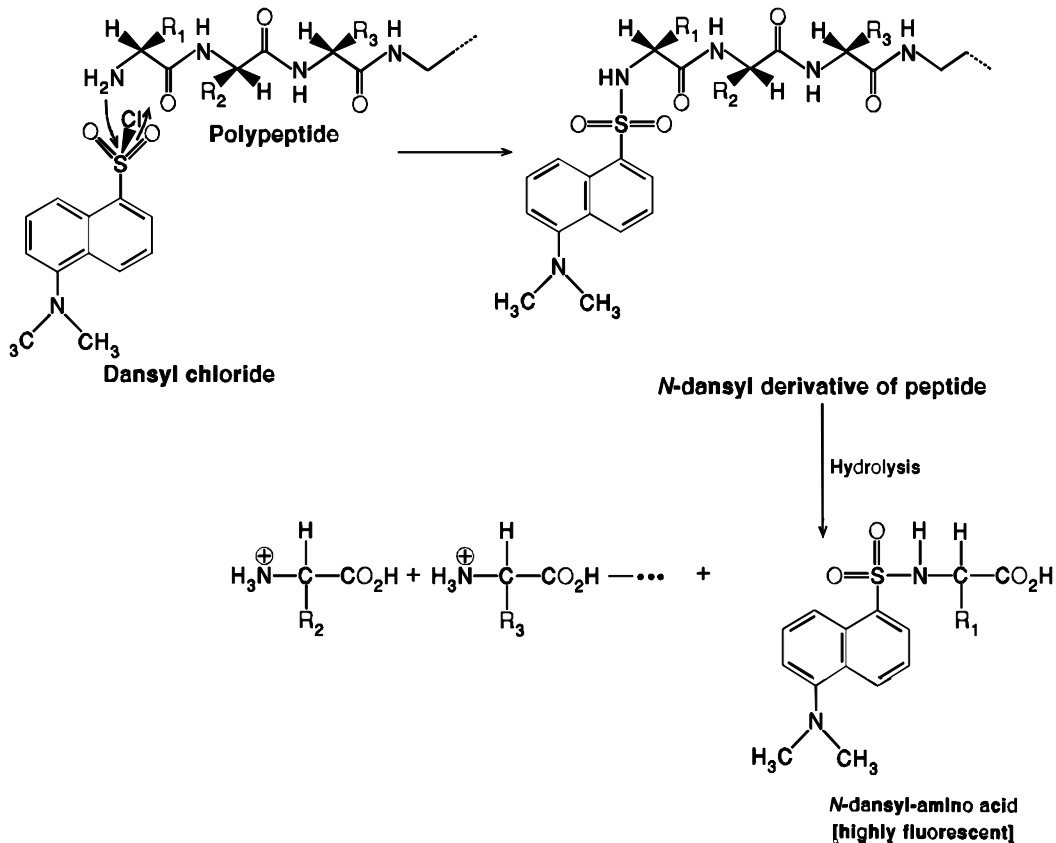
Daha sonra, asit ile peptit hidrolizi yapılır ve peptidin N-terminalindeki amino asit, 2,4-dinitrofenilamino asit şeklinde elde edilir ve tanısı yapılır.

Geride kalan peptide aynı işlemler uygulanarak peptidin N-terminalinden amino asit birimleri teker teker çıkarılır ve bu suretle peptiddeki amino asitlerin diziliş sırası anlaşılır.

Edman parçalanması yöntemi ile bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini için protein veya peptit, pH 8-9 ortamında *fenil izotiyosiyanat* ile reaksiyona sokulur:



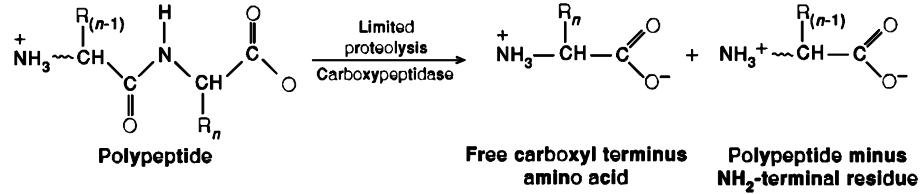
Dansil klorür yöntemi bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini için protein veya peptit, *dansil klorür* ile reaksiyona sokulur:



Lösin amino peptidaz enzimi de proteinlerin N-terminallerinden amino asitleri teker koparır; proteinlerin veya peptitlerin amino asit dizisini tayinde kullanılır.

Bir protein veya peptidin karboksil-terminal amino asidinin tayini yöntemleri

Bir protein veya peptidin C-terminal amino asidini tayin için, karboksipeptidazlar ile sınırlı proteoliz yöntemi uygulanabilir:



Çeşitli yöntemlerle proteinlerin amino terminal veya karboksil terminal ucundan serbestleştirilen amino asitler, iyon değiştirici kolon kromatografisi veya partiyon kromatografisi gibi yöntemlerle tanınırlar:

