

Serumun Çeşitli Derecelerde Isıtılmasile Protein Fraksiyonlarında Meydana Gelen Elektroforetik Değişiklikler

Electrophoretical Changes in Protein Fractions of Heat-treated Blood Serum at Different Temperatures

Sevket TEKMAN ve Nevzat ÖNER*

Kan serumunun muayyen derecenin üstünde ısıtılmasile pıhtılaştığı, başka bir deyimle ihtiva ettiği proteinlerin denatüre olduğu eskidenberi bilinmektedir. Denatürasyon, umumiyetle bir kısım proteinlerin ısı, ultraviyole ve saire gibi bir takım dış tesirlerle natif halde mevcut bazı özelliklerini irreversibl olarak değiştirmesinden ibarettir. Denatürasyon olayında, biri natif halde mevcut katlanmış moleküllerin açılması, diğeri bu açılmış moleküllerin agregatlar teşkil ederek çökmesi olmak üzere en az iki safhanın bulunduğu kabul edilmektedir. Proteinlerin denatürasyonunda meydana gelen değişikliğin bilhassa moleküllerin açılması safhasında husule geldiğini gösteren birçok tecrübeler vardır. Bu tecrübelerin yapılmasında çeşitli metodlar denenmiş ve son senelerde ise bu değişiklikler bilhassa elektroforetik metodla incelenmiştir.

Nitekim Van der Scheer ve arkadaşları (1) normal sığır serumunu 65°C de ısıttıktan sonra elektroferezini yapmışlar ve natiflerine nazaran beta globulin'e tekabül eden ve (C) komponenti adını verdikleri bir pik'in meydana geldiğini göstermişlerdir. Bozzetti ve Prina (2) ısı ile denatüre edilmiş insan serumunun elektroferezinde alfa globulin mıntakasında elektroforetik bir füzyon görmüşlerdir. David ve Hull (3) beta laktoglobulini 70°C de ısıttıktan sonra elektroferezini yapmışlar ve bu maddenin elektroforetik mobilitesinin arttığını tesbit etmişlerdir. Tsiprovich ve Loseva (4) serum proteinlerini üre ile denatüre ettikten sonra yaptıkları elektroferezde bir tek pik'in meydana geldiğini göstermişlerdir. Bundan evvelki bir çalışmamızda (5) serum albumin'in pH 6.4 de ve kaynar su banyosunda ısıttıktan sonra pıhtılaştığı ve aynı tecrübe-

* Biokimya Kürsüsü, Tıp Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

nin kongo kırmızısı muvacehesinde yapıldığı zaman berrak kaldığı ve elektroforezde göç ettiği tesbit edilmişti. Yine bir çalışmada (6) alkalik ortamda ve kaynar su banyosunda ısıtılarak pıhtılaşmasına mâni olunmuş ve bu tarzda denatüre edilmiş serum proteinlerinin elektroforezi yapılmış ve natiflerine nazaran farklı göç ettikleri tesbit edilmişti.

Yukarıda zikredilen tecrübeler denatürasyonda proteinlerin agregasyon safhasına gelmeden natiflerine nazaran bir takım değişiklikler gösterdiğini teyit eder mahiyettedir. Fakat ilk değişikliğin kaç derecede başladığı ve çeşitli derecelerde hangi fraksiyonda ne gibi değişikliğin husule geldiği gösterilmemiştir.

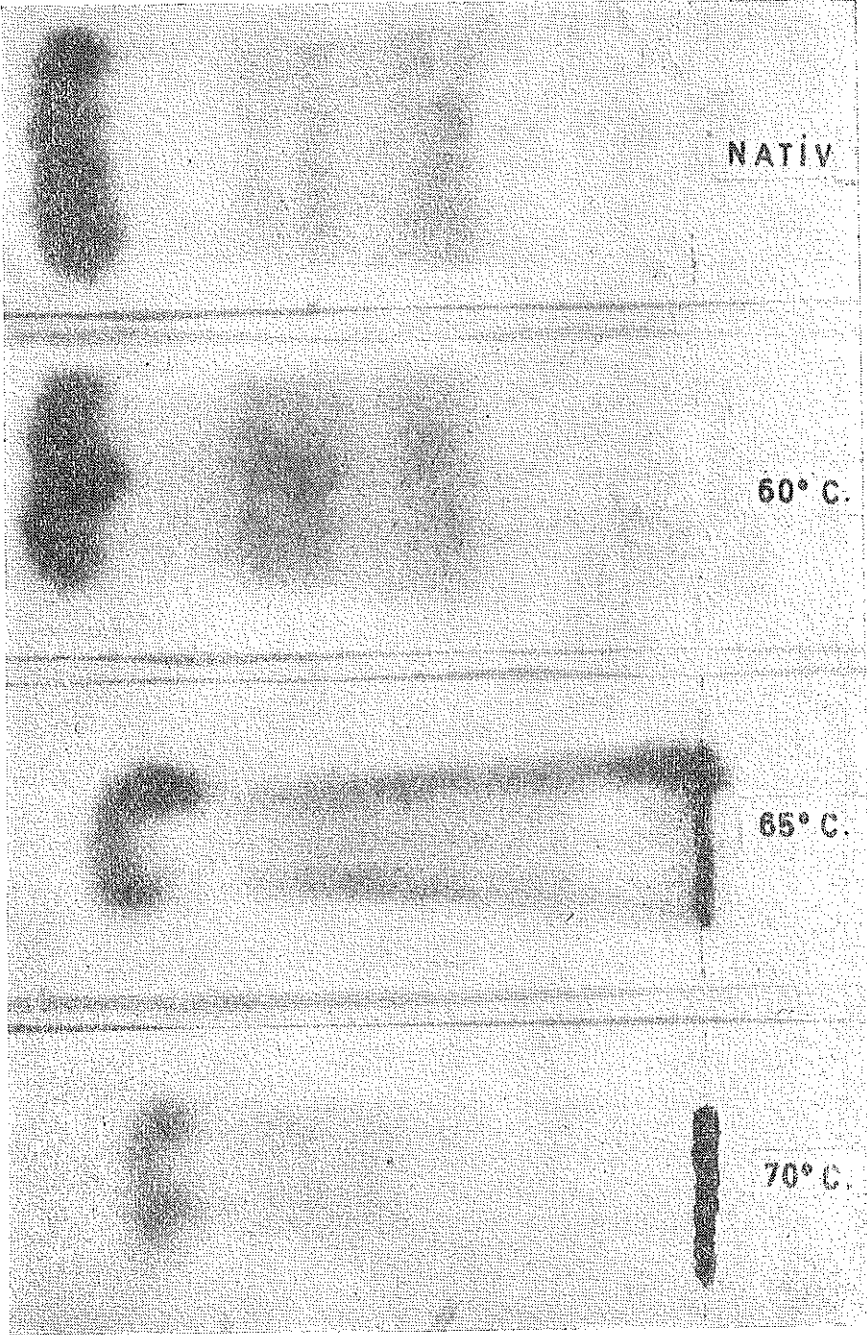
Biz bu çalışmamızda insan serumunu çeşitli suhnet derecelerinde ısıttıktan sonra protein fraksiyonlarında meydana gelen değişikliğin ilk defa kaç derecede başladığını ve hangi fraksiyonda ne gibi değişikliğin meydana geldiğini kâğıt elektroforezi ile inceledik.

M A T E R Y E L V E M E T O D

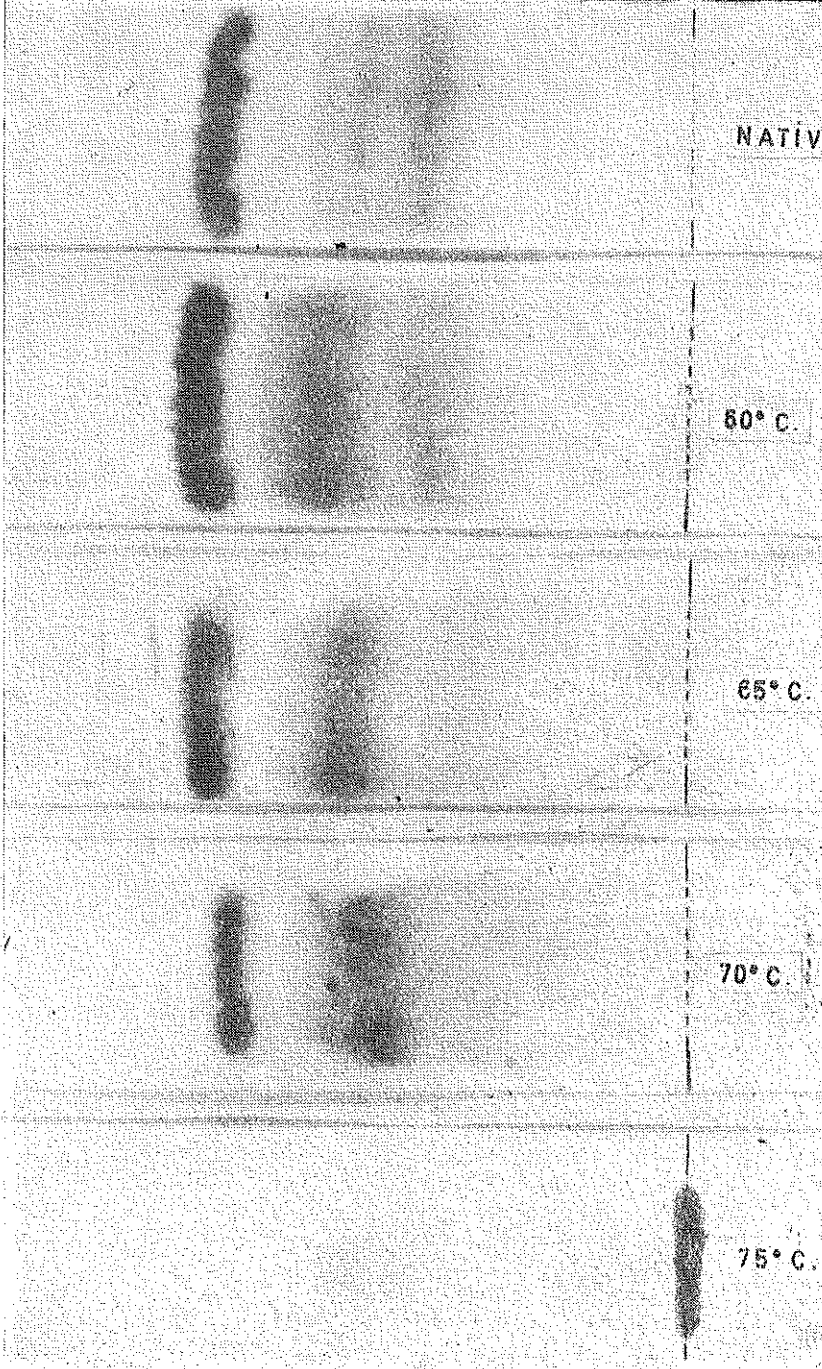
Tecrübelerimizde normal insan serumu kullanılmıştır. 1 er ml serum, cam kapaklı ve şilifli tüplere konarak ayrı ayrı olmak üzere 50°, 55°, 60°, 65°, 70° ve 75°C de su banyosunda 15 er dakika müddetle ısıtıldı ve soğutuldu. Natif ve ısıtılmış nünunelerden paralel olarak kâğıt elektroforezi yapıldı. Kâğıt elektroforezi için L. K. B. tipi ve B modeli cihaz ile L.K.B. 40 × 410 mm elektroforez kâğıdı kullanıldı. Bütün nünuneler veronal - veronal sodik tamponu (pH 8.6 ve iyonik direnç 0.1) ile 225 V da ve 8 saat müddetle yapıldı. Elektroforezden sonra kurutulan kâğıtlar bromofenol mavisi ile boyandı (7). Aynı tecrübeler sorumu % 0.9 tuzlu su eriyiği ile üç misli sulandırarak bir defa daha tekrarlandı.

N E T İ C E

Sulandırılmamış serumun 50°, 55°, 60°C de ısıtılmasında her hangi bir bulanıklık görülmemiş, 65°C de çok hafif bir opalesans, 70°C de sıvı halini muhafaza eden bir bulanma ve 75°C de ise tam bir pıhtılaşma müşahede edilmiştir. Yapılan elektroforezde, 50°, 55°C de protein fraksiyonlarında natiflerine nazaran elektroforetik bir fark görülmemiştir. 60°C de ilk değişikliğin başladığı, alfa ve beta globulin fraksiyonlarının birleşerek bir tek fraksiyon halinde göç ettiği ve albumin ile gama globulin fraksiyonlarının ise natif gibi davrandığı görülmüştür. 65°C de



Sekil 1. Sulandırmadan, farklı derecelerde ısıtılmış serumun elektroforezi



Şekil 2. Üç misli sulandırıldıktan sonra farklı derecelerde ısıtılmış serumun elektroforezi.

proteinlerin bir kısmının göç etmeyip başlangıç hattında kaldığı, göç eden albumin fraksiyonunun mobilitesinin azaldığı, buna mukabil globulin fraksiyonlarında bir ayrılma olmadığı ve bütün sahaya yayılmış bir halde göç ettiği tesbit edilmiştir. 70°C de albumin fraksiyonunun 65°C deki gibi göç ettiği ve globulin fraksiyonlarının hiç göç etmediği görülmüştür (Şekil 1). 75°C de tam bir pıhtılaşma hasıl olduğundan elektroforezi yapılmadı.

Üç misli sulandırılmış serumun 50°, 55°, 60°, 65°C lerde ısıtılmasında her hangi bir bulanıklık kaydedilmemiş, 70°C de hafif bir opalesans, 75°C de tam pıhtılaşma görülmüştür. Yapılan elektroforezde 50° ve 55°C de ısıtılan serumda natife nazaran bir fark tesbit edilmemiştir. 60° ve 65°C lerde alfa ve beta globulin fraksiyonları birleşerek bir tek fraksiyon halinde göç etmiş, albumin ve gama globulin fraksiyonları natif gibi davranmıştır. 70°C de ısıtılan serumda albumin fraksiyonunda bir değişiklik görülmemiş, buna mukabil bütün globulin fraksiyonları birleşerek bir tek fraksiyon halinde göç etmiştir (Şekil 2). 75°C de ısıtılan ve pıhtılaşmış olan nümunenin elektroforezinde proteinler göç etmemiş ve başlangıç hattında kalmıştır.

Sulandırılmamış ve sulandırılmış nümunelerdeki bulgular mukayese edilirse, her iki halde de ilk değişikliğin 60°C de başladığı ve sulandırılmış nümunede 65° de de devam ettiği ve bu değişikliğin alfa ve beta globulin fraksiyonlarının birleşerek bir tek fraksiyon halinde kendini gösterdiği tesbit edilmiştir. Bundan başka sulandırılmamış nümunede, 70°C de bilhassa globulin fraksiyonlarının başlangıç hattında kaldığı görülmüş, buna mukabil 70°C de ısıtılan sulandırılmış nümunenin bütün globulin fraksiyonları bir tek fraksiyon halinde ve mobilitenin artması şeklinde bir göç göstermiştir. Ayrıca pıhtılaşma sebeble proteinlerin bir kısmının göç etmeyip başlangıç hattında kalması, sulandırılmamış serumda 65°C de başladığı halde üç misli sulandırılmış serumda bu bulgu 75°C de ve hemen hemen proteinlerin tamamının başlangıç hattında kalması şeklinde müşahade edilmiştir.

M Ü N A K A Ş A

Bulguların incelenmesinde, ilk elektroforetik değişikliğin 60°C de başladığı, alfa ve beta globulin fraksiyonlarının birleşerek bir tek fraksiyon halinde göç ettiği görülmektedir. Sulandırılmış serumda albumin fraksiyonunda ilk değişiklik 65°C de başlamakta ve mobilitenin azalması

şeklinde kendini göstermektedir. Sulandırılmış nümunedede ise, albumin'e ait değişikliğin 70°C de başladığı tesbit edilmiştir. Denatürasyonda molekül içi ve moleküller arası köprü ve bağlar açılmaktadır. Bu açılma, ısı ile aşırı ajitasyon neticesi bilhassa peptid zincirleri arasındaki çapraz bağların birbirinden ayrılması ve hidrojen bağlarının kopması şeklinde izah edilmektedir (8). Sulandırılmış serumda pıhtılaşmanın daha yüksek derecede husule gelmesinin sebebi, su moleküllerinin açılan protein molekülleri arasına girerek agregat teşekkülünü kısmen önlemesi olsa gerektir. Alfa ve beta globulinlerin bir tek fraksiyon halinde göç etmelerini, bu iki fraksiyonun ısıtma esnasında birbirine bağlanması şeklinde izah etmek mümkündür. Bu deneyler aynı zamanda, ısı denatürasyonunda su moleküllerinin denatürasyon ve agregat teşekkülünü kısmen geciktirdiği intibamı vermektedir.

Ö Z E T

Sulandırılmış ve sulandırılmamış insan serumu çeşitli suhunetlerde su banyosunda ayrı ayrı ısıtılmış ve ilk değişikliğin kaç derecede başladığı ve hangi fraksiyonda ne gibi değişikliğin meydana geldiği elektroforetik olarak incelenmiştir. Neticede ilk değişikliğin 60°C de başladığı, alfa- ve beta-globulin fraksiyonlarının birleşerek bir tek fraksiyon halinde göç ettiği, 65°C de albumin fraksiyonunun mobilitesinin azaldığı tesbit edilmiştir. Bundan başka denatürasyon fenomeni münakaşa edilmiştir.

S U M M A R Y

Diluted and undiluted normal blood serum was heat-treated at different temperatures and the alteration of proteins was studied paper electrophoretically. The sample which heat-treated to 60°C had shown the initial alteration on globulin areas (alpha- and beta-globulin fractions came together to form a single fraction). The undiluted sample which heat-treated to 65°C had shown a decreased albumin mobility and no fractionation on globulin fraction. The phenomenon of denaturation is discussed.

L İ T E R A T Ü R

1. Van der Scheer, J., Wyckoff, R. G., and Clarke, F. L., *J. Immunol.*, 40, 39 (1941).
2. Bozzetti, E., and Prina, C., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 31, 953 (1955).
3. Briggs, D. R., and Hull, R., *J. Amer. Chem. Soc.*, 67, 2007 (1945).
4. Tsiprovich, A. S., and Loseva, A. L., *Biokhimiya* (Kief), 21, 53 (1956). - Ref. C. A., 50, 10147 e (1956).
5. Tekman, S. and Öner, N., *Nature* (London), 204, 287 (1964).
6. Tekman, S., *İst. Tıp Fak. Mec.*, 28, 85 (1965).
7. Durrum, E. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 2943 (1950).
8. Haurowitz, F., *Biochemistry*, 200, John Wiley and Sons, New York (1955).

(Redaksiyona verildiği tarih: 7 Ekim 1965)