



ADP, ATP, NAD, CoA, DNA VE RNA' NİN BİYOLOJİK KAYNAKLARDAN İZOLASYONU

Vahdettin BAYAZIT*
Sait BULUT**

ÖZET

Bu çalışma, ADP, ATP, NAD, CoA, DNA ve RNA'yı farklı biyolojik kaynaklardan elde etmek için yapılmıştır. ATP erkek tavşanların iskelet kaslarından, ADP, ATP'den, NAD ve CoA mayadan, DNA ve RNA ise erkek buzağının timus bezi, dalak, karaciğer, testis, böbrek, akciğer, kemik iliği ve eritrositlerden elde edilmiştir.

Bu çalışma sonunda, 3 gr Ba_2 ATP $4H_2O$; 0.3 gr $Ba_3(ADP)_2$ $4H_2O$; 0.6 gr NAD; 15 gr CoA elde edilmiştir. En çok DNA ve RNA karaciğerden, en az DNA böbrekten ve en az RNA ise akciğerden elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ADP, ATP, NAD, CoA, DNA ve RNA.

1. GİRİŞ

Bu çalışmada biyolojik önemi olan ATP, ADP, NAD ve CoA'nın farklı biyolojik kaynaklardan izolasyonu yapılarak fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalara bir başka önem kazandırılmıştır. Bilindiği gibi ATP önemli bir enerji maddesidir. Spesifik vital aktivite ATP'ye bağlıdır. Bunda mitokondrinin sorumluluğu unutulmaz. ATP elde edilmesinde mitokondriler oldukça faaldirler. Ancak bu durum di-

* Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye.

** Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye.

yetle alınan protein, karbonhidrat ve lipidlerin kalitatif ve kantitatif özellikleri intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlarda vuku bulan biyokimyasal reaksiyonların tabiatı, tür, cinsiyet, yaş, eksersiz, bazı ilaçlar, stres ve ekolojik faktörlerle değişebilmektedir. Hatta biyopotansiyel elektrik yük de bunlara bağlı olarak değişmektedir. Nitekim beyin fonksiyonlarını yerine getiremediğinde ve B.O.S. (beyin omurilik sıvısı), procephalon, diencephalon ve mezencephalon yeteri kadar kan akımı olmadığından elektro ansefalografi, elektrokardiyografi ve ossiloskobik bulgular anormal olmaktadır. Bu yüzden ki ATP beyin, göz, karaciğer, kalp, böbrek, kas, sinir ve kan biyokimyasında fevkalade öneme sahiptir.

NAD ise bilhassa oksidoredüksiyon reaksiyonlarında vazife yapan bir koenzimdir. Bilhassa laktatın pirüvata dönüşmesinde veya bunun tersi reaksiyonda laktat dehidrogenaz enziminin aktivasyonunda etkilidir. Diğer taraftan CoA bambaşka bir öneme sahiptir. Bunun bilhassa asetil CoA şekli protein, karbonhidrat ve yağların yıkımlarının ortak ürünü olduğundan bunların sentez ve yıkım reaksiyonlarının ortak maddesidir. Bilhassa beyin ve karaciğer metabolizmalarında çok etkilidir.

Bu önemli sebepler dolayısı ile ATP, ADP, NAD ve CoA'nın izolasyonu ve bunların değerlendirilmesi imkanlarının tespiti, bu araştırmanın başlıca amacı olmuştur. Bu tip biyolojik bir çalışmaya çok az rastlanılmıştır. Bu araştırma bazı in vivo ve in vitro çalışmalara kolaylıklar sağlayabilecektir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. ATP'nin Elde Edilişi

Bu çalışmada 10 *Lepus capensis* türü erkek tavşan kullanıldı.

2.1.1. Kasların İzolasyonu

Büyük bir erkek tavşan, %51'lik $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile intra peritoneal (i.p.) enjeksiyonla bayıltıldı. İlk doz vücut ağırlığının 1 kg'na karşılık 1 ml ve bundan sonraki her 10 dakika için 0.5 ml/kg olacak şekilde verilerek anestezi bu şekilde uygulandı. Bu takriben 30 dakikayı aldı. Sonra hayvan kesildi ve deri, barsak ve karkası soğutmak amacıyla 15 dakika için buzlu ortama alındı, karkas üzerindeki kaslar dissekte edildi ve sonra soğuk ortamda kıyma makinasından geçirildi. Bu işlem yaklaşık 30 dakikalık zamanı aldı, 4 kg'lık erkek bir tavşandan 0.8 ile 1 kg arasında kas elde edildi. Bu çalışmalar $0^{\circ}C$ 'ye yakın bir ortamda gerçekleştirildi (Colowick and Kaplan, 1957).

Kasların TCA (Tri Klor Asetik Asid) ile ekstraksiyonu 200 gr kas kıyması %10'luk 200 cc TCA ile 20.000 devirde 2 dakika süreyle homojenize edildi. Bunun süpernatantı alındı ve posa bu kez %5'lik TCA ile tekrar aynı şekilde homojenize edilip süpernatantı ayırıldı. Bu filtrat berrak beyaz renkte idi. Filtratın pH'sı %10'luk NaOH ile 7'ye ayarlandı.

Sonuç olarak 1 kg kasdan nötrale edilmiş filtrat elde edildi. (Şayet birden fazla tavşan kullanılacaksa her bir tavşan için ayrı ayrı işlem uygulanabilir).

2.1.2. ATP'nin Civa (Hg) Tuzları İle İlk Çökeltilmesi

2 litre filtrata 4 ml glasiyel asetik asitten 4 ml yavaşça konuldu ve üzerine civa asetat (%2'lik asetik asitte hazırlanmış %20'lik civa asetat)'tan 150 ml ilave edildi. 3 saat sonra 5000 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve posa 1:40'lık civa asetat ayırıcı ile yıkandı.

2.1.3. ATP'nin Baryum Tuzları İle İlk Çökeltisi

Üçüncü basamaktaki çökelti 400 ml saf suya alındı ve H₂S'li civa tuzları vakumla uzaklaştırıldı. Bu 10 dakika sürdü. Emilen filtrat preparasyonu filtre edildi. Ortamdaki HgS'nin katılaşması için üç kez 20 ml soğuk saf su ile yıkama yapıldı. H₂S'nin kombine serbest filtratlarından 1 saat süreyle hava geçirildi. Bu çözeltinin pH'sı %10 NaOH ile 7'ye ayarlandı. ATP'nin baryum tuzunu çökertmek için ortama 20 ml 2M baryum asetat ilave edildi. Bir saat sonra çökeltme meydana geldi. Ve santrifüje edilip berrak süpernatant ayırıldı. Arta kalan çökelti toplandı ve bu 20 ml soğuk saf su ile üç kez yıkandı.

2.1.4. ATP'nin Civa Tuzları İle İkinci Defa Çökeltilmesi

Dördüncü basamaktaki son ürün 500 ml saf su ile yıkandı ve üzerine süspansiyon meydana getirecek kadar (13 ml) glasiyel asetik asit ilave edildi. Çökeltinin az bir miktarı santrifügasyonla ortamdan alındı. Çözeltinin pH'sının en az 3 olmasına dikkat edildi. Bunun üzerine üçüncü basamaktaki civa asetattan 20 ml ilave edildi ve üçüncü basamaktaki gibi çökelti tekrar yıkanıp toplandı.

2.1.5. ATP'nin Baryum Sülfat Tuzu İle İkinci Kez Çökeltilmesi

Dördüncü basamakta olduğu gibi H₂S'li civa çökeltisi yıkanıp ayrıldı ve burada anlatıldığı gibi içerisine hava verilmiş filtrat elde edildi. Mevcut çökeltinin üzerine 2 ml %10'luk NaOH yavaşça konuldu ve pH'nın 6'dan az olmamasına dikkat edildi. Hali hazırdaki çökelti civa çökeltileri ile birlikte taşınan baryumun az bir miktarından gelen baryum ATP'dir. Çökeltinin pH'sı 6'ya düştüğünde çökeltme özelliği kaybolduğundan üzerine iki damla 2 M baryum asetat ilave edildi. Çökelti filtre edildi ve koloidal sülfidler uzaklaştırıldı. Berrak filtratın pH'sı %10 NaOH ile 7'ye ayarlandı ve 4. basamakta anlatıldığı vechile bu durumda baryum asetatlı ATP'nin baryum tuzu çökeltileri elde edildi. Çökelti soğuk saf su ile iki kez, %95'lik etanol ile bir kez, %75'lik etanol ile bir kez, %95'lik etanol ile iki kez ve eter ile iki kez bu sıraya göre yıkandı.

Son olarak yıkanmış ürün steril laboratuvar şartlarında etüvde 42 °C'de kurutuldu ve içerisinde kalsiyum klorid olan vakum desikatörüne yerleştirildi. Bu çalışmanın sonunda 1 kg tavşan kasından %95 saflıkta 3 gr Ba₂ATP.4H₂O elde edildi. Kromotografik ve enzimatik analiz deneylerde %90 ile %95 saflıkta sonuç vermiştir.

2.2. ADP'nin ATP'den Hazırlanışı

Bu çalışmada ADP istakoz (*Homarus vulgaris*) kaslarından elde edilen adenosin tri-fosfat enzimi kullanılarak ATP'den enzimatik hidroliz ile hazırlandı. ATP'az enziminin tavşanlardan izolasyonu çok güç olduğundan istakoz tercih edildi.

2.2.1. İstakoz Kasının Hazırlanışı

Canlı bir istakoz ikiye kesildi ve kuyruk kasları dissekte edildi. 25 gr gelen bu preparat 300 ml %0.45'lik soğuk KCl içine konuldu ve 15 dakika iyice karıştırıldı. Süpernatantı bu şekilde 5 kez değiştirildi. 1gr ATP'nin sodyum veya potasyum tuzu 100 ml saf suda çözündürüldü. Şayet ATP'nin baryum tuzu kullanılacak ise şu şekilde bir yol izlenebilir. 1.1 gr ATP'nin baryum tuzu 40 ml soğuk 0.1 N HCl'de eritilir ve üzerine 0.3 gr Na₂SO₄ ilave edilir. 5000 devirde 20 dakika santrifüj edilir ve 10 ml soğuk 0.1 N HCl ile ayrı ayrı iki kez karıştırılıp yıkanır ve santrifüje edilir. Süpernatantın pH'sı NaOH ile 7'ye ayarlandı ve saf su ile 100 ml'ye sulandırıldı. Şayet ATP'nin Na veya Ba tuzu hazırlanıp kullanılacak ise 0.1 M çözelti hazırlamak için katı KCl ilave edilir.

2.2.2. ATP'nin ADP'ye Enzimatik Dönüşümü

Birinci basamakta yıkanmış kas şeritleri ikinci basamaktaki 100 ml %1'lik ATP çözeltisine ilave edildi. Bunlar 20 °C'de 20 dakika süreyle karıştırıldı. Filtre edildi ve filtratta hidrolize olabilen asit P artışı tayin edildi. Bu %50 artmadığında, şeritler ortam ile birlikte 37 °C'de inkübe edilir ve 100 ml'lik 3 ATP çözeltisi ile kas şeritleri 3 kez ayrı ayrı muamele edildi.

2.2.3. ADP'nin Baryum Tuzunun İlk Çökeltilmesi

Filtrat üzerine 2 ile 3 ml 2M baryum asetat ilave edildi ve bir buz banyosuna yerleştirildi. Bütün uygulamalar 0 °C'ye yakın sıcaklıkta gerçekleştirildi. ADP'nin baryum tuzu ve inorganik ortofosfat karışımı ihtiva eden çökelti santrifüj ile ayırıldı.

2.2.4. ADP'nin Civa Tuzları İle İlk Çökeltilmesi

Önceki çökelti 10 ml 0.1 N HCl'de çözündürüldü ve üzerine %2'lik asetik asidde hazırlanmış %20 civa asetat ayırıcı ilave edildi. Bu şekilde bütün bir çökelti elde edildi. 5000 devirde 3 dakika santrifüje edilip çökelti 25 ml'li dörtlük civa asetat ile yıkandı. Üzerine 60 ml 0.05 N HNO₃ kondu ve H₂S'li civa tuzları uzaklaştırılarak filtre edilip 10 ml 0.05 N HNO₃ ile iki kez yıkandı. Çözeltideki H₂S, ortama hava verilerek uzaklaştırıldı ve ortamın pH'sı %10'luk NaOH ile 7'ye ayarlandı.

2.2.5. ADP'nin Baryum Tuzlarının İkinci Kez Çökeltilmesi

Nötralize filtrata %95 etanolden aynı miktar konularak iyice karıştırıldı. ADP'nin baryum tuzunun tam bir çökelti vermesi için ortama 2 M baryum asetatın yeteri kadar ilave edildi. 5.000 devirde 30 dakika santrifüje edildi. Sonra şu sıraya göre yıkama yapıldı: %50'lik etanol ile 2 kez, %75'lik etanol ile 1 kez, %95'lik etanol ile 2 kez ve eter ile 2 kez yıkandı. Materyal etüvde 40 °C'de kurutuldu ve içerisinde kalsiyum klorid olan vakum desikatörüne yerleştirildi.

Sonuç olarak yaklaşık %95 saflıkta 0.3 g Ba₂(ADP)₂ · 4 H₂O elde edildi.

Saflığı bozabilen başlıca unsur inorganik ortofosfatların baryum tuzu olduğundan ürün 0.1 N HCl ile çözündürülerek bu uzaklaştırılmış oldu ve ADP'nin ikin-

ci kez çökeltilmesi bu 6. basamakta tekrar yapıldı. Bu ATP ürününü kromotografik analiz ve enzim deneylerinde olduğu gibi serbest ATP gibi davranmıştır (Colowick and Kaplan, 1957; George, and Rutman, 1960; Bray, et al., 1966; Kaplan and Kennedy, 1966; Florkin and Stotz, 1967; Alberty, 1968).

2.3. NAD'nin Elde Edilmesi

Prensip; NAD'nin izolasyonu mayalardan sıcak su ile ekstraksiyonu esasına dayanmaktadır. Diğer ürünler ekstraksiyondan uzaklaştırıldıktan sonra arta kalan NAD bir gümüş tuzu olarak çöktü. Bu hidrojenize sülfid ile ayrıştırıldı ve NAD aseton ile çöktürüldükten sonra serbest asid olarak elde edildi. Saflaştırma ayrıca iyon değiştirici kromotografi ile tamamlandı.

2.3.1. Preparasyon Metodu

Başlangıç materyal; Bunun için, ticari ekmek mayası temin edildi ve kuru buz ihtiva eden ortama kondu. Bu haliyle iki gün bekletildi.

2.3.2. Gümüş İle Çöktürdükten Sonra %76 İle %83 Safılıktaki NAD'nin Elde Edilişi

2270 gr granül maya 3 litre kaynamakta olan saf suya konuldu. Suyun kaynadığı kap paslanmaz çeliktendi. 90 °C'de 7 dakika bekletildi. Bu kez 100 ml'lik ağız geniş bir beher glasa alındı. Süspansiyonun sıcaklığı 94 °C'ye ulaşınca kadar 2 dakika ısıtıldı. Sıcak süspansiyon whatman kağıdı ile filtre edildi. Altın sarısı ve parlak renkteki filtrat ayrı bir steril kaba alındı ve oda ısısında soğutuldu. Kombine filtratların 30 litresine 900 gr kurşun asetat ilave edildi ve üzerine 3 litre soğuk saf su kondu. Bu haliyle 30 dakika çökelti meydana geldi ve oda sıcaklığında filtre edilerek süpernatant ayırıldı. Üzerine köpüklenme oluncaya kadar capril alkol kondu. Ortamın pH'sı 1 N asetik asit ile 6.5'e tamamlandı. Bunun için 500 ml 1 N asetik asit kullanıldı; Kombine filtratların 29 litresine %25'lik gümüş nitratın 2.5 litre ilave edildi. Bu preparasyon gün ışığından korunacak şekilde yapıldı ve akşamleyin buzdolabına konuldu. Süpernatant çözeltisi sifonaj ile ayırıldı. Çökelti 5.000 devirde 30 dakika santrifüje edilerek daha iyi bir şekilde ayırıldı ve mevcut toplanan çökelti soğuk saf su ile 3 kez yıkandı. Bunun için 300 ml soğuk saf su kullanıldı ve sonra çökelti 100 ml 2 N nitrik asid ile asitleştirildi. Üzerine 5 damla capryl alkol ilave edildi ve bu süspansiyondan 1.5 saat süreyle H₂S geçirildi. Gümüş sülfür soğuk ortamda (tuz- buz karışımı) filtre edildi ve çökelti 100 ml 0.02 N nitrik asid ile 3 kez yıkandı. 800 ml filtrat içinden 30 dakika süreyle hava geçirildi ve NAD ortama 5 hacim -10°C'deki asetonun yavaşça ilavesiyle çöktürüldü. Bu preparasyon soğuk ortamın daha iyi temini gayesiyle gece saat 23⁰⁰'de başlandı ve 04⁰⁰'da tamamlandı. Tekrar 5.000 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve çökelti ayırılarak aseton ile 3 kez yıkandı ve kurutuldu. Sonra çökelti içerisinde kalsiyum klorid bulunan vakumlu desikatöre yerleştirildi. Sonuç olarak %76 ile %83 arası safılıkta 6.0 gr NAD elde edildi. Ürün beyaz renkte oldu.

2.3.3. İyon Değiştirici Kromotografi İle Tam Saflaştırma

Domex 1 resin (200 ile 400 mesh, Dow Chemical company) 260 nm'de absorpsiyon piki verinceye kadar 3N HCl ile 7 kez yıkandı. Sonra saf su ile 3 kez

yıkandı ve sonra 6 kez 2 M Sodyum format ile yıkandı. Tekrar (formatı uzaklaştırmak için) 3 kez saf su ile yıkandı. 52270 resin (reçine) 40 litrelik bir silindirde 8 saat süreyle iyice yıkandı. %76'lık (1082 μM) NAD'den 1 gr tartıldı ve saf suda çözdürüldü. Ortamın pH'sı NaOH ile 8'e ayarlandı ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti 14 cm uzunluğundaki ve 6.6 cm çapındaki bir kolona adsorbe edildi. Kolonun çalışma hızı 25 ml/dakikadır. Eşit hacimdeki saf su ile kolondaki NAD çözeltisi yıkandı. Üzerine 0.1 N formik asit (Merck, %88; 4.3 ml/L) kondu. Kolondaki yürüme hızı bu kez 20 ml/dakika oldu. Formik asit uygulaması tygon tüpe yapıldı. Çünkü bazen benzeri uyulamalar hava kabarcığı yapmaktadır. Birbirini takip eden 250 ml'lik fraksiyonlar toplandı ve 260 nm'de spektrofotometrik pikleri incelendi. Fraksiyonlardaki NAD'nin tamamı (%95.3; 1031 μM) hemen hemen görüldü. 5 (%12.6), 6(65.5), 7(%12.8) ve 8 (%4.4) nolu fraksiyonlardaki NAD toplamı %95.3 olmuştur. Bu 4 fraksiyon biraraya getirilip toplandı ve ortamın pH'sı 2N nitrik asit ile 2 ile 6'ya kadar asitleştirildi. Sonra üzerine 5.5 litre soğuk aseton ya da köpük yapmayacak şekilde ilave edildi. Bu işlem gece saat 23⁰⁰'de yapıldı ve çökelti santrifüje edildi. Sonra saf aseton ile 3 kez yıkandı ve etüvde 37 °C'de kurutulup içerisinde kalsiyum klorid olan desikatöre yerleştirildi. Sonuç olarak %95 saflıkta 0.6 gr NAD elde edildi.

2.3.4. NAD'nin Saflığı ve Özelliği

NAD oda sıcaklığında kalsiyum klorid'li desikatörde 2-3 ay, soğuk nötral çözeltilerde bir kaç hafta (5-8 hafta) nisbeten dayanıklıdır. Asidik pH'larda kararsızdır ve dayanıklılığı alkaliye meyillidir. Elde edilen bu NAD ürünlerinin enzimatik olarak indirgenmesi için (LDH enziminin laktat'ı pirüvat'a dönüştürmesi gibi) 340 nm'de birlikte absorbans verir ve bu enzimlerin aktifliğinin ölçülmesinde kullanılabilir. NAD'nin 340 nm'deki ekstinksiyon koeffişıyantı 6.22×10^6 cm (her mol için)'dir. 3 ml 0.1 μM NADH ışık yolu 1 cm olan bir spektrofotometre kuvvetinde 0.207'lik bir optik dansiteye sahiptir. İndirgenme etil alkol ve maya alkol dehidrojenazın kullanılması ile meydana gelmektedir. Bu sistem deamine olmuş NAD'nin tayininde de kullanılabilir. Oksidize NAD'nin 260 nm'deki ekstinksiyon koeffişıyantı (her mol için) 18.0×10^6 cm'dir (Colowick and Kaplan, 1957; Hutchinson, et al., 1964; Slater, 1966; Larsson and Reichard, 1967; Blakley and Vitols, 1968).

2.4. CoA'nın Elde Edilmesi

CoA aseton ile çöktürülüp kömürü ile kromatografiye edilerek sıcak su ile birlikte karıştırılmış mayadan elde edilmiştir. Saf preparasyon iyon değıştirici kromatografi, konsantr kömür ve aseton çöktürülerek %50 ile %55 saflıkta %50 ile %65 ürün elde edilmiştir. Daha saf preparasyonlar da hazırlanabilmektedir. Ancak bu metodların pahalı olduğunu unutmamak gerekmektedir.

2.4.1. Başlangıç Materyali

İyon değıştirici kromatografi yolu ile saflaştırılmış bir CoA preparasyonu kuruy mayanın bir su eksrakıtı bir odun kömürü kolonundan geçirilerek elde edilir. Bir Armour şirketi yetişkin domuz karaciğerinden bu yol ile 13 ünite CoA/1 mg karaciğer ve Sigma Chemical şirketi aynı yolla 6.5 ünite CoA/1 mg karaciğer elde etmiş-

lerdir. Bir Acti-nomycetes (mantar) cinsinden konsantre CoA'yı iyon değiştirici kromotografi ile elde etmek m¼mk¼n olmamıştır. Fakat mayadan bu hem ucuz hem de nisbeten kolaydır. Bu sebeplerle başlangıç materyali ekmek mayası olarak seçilmiştir.

2.4.2. Maya Ekstraktının Hazırlanışı

3 kg maya (ekmek mayası) kaynamakta olan 15 litre suya konup s¼spansiyon iyice karıştırılıp 5 dakika kaynatıldı. ¼zerine 11350 gr kırılmış buz parçaları ilave edildi. Soğumuş olan s¼spansiyon 2.000 devirde 30 dakika santrif¼je edildi. S¼pernatant ayırıldı. Bu s¼pernatant (19L.) 100.000 ± 30.000 ¼nite CoA ihtiva etmektedir.

2.4.3. Maya Ekstraktının Odun K¼m¼r¼ İle Kromotografi

19 litre maya ekstraktının pH'sı 6 N HCl (200-250 ml)ile 3.0'e ayarlandı. Bu ekstrakt bir odun k¼m¼r¼ kromotografisi (10 cm x 29 cm)'den geçirildi. Ekstraktın kromotografik uygulaması 3 dakikada 2 litre ekstrakt geçişi esasına g¼re yapıldı. Kolondan dışarı akan bu ekstrakt derhal steril bir kaba alınarak ayırıldı. Bunun rengi s¼t¼ms¼ beyaz oldu. Sonra bu kolon 10 ile 15 litre saf su ile ve akabinde 2 ile 4 litre %40'lık aseton ve 1 ml %28'lik konsantre amonyum hidroksit ile ayrı ayrı yıkandı. Kolondan alınan s¼t¼ms¼ beyaz s¼pernatanttan 2'şer ml alınıp bunların pH'sı ¼l¼ld¼ę¼nde 3.3'den 5.0 kadar değiştiği g¼r¼ld¼ ve sonra pH'ları 7.5 ile 9.0'a doğru belirgin bir şekilde arttı. Ancak pH genelde 3.8 ile 7 arasında değişmiştir.

CoA ihtiva eden fraksiyonlar biraraya toplandı ve pH'sı 6 N HCl ile 1.7'ye getirildi. Az miktarda meydana gelen okelti filtre edildi (Whatman no 1). Sonra CoA 2 fraksiyonundaki 5 ml soğuk aseton ile okt¼r¼ld¼, 2 saat sonra santrif¼je edilip okelti ayırıldı. Bu okelti aseton ile yıkandı ve daha sonra eter ile yıkanıp içerisinde P₂O₅ olan vakum desikat¼r¼ne konuldu. Bu durumda 6.5 gram kuru aseton tozu şeklinde ve her miligramını 10 ile 18 ¼nite CoA ihtiva eden ¼r¼n elde edildi.

2.4.4. Domex-1 Resin İle Kromotografi İşlemi

Aseton tozu tabir edilen yukarıdaki ¼r¼nden 50 gr alındı ve bir miktar saf su-da ¼z¼nd¼r¼ld¼. Bunun pH'sı 2 N KOH ile 8.1'e ayarlandı ve b¼t¼n hacim 200 ml'ye tamamlandı. ¼z¼nemeyen başka materyaller 3.000 devirde 30 dakika santrif¼je edilerek uzaklaştırıldı. Ham CoA ¼z¼ltisi % 2 resin ihtiva eden Domex-1'e yerleştirildi (Bu kolonun ebatları 13 cm x 15cm). Kolondan geçen CoA muhtevalı s¼pernatant alındı. Sonra kolon 2 kez 100'er ml'lik saf su ile yıkandı. Akabinde s¼pernatanta 25.8ml %88'lik formik asit ve 0.3 M amonyum format ilave edildi ve CoA muhtevalı ¼zelti tekrar kolondan geçirildi. Sonuçta toplam CoA'lı fraksiyonda CoA ve Adenin konsantrasyonları ¼l¼ld¼ (260 nm'de).

Eluate'nin konsantrasyonu CoA Domex kolonundan geniş bir hacim içinde (2500 ile 3000 ml s¼pernatant) geçmekte bu y¼zden CoA aseton ile tekrar okt¼r¼lebilir. Son derece saf CoA elde etmek için, eluatler iyon exchange kromatografisinden geçerken CoA/Adenin oranı 0.6 veya daha b¼y¼kt¼r. Bu y¼zden s¼pernatantın pH'sı 100-200 ml 6 N HCl ile 2'ye ayarlandı ve bu kez odun k¼m¼r¼

kolonundan geçirildi (kolonun ölçüleri 2.5 cm çapında x 12 cm uzunluğunda). Bunun 260 nm'deki optik yoğunluğu 0.02'den fazla olmadı. Kolon önce 300 ml saf su, sonra 300 ml %40 aseton ile yıkandı ve CoA son olarak litresinde 1 ml konsantrasyon amonyum hidroksit ihtiva eden %40'lık aseton ile tekrar elüe edildi. Bunun kolondan geçiş hızı 3.0 ml/ dakikadır. Fraksiyonlar 50'şer ml olarak toplandı. Alkali fraksiyonlar 4 N nitrik asit ile nötralize edildi. Kolondan dışarı çıkan süpernatantın pH'sı alkali olduğundan CoA genelde tamamen elüe edildi. Bu fraksiyonlardaki CoA nitroprussit testi ile iyi bir şekilde konsantrasyon olduğunu göstermiştir. CoA ihtiva eden fraksiyonlar bir araya getirildi. Toplanan bu son süpernatantın pH'sı 4 N nitrik asit ile 1.7'ye ayarlanıp asitleştirildi ve buna 7 kat hacimde aseton ilave edilecek çökelti ayırıldı. Bu işlem gece 23⁰⁰'de yapıldı. Çünkü soğuk ortama ihtiyaç vardı. Çökelti oda ısısında aseton ile iki kez eter ile 1 kez yıkandı ve içinde P₂O₅ olan desikatörde kurutuldu.

Saflaştırılmış 300 ile 400 mg materyalden her miligram 200 ile 270 ünite CoA ihtiva eden 15 gr konsantrasyon CoA elde edildi. İşin başlangıcından bu safhaya kadarki geçen işlemlerden %50-55 oranında ürün elde edildi. Bazen bu oran %40 veya %70 olabilmektedir (Colowick and Kaplan, 1957; Goodwin, et al., 1964; Gutfreund, 1965; Bernhard, 1968).

2.5. DNA ve RNA'nın Elde Edilmesi

2.5.1. DNA'nın Elde Edilmesi

Teorik olarak her hayvan dokusu DNA kaynağı olmakla birlikte, pratikte bazı doku tipleri bu amaç için daha az kullanılmaktadır. Pankreasta DNAaz aktivitesini inhibe etmek güç olduğundan DNA çok az elde edilmektedir. Memeli spermasındaki DNA ile protein arasında kuvvetli bir beraberlik olduğundan DNA yine güçlükle ekstrakte edilebilmektedir. Aynı güçlük yumurta içinde söylenebilir. Bu yüzden Timus bezi, dalak ve piliç eritrositlerinden DNA elde etmek nisbeten kolay olabilir. Çünkü bunlardaki DNAaz aktivitesi daha düşüktür.

2.5.1.1. Buzağı Timus Bezinden DNA'nın İzolasyonu

Yeni kesilmiş bir buzağının Timus bezi 30 dakika içinde hayvandan alındı ve tuz buz karışımı bir soğuk ortama muhafazalı olarak konuldu. Timus bezi -30 °C'ye kadar 10 gün dayanabilmektedir. Daha uzun süre bu iş için iyi sonuç vermemektedir. Timus bezinden 50 gr hemen tartıldı ve küçük parçalara ayrıldı. Bu küçük parçalar 100 ml 0.1 M soğuk sodyum sitrat ile 5 kez yıkandı (pH 7.4). Bu olmadığında 0.1 M EDTA da kullanılabilir (pH 7.35). Numune 2000 devirde 2 dakika homojenize edildi ve üzerine 250 ml 0.1 M sodyum sitrat ilave edildi. Homojenat 1800 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bunun üzerine tekrar 250 ml 0.1 M sodyum sitrat kondu ve aynı işlemler tekrarlandı. Sonra üzerine 1000 ml 2 M NaCl kondu. Karışım 4 °C'de 1 gün süreyle etüvde bekletildi ve sonra 1900 devirde 1 saat santrifüj edildi. Berraklığı süpernatanta bunun iki katı hacimde etil alkol ilave edildi ve filtrasyona tabi tutuldu. Filtrasyon hızı 150 ml/saat oldu. Sonra %75 'lik etil alkol ile iki kez yıkandı ve tekrar filtre edilip üzerine 1000 ml 0.14 M NaCl konarak pH 7.1'e ayarlandı. Bu çözeltiye hacminin 1/9'u kadar %5'lik Dupanol (% 70 'lik etil alkolde hazırlanmış) kondu ve karışım 1 saat süre ile oda

ısısında (23 °C) bırakıldı. Son konsantrasyonuna gelmesi için ortama katı NaCl katıldı. Bu kez 23 °C'de 30 dakika bekletildi ve sonra gece 23⁰⁰'de 4 °C'deki etüve alındı, santrifüje edildi (5000 devirde kademeli olarak 18 saat). Santrifügasyondan sonra berrak süpernatant alındı ve buna iki katı kadarki hacimde saf etil alkol ile yıkandı ve kalan posa %5 Dupanolden 1/9 hacim ihtiva eden standart Tris-EDTA Borik asit tamponunda çözündürülüp bu tampon ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve bu haliyle 23 °C'de 1 saat bekletildi. Sonra ortama %5'lik NaCl çözeltisi konsantrasyonunu elde etmek için gerekli miktarda NaCl konuldu. Son berrak süpernatant iki katı hacimde etil alkol yavaşça konuldu ve yukarıdaki gibi tekrar standart tampon ile çözündürüldü.

Sonuç olarak elde edilen son süpernatant yaklaşık 1.5 mg DNA/ml ihtiva etmektedir. Toplam ürün 950 mg olmuştur. Bu ürün -15 °C'de deep-freeze'de muhafaza altına alındı. Bu ürün sonra etil alkol ve eter (V/V) ile altında evapore edilerek kristalize edildi. Gerektiğinde bu uygun tamponunda çözündürülüp kullanılabilir.

2.5.1.2. DNA'nın Eritrositlerden İzolasyonu

100 ml taze kan 24 ml 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi ile karıştırıldı. Karışım 1800 devirde 30 dakika santrifüje edildi ve plazma kısmı uzaklaştırıldı. Kalan çökelti -15 °C'de 12 saat bekletildi ve sonra 23 °C'de çözündürüldü. Bu şekilde dondurma kırma metodu ile hücreler parçalanmış oldu. Bunun üzerine aynı sodyum sitrattan 60 ml ilave edildi ve tekrar 1800 devirde 30 dakika santrifüje edilerek bu kez süpernatantı uzaklaştırıldı. Bu son operasyon 3 kez tekrarlandı. Bu şekilde elde edilen yıkanmış nükleuslar kendi hacimleri kadar aynı sodyum sitrat ile tekrar süspansiyon edildi ve bu da aynı şekilde santrifüje edilip süpernatantı uzaklaştırıldı. Son sediment 400 ml 2 M NaCl ile karıştırıldı ve 4 °C'de 1 gün bekletildi ve sonra 1900 devirde 1 saat süreyle santrifüje edildi. Bundan sonraki işlemler timus bezine uygulananların aynısı olmuştur. Ayrıca buzağı dalak, karaciğer, testis, beyin, böbrek ve kemik iliğinden de DNA timus bezine uygulanan teknik ile elde edilmiştir.

2.5.2. RNA'nın Elde Edilmesi

Buzağı kesilir kesilmez karaciğer yürek, böbrek, beyin, dalak, timus bezi, testis, kemik iliği ve kanı ayrı ayrı steril kaplara alındı. Bunlar derhal deep-freeze'e alındı. Bunların her birinden tartılarak 0.01 M sodyum sitrat ile hazırlanmış 200 ml % 0.9 NaCl çözeltisi ile iyice karıştırıldı ve 2000 devirde 5 dakika homojenize edildi. Homojenat 2500 devirde 30 dakika santrifüje edildi. Bu şekilde deoksiribonükleoproteinler uzaklaştırıldı. Santrifügasyondan sonra süpernatant ayrırt edildi. Ortamın pH'sı 1 N HCl ile 4.5'e ayarlandı. Mevcut çökelti 15 dakika soğuk ortamda bekletildi ve sediment 100 ml %0.9 sodyum klorür ile süspansiyon edildi. Sonra süspansiyona 9 ml %2'lik sodyum dodesil sülfat eklenerek iyice karıştırıldı. Bu kez pH %10'luk NaOH ile 7'ye ayarlandı ve 3 saat oda sıcaklığında bekletildi. Sonra bunun konsantrasyonu 1 M oluncaya kadar üzerine katı sodyum klorür konuldu. Berrak viskoz çökelti 15000 devirde 15 dakika santrifüje edildi. Ortama 2 katı hacimde saf etil alkol konuldu ve süpernatant santrifüj ile uzaklaştırılarak çökelti halinde nükleik asit elde edildi. Çökelti önce saf etil alkol ve sonra saf aseton ile yıkanıp tekrar santrifüje edildi. Son çökelti havada kurutulup üzerine tekrar 9 ml %2'lik sodyum dodesil sülfat eklendi. pH tekrar %10'luk sodyum hidroksit ile 7'ye

ayarlandı ve 2 saat bekletildi. Bunun konsantrasyonu 1 M oluncaya kadar katı sodyum klorür konuldu 14000 devirde 15 dakika santrifüje edildi ve süpernatant uzaklaştırılıp çökelti 100 ml saf suda çözüldü. Süpernatant atılıp çökelti kurutuldu. Bu işlem karaciğer için yapıldığından bahis konusu diğer biyolojik materyallerden de aynı metod ile RNA elde edilmiştir (Colowick and Kaplan, 1957; Kornberg, 1961; Josse, 1961; Burton, 1965; Ingram, 1965; Cantoni and Davies, 1966; Felsenfeld and Miles, 1967; Madison, 1968; Davidson, 1969).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar Tablo 1, 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen ATP; ADP, NAD ve CoA'nın miktarları

Ürünün adı	Elde edilen miktarı (gr)	Elde edildiği materyal
ATP (Ba ₂ ATP 4H ₂ O olarak)	3	Tavşan iskelet kası
ADP (Ba ₃ (ADP) ₂ 4H ₂ O olarak)	0.3	Tavşan kasından elde edilen ATP'den
NAD	0.6	Maya
CoA	0.4	Maya

Tablo 2. Elde edilen DNA ve RNA miktarları

Elde edildiği kaynak	Elde edilen ürün (mg)	
	DNA	RNA
Timus bezi	950	1300
Dalak	1450	1600
Karaciğer	1563	1800
Testis	600	870
Beyin	870	1200
Böbrek	257	1100
Eritrosit	340	950
Kemik iliği	512	1200
Akciğer	270	817

Tablo 1'deki sonuçlar ile Tablo 2'deki timus bezi, dalak ve eritrositlere ait sonuçlar yapılan bir araştırmanın bulguları ile uyum içindedir (Colowick and Kaplan 1963). Tablo 2'deki diğer bulguların karşılaştırması için herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Tablo 1 incelendiğinde ATP miktarının ADP, NAD ve CoA'dan fazla olduğu görülebilir. Bu sonuç iskelet kası ile maya hücrelerinin organizasyon bakımından farklı olmalarından kaynaklanmaktadır. Kaldığı iskelet kasları tavşanların hareket yetenekleri için oldukça fazla miktarda ATP'ye ihtiyaç göstermektedir. Bunlar beklenilmeyecek sonuçlar değildir.

Diğer taraftan Tablo 2 incelendiğinde DNA ve RNA miktarlarının dağılımlarının çok farklı olduğu anlaşılmaktadır. Hem DNA hemde RNA karaciğerde en fazla elde edilebilmiştir. DNA en az böbrekte ve RNA ise en az olarak akciğerden elde edilmiştir. Ancak bu bulgular, tür, yaş, cinsiyet, beslenme, canlı ağırlık ve besin tiplerine hatta uygulanabilecek biyokimyasal metodlara göre değişebilmektedir.

Bu araştırmadaki şekli ile elde edilebilecek ATP, ADP, CoA, NAD, DNA ve RNA'nın diyet veya rasyonlar ile ya da enjeksiyon yolu ile hayvanlar üzerinde biyolojik verim ve performansı artırıp artıramayacakları, DNA'nın ise kalıtsal değişikliklere sebep olup olamayacağı araştırılabilir.

4. YARARLANILAN KAYNAKLAR

- Alberty, R.A., 1968, "Effect of pH and Metallon Concartration on the Equilibrion Hydrolysis of ATP to ADP", J. Biol. Chem. 243; 1337-1343.
- Bernhard,S., 1968, "The Structure and Function of Enzymes". W, A. Benjamin. Inc. New York.
- Blakley, R. L and Vitals, E., 1968, "Control of Nucleotide Biosynthesis." Ann. Rev. Biochem. 37: 201-224.
- Bray, H. G. and White, K., 1966, "Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry, 2d ed. Academic Press Inc., Publishhers, New York.
- Burton, K., 1965, "Sequence Determination in Nücleic Acids" In P.N. Campbelland, G. D., Greville (eds), Essays in Biochemistry, Vol.I, Academic Press, New York, 57
- Cantoni, G. L. and Davies, D.(eds), 1966, "Procedures in nücleic acid research", Haper and Row, Publishers, Inc. New York.
- Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., 1957, "Methods in Enzymology" Vol. III. Academic Press, New York.
- Davidson, J. N., 1969, "The Biochemistry of the Nucleic Acids. Methuen. London, 6 the edition, A Popular and Useful Intraduction 350 p.
- Felsenfeld, G., and Miles H. T, 1967, "Physical and Chemical Properties of Nucleic Acids. Ann. Rev. Biochem.. 36: 407 - 448.
- Florin, M. and Stotz, E. H. (eds), 1967, "Bioenerjetics", vol 22 of Comprehensive Biochemistry, American Elsevier, Publishingh Company, New York.
- George, P. and Rutman, R. J., 1960, "The high Energy Phosphate Bond Concept", Progr. Biophys. Chem., 10, 1-53.
- Goodwin, T, W, J. I. Harris and B, S. Bentley (eds) 1964, "Structure and Activity of Enzymes Academic Press," Inc. New York.
- Gutfreund, H., 1965, "Intraduction to the Study of Enzymes," Wiley, New York.
- Hutchinson, D. W., 1964, "Nucleotides and Coenzymes John Wiley and Sons." Inc. New York.
- Ingram, V. M., 1965, "The Biosynthesis of macromolecules",W. A., Benjamin, New York, A Primer.
- Josse, J., Kaiser, A. D. and Korberg, A., 1961, "Enzymatic Synthesis of DNA, VIII. Frequence of Neaust Neighbor Base Sequence in DNA", J. Biol. Chem., 236; 864.

- Kaplan, N. O. and Kennedy, E. P. (eds), 1966, "**Current Aspects of Biochemical Energetics**", Academic Press Inc., New York.
- Kornberg, A., 1961, "**Enzymatic Synthesis of DNA**", Jonh Wilet and Sons, New York.
- Larsson, A and Reichard, P., 1967, "**The Enzymatic Synthesis of Ribonucleotides**, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 7: 303 - 347.
- Madison, J. T., 1968, "**Primary Structure of RNA**", Ann. Rev. Biochem, 37; 137-148. Press Inc., Publishhers, New York.
- Slater, E. C. (ed.), 1966, "**Flavins and Flavoproteins Elseiver Publishing Company**," Amsterdam.