



Ankara Üniversitesi
ZİRAAT FAKÜLTESİ

Yayın No : 1423
Yardımcı Ders Kitabı : 412

KONUKÇU - PATOJEN İLİŞKİLERİNDE ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Prof.Dr.Gürsel ERDİLLER

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

Ankara - 1995

Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1423
Yardımcı Ders Kitabı: 412

KONUKÇU - PATOJEN İLİŞKİLERİNDE ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Prof.Dr.Gürsel ERDİLLER

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

ANKARA
1995

ISBN 975-482-272-7

A.Ü.Ziraat Fakültesi Halkla İlişkiler ve Yayın Ünitesi 1995-ANKARA

ÖNSÖZ

Bitki hastalıkları ile bunların konukçuları arasında naki bir ilişki söz konusudur. Hastalık etmenlerinin konukçu hücrelerinin içine girişi ile konukçu-patojen ilişkisi başlar. Etmenin konukçuya girişinde çevre şartları yanında konukçu bitkilerin kendi özellikleri ve onların salgıları çekici rol oynar. Enfeksiyon pasif, mekanik veya enzimatik olarak gerçekleşebilir. Bazı patojenlerin konukçuda taşınmaları patojenler tarafından çıkarılan antimetabolitlerin etkilerine de bağlıdır. Patojenlerin toksinlerinin bitkide patojen gibi semptomlara neden olduğu saptanmıştır. Buna rağmen bütün bitki patojeni olan mikroorganizmaların hastalıklara toksinler nedeniyle sebep olduğu söylenemez.

Patojen tarafından enfekte olan bitkinin morfolojik ve anatomik olduğu kadar solunumu, nişasta, azot, ferol, karbonhidrat metabolizması, su dizesi gibi fizyolojik, kimyasal ve biyokimyasal düzeminde bir takım değişimler ortaya çıkar.

Bu eserde, değinilen değişimleri saptamada kullanılan yöntemlerden bir kısmı verilmiştir.

Öğrencilerime ve konu ile ilgili meslekdaşlarıma yararlı olması en içten dileğimdir.

Ankara, 1995

Prof.Dr.Gürsel ERDİLLER

UYGULAMA: 1

BOTRYTIS CINEREA KÜLTÜRÜNÜN APPRESORIUM OLUŞTURMASI

Materyal: Botrytis spp.

Metod : B.cinerea aşılanacak ortam olarak % 2 glikoz, % 0.02 pepton, %2 agar 100 ml suya kutup otoklavda sterilize edilir, petrilere konur. Daha sonra bu ortama, B.cinerea aşılanır ve spor gelişimi gözlenir. Gelişen Botrytis kültüründen yaklaşık 10^7 spor/ml olacak şekilde spor süspansiyonu hazırlanır. Spor süspansiyonu hazırlamak için de % 0.5 lik glikoz çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu 100 ml lik çözeltiliye Botrytis kültüründen bir parça alınır aşılanır. Böylece spor süspansiyonu hazırlanmış olur.

Appresorium oluşumunu gözlemek için enli damla metodu kullanılır. Bunun için çukur lamin çevresi çabuk kurumaması için parafin ile yağlanır. Enfeksiyon öznesi spor süspansiyonuna batırılır, lamelin ortasına su damlacığı şeklinde konur. Ters çevrilip hava kabarcığı yapmayacak şekilde lama kapatılır. Sporların 2-3 saat sonra çimlenmesi gerekir, çim uçlarının lamela değdiği yerde appresorium oluşur. Bunu sağlamak için çukur lamalarımız nemli hücre içinde 25°C de iklim dolabında tutulur.

Not: Fitopatolojide Araştırma Metodları dersi (Prof.Dr.G.Erdiler) spor sayısı, spor süspansiyonunun konsantrasyonu nasıl saptanır, okuyunuz.

UYGULAMA: 2

FUNGUSLARIN ENZİM SALGILARININ TESPİT EDİLMESİ

Enfeksiyonda enzimlerin rolünün tespiti için yapılan bu denemede Fusarium sp. tarafından pectinase enziminin salgılanıp salgılanmadığı saptanacaktır.

Materyal:

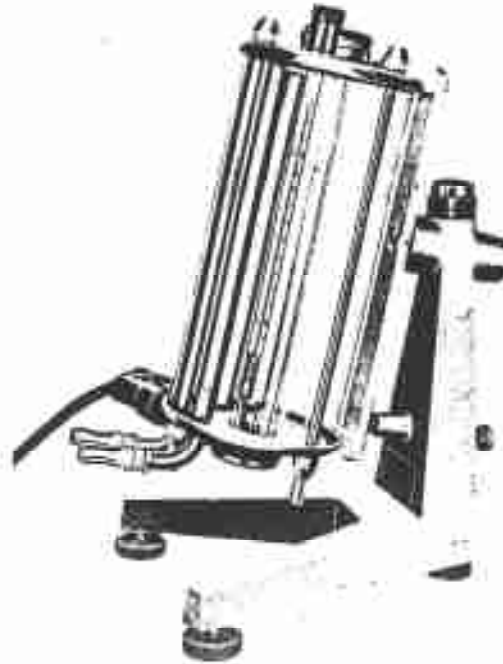
Fusarium sp. kültürü, filtre kağıdı, viskozimetre, erlen-mayer, mantar delici, pamuk, sarsak, pektin.

Fusarium sp nin geliştirileceği sıvı ortam:

% 0.1	NH ₄ NO ₃
% 0.05	MgSO ₄
% 1	Pektin

500 ml ortam hazırlanır. Ancak ortamın pH'ının 5.4 olması gerekir. Bu da fosfat buffer ile sağlanır. Düşük pH' da fungus daha iyi gelişmektedir.

1/35 M Fosfat Bufferin Hazırlanışı: (Bak; Erdiller 1987. Viroloji Tekniği, sf.21)



Viskozimetre Tip D112

Metod:

Karbon kaynağı olarak sadece pektin içeren sıvı ortamda *Fusarium* sp. 1 hafta süre ile geliştirilir. Kontrol olarak yine aynı ortam kullanılır. Fakat ortama *Fusarium* sp. aşılanmaz. *Fusarium* aşılanmış ve aşılanmamış pektinli ortam içeren erlen-mayerler 1 hafta süreyle sarsakta 25±2 °C de geliştirilir.

Bir hafta sonra kontrol ve diğer çözeltinin her ikisi de kaba filtrasyona (filtre kağıdı ile) tabi tutulur. Sonra rotary evaporatörde (su banyosunun sıcaklığı 40°C) filtratın suyu 3/4 oranında uçurular ve yoğun hale getirilir.

Enzimleri saptamada birçok metod olmasına rağmen en basit yöntem Viskozite testi dir. Yoğunlaştırılan çözeltilere belli oranda pektin çözeltisi karıştırılır ve belli zaman aralığıyla viskoziteleri ölçülür. Değişme olup olmadığı saptanır.

$$\text{Dinamik viskozite Formülü: } \eta = t (Q_1 - Q_2) / K$$

η : Dinamik viskozite (cP:centipois)

t : Düşüş zamanı (s)

Q_1 : Bilyenin özgül ağırlığı (g/cm³)

Q_2 : Ölçülecek sıvının ölçüm armadaki özgül ağırlığı (g/cm³)

K : Bilyenin sabiti

Viskozimetrenin ağzına kadar destile su konur. Bu su banyosunun 25°C olması istenir. Viskozimetrenin iç kısmındaki boruyu yaklaşık 40-50 ml sıvı alabilir. Bu nedenle % 1 lik pektin çözeltisinden 50-70 ml kadar hazırlanır. *Fusarium* sp. enfekteli çözelti 1/4 oranında (30 ml yeni pektin çözeltisi 10 ml *Fusarium* sp. enfekteli çözelti) yeni pektin çözeltisi ile karıştırılır.

Hazırlanan bu karışım viskozimetrenin borusuna konur. Sıvı kondüktan sonra bilye yukarıdan burulur. İki çizgi arasındaki geçiş süresi kronometre ile tespit edilir. Ölçüm belli aralıklar ile 10 dakika süresince yapılır. Aynı işlemler kontrol çözeltisi için de yapılır.

1 Nolu Bilye	2 Nolu Bilye
Çap: 15.801 mm	Çap: 15.631 mm
Özgül ağırlık: 2.398 g/cm ³	Özgül ağırlık: 2.403 g/cm ³
K : 0.009029	K: 0.07141
Min.düşüş süresi: 60sn	Min.düşüş süresi: 30sn

Elde edilen değerler formülide yerlerine konularak cP olarak viskozite hesaplanır. Bizim kullandığımız bilyeli viskozimetredir. Grafik, apsise zaman (dakika), ordinatı viskozite (cP) konularak çizilir. Grafikte zamanla viskozitenin azaldığı görülecektir. Belli bir süre sonra parçalanacak pektin kalınacağından grafik sabit kalacaktır.

Enfekteli sıvı kültürde *Fusarium* sp. tarafından pektinaz enzimi salgılandığından çözelti kontrole kıyasla daha berraktır.

UYGULAMA: 3

MİSELİAL DUVARIN PREPARASYONU VE ELİSİTÖRLERİN İZOLASYONU

- Mıcellerin Yıkınması: 4 litre destile su, 4 litre 100 mM potasyum fosfat (pH 7.2), 4 litre 500 mM potasyum fosfat (pH 7.2)
- 500 mM potasyum fosfat bufferin (pH 7.2) 250 ml si ile mıceller homojenize edilir.
- Homojenize edilmiş mıceller, 500 mM potasyum fosfat buffer iç 500 ml si ile monofilament yüzeyi açılan Nutex tea filitre edilmek suretiyle 8 kez yıkanır.
- Kalan kısım 8 litre destile su, 2 litre kloroform metanol, (1:1 v/v) ve 1 litre aseton ile yıkanır.
- Havada kurutulur (Saflaştırılmış misel hücre duvarı)
- Hücre duvarı destile suda süspansiyon edilir, (100 mg hücre duvarı)
- Süspansiyon 121°C de 3 saat tutulur.
- Sıcaklıkla erimeyen materyaller santrifüj ile uzaklaştırılır.
- Üstte kalan kısım membran filtreden (0.22 Mm milipore) geçirilir.
- Sıcaklıkta eriyen duvar parçaları düşük basınç altında 40°C de rotary evaporatör yardımıyla başlangıç hacminin %1 oranında yoğunlaştırılır.
- Üstte kalan kısımın 75 ml hacmine 37.5 ml %1 lik borik asit ilave edilir.
- Solüsyon karıştırılır ve pH 2N NaOH ile 8.9 a ayarlanır.
- Oda sıcaklığında 1 gece bekletilir.
- Santrifüj edilir ve çökeltili pH 8.9 luk %0.5 lik sodyum borat ile 3 kez yıkanır.
- Kalıntı %2 lik 10 ml asetik asitte çözülür.
- Solüsyonu ve etanolün 3 hacmine 10 mg sodyum asetat ilave edilir.
- Çökeltili % 2 lik asetik asitte tekrar çözülür ve tekrar çöktürülür.
- Çökeltili 25 ml suda çözülür, santrifüj edilir, dialize edilir ve dondurularak kurutulur (Bölüm B).
- Yoğunlaştırılmış bu süspansiyon 8 litre deiyonize suyun üç halide karşı dialize edilir.
- Hücre duvarınca serbest bırakılan elisitör olarak suyla eriyen ve dialize olmayan materyal toplanır.
- Kısmen saflaştırılmış elisitör (200 mg) 50 ml suda çözülür.
- % 7 lik 25 ml hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetavilon) ilave edilir.
- Bir gece oda sıcaklığında bekletilir.
- Çökeltili santrifüj edilir ve üst kısım filtrasyon için toplanır.
- Su ile yıkanır.
- Çökeltiler oda sıcaklığında bir gece boyunca 1 M ve 10 ml NaCl solüsyonunda çalkalanarak çözülür.
- Çözünmeyen materyal santrifüj ile uzaklaştırılır.
- Elisitör, etanolün 3 hacmi ile çöktürülür.
- Çözeltili santrifüj ile izole edilir.
- Çökeltili, etanolde bulunan % 2 lik asetik asit ile yıkanır.
- Kalıntı 25 ml suda çözülür, dialize edilir ve dondurularak kurutulur. (Bölüm A).

UYGULAMA: 4

SAĞLIKLI VE HASTA BİTKİLERİN KARBONHİDRAT İÇERİĞİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN TESPİTİ

Materyal:

% 80 lik metanol, hasta ve sağlıklı bitkiler, beher, saat camı, filtre kağıdı, cam tüp, fenol (%80 lik), aktif karbon, H₂SO₄ (% 96 lik)

Metod :

0.5 g taze ağırlığa sahip sağlıklı ve hasta bitkilerden alınan yapraklar (yaprakların aynı yaşta olmasına dikkat edilir) yaklaşık 1 cm lik parçalar halinde kesilir ve %80 lik 10 ml metanolde kaynatılır. Bu işlem 3 kez tekrarlanır ve bu sızıkların hepsi bir beherde toplanır. Soğuduktan sonra ortamdaki klorofil vs. gibi renk pigmentlerinin ortundan uzaklaştırılması için bir miktar aktif karbon ilave edilir ve filtre kağıdından süzülür.

Bu şekilde elde edilen ekstraktaki total karbonhidratların tespitinde pratik olması nedeniyle Döberis et al (1956) metodundan faydalanılır. Örneklerin herbirinden 3 tekrarlara olacak şekilde, 40 µl otomatik pipetler ile test tüplerine konulduktan sonra üzerine 400 ml saf su ilave edilir. Daha sonra üzerine 10 ml % 80 lik fenol konular ve solüsyonun homojenliğini sağlamak amacıyla tüp karıştırıcısında tüpler karıştırılır. Daha sonra üzerine 1 ml % 96 lik sülfürik asit başıncı pipetlenir ve yaklaşık 1 saat süreyle bekletildikten sonra spektrofotometrede 487.6 nm dalga boyunda absorbanans değerleri okunur. Kullanılan alet ve kimyasal maddelerden dolayı ortaya çıkan hataları en aza indirmek için kör olarak saf su alınır ve bütün işlemler köre de uygulanır.

Toplanan karbonhidrat miktarının elde edilmesinde glikoz standart eğrisinden yararlanılır. Bu amaçla 100-1000 µg/ml lik bir çözelti serisi düzenlenir.

Ekstraktlar için anlatılan tüm işlemler bu standart çözelti serisi için de yapılır. Bunlara ait absorbanans değerlerinin regresyon analizine tabi tutulmaları sonucunda glikoz standart eğrisinin denklemi bulunur. Örnekler için absorbanans değerinin bu denkleme uygulanması ile 1 g. kuru yaprak materyalindeki toplam karbonhidrat miktarı saptanır.

Sonuçlar :

Standartlar	Absorbanans değerleri
100 µg/ml	0.154
200 µg/ ml	0.158
300 µg/ ml	0.175
400 µg/ ml	0.179
500 µg/ ml	0.195
600 µg/ ml	0.196
700 µg/ ml	0.198
800 µg/ ml	0.214
900 µg/ ml	0.254
1000 µg/ ml	0.320

Örnekler**Absorbans değerleri**

Sağlıklı	a_1	0.316
Sağlıklı	a_2	0.302
Sağlıklı	b_1	0.192
Sağlıklı	b_2	0.327
Hasta	a_1	0.341
Hasta	a_2	0.337
Hasta	b_1	0.327
Hasta	b_2	0.307

UYGULAMA: 5

HASTALIKLI BİTKİNİN KLOROFİL MİKTARINDAKİ DEĞİŞMELER

Bitkilerde fotosentez olayı bitkilerin yeşil kısımlarında esas olarak yapraklarda yer alan kloroplastlar içinde gerçekleşmektedir. Kloroplastlar içinde yer alan klorofil pigmenti bitkilere yeşil rengi vermesinin yanı sıra fotosentezde yer alan en aktif bileşiklerdir. Bugünkü bilgilere göre en az 8 değişik klorofil bulunmaktadır. Bunlardan klorofil a ve b tüm ototrofik organizmalarla bol miktarda bulunan ve en iyi bilinen klorofilendir. Klorofilin fotosentez mekanizması içindeki görevleri belli dalga boyundaki ışık enerjisini absorbe ederek bunu fotosentez için gerekli bileşiklere aktarmak ve fotosentezin belli aşamalarında bir katalizör gibi görev yapmaktır.

Bazı hastalıkların neden olduğu nekroz ve klorozlar, kloroplast ve klorofil içeriğinde değişik etkiler yapmaktadır. Enfekteli alanlarda klorofil miktarı azalmakta ve kloroplastlar parçalanmakta veya her ikisi birden olmaktadır.

Materyal :

Hastalıklı ve sağlam bitki, spektrofotometre, Whatman no 1 filtre kağıdı, % 80 lik aseton.

Metod :

Deneme 4 tekerrür halinde yürütülür. Her tekerrürde 3 okuma yapılır. Sağlam ve hasta bitkilerden 0.5 g yaprak örnekleri alınarak 40 ml % 80 lik aseton içeren 150 ml lik erlenmayerlere konular. Oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda 1 gece bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür. Daha sonra süzük spektrofotometrede 663, 645 ve 652 nm dalga boylarında % 80 lik asetona karşı absorbanans değerleri okunarak kaydedilir. Elde edilen absorbanans değerlerinin aşağıda belirtilen formüllerde (Witham vd 1970) yerlerine konulması sonucunda, örneklerin klorofil a, b ve total klorofil miktarları hesaplanabilir.

$$mg \text{ klorofil a/g doku} = 12.7 (D_{663}) - 2.69 (D_{645}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$mg \text{ klorofil b/g doku} = 22.9 (D_{645}) - 4.68 (D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$mg \text{ total klorofil/g doku} = 20.2 (D_{645}) + 8.02 (D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

D: Belirtilen dalga boyunda aletten okunan absorbanans değeri

V: Ekstrakt hacmi (ml)

W: Ekstrakte edilen taze yaprak ağırlığı (g)

SONUÇLAR :

	663	645
Hasta 1	0.544	0.273
Hasta 2	0.680	0.322
Hasta 3	0.577	0.283
Sağlıklı 4	0.881	0.439
Sağlıklı 5	0.840	0.410
Sağlıklı 6	0.738	0.362

Bu sonuçlar formüllerde yerlerine konarak, klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları bulunur.

	Klorofil a	Klorofil b	Total Klorofil
Hasta 1	0.4939	0.2965	0.7902
Hasta 2	0.6216	0.3353	0.9566
Hasta 3	0.5253	0.3024	0.8277
Sağlıklı 4	0.8006	0.4744	1.275
Sağlıklı 5	0.7652	0.4366	1.2015
Sağlıklı 6	0.6719	0.3869	1.0534

UYGULAMA: 6

ENFEKTELİ BİTKİLERDE SOLUNUM MİKTARININ SAPTANMASI

Bitki fizyologlarına göre bitkilerdeki solunum olayı yaşayan hücrelerdeki depo maddeleri olan karbonhidratların yükseltgenmeleri (oksidasyonları) ile hücrelerindeki kimyasal enerjinin kullanılabilir bağımsız enerji şekline dönüşmesi olayına denir.



Fotosentez arında ışık enerjisi kimyasal enerjiye dönüşmekte ve karmaşık organik moleküllerde depolanmaktadır. Bitkilerde ışık enerjisinin büyük bölümü nişasta ve glikoz gibi karbonhidratlarda depo edilmektedir. Solunum sonucu karbonhidratların C bağlarının gevşetilmesi yada kırılması sonucu bitki tarafından kullanılabilir hale ve önemli miktarda enerji bağımsız hale geçer. Enerjinin açığa çıkması enzimler tarafından kontrol edilen bir seri tepkimeler sonucunda gerçekleşmektedir.

Hiç süpürsüz bitkinin fotosentez ve solunumunda hastalıklar nedeniyle birtakım aksaklıklar ortaya çıkacak ve bitki gelişimi olumsuz yönde etkilenecektir.

Solunumun Ölçülmesi:

Solunum oranının ölçülmesinde kullanılan yöntemlerin çoğu açığa çıkarılan CO_2 nin ya da absorbe edilen O_2 nin miktarının belirlenmesi ilkesine dayanır. Bitkiler tarafından kullanılan O_2 ve ortama verilen CO_2 miktarı iki yolla saptanır.

1. Manometrik olarak (Hacim sabit tutulmak koşulu ile basıncıdaki artış ve azalış saptanır)
2. Volumetrik olarak (Basıncı sabit tutulmak koşulu ile hacimdeki artış ve azalış saptanır.)

Deney süresince ortamdan alınan O_2 veya ortamda gelişen CO_2 gazına bağlı olarak basınç değişimi nedeniyle kapılar sistemdeki sıvı yükselir ve alçalır. Kapılar sisteminde okunan değerlerden gaz hacminde meydana gelen değişikliği hesaplayabilmek için, deney kabının hacminin deney kabına bağlı manometre hacminin bilinmesi gerekir. Manometredeki hacim işaretli noktaya kadar kabul edilmesi gerekir. Manometredeki hacim bu nedenle deney başlamadan önce sağ kapiller sütündeki brodie çözeltisi seviyesi 0 noktasına yani 150 mm ye ayarlanmalıdır. Kapların hacimleri ölçülmüş ve cam tıkaçların üzerine yazılmıştır.

Tek gazın ortamdan alınması veya ortamda gelişmesi halinde gazın hacmi ölçülen basınç değişimine göre aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$x = k \cdot h$$

x= Harcanan O₂ ml

h= Seviye farkı (mm) Deney kabı içinde değişen basınç sol taraftaki sitede okunan değer.

$$k = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f - \alpha}{P_0}$$

k : Deney kabı sabitesi

V_g : Sistemdeki gaz hacimleri toplamı (ml)

V_f : Sıvı madde hacimleri toplamı

V_m : Manometrenin 150 ile işaretli noktasına kadar olan hacmi(ml)

V_{g₁} : Warburg kabının hacmi (ml)

T : Mutlak sıcaklık (°K; Kelvin) °K= 273+ t°

t : Deneyin yapıldığı sıcaklık

α : Absorbsiyon sabit sayısı (Bu sabit sayı deney kabı içindeki gazın aynı kapta bulunan sıvı içinde normal basınç altında ve belli bir mola çözünürlüğünü gösteren sayıdır. 25°C de O₂ için 0.0283 ttr.

P₀ : Normal Hava Basıncı (760 mm-76 cm Hg sitede)

V_g : V_{g₁}+V_m-V_f

$$x = h \cdot \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f - \alpha}{P_0}$$

$$x = h \cdot \frac{(V_{g_1} + V_m - V_f) \cdot \frac{273}{T} + V_f - \alpha}{P_0}$$

Manometrik olarak ortamdan alınan veya ortama verilen gaz miktarının ölçülmesi, Warburg aleti ile olur. Standart olarak imal edilmiş kapların hacimleri ortalama 10-17 ml arasındadır. Deney kabındaki kol şeklindeki çıkıntı 1 veya 2 adet olup deney başlangıcında deney kabının esas bölmelerine aktarılacak çözeltilerin konması içindir. Bu kollar cam tıkaçlar ile kapatılabilir. Cam tıkaçlar üzerinde deney kabı ile havanın bağlantısını sağlayan ince oluklar vardır. Cam tıkaçların deney kabı kolu üzerine konup çevrilmesi ile oluklar kapanabilir. Deney kabının ortasında bulunan silindirik bölme NaOH veya KOH çözeltilerinin gerektiğinde konulması içindir. Bu maddeler özellikle O₂ tüketimini ölçmek istendiğinde ortamdaki CO₂ gazının absorpsiyonu için gereklidir.

Bugün geliştirilmiş manometrelerde manometre kısmı içinde 2 kapillar borunun (sağ kapalı, sisteme bağlı. Sol açık, hava geçiyor) borunun geçtiği, taksimatlı bir cam çubuktur. Bu iki kapillar sütun manometresinin altında, lastikten yapılmış bir Brodie reserve kabında birleşik kap sistemi oluşturmaktadır. Manometre sıvısı olarak Brodie çözeltisi kullanılır. (Çöz. yoğunluğu $d= 1.033 \text{ g/cm}^3$) $P_0 = 10.000$

Brodie Çözeltisi:

23 g NaCl

5 g Na-Chole ate

500 ml saf su

Brodie çözeltisinin kapillar sistemdeki seviyesi, lastik borudaki ısıtılma vidası ile ayulandır. Warburg deney kapları lastik halkalar veya çelik yaylar vasıtasıyla manometrik cam borulara bağlanır. Bu şekilde hazırlanan manometre sistemi belli sıcaklıkta bulunan Warburg aletinin su banyosuna (25°C) yerleştirilir.

Materyal :

Hastalıklı ve sağlıklı bitki yaprakları, 0.1 M pH=6-7 fosfat buffer çözeltisi, % 10 luk KOH çözeltisi, manometre, saf su, brodie çözeltisi, vâzelin.

Metod :

Erfekteli ve sağlıklı bitki yapraklarından 200 mg alınır. 2-3 mm^2 parçalar halinde kesilir. Warburg kaplarına yerleştirilir. Üzerine 0.1 M fosfat buffer çözeltisinden 2 ml konur. Orta silindire % 10'luk KOH çözeltisinden 0.2 ml konular. Warburg kapları manometreye yerleştirilir. (KOH taze hazırlanmış olmalıdır)

Manometre 25°C deki su banyosuna yerleştirilir. Alet su banyosunun ısısının istenilen düzeyde olması için 30 dak. önceden ısıtılır.) Alet 15 dak. ventilleri açık olarak kendi halinde salınma bırakılır. Sonra ventiller kapanır ve sağ kapillar sütun 150 mm seviyesine ayarlanır sol sütundaki değer okunur. Daha sonra 15 dak. aralıkla 2 saat süre ile okuma yapılır. Denemenin sonunda ventiller açılıp manometreler su banyosundan alınır. Örnekler kaplardan alınarak 105°C deki kurutma fırınında sabit ağırlığa gelinceye dek kurutulur. Değerlendirme $\mu\text{g O}_2/\mu\text{g}$ kuru ağırlık/saat esasına dayanarak yapılır.

Bir manometre de bitki örneği içermeyen sadece fosfat bufferin ölçümü yapılır.

UYGULAMA: 7

TÜM PROTEİN VE PROTEİN OLMAYAN N TAYİNİ

Materyal :

3 gr yaş bitki yaprağı, 0.1 M fosfat buffer, (pH:6), % 10 luk TCA(triklorasetikası), 10 N H₂SO₄, H₂O₂, Nessler çözeltisi, 2N NaOH, amonyum sülfat, havan, havaneli, tülbent, spektrofotometre, santrifüj.

Nessler Ayracının Hazırlanışı :

10 g KI 10 ml suda çözülür ve üzerine yavaş yavaş karıştırarak doymuş HgCl₂ çözeltisi kırmızı çökelti oluşuncaya kadar ilave edilir. Buna çok seyrek (60 ml su+30 g KOH) KOH ilave edilir. Sonra 1 ml doymuş HgCl₂ ilave edilir. 200 ml'ye seyreltilir, bir süre bekletilir üstteki berrak kısmı alınır.

Metod :

Bitki örneği (3 gr) 15 ml 0.1 M fosfat buffer (pH=6) ile +4°C de havanda ezilir. Elde edilen bitki sıvısı çift katlı tülbentten süzülerek santrifüj tüplerine alınır.

1 ml ekstrakta 1 ml %10 luk TCA karıştırılır. Bir gece bekletilir, daha sonra 20 dak. süre ile 7000 rpm de santrifüj yapılır. Üste kalan sıvıdan proteine bağlı olmayan N tayini, çökelen kısımdan ise proteine bağlı N miktarı tespit edilir.

TCA ile çöktürülmemiş sıvıdan ayrıca tüm N miktarı bulunmuştur. Bu organik substrat 4 ml 10N H₂SO₄ ile önceden 75°C de bir parça H₂O₂ (0.1 ml) ilavesi ile renksiz hale gelene dek kaynatılır.

Bu şekilde muamele edilen ekstrakt 1/10, 1/50 ve 1/100 oranında destile su ile seyreltilir. Toplam hacim 5 ml olacak şekilde ayarlanır.

Bu ekstraktlardan 2 ml alınıp, 2 ml nessler çözeltisi ile karıştırılır. Buna ilaveten 3 ml 2N NaOH ilave edilir, 20 dak. oda sıcaklığında tınsulur, sonra 490 nm dalga boyunda ölçülür.

Karşılaştırma ölçümü amonyum sülfat ile yapılır.

Kaynak :

Johnson (1941). A manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism manometric techniques sf.208-209.

UYGULAMA :8

BÜRET-FOLİN PROTEİN BELİRLEME METODU

Ayırıcılar :

- A: 0.1N sodyum hidroksit içinde %2 sodyum karbonat
- B: %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- C: %2 Na veya K tartar asidi tuzu
- D: B ve C nin 1:1 oranında karıştırılıp, sonra bu solüsyondan 1 ml alınıp 50 ml lik A ayıracağına eklenmesiyle elde edilen ayıracağı.
- Bir günden sonra kullanılmaz.
- E: 1.0 N Folin-Ciocalteu ayıracağı

Metod :

1. Numune ölçüsü : Son hacim 0.5 ml dir. Numuneye eklenen su miktarı numunedeki protein miktarına bağlıdır.

Numunesiz (boş): 0.5 ml H_2O

2. 2.5 ml D ayıracağı eklenir, iyice karıştırılır ve 10 dakika veya daha fazla bir süre beklemeye bırakılır.
3. 0.25 ml E ayıracağı eklenir ve hemen karıştırılır.
4. 30 dakika veya daha fazla süre sonra 750nm veya 500nm da (Spectronic 20) okunur.

Standartlar: Kullanım genişliği, 10-200 $\mu\text{g/ml}$ dir.

Kaynak :

Lowry et al 1951. J.Biol.Chem, 193: 265-275.

UYGULAMA :9

P- NİTROPHENOL ESTER HYDROLASE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Materyal :

1. 3.7 µg/ml Triton X-100 içeren, PH sı 8.0 olan 0.1 M phosphate buffer
2. Yukarıdaki buffer içinde 8.0 mM p-nitrophenol butyrate (molekül ağırlığı=209.2)
3. Küçük test tüpleri veya bir defa kullanıldıktan sonra atılan uygun plastik küvetler
4. 1.0 ml lik pipetler

Metod :

Her bir test numunesi için küvette veya küçük test tüplerinde aşağıdaki tepkime karışımları hazırlanır;

- 0.5 ml test solüsyonu (veya referans için distile su)
- 0.5 ml p-nitrophenol butyrate

Yukarıdaki tepkime karışımlarının absorbans derecesi 420 nm da Beckman CIII aletinde sürekli olarak veya 30,60,90 dakika gibi belli zaman aralıklarında belirlenebilir.

Sonuçlar :

Enzim aktivitesi salınan Mmoles p-nitrophenol/dakika olarak belirtilir. p-nitrophenol miktarı bir seri p-nitrophenol konsantrasyonu hazırlayarak ve 420 nm daki absorbans değeri belirlenir (Tab.1)

Eğer protein tesbiti test solüsyonunda yapılırsa, sonuçlar Mmoles/dakika/mg protein olarak belirtilir.

Tab.1: p-nitrophenol konsantrasyonu ve 420 nm daki absorbans değerleri arasındaki ilişki

p-nitrophenol Mmol	420 nm daki absorbans değerleri
500	1.94
250	1.93
100	1.21
50	0.59
25	0.32
10	0.13

Kaynak :

Purdy, R.E., and P.E. Kolattukudy. 1973. Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. *pinii*: Isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 159:61-68.

UYGULAMA :10

SPESİFİK OLMAYAN ELİCİTÖR (ortaya çıkarıcı=ayırıcı) PROTEİN MİKTARININ SAPTANMASI

Giriş :

Bio-Rad Protein testi bir boyanın proteinlere bağlanmasına dayandırılmaktadır. Bu olduğunda maksimum absorpsiyon dalga uzunluğunda protein konsantrasyonunu saptamaya imkan verecek şekilde 465 nm den, 595 nm ye doğru bir değişime olmaktadır. Bio-rad protein test kit i önceden test edilmiş konsantrasyon boyası ayırıcı ve standart bir protein çözünürlüğü içermektedir. Standart protein çözünürlüğü boyanın işleyişini sağlar ve daha spesifik bir protein standardı elde olmadığında kullanılır.

Ayırıcı hazırlanması :

Boya ayırıcı 5 katlı bir konsantrasyon şeklinde elde edilir. Kullanmadan önce seyreltilmeli ve filtre edilmelidir. 1 hacim konsantrasyon boyayı 4 hacim yüksek kaliteli distile su ile seyreltin. Whatman No 1 veya eşdeğer bir kağıttan geçirin ve seyreltik ayırıcı bir cam kaptan oda sıcaklığında depolayın. 2 hafta sonra boya ayırıcı kullanılmayın atın. Konsantrasyon boyası ayırıcı için optimum depolama sıcaklığı 4 C° dir.

*Not: Zamanla seyreltik ayırıcı yavaş yavaş bir çökelti oluşturur ve bu yüzden 2 hafta içinde yararlanılacak miktarlarda seyreltmek en iyisidir. Eski seyreltik ayırıcı tekrar filtre edilebilir ve kullanılabilirken, yüksek protein düzeylerinde bir doğrusal duyarlılık kaybı meydana gelebilir.

Protein standardı :

Kit de elde edilen Bio-rad Protein Standardı lyofilize ağır globulinden (nitrojen altında etiketlenmiş (örtülmüş) olur.

Tekrar bileşik oluşturmak için yaklaşık 1.4 µg/ml'lik bir konsantrasyon elde edecek şekilde 20.0 ml distile su ilave et. (Tam konsantrasyon için Protein Standard etiketine bak). Tekrar hidrasyona tabi tutulmuş proteini 4 C° de 60 güne kadar depola. Ayırıcının tek tek (bireysel) proteinlere olan spesifik hassasiyeti değişeceği için, kullanımı aşısına izin verilecek örnekler çok yaklaşan bir karışım veya saflaştırılmış bir preparasyondan kendi protein standardını üretmek isteyecektir.

Eğer böyle oluruz testte 0.1-1.0 OD birimlerden bir OD 595 duyarlılığı meydana getiren standartların kullanılması gerekir.

Tavsiye edilen seyreltme bufferi :

Birçok örnek seyreltme gerektirdiğinden, Bio-rad, örnek ve standartın seyreltilmesi için bir fizyolojik buffer tuz solüsyonu kullanmayı önermektedir.

Tuzlu Fosfat Tampon :

6.8 g KH_2PO_4 ı yaklaşık 600 ml suda çözün. 8.76 g sodyum klorit ekleyin. Bir konsantr KOH solüsyonu ile pH. 7.2 ye ayarlayın. 1000 ml ye seyreltin. 0.1 gr NaN_3 koruyucu olarak eklenebilir.

Standart test işlemi:

0.2 den 1.4 mg/ml ye kadar Bio-rad protein standardı içeren birkaç dilüsyon hazırlayın.

1. 0.1 ml standartları yerleştirin ve bilinmeyenleri temiz, kuru test tüplerinde yaklaşık olarak seyreltin.

2. 5.0 ml seyreltik boya ayıracı ekleyin.

3. Vortex (Ağır köpüklerden sakın).

4. 5 dakikadan 1 saate kadar olan bir periyottan sonra OD595 ayırac başlığına ölçün.

5. Standartların OD595 konsantrasyonunun grafiklerini çizin. Bilinmeyenleri standart kurveden okuyun.

Uyarı : Konsantr boya ayıracı fosforikasit ve metanol içermektedir. Bu yüzden dikkatli kullanılmalıdır.

Not : Küvetler üzerinde oluşan mavi renk metanolle kolaylıkla ortadan kaldırılabilir.

Mikrotest Yöntemi :

5µl/ml veya daha az protein konsantrasyonları 0.8 ml örnekleri konsantr 0.2 ml boya ayıracı eklenerek miktar tespiti yapılabilir. Bu test bu şekilde genişletildiğinde iyonik güç, pH ve deterjanların rekabeti oransal olarak büyük olduğundan şiddetli olabilir.

UYGULAMA :11

İNDİRGEN ŞEKERLER İÇİN D.N.S. TESTİ KULLANILARAK POLİGALAKTRONAZ DENEMESİ

Materyal :

- Poligalakturonaz (Polylgalacturonase) (süzülmüş kültür ya da ticari enzim)
- Sodyum polipektat (sodium polypectate)
- Dinitrosalisilik asit (Dinitrosalicylic acid)
- Fenol (Phenol)
- Potasyum sodyum tartarat (Potassium sodium tartrate)
- Sodyum hidroksit (sodium hydroxide)
- Sodyum bisülfid (Sodium bisulphite)
- Test tüpleri (geniş)
- Spektrofotometre ("Spectronic 20")

İşlem :

A. Sodyum polipektat solusyonunun hazırlanması.

1. 1,4 grm sodyum polipektat, karıştırıcı (Waring Blender) içindeki 100 ml sıcak destile suya eklenir.
2. 40 ml sodyum polipektat solusyonunu 40 ml destile su pH sı 4.5 olan 10 ml 0.5M sitrat tamponuna eklenir.

B. DNS solusyonunun hazırlanması.

1. Solusyon A: 300 ml, %4,5 luk NaOH (W/V) de 880 ml % 1 lik (W/V) dinitrosalisilik asit ve 255 g Rochelle tuzu (Potasyum sodyum tartarat) eklenir.
2. Solusyon B: 10 g kristal fenol (karbolik asit)e % 10 luk (W/V) 22 ml NaOH eklenir. 100 ml ye kadar nulanır ve karıştırılır.
3. 69 ml solusyon B ye 6.9 g sodyum bisülfid eklenir. Bu solusyon ise solusyon A ya eklenir. Bütün Rochelle tuzu eriyene kadar iyice karıştırılır. Şişelere doldurularak, sıkıca tıplanarak muhafaza edilir. Solusyon 1 yıl süre ile muhafaza edilir.

C. Deneme :

1. 4.5 ml sodyum polipektat solusyonu bir seri eğlenmiş tüblere konur.
2. 1.tübe 0.5 ml inaktivlanmış enzim solusyonu eklenir.
3. 2.tübe 0.5 ml ısıtılmış (15 dak. 121°C de) enzim eklenir.
4. 3.tübe 0.5 ml steril kültür ortamı eklenir (sadece saf oluşturan enzim kullanırsa).
5. 4.tübe 0.5 ml distile su eklenir(1-5.safhalar çift yapılır).
6. Her tüpten 1 ml ayrılır ve azalan grupların başlangıç seviyesi için kontrol amacıyla DNS belirteci (reagent) (aşağıya bakınız) yerleştirilir.
7. Tüpler 1 yada 2 saat (enzim aktivitesine bağlı olarak) 30°C de inkube edilirler.
8. Her enzim substrat tüpünden 1 ml alınır ve 3 ml DNS solusyonu içeren geniş test tüpüne eklenir.
9. Karıştırmak için 30° lik bir açıyla sallanır (çalkalanır).
10. Tüpler 5 dakika süreyle kaynatılır suya daldırılır ve daha sonra buz banyosunda soğutulur.
11. 25 ml ye kadar sulandırılır (seyreltilir) ve boş (açık) olarak otoklavlanmış enzim substratının kullanılmasıyla fotoreaktometrede (photocolorimeter) 575 mμ da yüzde geçirgenlik tesbit edilir.

D. Standart Glikoz Eğrisi

1. 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml ve 0.125 mg/ml glikoz içeren su solusyonları hazırlanır.
2. DNS belirteci (reagent) her solusyonun 1 ml eklenerek yapılmış denemeye iletilenir ve enzim denemesi ile olduğu gibi tanımlanır, 575 mμ da yüzde geçirgenlik tesbit edilir.

Sonuçlar :

1. Glikoz standartlarında mg glikoz/ml e karşı geçirgenliğin bir eğrisi çizilir.
2. Test solusyonlarının azalan gücü (x) mg glikoz olarak ifade edilir.

$$X = \frac{Y-100}{-c}$$

Y= Test solusyonunun geçirgenliği

C= (Glikoz konsantrasyonunda geçirgenlik/mg değişim yüzdesindeki) ytk.

Kaynak :

1. Stinner, J.B., and G.F. Somers. 1949. Laboratory experiments in biological chemistry, p. 38-39. Academic Press, Inc. New York.

UYGULAMA: 12

İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ (Thin Layer Chromatography -TLC)

Fiziksel adsorbtüyon esasına dayanır. Maddeleri birbirinden ayırma tekniklerinden biridir. Şekerlerin, aminoasitlerin, hormon tabiatlı bileşiklerin, toksik maddelerin, phytoalexinlerin vs. tanımında kullanılabilir. Kuantitatif tayinlerde de kullanılabilirse de TLC metodu ile yapılan miktar tayinlerinin çok hassas olduğu söylenemez. Fakat diğer metotlara göre çok daha pratik olması nedeniyle tercih edilmektedir.

Şeker Analizi için Tabakaların Hazırlanışı :

10 adet tabakayı kaplamak için 60 g silica gel tartılır. 120 ml sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{-COONa}$) konup bulamaç haline getirilir. Şeker analizlerinde tabaka hazırlanırken 0.02 M sodyum asetat kullanılır, diğer durumlarda silica-gel su kullanarak bulamaç haline getirilir. Hazırlanan bulamaç TLC tabaka dökmeye setine konular. 20X20 cm lik özel TLC cam plakaları bu setin altından geçirilerek silica-gel ile kaplanır.(Yaklaşık 0,25 mm kalınlıkta)

Tabakalar bir süre havada kurutulduktan sonra 110°C sıcaklıktaki fırında 30 dakika tutulur. Bu işlem tabakaların aktif hale geçmesi içindir. Bu şekilde hazırlanan tabakalar şeker analizlerine hazır hale gelmiştir.

0.02 M 250 ml Na-asetat su hazırlanışı:

Na asetatın mol ağırlığı:	136.208 g
1 lit de	136,08 g çözülürse 1 mol
x	0.02 Mol

x= 2.7216 g 1 lit suya tartılıp konular
250 ml suya 0.7 g tartılıp konular.

Bu şekilde hazırlanan tabakalar üzerine mikropipetle hastalıklı ve sağlıklı bitki ekstraktları tabaka üzerine sıralarını kaydederek konular. Karşılaştırma için % 0.5 ve %1 oranında sakkaroz kullanılır ve tabakalara yerleştirilir. Daha sonra bu tabakaların kenarına özel kesilmiş karton yerleştirilir. Bunun amacı tabakanın üzerine kapatılan cam plakanın tabaka üzerine temasını engellemektir. Tabakaların özel kâvetin içine konmadan önce 5-10 dak.tutularak suyunun uçmasını sağlanır.

Tabakaları koyacağımız kâvetin içine 60 ml kloroform+ 40 ml metanol den oluşan bir çözücü konular ve tabakalar kâvetin içine daldırılır. Tabakaların özel kâkaç ve destekler ile dik olarak durması sağlanır. Sonra çözücünün 10 cm seviyeye yükselmesi beklenir. Çözücü yukarıya doğru çıkarken koyduğumuz maddeleri de taşıyacaktır.

Cözelti seviyesi 10 cm kadar yükselmiş tabakalara 1,5 gr fenol, 2,5 ml H_2SO_4 ve 47,5 ml etil alkolden oluşan karışım püskürtülür. H_2SO_4 çukurları yakar. Böylece peker olan bölgede renkte koyulaşma görülür. Bu tabakalar karışım püskürtüldükten sonra $110^{\circ}C$ de 10 dak. tutularak aktifleşmesi sağlanır.

- 1 no % 0,5 Glükoz
- 2 no % 1 "
- 3 no Suşları a
- 4 no Hasta b
- 5 no Sağları b
- 6 no Hasta a
- 7 no Hasta a
- 8 no Hasta b
- 9 no Sağları a
- 10 no % 0,5 Sakkaroz
- 11 no % 1 "

UYGULAMA :13

ELEKTROFOREZ METODU

Çeşitli elektroforez yöntemleri vardır.

1. Kolon elektroforezi
2. İnce tabaka elektroforezi.

1. Kolon Elektroforezi.

Yukarıdaki sistemi (-) değerli elektroda elektrik akımı, aşağıdakine ise (+) değerli bir elektroda elektrik akımı verilir. Kolon sayısı 18 dir. Kolona konan jellerin porları vardır. Bu porların çapları değişebilir. Bu porlardan elektronlar geçerler ve geçerken porlara yerleştirilen maddeleri de sürükleyeceklerdir. Bu sürüklenen maddeler molekül büyüklüklerine bağlı olarak farklı kesimlerde kalırlar. Taşıma yukarıdan (-) aşağıya (+) doğru olur.

Araştırılan maddelere göre değişik boyular vardır. Bunlar sayesinde taşınan maddelerin görünürlüğü sağlanır. Doğru akım güç kaynağı ile akım ayarlanır. Alette 18 tüp olduğunda aynıuç 18 e bölünerek 1 tüpteki akım şiddeti bulunur.

2. İnce Tabaka Elektroforezi.

Kolon elektroforezi ile sistem olarak aynıdır. Yalnız bu yatay olarak çalışır. Burada kolon yoktur. Mikroskop lamaları gibi camlar vardır. Üzerine jeller konarak yerleştirilir. Araştıracağımız maldreyi (-) akım vereceğimiz kısma yerleştiriyoruz, (-) den (+) ya geçişle madde de taşınır ve banlar oluşur.

Materyal :

Streptococcus lactis kültürü, lizozis, etilendiamid tetra asetik asit, EDTA, Tris, Vorteks, NaOH, HCl, fenol, kloroform, izamil alkol, izopropanol, RNase, UV lamba, santrifüj,

Metod :

Anderson ve Mc Kay elektroforez yöntemine göre *Streptococcus lactis* in çekirdek dışı genetik materyalinin (plazmid) ayrılması sağlanmıştır.

S.lactis hücreleri sakkaroz çözeltisi içinde süspansiyon edilir (379 µL) Üzerine lizozis (% 96,5 µl) ilave edilir ve 37°C de 5 dakika tutulur. Daha sonra (etilendiamid tetra asetik asit) EDTA+ Tris ilave edilir (0.48 ML). Üzerine SDB eklenerek (227.6) 37°C de 10 dakika tutulur.

Vortekste 30 sn yüksek hızda karıştırılır. Üzerine yeni hazırlanmış 3M NaOH ilave edilir. (27,6 µl), 10 dakika ara ile karıştırıldıktan sonra 2 M tris HCl ilave edilip (49,6 µl), 3 dakika karıştırılır. Bu karışıma 5 M sodyumklorür (NaCl) ilave edilir (71,7 µl), % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol katılır (700 µl) ve 5000 rpm de 5 dakika sentrifüj edilir. Üst faz alınır ve kloroform izamil alkol ile yeniden ekstrakte edilir (700 µl). İzopropanol ile 1/1 oranında seyreltilir ve 15.000 rpm de 10 dakika sentrifüjlenerek alkol uzaklaştırılır. Daha sonra tris EDTA içinde çözülür. RNase A ile inaktivite edildikten (2 µl) sonra 37°C de 30 dakika tutulur. Üzerine marker boyası ilave edilir (2 µl). Son olarak 25 ml jele yüklenir ve 100 V da 3 saat yürütülerek UV ışıkta gözlem yapılır.

UYGULAMA: 14

POLYGALAKTRONASE İÇİN VİSKOMETRİK DENEY

Materyal :

Sabit sıcaklıkta su banyosu
Elektrikli karıştırıcı (su banyosu için)
Oswald-Fenske viskozite pipetleri için tutucu
Oswald-Fenske viskozimetre (sıze 300)
Zaman saati
Mezür 10 ve 250 ml
Erlen 250,500 ve 1000 ml
Pipet, 1 ve 3 ml
Test tüpleri, 20 ml
Waring Blender
Sodyum polipektat
Ticari veya patrijen polygalactronase
Aseton
Sodyum hidroksit
Sitrik asit
Sülfürik asit
Toluene

Metod :

Sodyum polipektat solüsyonunun hazırlanması :

Sodyum hidroksit- sitrik asit tampon solüsyonu (pH:5.0-4.5) içinde %1.2'lik sodyum polipektat solüsyonu hazırlanır.

- 0.7g NaOH ve 1.8 g sitrik asit tartılır.
- 500 ml saf suda eritilir (pH ölçülür).
- Sıcaklık 50-60 °C'ye gelince kadar ısıtılır.
- 500 ml ilik solüsyonu Waring Blender'a beşaltılır, düşük devirde çalışırken 6g Na polipektat yavaş yavaş dökülür, topraklanma kayboluncaya kadar karıştırılır (yaklaşık 2 dk).
- Solüsyon iki katlı tübentlerden süzülür.
- Solüsyon soğuduktan sonra 1 ml toluene eklenir ve hızlıca çalkalanır, ağzı kapalı erlende buzdolabında saklanır.

Poliglakturonaze solüsyonunun hazırlanması :

1. Eğer ticari enzim kullanılıyorsa 1 gr'ını 100 ml saf suda eritilir. Solüsyonu filtre edilir ve enaz 50 hacim saf suya karıştırmak üzere 2-5 °C'de 12-18 saat diyaliz edilir.
veya;

2. Poliglakturonaze, hastalıklı dokunun (*Rhizoctonia*'lı fasulye hipokotili) verilen ağırlıkta 1 hacim su içinde 2 dak. ezilerek hazırlanabilir. Ezilen kısmı sıkıştırarak sıvı kısmı tülbütten geçirilir. Sıvı fazı 5000 d/d'de 20 dak. santrifüjlenerek temizlenir. Üst sıvı yukarıdaki gibi diyaliz edilir.

Poliglakturonaze aktivite deneyi:

Denenecek her örnek içinde 2 viskozimetreyi 30 C'deki su banyosuna aynı tutulur, ve 2 pipetten her birinin içine 3 ml pektat solüsyonu çekilir.

- a) Pektat solüsyonunun su banyosu sıcaklığına erimesi için 10 -15 dak. beklenir.
- b) Her pipete 1 ml enzim eklenir, karıştırılır, reaksiyon karışımını viskozimetre içine çekilip hareketlendikten sonra boşaltılmak için viskozimetrede üst hubbocik zaman saniyeler halinde zamanı sapılarak sıfırlanır.
- c) 5 dak. aralıklarla 30 dakikadaki akış hızı ölçülür.

Her iki örnek için kontrol yapılmalıdır. Kontrol, her iki ek pipete 121 C'de 15 dak. otoklav edilmiş 1 ml enzim konarak yapılır.

Sonuçlar:

Pektinolitik aktivitenin hesaplanması :

Akış zamanı başlangıçta belirlenen aralıklarla saniyeler geçkinde ölçülür. Pektat solüsyonundaki % viskozite kaybı hesaplanır, viskozimetrede su için ortalama akış zamanı 4.5 sn. civarındadır (kesin değerler her viskozimetre için alınacaktır). Bu viskozimetre değerleri denkleme uygulanır ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$PLV_1 = \frac{E-E_2}{E-E_1} \times 100$$

PLV_1 = Viskozitedeki % kaybı

E_1 = 121 C' de 15 dak. otoklav edilmiş inaktif filtrat
içeren reaksiyon karışımının akış zamanı

E_2 = Inkubasyon süresinden (t) sonra aktif enzim içeren reaksiyon karışımının akış zamanı

E_0 = Aynı viskozimetredeki saf suyun akış zamanı



ISBN 978-402-172-7