

VFZ 202
Biyokimya II Dersi Uygulama Kitapçığı
2013

Öğrencinin;

Adı Soyadı :

Numarası :

Uygulamanın adı	Nükleik asit deneyleri
Yapılacağı hafta	1. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Nükleik asitlerde bulunan fosfat, pentoz ve pürin bazlarının varlığının gösterilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, et, triklorasetik asit, amonyum molibdat, bial ayırıcı, kırmızı turnusol kağıdı, amonyak, gümüş nitrat
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Nükleik asit deneylerinde ön işlem

Kasta nükleoproteinler halinde bulunan nükleik asitlerin gösterilebilmesi için hidroliz işlemiyle protein ve nükleik asit kurucularının ayrılması gerekir. Bunun için bir deney tüpü içerisine 0.5 g kas ve 8-10 ml triklorasetik asit (TCAA) konur ve kaynar su banyosunda 10 dakika kaynatılır.

RNA'nın hidroliz ürünleri H_3PO_4 , riboz, adenin, guanin, sitozin ve urasildir

DNA'nın hidroliz ürünleri H_3PO_4 , deoksiriboz, adenin, guanin, sitozin ve timindir.

Süzülerek çöken proteinler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen süzüntüdeki nükleik asit bileşenleri aşağıdaki testlerle gösterilir.

1- Fosfat varlığının gösterilmesi

Deneyin prensibi:

Fosfat iyonları amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat çökeleği verirler.

Deneyin yapılışı:

Bir tüpe elde edilen hidrolizattan 1 ml alınır ve üzerine 1 ml amonyum molibdat ilave edilir, kaynatılır. Oluşan sarı çökelek fosfat iyonlarının varlığını gösterir.

2-Pentoz varlığının gösterilmesi:

Deneyin prensibi:

Pentozlar kuvvetli asit ortamda ısıtıldıkları zaman furfuralleri verirler. Furfuraller de fenoller ile renkli bileşikler yaparlar. Bial ayırıcında bulunan orsinol de bir fenol türevidir. Bu reaksiyonu nükleotidlerde bulunan pentozlardan sadece riboz vermektedir.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 1 ml hidrolizat alınır. Üzerine 2 ml bial ayırıcı ilave edilir ve çıplak alevde ısıtılır. Yeşil rengin görülmesi pentoz varlığını gösterir.

Bial ayırıcı hazırlanırken 3 g orsin 1 litre yoğun HCl'de eritilir ve üzerine %1 lik $FeCl_3$ çözeltisinden 3 ml eklenir.

Pürin bazlarının gösterilmesi:**Deneyin prensibi:**

Pürin bazları gümüş tuzları ile çözünmeyen beyazımsı çökelek teşkil ederler.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 4 ml hidrolizat alınır. İçerisine bir parça kırmızı turnusol kağıdı atılır. Turnusol kağıdının rengi kırmızıdan maviye dönünceye kadar, damla amla amonyak ilave edilir. Daha sonra deney tüpüne 1-2 ml gümüş nitrat konur. Oluşan beyazımsı çökelek pürinlerin varlığını gösterir.

Uygulamanın adı	Süt deneyleri
Yapılacağı hafta	2. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Kaynamanın süte etkisini, sütün asitle pıhtılaş-tırılmasını, süt şekerinin, süt proteinlerinin varlığını göstermek ve sütte keton maddelerini aramak.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, süt, %10'luk sodyum hidroksit, yoğun NaOH %0.1 CuSO ₄ , yoğun nitrik asit, %10 sülfosalisilik asit, Rothera ayracı, yoğun amonyak.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Kaynamanın süte etkisinin gösterilmesi

Deneyin prensibi:

Proteinlerin suda çözünür şekilde bulunması su moleküllerinin dipol karakterleri ile ilgili olup su molekülleri proteinlerin ve aminoasitlerin etrafını kuşatarak(hidratize ederek) onları çözünmüş formda tutarlar. Proteinlerin çözünmüş olarak bulunduğu böyle bir çözeltiye ısı uygulanırsa, ısının vereceği enerji ile proteinleri kuşatan su molekülleri ve protein arasında şekillenen zayıf bağlar ortadan kalkar ve çözeltide bulanıklaşma görülür. Bu bulanıklaşmaya koagülasyon ya da pıhtılaşma denir.

Sütün en önemli proteini olan kazein kalsiyum kazeinat halinde olduğundan kaynatma ile pıhtılaşmaz.

Deneyin yapılışı:

Birkaç mililitre inek sütü kaynayınca kadar ısıtılır, sütün pıhtılaşmadığı görülür. Hâlbuki eşek sütü ve köpek sütü daha çok albumin ihtiva ettiklerinden dolayı kaynatılınca pıhtılaşır.

Moore deneyi:

Deneyin prensibi:

Alkali ortamda ısı etkisiyle şekerin 1 ve 2 numaralı karbonları arasında yeniden tertiplenme ile redükleyici özellikte sarı renkli di-enol gruplarının teşekkülü esasına dayanır.

Deneyin yapılışı:

2 ml süt, 1 ml %10'luk NaOH ile karıştırılıp ısıtılırsa sarı renk oluşur. Bu sonuç bize sütte şeker bulunduğunu gösterir.

Sütte bulunan tek karbonhidrat laktozdur. Laktoz meme dokusunda glikozdan sentezlenir. Emilen laktozun hidrolizi galaktoz ve glikozu verir.

Sütte laktalbumin laktoglobulin varlığının gösterilmesi

Deneyin prensibi:

Proteinlerin üç boyutlu yapısındaki bozukluklar, proteinlerin çözünürlüklerinin kaybolmasına neden olurlar (denaturasyon). Bu nedenle berrak bir protein çözeltisi organik çözücüler, asitler v.b. tarafından denatüre edilerek çöktürülebilir.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 4-5 ml süt, üzerine 4-5 ml su ilave edilerek karıştırılır. Üzerine damla damla asetik asit ilave edilirse kazein çöker. Bu karışım süzülür, elde edilen filtratla şu deneyler yapılır.

- a) **Biüret deneyi:** Süzüntüden 1 ml alınır, üzerine 1 ml yoğun NaOH çözeltisi ilave edilip karıştırılır. Devamlı çalkalanarak damla damla %0.1 lik CuSO_4 çözeltisi ilave edilirse menekşe renk görülür.
- b) **Heler halka deneyi:** Bir deney tüpüne yaklaşık 2 ml süzüntü alınır ve nitrik asitle tabaka yaptırılır. İki sıvının birbirine değdiği yerde beyaz bir halka oluşur.
- c) **Sülfosalisilik asit testi:** Birkaç mililitre süzüntü üzerine %10'luk sülfosalisik asitten birkaç damla ilave edilirse beyaz bir tortu oluşur.
- d) **Kaynatma deneyi:** Süzüntüden birkaç mililitre alınır ve kaynatılırsa bir bulanıklaşma görülür.

Sütte keton maddelerinin aranması:

Ketozis bir metabolizma bozukluğu olup, evcil hayvanlardan en çok yüksek verimli süt ineklerinde ve gebe koyunlarda görülür. Seyrek olarak da şeker hastalıklı köpeklerde de görülebilir. Açlıkta, fazla yağlı beslenmede, hepatitte, karaciğer sirozunda, ilerlemiş dolaşım bozukluklarında, endokrin bozukluklarda, değişik derece ketozis görülebilir. Ketozisin tanısında sütte keton maddelerinin varlığının ortaya konmasının pratik önemi vardır. Bunun için Rothera testi (Nitroprussid deneyi) yapılır.

Rothera testi (Nitroprussid deneyi)

Deneyin prensibi:

Keton maddelerinin izonitro bileşiği ile ferropentosiyanyür, ya da izonitroamin türevleri ile benzer bileşikler oluşturması esasına dayanır. Üç keton maddesinden Beta hidroksibütirik asit nitroprussid ile reaksiyona girmez. Test büyük oranda asetoasetik asite, daha az oranda da asetona bağlı olarak çalışır.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 1 g kadar Rothera ayıracı (nitroprussid karışımı) ve 3-4 ml süt alınıp karıştırıldıktan sonra 1 ml yoğun amonyak ilave edilir. Belirgin pembe veya menekşe rengin oluşumu sütte keton bulunduğunu gösterir.

Rothera ayıracı hazırlanırken, 1 g sodyum nitroprussid ve 100 g amonyum sülfat bir havan içerisinde karıştırılarak dövülür.

Uygulamanın adı	Yumurta deneyleri
Yapılacağı hafta	3. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Yumurta kabuğundaki kalsiyumun ve yumurta zarında protein varlığının gösterilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, yumurta kabuğu, seyreltik HCl, amonyak, %4 lük amonyum okzalat, yumurta zarı, yoğun nitrik asit, yoğun amonyak.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Yumurta kabuğunda kalsiyumun gösterilmesi:

Yumurta kabuğu esas olarak bir protein matriksinde depolanmış kalsiyum karbonattan meydana gelmiştir.

Deneyin prensibi:

Kabuktaki kalsiyum karbonat hidroklorik asitle muamele edilirse karbondioksit çıkışı olur. Geride kalan kalsiyum nötr ortamda amonyum okzalat ile erimez kalsiyum okzalattı oluşturur. Bu da beyaz tortu olarak gözlenir.

Deneyin yapılışı:

Yumurta kabuğunun küçük bir parçası bir deney tüpüne konur ve üzerine seyreltik HCl ilave edilir ve CaCO_3 'den CO_2 çıkışı sağlanır. Kaynayan su banyosunda tutularak bütün mineral maddenin çözünmesi sağlanır. Çözelti amonyakla nötralize edildikten sonra üzerine %4'lük amonyum okzalat ilave edilirse kalsiyum okzalattan ibaret beyaz bir tortunun oluşması bize yumurta kabuğunda kalsiyumun varlığını gösterir.

Yumurta zarında protein varlığının gösterilmesi

Ksantoprotein deneyi:

Deneyin prensibi:

Aromatik halka taşıyan bileşikler nitrik asitle sarı renkli nitro veya nitrozo bileşiklerini oluştururlar. Bu sarı renk alkali ortamda daha da koyulaşır. Fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitleri benzen halkası içeren bileşikler (aromatik bileşikler) olduklarından bu aminoasitler ile bunları yapısında bulunduran proteinler bu deneyi verirler.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne bir parça yumurta zarı alınır, üzerine 1 ml yoğun nitrik asit ilave edilir ve 2 dakika kaynatıldıktan sonra soğutulur. Daha sonra yoğun amonyakla tabaka yaptırılır. Sıvıların temas yüzeyinde portakal renkli bir halkanın oluşması sonucun pozitif olduğunu gösterir.

Uygulamanın adı	Yapağı deneyleri
Yapılacağı hafta	4. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Yapağıda protein ve kükürt aranması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, yapağı, yoğun nitrik asit, yoğun amonyak, %10'luk NaOH, %0.1'lik bakır sülfat
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Yapağının protein ve kükürt yönünden analizi

Yapağı üzerine bir miktar 2 N NaOH ilave edilir ve kaynar su banyosunda tutularak yapağının çözünmesi sağlanır. Bu çözelti üzerinde aşağıdaki deneyler uygulanır.

1. Protein aranması:

Yapağı çözeltisinde Ksantoprotein ve Biüret deneyleri yapılır.

a) Ksantoprotein deneyi:

Deneyin prensibi: Aromatik halka taşıyan bileşikler nitrik asitle sarı renkli nitro veya nitrozo bileşiklerini oluştururlar. Bu sarı renk alkali ortamda daha da koyulaşır. Fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitleri benzen halkası içeren bileşikler (aromatik bileşikler) olduklarından bu aminoasitler ile bunları yapısında bulunduran proteinler bu deneyi verirler.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 1 ml yapağı çözeltisi alınır, üzerine 1 ml yoğun nitrik asit ilave edilir ve 2 dakika kaynatıldıktan sonra soğutulur. Daha sonra yoğun amonyakla tabaka yaptırılır. Sıvıların temas yüzeyinde portakal renkli bir halkanın oluşması sonucun pozitif olduğunu gösterir.

b) Biüret deneyi:

Deneyin prensibi:

Bakır sülfat iki ya da daha fazla peptid bağı taşıyan bileşiklerle alkali ortama reaksiyona girerek menekşe renkli kompleks oluşturur (Biüret kompleksi).

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 2 N NaOH'de çözünmüş yapağı çözeltisinden 1 ml alınır ve çalkalamak suretiyle damla damla bakır sülfat çözeltisi ilave edilirse menekşe renk görülür.

Uygulamanın adı	Kemik Deneyleri
Yapılacağı hafta	5. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Kemikte kalsiyum ve fosfor aranması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, kemik, 2 N HCl, yoğun amonyak, %4'lük amonyum okzalat, yoğun nitrik asit, yoğun amonyak, filtre kağıdı.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Kemik ekstraktının hazırlanması

Bir beher içerisine 2-3 küçük kemik parçası alınır ve bunların üzerini örtecek kadar 2 N HCl konur. Su banyosunda 30 dk ısıtılır. Buharlaştıran asit kadar yerine distile su ilave edilir. 30 dakika sonra filtre edilir.

Kalsiyum aranması:

Deneyin prensibi:

Kemik ekstraktında bulunan kalsiyum nötr ortamda amonyum okzalat ile erimez kalsiyum okzalatı oluşturur.

Deneyin yapılışı:

Bir deney tüpüne 2 ml asitli kemik ekstraktından alınır ve amonyakla nötralize edildikten sonra üzerine %4'lük amonyum okzalat ilave edilirse kalsiyum okzalattan ibaret beyaz bir tortunun oluşması bize yumurta kabuğunda kalsiyumun varlığını gösterir.

Protein aranması:

Kemik ekstraktı kullanılarak daha önce uygulanan ksantoprotein deneyi tekrarlanır.

Uygulamanın adı	İdrarın fiziksel muayenesi
Yapılacağı hafta	6. hafta
Uygulamanın temel hedefi	İdrarı fiziksel özelliklerine bakarak incelemek
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, idrar, idrar kabı,dansitometre.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Uygulamanın adı	İdrarda protein aranması
Yapılacağı hafta	7. hafta
Uygulamanın temel hedefi	Değişik deneylerden yararlanarak idrarda protein varlığını belirlemek.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Cam malzeme, idrar, %20'lik sülfosalisilik asit, %20'lik triklorasetik asit, konsantre nitrik asit, Esbach ayırıcı, filtre kağıdı.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

İdrarda protein görülmesine proteinüri (albuminüri) denir. Proteinüri fonksiyonel ve organik olmak üzere iki türdür.

a)Fonksiyonel proteinüri: Aşırı kas faaliyetleri, konvülziyonlar, gebelik ve doğum gibi fizyolojik durumlar, stres, uzun süreli zihinsel yorgunluk, uzun yürüyüş ve yolculuklar, proteinli besinlerin fazla alınması proteinüriye neden olabilir.

b)Organik proteinüri:

- 1- Prerenal Proteinüri: Kardiyovasküler albuminüri, febril albuminüri, toksik albuminüri, nörotik albuminüri v.b. çeşitleri vardır.
- 2- Renal Proteinüri: Çeşitli böbrek hastalıkları, asidozis, travma, tümoral oluşumlar, renal proteinüri sebeplerindendir.
- 3- Postrenal proteinüri: Piyelitis, üreteritis, sistitis, prostatitis gibi sebeplerle oluşur.

İdrarda protein arama deneyleri

1-Sülfosalisilik asit ile idrarda protein aranması:

Deneyin prensibi: Proteinlerdeki serbest amino grupları ile sülfosalisilik asit arasında suda çözünmeyen protein-sülfosalisilat bileşiği oluşur.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünün 2/3'sine kadar idrar konur. Bunun üzerine %20'lik sülfosalisilik asitten damla damla eklenir. Tüpteki idrarda bir bulanıklık oluşması idrarda protein bulunduğunu gösterir.

2- Triklorasetik asit (TCA) ile idrarda protein aranması:

Deneyin prensibi: Proteinlerdeki katyonlar ile TCA anyonları, suda çözünmeyen anyonlar oluştururlar.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünün 2/3'sine kadar idrar konur. Bunun üzerine %20'lik TCA damla damla eklenir. Tüpteki idrarda bir bulanıklık oluşup oluşmadığına bakılır.

3- Heler halka deneyi:

Deneyin prensibi: Proteinler nitrik asit ile denatüre olurlar, çözünürlükleri azalır.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 2 ml konsantre nitrik asit konur, üzerine 2 ml idrar 45 derecelik eğimle tabaka yapılarak ilave edilir. Sıvıların temas yüzeyinde beyaz bir halkanın oluşup oluşmadığına bakarak sonuç değerlendirilir.

4- Esbach deneyi:

Deneyin prensibi: İdrarda bulunan albumin sitrik asitli ortamda (+) yükle yüklenir ve (-) yüklü pikrik asit tarafından nötralize edilerek çöktürülür.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 ml süzölmüş idrar alınır, üzerine 1 ml esbach ayırıcı ilave edilir ve karıştırılır. Bulanıklık veya tortulaşmanın oluşması idrarda protein bulunduğunu gösterir.

Esbach ayırıcı hazırlanırken, 10 g pikrik asit, 20 gram sitrik asitle distile suda eritilip, 1 litreye tamamlanır.

Uygulamanın adı	İdrarda şeker aranması deneyi
Yapılacağı hafta	8.hafta
Uygulamanın temel hedefi	İdrardaki şeker varlığını bakırın indirgenmesi esasına dayanan Fehling deneyi ile belirlemek
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Fehling A, Fehling B çözeltileri, İdrar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Fehling Deneyi

Deneyin Prensibi:

Serbest aldehit ya da keton grubuna sahip şekerler alkali ortamda ve ısı etkisiyle ağır metal hidratlarını (Cu, Ag gibi) redükleme özelliği gösterirler. Deney sırasında şekerler oksitlenir ve şeker asitlerini verirler.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 1 ml Fehling A çözeltisi 1 ml Fehling B çözeltisi konulup karıştırılır. Üzerine 2 ml idrar ilave edilip karıştırılır ve ısıtılır. Tuğla kırmızısı rengin görülmesi deneyin pozitif olduğunu yani idrarda glikoz bulunduğunu gösterir.

Fazla karbonhidrat içeren besinlerden sonra, ağır egzersiz, korku, heyecan, şok gibi durumlarda, anestezi sonrası, şeker hastalığı, kronik karaciğer ve böbrek hastalıkları, kuduz, gebelik toksemisi gibi durum ve hastalıklarda idrarda şeker bulunabilir.

Uygulamanın adı	İdrarda Keton Maddelerinin Aranması Deneyi
Yapılacağı hafta	9.hafta
Uygulamanın temel hedefi	Lipid metabolizmasının ara bileşikleri olan aseton, asetoasetik asit, ve beta-hidroksibütirikasitin üçü birden keton maddeleri olarak adlandırılır. Ve bunların idrarda görülmesine ketonüri denilir. Amaç legal metodu ile idrardaki keton maddelerin varlığını belirlemektir.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	NaOH, Sodyum nitroprussit, Asetik asit, idrar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Legal Metodu

Deneyin prensibi:

İdrardaki aseton alkali ortamda sodyum nitroprussit ile mor veya menekşe kırmızısı bir renk verir. Bu renk asit ilavesiyle daha da koyulaşır. Normal idrarda alkali ortamda oluşan mor renk kreatinin sodyum nitroprussit ile reaksiyona girmesinden kaynaklanır. Ancak asetik asit ilavesinden sonra renk kaybolur. Asetonun sodyum nitroprussitteki –NO gurubu ile izonitroaseton halinde bağlandığı ve bunun asetik etkisiyle yıkımlanmadığı kabul edilir.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpün 1 ml idrar alınır ve üzerine % 10'luk NaOH'den birkaç damla ilave edilir. Daha sonra sodyum nitroprussit çözeltisinden birkaç damla ilave edilerek karıştırılıp, birkaç damla asetik asit ilave edilir. Mor veya menekşe kırmızısı bir rengin oluşması idrarda aseton bulunduğunu gösterir.

Sığırlarda ketozis, koyunlarda gebelik toksemisi, bütün hayvanlarda şeker hastalığı, aşırı açlık, eter ve kloroform anestezisinden sonra, uzun süren kusma ve ishallerde uzun süren süt humması ve bazı enfeksiyon hastalıklarında idrarda keton maddeleri görülebilir.

Uygulamanın adı	İdrarda Safra Renkli Maddelerin Aranması
Yapılacağı hafta	10.hafta
Uygulamanın temel hedefi	Karaciğer hastalıklarında (Hepatit, tıkanma sarılığı) klinik sarılıktan önce idrarda görülebilecek olan bilirubini tespit etmek.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	BaCl ₂ , Fouchet ayracı, süzgeç kağıdı, idrar,
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Fouchet Deneyi

Deneyin Prensibi:

İdrarda bulunan sülfat anyonları BaCl₂ ile BaSO₄ şeklinde bir bulanıklık verirler. BaSO₄ adsorban bir maddedir. İdrardaki bilirubini adsorbe eder ve süzgeç kağıdından geçemezler. Daha sonra beyaz bir zemine açılan süzgeç kağıdı üzerine Fouchet ayracından bir damla damlatılır. Bilirubin bu ayractaki FeCl₃ tarafından biliverdin ve bilipurpurine oksitlenir. Bu da yeşil, sarı-mavi renkli lekelerin oluşmasıyla kontrol edilir.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 5 ml idrar ve üzerine 1 ml BaCl₂ çözeltisi ilave edilir. Karıştırıldıktan sonra süzgeç kağıdından süzülür. Süzgeç kağıdı beyaz bir zemin üzerine açılır ve üzerine birkaç damla Fouchet ayracı damlatılır. Yeşil mavi renkli lekelerin oluşumu bilirubin varlığını gösterir.

Uygulamanın adı	İdrarda Kan Aranması Deneyi
Yapılacağı hafta	11.hafta
Uygulamanın temel hedefi	İdrar yollarındaki patolojik durumlara bağlı olarak oluşabilecek kanın idrardaki varlığını belirlemek.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	İdrar, glasiyel asetik asit, gayak zamkı tozu, etil alkol, hidrojen peroksit, fenolfatleyn, NaOH, çinko tuzu
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Guaic (Gayak) Testi

Deneyin Prensipleri:

Eritrositlerin veya hemoglobinin peroksidaz aktivitesinden yararlanılır. Ancak idrarda bulunan organik pseudoperoksidazların önce ısı yardımı ile inaktif hale getirilmesi gerekir. Hemoglobin ya da eritrositlerdeki peroksidaz aktivitesi ile hidrojen peroksit parçalanır ve moleküler oksijen açığa çıkar. Oksijen de asit ortamda guaiac asidi oksitler ve mavi renk oluşur. O halde deney sırasında yeşil-mavi bir renk halkasının görülmesi idrara kan veya hemoglobin geçtiğini gösterir.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 4 ml idrar konulur. Üzerine birkaç damla asetik asit ilave edilir ve karıştırılır. Başka bir deney tüpüne gayak zamkı tozu konulur ve üzerine 2 ml % 95'lik etil alkol eklenerek karıştırılır. Sonra % 3'lük hidrojen peroksitten 2 ml ilave edilerek karıştırılır. İdrar bulunan tüpe idrarın üzerinde tabaka oluşturacak şekilde, tüpün kenarından akıtılarak, bu karışımdan yavaş yavaş dökülür. İdrarda kan varsa iki sıvının birbirine temas yerinde yeşil veya mavi renkli bir renk oluşur. Rengin koyuluğu kanın miktarına bağlıdır.

Castle-Meyer Reaksiyonu

Deneyin Prensipleri:

Hemoglobinin peroksidaz aktivitesi ile hidrojen peroksidi parçalaması ve serbest hale geçen oksijenin, ayraçtaki fenolfatleynin indirgenmiş renksiz türevini tekrar oksitlemesi ve kırmızı renge dönüşmesi esasına dayanır.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 2 ml idrar konulur. Isıtılır, soğutulur. Üzerine 2 ml Talmon Sardou ayracı ve 1 ml Castle-Meyer ayracı ilave edilir. Karışım üzerine birkaç damla hidrojen peroksit damlatılır. Kısa bir süre sonra menekşe kırmızısı bir rengin meydana gelişi idrarda kanın varlığını gösterir. Önceden idrarın kaynatılması organik peroksidazları tahrip eder ve reaksiyonun yanlış sonuç vermesi engeller.

Castle-Meyer Ayracı:

Fenolfatleyn 20 g
NaOH (% 30) 400 ml
Distile su 600 ml
Çinko tuzu 100 g

Talmon Sardou Ayracı:

Glasiyel asetik asit 20 ml
% 90 Alkol 1000 ml

Uygulamanın adı	İdrarın Mikroskopik Muayenesi
Yapılacağı hafta	12.hafta
Uygulamanın temel hedefi	İdrar sedimentinin mikroskopik muayenesi fiziksel ve kimyasal analizleri tamamlayan bir yöntemdir. Mikroskopik muayene tanı bakımından önemli patolojik bulgular gösterebilir. Klinik bakımdan önemli organik ve inorganik elementlerin saptanması amaçlanmaktadır
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikroskop, lam, lugol çözeltisi
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü

UYGULAMA BİLGİSİ

Mikroskopik muayene için idrar örneği taze olmalıdır. 24 saatlik idrarda yapılacaksa eğer koruyucu madde ilave edilmelidir. İdrar sedimenti, idrarın temiz bir santrifüj tüpünde 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilir. Üstteki kısım dökülerek dipteki tortu kısmı bir lam üzerine yayılır ve üzerine lugol çözeltisi damlatılarak önce küçük sonra büyük büyütmede incelenir. İdrar sedimetleri organik ve inorganik olabilir. Klinik değer taşıyan organik sedimetlerdir.

1) Organik Sedimetler

a) Eritrositler

- i) Böbrek epitel hücresi: Böbrek hastalıklarında akut safhada görülür.
- ii) Yassı (Squamöz) epitel hücresi: Vajina, vulva ve uretra mukoza yangısında görülebilir.
- iii) Kuyruklu epitelyum hücresi: Böbrek pelvisi, ureter, idrar kesesi, prostat vesicula seminalis ve epididimisden de köken alabilir.

b) Lökositler

İdrar fazla miktarda lökosit içeriyorsa böbrek ve idrar yolunun yangısal bozukluğu akla gelmelidir.

c) Eritrositler

İdrarda bulunması patolojiktir. İdrarda eritrositlerin görülmesi kanamanın varlığına işaret eder. Aşırı kas faaliyetlerinden sonra da görülebilir. Böbrek tüberkulozu, kötü huylu tümörler, böbrek taşı ve parazitlere bağlı olarak da eritrosit görülebilir.

d) Silindirler

Tubuluslara gelen proteinlerin burada suyun geri emilmesi, asiditenin artması, yüzey geriliminin azalması gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerle pıhtılaşarak sertleşmesi sonucu oluşur. İdrarda görülmesi nefrite işaret eder.

- i) Gerçek silindirler
 - i-1) Hyalin silindirleri
 - i-2) Granüler silindir
 - i-3) Mum silindirleri
 - i-4) Epitel silindirleri
 - i-5) Eritrosit silindirleri
 - i-6) Lökosit silindirleri
 - i-7) Yağ silindirleri

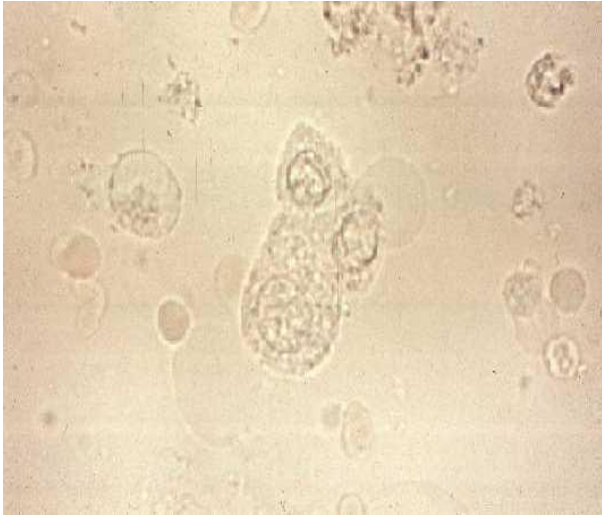
ii) Yalancı silindirler

Ürat, fosfat, kalsiyum okalat gibi ögelerin mukus gibi bazı maddeler etrafında toplanarak oluşturdukları yapılardır. Böbrek hastalıkları ile ilgili değildir.

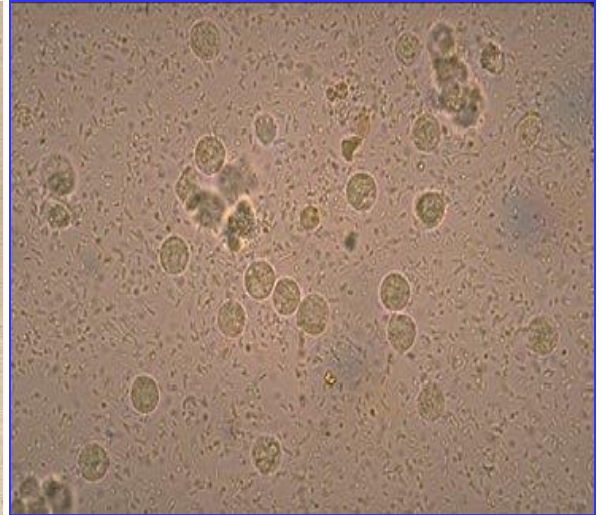
2) İnorganik sedimentler

Klinik değeri organik sedimentlere göre azdır.

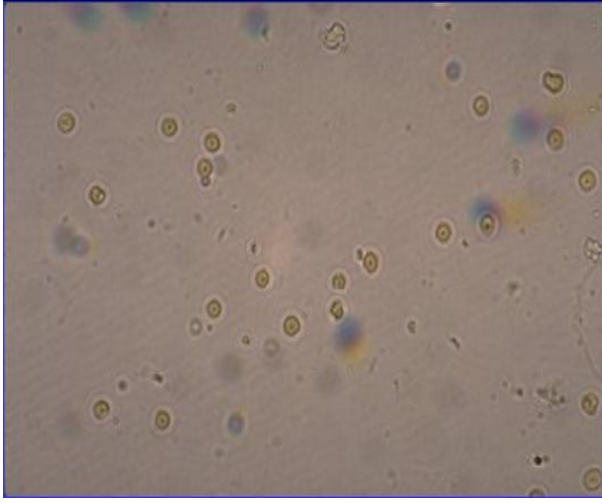
- a) Kalsiyum okalat kristalleri
- b) Ürat kristalleri
- c) Amorf ürat kristalleri
- d) Ürik asit kristalleri
- e) Löysin ve tirozin kristalleri
- f) Sistin kristalleri
- g) Sülfonamid kristalleri
- h) Amonyum magnezyum fosfat kristalleri
- i) Amorf fosfat kristalleri
- j) Kalsiyum karbonat kristalleri
- k) Kalsiyum fosfat kristalleri



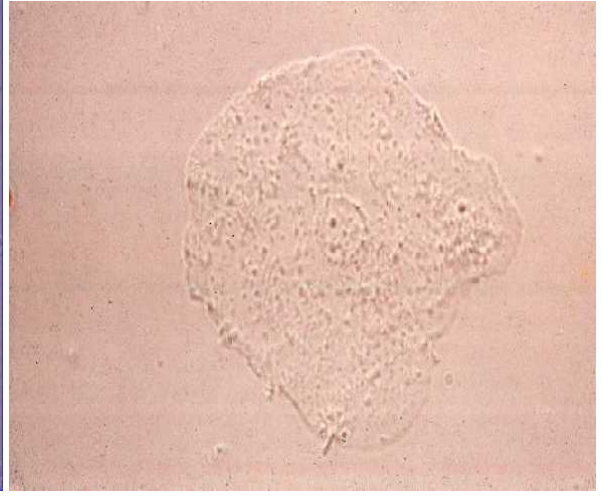
Ortada Böbrek epiteli kenarda lökositler



Lökositler



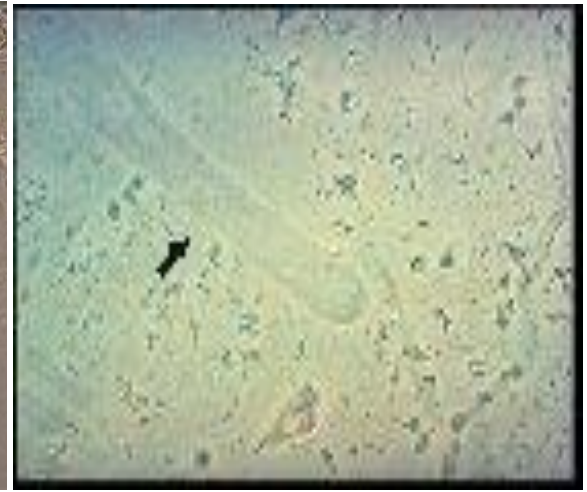
Eritrositler



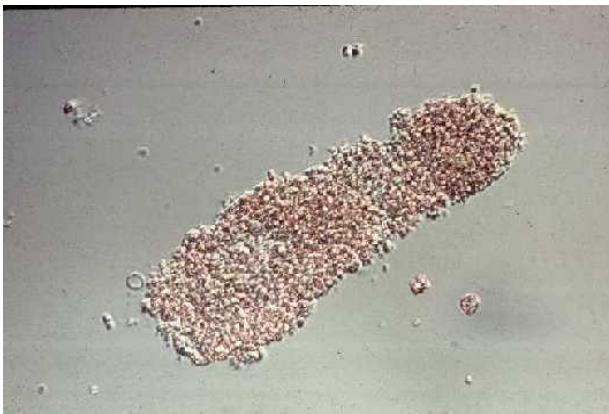
Squamoz epitel hücresi



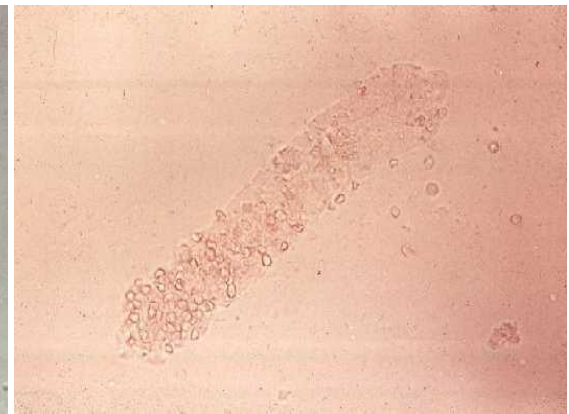
Böbrek epitel hücresi



Hyalin silindiri



Granüler silindir



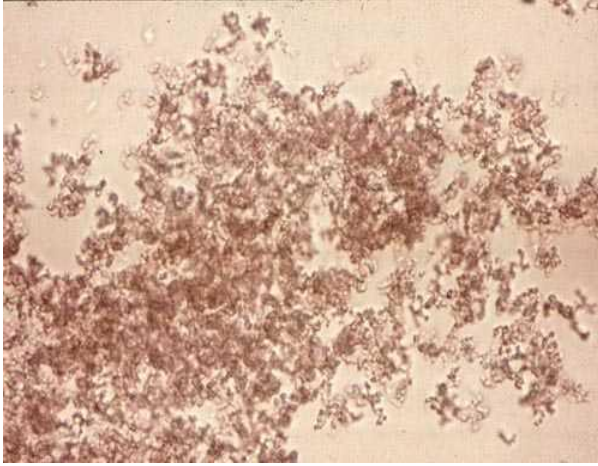
Eritrosit silindiri



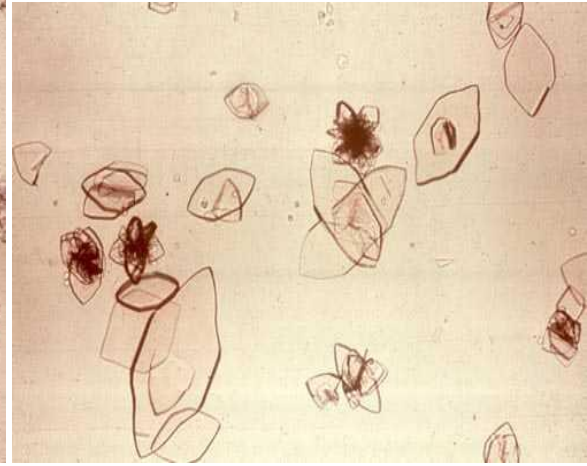
Lökosit silindiri



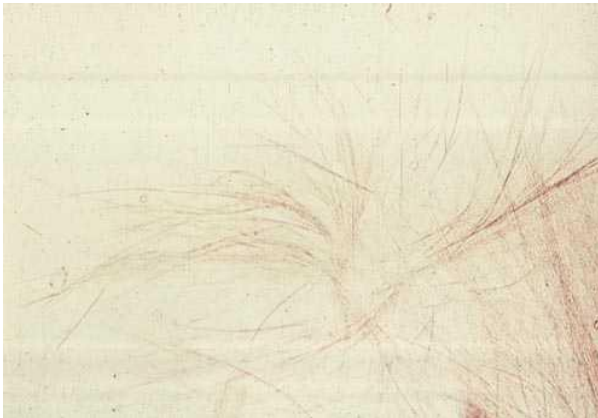
Amonyum urat kristali



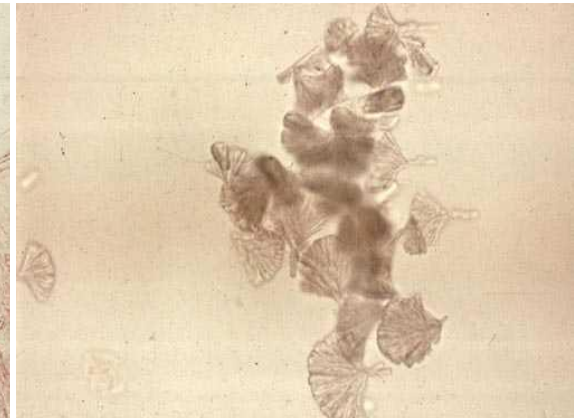
Amor urat kristalleri



Ürik asit kristalleri



Tirozin kristalleri



Sülfanamid kristalleri

Uygulamanın adı	İdrarda Klor Aranması
Yapılacağı hafta	13.hafta
Uygulamanın temel hedefi	Normal idrardaki klorür varlığı gıda ile alınan klorür miktarına bağlıdır fakat akut ateşli hastalık ishal gibi durumlarda idrardaki klorür miktarı değişimlerini belirlemek.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	idrar, potasyum bikromat, AgNO_3
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

Mohr Metodu ile idrarda Cl Tayini

Deneyin Prensipleri:

İdrar üzerine damla damla AgNO_3 ilave edildiğinde, önce gümüş nitrat ortamdaki klorür ile reaksiyona girerek AgCl oluşur. Ortamda mevcut klorür tükenince ilave edilen gümüş nitrat indikatör olan potasyum kromat ile birleşerek kırmızı renkli gümüş kromat oluşur. Titrasyonda kırmızı renk oluşunca ortamda artık AgNO_3 ile reaksiyona girecek Cl kalmadığını gösterir. Bu noktada harcanan gümüş nitrat miktarından idrardaki Cl miktarı hesaplanır.

Deneyin Yapılışı:

Bir erlene 2 ml süzölmüş idrar konur. 20-30 kez (30-40 ml distile su ile) sulandırılır. Distile suda Cl olmadığından sulandırma reaksiyon akışını değiştirmez. Üzerine % 10'luk potasyum bikromat çözeltisinden 3-4 damla damlatılır. Bürete doldurulmuş olan 0,1 N AgNO_3 çözeltisi damla damla erlene eklenerek karışım çalkalanarak titre edilir. Çalkalanmakla kaybolmayan tuğla kırmızısı renk oluşunca titrasyona son verilir. Kullanılan AgNO_3 miktarı büretten okunur.

Böylece sarf edilen gümüş nitrat miktarından hesaplama yapılır. Normaliteleri aynı çözeltilerin eşit miktarları birbirlerine eşdeğerdir.

Örneğin 2 ml idrar için 4 ml 0,1 N gümüş nitrat çözeltisi harcanmış olsun;

1 ml 0,1 N Gümüş nitrat 0,00585 g NaCl

4 ml 0,1 N Gümüş nitrat ?

? = 0,0234 g'dır. Diğer bir ifadeyle 2 ml idrar içinde 0,0234 gram NaCl var demektir.

2 ml idrarda 0,0234 g NaCl

1000 ml idrarda ?

? = 11,7' dir. Sonuç olarak 11,7 g/L' NaCl'dir.

Normal idrarda klorür miktarı gıda ile alınan klorür miktarına bağlıdır. Akut ateşli hastalıklarda, transudat ve eksudatların oluşumunda, ishallerde, ödemle birlikte seyreden böbrek yangılarında idrarda Cl miktarı azalır. Ateşli hastalıklarda ateşin düşmesi sırasında transudat ve eksudatın emilmesi safhasında ise artar.

Uygulamanın adı	Bir sıvının idrar olup olmadığının anlaşılması
Yapılacağı hafta	14.hafta
Uygulamanın temel hedefi	Veteriner hekimlikte zaman zaman vücuttan alınan sıvının idrar olup olmadığının anlaşılması gerekli olmaktadır. O yüzden amaç alınan sıvının tipinin belirlenmesidir.
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	İdrar, lam, lamel, nitrik asit, mikroskop, amonyum klorür, NaOH, sodyumnitroprussit
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Laboratuvar önlüğü, laboratuvar gözlüğü, tahta maşa, eldiven

UYGULAMA BİLGİSİ

İdrar için karakteristik olan üre ve ürik asidin aynı zamanda bir sıvıda bulunması bu sıvının idrar olduğunun veya buna idrar karıştığının delilidir. Bir de buna kreatinin varlığı eklenirse muayene edilen sıvının idrar olduğuna kesin olarak karar verilir.

İdrarda üre aranması

Muayene edilecek sıvıdan 1-2 ml alınır. Hafifi şurup kıvamı alıncaya kadar ısıtılır. Soğuduktan sonra birkaç damla yoğun nitrik asit ilave edilir. Eğer bu sıvıda üre varsa nitrik asit ile kristal oluşturur. Mikroskopik muayenede rombik tarzda üre kristalleri gözlenir.

İdrarda ürik asit aranması

Muayene edilecek sıvıdan birkaç ml alınır ve amonyum ile doyurulur (her 2 ml için 0,5 g amonyum klorür) ve üç saat bekletilir. Daha sonra santrifuj edilir, tortu kısma mureksid deneyi yapılır. Bunun için tortu bir lamele konur. İki damla nitrik asit ile karıştırılır. Daha sonra nitrik asit uçuncaya kadar bek alevinde yavaş yavaş ısıtılır. Tortu kurur ve tuğla kırmızısı bir renk alır. Bir damla NaOH (veya NH₃) damlatılır ve mikroskopta ürik asit kristalleri aranır. Bileyi taşı görünümündeki kristaller ürik asit kristalleridir. Yine fıçı, limon, altıgen, laminal ürik asit kristalleri de görülmektedir.

İdrarda kreatinin aranması

Muayene edilen sıvıdan 2 ml alınır. Üzerine taze hazırlanmış sodyumnitroprussit çözeltisinden birkaç damla konur ve karıştırılır. Üzerine % 10'luk NaOH çözeltisi damlatılır. Eğer kreatinin varsa, yakut kırmızısı bir renk oluşur. Reaksiyon renk kayboluncaya kadar (asit bir hal alıncaya kadar) asetik asit damlatılır. Eğer renkte daha da bir koyulaşma varsa bu asetondan kaynaklanıyor demektir.

Uygulamanın adı	Uygulama Sınavı
Yapılacağı hafta	15.hafta
Uygulamanın temel hedefi	
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	

UYGULAMA BİLGİSİ