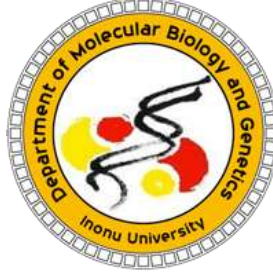


GENERAL BIOLOGY LABORATORY II



Canbolat Gürses, Samet Kocabay, Hongling Yuan, Hikmet Geçkil
Department of Molecular Biology and Genetics
Inonu University

Week 11

Chromatographic methods for protein quantitation

In this week's and next week's laboratories you will be introduced the principles behind the separation and thus qualification/quantitation of proteins and will run an "SDS-gel electrophoresis of proteins".

(P.S. For now the handout is in Turkish and we will supply you with English version of the text by the next week).

Bir proteinin fonksiyonunu anlamadan anahtarı onun yapısını anlamaktan geçer. Nükleik asitlerin tersine, proteinler uniform, düzenli yapılar göstermezler. Bunun nedeni 20 çeşit amino asidin proteinden proteine farklı sayı, dizin ve çeşitte bulunmalarıdır. Bu amino asitlerin birbirine bağlanma özelliklerine bakarak (hem primer ve hem de daha ileri yapıda) bir proteinin fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında fikir sahibi olabiliriz (örneğin, onların erime özellikleri, zincir yapıları, vs).

Teorik olarak polipeptidlerin çeşitliliği sonsuz sayıda olabilir. Bir protein zincirindeki herhangi bir amino asidin 20 farklı amino asitten biri olabileceğini düşünürsek bunun sebebi anlaşılır. n sayıda amino asit içeren bir proteinin 20^n sayıda farklı zinciri olabilir. Örneğin, 100 amino asitten oluşan normal büyüklükteki bir protein için 20^{100} (veya 1.27×10^{130} , yani 127'nin arkasında 128 tane sıfır) adet farklı zincir yapabilirliği teorik olarak mümkündür. Bu değer evrenin toplam 9×10^{78} olan atom sayısından daha büyüktür.

Bir proteinin kendine has özelliği onun amino asit sayısından çok, bu amino asitlerin dizilim sırası ile belirlenir. Örneğin, her harfi bir amino asite denk gelmek kaydı ile KAÇMAK ve ÇAKMAK kelimeleri aynı amino asit türlerine eşit sayıda sahipken, bu amino asitlerin farklı sıralarda dizilmesi bu iki kelimenin tamamen farklı anlamlara gelmesine neden olmuştur. Bu durumun aynı proteinler için de geçerlidir. Dolayısıyla iki protein benzer amino asit içeriğine sahip olsa bile, bu amino asitlerin zincirde değişik pozisyonlarda olmasından dolayı çok farklı karakter gösterebilirler. Örneğin, biri enzimatik bir özellik kazanırken, diğeri membranda yerleşecek bir protein özelliği kazanabilir. Dolayısıyla hem bu farklı dizilimler ve farklı amino asit içeriği ve hem

de zincirlerin farkli buyukluklerde olmasi sayesinde bir proteini diger binlerce proteinden saflastirmak (purifikasyon) mumkundur.

Makromolekullerin bireysel ozelliklerini calismak icin saflastirma islemi zor bir olay olsa da onemli bir gerekliliktir. Bu islem zordur, cunku, toplam kuru agirligin % 0.1'inden daha az miktarda bulunan bir maddeyi (proteini) yaklasik % 98 oraninda saflastirmak gerekir. Bu nedenle, ilk zamanlar saflastirilan proteinler genellikle hucrede buyuk oranlarda bulunanlardir. Ornegin, hemoglobin kirmizi kan hucrelerinin agirliginin 1/3'unu olusturur. Dolayisi ile bu proteinin bol miktarlarda saflastirilmesi nisbeten cok daha az miktarlarda bulunan hucre proteinlerine gore daha kolaydir. Ancak, gunumuzde molekuler klonlama teknikleri sayesinde, hucrede cok az miktarda uretilen bir protein bile reombinant hucreler tarafindan buyuk oranlarda yapilip calisilabilir.

Protein saflastirma islemlerinde ilk basamak genellikle proteini hucre disina cikarmakla baslar. Bu da mekanik, fiziksel (havanda ezme, ultrason) veya kimyasal ve enzimatik yollarla olabilir. Butun bu metodlarla hucreler parcalanir ve sitoplazmik icerik disari salinir. Eger calisilacak protein membranda yerlesik bir protein ise, oncelikle organik bir solventle (etanol, metanol, benzen, kloroform) eritilmesi gerekir. Bu sekilde hucre disina salinan binlerce protein icinden bizim calisacagimiz protein cesitli fraksinasyon yontemleri ile o proteinin cesitli fiziko-kimyasal ozellikleri goz onune alinarak, basamak basamak diger proteinlerden ve maddelerden saflastirilir. Burada, amac istenen proteini diger maddelerin icinden alip saflastirmaktir. Bu saflastirma icin goz onune alınmasi gereken bazi parametreler ve bu parametreler icin kullanılacak saflastirma yontemleri asagidaki gibi sayilabilir:

Protein icin goz onune alinacak ozellik

Yontem

Yuk (elektrik yuk)

iyon-degisim kromatografisi ve elektroforez

Polarlik

Hidrofobik etkilesim kromatografisi

Buyukluk

Jel filtrasyon kromatografisi, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi), Ultrasantrifugasyon

Ozgun baglanma

Affinite kromatografisi

Bir protein cok sayida yuklu grup cerdiginden erirliligi ortamdaki tuz konsantrasyonu, solventin polarliligi, ortam pH ve isisine baglidir. Dusuk iyon konsantrasyonlu bir ortamda bulunan bir proteine tuz eklenirse, bu proteinin erirliligi artar. Bunun nedeni, ilave edilmiş olan iyonlar proteindeki cok sayida bulunan iyonik yukleri kapsama alanina alarak onların diger proteinler veya molekuller üzerindeki zit yuklu gruplarla bir araya gelmesini engeller (eger bu olmasa idi bir cok grup bu proteinler arasında bir araya gelecek ve onların agregasyonuna veya diger bir deyimle presipitasyonuna neden olacakti).

Ancak, tuz eklenmeye devam edilirse (yuksek tuz iyonlari saglandiginda) bu defa da erirlilik azalir ve protein presipite olmaya baslar (yani cokelir). Bunun ise nedeni, tuz iyonlari ile protein ve

TOOLS OF THE TRADE

diger erimis maddelerin solvent (ornegin, su) icin yarismalaridir. Cok yuksek tuz iyonlari iceren bir ortamda suyun hemen hepsi tuzu eritmede kullanildigi icin, proteinler ve diger maddeler icin onlari erir halde tutacak su miktarı yeterli olmadigindan, bunlar presipite olurlar. Bu durum proteinleri saflastirmak icin onemli bir uygulama alanı bulur. Cunku, **her protein farklı iyonik karakterinden dolayı farklı tuz konsantrasyonunda presipite olur. Amonyum sulfat tuzu** ile presipitasyon en yaygın olarak kullanılanıdır (yüksek eririligidinden dolayı, 0 °C'de 4 M, bu nedenle yüksek iyonik kuvvette solusyonlar hazırlanabilir).

Izoelektrik noktasını (pI) bildigimiz bir proteinde ortam pH'i pI'ya yakın alınabilir ve böylece net yükün sıfır olduğu bu durumda proteinin eririligi minimum seviyede olur.

Bazı proteinlerin izoelektrik noktaları

Protein	pI	Protein	pI
Pepsin	1.0	Miyoglobın Hemoglobın	7.0
Ovalbumin (yumurta)	4.6	Sitokrom c	7.1
Serum albumin	4.9	Histon	10.6
Insulin	5.4	Lizozim (yumurta akı)	10.8
Kollojen	6.6		11.0

Cesitli **kromatografik metodlar** proteinlerin saflastirilmasında vazgeçilmez yöntemlerdir. Bunlarda genellikle saflastırılacak proteini iceren karışım (**hareketli faz**), porlu kati bir matriks ile dolu bir kolon (**duragan faz**) üzerine uygulanır. Cozunmus maddeler (ornegin, proteinler) kolondan asagi akarken, tasimis olduklari yuk veya buyukluklerine gore duragan faz tarafından tutulurlar veya saliverilirler. Protein ile kromatografik kolon dolgu maddesi arasındaki etkilesime gore cesitli kromatografik metodlar olabilir.

En yaygın kromatografik metodlar

A. İyon-degisim kromatografisi

Yuklu molekullerin kendilerine zit yük taşıyan duragan ortama bağlanmalarına dayanır. *Anyonlar anyon-degisim kromatografisinde katyonik gruplara bağlanırken, katyonlar katyon-degisim kromatografisinde duragan faza bağlı olan anyonik gruplara bağlanırlar.* En yaygın kullanılan anyon degistirici **dietilaminoetil** (DEAE)'in bağlandığı matrikslerken: Matriks-CH₂-CH₂-NH(CH₂CH₃)₂⁺, en yaygın kullanılan katyon degistirici ise **karboksimetil** (CM)'in bağlandığı matrikslerdir: Matriks-CH₂-COO⁻. Matriks materyali olarak ise seluloz ve agarozdan yapılan reçineler en yaygın kullanılanlarıdır. Hem pozitif ve hem de negatif yük taşıyan proteinler gibi molekuller hem anyon (-) ve hem de katyon (+) degisim kromatografi materyaline bağlanabilirler.

Proteinlerin kuvvetli veya zayıf bağlanmaları tamamen onların tasidıkları pozitif ve negatif yüklerle ve bu yüklerin ortaya çıkmasını sağlayan ortam pH'i ile belirlenir. Proteinler önce uygun pH ve tuz konsantrasyonuna sahip bir tamponda çözünürler ve kolona yüklenirler. Aynı tamponla kolon yıkanarak zayıf bağlanmış proteinlerin kolondan yıkanması (elusyon) sağlanır. İlgilenilen protein veya proteinler ise kolona daha sıkı bağlandıklarından bunların yıkanması ancak daha yüksek pH ve tuz konsantrasyonuna sahip bir tamponla yıkamakla olur. Yüksek pH ve tuz konsantrasyonu

proteinin matrikse bagli iyon-degisim maddesine olan ilgisini azaltarak oradan kopmasini saglar. Elusyon edilmiş proteinlerin konsantrasyonlari basitce 280 nm dalga boyunda vermiş olduklari absorbanlardan yararlanilarak bulunur. Bu dalga boyunda esas olarak uc aromatik amino asit (tirozin, triptofan ve fenilalanin) isigi absorbe eder. Absorbe olan isik miktarı konsantrasyonla direkt iliskilidir.

Ornek 1. Arjinin, histidin ve losin amino asitlerini iceren bir solusyon pH=6.0'daki bir karboksimetil kolonuna yuklenirse, bu amino asitler hangi sira ile ayrilir? Once daha az katyonik (+) olan losin, daha sonra histidin ve en son da kuvvetli katyonik formda olan arjinin ayrilir.

B. Hidrofobik etkilesim kromatografisi

Matriks materyaline bir miktar oktil veya fenil gruplari ilavesi ile olur. Bu hidrofobik gruplar proteinin yuzeyindeki polar olmayan gruplarla etkilesime girer (her iki grup da polar olan solvent tarafından itilir). Bagli proteinler basitce azalan tuz konsantrasyonu iceren bir tamponla yikanarak ayrilir.

C. Jel filtrasyon kromatografisi

Bu metoda **buyukluge gore ayirim** veya **molekuler eleme kromatografisi** de denir. Burada molekullerin ayrimi yapi ve buyukluklerine gore olur. Duragan faz belli buyuklukteki molekkulerin iceri girmesini saglayan porlu bir matrikstir. Tipik olarak caplari bu porlardan daha kucuk olan proteinler boncuklari icine girip zaman kaybederken, caplari por caplarindan daha buyuk proteinler porlar arasindan hizlica gecerek ayrilir. Degisik por caplarina sahip matriksler kullanilarak veya matriks karisimleri yaparak istenen proteinlerin en azindan kismen saflastirilmalari mumkun olur.

D. Affinite kromatografisi

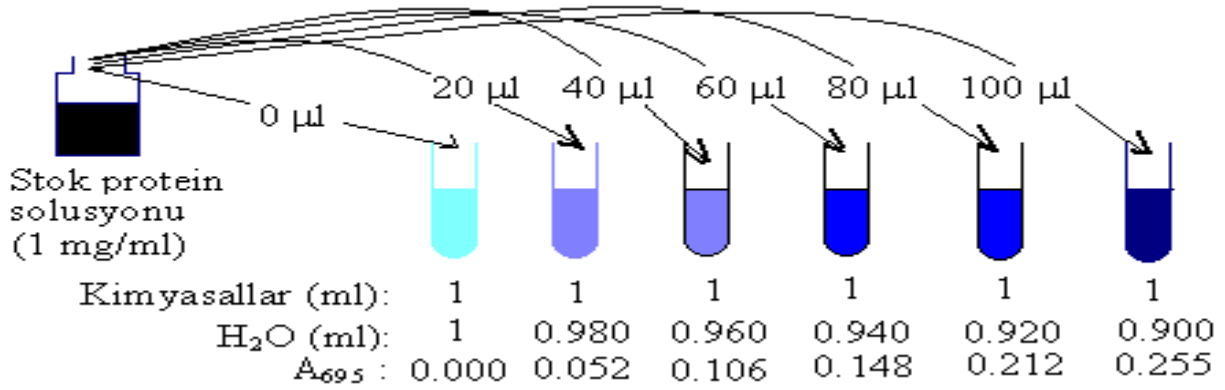
Proteinlerin ilginc bir ozelligi ise ozel molekulere kovalent olmayan bir sekilde kuvvetli baglanmalaridir. Bu olaya affinite denir. Bu yontemde, duragan matrikse bu ozel molekuller (**ligand**) baglanir. Protein karisimi yuklenen bu kolonda, sadece o liganda ozgun protein matrikse bagli liganda baglanirken, digerleri kolondan kolayca ayrilir. **Immunoaffinite kromatografisinde** bir proteine karsi yapilan bir antikora matrikse baglanir ve protein karisimi bu ortama uygulandiginda sadece o ozel protein antikora baglanirken diger spesifik olmayanlar kolayca yikanip alinirlar. Bagli protein ise ortama yuksek konsantrasyonda ligand verilmesi sureti ile kolondan ayilabilir.

E. Yuksek performans likid kromatografisi (HPLC)

Bu otomatik sistede 3-300 µm capindaki cam veya plastik kromatografik matriksten akis orani ve yuksek basinc ayarlanarak molekullerin ayrilmasi saglanir. Standart molekuller kullanilarak sistem standardize edilir ve bilinmeyen molekullerin boyutlari ve miktarlari belirlenebilir. Pahali bir sistem olmasina karsin en verimli ayirim metodudur.

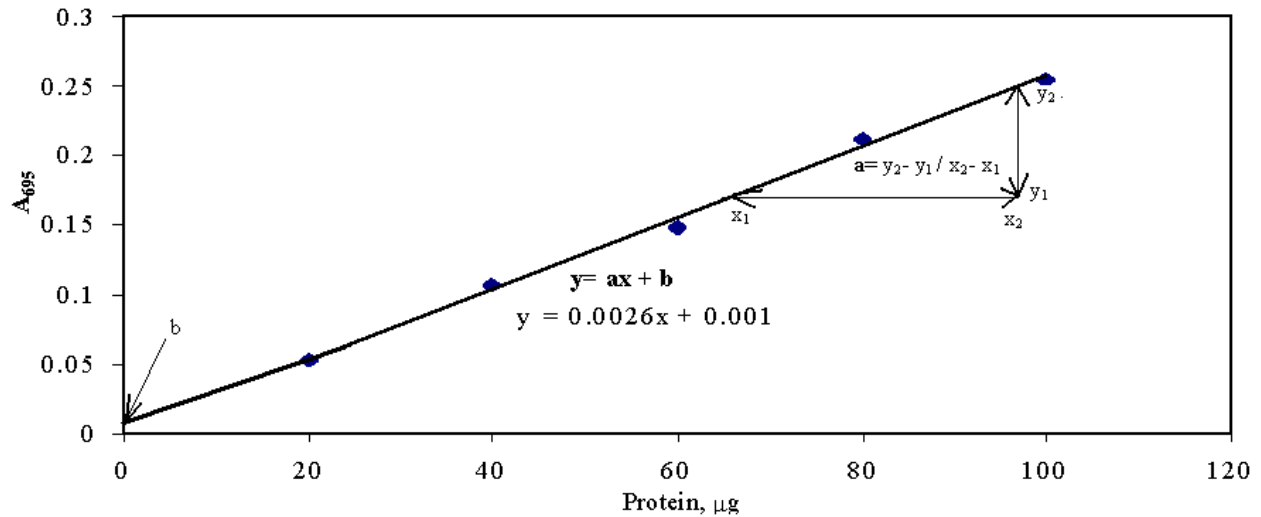
TOOLS OF THE TRADE

TOTAL HUCRE PROTEINI TAYINI



Çalışmakta olduğumuz bir hücre veya doku ekstresindeki protein konsantrasyonunu belirlemek için yukarıdaki gibi bir deney rutin olarak laboratuvarında yapılır. Burada, konsantrasyonunu bildiğimiz bir protein solüsyonu hazırlanır (örneğin burada 1 mg/ml). Bu solüsyondan değişik miktarlarda alınarak tüplere aktarılır ve toplam hacim her tüp için aynı miktara ayarlanır.

Örneğin yukarıdaki numune için, 1. tüpe protein solüsyonu alınmamış ve kör olarak kullanılırken, diğer tüplere değişik volümlerde protein solüsyonu eklenmiş ve toplam hacim her tüp için 2 ml'ye tamamlanmıştır). Birinci tüp 695 nm'deki absorbanı sıfırlamak için kullanıldıktan sonra, diğer tüplerin verdiği absorban aynı dalga boyunda ölçülerek her tüpün içindeki protein miktarına karşı grafiklendirilmiştir (protein stoku 1 mg/ml veya diğer bir deyimle 1 µg/ml olduğundan, tüplerde sırası ile 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg protein bulunacaktır):



Grafik veya verilerden de anlaşılacağı üzere, **protein konsantrasyonu** ile **absorbans** arasında lineer bir ilişki vardır (butun noktalara en yakın geçen bir eğri çizilir, lineer regresyon). Eğrinin **egimi (a)** ve **y** eksenini kestiği bölgeden (**b**), **y**'nin **x** ile ilişkisini gösteren $y = ax + b$ eşitliğini elde edebiliriz. Bu örneğimizde, $b=0.001$, $a= 0.0026$, dolayısıyla $y=0.0026x + 0.001$. Böylece, protein konsantrasyonu bilmediğimiz çalışma eksterminin verdiği absorbanstan (**y**) ne konsantrasyonda

TOOLS OF THE TRADE

(**x**) bir protein solusyonuna sahip olduğumuzu hesaplayabiliriz. Lineer formulumuzun gerçekten bu verileri yansıtıp yansıtmadığını kontrol etmek için her hangi bir y değerine karşılık yaklaşık x değerini bulmamız gerekir. Örneğin, 0.10 absorbans, **x** ekseninde yaklaşık 40 µg proteine denk gelmeli: $0.10 = 0.0026x + 0.001$, burada $x = 38 \mu\text{g}$ bulunur ki, bu da egrinin tüm noktalara en yakın geçen (veri noktalarının üzerinden geçemeyebilir) bir özellikte olmasından kaynaklanır ve kabul edilebilir bir değerdir.

Sunu unutmayın ki, 38 µg bize proteinin solusyondaki gerçek konsantrasyonu hakkında bilgi vermez. Protein solusyonun ml'inde kaç mg protein olduğunu belirlemek için bu değeri gelmiş olduğu volume (yani, 40 µl veya 0.04 ml'ye) bölmemiz gerekir: $38 \mu\text{g} / 0.04 \text{ ml} = 950 \mu\text{g/ml}$ 'e denk gelir (orijinal stok solusyonumuzda da proteinin 1 mg/ml veya 1000 µg/ml olduğunu hatırlayınız). Dolayısı ile bulunan değer (950 µg/ml) beklenen değere (1000 µg/ml) uygunluk göstermektedir.

Örnek 2. Yukarıdaki standarda göre konsantrasyonunu bilmediğiniz bir protein solusyonundan 0.25 ml alıyorsunuz ve standarttaki gibi toplam hacmi su (0.750 ml) ve kimyasallarla (1 ml) toplam 2 ml yapıyorsunuz. Bu tüpteki solusyonun verdiği absorbansı (A_{595}) 0.657 olarak okuyorsunuz. Bu proteinin orijinal solusyondaki konsantrasyonu nedir?

Hesplanan lineer eğri formülünde y değeri yerine 0.657 konulursa; $0.657 = 0.0026x + 0.001$, $x = 252 \mu\text{g}$ bulunur. Fakat bu absorpsiyon okunan tüpteki protein miktarıdır. Bu kadar protein orijinal solusyonun 0.25 ml'sinden geldiğinden, orijinal solusyonda; $252 \mu\text{g} / 0.25 \text{ ml} = 1008 \mu\text{g/ml}$ protein var demektir.

Uygulama: Proteinlerin absorpsiyon karakteristikleri, spektrofotometrik olarak kantitasyonu (miktarı) ve kalitatif (niteliği) analizleri, standart eğri oluşturma gibi konular uygulamalı olarak verilecektir. Bunun için Asistanınız'ın size vereceği materyal ve metodlar kullanılacaktır.

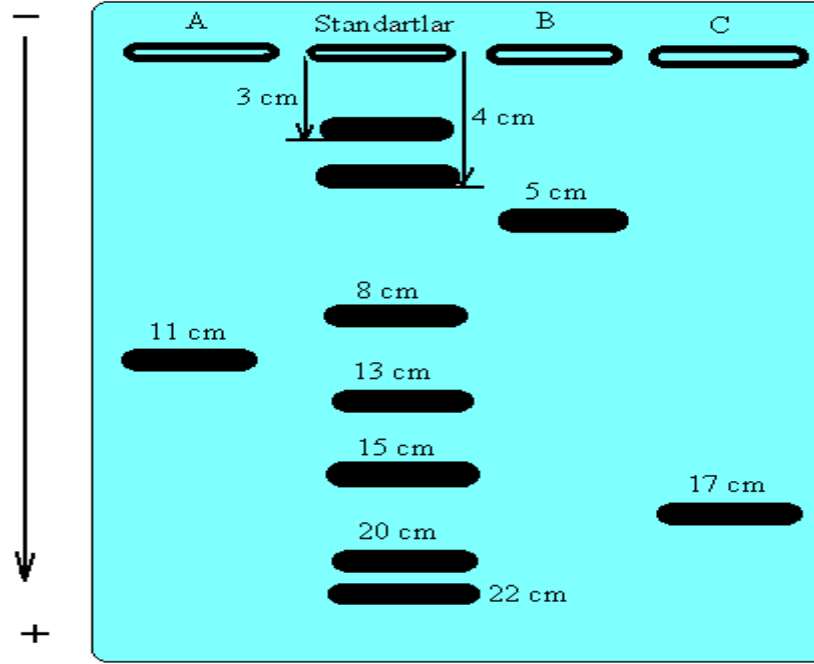
PROTEINLERİN ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİ

Elektroforez, iyonik moleküllerin elektrik alanında yurumesidir. Elektrik alanında moleküller yüklerinin tersi tarafa doğru yük ve büyüklüklerine göre yururler. Proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinin yanında, bu metod aynı zamanda protein purifikasyonu (safılaştırma) için de kullanılabilir. Proteinler için en yaygın kullanılan jel matriksi **poliakrilamid** jellerdir. Jelin konsantrasyonu ayarlanarak por büyüklükleri amaca uygun hale getirilebilir. Yüksek konsantrasyonlu jeller küçük porlu bir matriks oluştururlar. Yüksek pH'li (> 9.0) ortamda hemen tüm proteinler negatif yüklü olduklarından elektrik alanında anoda (+) doğru hareket ederler. Dolayısı ile aynı yük ve büyüklüğe sahip proteinler aynı bölgeye yuruyup bir bant oluştururken, farklılar farklı pozisyonlarda kalırlar. Uygun protein boyaları ile boyandıklarında bu bantlar jel üzerinde gözle görünür duruma gelecek şekilde boyanırlar. Safılaştırma işlemi için proteinler genellikle boyanmadan jelin ilgili bölgesinin kesilip eritilmesi ile olur.

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi)

Yukarıdaki metodun aynısıdır. Sadece farklı olarak burada proteinler SDS (bir çeşit deterjan, $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-]\text{Na}^+$) gibi denatüre edici maddelerle denatüre edilirler. Bu amfifilik

deterjan proteinleri kararlı hale sokan hidrofobik etkileşimleri bozarak onları zincir şekline (primer yapı) sokar. Bir çok protein mg başına 1.4 mg SDS bağlar (diğer bir deyimle iki amino asit için bir molekül SDS). SDS'in taşıdığı büyük negatif yük proteinlerin iç dinamiklerini sağlayan γ Alt uniteleri disulfid (-S-S-) bağları ile birbirine bağlı proteinlerin bu alt unitelerini birbirlerinden ayırmak için ayrıca ortama indirgeyici bir madde olan **2-merkaptoetanol** ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ilave edilir. Bu nedenle bu yöntem jel filtrasyon yöntemindeki gibi proteinlerin büyüklüklerine göre ayırmasını sağlar.

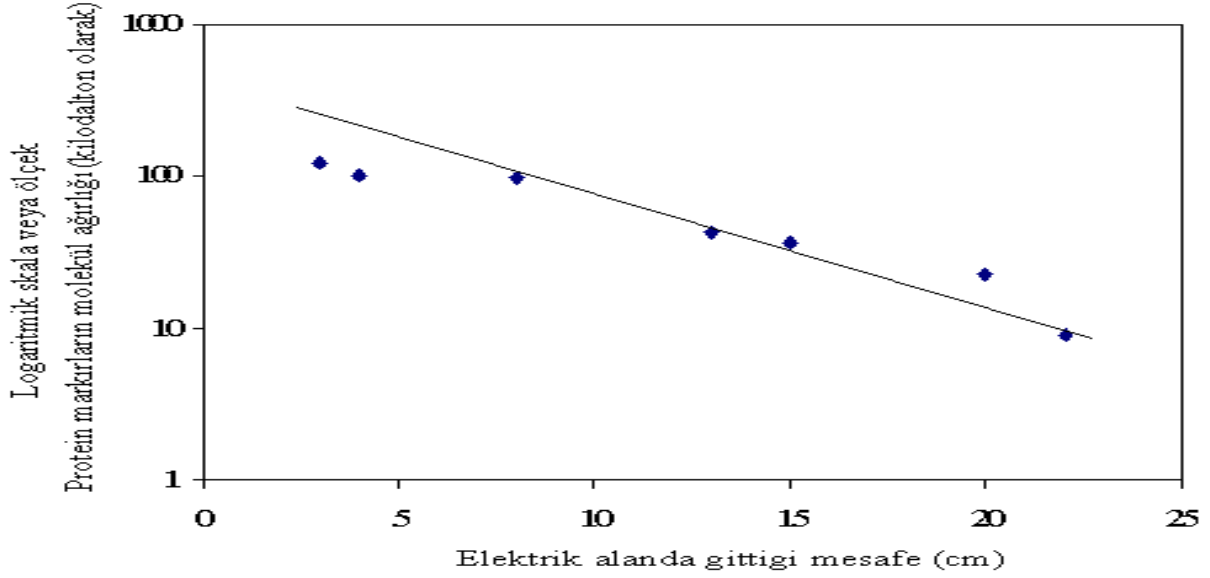


Yukarıdaki gibi bir jel (jole gibi bir madde) tipik olarak protein ve nükleik asitleri birbirinden ayırt etmek için kullanılırlar. Proteinler ve nükleik asitler bu elektrik akımı uygulanan matris ortamında yüklerinin tersi yöne doğru ve molekül ağırlıklarının logaritmik fonksiyonu olarak ayrılırlar. Proteinler için genel olarak polimerize olan **akrilamid jeller** kullanılırken (dolayısıyla bunlara poliakrilamid jeller denir), nükleik asitler (DNA ve RNA) için daha çok **agaroz jeller** kullanılır.

Ticari olarak satılan ve molekül ağırlığını bildiğimiz ve konsantrasyonunu ayarlayabileceğimiz standart (markir) protein ve nükleik asitler kullanılarak, bilinmeyen örneklerimizin molekül ağırlıklarını ve de hücre içi konsantrasyonlarını bulabiliriz. Yani bu teknik güçlü bir kalitatif ve kantitatif analiz metodudur.

Örnek 3. Yukarıdaki jelde A, B ve C proteinlerinin yaklaşık molekül ağırlıklarını hesaplayınız. Bu sorunun cevabı da örnek 1'deki çözüme benzer yolla elde edilebilir...

TOOLS OF THE TRADE



ULTRASANTRIFUGASYON

Bir bardak icine su ve kum koyup calalayip birakirsaniz yercekimi (9.8 m/s^2 hiz veya xg) etkisinden dolayi zamanla kumun hepsi dibe coker. Ayni gravitasyonal cekim kuvvetine maruz kalan makromolekuller ise solusyonda boyle bir durum gostermezler. Bunun nedeni, bu molekullerin gelisiguzel termal hareketleri (**Browniyan hareketler**) bu sekilde bir presipitasyon olmasina engel olarak onlari solusyonda homojen olarak dagili kalmasini saglar. Ancak, bu makromolekulleri iceren solusyonlar cok yuksek hizlarla cevrildiklerinde (dakikada binlerce donme) aynen kum ornegindeki gibi bunlarda dibe cokerler.

Ultrasantrifuj aleti 1923 yilinda Svedberg tarafından gelistirildi. Yuksek hizli ultrasantrifujlerle dakikada 80,000 defa (rpm) donus ve dolayisi 600,000 xg 'ye ulasan (yercekimi hizinin 60 bin katindan fazla) gravite uygulanabilir. Bu cesit santrifugasyon hiz ve suresinin ayarlanmasi ile hucreden organellere onlardan da nukleik asitlere, proteinelere kadar bir cok yapi ve molekulin presipitasyonu (cokertilmesi veya sedimentasyonu) mumkundur. Herhangi bir makromolekulin veya hucresel komponentin sedimentasyon oranini o maddenin buyuklugune baglidir (ayrica maddenin icinde bulunduгу solusyonun konsantrasyonu ve cozunen maddenin molekuller yapisi da sedimentasyonda onemli rol oynar). Bir birim sentrifuj kuvveti basina olan sedimentasyon hizi bir proteinin sedimentasyon sabitesini (10^{-13} saniye=Svedberg sabitesi) verir.

Bazi proteinlerin sedimentasyon katsayilari(S):

Protein	Molekul ağırlığı(kD)	S ($\times 10^{-13}$ saniye)
Lipaz	6.7	1.14
Sitokrom c	13.4	1.71
Miyoglobin	16.9	2.04
Laktat dehidrogenaz	150	7.31
Katalaz	222	11.2

Burada dikkat edilmesi gereken sey, molekul agirligi ile sedimentasyon orani arasindaki iliski lineer degildir (yani, S degerleri aritmetik olarak eklenerek bulunmaz). Bunu nedeninin de yukarida acikladigimiz gibi, molekullerin molekul agirliginin yaninda onlarin yapilarinin da S'yi belirlemede rol oynamalaridir. Proteinlerin sedimentasyon sabiteleri 1 S ile 50 S arasinda degisir (ribozomlar ki bunlar bircok protein ve RNA'dan meydana gelmislerdir 80 S buyuklukle ifade edildiklerini hatirlayiniz). Daha buyuk partikuller daha buyuk sedimentasyon katsayilarina sahiptirler. Ornegin, virusler icin bu degerler 40 S ile 1000 S arasinda degisir.

SORULAR

1. pH = 8.0 olan bir DEAE kolunundan glutamik asit, lizin ve valin hangi sira ile ayrilir? Neden?
2. 280 nm dalga boyunda hangi ařađıdaki peptidlerden hangisi daha yuksek absorbans gosterir? Neden?
 - a. Glutamik asit-losin-glutamik asit-fenilalanin-treonin-losin-aspartik asit-glisin-tirozin
 - b. Serin-valin-triptofan-aspartik asit-fenilalanin-glisin-tirozin-triptofan-alanin
3. Iyon degisim kromatografisinin affinite kromatografisinden farki nedir?
4. Asagidaki bilgilerden bir proteinin alt unite kompozisyonunu belirleyiniz: jel filtrasyonla proteinin molekul agirligi 200 kD olarak belirlenmistir. Ayni protein SDS-PAGE ile 100 kD olarak belirlenmistir. Yine ayni protein merkaptotanol ile muamele edildikten sonra SDS-PAGE'de 40 ve 60 kD olarak iki farkli molekul agirlikta belirlenmistir. Bu proteinin muhtemel molekuler yapisini (alt uniteler bakimindan) aciklayiniz.
5. 0.1 M NaCl solusyonunda 2.6 S'lik sedimentasyon katsayisina sahip bir proteinin 1 M NaCl solusyonundaki sedimentasyon katsayisi 4.3 S olarak bulunmustur. Neden?