

8. Hafta: İyon Değişimi Kromatografisi: İyon değişim kromatografisi teknikleri, proteinlerin iyonik elüsyonla kolondan ayrılması.

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

İYON DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİ

Proteinleri oluşturan amino asitler farklı özellikleri olan yan zincirler içerir. Örneğin, aspartik ve glutamik asit pH 7.0'de negatif yüklü asidik gruplar taşırken lizin, arjinin ve histidin amino asitleri pozitif yüklü bazik gruplar içerir. Her proteinin net yükü yapısındaki yüklü amino asitlerin miktarına ve bulunduğu çözeltinin pH'sına bağlı olarak değişir. Proteinler izoelektrik noktalarının üzerindeki pH'larda negatif, altındaki pH'larda ise pozitif yüklüdürler.

Biyolojik maddelerin ayrılmasında ilk kullanılan iyon değiştiriciler ise sellülozik iyon değiştiricilerdir. Sellüloz hidrofilik olduğu için, proteinleri denatüre etme eğilimi azdır. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen ve modifiye bir dekstran olan "Sephadex", çapraz bağlı bir agaroz olan "Sepharose" ve çapraz bağlı bir sellüloz olan "Sephacel", küresel tanecikli ve yüksek gözenekli ilk iyon değiştiricilerdir. Son zamanlarda çok çeşitli matriksler kullanılmasına rağmen, protein ekstraksiyonu için en çok kullanılan destek maddesi sellülozdur. Anyon değiştiricilerde pozitif yüklü fonksiyonel gruplar olarak, en fazla aminoetil, trietilaminoetil ve dietilaminoetil grupları kullanılır. Katyon değiştiricilerde negatif yüklü gruplar olarak ise genelde sülfö ve karboksimetil grupları bulunur.

Saflaştırma için en uygun fonksiyonel grubu içeren matriksin seçiminde, proteinin optimum pH sı da dikkate alınmalıdır. Eğer saflaştırılacak protein pl değerinin üzerindeki pH'larda daha kararlı olan bir proteinse, anyon değiştirici kullanılmalı, aksi durumda katyon değiştirici tercih edilmelidir. pH 4-9'un dışında kararlılığını koruyan enzim sayısı çok az olduğundan iyon değişim kromatografisinde kullanılan matriks sayısı da sınırlıdır. En çok kullanılan adsorbanlar selüloz, agaroz ve dekstranın karboksimetil ve dietilaminoetil türevleridir.

Proteinlerin İyon-Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

Proteinler, iyon değiştiricilere iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanır. Bağlanan proteinler ya tampon çözeltinin iyonik gücü kademeli olarak arttırılarak ya da tampon çözeltinin pH'ı değiştirilerek protein yüzeyindeki grupların yükü yok edilir. Bu şekilde kolondan ayrı ayrı elue edilebilirler. Bütün bu işlemler sırasında iyon değiştiricinin yükü sabit kalacak bir pH aralığı seçilmelidir, yoksa tüm proteinler birlikte elue olur. Bağlanma gücü proteinin izoelektrik noktasıyla ve toplam yükü ile ilgilidir.

İyon Deęiřtiricinin Seçimi

Amfifilik maddeler olan proteinlerin net yükleri ortamın pH'ına göre değişir. Düşük pH larda pozitif, yüksek pH larda negatif ve izoelektrik noktada ise sıfır yüklüdür. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları özellikle, karboksil ve amino grupları veya tersiyer amino gruplarıdır. Dolayısıyla anyon değiştiriciler, proteinlerin – yüklü karboksil gruplarını bağlarken protonlanmış amino gruplarını iterler. Genel kural olarak, aspartik asit ve glutamik asit içeren proteinler anyon değişticilerle ayrılırken, lizin, arjinin ve histidin gibi bazik amino asitler içeren proteinler katyon değiştiricilerle ayrılabilir.

Genellikle ayrılmaya çalışılan proteinin izoelektrik noktası bilinmez ve bir protein karışımındaki proteinlerin birbirlerinden ayrılabilmesi için hangi tür bir iyon değiştirici kullanılacağı ancak deneme yanılma yöntemi ile bulunabilir. Az miktardaki bir örnek, tampon çözeltide çözülür ve farklı iyon değiştiricilerin bulunduğu test tüplerine eşit olarak koyulur. 10-15 dakika bekletildikten sonra santrifüjlenerek çözeltinin 280 nm de absorbanısı okunur. Relatif olarak en düşük absorbanısı veren test tüpündeki iyon değiştirici kullanılır.