

BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER-II

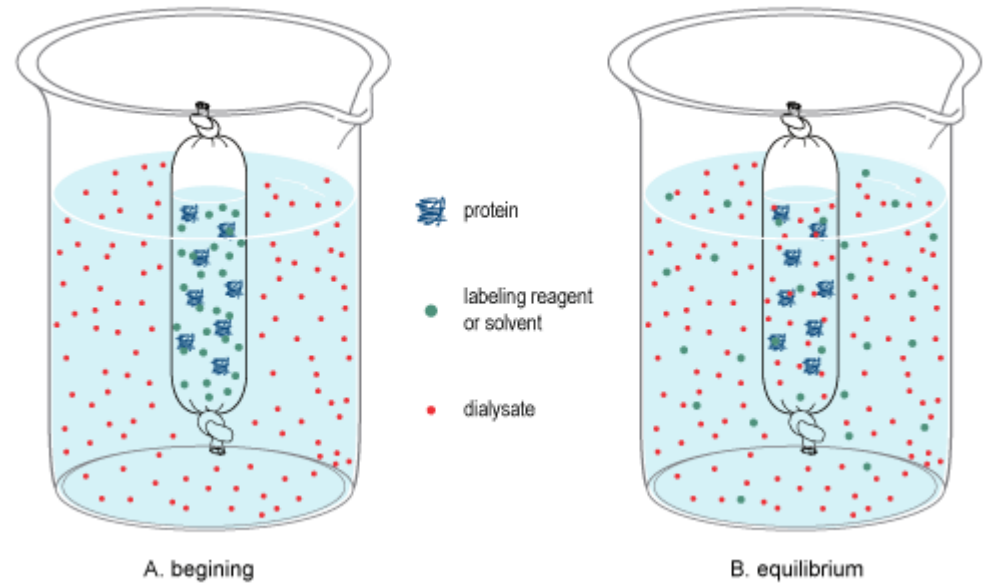
Doç. Dr. Öğünç MERAL

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Diyaliz

- Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır.
- Bu tekniğin en genel uygulaması değişik büyüklüklerdeki molekülleri içeren çözeltinin, makromolekülleri geçirmeyen fakat su vb. küçük moleküllerin geçişine izin veren, yarı geçirgen bir zardan yapılmış diyaliz tüpüne konulup düşük iyonik kuvvette uygun bir tampona (veya saf suya) daldırılması şeklinde gerçekleştirilir.

- Biyolojik moleküllerin ayrımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

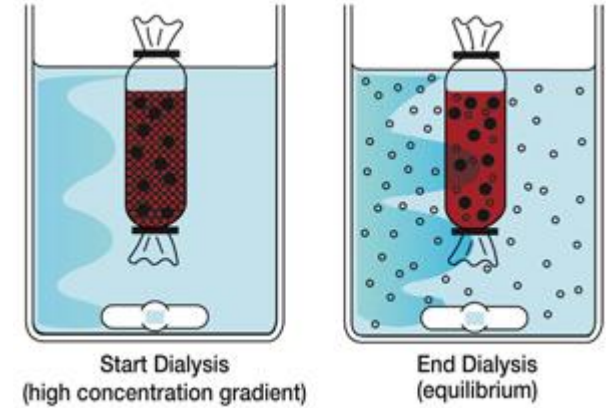
➤ Diyaliz

- Zarın porları genellikle molekül ağırlığı 10.000 daltondan daha fazla olan makromoleküllerin geçisine izin vermeyecek kadar küçüktür.
- Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki su (ve küçük iyonlar) dışarı çıkarken içeride ayrılmı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır.
- Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Diyaliz

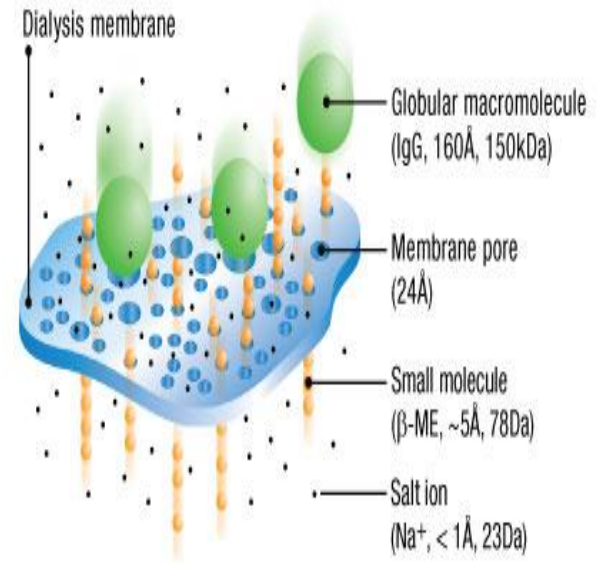
- Dengeye ulaştıktan sonra, eğer dışarıdaki solüsyon taze tamponla yenilenecek olursa, diyalizin devam etmesiyle tüpün içindeki küçük moleküllerin konsantrasyonundaki azalma devam eder.
- Böylece, istenilen ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürebilir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Diyaliz

- Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar çeşitli materyallerden (kollodyon, selofan, selüloz gibi) yapılmış, değişik por çapına sahip malzemelerdir.
- Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğünü belirler.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Diyaliz

- Diyaliz, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek ve/veya çözeltileri konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir.
- Genellikle solüsyonlardaki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmada kullanılır.
- Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri (NAD, FAD gibi kofaktörler veya metal iyonları) de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Liyofilizasyon

- Liyofilizasyon, donmuş durumdaki bir çözücünün (su) vakum altında doğrudan gaz haline geçmesini (buharlaştırmasını) sağlayan süblimasyon temeline dayalı bir tekniktir.
- Genellikle, yüksek ısıya duyarlı materyallerin kurutulması ya da **konsantre edilmesi** için en etkin yöntemlerden biridir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEİ

➤ Liyofilizasyon

- Alet içerisinde, biyolojik materyalin stabilitesini korumak üzere -40 °C dolayında tutulan örneğe yaklaşık 5-25 mm Hg vakum uygulaması yapılır.
- Sulu çözeltilerden oluşan buz **süblimasyona** uğrar.
- Bu koşullarda uçucu hale geçen tüm materyaller ortadan kaldırılır, uçucu olmayan (nükleik asitler, proteinler vb) ise konsantre olurlar.



- Bu şekilde dondurularak kurutulmuş biyolojik materyaller çok uzun süre stabil olarak kalırlar ve yıllarca canlılıklarını korurlar.
- Sıvı içine konulduklarında yeniden çözünürler.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

$$F = m \times \omega^2 \times r$$

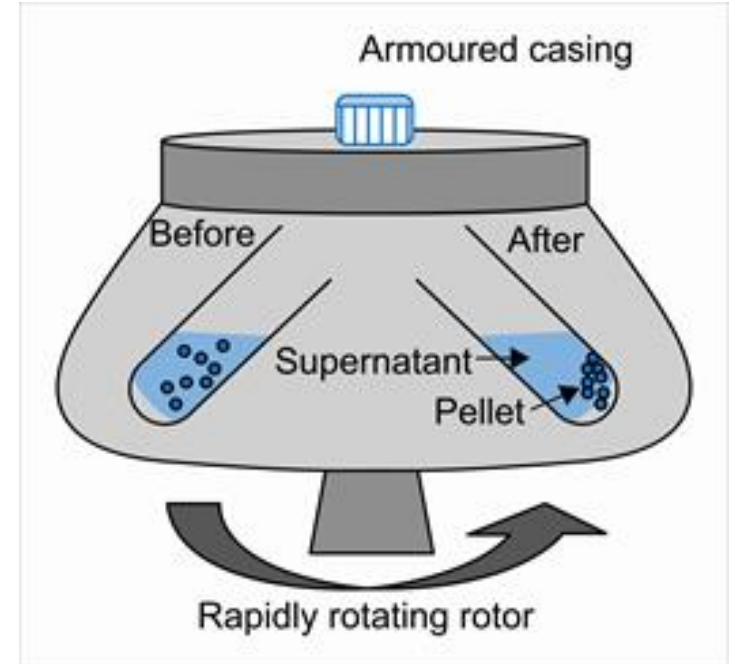
- Bu teknik **santrifüj** adı verilen aletler yardımıyla, yüksek hızda döndürülerek merkezkaç kuvveti oluşturulan bir alanda partiküllerin davranışı temeline dayanır.

- **F** = santrifüj kuvvetinin derecesi
- **m** = çökelen partikülün etkin kütlesi
- **ω** = dönümün açısal hızı (radyan/saniye)
- **r** = göç eden partiküllerin merkezdeki dönüm eksenine olan uzaklığı (cm)

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

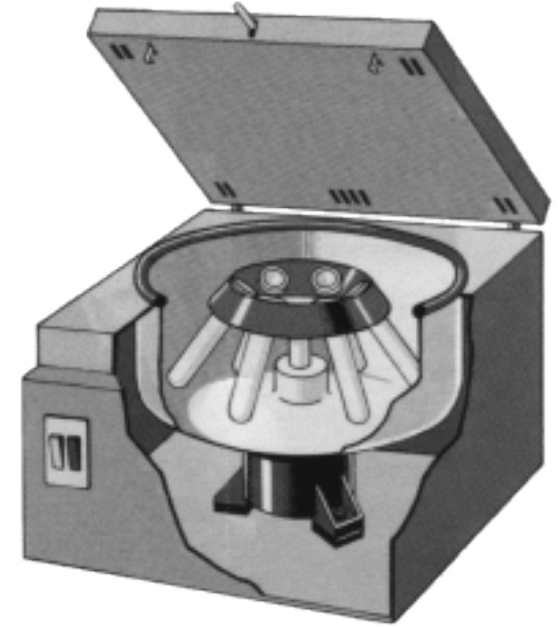
- Çökelen bir partikül üzerindeki kuvvet, dönüm hızı ve partikülün dönüm eksenine uzaklığı ile artar. F değerinin, yerçekimi kuvvetiyle (g) ilgili olarak, daha genel bir ifadesi göreceli (rölatif) yer çekimi kuvveti (RCF) dir.
- Rpm dakikadaki dönüm sayısı (devir/dakika)



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

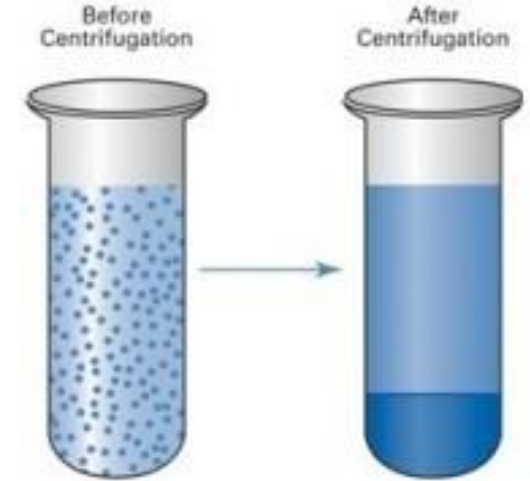
- Santrifüjleme temelde biyolojik materyalin hazırlanmasında, moleküllerin yalıtımı ve saflaştırılmasında kullanılan preparatif bir teknik olduğu gibi saflaştırılmış moleküllerin hidrodinamik özelliklerinin (biçim, boyut, yoğunluk vb) analitik ölçülmesinde de yararlıdır.
- Santrifüjler, temelde dönüm sağlayan bir motor ile tüplerin konulduğu bir rotordan oluşur.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

- **Düşük hızlı santrifüjler**
- Oldukça ağır partiküllerin çökmesinde kullanılan düşük hızlı (devirli) santrifüjlerin en yüksek hızları 4000 – 5000 devir / dakikadır. (3000 g)
- Bu aletler genelde oda sıcaklığında çalışırlar ve sıcaklık kontrolleri yoktur.
- Bu tip santrifüjlerden daha çok sıvı besi ortamları ya da süspansiyonlardaki hücrelerin hızlı şekilde çöktürülmesinde yararlanılır.
- Santrifüjleme sonunda tüpün dibinde hücreleri içeren bir **çökelti (pellet)** oluşur, çökeltinin üstündeki **üst sıvı (supernatant)** dökülerek uzaklaştırılır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

- **Yüksek hızlı santrifüjler**
- Daha duyarlı uygulamalar için, yüksek devirli ve ısı kontrollü santrifüjler gereklidir.
- Sıcaklığın ve hızın kontrol altında tutulması, özellikle yüksek sıcaklığa duyarlı biyolojik materyalin santrifüjlenmesi sırasında önemlidir.
- Maksimum hızları genellikle 12000 – 15000 devir/dakikadır. (11000 – 12000 g)

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

- **Yüksek hızlı santrifüjler**
- Biyolojik örneklerin hazırlanmasında orta ya da yüksek hızlı santrifüjlerin kullanımı gereklidir.
- Bu santrifüjlerde, parçalama sürecinden sonra hücre artıkları yok edilebildiği gibi hücre organelleri (nükleus, mitokondri, kloroplast) ve kimyasal uygulamalar sonrasında makromoleküller (nükleik asit, protein) çöktürülebilir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Santrifüjleme

- **Ultrasantrifüjler**
- En karmaşık yapılı santrifüjlerdir.
- Ultrasantrifüjlerle çok yüksek devirlere ulaşılabilmesi nedeniyle rotorda yüksek derecede ısı artışı meydana geleceğinden çalışma sırasında aletin içinin soğutulması gerekir.
- Ultrasantrifüjler hücre bileşenlerinin (organel veya moleküllerin) ayrılmasında ve saflaştırılmasında, saflaştırılmış makromoleküllerin (saflık derecesi, molekül ağırlığı, yoğunluğu, biçimi, bileşenlerinin özellikleri ve oranının belirlenmesine yönelik olarak) analitik ölçümlerinin yapılmasında geniş çapta kullanılır.

