

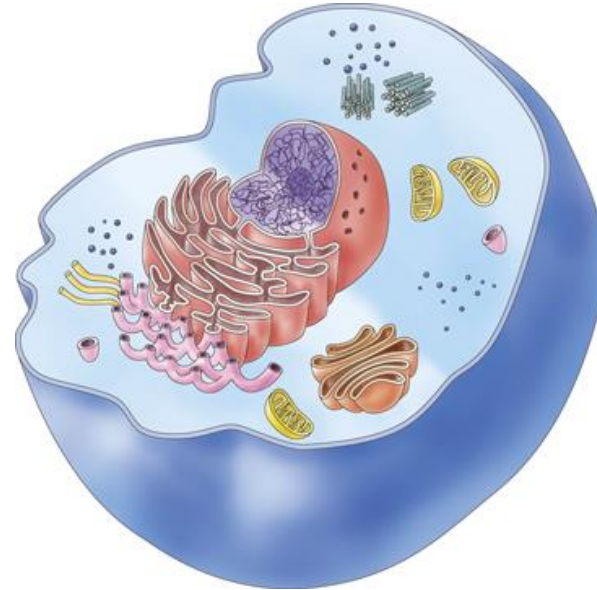
BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Doç. Dr. Öğünç MERAL

BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

- Canlılık olayları hücreler içerisindeki biyolojik moleküllerin yapı ve işlevlerine bağlı olarak ortaya çıkar.
- İnorganik ve organik kimyasal bileşenlerden oluşan hücrelerde, C atomlarından türevlenen, organik bileşikler **yaşam molekülleri** olarak kabul edilirler.

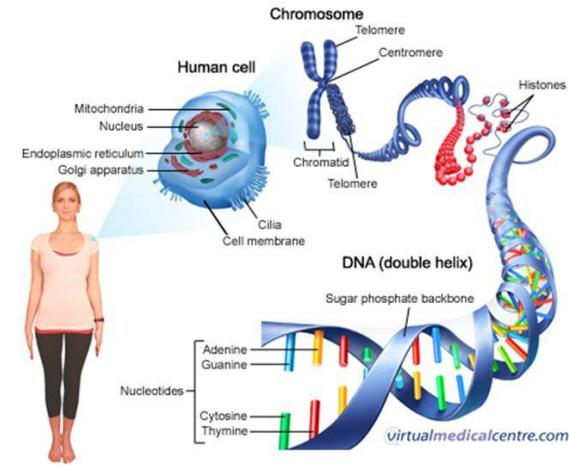
- C,H,N ve O %99
- Makromoleküller arasında özellikle nükleik asitler ve proteinler hücrenin ve dolayısıyla bireyin yapısal oluşumunu ve canlılık işlevleri açısından çok önemli rol oynarlar.



BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

- Nükleik asitler, canlılık özelliklerini yönettikleri için biyolojik açıdan en önemli makromoleküllerdir. Nükleik asitlerin temel rolü **genetik bilginin yaşam boyunca korunmasının** sağlanmasıdır.
- Genetik materyal görevini yüklenen nükleik asitler bireyin oluşumunu ve türe özgü karakterlerini kazanmasını proteinler aracılığıyla yönetirler.
- Proteinler hücrelerde yapısal ve işlevsel temel moleküllerdir.
- Bu nedenlerle, moleküler biyolojiye ilişkin çalışmalarda özellikle nükleik asitlerin ve proteinlerin yapısal ve işlevsel analizlerinde moleküler biyolojik yöntemlerin bilinmesi ve kullanımı büyük önem taşır.

Nucleic Acids and Protein Synthesis

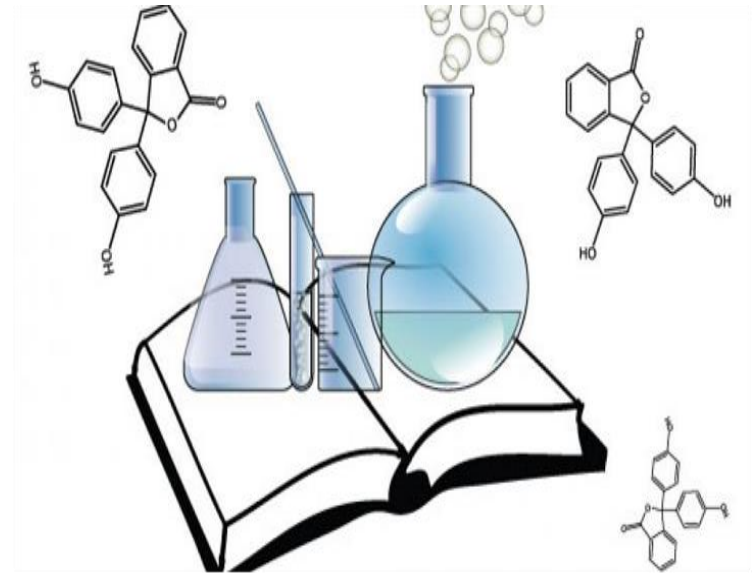


BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

- En basit hücre bile karmaşık bir yapıya sahiptir ve binlerce farklı çeşitteki molekülden oluşur.
- Bu nedenle, öncelikle ilgilenilen molekül grubunu hücredeki diğer kısımlardan ve moleküllerden ayırmak ve daha sonra da, yapılacak çalışmanın ön gördüğü ölçüde, saflaştırmak gerekir.

BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

- Çalışılacak biyolojik molekül grubunun izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen işlemlere **ekstraksiyon** adı verilir.
- Ekstraksiyon
 - Homojenizasyon (parçalama)
 - Separasyon (ayırma)
 - Purifikasyon (saflaştırma)



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

- Çalışılacak molekül grubunu (nükleik asit ya da protein) içeren doku veya hücrelerin çeper ve zar yapıları parçalanıp yok edilir.
- Elde edilen karışıma **homojenat** adı verilir.
- Homojenatta hücre yapısı ortadan kalkmış, serbest ya da organeller içerisinde hücre bileşenleri, membran parçaları ve bir miktar parçalanmamış hücre süspansiyon halinde bulunur.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

- Hücreleri parçalayarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde hücre sınırlarının çeşitli fiziksel ve kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar.
- Hücre elemanlarının işlevlerini kaybetmeden parçalama sağlayan çeşitli teknikler geliştirilmiştir.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Mekanik işlemler

- Bu tip tekniklerin en basit ve ilkel şekli materyali bir **havan içinde öğütmektir**.
- Ezerek parçalama daha gelişmiş şekilde, doku veya hücrelerin sıvı azotta (-196 C) ya da -20 -80'de dondurulduktan sonra soğuk havanda yapılır.
- Donma sonucu kristal hale geçen yapılar toz haline gelene kadar kolaylıkla parçalanabilmektedirler.



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Mekanik işlemler

- Günümüzde mekanik olarak parçalamada daha çok **homojenizatör** adı verilen aletler kullanılmaktadır.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Mekanik işlemler

✓ Karıştırıcı homojenizatör

- Karıştırıcı tipinde olanlar evlerde kullanılanların daha güçlü olanlarıdır. Metal ya da camdan yapılmış özel bir kap içerisinde bulunan, yüksek hızda dönen bıçaklar yardımıyla biyolojik materyaller kesilerek parçalanır.
- Bu tip aletler daha çok hayvan ve bitki doku veya organlarının parçalanması için kullanılmakta olup bakteri gibi küçük boyuttaki organizmalar için uygun değildir.



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Mekanik işlemler

✓ Milli Homojenizatör

- Milli homojenizatör ucunda özel dişleri bulunan metal bir milin çok yüksek devirde döndürülmesiyle parçalama yapar.
- Dişli kısım parçalanacak materyali içeren tampona daldırılır, motor çalıştırıldığında mil döner ve materyal dişler arasında kesilerek parçalanır.



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Mekanik işlemler

✓ Pistonlu Homojenizatör

- Pistonlu homojenizatörler basınç etkisiyle parçalama yapan ve ucunda genellikle teflondan yapılmış bir pistonu bulunan aletlerdir.
- Basınç uygulaması elle veya motor gücüyle yapılabilir.



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Ultrasonik Homojenizatör

- **Ultrasonikasyon**
- İnsanın duyma sınırının üzerindeki frekanslarda (18kHz üstü) ses dalgaları sıvı bir ortamdaki hücrelere uygulandığında parçalanmaya yol açar. Bu uygulama süspansiyondaki su moleküllerinin kinetik enerjilerini artırır; basınç farkları çok fazla sayıda mikro hava kabarcığının oluşumuna yol açar.
- Bu kabarcıklar hızla hareket edip bir süre sonra patlayarak yoğun şok dalgaları yaratır.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Ultrasonik Homojenizatör

- **Ultrasonikasyon**
- Patlama sırasında ses enerjisinin mekanik parçalama enerjisine dönüşümüyle ortamdaki hücreler parçalanır.
- Bu amaçla kullanılan aletler elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış bir prob yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale verir.



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Fiziksel Yöntemler

➤ Dondurma-Çözme

- Hücrelerin çok düşük sıcaklık derecelerinde sonra yeniden ısıtılarak çözündürülmesi ve bu işlerin birkaç kez tekrarlanması parçalanmaya yol açar.
- İşlemin temeli, donan su moleküllerinin hacminin genişlemesi ve hücrelerde oluşan buz kristallerinin hücre zarına zarar vererek parçalanmayı sağlamasıdır.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Kimyasal Yöntemler

➤ Çözücülerin Kullanılması

- Bu uygulamanın prensibi, hücre zarındaki bileşiklerin çözündüğü uygun bir çözücü yardımıyla zar yapısının eritilmesidir.
- Organik çözücüler (etil asetat, toluen) → zardaki lipidler
- Deterjanlar (SDS) → zardaki protein, lipoproteinler



HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

Kimyasal Yöntemler

➤ Enzimlerin Kullanılması

- Bu amaçla kullanılan enzimler özellikler mikroorganizmalar için uygundur.
- Lizozim → bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasındaki beta-1,4-glikozidik bağları hidrolize eder.

HOMOJENİZASYON YÖNTEMLERİ

- Kullanılacak parçalama yöntemi;
 - amaçlanan çalışmaya,
 - kullanılan biyolojik materyalin tipine,
 - izole edilecek molekül grubuna,
 - eldeki olanaklara bağlıdır.
- Buna göre, fiziksel veya kimyasal yöntemlerden ya da iki tipi de içeren karma yöntemlerden yararlanılabilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

- Parçalanmayı ardışık olarak, üzerinde çalışılacak molekül grubunu homojenattaki diğer moleküllerden ayırmaya (**separasyon**) ve saf şekilde elde etmeye (**pürifikasyon**) yönelik bir seri işlem uygulanır.
- Homojenattaki membran parçalarını, parçalanmış doku veya hücrelerin uzaklaştırmak amacıyla uygulanan ön ayırma işlemlerinden sonra elde edilen ve çalışılacak molekülle birlikte birçok molekülü içeren karışıma ham **özüt** denir.
- Ham özüt bazı biyokimyasal analizlerde doğrudan kullanılabilirdiği gibi moleküler biyolojik çalışmalarda ilgilenilen molekül, hedeflenen saflık derecesine göre uygulanan yöntemlerle, ham özütteki diğer moleküllerden ayrılır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

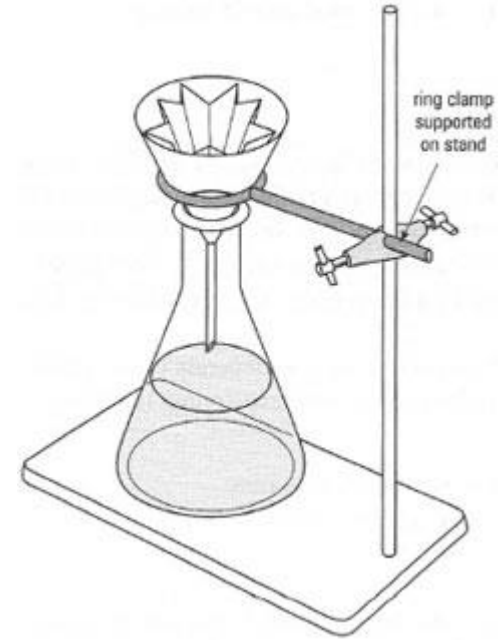
- Bu yöntemler karışımdaki molekül gruplarının genellikle;
 - çözünme özelliklerine
 - yoğunluk, elektriksel yük gibi fiziksel karakteristiklerine
 - diğer moleküllerle ilgisine

göre birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan işlemleri kapsarlar.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Süzme (Filtrasyon)

- Homojenatın filtre edici bir materyalden geçirilerek, süspansiyonda bulunan partiküllerin sıvı kısımdan ayrılmasıdır.
- Bu yolla, kullanılan filtre edici materyalin gözeneklerin çapına göre, filtreden geçen kısımda belli büyüklükte partikül bulunabileceği gibi bunların tamamı da filtrenin üzerinde kalabilir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

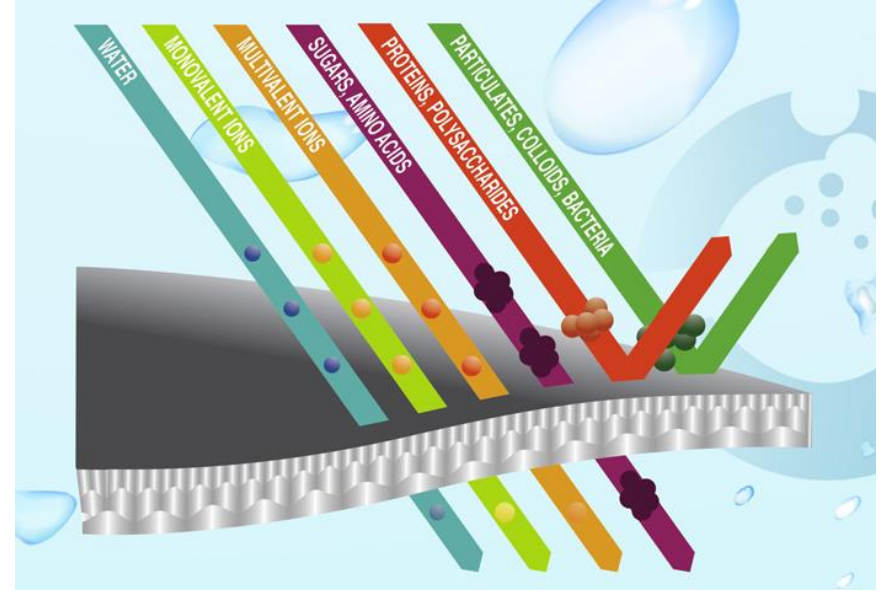
➤ Süzme (Filtrasyon)

- En çok kullanılan filtre edici materyaller;
 - Filtre kağıdı
 - Sinterli cam huni
 - Membran filtre
- Kullanılan sisteme vakum veya basınç uygulanarak süzme işlemi hızlandırılabilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Ultrafiltrasyon

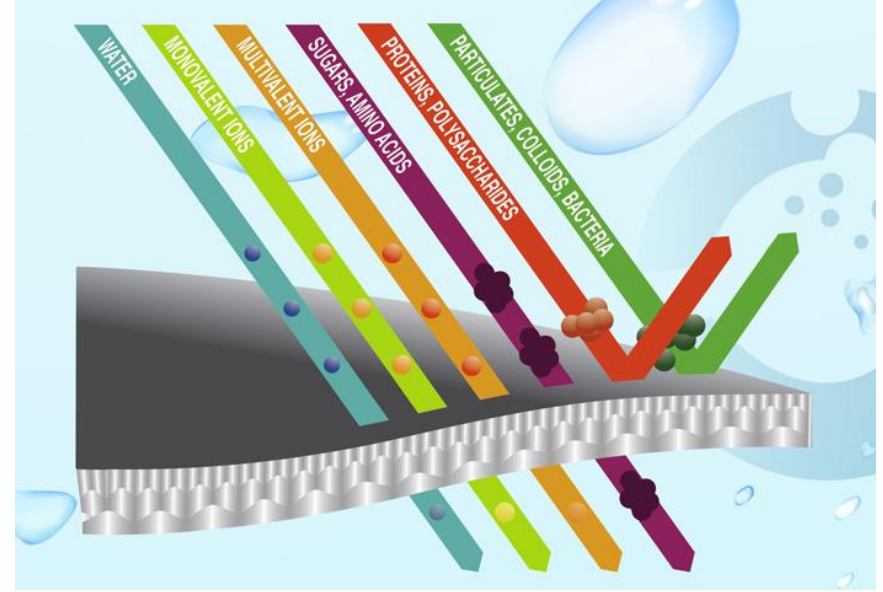
- Membran filtrelerle yapılan bu filtrasyonda moleküllerin boyut, biçim ve/veya yüklerine göre ayrımları sağlanır.
- Ayrımı yapılacak molekülleri içeren solüsyon dışarıdan oluşturulan bir kuvvetle yarı geçirgen bir zardan geçmeye zorlanır.
- Filtrelerden sıvının geçişini sağlamak için emme, basınç ya da santrifüj kuvveti gerekir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Ultrafiltrasyon

- Ultrafiltrasyonda kullanılan zarların por çapı genelde 1-20 nm arasında değişir.
- Kullanılan zarın por çapı çalışılan molekülün geçmesine izin vermeyecek şekilde olmalıdır.
- Ultrafiltrasyonun çalışma prensibinin, filtre tarafından partikül veya moleküllerin fiziksel yakalanması sonucu ayrılmalarına dayandığı kabul edilmektedir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Çöktürme

- Bu yolla ayırma, su veya başka bir çözücü içeren bir ortamda istenilen ya da istenmeyen moleküllerin çöktürülerek katı halde ayrılması temeline göre yapılır.
- Amonyum ve sodyum sülfat → proteinleri
- İzopropanol, etanol → nükleik asitler

