

BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Doç. Dr. Öğünç MERAL

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Kromatografi, katı veya sıvı bir durağan fazın yüzeyine veya içine uygulanmış bir karışımdaki moleküllerin, sıvı veya gaz halindeki bir hareketli faz aracılığıyla hareket ederken birbirlerinden ayrılmaları temeline dayanır.
- Bu ayrılmaya yol açan etkenler; moleküllerin tutunma (adsorbtion), dağılma (partition), iyon değişimi, ilgi (afinite) özellikleri ya da molekül ağırlıklarındaki farklılıklardır.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

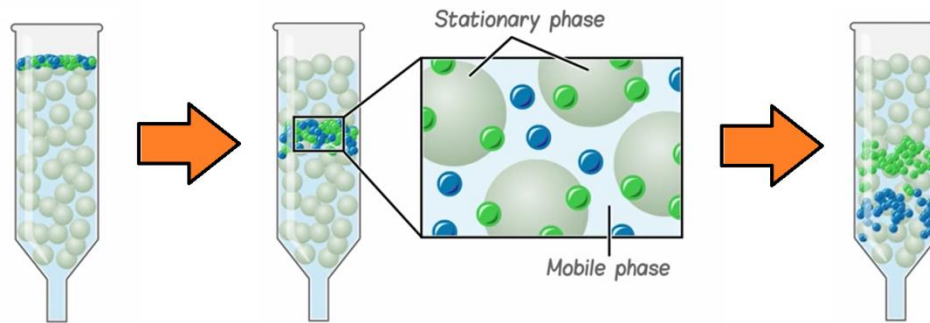
- Bu farklılıklar nedeniyle karışımındaki bileşenlerden bazıları durağan fazda daha uzun süre kalırlar ve kromatografi sistemindeki hareketleri yavaş olur; diğerleri ise hareketli faza daha çabuk geçer ve sistemden daha hızlı ayrılır.

Kromatografi tekniğinde yararlanılan **temel prensip**, bir karışımındaki çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilirken farklı hızlarda hareketi sonucu ayrılabilmesidir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Kromatografi tekniğinin temelinde şu unsurlar yer alır.
- Sabit faz: Bu faz daima "katı" veya bir "katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı tabakasından" oluşur.
- Hareketli faz: Bu faz daima bir "sıvı" veya "gazdan" oluşur.

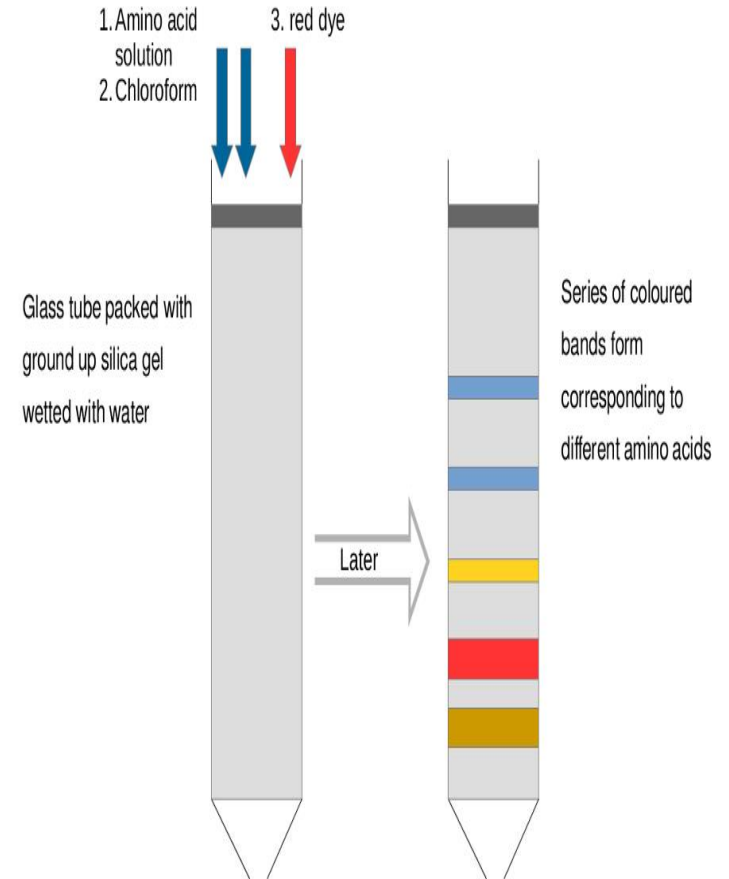


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Kromatografi yöntemleri, çözünen molekülleri durağan faza bağlama veya onunla etkileşime girme biçimine göre iki tipe ayrılır.
- Dağılım (partition) kromatografisi çözünen iki sıvı faz arasındaki dağılımına dayanır. Uygulamada doğrudan iki sıvı kullanılabildiği gibi, (ince tabaka ve gaz-sıvı kromatografisi) sıvılardan biri katı bir destek üzerinde sabitleştirilmiş olabilir. Araştırılan örneğin bileşenlerinin iki faz arasındaki dağılımı temelde onların çözünürlük farklarından kaynaklanır.

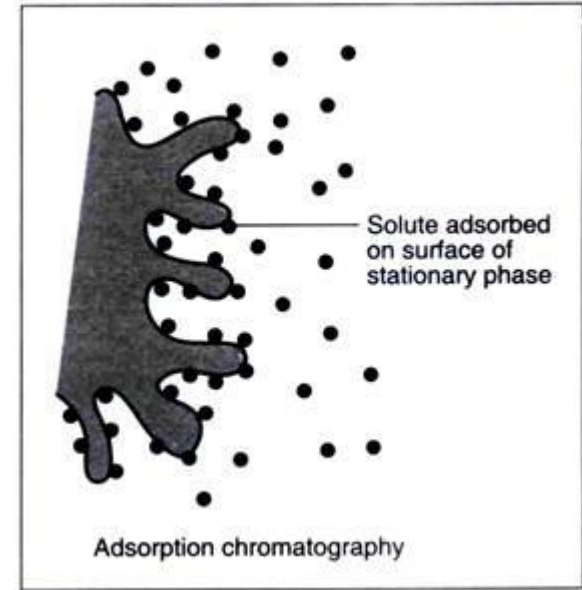
Partition chromatography



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Tutunma (adsorpsiyon) kromatografisinde örnekteki moleküller için sınırlı sayıda özgül bağlanma yerleri içeren bir durağan faz ya da destek bulunur.
- Bu kromatografi tipi moleküller ile durağan fazın yüzeyindeki bağlanma yerleri arasındaki özgül etkileşimlere dayanır. Moleküllerle destek arasındaki çekim kuvvetleri iyonik, hidrojen bağları oluşumu veya hidrofobik etkileşimler olabilir ve bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Dağılım esasına dayalı kromatografi yöntemleri özellikle amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri gibi küçük moleküllerin ayrımı ve tanımlanmasında çok etkilidir.
- Tutunmaya dayalı olanlar (iyon değişim kromatografisi) ise nükleik asitler ve proteinler gibi makromoleküllerin ayrımında daha etkilidir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografi):

- **Dağılım temellidir.**

- Kağıt kromatografisinde destek ortamı suyla yüksek derecede doyurulmuş durumdaki selüloz tabakasından oluşur.

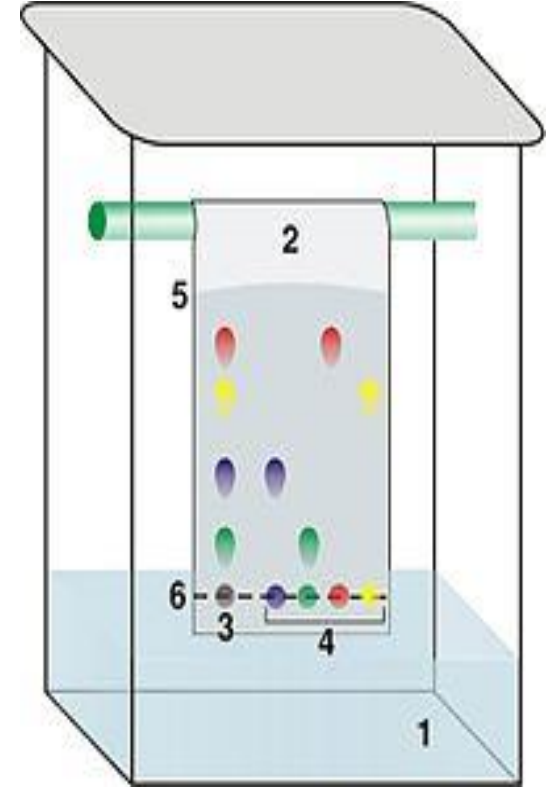
- İnce tabaka kromatografisinde ise ince silika bir jel, selüloz ile kaplanmış cam, aluminyum ya da plastik bir tabaka olabilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

• Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografi):

- Araştırılan örnek genellikle uçucu bir çözücü içerisinde çözündürülür, destek ortamına çok az miktarda damlatılır ve kurumaya bırakılır.
- Daha sonra kağıt ya da ince tabaka içinde az miktarda çözücü bulunan bir kaba konur ve çözücünün kılcal hareketi ile ayırım başlar.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

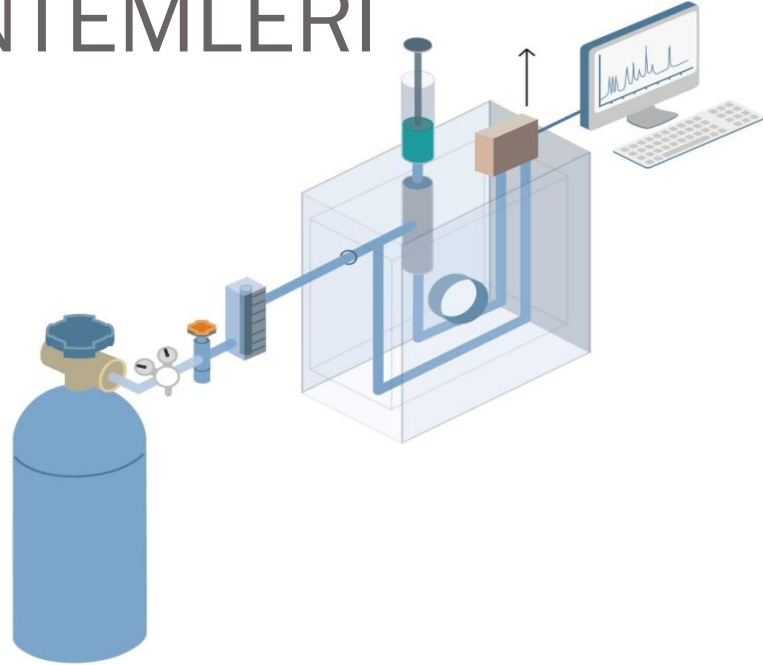
- Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografi):

- Kağıt ve ince tabaka kromatografileri için çok az miktarda örnek yeterlidir, analiz hızlı ve ucuzdur, saptama çok belirgindir.
- Bununla birlikte, bu tekniklerin duyarlılığı pek yüksek değildir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Gaz Kromatografisi:



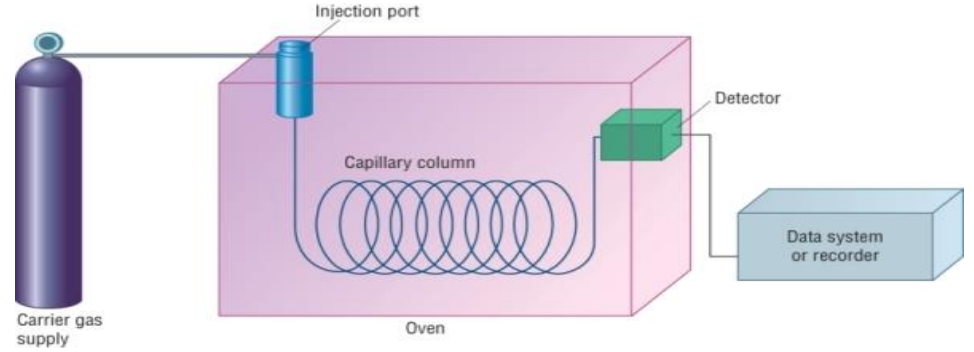
- Kromatografik bir sistemde hareketli gaz faz, durağan faz da inert katı partiküller üzerini kaplayan bir sıvı olduğunda bu tekniğe gaz-sıvı kromatografisi ya da kısaca gaz kromatografisi denir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Gaz Kromatografisi:

- Çalışılan örnek buharlaştırılarak gaz fazına sokulur ve durağan fazdan geçmesi sağlanır.
- Örnekteki bileşenler hareketli faz ile katı destek üzerindeki durağan sıvı faz arasında dağılırlar.
- Durağan faza ilgisi olan moleküllerin kolondaki hareketleri daha yavaş olur.



- Gaz kromatografisi ile ayırım temelde dağılım olayına dayanır. Durağan faz, yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı, paslanmaz çelik veya camdan bir tüp (kolon) içine doldurulur.
- İnert bir gaz (helyum, azot veya argon) halindeki hareketli faz yüksek basınç altında kolondan geçirilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Gaz Kromatografisi:

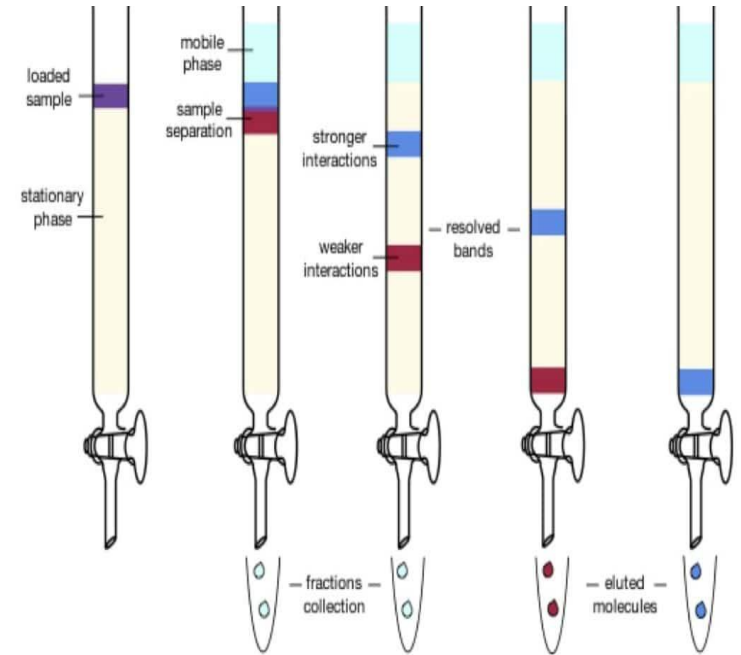
- Gaz kromatografisinde çok küçük moleküllerin son derece iyi ayrılmasını sağlayan, basit, çok yönlü, hızlı bir tekniktir ve çok duyarlıdır.
- En önemli kısıtlama kullanılan örneğin uçucu ve yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı olması gerekliliğidir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Kolon Kromatografisi:

- Katı bir durağan faz ile sıvı bir hareketli fazdan oluşur.
- Durağan faz cam veya plastik bir tüp (kolon) içerisine konur ve hareketli faz (bir çözücü ya da tampon) bu katı tutucudan geçirilir.

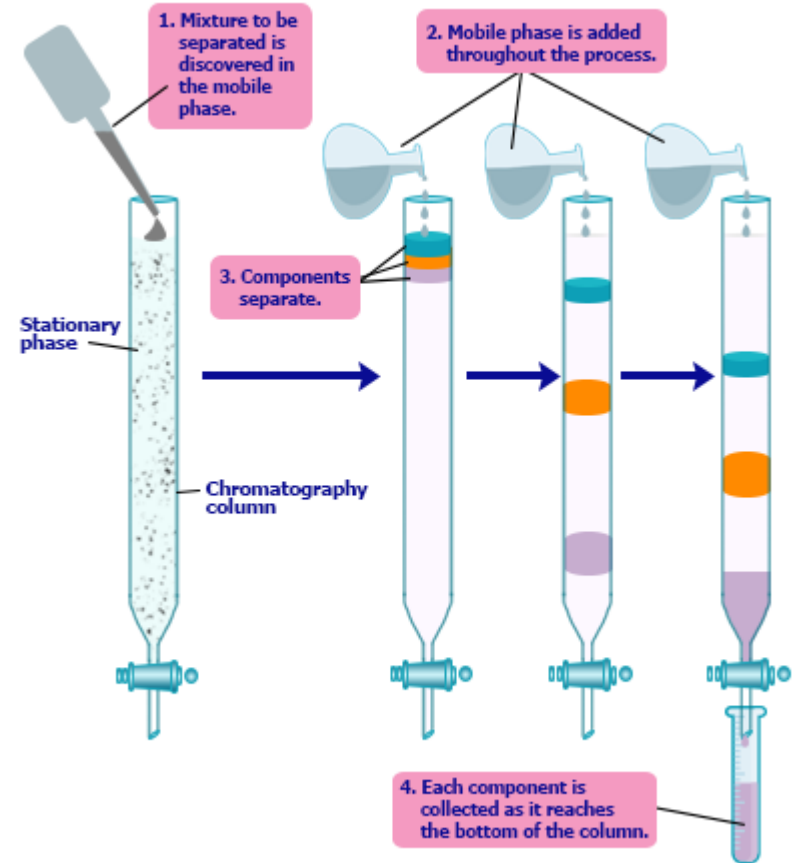


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Kolon Kromatografisi:

- Karışım kolondan geçerken karışımı oluşturan moleküller iki fazdaki tutunma veya dağılma özelliklerindeki farka göre kolonda farklı hızda ilerlerler.
- Kolondan çıkan sıvı fazın fraksiyonlar halinde toplanmasıyla değişik moleküllerin ayrımı yapılabilir.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- Kolon Kromatografisi Türleri:

Jel filtrasyon → büyüklük

İyon değişim → yük

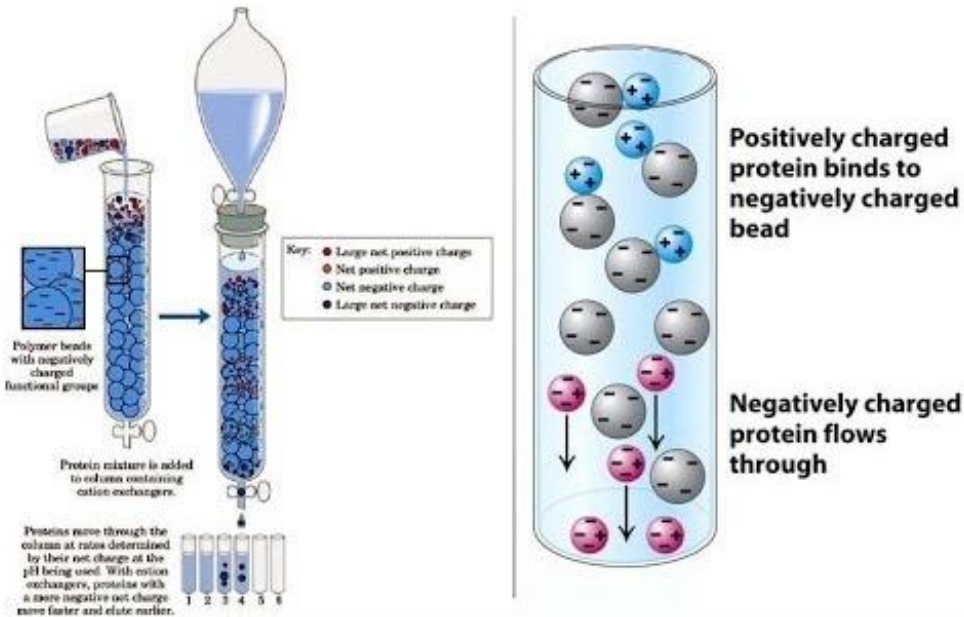
Affinite → bağlanma

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● İyon Değişim Kromatografisi:

- Bu teknik iyonik moleküllerin yüklü bir durağan fazla geriye dönüşebilen elektrostatik etkileşime girdikleri bir tutunma kromatografisi biçimidir.



- İyon değişim kromatografisinde kolon iyonik işlevsel gruplarla etiketlenmiş sentetik reçineden oluşan durağan fazla doldurulur.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● İyon Değişim Kromatografisi:

- İşlemin ilk aşaması kolondaki çözünmeyen özellikteki pozitif yüklü reçinenin tampondaki zıt yüklü iyonlarla çevrilmesidir.
- İkinci aşamada ayrılacak karışımın kolona yüklenmesiyle farklı yüklü moleküllerin iyon değiştirici ortama girmesi sağlanır.
- Reçineninkine göre zıt yüklü olan moleküller durağan faza sıkı fakat geri dönüşebilir şekilde bağlanır.
- Bağlanmanın kuvveti yükün büyüklüğüne ve yoğunluğuna bağlıdır.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

• İyon Değişim Kromatografisi:

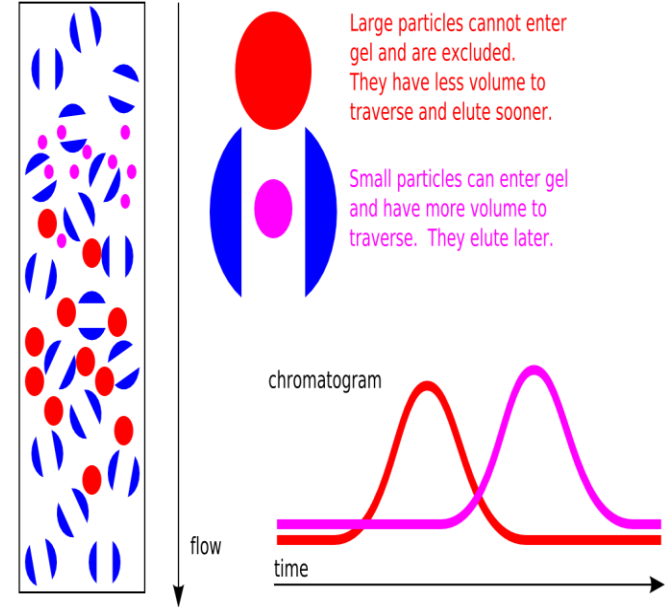
- Nötr veya reçineninkine eşdeğer yüke sahip olanların durağan faza ilgisi çok azdır ya da hiç yoktur.
- Bağlanmış olan moleküller iyonik kuvveti veya pH'sı artırılmış olan bir tamponla kolondan geri alınabilir.
- Tamponun iyonik kuvvetindeki artış bağlı moleküllerin koparılmasına pH'sındaki artış ise molekül veya reçinenin yükünün indirgenmesiyle etkileşim gücünün azalmasına yol açar.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Jel Geçirgenlik Kromatografisi:

- Jel filtrasyonu olarak da adlandırılan jel geçirgenlik kromatografisinde ayırma molekül büyüklüğüne göre yapılır.
- Bu teknik protein, nükleik asit, polisakkarid ve diğer biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında önem taşımaktadır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Jel Geçirgenlik Kromatografisi:

- Jel filtrasyonu için kullanılan bir kolonda durağan faz kontrollü boyutta küçük porlu inert partiküllerden oluşur.
- Farklı boyutlarda moleküller içeren solüsyon devamlı bir çözücü akışıyla kolondan geçirilir.
- Porlardan daha büyük olan moleküller jeldeki partiküllerin içerisine giremezler ve partiküllerin arasında sınırlı bir alanda kalırlar.
- Sonuçta bu moleküller yavaşlamazlar ve kolondan hızla çıkarlar. Partiküllerin içinde ve dışında yayılabilen küçük moleküllerin kolondaki hareketleri ise daha yavaş olur.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi:

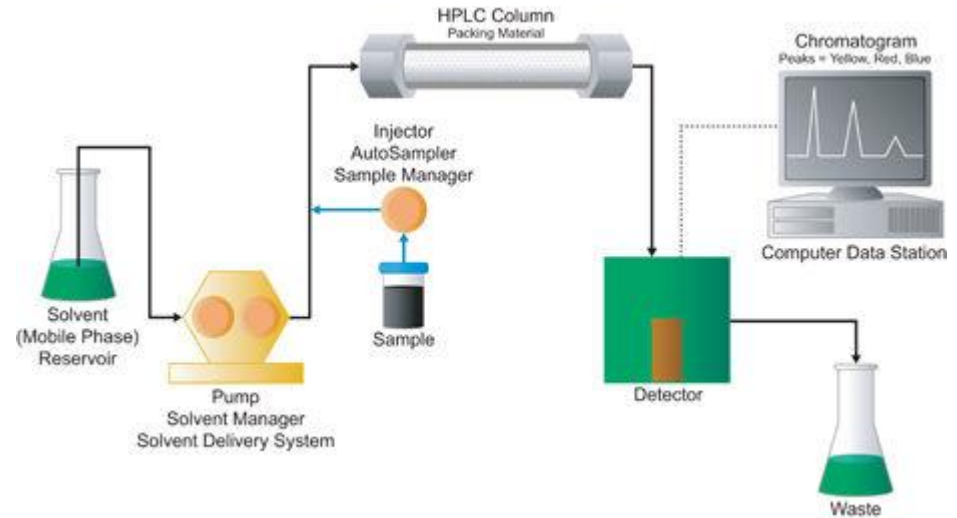
- Aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, nükleik asitler, proteinler, steroidler ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin ayrımının yapılmasında ve tanımlanmasında çok iyi sonuçlar veren bu teknik temelde otomatik hale getirilmiş modern sıvı kromatografidir.
- HPLC'nin klasik sıvı kromatografilere göre önemli üstünlükleri vardır;
 - Ayırıştırma ve analiz hızı daha yüksektir.
 - Kolonları yeniden doldurulmadan ve yenilenmeksizin sürekli kullanılabilir.
 - Ayırma gücünü etkileyen değişkenler sıkı şekilde kontrol edilebildiğinden tekrarlanabilirliği son derece yüksektir.
 - Aletin çalışması ve verilerin analizi kolaylıkla otomatikleştirilir.
 - Büyük boyuttaki ayırım süreçlerine uygulanabilir.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

• Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi:

- Bir hplc aygıtının temel bileşenleri bir çözücü deposu, yüksek basınç pompası, ticari olarak hazırlanmış kolon, dedektör ve yazıcıdır.
- HPLC ve GC sistemleri arasında büyük benzerlik vardır. Sadece, GC'deki taşıyıcı gazın yerini HPLC'de çözücü almıştır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● İlgi (Afinite) Kromatografisi:

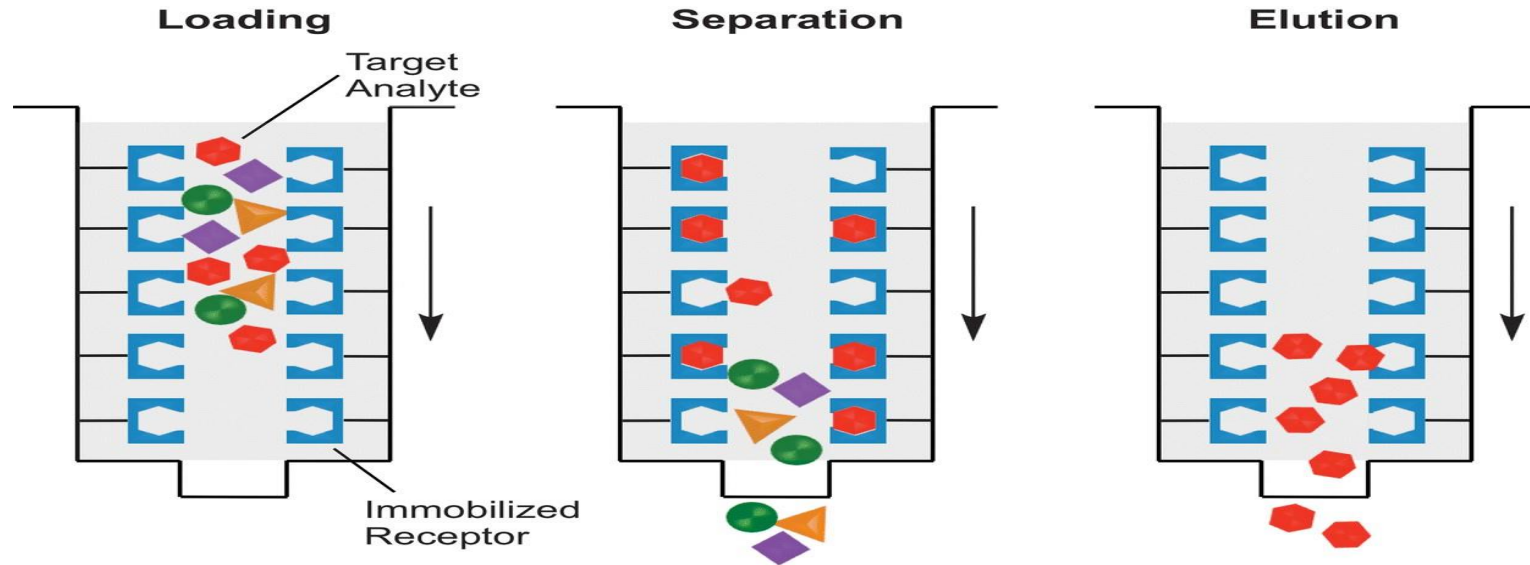
- Afinite kromatografisi biyolojik etkileşim temeline dayanır ve bu nedenle son derece özgül ayırımların yapılabilmesini sağlar.
- Makromoleküllerin çoğunun meydana getirdikleri biyolojik işlevler ligand adı verilen özgül moleküllerle etkileşimlerinin sonucudur.

SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

• İlgi (Afinite) Kromatografisi:

- Biyolojik sistemlerde bir kompleksin oluşumu genellikle bazı yanıtları (immünojenik reaksiyonlar, metabolik sürecin kontrolü, substratın yıkımı) tetikler.
- Biyolojik yanıt moleküler tanıma ve bağlanmanın doğru olmasıyla sağlanır.

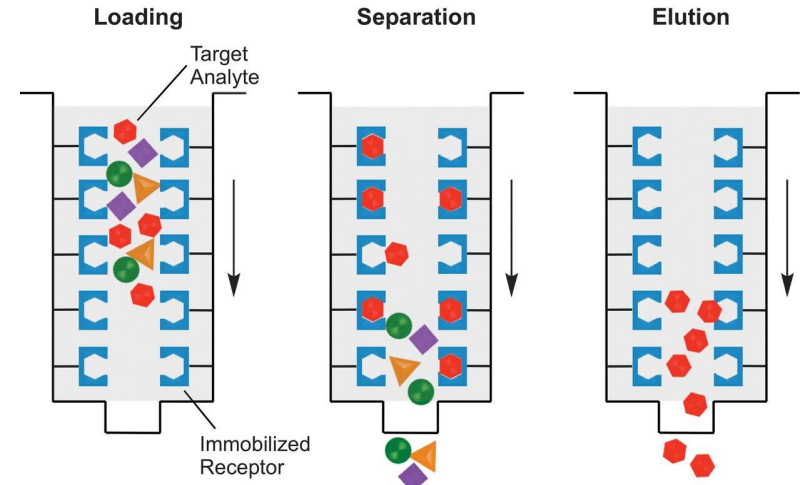


SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

● İlgi (Afinite) Kromatografisi:

- Bu kromatografi uygun ligand moleküllerinin kovalent şekilde bağlanmış olduğu suda çözünmeyen bir durağan faz gerektirir.
- Buna göre ligand moleküller durağan destek üzerinde sabitleştirilir.
- Destek faz istenilen makromolekülleri içeren karışımın geçirileceği kolona doldurulur.
- Kolondan geçiş sırasında ligandı tanıyan ve bağlanan moleküllerin hareketinde diğerlerine göre yavaşlama olur.
- Bağlanmamış moleküllerin yıkamayla kolondan çıkarılmasından sonra, ilgilenilen makromoleküllerin ligandla oluşturduğu kompleksin bozulmasıyla geri kazanılır.



SEPARASYON VE PURİFİKASYON YÖNTEMLERİ

➤ Kromatografi

- İlgi (Afinite) Kromatografisi:

- Bu kromatografi tekniği, hemen hemen tüm biyolojik makromoleküllerin izolasyonu ve saflaştırılmasında kullanılır.