

3. Hafta: Proteinlerin Ekstraksiyonu ve Fraksiyonlanması: Hücre lizis yöntemleri, homojenizasyon, sonikasyon, fransız basınç hücresi, alümina ve kum ile öğütmek, cam boncukla vortekslemek, enzimatik ve deterjan uygulamaları.

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

Proteinler, doğal ortamları dışında genellikle kararsızdır ve hücre içi kompartmanlarla hücre dışı sıvılar arasında önemli farklılıklar gösterirler. Normal biyolojik ortamından ekstrakte edilen her protein, fonksiyonunu gösterebilmek için bazı spesifik koşullara gerek duyar. Bunların iyi belirlenebilmesi ve o proteinle çalışılacağı zaman o koşulların sağlanması gerekir. Hücre içi bir proteinin saflaştırılması için öncelikle hücre, saflaştırılacak proteine zarar vermeden parçalanmalıdır. Bazı tip doku ve hücreleri parçalayan (lize eden) standart yöntemler bulunmakla birlikte, bazı durumlarda aktif proteini maksimum verimle elde edebilmek için alternatif bir parçalama yöntemi geliştirilmesi gerekebilir.

Genel olarak, bir protein izolasyonunun ilk basamağında, doku yıkanır ve parçalanır. Bundan sonraki santrifüj basamağı da çözünür proteinleri, membran fraksiyonu ve çözünmez debridenden ayırmak amacıyla yapılır. Sonuçta saflaştırılan materyal, incelenir veya saklanır. Doku, kan kalıntıları veya diğer hücre dışı materyallerden uzaklaştırmak için tampon çözeltiyle ile yıkanır. Mikrobiyal hücreler ise santrifüjlendikten sonra resüspanse edilir ve tekrar santrifüjlenerek büyütüldüğü ortamın atıklarından temizlenir. Doku parçalanması sonunda ele geçen ve "homojenat" olarak adlandırılan ekstrakt, genel olarak 10 dakika 15 000 g'de santrifüjlenir. Bu işlem sonunda elde edilen supernatant ham ekstrakt (**crude ekstrakt**) adını alır. Pellet (çökelek) ise membran fraksiyonu içermektedir. Eğer ham ekstraktta yüzen partiküller varsa süzgeç kağıdı ile süzülmalıdır. Protein örnekler 40C, -200C, -800C veya sıvı azot içinde (-2000C) saklanmalıdır. Bu aşamada proteinlerin stabilizasyonu için gliserol ilave edilmelidir. Küçük hacimler halinde saklama, yapılacak her işlem için tüm örneğin çözünmesini önleyeceği için oldukça avantajlıdır.

Hücrenin Fraksiyonlanması

Hücre içi farklı fraksiyonların belirlenmesi için o hücrenin parçalanması (lize edilmesi) ve her bir kompartmanın birbirinden ayrılması gerekir. Bu olaya "hücre fraksiyonlanması" denir. Bunun için önce hücrenin parçalanması, daha sonra da homojenattaki organel ve partiküllerin birbirinden ayrılması gerekir. Hücre lizisi için çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır, bu yöntemler parçalanacak materyale göre farklılık gösterir.

En fazla kullanılan hücre lizis yöntemleri

- 1- Homojenizasyon,
- 2- Sonikasyon,
- 3- Fransız Basınç Hücresi,
- 4- Öğütmek,
- 5- Cam boncukla vortekslemek,
- 6- Enzimle sindirim,
- 7- Deterjan ile lizis,
- 8- Organik çözücüyle lizis,
- 9- Osmotik şok ve
- 10- Dondurma–Eritme lizisidir.

Homojenizasyon

Homojenizasyon yumuşak dokuların parçalanmasındaki önemli yollardan biridir. Homojenizasyon işlemlerinde, dokular blenderda doğranabilir veya cam bir kap içinde teflon bir kol ile sıkıştırılarak ezilebilir.

Sonikasyon

Sonikatör, vibrasyonlarla hücre duvarı veya membranı parçalanarak gerçekleştirilir. Öncelikle sonikatör probu örnek içine daldırılır ve titreşim şiddeti ayarlanır. Sonikasyon ile parçalama işleminde genellikle plastik test tüpleri kullanılır. Bu yöntemde lizis süresi 5-10 dakikadır. Sonikasyon süresi sonunda hücrelerin parçalanma derecesi faz kontrast mikroskobu ile kontrol edilebilir. Bu yöntem E. Coli, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae ve homojenize beyin dokusu gibi birçok örnek için başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Fransız Basınç Hücresi (French Pressure Cell)

Bu yöntemde örnek yüksek basınç altında bulunurken aniden atmosferik basınca geçilir ve böylece hücre lizisi gerçekleştirilir. Bu şekildeki hızlı basınç değişikliği hücrelerin patlamasına neden olmaktadır. Bu yöntem genellikle bakteri ve maya hücrelerinin lizisinde kullanılır.

Alümina veya Kum ile Öğütmek

Bu tür sürtünmeyi arttırıcı bir materyalle yapılan öğütme işlemi genellikle tek hücreli organizmalar için kullanılır. Bu işlemde kullanılan maddeler oldukça ucuzdur, ancak materyal en az 30 gram olmalıdır. Lizis süresi,

Enzimatik Uygulamalar

Enzimatik yollarla hücre parçalanması işlemi, mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Lizis süresi 15-30 dakikadır. Genel olarak hücrelerin parçalanması amacı ile lizozim enzimleri uygulanmaktadır.

Deterjan ile Lizis

Deterjan ile hücre lizisi, hayvan hücresi kültürleri için çok kullanılmaktadır. Düşük deterjan konsantrasyonunda yeterli hücre lizisi sağlanabiliyorsa, bu yöntem proteinlerin ekstraksiyonunda diğer lizis yöntemlerine göre tercih edilir. Lizis süresi 20-90 dakika arasında değişmektedir. Deterjan olarak % 0.1 - 0.3 konsantrasyonunda Triton X -100 önerilmektedir. Bunun yanısıra iyonik deterjanlar (SDS, LiDS, sodyum kolat, sodyum deoksikolat), non iyonik deterjanlar (Triton X -114, Nonidet P - 40, oktilglukozid, Tween 20 gibi) ve zwitteriyonik deterjanlar (CHAPS, Zwittergent 3 -14) da kullanılmaktadır. Bu yöntem ile ekstraksiyon sonrası proteinlerin stabilizasyonu için ekstrakta % 50'lik gliserol eklenmesi gerekir.

Organik Çözücü ile Lizis

Organik çözücü ile hücre lizisi bakterilere uygulanmaktadır. Bu yöntem ile parçalanmış hücreler filtre üzerinde tutulur ve burada antikor veya nükleik asit problemleri ile inkübe edilebilir.

Osmotik Şok ile Lizis

Hücreler bir hücre duvarı ile korunmamışsa, hipotonik çözelti içinde osmotik şok etkisi ile parçalanabilir. Bu yöntem genellikle eritrositlere uygulanmaktadır.

Dondurma - Eritme Lizisi

Dondurma eritme işleminin birkaç kez tekrarlanması, hücre parçalanmasına neden olabilmektedir. Bu yöntem özellikle denatürasyona dayanıklı ve proteolizden korunmuş stabil proteinlerle çalışıldığında uygundur.