

4. Hafta: Çözünürleştirme ve Berraklaştırma: Membran proteinlerinin çözünürleştirilmesi için deterjan uygulamaları ve kullanılan deterjanlarla ilgili parametreler.

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

Gen mühendisliğinde bakteri hücrelerinde (özellikle *E.coli*) yüksek düzeyde protein üretilmektedir. Hücre parçalanmasından sonra santrifüjle elde edilen protein agregatları %50 saflıktadır. Ancak genelde aktif formda değildir. Organellerdeki protein, monomerik veya multimerik yapıda, indirgenmiş veya yükseltgenmiş olabilir. Bu elde edilen protein agregatları önce çözülür daha sonra üç boyutlu yapı oluşumu sağlanarak doğal aktivitelerine ulaştırılır. İlk aşamada hücreler, sonikasyon, fransız basınç hücresi veya lizozim-deterjan uygulamasıyla süspansiyon edilir. Çözünme basamaklarında dikkat edilmesi gereken değişkenler, pH, inkübasyon sıcaklığı, çözücü ile işlem süresi, çözücünün iyonik içeriği, çözücünün derişimi, toplam protein miktarıdır.

Ekstratın Optimizasyonu

Hücre parçalanması sağlanıp ekstrakt elde edildikten sonraki işlemlerde saflaştırılacak proteinin kendi özellikleri yanında, içinde bulunduğu çözeltideki diğer maddeler ve diğer proteinler de oldukça önemlidir. Böyle bir ortamda diğer proteinler yanında, fosfolipidler, nükleik asitler gibi yüklü bileşikler ve iyonlar da bulunmaktadır. Bir hücre sitoplazmasının iyonik gücü 0.15–0.2 M arasındadır. Bu şartlar altında sitoplazmik proteinler çözülmüş durumda ve hareket halindedir. Tüm çözünür hücre bileşenlerinin ekstrakte edilebilmesi için kullanılan tamponun iyonik gücü ve pH'sı fizyolojik şartlara yakın olmalıdır. Mitokondri, lizozom, peroksizom gibi organellerin izolasyonunda ozmotik strese bağlı yıkılımı önlemek amacıyla izosmotik ortam kullanılmalıdır. İyonik tuz çözeltileri, membrandaki periferik proteinleri uzaklaştırdığı için kullanılmamalıdır.

MEMBRAN PROTEİNLERİNİN EKSTRAKSİYONU

Membran proteinlerinin saflaştırılmasında deterjanlar çok fazla kullanılır. Membrana bağlı proteinlerin çözünürleştirilmesinde kullanılan deterjanların, hidrofilik baş grupları ve

hidrokarbon zincirleri içeren hidrofobik kuyruk kısımları vardır ve yüzey aktif amfifilik moleküllerdir. Periferel proteinler ortamın iyon şiddeti ve pH'ı değiştirilerek kolayca çözünür hale getirilir. Bu proteinler genellikle sulu ortamda çözünür ve kolayca membrandan ayrılır. İntegral membran proteinleri, membrana hidrofobik kısımları ile bir veya daha fazla bölgeden bağlıdır. Membran proteinlerinin çözünür hale gelmesinde deterjanlar ve proteolitik enzimler kullanılır.

Deterjanlar, çözünürleştirme ajanı olarak etki göstermelerinin yanısıra elektroforetik yöntemlerde, membran proteinlerinin kristallendirilmesinde, immunoassay veya diğer protein ve enzim analiz ortamlarında katkı maddesi olarak da kullanılır. Deterjanlarda molekülün hidrofobik ve hidrofilik kısımları bir arada olduğu için, miseller oluşturarak çözünürlük sağlarlar. Bunların hidrofobik kısımları düz, dallanmış zincirli veya steroid iskeletlerden oluşabilir. Hidrofilik kısımlar ise iyonik, non iyonik, basit veya kompleks olabilir.

Deterjanlarla ilgili bazı tanımlamalar aşağıda verilmektedir.

Deterjan Agregasyon Sayısı

Deterjanlardaki ortalama monomer molekülü sayısına agregasyon sayısı adı verilir ve bu sayı deterjan konsantrasyonu arttıkça artar.

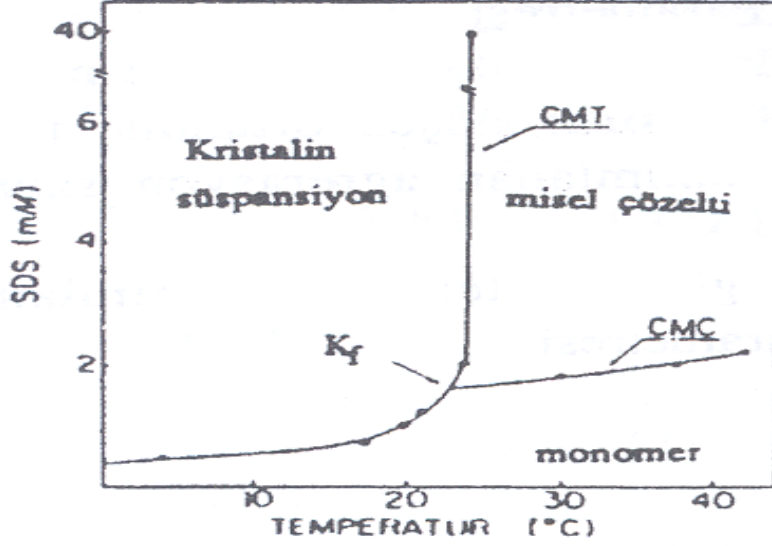
Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC)

Miseller deterjan moleküllerinin apolar kısımlarının iç merkeze, polar kısımlarının ise dış merkeze yönelmesiyle oluşmuştur. Düşük deterjan konsantrasyonlarında yalnızca monomerler, yüksek deterjan konsantrasyonlarında ise hem monomer hem de miseller denge halindedir.

Kritik Misel Sıcaklığı (CMT)

Deterjan ve çözücünden oluşan sistemin hidrate kristalin formdan izotropik misel formuna dönüştüğü sıcaklıktır. CMT, deterjan-çözücü sisteminin sıcaklık ve konsantrasyona bağımlı faz diyagramlarından bulunabilir. CMT yaklaşık olarak kristalin hidrokarbon zincirinin

eridiği noktadır. CMT safsızlıktan çok etkilenir. Bazı yayınlarda rastlanılan Kraft noktası (TK) ında CMC de CMT ye eşdeğerdir.



Deterjan Seçimi

Deterjan seçiminde en önemli nokta, protein veya enzimi fonksiyonel formda tutabilmektir. Bu nedenle proteinin çözünürlük ve kararlılığını garanti altına alabilecek koşullar sağlanmalıdır. Sıcaklık, pH, iyonik şiddet, ve proteinin spesifik iyon gereksinimleri göz önüne alınmalıdır. Bu nedenle deneme yanılma yöntemleriyle gerekli çalışmaların yapılması gerekir.

Deterjan-Protein Etkileşimi

Deterjanlarla proteinlerin etkileşimleri genel termodinamik yasalara uygun olarak gerçekleşir. Deterjanların uzun zincir grupları proteinlerle hidrofobik, baş grupları ise hidrojen bağı ve iyonik etkileşimlere girerler. Yüklü deterjanlar proteinlerin hidrofobik

bölgeleri dışında diğer bölgelerle de etkileşime girer. Sodyum dodesil sülfatın (SDS) proteinleri denatüre edici etkisi katyonik deterjanlardan fazladır.

Yumuşak bir deterjan olan Triton X-100, membran proteinlerinin çözünürleştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tampon Etkisi

Çözünürleştirmede kullanılacak tampon derişimi en az 25 mM ve pH'ı pKa değerine yakın olmalıdır. Uzun zincirli karboksilik asitlerin iki değerlikli katyonlarla çözünmez kompleks oluşturmaları da iyon değıştirici kromatografi ve elektroforez uygulamalarında sorun yaratmaktadır.

Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığa bağılı olarak deterjan özelliklerinde farklılıklar olabilmektedir. Bulutlanma noktası olarak tanımlanan sıcaklıkta miselde meydana gelen genişlemeyle deterjanlar susuz faza ayrılırlar. Bu etki, protein saflaştırmada üstünlük sağlasa da elektroforetik yöntemlerde olduğu gibi bölgesel ısınmalar deterjan özelliklerinin dolayısıyla deneysel sonuçların farklı olmasına neden olacaktır.