

**5.Hafta:** Protein Ekstratının Deriřtirilmesi: Tüp ve yığın disk santrifüjleri, yoğunluk gradiyenti, gradiyentin fraksiyonlanması, flokülasyon, mikrofiltrasyon, liyofilizasyon.

**Prof. Dr. şule Pekyardımcı**

## **Santrifüj**

Homojenattaki subsellüler fraksiyonların ayrılması, santrifüjleme işlemleriyle yapılır. Birbirlerinden farklı boyut, yoğunluk ve şekilde bulunan organeller veya partiküller santrifüjlendiğinde farklı hızlarda sedimente olurlar.

Diferansiyel santrifüjleme ile, bir karışımındaki partiküller boyutlarının farklılığına göre ayrılırlar. Homojenat, relatif santrifüj kuvvet (RCF) arttırıldıkça fraksiyonlarına ayrılır. Bu teknikle, partiküller boyutlarına göre büyükten küçüğe doğru ayrılır. Ancak bu yöntemde Başlangıçta santrifüj tüpündeki materyal, homojen bir dağılımda olduğu için pellet her zaman kontamine haldedir.

Diferansiyel ve gradient-dansite santrifüjleri birlikte uygulandığında hücrelerdeki değişik kompartmanlar elde edilebilir. Hücre organelleri elektron mikroskobu ile belirlenebildiği gibi, organellere spesifik olan marker enzim aktiviteleri ile elde edilen fraksiyonların saflığı ile ilgili bilgi edinilir.

## **Diferansiyel Santrifüj**

Merkez kaç kuvveti kademeli olarak arttırılarak homojenat fraksiyonlu olarak ayrılır. Bileşimin ayrılması, zamana, devir sayısına, partikül büyüklüğüne ve yoğunluğuna bağlıdır.

## **Yoğunluk Gradient Santrifüj**

Gradient-dansite santrifüjü ile yapılan saflaştırmalar oldukça hassastır. Yoğunluk gradiyenti tekniğinde sakkaroz, gliserin, sezyum klorür kullanılarak oluşturulan gradientlerde santrifüj yapılır. Genellikle sukroz kullanılarak yapılan dansite gradienti üzerine homojenat tabakalandırılır. Bu tür işlemlerde tüpün dibine doğru dansite arttırılmaktadır. Homojenat santrifüjlendiğinde örnek içinde bulunan partikül ve organeller kendilerine benzer dansitede bir zon (bölge) oluştururlar. Bu yöntem düşük santrifüj hızında gerçekleştirilir ve ayırım yoğunluğa göre değil molekül büyüklüğüne göre yapılır.

Gradient-dansite santrifüjleri ile hücrelerdeki değişik kompartmanlar elde edilebilir. Hücre organelleri elektron mikroskobu ile belirlenebildiği gibi, organellere spesifik olan marker enzim aktiviteleri ile elde edilen fraksiyonların saflığı ile ilgili bilgi edinilir.

### **Fraksiyon**

Nükleus

Mitokondri

Endoplazmik Retikulum

Golgi Cisimciği

Lizozom

Mikro Cisimler

Plazma Membranı

Sitoplazma

### **Marker Enzim**

DNA Polimeraz

Süksinat Dehidrogenaz

Glukoz - 6 – Fosfataz

Galaktozil Transferaz

Asit Fosfataz

Katalaz

Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPaz

Laktat Dehidrogenaz