

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİĞİR SERUM ALBUMİNİN İMMOBİLİZE METAL
AFİNİTE MEMBRANLARI KULLANILARAK
SULU ORTAMDAN ADSORPSİYONU

DENİZ SAFİYE ALTUNER

ARALIK 2006

ÖZET

SIĞIR SERUM ALBUMİNİN İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE MEMBRANLARI KULLANILARAK SULU ORTAMDAN ADSORPSİYONU

ALTUNER, Deniz Safiye

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Aralık 2006, 49 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, sığır serum albuminin sulu ortamdan adsorpsiyonu için, yeni bir immobilize metal afinite membranı (IMAM) geliştirmektir. Geliştirdiğimiz IMAM sisteminde, destek materyali olarak, metil metakrilat (MMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerleri kullanılarak, fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlediğimiz, poli(GMA-MMA) polimerini kullandık. poli(GMA-MMA) membranlarına, bir tridentat şelatlayıcı ligand olan iminodiasetikasit (IDA) kovalent olarak bağlanarak, poli(GMA-MMA)-IDA membranı elde edildi. Metal iyonu olarak, bir sınır metali olan Cu(II) seçildi. IDA ve

Cu(II) arasında, koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve albumine spesifik, poli(GMA-MMA)-IDA-Cu, immobilize metal afinite membranı hazırlandı.

poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranının karakterizasyon çalışmaları yapıldı. IMAM membranının, denge şişme oranı, gözenekliliği, FTIR analizi ve SEM yüzey analizi gerçekleştirildi. poli(GMA-MMA) membranına, IDA bağlanmasına pH, sıcaklık ve zaman gibi çeşitli faktörlerin etkisi ayrıntılı olarak incelendi. Karakterizasyon tamamlandıktan sonra, kesikli sistemde sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Adsorpsiyon ortamının pH'nın, sıcaklığının, iyonik şiddetinin, başlangıç konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucu, elde edilen poli(GMA-MMA)-IDA-Cu(II), membranının, albumin adsorpsiyonunun yüksek olduğu ve membranlara non spesifik adsorpsiyonun ise düşük olduğu belirlendi. Albuminin membrandan desorpsiyonunun %87.4 oranında gerçekleştirilebildiği ve membranların kapasitelerinin minimum (~%9) bir kayıpla tekrar kullanılabilir olduğu belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmayla geliştirilen poli(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membranının, histidin içeren çok çeşitli enzimlerin saflaştırılmasında kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler : İmmobilize metal afinite membranı, Sığır Serum Albumini,

İminodiasetik asit, Cu(II), poli(GMA-MMA)

ABSTRACT

THE ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN BY USING IMMOBILIZED METAL AFFINITY MEMBRANES

ALTUNER, Deniz Safiye

Kırıkkale University

Graduate School Of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

December 2006, 49 pages

The purpose of this thesis study is to develop a new immobilized metal affinity membrane (IMAM), for adsorption of bovine serum albumin from aquatic medium. In the IMAM system which we developed, we used poly(GMA-MMA) polymer as support material which we synthesized with photopolymerization method by using methyl methacrylate (MMA) and glycidil methacrylate (GMA) monomers. The poly(GMA-MMA)-IDA membrane was obtained by covalent binding of iminodiacetic acid (IDA) which is a tridentate chelator ligand. As metal ion, Cu(II) was chosen which is an intermediated metal ion. The coordination complex between IDA and Cu(II) was formed and poly(GMA-MMA)-IDA-Cu immobilized metal affinity membrane which is specific to albumin, was prepared.

The characterization studies of poly(GMA-MMA)-IDA-Cu membrane was made. The equilibrium swell ratio, porosity, FTIR analysis and SEM surface analysis of IMAM membrane were realized. The effect of several factors such as pH, temperature and time, on the binding of IDA to poly(GMA-MMA) membrane, were examined in detail. After the characterization studies, the adsorption studies of albumin with the batch system, from the aquatic medium were realized. The effect of pH, temperature, ionic strength, initial concentrations of adsorption medium were investigated. The results of these studies determined that, the albumin adsorption of obtained poly(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membrane is high and, the non specific adsorption of albumin to membrane is low. It was determined that, the desorption of albumin from membrane can be realized as ratio of 87.4% and the membranes are reusable with minimum lost (~9%) in their capacities. Consequently, the usability of poly(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membrane which was developed in this study, to purification of several enzymes contained histidine was determined.

Key Words: : Immobilized metal affinity membrane, Bovine Serum Albumin,

Iminodiacetic acid, Cu(II), poly(GMA-MMA)

TEŐEKKÜR

Bu tez alıőmasının her kademesinde, derin bilgi birikimini, tecrubesini ve kıymetli yardımlarını benden esirgemeyerek, her turlü imkanı tarafıma sunarak, her zaman destek olan, değerli danıőmanım, Hocam, Sayın Prof. Dr. M. Yakup ARICA'ya, saygı ve teőekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalıőmanın gerçekleőtirilmesinde, kıymetli gayretleri ve sonsuz özverisi ile bana destek veren, değerli bilgileri ile daima yanımda olan, samimi yardımlarıyla bana güç veren değerli Hocam, Sayın Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU'na, saygılarımı ve teőekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Gerçekleőtirdiđimiz bu tez çalışmaları sırasında, yardımlarını gördüğüm Sayın, Araő. Gör. Dr. Meltem YILMAZ'a teőekkür ederim.

Deniz Safiye ALTUNER

Aralık 2006, KIRIKKALE

2.3.	İminodiasetik asit ligandının membran yüzeyine bağlanması.....	17
2.4.	İmmobilize Afinite Membranlarının (IMAM) Hazırlanması.....	18
2.5.	İmmobilize Afinite Membranının Karakterizasyonu.....	18
2.5.1.	Denge Su İçeriği	18
2.5.2.	Yoğunluğu.....	19
2.5.3.	Spesifik Yüzey Alanı.....	19
2.5.4.	Yüzey Morfolojisi.....	19
2.5.5.	FT-IR Spektrası	19
2.5.6.	Epoksi Grubu Tayini	19
2.5.7.	İmmobilize bakır iyonu miktarının belirlenmesi.....	20
2.6.	Sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu.....	20
3.	SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....	23
3.1.	İmmobilize metal afinite membranların karakterizasyonu.....	25
3.2.	İmmobilize afinite membranlar ile sulu çözeltilerden albumin adsorpsiyonu çalışmaları.....	28
3.2.1.	Membrana metal iyonu bağlanması işleminin optimizasyonu.....	28
3.2.2.	pH Etkisi.....	29
3.2.3.	İmmobilize metal afinite membran dozunun etkisi.....	32
3.2.4.	İyonik şiddet etkisi.....	33
3.2.5.	Protein konsantrasyonunun etkisi.....	34
3.2.6.	Sıcaklığın etkisi	37
3.2.7.	Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	38
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	39
	KAYNAKLAR	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

1.1. Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması.....	10
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. (A) Metal iyonu ve su molekülleri koordinasyonu, (B) Metal iyonu ve baz molekülünün oluşturduğu koordinasyon.....	8
3.1. İmmobilize afinite membranların hazırlanmasının şematik gösterimi.....	24
3.2. Afinite membranın SEM mikrografı.....	26
3.3. Afinite membranın FTIR spektrumu	27
3.4. İmmobilize memtal afinite membranı ile albumin adsorpsiyonuna pH etkisi...31	
3.5. IMAM dozunun albumin adsorpsiyonuna etkisi	32
3.6. p(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membranları ile albumin adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi	34
3.7. IMAM için belirlenen deneysel adsorpsiyon izotermi	36

1. GİRİŞ

Protein, peptit ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin yüksek miktarda ve yüksek saflıkta üretilebilmesi, özellikle biyoteknolojik alanda yapılan tüm çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin hızlı gelişimi ile, büyük ölçekte enzimlerin ve proteinlerin üretilmesi ve kaynağından (biyolojik sıvılar ya da dokular) verimli bir şekilde elde edilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Bu protein ve enzimlerin yüksek oranda sıvı kültür ortamları ve serum gibi biyolojik akışkanlardan toplanması, basit kromatografik ayırma teknikleri ile mümkün olmaktadır. Kromatografi ile yapılan ayrımlar, moleküllerin yük, büyüklük, şekil ve yüzey karakteristiği gibi özelliklerine dayanır (1-3).

Küre geometrisine sahip materyallerin kullanıldığı dolgulu kolon kromatografisi uygulamaları; uzun işlem süresi gerektirmesi, düşük basınç düşmesi ve gözeneklere difüzyon hızının yavaş olması gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Araştırmacılar tarafından, bu dezavantajları gidermek için çeşitli alternatifler sunulmuştur. Son on yıl içerisinde, geleneksel kolon kromatografisi tekniği kullanılarak biyomoleküllerin ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması işlemine alternatif olarak; kütle transferi kısıtlamalarını minimuma indirmesi nedeni ile, afinite membran uygulamaları daha çok dikkat çekmeye başlamıştır. Afeyan ve arkadaşlarının (4,5) geliştirdiği perfüzyon kromatografik destekleri, 1 µm'den büyük gözenek çapına ve yüksek gözenekliliğe sahiptir. Bu desteklerin kullanımı ile geri basınç önemli derecede azalmış ve saflaştırma işlem kinetiğinde düzelmeler kaydedilmiştir. Membran kromatografisi (MC), membran saflaştırma yöntemleri ile

kolon kromatografisi yöntemlerinin avantajlarını birleştiren bir hibrid saflaştırma yöntemidir. Çözeltinin gözeneklerden konvektif akışı ile kütle transfer direnci azalmaktadır. İmmobilize metal afinite kromatografisi adsorbentleri olarak, şelatlayıcı ligandın immobilizasyonunda bu tip desteklerin kullanımı ile ilgili oldukça fazla örnek vardır (6-12).

Kromatografik uygulamalarda, membran yapıdaki afinite desteklerinin adsorpsiyon özelliklerinin geliştirilmesi ve daha etkili ayırmanın yapılması için farklı yöntemler benimsenmiştir. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanıma sahip olan afinite kromatografisi, yüksek seçicilikte moleküler düzeyde tanımayaya dayalı olan bir ayırma tekniğidir. Afinite kromatografisinde yabancı spesifik ligandlar özellikle boyalar, amino asitler ve metal şelatlar biyospesifik ligandların yerine kullanılmaktadır. Metal şelat afinite kromatografisinde, katı destek malzemesine kovalent olarak bağlanan metal iyonları, hedef moleküle etkileşerek molekülün adsorbente bağlanmasını sağlamaktadır. Afinite membran teknikleri arasında en yaygın olarak; yüzeyde açığa çıkan histidin, sistein, triptofan ve tirozin ya da polihistidin kuyruklu biyomolekülleri içeren proteinlerin saflaştırılmasında çoğunlukla uygulanan, "İmmobilize metal afinite membranları"dır (IMAM). Bu yöntemin üstünlüğü, immobilize metal iyonu ile biyomoleküllerin yüzeyinde yer alan bu aminoasitler arasındaki seçici etkileşimden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, afinite membranına immobilize edilen metal iyonlarının ancak EDTA (etilendiamintetraasetikasit) gibi çok güçlü şelatörlerle yüzeyden uzaklaştırılabilmesi ve immobilize metal afinite membranının kolay rejenerasyonları dolayısı ile protein ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde defalarca kapasitesinde önemli bir değişme olmaksızın kullanıma olanak tanınması bu yöntemin sunduğu diğer avantajlardır.

İmmobilize metal afinite membranlarının hazırlanmasında kullanılacak olan monomer ve/veya polimerlerin seçimi, destek materyalinin kromatografik performansını etkileyen önemli faktörler arasında yer alır. Doğal kökenli polimerik destek materyalleri arasında yer alan agaroz, dekstran, sellüloz ve kitosan iyi birer afinite destekleridir; ancak, mekanik olarak zayıf olmaları ve membran yapıda hazırlanmalarındaki zorlukları, önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu olumsuz işlemsel özellikler araştırmacıları sentetik kökenli polimerik materyallerin geliştirilmesine ve kullanılmasına yönlendirmiştir. Membran yapıda hazırlanabilen akrilik ve metakrilik kökenli polimerik destek materyalleri, biyolojik ortamlardan hedef proteinin ayrıştırılması/saflaştırılması, kontakt lens yapımı, kontrollü ilaç salınım sistemlerinin geliştirilmesi ve yapay damar üretiminde kullanılması gibi, çok çeşitli tıbbi uygulamalar için, geniş ölçekli olarak kullanılmaktadır (13,14). Epoksi grubu taşıyan polimerik materyaller, istenilen geometride hazırlanabilmelerinin yanısıra birçok kimyasala karşı dirençlidir ve yüksek mekanik güce sahiptir. Bu özelliklerine ek olarak, epoksi grubu taşıyan akrilat kökenli materyaller, yüzeylerinde sahip oldukları epoksi grupları aracılığı ile aktive edilerek, farklı ligandların bağlanmasına olanak tanımaktadırlar (13-16).

Yaklaşık olarak, 46 kg/m^3 toplam protein konsantrasyonuna sahip olan plazmada, albumin yüzdesi %70 olarak belirlenmiştir (17). Bir plazma proteini olan serum albumin, toplam molekül kütlesi ve plazma konsantrasyonu ile 25 mmHg'lık normal kolloid onkotik basınca, %80 oranında katkıda bulunmaktadır. Albuminin ilaçların bağlanmasında ve salınmasında, lipitlerin ve endojen maddelerin metabolizmasında görev alması, fizyolojik koşullar altında önemli antioksidan potansiyele sahip olması, endotelial hücrelerde apoptozisi önlemesi gibi birçok

önemli fonksiyonundan ve insan plazmasındaki toplam konsantrasyonundan dolayı, kan plazmasında hayati bir görev üstlenmektedir. Bu nedenlerden dolayı, albuminin, bir biyolojik sıvı karışımı olan serumdan ayrıştırılması ve saflaştırılması, önemli ölçüde ilgi çekmiştir. Klasik ayırma yöntemlerine kıyasla, afinite kromatografisi, sağladığı avantajlardan dolayı, önemli serum proteinlerinin, özellikle de albuminin saflaştırılması işleminde, son yıllarda en çok tercih edilen yöntem olarak öne çıkmaktadır (18-21).

Bu amaçla çalışmamızda, metil metakrilat (MMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerleri ve azoizobutironitril (AIBN) başlatıcısı kullanılarak, UV fotopolimerizasyon yöntemi ile, poli(GMA-MMA) membranları sentezlendi. Tridentat (üç dişli) bir ligand olan imunodiasetikasit (IDA) şelatlayıcı ligandı, yüzeye kovalent olarak bağlanarak poli(GMA-MMA)-IDA membranı hazırlandı. İmmobilize metal şelat afinite membranı (IMAM) oluşturmak amacı ile, şelatlayıcı ligand bağlı membranlar, Cu(II) metal iyonu içeren çözelti ile etkileştirilerek albumine spesifik poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranı sentezlendi. Albumine spesifik IMAM membranının karakterizasyon çalışmaları yapıldı ve kesikli sistemde sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu çalışmaları optimize edilerek, serum proteini olan albumine gösterdiği afinite araştırıldı.

1.1. Kuramsal Temeller

1.1.1. Kromatografi ve Kromatografik Teknikler

Kromatografi, maddelerin, farklı ortamlardaki davranışlarının, birbirlerinden ayrılmalarına yol açması esasına dayanır. Hedef moleküllerin, çoklu bir karışımdan ayrıştırılması ve/veya saflaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılabilir. Maddelerin dağılma oranları değişiktir. Yeni geliştirilen yöntemlerle, moleküllerin izomerleri gibi çok küçük farklılıklara dayanan ayırmalar gerçekleştirilebilmektedir (14,22). Bu ayırmalarda ölçümler, mikrogram seviyesindedir ve çok hassastır. Kromatografik ayırma teknikleri özellikle klinik kimya, biyokimya ve farmosotik kimya, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatografik tekniklerle ürün ayırımı ve ürün elde edilmesi, kompleks biyolojik örneklerden başarılı şekilde, endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilebilmektedir (23-25).

Kromatografik ayırım farklı maddelerin, destek materyali tarafından alıkonma derecesine bağlı olarak, farklı derecelerde dağılması prensibine dayanır. Moleküllerin çeşitli karışımlardan yüksek saflıkta ve tek basamakta ayrıştırılabilmesi için klasik ayırma tekniklerine alternatif yeni yöntemler arayışı halen devam etmektedir. Kromatografinin ilk kez kullanımından (1906) itibaren ayırım özelliklerine bağlı olarak farklı yöntemler geliştirilmiştir. Jel filtrasyonu ya da moleküler dışlama (size exclusion) kromatografisi, proteinlerin şekil ve büyüklük özelliklerine göre ayırım prensibine dayanmaktadır. Bu sistemde farklı gözenek boyutuna sahip destek materyalleri kullanılmaktadır. Gözeneklerin büyüklüğü protein ayırımının esasını oluşturmaktadır. İyon değişim kromatografisi (IEC), yüklü moleküllerin yüklü destek materyalleriyle etkileşimine dayanmaktadır. Hidrofobik

etkileşim kromatografisi ise (HIC) hedef molekül ile destek materyalin sahip olduğu hidrofobik grupların etkileşimini içermektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip bir diğer kromatografik teknik ise, protein ve afinite destek materyalinin yüzey özelliklerine dayanan ayırım şeklidir. Afinite kromatografisi olarak isimlendirilen bu yöntemde, birbirine yüksek afinite sergileyen matriks ve hedef molekül, anahtar-kilit modeline uygun olarak etkileşmektedir (14,17-19,26,27).

1.1.1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi ile, bir hedef molekül, kompleks bir karışımdan, yüksek saflıkta saflaştırılabilmektedir. Bu yöntemde, substrata spesifik bağlanabilmesi için özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekül (ligand ya da bağlayıcı), genellikle polimerik malzemeden, uygun, çözünmeyen, küresel ya da membran formunda olan bir destek (matriks ya da taşıyıcı) üzerine tutuklanır. İzole edilecek olan molekül, analit ya da hedef olarak isimlendirilir. Hedef molekülü içeren çözeltinin, kromatografik kolondan uygun şartlar altında geçirilmesi ile hedef moleküller, matriks üzerine tutuklanmış olan, tamamlayıcı ligand tarafından, seçici olarak yakalanır ve adsorbe edilir (28).

Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar; non-spesifik ligandlar (amino asitler, metal şelatlar ve boya-ligand) ve biyo-spesifik ligandlar (enzim, substrat, koenzim, kofaktör, oligopeptid, protein, nükleik asit, oligonükleotid, antibadi ve antijen) olmak üzere iki grup altında incelenebilir (10). Spesifik ligand taşıyan afinite sorbentlerin hazırlanma aşamalarında, destek malzemelerine bağlanması ve biyolojik aktivitelerini uzun süre korumaları mümkün olmamaktadır. Bu doğrultuda,

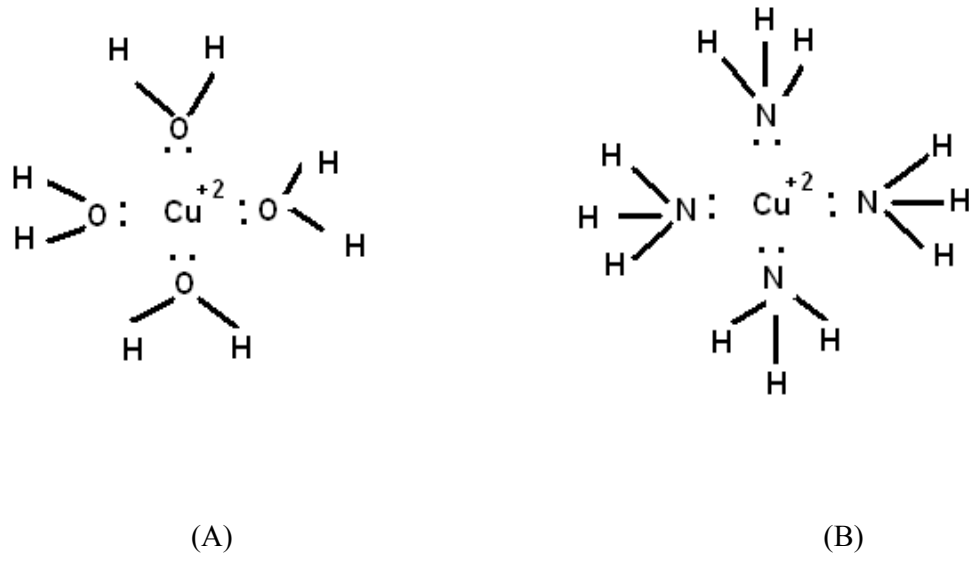
pseudo-spesifik ligandlar spesifik ligandlara önemli alternatif oluşturmaktadır (10,20,21,29).

Afinite kromatografisi, kullanılan ligandların hedef molekülle girdiği etkileşime göre, hidrofobik kromatografi, kovalent kromatografi, immobilize metal afinite kromatografisi gibi gruplara ayrılır. Bu yöntemler arasında yer alan, immobilize metal iyonu ile biyomoleküller yüzeyinde yer alan histidin, sistein ve triptofan gibi aminoasitler arasındaki seçici etkileşimden dolayı hedef moleküllerin ayırımında başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlayan immobilize metal afinite kromatografi tekniği ile protein ve peptitlerin saflaştırılması işlemlerinde geniş ölçekli olarak gerçekleştirilebilmiştir (1,14).

1.1.1.1.1. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAK)

Literatürde immobilize afinite kromatografi tekniği ile gerçekleştirilen protein ve enzim saflaştırma çalışmaları, bu yöntemin gelişim sürecinin oldukça hızlı olduğunu göstermektedir. 1975’de Porath ve arkadaşları (1) tarafından protein saflaştırılmasında immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAK) olarak adlandırılan yeni bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir.

Metal iyonları su moleküllerinin koordinasyonunun sonucu olarak, sulu ortamlarda yüksek derecede çözünürlüğe sahiptir. Su molekülü güçlü bir baz ($-NH_3$) ile yer değiştirebilir (Şekil 1.1) ve bu değişim sonucunda metal kompleksleri oluşur. Metal iyonu ile kordinasyon kompleksi oluşturan grup şelatlayıcı ligand (elektron çifti verici grup) olarak adlandırılır (6,7).



Şekil 1.1. (A) Metal iyonu ve su molekülleri koordinasyonu,

(B) Metal iyonu ve baz molekülünün oluşturduğu koordinasyon

Kromatografik desteğe eklenmiş olan şelat bileşiklerin içindeki elektron verici atomların metal ile oluşturduğu koordinasyon bağ sayısına göre bidentat, tridentat, tetradentat, pentadentat metal şelatları oluşur, geriye kalan koordinasyon bölgeleri normal olarak su molekülleri ile işgal edilmiştir ve proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilirler.

Kromatografik uygulamalarda metal iyonlarının immobilizasyonunda bidentat şelatlayıcı bileşikler olarak; aminohidroksamik asit, salisilaldehit ve 8-

hidroksikinolin, tridentat şelatlayıcı bileşikler olarak; iminodiasetikasit (IDA), dipikoliamin, orto-fosferin, N-(2-piridilmetil) aminoasetat, 2,6,diaminometilpiridin, tetradentat ligand olarak; karboksi metil aspartat (CM-ASP); ve tris(karboksimetil)etilendiamin (TED) ise pentadentat şelatlayıcı olarak kullanılmaktadır (8,9,14,30,31). Yaygın olarak kullanılan şelatlayıcı grup iminodiasetik asittir. Metal iyonlarının IDA'ya güçlü bağlanması ile İMAK işleminde kolondan metal iyonlarının sızması minimize edilmesi önemli bir avantaj sağlar (32).

Bir İMAK adsorbentinin performansı metal iyonu ile hedef molekül arasında oluşacak koordinasyon kompleks bileşiğine bağlıdır. Bu durumda hedef molekülün ayrımını, immobilize edilecek metal iyonunun seçimi belirleyecektir. Desteğe tutuklanacak metal iyonu, şelatlayıcı bileşik ile kararlı bir kompleks oluşturmalı ve saflaştırılacak olan proteine yüksek afinite göstermelidir. Hedef molekülün ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması sırasında metal iyonlarının destekten sızmadığından emin olunmalıdır, bu yüzden şelatlayıcı gruplar ile metal iyonları arasındaki bağ güçlü olmalıdır. Ancak, metal ile şelatlayıcı grup arasındaki güçlü bağlanma, metal ile protein arasındaki etkileşimin zayıf olmasına ve düşük adsorpsiyon kapasitesi elde edilmesine neden olur (6,7). Pearson'ın sınıflandırmasına göre, metal iyonları sert metaller (Mg(II), Ca(II), Fe(III), Al(III), Ga(III) ve In(III)), yumuşak metaller (Cu(I), Ag(I), Cd(II), Hg(II) ve Tl(III)) ve sınır metal iyonları (Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)) olmak üzere üç kategoriye ayrılır (33).

Bu yolla proteinlerin ayrımında ligand ve uygun metal iyonu seçilerek optimum koşullar sağlanarak diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bir seçiciliğe

sahip bir afinite destek materyali hazırlanmış olur. Bu şekilde hazırlanmış bir IMAK kolonundan elüe edilen proteinin biyolojik aktivitesi de korunmuş olur.

IMAK uygulamalarının sunduğu avantajlar; diğer afinite sorbentlerine göre ligand kararlılığı, yüksek oranda protein yükleme kapasitesi, yıkama şartlarının uygunluğu, rejenerasyonu, düşük maliyetli olması, endüstriyel uygulamalara açık olması, geniş ölçekli saflaştırmalar için kullanılabilmesi olarak sıralanabilir (Çizelge 1.1) (7,34).

Çizelge 1.1. Farklı kromatografik tekniklerin karşılaştırılması (7)

Özellik	Kromatografik teknikler			
	IMAK	Afinite	IEC	HIC
Kapasite	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek-Orta
Yeniden kullanım	Yüksek	Orta	Yüksek	Orta
Yükleme	Yüksek-Orta	Orta	Orta	Orta
Elüsyon	Yüksek	Zor	Yüksek	Yüksek
Seçicilik	Yüksek	Yüksek	Düşük-Orta	Düşük-Orta
Maliyet	Düşük	Yüksek-Orta	Düşük	Düşük

1.1.1.1.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Tekniğinde Protein ve Metal Etkileşimi

Metal-protein etkileşimleri biyokimyada proteinlerin biyolojik aktivitelerini göstermeleri açısından oldukça önemlidir. Metaller proteinlerle iki temel yolla etkileşmektedir. Birincisi, hemoglobin gibi metalloproteinlerde olduğu gibi, metal iyonu protein yapısının entegre bir parçasını oluşturur. İkincisinde ise, metal-şelatta olduğu gibi proteinler metal iyonları ile geri dönüşebilen kompleks meydana getirirler. Bu yaklaşım, proteinlerin sulu çözeltilerden ayrıştırılmasında kullanılır. İmmobilize metal afinite kromatografisi, immobilize metal iyonu ile protein yüzeyindeki elektron verici grup arasındaki koordinasyona dayanır.

Protein ve immobilize metal iyonları arasındaki etkileşim, N terminale ek olarak yan zincirdeki elektron verici atomların arasında da olmaktadır. Her ne kadar glutamik asit, aspartik asit, tirozin, sistein, histidin, arjinin, lizin, metiyonin gibi pek çok sayıda yan gruplar bağlanmaya katılsalar da İMAK'daki temel protein etkileşimi histidin amino asitinin yüzeyde açığa çıkan imidazol sayısına ve erişilebilir olmasına bağlıdır. Bununla birlikte triptofan, fenilalanin, tirozinin aromatik yan zincirlerinin histidin artıklarının civarında bulunmasının bağlanmaya katkı sağladığı rapor edilmiştir (7,35).

1.1.1.1.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Uygulamaları

Borrebaeck ve arkadaşları (36,37) lektin ayırımında kalsiyum iyonlarının immobilize edildiği adsorbentin kullanıldığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarını

yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışmaları ile desteklenen İMAK uygulamaları takip etmiştir (11,12,38,39). Bu uygulamaların başarısı araştırmacıları, farklı şelatlayıcı ligand ve matriks tipi üzerine yönlendirmiştir. İMAK gelişiminin erken safhalarında yalnızca proteinler ve enzimlerin saflaştırılması çalışılmamıştır.

1989'da Sulkowski (40) geçiş metallerinin protein molekülleri üzerinde küçük bağlanma bölgelerine gereksinim duyduğunu rapor etmiştir. Adsorbente tutuklanmış Cu^{+2} metal iyonunun hedef moleküle bağlanabilmesi için molekül yüzeyinde tek bir histidin kalıntısının yeterli olduğunu, Ni^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonları için en az iki histidin kalıntısının gerekli olduğunu belirtmiştir. Muszynska ve arkadaşları (41) protein molekülü yüzeyindeki tirozin ve karboksilik aminoasitlerin, tutuklanmış sert metal iyonları ve proteinler arasındaki etkileşime etkisini incelemişlerdir.

Son yıllarda DNA ve histidin kalıntıları takılı oligonükleotitlerin saflaştırılmasında İMAK prensibinden yararlanılmıştır. Literatürde oligo- ve dinükleotitlerin saflaştırılmasında çeşitli metal iyonları kullanılmış ve bu çalışmalar sonucunda nükleotitlerin geçiş metallerine yüksek bir afinite sergilediği belirtilmiştir (28,42). İMAK'ın uygulama alanları büyümeye devam etmektedir. İMAK tekniği ile DNA ya da rekombinat proteinlerle birleştirilerek yeni sabit taşıyıcı fazlar üretilebilir. Bu sistemlerde hala tam olarak aydınlatılmamış olan protein-protein etkileşimleri ve DNA-protein etkileşimleri açığa çıkarılabilir (43,44).

1.1.1.2. Afinite Kromatografisi Uygulamalarında Kullanılan Matriksler

Destek matriksinin seçimi afinite sistemlerindeki ilk dikkat edilecek noktadır. Matriks, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil,

amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Matriks, hidrofilik ve nötral davranış, iyi bir kimyasal, mekanik, biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeye izin vermelidir. Afinite ortamındaki tutuklanmış ligand ile hedef molekül arasında spesifik etkileşim gerçekleşebilmelidir.

Destek matriksi küresel, çubuk veya membran formunda hazırlanabilir. Kolon kromatografisinde kullanılan küçük küreler ve sıkıştırılmış yumuşak jeller, kolon içerisinde yüksek basınç ve akış hızının azalmasına neden olur. Membran tipi destek malzemeleri ile düşük basınç, yüksek akış hızı ve yüksek verimlilik gibi sonuçlar elde edilir. Bunların yanında kolay paketleme imkânı, büyük ölçeğe uygulanabilirliği, tıkanma sorunun olmaması gibi üstünlükler de sayılabilir. Bu yüzden membran yapıda hazırlanabilen kromatografi matriksi protein ve enzimlerin geri kazanılması, saflaştırılması, izolasyonu için büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde dikkat çekicidir.

Afinite matriksinin hazırlanması;

i) membranların sentezlenmesi,

ii) sentezlenen membranların aktivasyonu ve/veya

iii) aktive edilen membrana ligandın bağlanması işlem basamaklarından oluşur.

1.1.1.2.1. İmmobilize Metal Afinite Membranları

İmmobilize metal afinite membranları (IMAM) yukarıda anılan afinite membranlarının hazırlanma yöntemine ek olarak metal iyonu immobilizasyon basamağı içermektedir. IMAM membranları yüzeyinde histidin, sistein ve triptofan,

tirozin ya da polihistidin artıkları taşıyan proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır ve bu konuda yapılan çalışmalar artan bir hızla devam etmektedir.

İmmobilize metal afinite membranı sentezi için kullanılan ilk materyaller arasında selüloz, naylon, polisülfon, polietilen, cam ve sentetik kopolimerler olduğu rapor edilmektedir. Bu materyaller arasında, kitosanın, yapısında bulunan hidroksil grubunun şelatlayıcı ajan olarak çeşitli ligandların immobilizasyonuna olanak tanınması nedeni ile, dikkat çekicidir (45).

İmmobilize metal afinite membran materyallerinin seçimi ve kompozisyonu İMAK yönteminde kromatografik performansı etkileyen önemli faktörlerden biridir. Polisakkaritler biyolojik olarak uygun ve kolay modifiye edilebilirken geniş ölçekli endüstri uygulamalarında düşük zayıf mekanik dayanımı ve yüksek basınç düşmesi sergilemektedirler. En sık kullanılan matriksler agaroz, dekstran ve selüloz gibi doğal polimerlerdir. Fakat bu polimerlerin yetersiz mekanik güç ve gözenekliliğe sahip olmaları, biyolojik degradasyona yatkın olmaları kullanım alanlarını sınırlamaktadır. Diğer taraftan silika gibi inorganik adsorbentler mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler fakat proteinlerin geri dönüşümsüz nonspesifik adsorpsiyona yol açar (6).

Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, laboratuvar uygulamalarında ve geniş ölçekli kullanımlarda aktivasyona ve türevlendirilebilmeye uygun malzemelerdir. Bu destek materyalleri depolama süresince kararlıdır. Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, ılımlı deney koşulları altında farklı aktivatörlerle çok kararlı kovalent bağ oluşturabilmeleri nedeni ile kromatografi uygulamalarında önemli kullanım alanına sahiptirler. Akrilat ve metakrilat kökenli polimerik materyaller iyi bir mekaniksel güce sahiptir (10,29).

1.1.2. Sığır Serum Albumini

1.1.2.1. Albuminin yapısı

Sığır serum albumini (BSA) molekülü üç homolog ünitelerden oluşan, alfa heliks (%67) yapısının baskın olduğu ve düşük triptofan ve metiyonin ancak yüksek sistein aminoasit içeriğine sahip bir proteindir.

Albumin plazmada çözünür özellikte olmayan yağ asitlerinin taşıyıcısıdır. Bilirubin gibi toksik lipofilik metabolitleri inaktive eder ve oksijen gibi serbest radikallerin düzenlenmesinde görev alır. Bu tür moleküllerin metabolizmasında rol aldığı için albumin, yağ asitleri ve bilirubine karşı yüksek afiniteye sahiptir. Ayrıca hematin, piridoksal fosfat, sistein, glutatyon, çeşitli metal iyonları [Cu (II), Ni (II), Hg (II), Ag (II) ve Au (I)] ve negatif yüklü aromatik yapıdaki küçük moleküllere de bağlanma afinitesine sahiptir. Ayrıca albumin nörotransmitter molekül olan nitrit oksitini taşıyıcısıdır ve bu moleküle karşı afiniteye sahiptir.

Çeşitli moleküllerin saflaştırılmasında ligandlar önemli bir role sahiptir. Ligand yüksek afinite sergilediği hedef moleküle etkileşerek destek materyale molekülün bağlanmasını sağlamaktadır. Albumin ligand olarak yer aldığı metabolizmalarda çeşitli moleküllerle spesifik olarak etkileştiği bilinmektedir. Kan plazmasında bilirubin miktarının artması *hiperbilirubinemi* olarak bilinmektedir. Bu tür durumlarda ancak plazmadan bilirubin uzaklaştırılması ile plazma bilirubin seviyesi normal değere getirilebilir. Bu amaçla albumin tutuklanmış çeşitli destek materyalleri başarı ile kullanılmaktadır. Ayrıca ağır metallerin plazmadan ya da atık sularından uzaklaştırılmasında da albumin afinite ligandı olarak kullanılabilir.

2. DENEYSEL YÖNTEMLER

Çalışmamızda, membran yapıda poli(GMA-MMA) membranları metil metakrilat (MMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerlerinin kopolimerizasyonu ile UV fotopolimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlendi. IMAK uygulamasında kullanılmak üzere sentezlenen poli(GMA-MMA) membranlarının yapısında bulunan reaktif epoksi gruplarına iminodiasetik asit üç dişli ligandı kovalent olarak bağlandı. poli(GMA-MMA)-IDA membranı Cu(II) metal iyonu içeren çözelti ile etkileştirilerek koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve albumine spesifik, poli(GMA-MMA)-IDA-Cu, immobilize metal afinite membranı (IMAM) hazırlandı. Albumine spesifik IMAM membranının karakterizasyon çalışmaları yapıldı ve kesikli sistemde sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu çalışmaları optimize edilerek serum proteinleri arasından albumine gösterdiği seçicilik araştırıldı.

2.1. Materyaller

Sığır serum albumin (BSA) ve başlatıcı olarak kullanılan azobisisobutironitril (AIBN), iminodiasetik asit (IDA) Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi ve kullanıldı. Glisidil metakrilat (GMA), metilmetakrilat (MMA), izopropilalkol Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından elde edildi. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROpure LP marka ters ozmoz, Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid

uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişimi dolgulu yatak kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi.

2.2. Poli(GMA-MMA) membranlarının sentezi

Poli(GMA-MMA) sentezi için 20 mg AIBN içeren MMA monomeri, GMA ve izopropilalkol çözeltileri ile karıştırıldı. Bu karışım 9 cm çapta daire şeklinde bir kaba aktarılarak polimerizasyona tabii tutuldu. Polimerizasyon azot atmosferi altında UV ışığında 1 saat süre içinde tamamlandı (10). Bu yolla hazırlanan membranlar bir perforator yardımı ile (0.75 cm. çapı olan) disk halinde kesildi. Polimerleşmeyen monomerleri membran yapısından uzaklaştırmak amacı ile membran parçaları %70'lik etanol içerisinde 5 saat süre ile yıkandı.

2.3. İminodiasetik asit ligandının membran yüzeyine bağlanması

Poli(GMA-MMA) membranları (~ 5.0 g), sırası ile distile su, fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4) ve karbonat tamponu (50 mM, pH 11) içerisinde yıkandı ve karbonat tamponunda dengeye getirildi. Poli(GMA-MMA) membran yüzeyine üç dişli bir ligand olan IDA'nın kovalent olarak bağlanması amacı ile membranlar, ortam pH'ı karbonat tamponu ile 11.0'e ayarlanan IDA çözeltisinde (25 ml 0.2M), 12 saat süre ile manyetik karıştırıcılı ortamda, 80°C reaktör sıcaklığında inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, membranlar sırası ile %5 asetik asit çözeltisi ve distile su ile yıkandı.

2.4. İmmobilize Afinite Membranlarının (IMAM) Hazırlanması

Şelatlayıcı grup olan ligand (IDA) yapısındaki karboksil grupları ile geçiş metal iyonu olan Cu(II) iyonu arasındaki koordinasyon kompleksi oluşumu sonucunda IMAM destekleri hazırlandı.

Bakır iyonları immobilizasyonu için şelatlayıcı ajan bağlı poli(GMA-MMA)-IDA membran diskleri, CuSO₄ (10 ml 0.1 M) çözeltisi ile 6 saat süreyle 100 rpm karıştırma hızında etkileştirildi. İnkübasyon sonrasında membranlar distile su ve sitrat tamponu (pH, 5.5) ile yıkandı ve kullanılabilece kadar fosfat tamponu içerisinde, +4 °C'da saklandı.

2.5. İmmobilize Afinite Membranının Karakterizasyonu

2.5.1. Denge Su İçeriği

IMAM membranının, poli(GMA-MMA)-IDA-Cu, membranlarının denge su içeriği gravimetrik yöntem kullanılarak belirlendi. Kuru haldeki kütleleri, m_k , belirlenen membran diskleri oda sıcaklığında fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine aktarıldı ve belirli zaman aralıklarında membranların yapısına su alarak şişmiş durumdaki kütleleri, m_s , belirlendi ve eşitlik 2.1 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge Su İçeriği \%} = [(m_s - m_k) / m_k] \times 100 \quad (2.1)$$

2.5.2. Yoğunluğu

İmmobilize afinite membranının yoğunluğu Gay Lussac piknometresi ile, 25°C sıcaklıkta membran diskleri için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

2.5.3. Spesifik Yüzey Alanı

p(GMA-MMA)-IDA-Cu immobilize metal afinite membranının gözenek hacmi civa porozimetresi ile spesifik yüzey alanı ise BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü.

2.5.4. Yüzey Morfolojisi

Vakum etüvünde kurutulmuş membran diskleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve kürelerin elektron mikrografları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.5.5. FT-IR Spektrasi

İmmobilize metal afinite membranlarının FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Mattson 1000 FT-IR, İngiltere) kullanılarak elde edildi.

2.5.6. Epoksi Grubu Tayini

poli(GMA-MMA) membranlarının yüzeyde erişilebilir epoksi grubu içeriği literatürde verilen piridin-HCl yöntemi ile tayin edildi (46).

2.5.7. İmmobilize bakır iyonu miktarının belirlenmesi

poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membran diskleri EDTA çözeltisi ile etkileştirilerek bağlanan bakır iyonlarının yapıdan ayrılması sağlandı. Bu işlem membrana bağlı bakır iyonlarının tamamını uzaklaştırmak için iki kez tekrar edildi. EDTA çözeltisi içerisine geçen bakır iyon derişimi Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS) (Shimadzu AA 6800, Japan) kullanılarak belirlendi. 50 mM EDTA içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakır çözeltisi hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çıkarıldı. İmmobilize olan bakır iyonu konsantrasyonu salınan bakır miktarına eşit olacağından membrana bağlanan Cu(II) metal iyonu miktarı belirlendi.

2.6. Sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu

poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranlarına, sulu ortamdan sığır serum albumini (BSA) adsorpsiyon davranışı incelendi. Albumin adsorpsiyonuna; pH, sıcaklık, başlangıç albumin konsantrasyonu ve iyonik şiddetin etkisi araştırıldı. Adsorpsiyon deneyleri, 1.0 mg/ml başlangıç albumin konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Tüm adsorpsiyon deneyleri 3.0 saat süre ile 25°C'de 100 rpm karıştırma hızında yapıldı. Bu süre sonrasında, membranlar adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve IMAM üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında adsorpsiyon ortamından alınan çözeltilerin 280 nm'de UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak değerlendirildi. BSA'nın 0.05-3.0 mg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve 2.2 Eşitliği kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

$$q = [(C_o - C) V_s] / V_m \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte, q, IMAM üzerinde adsorblanan albumin miktarını (mg/ml), C_o, albuminin çözeltideki başlangıç derişimi (mg/ml), C, adsorpsiyon sonrası, sulu fazın albumin derişimi (mg/ml), V_s, çözeltinin hacmi (ml) ve V_m adsorpsiyon ortamındaki membranların hacmidir (ml).

Adsorpsiyon ortamının pH'sının, albumin adsorpsiyonuna etkisi, pH 4.0 ile 9.0 arasında, farklı tampon sistemleri kullanılarak çalışıldı. Sulu ortamdan BSA adsorpsiyonu davranışının sıcaklıkla değişimi 5°C, 15°C, 25°C ve 35°C sıcaklıklarında araştırıldı. İyonik şiddetin etkisi tampon içerisinde farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren (0.0-1.0 M) çözeltileri ile 25°C ortam sıcaklığında gerçekleştirildi. Sulu ortamdan albumin adsorpsiyonuna adsorbent dozunun etkisi adsorpsiyon ortamında çözelti hacmi sabit tutularak farklı hacimlerde katı faz kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel adsorpsiyon izotermi ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin belirlenebilmesi için 0.1-2.0 mg/ml başlangıç konsantrasyonuna sahip BSA ile çalışıldı.

poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranlarına adsorplanan BSA'nın desorpsiyonu, KSCN (2.0 M) ile gerçekleştirildi. BSA desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = [\text{salınan BSA miktarı} \times 100] / [\text{adsorplanan BSA miktarı}] \quad (2.3)$$

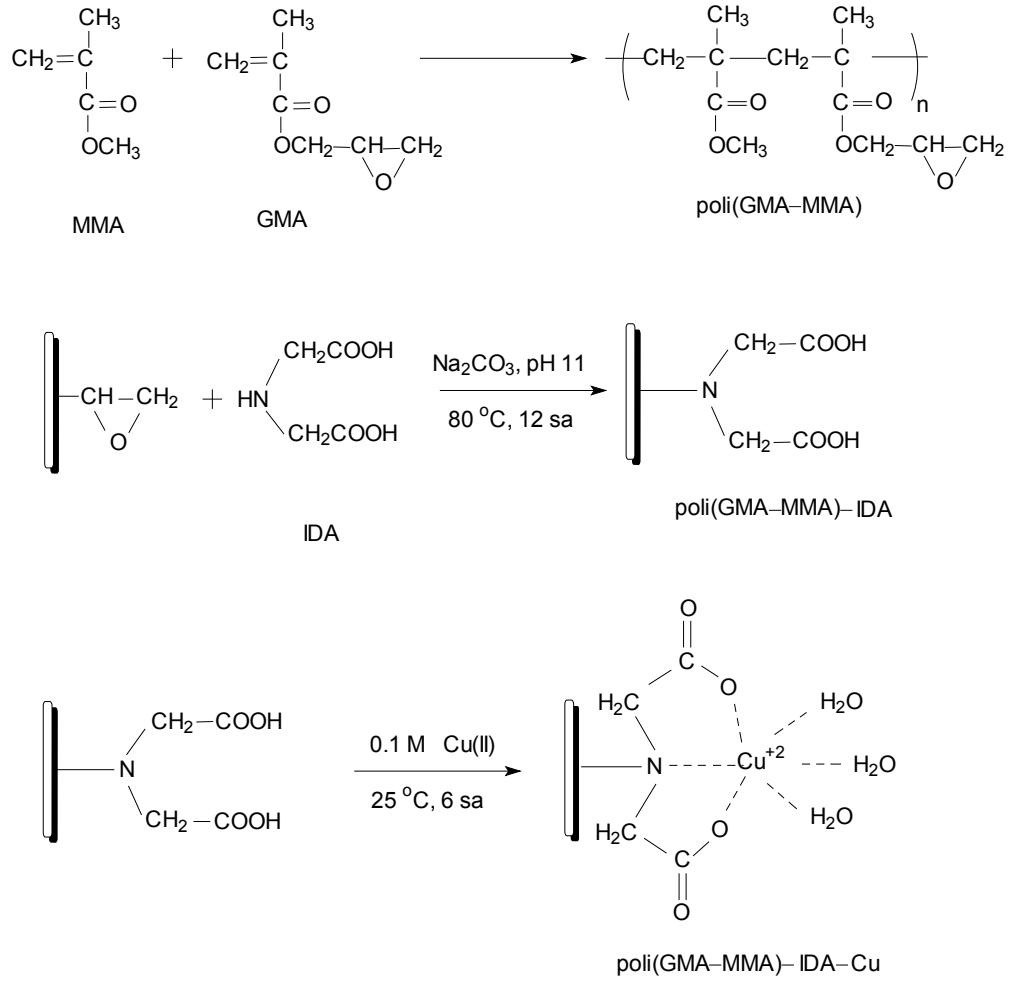
İmmobilize metal afinite membranlarının tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri aynı afinite membranları kullanılarak sekiz kez tekrar edildi.

3. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğin gelişimi ile birlikte proteinlerin endüstriyel ölçekte üretilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Buna paralel olarak proteinlerin sulu ortamdan adsorpsiyon işlemlerinin optimizasyonu ve kültür ortamı ve/veya serum gibi biyolojik sıvılardan yüksek derecede saflıkta tek basamakta saflaştırılması için, yeni ayırma tekniklerinin geliştirilmesi de önem kazanmıştır. Kromatografik yöntemlerin kullanılmasındaki başarı, saflaştırılacak proteine spesifik olan destek materyalinin seçimi ve hazırlanmasına bağlıdır. Destek materyalinin hedef proteine karşı seçici hale getirilmesi; yüzey modifikasyonları ve/veya anahtar-kilit modeli ile bağlanmayı sağlayacak bir afinite ligandı kullanılması ile mümkün olmaktadır. Bu doğrultuda IDA, TED gibi şelatörlerin, metal iyonlarına karşı ligand olarak kullanıldığı immobilize metal afinite kromatografisi yönteminde, ligand ile metal iyonlarının oluşturdukları koordinasyon kompleksleri, hedef moleküle yüksek seçicilik göstererek immobilize metal afinite adsorbentlerinin kapasiteleri arttırılabilmektedir (47).

Sunulan çalışmada immobilize metal afinite kromatografisi alanında kullanılmak üzere, sığır serum albuminine spesifik membran yapıda yeni poli(GMA-MMA)-IDA-Cu destek materyali geliştirildi (Şekil 3.1). Çalışmamızın ilk aşamasında, epoksi grubu taşıyan poli(GMA-MMA) membranları UV-fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. İkinci aşamada, Cu(II) metal iyonuna karşı bir ligand görevini yapacak üç dişli bir şelatör olan imünodiasetik asitin membran yüzeyindeki erişilebilir reaktif epoksi gruplarına kovalent olarak bağlanması sağlanarak, poli(GMA-MMA)-IDA membranı hazırlandı. Son aşamada

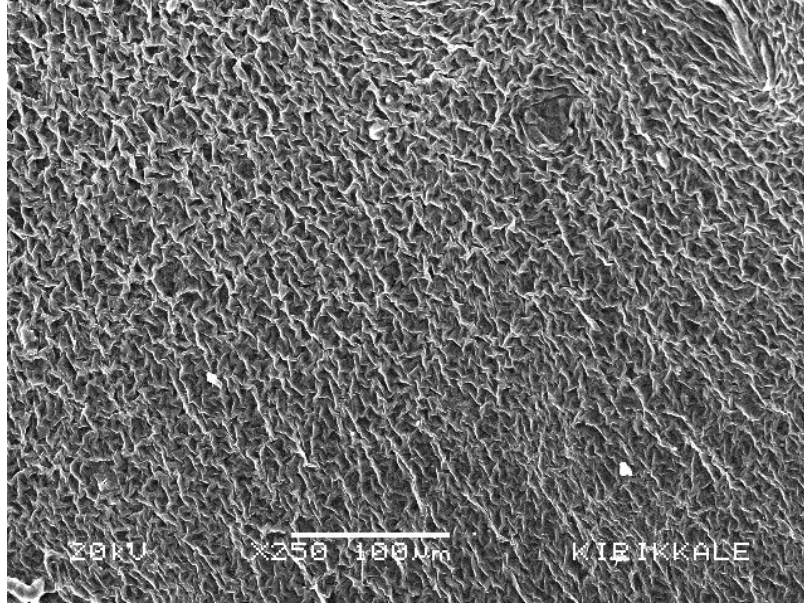
ise membrana bağlı olan ligandın (IDA) yapısındaki karboksil grupları ile geçiş metal iyonu Cu(II) arasındaki etkileşim sonucunda, Cu(II) metal iyonunun membrana immobilizasyonu sağlandı ve albumine spesifik IMAM poli(GMA-MMA)-IDA-Cu hazırlandı.



Şekil 3.1. İmmobilize afinite membranların hazırlanmasının şematik gösterimi

3.1. İmmobilize metal afinite membranların karakterizasyonu

İmmobilize afinite membranları hidrofilik ve çapraz bağlı bir yapıya sahiptirler. Sulu ortamda çözünmezler fakat çapraz bağlanma oranlarına göre yapılarına su alarak şişerler. Polimerik membranlara su difüzyonu hızlı olmakla beraber, ulaşılan denge şişme oranı % 52'dir. İmmobilize metal afinite membranlarının ıslak kalınlığının 0.06 cm ve yoğunluğunun 1.21 g/cm³ olduğu bulundu; 1.0 ml membranın 38.5 cm² yüzey alanına sahip olduğu hesaplandı. Civa porozitemetre analizleri ile poli(GMA-MMA) membranının ortalama gözenek boyutu 0.79 µm, spesifik yüzey alanı ise 89.1 m²/g olarak bulundu. Elde edilen 3.3 ml/g toplam gözenek hacmi %75 oranında gözenekliliğe ulaştığını gösterdi. Gözenekli bir yapı sergileyen membranın SEM mikrografı Şekil 3.2'de verildi. Düzgün bir yüzey yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Destek materyalinin gözenekli olması, adsorpsiyon alanını genişleten bir özelliktir. Geniş yüzey alanı, adsorbente yüksek ligand immobilizasyonu ve dolayısıyla yüksek protein adsorpsiyon kapasitesi sağlaması açısından oldukça önemlidir. poli(GMA-MMA) membranının yüzeyde ulaşılabilir epoksi grubu içeriği, pridin-HCl yöntemi kullanılarak 1.08 µmol/g olarak bulundu. Epoksi grubu taşıyan membranların, IDA bağlama verimliliğine pH, sıcaklık ve zaman gibi reaksiyon koşullarının etkisi araştırılarak optimize edildi. poli(GMA-MMA)-IDA membranları ile 1.28 µmol/cm² şelatlama kapasitesi elde edildi.

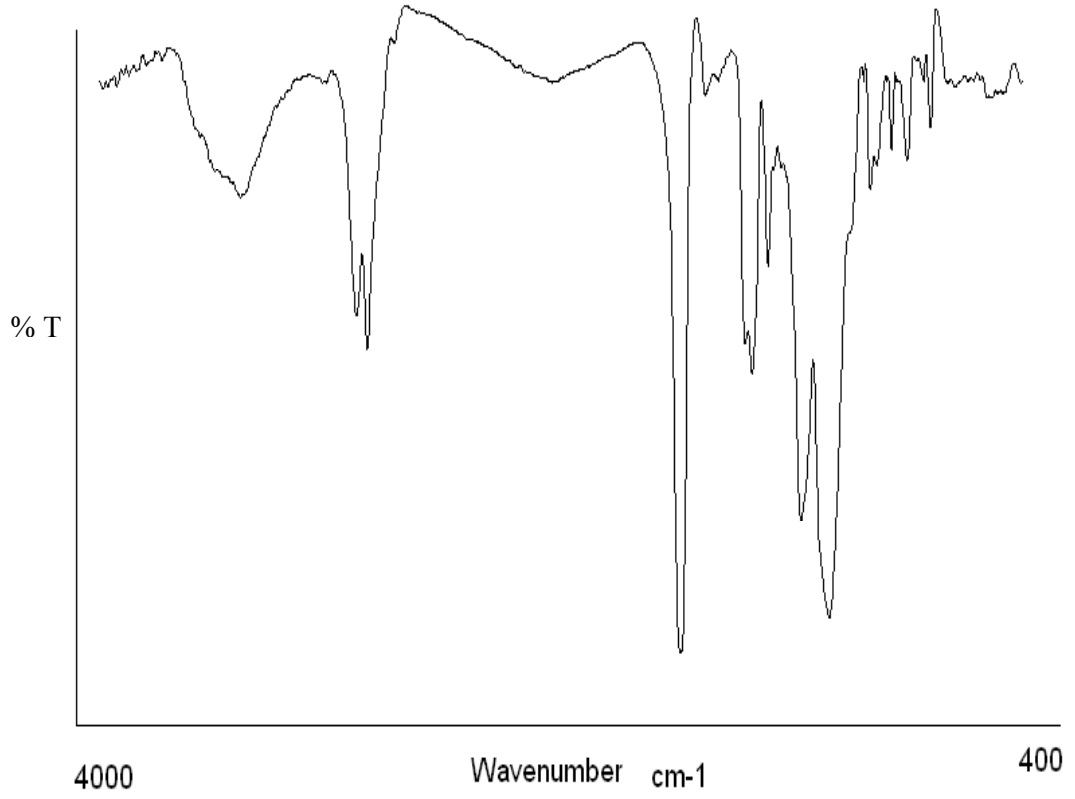


Şekil 3.2. Afinite membranın SEM mikrografı

poli(GMA-MMA)-IDA membranları üzerine tutuklanan Cu(II) iyonu miktarının belirlenmesi için tutuklama işlemi öncesi ve sonrasında ortamdan alınan çözelti örnekleri, AAS ile analiz edildi. IDA şelatörü için 127.4 $\mu\text{mol/g}$ bakır iyon kapasitesine ulaşıldığı bulundu.

poli(GMA-MMA) membranı için elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.3'de sunuldu. Spektrumdan görüldüğü gibi, $\sim 2951 \text{ cm}^{-1}$ de görülen metilen ve 2994 cm^{-1} 'deki metil titreşimleri glisidil metakrilat ve metil metakrilat'ın karakteristik titreşimleridir ve bu monomerlerinin kopolimer yapıda olduğunun bir göstergesidir. 1730 cm^{-1} 'de görülen titreşim glisidil metakrilat ve metil metakrilat'ın ester konfigürasyonunu ifade eden absorpsiyon pikleridir. Epoksi grubu, 910 cm^{-1} 'de bant

vermiştir. 3447, 1632 cm^{-1} deki absorpsiyon bantları C=O piki, 1156 cm^{-1} deki C-O karakteristik piki, 2992 ve 1452'deki C-H gerilim ve titreşim bantlarına ait piklerdir.



Şekil 3.3. Afinite membranın FTIR spektrumu

3.2. İmmobilize afinite membranlar ile sulu çözültiden albumin adsorpsiyonu çalışmaları

Membran yapıda poli(GMA-MMA) kromatografik destek malzemesinin hazırlanması için, optimize edilen deney protokolün oluşturulmasını takiben, sırası ile membran yüzeyine üç dişli ligand olan IDA ve Cu(II) metal iyonu immobilize edilerek geliştirilen, poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranı ile, tek basamakta sulu ortamdan sıgır serum albumini adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilerek, albumin moleküllerine karşı gösterdikleri afinite araştırıldı ve adsorpsiyon sistem parametreleri belirlendi.

3.2.1. Membrana metal iyonu bağlanması işleminin optimizasyonu

Su moleküllerinin koordinasyonunun sonucu olarak, metal iyonları sulu ortamlarda yüksek derecede çözünebilirler. Çözeltide, metal iyonları bir Lewis asiti (elektron çifti alıcı) olarak ve su molekülleri de bir Lewis bazı olarak (elektron çifti verici) davranır. Su molekülü güçlü bir baz ile yer değiştirebilir ve bu değişim sonucunda metal kompleksleri oluşur. Metal iyonu ile koordinasyon kompleksi oluşturan ligandın grubu elektron çifti vericisi olarak adlandırılır. Şelatlayıcı gruplar, metal iyonlarını matriks üzerine tutmak için kullanılır. Sulu çözültülerden proteinleri ayırma sırasında metal iyonlarının sızmadığından emin olmak gerekir, bu nedenle şelatlayıcı gruplar ile metal iyonlar arasındaki bağ güçlü olmalıdır. Bununla birlikte, metal ile şelatlayıcı grup arasındaki çok güçlü bir bağlanma, metal ile protein arasındaki etkileşimin zayıf olmasına sebep olur. Düşük adsorpsiyon kapasitesi pratik olarak İMAK işlemi için uygun değildir.

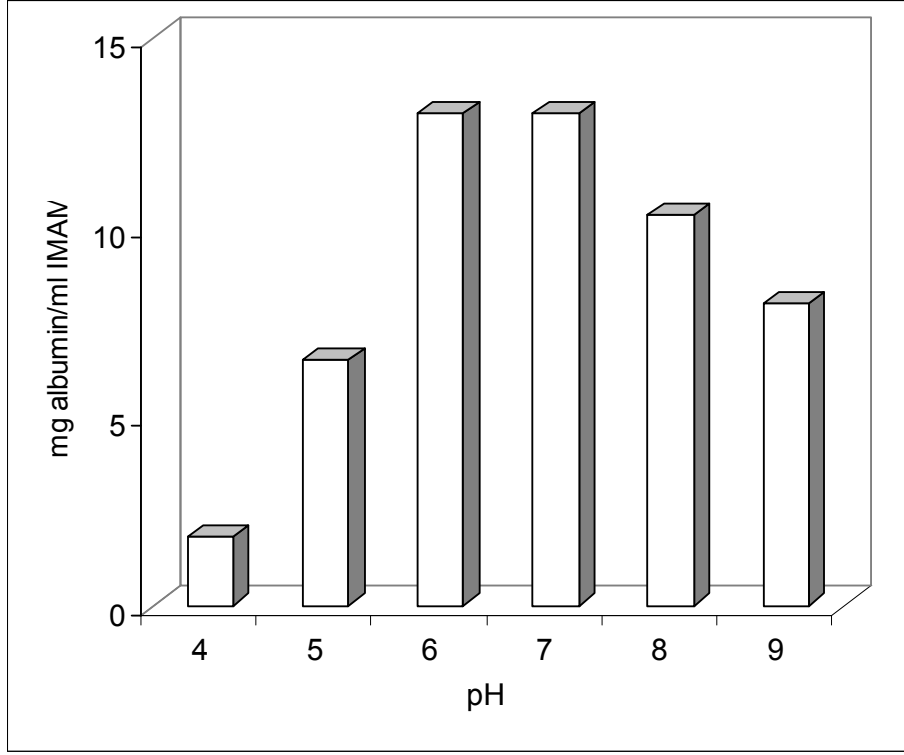
Bu doğrultuda epoksi grubu taşıyan membranların, IDA bağlama verimliliğine pH, sıcaklık ve zaman gibi reaksiyon koşullarının etkisi araştırılarak optimize edildi. Destek materyalinin şelatlama kapasitesi ve immobilize edilecek metal iyonu miktarı için ligand görevi gösterecek şelatörün seçimi, oldukça önemli bir parametredir. Çalışmamızda, IDA bağlı membranlarla yüksek Cu(II) metal iyonu immobilizasyon kapasitesi elde edildi.

Kromatografik uygulamalarda hazırlanan immobilize afinite membranlarından deneyin farklı aşamalarında bakır metal iyonu sızıntısı istenmeyen bir durumdur ve bunun çeşitli sebepleri olabilir. IMAM'lere kararlı bir şekilde bağlanmayan Cu(II) metal iyonu, sulu ortamdan protein adsorpsiyon aşamasında çözeltiye geçebilir veya yüksek tuz konsantrasyonu varlığında protein elüsyonu yapılması gereken durumlarda metal iyonu elüsyon ortamına geçebilir ve bu nedenle destek materyalinin tekrar kullanımına izin vermeyebilir. Bu doğrultuda metal iyonunun membran yapısından sızıp sızmadığı AAS ile kontrol edildi ve herhangi bir sızıntı olmadığı belirlendi.

3.2.2. pH Etkisi

pH ve iyonik şiddet, arayüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimlerle yönetilen afinite kromatografi sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Hedef molekül yüzeyinde iyonize olabilen gruplar dolayısı ile oluşan yüzey yük dağılımı, afinite destek materyalindeki bağlanma bölgeleri ile spesifik afinite etkileşimlerinde pH'ın oldukça önemli bir faktör olmasına yol açacaktır. Cu(II) metal iyonu immobilize metal afinite membranı ile albuminin spesifik etkileşimine pH'ın etkisi

4.0-9.0 aralığında değiştirilerek araştırıldı (Şekil 3.4). Adsorpsiyon ortam pH'sının 5.0'den 6.5 değerine yükseltilmesi sonucu membranın albumin adsorpsiyon etkinliğinin de arttığı gözlemlendi. pH 8.0 değerininin üzerinde ise albuminin Cu(II) metal iyonuna bağlanma eğiliminde bir azalma gözlemlendi. Çözeltideki başlangıç derişimi 0.5 mg/ml olan albuminin pH 7.0'de, 1 ml IMAM destek materyalinin sulu ortamdan 13.02 mg albumini adsorpladığı belirlendi. Bu spesifik etkileşimin, albuminin bu pH değerinde konformasyonel ve yüzey yük dağılımı durumundan ve destek materyali yüzeyindeki negatif yük yoğunluğuna sahip bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı düşünöldü. İyi bilindiği gibi, bir arayüzey olayı olan biyolojik molekül adsorpsiyonunda, hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları, spesifik adsorpsiyondan sorumlu olan başlıca kuvvetlerdir (48). Artan pH ile adsorplanan protein miktarının artması; albumin proteininde açığa çıkan histidin, sistein ve triptofan aminoasit kalıntılarının yüksek pH'larda Cu(II) metal iyonları için koordinasyon bölgelerini oluşturarak bir ligand görevi üstlenmelerinden kaynaklanmaktadır (49-54). Düşük pH değerlerinde bu amino asit kalıntılarının protonasyon derecesi artacağı ve koordinasyon kompleksi oluşumunun da azalacağı belirtilmektedir (32).

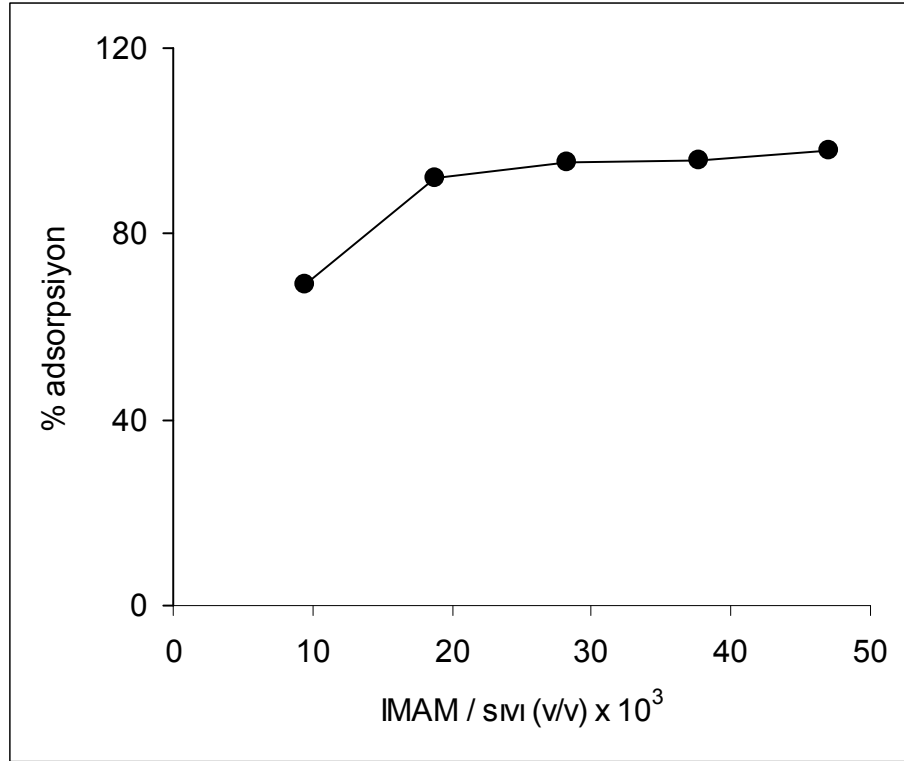


Şekil 3.4. İmmobilize metal afinite membranı ile albumin adsorpsiyonuna pH etkisi

İmmobilize afinite membrana sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu işleminde dengeye ulaşma zamanının etkisi araştırıldı. Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki albumin için adsorpsiyon işleminin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı olduğu, 180 dakika içerisinde dengeye ulaştığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle çeşitli koşullar altındaki (farklı adsorpsiyon parametreleri) adsorpsiyon verileri, dengeye ulaşılan 3 saatlik adsorpsiyon işlemi süreci uygulanarak elde edildi.

3.2.3. İmmobilize metal afinite membran dozunun etkisi

Albumin konsantrasyonu (0.5 mg/ml) olarak sabit tutuldu ve katı/sıvı (v/v) oranı değiştirilerek sulu ortamdan uzaklaştırılacak albumin yüzdesine etkisi araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3.5’de verildi.

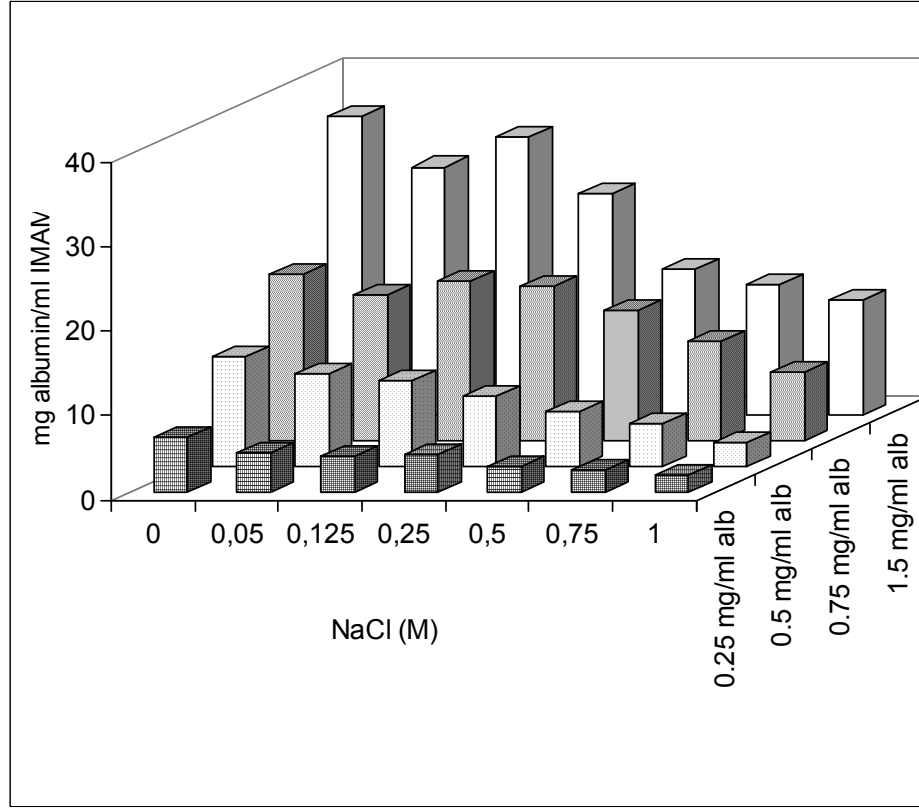


Şekil 3.5. IMAM dozunun albumin adsorpsiyonuna etkisi

3.2.4. İyonik şiddet etkisi

Sulu çözümlerden albumin adsorpsiyonuna, iyonik şiddetin etkisi farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı başlangıç albumin konsantrasyonunda çalışıldı (Şekil 3.6). Şekilden görülebildiği gibi, iyonik şiddetin artması ile adsorpsiyon etkinliği de önemli derecede azalmaktadır. Tuz konsantrasyonunun artması ile protein yüzeyindeki imidazol grupları ile metal iyonu arasındaki etkileşim önemli derecede etkilenmektedir. Non spesifik etkileşimde IMAM ile yüklü protein molekülü arasındaki elektrostatik etkileşim azalmakta, hidrofobik etkileşim ise artmaktadır. Şekil 3.6'dan da görüldüğü gibi tuz ilavesi ile adsorpsiyon kapasitesindeki önemli derecedeki azalma, elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğunu göstermektedir. Adsorpsiyon sistemi için optimum pH olarak seçilen 7.0 ortam pH'sında, BSA anyoniktir ve bu nedenle tuz konsantrasyonunun artması ile katyonik bakır iyonu ile arasındaki etkileşimin azaldığı düşünülmektedir.

İyonik şiddet arttıkça, Debye-Hückel uzunluğu tarafından verilen, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka azalacaktır. Rustemier ve Killmann, ortamdaki artan elektrolit konsantrasyonuyla, yüzey yüklerini görüntülemişlerdir. Bu etkilerin, moleküller arasındaki itme kuvvetinin azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, moleküller arasındaki toplam potansiyel enerji bariyerinin azalması neticesinde sistemlerde agregasyon görülmeye başlamaktadır (55).



Şekil 3.6. p(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membranları ile albumin adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi

3.2.5. Protein konsantrasyonunun etkisi

İmmobilize afinite membran ile sulu çözülden albumin uzaklaştırılması için elde edilen deneysel adsorpsiyon eğrisi Şekil 3.7’de sunuldu. Adsorpsiyon kapasitesinin, ortamdaki protein konsantrasyonunun artırılması sonucu, arttığı gözlemlendi. IMAM ile maksimum adsorpsiyon kapasitesine 2.0 mg/ml albumin

konsantrasyonunda ulaşıldı ve bu başlangıç derişim değerinden sonra sabit kaldığı gözlemlendi. Bu durumun afinite membranın spesifik etkileşim gruplarının, albumin molekülleri ile doygun hale gelmiş olmasıyla açıklanabileceği düşünöldü. Albumin yüzeyinde histidin dizisine sahiptir. Bu yüzeyde açığa vurulan histidin amino asidinin yan imidazol halkası, immobilize Cu(II) iyonları ile protein arasında, baskın afinite bölgeleri oluşturmuştur. poli(GMA-MMA)-IDA-Cu immobilize metal afinite membranı ile, beklenildiği gibi, hedef molekül albumine yüksek kapasite ile bağlandığı belirlendi.

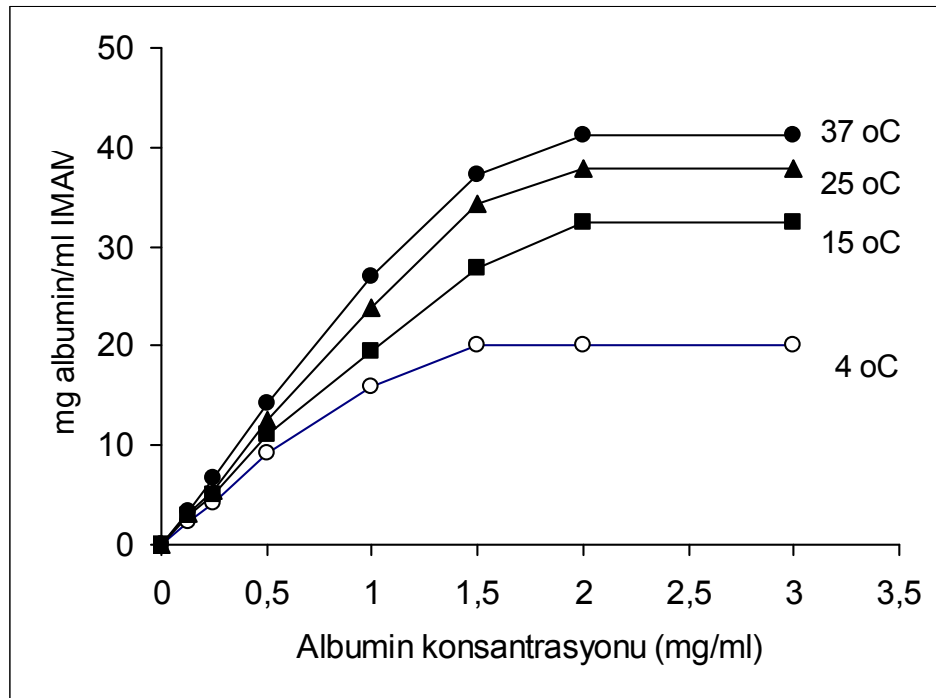
İmmobilize metal afinite kromatografisi tekniği kullanılarak yapılan çalışmalardan birini, Todorova-Balvay ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, şelatlayıcı IDA ligandına, Cu(II), Ni(II), Zn(II) ve Co(II) iyonları bağlanarak kurulan, IMAK sistemleriyle, IgG, Cohn II-III fraksiyonları, ve bunun pepsinle parçalanma fragmentlerinin adsorpsiyonu incelenmiştir ve en yüksek adsorpsiyon, IDA-Cu(II) ile IgG adsorpsiyonunda, yaklaşık 19 mg olarak elde edilmiştir(56).

Belew ve arkadaşları, şelatlayıcı Sepharose Fast Flow ya da 5PW şelatlı TSK gel üzerine immobilize Cu(II) ile, lizozim, ovalbumin, sığır ve domuz serum albuminlerinin adsorpsiyonunu çalışmışlardır. İmmobilize Cu(II) ile, lizozim için, 3.8-6.8 µmol/ml; ovalbumin için, 0.71-1.8 µmol/ml; BSA için, 0.55-1.1 µmol/ml; PSA için, 0.63-1.5 µmol/ml protein adsorpsiyonu elde edilmiştir (57).

Patwardhan ve Atai, 3461 ml/g BSA adsorpsiyonunu, immobilize Cu(II)-IDA kolon ile, pH 7'de elde etmişlerdir (58).

Hutchens ve Yip, 1990'da yaptıkları bir çalışmada, şelatlayıcı Sepharose Fast Flow-IDA-Cu(II) ile, ml ıslak jel başına, yaklaşık 7.5 mg α - ya da γ -kimotripsin adsorplamışlardır (51).

Berna ve arkadaşları ise, 1997'de gerçekleştirdikleri bir çalışmada, Novarose-IDA-Cu(II) ile, 2.27 μ mol ya da 57 mg α - ya da γ -kimotripsin/ml ıslak jel değerine ulaşmışlardır (59).



Şekil 3.7. IMAM için belirlenen deneysel adsorpsiyon izotermi

İmmobilize metal afinite membranlarına olası protein adsorpsiyonu mekanizması;

i) protein yüzeyindeki histidin artıklarındaki imidazol halkasının elektron verici gruplar ile metal iyonu arasındaki spesifik etkileşim,

ii) yüklü protein molekülü ve pozitif yüklü metal iyonu arasındaki elektrostatik etkileşim ve

iii) membran yüzeyindeki hidrofobik gruplar ile protein arasındaki hidrofobik etkileşim mekanizmalarından biri veya tamamı ile açıklanabilmektedir.

İlk etkileşim spesifik bağlanmayı sağlarken son iki etkileşim ise non-spesifik etkileşim oluşumunda etkin faktördür.

Bu doğrultuda, poli(GMA-MMA)-IDA membranına sulu ortamdan albuminin adsorpsiyonu araştırıldı. İzoelektrik noktası 4.7 olan sığır serum albuminin yüzey yük yoğunluğu pH 7.0'de negatiftir ve bu nedenle albumin söz konusu pH ortamında anyonik özellik taşımaktadır. Adsorpsiyonun gerçekleşeceği arayüzeyde aynı yükle yüklü iki grup birbirini ittiğinden poli(GMA-MMA)-IDA yüzeyine non spesifik adsorpsiyon oldukça küçük bulundu.

3.2.6. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın artması ile albumin ve IMAM'ın fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanının artması sonucunda adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.7). Sıcaklığın 4°C'den 37°C'ye çıkarılması ile birlikte afinite membranın adsorpsiyon kapasitesindeki bu artışın albumin molekülünün konformasyonel yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü.

3.2.7. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Biyolojik bir sıvı karışımından oluşan serumdan, tek basamakta ve yüksek saflıkta albuminin saflaştırılması için gerekli optimum koşulların belirlenebilmesi doğrultusunda, farklı ortam koşullarının, adsorplanan albumin miktarına etkisi yanında, desorpsiyon ve yeniden kullanılabilirlik parametreleri de araştırıldı. Albumin yüklü membranların elüsyonu, 2.0 M KSCN içeren desorpsiyon ortamında yapıldı ve % 87.4'ünün elüe edilebildiği belirlendi.

İmmobilize metal afinite kromatografisi uygulamalarında kullanılacak membran yapıdaki destek materyalinin kimyasal bileşimi, yüzeyinde aktif grupların yer alması, şelatlayıcı ajanın yapısı, metal iyonunun türü ve metal iyon konsantrasyonu, IMAM performansının değerlendirilmesinde önemli parametrelerdir. Bu çalışmada IDA şelatörü Cu(II) metal iyonuna karşı üç dişli bir ligand olarak kullanıldı ve albumine yüksek afinite gösteren poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranı hazırlandı ve protein adsorplama kapasitesi belirlendi. IMAM membranlarının kullanılabilirliğini test etmek için membranların yeniden kullanılabilirliği de araştırıldı ve membranlar adsorpsiyon kapasitelerindeki minimum kayıpla (~%9) yüksek derecede yeniden kullanılabilirlik gösterdi. Bu çalışmalarla elde edilen veriler; poli(GMA-MMA)-IDA-Cu immobilize afinite membranının çeşitli enzimlerin saflaştırılmasında kullanılabileceğini ve histidin artıkları içeren biyolojik moleküllerin izolasyonunda kullanılabileceğini gösterdiği düşünülmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında, önemli bir serum proteini olan albuminin sulu ortamdan adsorpsiyonu için, yeni bir immobilize metal afinite membranı tasarlandı. Destek materyali olarak üretilen polimer, metil metakrilat (MMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerleri kullanılarak hazırlandı. Polimerizasyon, azoizobutironitril (AIBN) başlatıcısı varlığında, UV ışınması altında, azot atmosferinde, fotopolimerizasyon yöntemi ile gerçekleştirildi.

Elde edilen poli(GMA-MMA) membranları, yapısında bulunan, reaktif epoksi grupları kullanılarak, metal iyonunun şelatlanması için, tridentat bir ligand olan imunodiasetikasit (IDA) ile kovalent olarak bağlandı ve poli(GMA-MMA)-IDA membranı elde edildi. Cu(II) metal iyonunu içeren çözelti ile membranın etkileştirilmesiyle, IDA ve Cu(II) arasında, koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve albumine spesifik, poli(GMA-MMA)-IDA-Cu, immobilize metal afinite membranı (IMAM) hazırlandı.

İlk olarak, hazırlanan poli(GMA-MMA)-IDA-Cu membranının karakterizasyon çalışmaları yapıldı. IMAM membranının, denge şişme oranı, gravimetrik yöntem kullanılarak, % 52 olarak bulundu. IMAM membranlarının hidrofilik ve çapraz bağlı bir yapıya sahip olduğu tespit edildi.

poli(GMA-MMA) membranının, %75 oranında gözenekliliğe ulaştığı gösterildi. Membranın SEM mikrografı alınarak, gözenekli ve düzgün bir yüzey yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Membranın, gözenekliliği, yüzey alanını ve dolayısıyla adsorpsiyon kapasitesini arttıran bir özelliktir.

poli(GMA-MMA) membranına, IDA bağlanmasına pH, sıcaklık ve zaman gibi çeşitli faktörlerin etkisi ayrıntılı olarak incelendi ve poli(GMA-MMA)-IDA membranları ile $1.28 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ şelatlama kapasitesine ulaşıldığı tespit edildi. Membranın FTIR spektrumu alınarak, monomerlerin kopolimer yapıda olduğu belirlendi.

Membranın karakterizasyonu tamamlandıktan sonra, kesikli sistemde sulu ortamdan albumin adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Adsorpsiyon ortamının pH'nın, albumin adsorpsiyonuna etkisi araştırıldı. pH'nın 5.0'den 6.5 değerine yükseltilmesi ile, albumin adsorpsiyonunda bir artış, ancak pH 8.0 değerininin üzerinde bir azalma gözlemlendi. Elde edilen adsorpsiyon, pH 7.0'de, 13.02 mg albumin/1 ml membran'dır. pH'nın artmasıyla, adsorpsiyonun artması; albumindeki histidin, sistein ve triptofan aminoasit yan gruplarının, bir sınır metali olan Cu(II) iyonları için, koordinasyon bölgesi teşkil etmesiyle açıklanabilir.

Adsorpsiyon ortamının sıcaklığının, membranların albumin adsorpsiyonuna etkisi araştırıldı. Sıcaklık artışı ile, albumin ve IMAM'ın etkileşim alanının arttığı ve adsorpsiyon kapasitesinin de artış gösterdiği bulundu. Bu durumun, albuminin konformasyonel yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü.

Albumin adsorpsiyonunun, dengeye ulaşma zamanı, farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki albumin çözeltilerinde araştırıldı. Membranlara, albumin adsorpsiyonunda, 180 dakika içerisinde dengeye ulaşıldığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı gözlemlendi.

Membranlara, albumin adsorpsiyonuna, iyonik şiddetin etkisi, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı başlangıç albumin konsantrasyonunda çalışıldı. İyonik şiddetin artması ile adsorpsiyonun önemli derecede azaldığı görüldü. Bu durum,

ortamdaki tuzun, IMAM ile yüklü protein molekülü arasındaki, baskın olan elektrostatik etkileşimi azaltmasıyla açıklandı.

Yapılan çalışmalar sonucu, elde edilen poli(GMA-MMA)-IDA-Cu(II), membranının, literatürde yer alan immobilize metal afinite çalışmalarıyla kıyaslanabilecek ölçüde, protein adsorpsiyonuna ulaştığı görüldü. Metal iyonu içermeyen, poli(GMA-MMA)-IDA formunun ve albuminin, pH 7.0'de negatif olmalarından dolayı, non spesifik adsorpsiyonun düşük olduğu bulundu. Albuminin, membrandan desorpsiyonunun da, oldukça yüksek oranda elde edilmesi ve membranların tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olması, önemli bir avantaj sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada sentezlenen, yeni poli(GMA-MMA)-IDA-Cu(II) membranı ile, özellikle Cu(II) iyonu ve imidazol grubunun etkileşiminden faydalanılarak, histidin içeren moleküllerin, ya da histidin kuyruğu takılan moleküllerin izolasyonunda olmak üzere, çok çeşitli enzimlerin saflaştırılmasının gerçekleştirilebileceği, spesifik ve etkin bir yaklaşım sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. J. Porath, C. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*; **258**, 598–599, (1975).
2. F. Helfferich, Ligand Exchange: a novel separation technique. *Nature*; **189**, 1001-1002, (1961).
3. V.A. Davankov, A.V. Semechkin, Ligand-Exchange chromatography. *J. Chromatogr.*; **141**, 313–353, (1977).
4. N. B. Afeyan, S. P. Fulton, F. E. Regnier, Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides *J. Chromatogr. A*, **544**, 267-279, (1991).
5. N.B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, F. E. Regnier, Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, **519**, 1-29, (1990).
6. V. Gaberc-Porekar, V. Menart, Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 335-360, (2001).
7. G. S. Chaga, Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **49**, 313-334, (2001).
8. A. L. Fanou, M. Vijayalakshmi. Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool. *Ann. NY. Acad. Sci.* **413**, 300-6, (1983).

9. J. Porath, P. Hansen, Cascade-mode multiaffinity chromatography: fractionation of human serum proteins. *J. Chromatogr.* **550**, 751-64, (1991).
10. M. Y. Arica, M. Yılmaz, E. Yalçın, G. Bayramoğlu, Affinity membrane chromatography: relationship of dye-ligand type to surface polarity and their effect on lysozyme separation and purification, *J. Chromatogr. B*, **805**, 315–323, (2004).
11. Y. Kato, K. Nakamura, T. Hshimato. High-performance metal chelate affinity chromatography of proteins. *J. Chmatogr.* **354**, 511-517, (1986).
12. M. Belew, T. T. Yip, L. Andersson, R. Ehrnström, High performance analytical, applications of immobilized metal ion affinity chromatography, *Anal. Biochem.* **164**, 457-65, (1987).
13. G. Bayramoğlu and M. Y. Arica, A novel pH sensitive porous membrane carrier for various biomedical applications based on pHEMA/chitosan: preparation and its drug release characteristics. *Macromol. Symp.*, **203**, 213-218, (2003).
14. H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **49**,199-240, (2001).
15. M.Y. Arica, M. Yılmaz, E. Yalçın and G. Bayramoğlu, Surface properties of Reactive Yellow 2 immobilised pHEMA and HEMA/chitosan membranes: characterisation of their selectivity to different proteins. *J. Membr. Sci.*, **240**, 167-178, (2004).

16. M. Y. Arıca, Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: Covalently bound urease in a continuous model system *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 2000-2008, (2000).
17. R. Ghosh, Separation of human albumin and IgG by a membrane-based integrated bioseparation technique involving simultaneous precipitation, microfiltration and membrane adsorption. *J. Membr. Sci.*, **237**, 109-117, (2004).
18. N. Belattar, T. Mekhalif, Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads. *Mat. Sci. Eng. C.*, **24**, 507-511, (2004).
19. T. Hu, Z. Su, A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate, *J. Biotechnol.* **100**, 267-275, (2003).
20. M. Y. Arıca, G. Bayramoğlu, A. Ü. Şenel ve E. Yalçın, *Poly. Int., Inpres*, (2006).
21. G. Bayramoğlu, E. Yalçın, M.Y. Arıca, Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes *Proc. Biochem.*, **40**, 1433-1442 (2005).
22. A. Otto, G. Birkenmeier, Recognition and separation of isoenzymes by metal chelates, immobilized metal ion affinity partitioning of lactate dehydrogenase isoenzymes, *J. Chromatogr.* **644**, 25-33, (1993).
23. M. Yılmaz, Polihidroksi etilmetakrilat Kökenli Yapay Damarların Hazırlanması ve Biyo-uyumluluk Özelliklerinin Arttırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2006.

24. K. C. Chatha, P. M. Grob, A. J. Mikolski, L. R. J. Davis, E. Sulkowski. Kopper chelate affinity chromatography of human fibropast and leucocyte interferons. *J. Gen. Virol.*, **43**, 701-706, (1979).
25. I. Ohkubo, T. Kondo, N. Taniguchi. Purification of nuchleoside diposphatase of rat liver by metal-chelate affinity chromatography. *Biochim Biophys. Acta*; **616**, 89-93, (1980).
26. H. Hansson, L. Kaageda. Adsorption and deseorption of proteins in metal chelate affinity chromatograhy. Purification of albumin. *J. Chromatogr*, **215**, 333-339, (1981).
27. B.O. Lönnerdal, C. Keen. Metal chelate afinity chromatography of proteins. *J. Appl. Biochem.*, **4**, 203-208, (1982).
28. P. Hubert, J. Porath Metal chelate affinity chomatography; I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds. *J. Chromatogr.* ;**198**, 247-55, (1980).
29. G. Bayramoğlu, M. Yılmaz, M. Y. Arıca, Evaluation of lysozyme adsorptive behaviour of pHEMA-based affinity membranes related to the surface energy and its components to be used in chromatographic fields, *Coll. and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **243**, 11–21, (2004).
30. M. D. Bacolod, R. Z. El, High performance metal chelate interaction chromatography of proteins with silica bound ethylenediamine-N,N'-diacetic acid, *J. Chromatogr.* **512**, 237-47, (1990).
31. M. C. Van Heusden, S. Fogarty, J. Porath, J. H., Law, Purification of insect vitelogenin and vitellin by gel-immobilized ferric chelate. *Prot. Express. Purif.*, **2**, 24-8, (1991).

32. N. Kubota, Y. Nakagawa, Y. Eguchi, Recovery of serum proteins using cellulozic affinity membrane modified by immobilization of Cu²⁺ ion, *J. App. Poly. Sci.*, **62**, 1153-1160, (1996).
33. R. G. Pearson, In: R. G. Pearson editor. *Hard and soft acids and bases*. Stroudsburg, PA: Hutchington, Ross, 53-9, 67-85, 1973.
34. B. Comiskey, J. D. Albert, H. Yoshizawa, J. Jacobsan, J., An electrophoretic ink for all-printed reflective electronic displays *Nature*, **394**, 53, (1998).
35. F. H. Arnold, Metal affinity separations: a new dimension in protein processing, *Biotech.*, **9**, 151-6, (1991).
36. C. A. Borrebaeck, B. O. Loennerdal, M. E. Etzler. Metal chelate affinity chromatography. *FEBS Lett* ;**1930**, 194-196, (1981).
37. C. A. Borrebaeck, B. Mattiasson, B. Nordbring-Hertz. Izolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. *Biochem. J.* , **222**, 261-264, (1984).
38. M. A. Vijayalakshmi, High performance liquid chromatography with immobilized metal adsorbents, In: I.M. Chaiken, M. Wilchek, I. Parikh, editors. *Affinity chromatography and biological recognition*. New York: Academic Press; 269-73, 1983.
39. D.A.P. Small, T. Atkinson, C.R. Lowe, High-performance metal chelate chromatography. In I.M. Chaiken, M. Wilchek, I. Parikh, editors, *Affinity chromatography and biological recognition*. New York: Academic Press; 267-8, 1983.

40. E. Sulkowski, The saga of IMAC and MIT. *BioEssays*. **10**, 170-175, (1989).
41. G. Muszynska, L. Andersson, J. Porath. Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized metal ferric chelate. *Biochem*. **25**, 6850-6853, (1986).
42. P. Hubert, J. Porath, Metal chelate affinity chromatography II. Group separation of mono- and dinucleotides. *J. Chromatogr*. **206**, 164-8, (1981).
43. C. Min, G. L. Verdine, Immobilized metal affinity chromatography of DNA, *Nucl. Acid. Res.*, **24**, 3806-10, (1996).
44. T. H. Smith, J. V. LaTour, D. Bochkariov, G. Chaga, P. S. Nelson, Bifunctional phosphoramidite reagents for the introduction of histidyl and dihistidyl residues into oligonucleotides. *Bioconju. Chem*. **10**, 647-52, (1999).
45. C. Y. Wu, S. Y. Suen, S. C. Chen, J. H. Tzeng,. Analysis of Protein Adsorption on Regenerated Cellulose-based Immobilized Copper Ion Affinity Membranes, *J. Chromatogr. A*, **996**, 53-70, (2003).
46. S. Sidney, *Quantitative Organic Analysis*, Wiley, New York, 3. Baski, 1967.
47. J. Porath, Immobilized metal ion affinity chromatography, *Prot., Express. Purif*. **3**, 263-281, (1992).
48. X-D. Tong, X-Y. Dong, Y. Sun, Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent, *Biochem. Eng.*, **12**, 117-204, (2002).

49. Y. J. Zhao, E. Sulkowski, J. Porath, Surface topography of histidine residues in lysozymes *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1115, (1991).
50. R. M. Chicz, F. E. Regnier, Immobilized-metal affinity and hydroxyapatite chromatography of genetically engineered subtilisin. *Anal. Chem.*, **61**, 1742, (1989).
51. T. W. Hutchens, T. T. Yip, Protein interactions with immobilized transition metal ions: quantitative evaluations of variations in affinity and binding capacity. *Anal. Biochem.*, **191**, 160, (1990).
52. J. Sezdik, Y. Kotake, K. Uyemura, Purification of P0 Myelin Glycoprotein by a Cu²⁺ immobilized metal affinity chromatography, *Neurochem. Res.* **24**, 6, 723-732, (1999).
53. K. Moriya, K. Tanizawa, Y. Kanaoka, Schiff base copper (II) chelate as a tool for intermolecular cross-linking and immobilization of protein, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **161**, 1, (1989).
54. A. L. Blomkalns, M. R. Gomez, Purification of bovine α -lactalbumin by immobilized metal ion affinity chromatography, *Prepar. Biochem. and Biotech.* **27**, 219-226, (1997).
55. O. Rustemier and E. Killmann, Electrostatic Interactions and Stability of Poly-L-Lysine Covered Polystyrene Latex Particles Investigated by Dynamic Light Scattering, *J. Coll. Interf. Sci.* **290**, 360, (1997).
56. D. Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, M. Vijayalakshmi, Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments, *J. Chromatogr. B*, **808**, 57-62, (2004).

57. M. Belew, T. T. Yip, L. Andersson, J. Porath, Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis, *J. Chromatogr.*, **403**, 197-206, (1987).
58. A. V. Patwardhan, M. M. Ataii, Site accessibility and the pH dependence of the saturation capacity of a highly cross-linked matrix immobilized metal affinity chromatography of bovine serum albumin on chelating superose, *J. Chromatogr. A*, **767**, 11-23, (1997).
59. P. P. Berna, N. T. Mrabet, J. V. Beeumen, B. Devreese, J. Porath, M. A. Vijayalakshmi, Residue accessibility, hydrogen bonding, and molecular recognition: Metal-Chelate Probing of Active Site Histidines in Chymotrypsins, *Biochem.*, **36**, 6896-6905, (1997).