168801

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UZATMA KOLU TAKILI L-HİSTİDİN BAĞLI p(GMA-MMA) AFİNİTE MİKROKÜRELER İLE IgG SAFLAŞTIRILMASI

AYŞEGÜL ÜLKÜ ŞENEL

OCAK 2005

Fen Bilimleri Enstitüsü müdürünün onayı.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet SAÇAK

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Adnan BULUT

ÖZET

UZATMA KOLU TAKILI L-HİSTİDİN BAĞLI p(GMA-MMA) MİKROKÜRELER İLE IgG SAFLAŞTIRILMASI

ŞENEL, Ayşegül Ülkü

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Ocak 2005, 78 sayfa

Bu çalışmada, afinite destek malzemesi olarak epoksi grubu içeren, poli (glisidil metakrilat-metil metakrilat), p(GMA-MMA), mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi ve IgG saflaştırılmasında kullanıldı. Hazırlanan p(GMA-MMA) mikroküre lerinin epoksi grupları, amonyak ve hekzametilendiamin (uzatma kolu) ile amin gruplarına dönüştürüldü. L-Histidin ligandı, bağlanma ajanı olarak glutarikdialdehit kullanılarak aminlenen veya uzatma kolu takılı p(GMA-MMA) mikroküre lere kovalent olarak bağlandı. Afinite matriksin, IgG'ye seçiciliğini arttırmak üzere, L-Histidin ligandı ile Cu(II) metal iyonu arasında koordinasyon kompleksi oluşturmak üzere bağlandı. Afinite mikroküre lerin sulu çözeltiden ve insan serumundan IgG uzaklaştırılması ve

saflaştırılmasında performansı incelendi. Tüm afinite mikroküreler için maksimum adsorpsiyon kapasitesi, pH 7.0' de gözlendi. p(GMA-MMA)-L-Histidin, p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin, p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin -Cu(II) mikrokürelerinin adsorpsiyon kapasiteleri sırayla, 56.0, 93.9 ve 142.2 mg/g olarak bulundu.

Afinite mikrokürelerin desorpsiyonu glisin-HCl (pH 2.6) çözeltisi ile % 63 oranında gerçekleştirildi. Afinite mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemlerinde tekrar kullanılabilirliği belirlendi. p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleri ile insan serumundan ayrıştırılan IgG'nin saflığı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yardımı ile % 84.2 olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Afinite mikroküre, L-Histidin ligandı, Uzatma kolu, Cu(II) metal iyonu, Immunoglobulin G

ABSTRACT

IMMUNOGLOBULİNE G PURİFİCATİON WİTH SPACER ARM ATTACHED L-HİSTİDİNE IMMOBİLİZED p(GMA-MMA) AFFINITY MİCROBEADS

ŞENEL, Ayşegül Ülkü

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Chemistry,

M.Sc.Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

January 2005, 78 pages

In this study, epoxy group containing affinity support, poly(glycidyl methacrylate-methylmethacrylate), p(GMA-MMA), microbeads were prepared by suspension polymerisation. The adsorption of IgG from solution and human serum was investigated. The epoxy groups of p(GMA-MMA) microbeads was converted into amino groups with either ammonia or hexamethylenediamine (spacer arm). L-Histidine was then covalently immobilised on aminated and the spacer arm-attached p(GMA-MMA) microbeads using glutaricdialdehyde as a coupling agent. The specifity of the affinty matrix to IgG was increased by Cu(II) metal-coordination complex with L-Histidine ligand on microbeads. The performance of modified microbeads on IgG purification from human serum was investigated. The affinity microbeads, the maximum adsorption capacity of IgG was found at pH 7.0.

The adsorption capacity of p(GMA-MMA)-L-Histidine, p(GMA-MMA)-spacer arm-L-Histidine and p(GMA-MMA)-spacer arm-L-Histidine was found, 56.0, 93.9 and 142.2 mg/g respectively. The desorption of affinty microbeads was found %63 by glycine-HCl solution (pH 2.6). The IgG molecules could be repeatedly adsorbed and desorbed with affinity microbeads withhout noticeable loss in their IgG adsorption capacity. The purification of IgG with p(GMA-MMA)-spacer arm-L-Histidine from human serum was determined by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The result of purification amount was found % 84.2

Keywords: Affinity matrix, L-Histidin ligand, Spacer arm, Cu(II) metal ion, Immunoglobuline G

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde her türlü imkanı sağlayan, değerli bilgileriyle yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülay Bayramoğlu'na teşekkür ederim.

Bu tezin okunması aşamasında değerlendirmeleri ile yaptığı katkısından dolayı Sayın Prof. Dr. M. Yakup Arıca'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Arş. Gör. Emine Yalçın'a teşekkür ederim.

Bu tez kapsamındaki araştırmaların tamamı *Biyokimyasal İşlemler ve Biyomateryal Araştırma Laboratuvarı*'nda yürütülmüştür.

Ayşegül Ülkü ŞENEL

Kırıkkale, Ocak 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i

ABSTRACT.....iii

TEŞEKKÜR.....v

İÇİNDEKİLER.....vı

ÇİZELGELER DİZİNİ.....x

ŞEKİLLER DİZİNİ.....xı

1.GİRİŞ.....1

2.KURAMSAL TEMELLER.....6

2.1.Kromatografi.....6

2.2. Adsorpsiyon.....7

2.2.1. Adsorpsiyon İzotermleri.....8

2.2.1.1. Langmiur Adsorpsiyon Modeli.....8

2.2.1.2. Freundlich Adsorpsiyon Modeli.....9

2.2.2. Proteinlerin Adsorpsiyonu.....10

2.3. Afinite Kromatografisi.....10

2.3.1. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Destek Materyalleri.....12

2.3.1.1. Süspansiyon Polimerizasyonu.....15

2.3.2. Uzatma Kolu.....16

2.3.3. Aktivasyon Ajanları.....17

2.3.4. Ligand.....17

2.3.4.1. Histidin.....18

2.4. İmmobilize Metal Afinite Kromarografisi.....20

2.5. İmmunoglobulinler.....21

3. MATERYAL METOT.....25

3.1. Materyaller 25

3.1.1. Kimyasal Maddeler 25

3.1.2. Cihazlar 25

3.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre 25

3.1.2.2. FTIR Spektrofotometre 26

3.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 26

3.1.2.4. Elementel Analiz 26

3.1.2.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC).....26

3.1.2.6. Diğer Cihazlar.....27

3.2. Yöntem 27

3.2.1. p(GMA-MMA) Mikroküreleriniń Sentezi.....27

3.2.2. p(GMA-MMA) Mikroküreleriniń Aktivasyonu.....28

3.2.2.1. p(GMA-MMA) Mİkroküreleriné Uzatma Kolu Takılması...28

3.2.2.2. p(GMA-MMA) Mikroküreleriniń Aminlenmesi.....29

3.2.2.3. Mikroküreleriń Glutarikdialdehit ile Aktivasyonu.....29

3.2.2.4. Mikroküreleré L-Histidin Ligandının Bağlanması.....29

3.2.2.5. L-Histidin Bağlı Mikroküreleré Metal İyonu Bağlanması.....30

3.2.3. Mikroküreleriń Karakterizasyon.....31

3.2.3.1. Mikroküreleriń Şişme Oranı.....31

3.2.3.2. Mikroküreleriń Yoğunluğu.....31

3.2.3.3. Mikroküreleriń Yüzey Morfolojileri.....31

3.2.3.4. Mikroküreleri̇n Yüzey Alanı.....32
3.2.3.5. Mikroküreleri̇n FTIR Analizi.....32
3.2.3.6. Epoksi Grup Tayini.....32
3.2.3.7. Mikroküreleri̇n Amin Grup Tayini.....33
3.2.3.8. Afinite Mikrokürelere Bağlanan Ligandın Tayini.....33
3.2.4. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları.....34
3.2.4.1. pH Etkisi.....34
3.2.4.2. Zamanın Etkisi.....35
3.2.4.3. İyonik Şiddet Etkisi.....36
3.2.4.4. Afinite Sorbent Dozunun Etkisi.....36
3.2.4.5. Adsorpsiyon İzotermleri.....36
3.2.4.6. Sıcaklık Etkisi.....37
3.2.4.7. Adsorpsiyon Kinetikleri.....37
3.2.4.8. Protein Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik.....39
3.2.5. HPLC Çalışma Koşulları.....39
3.2.5.1.Kesikli Sistemde IgG Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi.....40
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....41
4.1. Sonuçlar.....41
4.1.1. Karakterizasyon Çalışmaları.....41
4.1.1.1. Mikroküreleri̇n Aktivasyonu.....46
4.1.1.2. Afinite Sorbentin Karakterizasyonu.....48
4.1.2. Sulu Çözeltiden IgG Adsorpsiyon Çalışmaları.....48
4.1.2.1. pH Etkisi.....48
4.1.2.2. Sorbent Dozunun Etkisi.....51

4.1.2.3. Adsorpsiyon Hızı.....52
4.1.2.4. İyonik Şiddet Etkisi.....53
4.1.2.5. IgG Başlangıç Konsantrasyonun Etkisi.....54
4.1.2.6. Sıcaklık Etkisi.....57
4.1.2.7. Adsorpsiyon İzotermleri.....58
4.1.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği.....62
4.1.2.9. Desorpsiyon 64
4.1.2.10. İnsan Serumundan IgG Saflaştırılması.....65
4.2. Değerlendirme.....67
KAYNAKLAR.....73

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. Afinite Mikroküreler ile Sulu Çözeltiden IgG Asaorpsiyon Davranışında Langmiur İzoterm Modeli Sabitleri ve Korelasyon Katsayıları.....60

4.2. Afinite Mikroküreler ile Sulu çözeltiden IgG Adsorpsiyon Davranışında Freundlich İzoterm Modeli Sabitleri ve Korelasyon Katsayıları.....61

4.3. Afinite sorbentlerin sulu ortamdan IgG adsorpsiyon kinetik sabitleri.....64

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....12

2.2. L-Histidin yapısı.....19

2.3. Ligandın destek materyaline bağlanması.....20

2.4. IgG'nin yapısı; a) Üç boyutlu b) İşlevsel şeması.....23

4.1. p(GMA-MMA) mikroküreleriniin boyut dağılımı.....42

4.2. p(GMA-MMA) mikroküelerinin boyut dağılımı.....42

4.3. p(GMA-MMA) mikroküreleriniin SEM mikrografı.....44

4.4. p(GMA-MMA) mikroküreleriniin FTIR spektrumu.....45

4.5.p(GMA-MMA) mikroküreleriniin aktivasyonu a) aminlenmesi b) uzatma Kolu takılması 47

4.6. Afinite mikroküreleriin IgG adsorpsiyonuna pH etkisi.....50

4.7. Cu(II) konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....51

4.8. Afinite mikroküreler ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında sorbent dozunun etkisi.....52

4.9. Afinite mikroküreleriin adsorpsiyonunda adsorpsiyon süresinin etkisi..53

4.10.Afinite sorbentlerle IgG adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi.....54

4.11.Başlangıç IgG konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....56

4.12. Cu(II) metal iyonu bağlı olan p(GMA-MMA)-uzatma kolu- L-Histidin afinite mikroküreleriele sulu ortamdan protein adsorpsiyonunun şematik gösterimi.....56

4.13.Afinite mikroküreleriin IgG adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi.....58

4.14. Afinite mikroküreler ile sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonuna Langmiur izoterm modelinin uygulanması.....59

4.15. Afinite mikroküreler ile sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonuna Freundlich izoterm modelinin uygulanması.....61

4.16. Afinite mikrokürelerin sulu ortamdan IgG adsorpsiyonunun ikinci derece kinetik modeline uygulanması.....63

4.17. A) Standart HSA ve IgG karışımı B) Adsorpsiyon öncesi C)Adsorpsiyon sonrasında p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin mikroküreleri ile insan serumundan elde edilen HPLC kromatogramları.....66

1. GİRİŞ

Kromatografi, bir karışım içinde bulunan farklı fiziksel veya kimyasal özelliklere sahip maddelerin, bir hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden yürütülmesi ile maddelerin bu iki fazdaki dağılma katsayılarına bağlı olarak ayrılması yöntemidir. Bu yöntem, protein, enzim, peptid, nükleik asit ve hormonlar gibi biyomoleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılan etkin ve güvenilir bir analitik tekniktir.

Biyolojik sıvılardan hedeflenen makromoleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için daha güvenli ve etkin ayırma yöntemlerine duyulan gereksinim biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin hızlı gelişmesi sonucu ortaya çıkmıştır [1-4]. Bu tekniklerin arasında yer alan afinite kromatografisi, biyomoleküllerin bulundukları ortamdan yüksek saflıkta tek basamakta elde edilmesini sağlar.

Afinite kromatografisi, destek materyali üzerine tutuklanmış ve yüksek tanıma kapasitesine sahip bir ligand molekülü ile biyolojik molekül arasında ortaya çıkan ve kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanır. Molekül, uygun şartlar altında matriks üzerine tutuklanmış ligand tarafından adsorbe edilir. Daha sonra adsorplanan molekül farklı pH, iyonik şiddet veya uygun eluentler kullanılarak ligand ile molekül arasındaki etkileşimin bozulması ile saf olarak elde edilir [5]. Çok sayıda farklı moleküllerin (enzim, antikor, hormon, vitamin, reseptör, protein ve glikoproteinler, RNA,DNA vb.) yanında bakteri, virüs ve hücrelerin saflaştırılmasında afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır [6].

Bu ayırma yönteminde, özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekül (ligand veya bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik bir destek (matriks veya taşıyıcı) materyalinin üzerine tutuklanır. Afinite kromatografisinde yalancı spesifik ligand olarak tekstil boyaları, amino asitler ve metal şelat oluşturabilen moleküller çok sayıdaki avantajlarından dolayı, biyospesifik ligandların yerine kullanılmaktadır. Kullanılan ligand, tutuklama ve elüsyon şartları altında kararlı olmalı, uygun fonksiyonel gruplar içermeli ve maliyeti düşük olmalıdır. Oldukça spesifik olan biyolojik ligandların matriks üzerine tutuklama işlemi sırasında kararsız olması, yapıdan sızması ve yüksek üretim maliyeti gibi dezavantajlarından dolayı kullanımı sınırlıdır [3,7].

Destek materyallerine bağlanan ligandların seçiciliğini artırmak için metal iyonları ile şelatları oluşturulur ve bu yolla hedef proteine karşı daha seçici olmaları sağlanabilir. Bilindiği gibi farklı proteinler farklı metal iyonlarına ilgi göstermektedir. Metal iyonları, proteinlerin üç boyutlu yapılarında yüzeyde açığa çıkan bazı amino asitlerin yan grupları ile (örnek olarak, histidinin imidazol grubu, sisteinin tiyol grubu, tiriptofanın indol grubu, tirozinin hidroksil grubu gibi) koordinasyon kompleksi oluştururlar[13]. Bu yöntem kromatografik alanda Imobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) olarak adlandırılmaktadır [13-14]. Metal-protein etkileşimleri biyokimyada proteinlerin biyolojik aktivitelerini göstermeleri açısından oldukca önemlidir. İmmobilize metal afinite kromatografisi, immobilize metal iyonu ile protein yüzeyindeki elektron verici grup arasındaki koordinasyona dayanır.

Bir protein karışımından hedeflenen proteini ayrıştırma ve saflaştırma işlemini amaçlayan afinite kromatografi sistemlerinde en önemli parametre kullanılacak destek materyalinin seçimidir[5]. Afinite kromatografi ayırma yönteminde, kullanılacak destek materyali, küresel, çubuk veya membran yapıda hazırlanabilir [8,9,10]. Küre yapıda kullanılan destek materyalleri genellikle 50-400 µm boyut dağılımına sahiptir. Bu materyaller, özellikle kolon uygulamalarında en az difüzyon sınırlaması ile mükemmel akış özelliği sağlar. Ayrıca hedef moleküllerin kaynağından doğrudan saflaştırılmasını sağlamasının yanı sıra işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltır [5]. Bunun yanı sıra gözenekli mikroküreelerden oluşan matriksin sağlayacağı geniş yüzey alanı destek malzemesi ve protein arasında daha fazla etkileşim bölgesi oluşturacağı için önemli bir avantaj oluşturur.

Monoklonal antikorlar, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldıklarından önemli terapötik ajan grubunu oluştururlar. Endüstriyel öneme sahip farklı antikorların %30'unu biyoteknolojik kökenli antikorlar oluşturmaktadır. Bunlar arasında insan immünoglobulin G (IgG) önemli bir yere sahiptir. Insan plazmasından IgG elde edilmesi, alloimmünizasyon, SLE, immunolojik tayin kitlerinde ve immün bozukluklarda, kanser gibi önemli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmasının yanı sıra alternatif bir tedavi sistemi oluşturduğu için IgG saflaştırılması biyoteknoloji ve eczacılık alanında önemlidir [11,12].

Bu çalışmada insan serumundan tek basamakta IgG uzaklaştırılması ve saflaştırılması için afinite kromatografisi alanında kullanılabilecek, küre yapıda destek malzemesi geliştirilmesi düşünüldü. Bu doğrultuda, uzatma

kolu takılı p(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat), p(GMA-MMA), mikroküreleré, tabii bir amino asit olan L-Histidin ligandı immobilize edildi ve sulu çözeltilerden IgG ayrıştırılması ve insan serumundan IgG saflaştırılmasında kullanılması amaçlandı. Metakrilat kökenli ve kopolimer yapıda olan bu destek malzemesinin yapısında bulunan reaktif epoksi grubu uzatma kolu olarak kullanılması amaçlanan hekzametilendiaminin kolayca bağlanmasına imkan verir. Ayrıca, hazırlanan kürelerin gözenekli yüzey yapısı ve elde edilen geniş yüzey alanı istenilen miktarda ligand ve protein moleküllerin immobilizasyonu için olanak sağlar.

Bu amaçla çalışmamızda, metil metakrilat (MMA), glisidil metakrilat (GMA) ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) monomerleri kullanılarak süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile p(GMA-MMA) mikroküreleri hazırlandı ve 75-150 μm boy ve boyut dağılımına sahip olan mikroküreler araştırmamızda kullanıldı. Sentezlenen mikrokürelerin bir bölümünün epoksi grupları H_2SO_4 (0.1 M) varlığında hidroliz edilerek yüzeylerinde hidroksil grupları oluşturuldu ve ligand bağlı karşıtlarına karşı adsorpsiyon işleminde protein ile sorbent arasındaki non-spesifik etkileşimlerin incelenmesinde kontrol amaçlı kullanıldı. L-Histidin ligandı, p(GMA-MMA) mikrokürelerine iki yolla bağlandı; (1) mikrokürelerin yüzeylerinde amonyak varlığına amin grupları oluşturuldu ve glutarikdialdehit ile aktive edildikten sonra L-Histidin amino asidi kovalent olarak bağlandı, *p(GMA-MMA)-L-Histidin*, (2) mikrokürelerin yüzeyine uzatma kolu takılarak ligand bağlanmasının sulu ortamlardan IgG ayrıştırılması ve saflaştırmasına etkisini araştırmak amacı ile, mikrokürelere hekzametilendaimin (HMD) uzatma kolu takılarak yüzey aktivasyonu yapıldı ve IgG'ye karşı spesifik olan L-Histidin amino asidi ligand

olarak bağlanarak *p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin* afinite mikroküreleri hazırlandı. Ayrıca, uzatma kolu takılı ve L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite mikroküreleri ile Cu(II) metal iyonları arasında şelat oluşturuldu, *p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II),* ve IgG ayrıştırılmasında ve saflaştırılmasında kullanıldı. Hazırlanan üç farklı afinite mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları (yüzey alanı, partikül boyu ve boyut dağılımı, yoğunluğu, şişme oranı, SEM mikrografı, FTIR spektrumu, yüzeydeki aktif grupların tayini) tamamlanarak sulu çözeltilerden ticari açıdan büyük bir öneme sahip olan IgG proteininin adsorpsiyon davranışı ve insan serumundan IgG saflaştırılması çalışmalarında kullanıldı. Adsorpsiyon koşullarının (pH, adsorpsiyon denge süresi, iyonik şiddet, sıcaklık, başlangıç protein derişimi gibi) mikrokürelerin IgG adsorpsiyon performansına etkileri incelendi. Yapıya metal iyonlarının eklenmesi sonucunda elde edilen *p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II)* mikrokürelerinin IgG'ye karşı gösterdiği afinite araştırıldı. Adsorpsiyon ve desorpsiyon kinetiği, adsorpsiyon izoterm modeli ve afinite mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği gibi parametreler de belirlendi. Adsorpsiyon izotermi ve kinetik eşitlikler, belirlenen teorik denge kapasitesi ile deneysel veriler arasındaki farkı değerlendirmek için kullanıldı. Geliştirilen afinite sorbentlerin IgG'ye karşı gösterdiği seçicilik HPLC yardımı ile belirlendi.

2. KURAMSAL BİLGİLER

Yirminci yüzyılın ortalarına kadar analitik ayırmalar; çöktürme, damıtma ve ekstraksiyon gibi klasik yöntemler ile yapılıyordu. Günümüzde ise, analitik ayırımlar numunenin çok bileşenli ve karmaşık olması nedeni ile, kromatografi ve elektroforez teknikleri kullanılarak yapılmaktadır.

2.1. Kromatografi

Kromatografi, bilimin tüm dallarında uygulama alanı olan güçlü bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem, yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve isimlendirilmiştir. Son beş yılda, hem bir çok yeni kromatografik teknik geliştiğinden, hem de bilim adamlarının karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri olduğundan, kromatografik uygulamalar önem kazanmıştır.

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri diğer ayırma yöntemleri ile yapılamayan ayırımlar için kullanılan farklı teknikleri içerir. Bütün kromatografik ayırma işlemlerinde numune gaz, sıvı veya bir süper kritik akışkanı olan, hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz, bir kolonda ya da bir katı yüzeyde sabitlenmiş, kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçirilir. Bu iki faz, numune bileşenlerinin, hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılmasını sağlayacak şekilde seçilir. Durgun faz bileşenleri tarafından kuvvetle tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla, çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz

tarafından zayıfça tutulan bileşenler, hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sayesinde, numune bileşenleri birbirinden ayrılır [15].

Yeni geliştirilen kromatografik yöntemlerle, moleküllerin izomerleri gibi çok küçük farklılıklara dayanan ayrımlar gerçekleştirilebilmektedir. Bu ayrımlarda ölçümler, mikrogram seviyesindedir ve çok hassastır. Bu yöntem ile ürün elde edilmesi ve ayrımı endüstriyel ölçekte gerçekleştirilebilmektedir [16].

Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması, hareketli ve durağan fazların yapısı ve ayırma prensipleri dikkate alınarak çeşitli şekillerde yapılır. Bu tekniklerin arasında yer alan afinite kromatografisi ayırımları, protein moleküllerinin spesifik bağlanması gibi yüzey özelliklerine dayanır [3].

2.2. Adsorpsiyon

Gaz, sıvı ya da bir çözeltiden çözünen molekül ya da iyonların katı yüzeyinde tutunmasına "adsorpsiyon", tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına "desorpsiyon", yüzeyde tutunan maddeye "adsorplanan", adsorplayan destek malzemesine ise "adsorbent" veya "sorbent" adı verilir. Adsorpsiyon, fiziksel ve kimyasal olarak gerçekleşebilen bir ara yüzey olayıdır ve adsorplanan ile sorbent arasındaki bağlar van der Waals kuvvetlerine, dipol-dipol etkileşimine ve hidrojen bağlarına ve/veya kimyasal bağ oluşumuna dayanan kompleks bir ayırma işlemidir. Tersinir veya tersinmez olarak yürüyebilen adsorpsiyon işlemi, çok tabakalı yani multimoleküler veya tek tabakalı yani monomoleküler olarak gerçekleşebilir

[17-20]. Günümüzde adsorpsiyon, çok sayıda fiziksel, kimyasal ve biyolojik ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır.

2.2.1. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Çözelti fazında adsorpsiyon, sorbent, adsorplanan ve ortam sıcaklığı sabit tutulduğunda derişime bağlı olarak değişmektedir. Gaz fazında meydana gelen adsorpsiyon ise, aynı koşullarda basınca bağlıdır. Yüzeye adsorplanan madde miktarının basınçla ya da derişimle değişimini veren eğrilere "adsorpsiyon izotermi" adı verilmektedir.

Deneysel olarak elde edilen adsorpsiyon izotermlerini değerlendirebilmek için çok sayıda teorik adsorpsiyon izoterm modeli geliştirilmiştir. Adsorplanan ve adsorplayıcı maddelerin özelliklerine göre, bir adsorpsiyon için bu eşitliklerden biri veya birkaçı uygun olmaktadır [17-21].

2.2.1.1. Langmiur Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Bu izoterm modeli yüzey kimyası alanındaki çalışmalarından dolayı 1932 yılında Nobel Ödülü alan Amerikalı Bilim Adamı Irving Langmiur (1881-1957) tarafından 1916 yılında kimyasal adsorpsiyon için türetilmiştir. Langmiur adsorpsiyon kuramı, katı yüzeyin her noktasının aynı özellikte olduğu, adsorbe olan moleküllerin katı yüzeyini monomoleküler olarak (tek molekül kalınlığında) örttüğü, homojen adsorpsiyon modelini ifade eder. Ayrıca, katı yüzeyin her bölgesinin eşdeğer enerjili olduğu ve komşu bağlanma bölgelerine adsorplanan moleküllerin birbiri ile etkileşmeyecek

kadar uzak olduğu düşünülür. Langmiur adsorpsiyon izoterm modeli aşağıdaki eşitlikle verilmektedir.

$$dq/dt = k_1 C_{den} (q_m - q_{den}) - k_2 q \qquad (2.1)$$

Bu eşitlik denge anında (2.2) eşitliğiyle verilir.

$$q_{den} = q_m C_{den} / (K_d + C_{den}) \qquad (2.2)$$

Bu eşitlikte, q_m, sorbentin maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); C_{den}, sulu çözeltideki proteinin denge konsantrasyonunu (mg/ml); q_{den}, sorbentin dengedeki adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); ve K_d ($K_d = k_2/k_1$) ise sistemin ayrışma sabitini (mg/ml) göstermektedir [22-23].

2.2.1.2. Freundlich Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Heterojen adsorpsiyonlar için, Alman Fizikokimyacı Herberty Max Finlay Freundlich (1880-1941) tarafından Langmiur İzoterm modelinden türetilen Freundlich adsorpsiyon modeli kullanılır.

$$q_{den} = K_F (C_{den})^n \qquad (2.3)$$

Bu eşitlikte, K_F ve n, sistem karakteristiği olan Freundlich sabitleridir. K_F, adsorpsiyon kapasite parametresi; n, adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren üssel parametrelerdir.

Freundlich eşitliği, proteinin bir adsorbent üzerindeki bir yere bağlanma adsorpsiyon enerjisinin, komşu bölgelerin diğer protein molekülleri tarafından işgal edilip edilmemesine bağlı olduğunu gösteren deneysel bir bağıntıdır [24-28].

2.2.2. Proteinlerin Adsorpsiyonu

Protein adsorpsiyonu, çeşitli fizikokimyasal faktörlere bağlı olarak belirlenebilen çok karmaşık bir işlemdir. Bunlar arasında en önemli olan faktörler, yüzeyin kimyasal yapısı, pürüzlülüğü ve hidrofilisite derecesi, protein moleküllerinin birbirleriyle ve yüzeyle elektrostatik etkileşimleri ve protein moleküllerinin yapısal kararlılığıdır. Proteinlerin adsorpsiyonu spesifik ve non-spesifik etkileşimlerin ikisini birden içerebilir .

2.3. Afinite Kromatografisi

Kromatografi, biyoteknoloji alanında yüksek performanslı saflaştırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Kromatografik teknikler arasında en önemli yeri afinite kromatografisi almaktadır. Anılan yöntem, proteinler gibi makromoleküllerin saflaştırılması için yeterli, yüksek seçiciliğe sahip ve iyi bir ayırma yöntemi olduğu çok sayıda araştırıcı tarafından rapor edilmiştir [29-33]. Afinite kromatografi yöntemi, 1968'de Cuetracasas ve arkadaşları tarafından ilk kez çalışıldığından beri, binlerce farklı molekülün (enzimlerin, antikorların, hormonların, vitaminlerin, reseptörlerin, çok sayıda farklı glikoproteinlerin,

Freundlich eşitliği, proteinin bir adsorbent üzerindeki bir yere bağlanma adsorpsiyon enerjisinin, komşu bölgelerin diğer protein molekülleri tarafından işgal edilip edilmemesine bağlı olduğunu gösteren deneysel bir bağıntıdır [24-28].

2.2.2. Proteinlerin Adsorpsiyonu

Protein adsorpsiyonu, çeşitli fizikokimyasal faktörlere bağlı olarak belirlenebilen çok karmaşık bir işlemdir. Bunlar arasında en önemli olan faktörler, yüzeyin kimyasal yapısı, pürüzlülüğü ve hidrofilisite derecesi, protein moleküllerinin birbirleriyle ve yüzeyle elektrostatik etkileşimleri ve protein moleküllerinin yapısal kararlılığıdır. Proteinlerin adsorpsiyonu spesifik ve non-spesifik etkileşimlerin ikisini birden içerebilir .

2.3. Afinite Kromatografisi

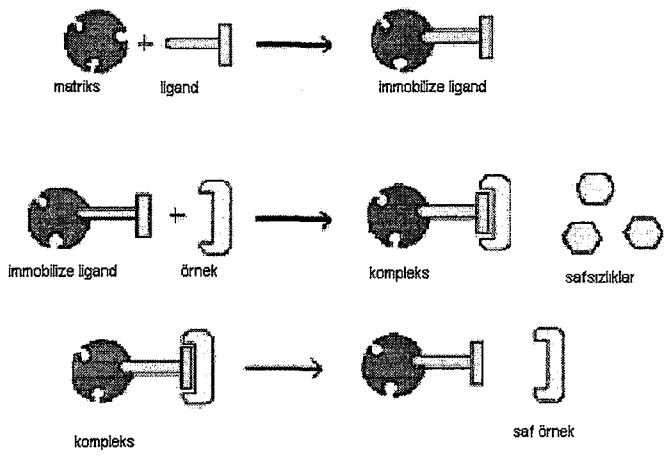
Kromatografi, biyoteknoloji alanında yüksek performanslı saflaştırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Kromatografik teknikler arasında en önemli yeri afinite kromatografisi almaktadır. Anılan yöntem, proteinler gibi makromoleküllerin saflaştırılması için yeterli, yüksek seçiciliğe sahip ve iyi bir ayırma yöntemi olduğu çok sayıda araştırıcı tarafından rapor edilmiştir [29-33]. Afinite kromatografi yöntemi, 1968'de Cuetracasas ve arkadaşları tarafından ilk kez çalışıldığından beri, binlerce farklı molekülün (enzimlerin, antikorların, hormonların, vitaminlerin, reseptörlerin, çok sayıda farklı glikoproteinlerin,

RNA'nın, DNA'nın), hatta bakterilerin, virüslerin ve hücrelerin, ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılmıştır [34-37].

Makromoleküllerin teşhisi ve saflaştırılması için önemli bir metot olan afinite kromatografisinin temel prensibini, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi özgün tanıma yeteneğine sahip olan bir molekülün (ligand ya da bağlayıcı) uygun, çözünmeyen, genellikle polimerik bir destek materyalinin üzerine tutuklanması oluşturmaktadır. Hedef moleküle özgün bağlanma yeteneği gösteren molekül ligand olarak isimlendirilir. Hedef molekül uygun şartlar altında seçici olarak matriks üzerine tutuklanmış ligand ile kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile ayrıştırılır. Bu işlem, sürekli veya kesikli sistemlerde, hedef molekül içeren ortamın, matrikse tutuklanmış ligandla teması ile sağlanır. Daha sonra adsorplanan hedef molekül, farklı pH, iyonik şiddet veya uygun elüentler kullanılarak, molekül ile ligand arasındaki kovalent olmayan ilişkinin bozulması sonucu (desorpsiyonu) hedef molekül saf olarak elde edilir [1,5,6].

Afinite kromatografi alanında; kullanılan ligandın seçiciliği, adsorplanan proteinin kolay elüsyonu, ligand molekülün üretimi, tekrar kullanılabilirliği, yapısal kararlılığı ve kararlılığını koruma ve ekonomik olması gibi unsurlar dikkat edilmesi gerekilen faktörlerdir. Bu parametreler arasında en önemlisi ligand molekülünün hedef moleküle karşı gösterdiği seçiciliktir [38].

Afinite kromatografisi alanında kullanılan destek malzemeleri genel olarak üç aşamada hazırlanmaktadır: i) destek materyalinin hazırlanması, ii) materyalin aktivasyonu ve iii) materyale ligandın bağlanması



Şekil2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

2.3.1. Afinite Kromatografisinde Kullanılan Destek Materyalleri

Afinite kromatografisinde performansı belirleyen en önemli parametre lerden birisi destek materyalinin seçimidir. Destek materyali, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanısıra hidrofilik ve nötral davranış, kimyasal, mekanik ve biyolojik kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeye izin vermelidir. Protein saflaştırması için, gözenekli destek materyalleri yüksek miktarda ligand tutuklanmasına olanak sağlayacağı ve böylece hedef molekül için daha fazla adsorpsiyon kapasitesine ulaşılacağı için tercih edilir. Bununla birlikte, matriks yüzeyindeki yüklü veya hidrofobik gruplar ile proteinler

arasında meydana gelebilecek non-spesifik adsorpsiyonun mümkün olduğunca düşük olması beklenir.

Matriks bu özelliklerinin yanı sıra, yüksek ve düşük pH değerlerine, sıcaklığa, organik çözücülerin, deterjan ve guadinhidroklorür gibi zarar verici elüentlerin kullanıldığı zor elüsyon şartlarına dayanıklı olmalı ve rejenerasyon esnasında da fiziksel ve kimyasal olarak kararlılığını korumalıdır. Ayrıca, bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir [29,39].

Biyolojik sıvılardan hedeflenen proteinin saflaştırılması ve ayrıştırılmasında, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler, poliakrilamitler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) destek materyalleri olarak kulanılmaktadır. Akrilat kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Bu grupta yer alan poli(metilmetakrilat), p(MMA), biyouyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik polimerler yapay damar, kontakt lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyouyumluluğu ve fonksiyonelliği canlı dokulardaki in vivo etkileşimleri ile kontrol edilmektedir. Bu materyal mekanik olarak güçlü olmasından dolayı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır [40].

Bu doğrultuda, araştırmacıların protein saflaştırılması için yeni destek malzemeleri elde etme çabaları sonucu, gözenekli yapılarında epoksi grubu taşıyan glisidil metakrilat bazlı polimerler kullanılmaya başlanmıştır [41]. Epoksi

grubu taşıyan destek materyalleri, enzim ve proteinlerin laboratuvar ve endüstriyel ölçekte immobilizasyonu için elverişlidir. Aktive edilebilen bu materyaller, depolama esnasında ve çözelti ortamında kararlıdır. Bununla birlikte, bu materyaller farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik türler) kararlı O-C ve N-C kovalent bağları oluştururlar [42,43]. Bu özelliklerinden dolayı, epoksi içeren destek materyalleri 1.0-12.0 gibi geniş pH aralığında biyomoleküllerin ayrıştırma ve saflaştırma işleminde etkili olarak kullanılmaktadır [42]. Poli(glisidilmetakrilat), pGMA, polimerlerindeki epoksi grupları kolaylıkla diol grupları meydana getirmek üzere hidroliz edilebilirler. Epoksi grupları ayrıca, iyon değişim mekanizmalarında kullanılmak üzere türevlendirilebilir [44,45].

Afinite kromatografisinde kullanılan destek materyalleri, küre, çubuk veya membran yapıda hazırlanabilir. Çoğu ayırma ortamlarında, küre yapıdaki destek materyalleri sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilir [46,47].

Afinite kromatografisinde kullanılan küre yapıdaki materyallerin boyutu 50-400 μm aralığındadır [5]. Küre yapıdaki destek malzemelerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımdan direkt olarak izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamasının yanında, işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olur [48,49]. Adsorpsiyon işleminde kullanılan küre yapıdaki sorbentin partikül boyutu ve gözenekliliği daha fazla yüzey alanı sağladığından önemli bir kriterdir. Kürelerin gözenek büyüklüğü, saflaştırılmak istenen hedef molekül veya immobilize edilecek büyük moleküllü ligandların bağlanmasına izin verecek boyutta olmalıdır [5].

Mikroküre halinde hazırlanan polimerik yapılar geniş ölçekli üretilebilmesi ve farklı aktivasyon yöntemleri ile aktive edilebilir olması nedeniyle ilgi çekicidir [50-52]. Gözenekli veya gözeneksiz polimerik mikroküreler, genellikle süspansiyon polimerizasyonu ile üretilir. Bu işlemler, küreler için geniş aralıklı partikül büyüklüğü sağlamakla birlikte, polimerizasyon şartlarında yapılan uygun değişiklikler, yapısal özelliklerinde de değişiklik sağlayabilir [53].

2.3.1.1. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu, günümüzde bir çok önemli polimerin, yüksek kapasitelerde üretiminde kullanılmaktadır. Bugün, akrilik ve metakrilik asitler, stiren ve kopolimerleri, vinil asetat, vinil klorür, vinilidin klorür, tetrafloroetilen, klorotrifloroetilen ve daha bir çok doymamış monomerin polimerizasyonu bu yöntemle gerçekleştirilmektedir.

Bu yöntemde, monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı olarak genellikle su kullanılır. Başlatıcı suda dağılmış halde bulunan monomer damlacıkları içinde çözünmüştür. Ortam sürekli karıştırılarak monomer süspansiyonunun devamlılığı sağlanır. Dağıtma ortamında çözünen süspansiyon stabilizatörleri ve emülsifiye ediciler eklenerek süspansiyon sisteminin kararlılığı sağlanır. Sisteme uygun bir ısıtma programı uygulanarak, monomer damlacıkların küresel tanecikler haline dönüşmesi sağlanır. Bu işlemde, sistem parametrelerinin ayarlanması ile, 10 μm'den 10 nm'ye kadar istenilen boyda polimer tanecikleri elde edilebilir. Sürekli karıştırma gerektirmesi, süzme, yıkama, kurutma gibi yan

işlemler içermesi ve yüzeyinde adsorbe olan stabilizatörler ve diğer katkı maddeleri nedeniyle ürün kirlenmesi bu sistemin dezavantajını oluşturmaktadır [54].

2.3.2. Uzatma Kolu

Destek materyalindeki ligand küçük bir molekül olduğunda (örneğin; reseptör ya da bir kimyasal antijen), hedef molekül ile destek materyali arasında sterik engelleme meydana gelir. Bu olay bir indirgenme ya da spesifik bağlanma eksikliğine sebep olur. Bu problemi gidermek için çoğunlukla ya farklı bir destek materyali seçilir ya da ligand bağlanmadan önce destek materyaline bir uzatıcı molekül bağlanır. Bir uzatma kolunun kullanımı ligandın destek materyali yüzeyinden uygun bir uzaklığa yerleşmesini sağlar. Uzatma kolu, matriks ile ligand arasında etkin bağlanmayı sağlayan ara maddelerdir [55].

Bu materyaller, matriksin reaktif bölgesine doğrudan bağlanabilir. Bu aşamadan sonra ikinci bir reaksiyon ile uzatma kolu takılı destek malzemesine ligand bağlanır. İdeal bir uzatma kolu; uygun uzunlukta olmalı (en az üç atomlu), destek materyali ile örnek arasında non-spesifik adsorpsiyona sebep olmamalı ve bifonksiyonel grupları hem substrat hem de ligand ile etkileşime girebilmelidir [56]. Hekzametilendiamin, propandiamin ve etilendiamin gibi yapısında diamin grupları bulunan bileşikler afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılan uzatma kollarıdır [57]. Aktivasyon işleminde kullanılan aktivasyon ajanı da uzatma kolu gibi davranabilir. Örneğin glutarikdialdehit, beş karbonlu bir uzatma kolu görevi yapar [40].

2.3.3. Aktivasyon Ajanları

Afinite kromatografisinde, destek malzemelerinin hazırlanmasının ikinci aşamasını oluşturan, aktivasyon işlemi; destek materyaline ligand bağlanması için gerekli olan reaktif grupları elde etmek için uygulanan çeşitli yöntemleri içerir. Bu doğrultuda siyanojen bromür, epoksit, peroksit, triazin aktivasyonu gibi destek materyalindeki fonksiyonel grupların varlığına göre farklı aktivasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Diğer önemli aktivasyon yöntemleri, karbonilasyon, 2,2,2-trifluoroethanesulfonil klorid, diglikolik anhidrat, sülfonik asit klorid ve Woodward K yöntemi sayılabilir [58].

2.3.4. Ligand

Biyomoleküllerin ayrımı için kullanılan ligandlar, biyolojik, pseudo-spesifik ve metal iyonları gibi çok çeşitli olabilir. Ligand, hedef moleküle spesifik ve tersinir olarak bağlanmalı ve destek materyaline bağlanmaya olanak verecek gruplar içermelidir. Ancak, uygulanacak aktivasyon işlemi, ligandın spesifik bağlanma aktivitesini zayıflatmamalı ve zarar vermemelidir[59]. Bu özelliklere sahip afinite ligandı olarak kullanılan materyaller monospesifik ya da grup-spesifik ligandlar olarak iki gruba ayrılabilirler.

Monospesifik ligandlar, genel olarak proteinlere grup spesifik ligandlara göre daha güçlü bir şekilde bağlanır. Bu tür ligandların ayrışma sabitleri genel olarak 10^6 - 10^8 M^{-1} aralığındadır. Bu grupta yer alan biyolojik ligandlar arasında reseptör, antikor, protein A, lektin, nükleik asitler yaygın

olarak kullanılanlardır [60-65]. Ancak bu ligandların yüksek maliyetli olmaları, yıkama ve elüsyon koşullarındaki kararsızlıkları, yapıdan sızması gibi dezavantajlarından dolayı uygulanmaları güçtür [20].

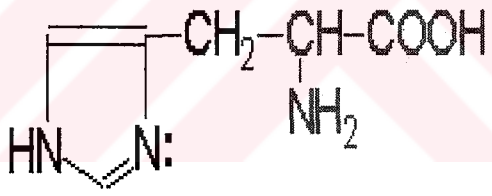
Bu olumsuzlukları gidermek için, biyolojik ligandların yerine düşük molekül kütleli ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Vijayalokshmi bu terimleri "pseudobioafinity" adı altında toplamıştır [20]. Pseudobiyospesifik ligandlar, güçlü kimyasal şartlara ve yüksek sıcaklıklara (sterilizasyon şartları) dirençlidir. Bununla birlikte düşük maliyete ve bağlanma sabitlerine (10^{-4} - 10^{-6} M^{-1}) sahiptirler [66-67]. Bu ligandlar arasında düşük molekül kütleli bileşikler, boyalar, metal şelat, tiofilik bileşikler ve boronik asit türevlerini içeren maddeler yer alır [68-72].

Afinite kromatografisinde, enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, aminoasitler, oligopeptitler, proteinler, nükleik asitler ve oligonükleotitleri içeren fonksiyonel moleküllerin geniş bir bölümü yeni sorbentlerin dizaynında ligand olarak kullanılabilmektedir [73].

2.3.4.1. Histidin

Pseudobiyospesifik ligandlar arasında yer alan L- histidin aminoasiti, biyomoleküllerin saflaştırılması için oldukça seçici ve etkin bir ligand olarak kullanılmaktadır [74]. Histidin amino asiti, zayıf hidrofobisite ve yük transfer kabiliyetine, geniş pKa aralığına sahip olması nedeniyle diğer amino asitlerden farklıdır [75,76].

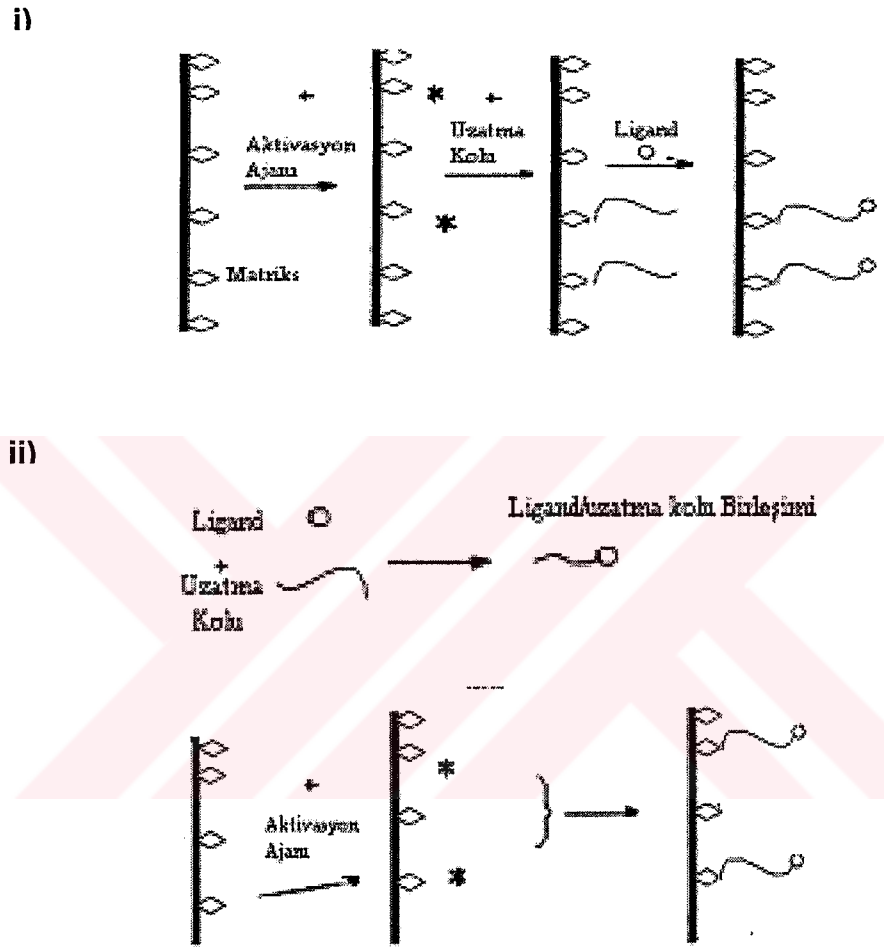
Histidin, protein ligandlara göre daha ekonomiktir. Destek materyaline kolay tutuklanan bu amino asit ligandı, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir [12]. Bu ligand, çeşitli proteinlerle izoelektrik noktaları yakınlarında karboksil, amino ve imidazol grupları sayesinde etkileşir (Şekil 2.2). Yapısındaki bu imidazol grubu, elektrostatik, hidrofobik ve iyonik etkileşimlerde bulunur [12,77,78]. Bu özellikleri sayesinde biyolojik sıvılardan IgG'lerin saflaştırılmasında başarı ile kullanılmışdır [12,77]. Ancak, Histidindeki katyonik α-NH_3^+ grubu serumdaki diğer proteinlerin de adsorplanmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Özellikle, ilaç, aminoasitler (sistein, triptofan), metaller ve steroid hormonlarından dolayı serumda varolan HSA (Human Serum Albumin) adsorplanabilir.[1]



Şekil 2.2. L-Histidin amino asitinin kimyasal yapısı

Bazen biyolojik molekülün aktif bölgesi, üç boyutlu yapısının iç kısmında bulunmaktadır. Bu durum, hedef molekül ve ligand arasında, sterik engellemeye sebep olur. Böyle durumlarda, matriks ile ligand arasına genellikle kısa alkil gruplarından oluşan uzatma kolları yerleştirilir. Bunun için kullanılan iki alternatif yöntem şematik olarak Şekil 2.3'de gösterilmektedir; (i)

matriks aktivasyon ajanı ile aktive edilir ve daha sonra uzatma kolu, aktif bölgeler üzerinden matrikse kovalent olarak bağlanır, (ii) ligand-uzatma kolu birlikte sentezlenerek taşıyıcıya tek adımda bağlanır.



Şekil 2.3. Ligandın destek malzemesine i) yüzey aktivasyonu ile ii) direkt bağlanması

2.4. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) çeşitli proteinler için yüzeyde açığa çıkan amino asit artıklarının, metal iyonu ile koordinasyon

kompleksi oluşumuna dayanan bir ayırma tekniğidir. IMAC 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 gibi bazı avantajlara sahiptir. Şelat yapma özelliğine sahip immobilize ligand üzerine farklı metal iyonlarının bağlanabilmesi ve bağlı metal iyonlarının uzaklaştırılabilmesi için EDTA kullanılması IMAC'ın diğer yöntemlere göre üstünlüğünü oluşturur [13,79-82]. IMAC yönteminde destek materyallerinin seçimi ve kompozisyonu kromatografik performansı etkileyen önemli faktörlerden biridir. Metal iyonları; sert metaller (Fe(III), Al(III) gibi), yumuşak metaller (Cu(I), Hg(II) gibi) ve sınır metaller (Cu(II), Zn(II) gibi) olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar.

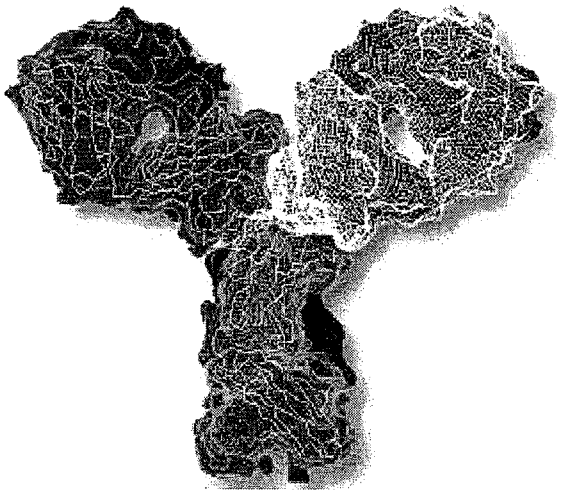
2.5. İmmünoglobulinler

İmmunoglobulinler, plazma hücrelerinde yabancı maddelerin varlığına cevap üreten aktif bir biyolojik protein grubudur. Tüm immunoglobulinler, Ig ile ifade edilen protein ailesine aittir [83]. Bu protein grubu insan hücrelerinde 12.5 kg m^{-3} miktarında bulunur. İmmunoglobulinler her biri birbirinden farklı çeşitli sınıfları içerirler. Her bir sınıfta yer alan proteinler, yapısal ve molekül ağırlığı açısından farklılıklar gösterir. Bu sınıflar arasında konsantrasyonu en yüksek olan G sınıfı immunoglobulinlerdir. Bu sınıfın plazmadaki konsantrasyonu 10 kg m^{-3} 'e kadar ulaşabilmektedir [84].

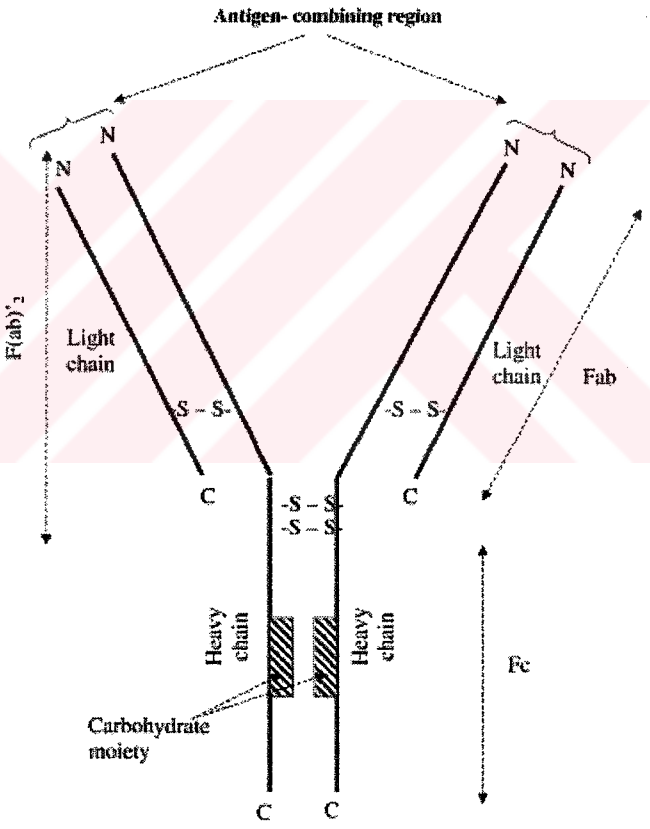
Immunoglobulinler, ağır ve hafif zincirlerden oluşurlar. Bu protein sınıflarının yapısında, (IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE) beş farklı ağır zincir

(γ,α,μ,δ,ε,) ve iki farklı hafif zincir (K ve λ) bulunmaktadır[85]. Bu zincirler, dimerlere bağlı disülfit bağ çiftleri ile değişken ve sabit bölgeler içerirler. Değişebilen bu bölgeler, antijen ile etkileşim için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bunun yanı sıra, ağır zincirin sabit bölgeleri, antikora çeşitli biyolojik fonksiyon sağlar (Şekil 2.4)[85].

A)



B)



Şekil 2.4. **A)** IgG'nin üç boyutlu yapısı

B) IgG molekülünün işlevsel şeması

Son yıllarda, kimyasal ve biyolojik anlamda spesifik antikorların üretimi için yeni tekniklerin geliştirilmesi ve kanser tedavi stratejileri için yol gösterici olmuştur[85]. IgG'ler teşhis kitlerinde, immünokromatografi, immüno terapi ve eczacılık alanında önemi olan değerli proteinlerin endüstriyel ölçekte saflaştırılmasında afinite ligand olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında, stokinler, kan pıhtılaşma faktörleri ve heparin gibi biyolojik moleküller yer almaktadır [12,85]. Modern teşhis ve tedavideki bu önemlerinden dolayı, antikorların saflaştırılması önemlidir.

IgG'ler, teşhis ve özellikle medikal uygulamalar için fizikokimyasal metodların bileşimi kullanılarak saflaştırılmaktadır. IgG lerin kan serumundan saflaştırılmasında kullanılan en basit yöntem etanol ile çöktürülmesi ile saflaştırılmasıdır [86]. Saflaştırma işlemi için kullanılan kromatografik teknikler arasında size-exclusion, iyon değişimi, hidroksi apatit ve afinite kromatografisi gelmektedir [87].

Bu teknikler arasında en sık kullanılan size-exclusion metodudur. Ancak, bu yöntem yeterli seçicilik göstermez. Protein A ve G gibi biyolojik ligandların kullanıldığı afinite sistemler yüksek seçicilik gösterirler. Ancak biyolojik ligand olmalarından dolayı ekonomik olmadıkları çok sayıda araştırıcı tarafından rapor edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda, IgG saflaştırılması için pseudobiyospesifik ligandlar kullanılmaktadır [87]. Bu ligandlar arasında yer alan histidin IgG'ye karşı yüksek seçicilik göstermektedir [85].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

İnsan İmmunoglobulin G, (insan Serumundan, cohn fraction II, III), başlatıcı olarak kullanılan α,α' azobisizobutirilonitril (AIBN) Sigma Chem. Co.(St. Louis. MO, ABD) firmasından temin edildi. Glisidil metkrilat, metil metakrilat Merck AG (Darmstadt, Almanya), etilenglikoldimetakrilat ise Aldrich Chemical Campany (USA) firmasından alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

3.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre

Sulu ortamdan IgG adsorsiyon çalışmalarında deney ortamındaki başlangıç ve bakiye protein miktarları, UV-VIS spektrofotometre ile (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi.

3.1.2.2. FTIR Spektrofotometre

p(GMA-MMA) mikroküreleriniп FTIR spektrumları (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Tabletler 0.1 g kuru mikroküre ve 0.1 g KBr karıştırılarak elde edildi ve spektrumları alındı.

3.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu

75-150 μm boyut dağılımına sahip vakum etüvünde kurutulmuş p(GMA-MMA) mikroküreleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

3.1.2.4. Elemental Analiz

Aminlenen ve uzatma kolu takılı afinite p(GMA-MMA) mikroküreleре bağlı L-Histidin ligandı miktarı element analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD) ile, azot miktarları dikkate alınarak tayin edildi.

3.1.2.5. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik çalışmalarda Dionex HPLC sistemi (Dionex Co., Germering, Germany) kullanıldı. HPLC sistemi, on-line vakumlu gaz giderici gradiyent pompa (Model P580 A), 1'den 250 μl enjeksiyon kapasitesine sahip otomatik örnek enjeksiyon ünitesi (Model ASI-100), kolon fırını (Model STH

585) ve UV-VIS diyot dizi dedektörü (Model 340 S) ünitelerinden oluşmaktadır. Protein karışımının ayrıştırılmasında VYDAC 259 VHP 5415 (iç çapı 4.6 mm, uzunluğu 150 mm) polimer polipeptit kolonu kullanıldı. Kromatografik çalışmalarda kullanılan bütün protein çözeltileri membran filtre (0.2 μm, Millipore) ile filtre edildi.

Bütün sistem CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında otomatik olarak kontrol edildi.

3.1.2.6. Kullanılan Diğer Cihazlar

pH metre (NEL Elektronik, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), vakum etüvü (Nüve EV018, Türkiye), santrifüj (Nüve, Türkiye), su banyosu (Nüve ST402, Türkiye), sirkülatörlü ısıtıcılı soğutuculu su banyosu (Labcon CPE20, Labcon LTB12140, Güney Afrika).

3.2. Yöntem

3.2.1. p(GMA-MMA) Mikroküreleri̇nin Sentezi

Küre yapıdaki poli(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat), p(GMA-MMA), kopolimeri süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Glisidilmetakrilat (5.0 ml), metilmetakrilat (7.5 ml) monomerleri, α-α' azobisizobütironitril başlatıcısı (200 mg) varlığında çapraz bağlayıcı olarak etilen glikoldimetakrilat (7.5 ml) monomerinin ve stabilizatör olarak da,

polivinil alkol, PVA, çözeltisi (%5 w/v) kullanılarak sentezlendi. Dağıtıcı ortam olarak toluen ve su, elektrolit olarak da NaCl çözeltisi (0.5 M) kullanıldı.

Polimerizasyon işleminden önce, monomer çözeltileri içindeki inhibitörler, NaOH-NaCl çözeltisi (20 ml, %5-%20, w/v) ile ekstrakte edilerek uzaklaştırıldı. Ekstrakt içinde kalabilecek muhtemel çözelti $CaCl_2$ (0.5 g) kullanılarak uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından, başlatıcı monomer karışımında çözülerek polimerizasyon ortamına aktarıldı. Polimerizasyon işlemi, 250 rpm karıştırma hızında 70 °C'de 2 saat, 80 °C'de 1 saat mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra, süzülen mikroküreler sırası ile, distile su ve etanol ile yıkandı. Vakum etüvünde kurutulan p(GMA-MMA) destek materyali moleküler elek ile elenerek boyut dağılımı belirlendi ve polimerizasyon verimi hesaplandı.

3.2.2. p(GMA-MMA) Mikroküre lerinin Aktivasyonu

3.2.2.1. p(GMA-MMA) Mikroküre lerine Uzatma Kolu Takılması

p(GMA-MMA) mikroküre lerinin yapısında bulunan epoksi gruplarına uzatma kolu olarak altı karbonlu hekzametilendiamin küreler üzerine kovalent olarak bağlandı. Bu amaçla reaktördeki HMD çözeltisi (%1 w/v, pH 10.0) içerisine 75-150 μm boyut dağılımına sahip olan p(GMA-MMA) mikroküreleri (5 g) aktarılarak, 65 °C' de 5 saat süre ile manyetik olarak karıştırmalı ortamda reaksiyonu sağlandı. İşlem sonunda süzülen mikroküreler distile su ile yıkandı.

3.2.2.2. p(GMA-MMA) Mikroküreleriniin Aminlenmesi

Uzatma kolu taşımayan p(GMA-MMA) afinite sorbenti hazırlamak için, 75-150 μm boyut dağılımına sahip olan p(GMA-MMA) mikroküreler (5 g) amonyak çözeltisi (%25 v/v) ile 50 °C'de 5 saat süresince sürekli karıştırılarak inkübe edildi ve yüzeyde amin grupları taşıyan mikroküreler elde edildi. Reaksiyon sonunda süzülerek ortamdan alınan mikroküreler, distile su ile yıkandı.

3.2.2.3. Mikroküreleriin Glutarikdialdehit ile Aktivasyonu

Uzatma kolu takılı ve/veya aminlenen p(GMA-MMA) mikroküreleri (~ 5.0 g), fosfat tamponu içersinde (50 mM, pH 7.4) dengeye getirildi ve reaktörde aynı tampon sisteminde hazırlanan glutarikdialdehit çözeltisi (% 0.25 v/v, 100 ml) ortamına aktarılarak, 12 saat boyunca manyetik karıştırıcılı ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. Aktivasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra mikroküreler sırası ile distile su, asetik asit çözeltisi (100 mM, 100 ml) ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7.0) ile yıkanarak gulutarikdialdehitin fazlası uzaklaştırıldı. Aktive edilen p(GMA-MMA) mikroküreleri 40 °C'da vakum etüvünde kurutuldu.

3.2.2.4. Mikroküreleriine L-Histidin Ligandının Bağlanması

Glutarikdialdehit ile aktive edilen uzatma kolu takılı ve/veya aminlenen p(GMA-MMA) mikroküreleri (~ 5 g), pH'sı 10.0 olan, 40 ml L-Histidin ligandı

içeren çözelti (4 mg L-Histidin/ml çözelti) ortamına aktarılarak oda sıcaklığında manyetik karıştırmalı sistemde inkübasyonu sağlandı. Bu yolla hazırlanmış olan p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleri distile su ve tampon ile yıkanarak vakum etüvünde kurutuldu.

3.2.2.5. L-Histidin Ligandı Bağlı Mikroküreleere Metal İyonu Bağlanması

Uzatma kolu takılı ve L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite sorbentine sınır metal iyonu Cu(II)'nin bağlanması, mikroküreler üzerine bağlı L-Hisitidin ligandın yapısındaki imidazol grupları ile metal iyonlarının arasındaki koordinasyon kompleksleri oluşumuna dayanır. Bu doğrultuda, pH'sı 4.1 olan 50, 100, 200 ve 300 ppm'lik nitrat tuzlarını içeren metal iyonu çözeltileri hazırlandı. Ortamın pH'sı deneyin başlangıcında 0.1 Molar hidroklorik asit (HCl) ile ayarlandı ve daha sonra kontrolü yapılmadı. Ligand bağlı mikroküreler metal çözeltisi içeren ortama aktarıldı, 25°C'de 4 saat süreyle 100 rpm'de karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-histidin-Cu(II) afinite mikroküreleri fosfat tamponu (50 mM pH 7.0) ile birkaç kez yıkandı.

Metal iyonu bağlı mikroküreleerden metal iyonunun desorpsiyonu pH'sı 4.9 olan 25 mM EDTA içeren tampon çözeltisi ile gerçekleştirildi. Üzerinde metal iyonları bağlı olan mikroküreler tampon içine yerleştirildi ve 25°C'da 100 rpm'de 60 dakika süresince karıştırıldı. Ortamdaki bakiye metal iyonları konsantrasyonu Sodyumdietilditiyokarbamat (Na-DDTC) ile verdiği renkli

kompleks oluşumundan faydalanarak, 436 nm de spektrofotometrik olarak tayin edildi [98].

3.2.3. Kürelerin Karekterizasyonu

3.2.3.1. Mikroküreleri̇n Şişme Oranı

p(GMA-MMA) mikroküreleri̇nin şişme oranı, di̇sti̇le su i̇çi̇nde tayi̇n edi̇ldi̇. Di̇sti̇le su bulunan volümetri̇k kap (10 ml) i̇çeri̇si̇ne ~ 1g küre aktarılarak 24 saat sonundaki yükseklik okundu ve mikroküreleri̇n şişme oranı, (3.1) eşi̇tli̇ği̇ kullanılarak hesaplandı.

Şişme Oranı = ilk yükseklik / son yükseklik *(3.1)*

3.2.3.2. Mikroküreleri̇n Yoğunluğu

p(GMA-MMA) mikroküreleri̇n yoğunluğu pi̇knometre yardımıyla, mikroküreler i̇çi̇n çözücü olmayan bır sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

3.2.3.3. Mikroküreleri̇n Yüzey Morfolojileri

Vakum etüvünde kurutulmuş 75-150 µm boyut dağılımına sahip p(GMA-MMA) mikroküreleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve kürelerin elektron mikrografları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

3.2.3.4. Mikroküreleriin Yüzey Alanı

p(GMA-MMA) mikroküreleriin yüzey alanı, BET (Brunauner-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü. Çok tabakalı fiziksel adsorpsiyonu ifade eden teorik BET denklemi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir [97].

$$q_{den} = BQ^{o} C_{den} / (C_s - C_{den})[1 + (B-1)(C_{den}/C_s] \qquad (3.2)$$

Burada, C_s adsorplanan bileşenin doygunluk konsantrasyonu, B ve Q^{o} ise sırasıyla adsorplayıcı yüzeyi ile çözelti arasındaki etkileşim enerjisini gösteren ve tek tabaka adsorpsiyon kapasitesini ifade eden bir sabittir.

3.2.3.5. Mikroküreleriin FTIR Spektrumu

p(GMA-MMA) mikroküreleriine ait FTIR spektrumu, FTIR spektrometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. 0.1 g kuru küre ve 0.1 g KBr karıştırılarak tablet haline getirildikten sonra spektrumu alındı.

3.2.3.6. Epoksi Grubu Tayini

p(GMA-MMA) mikroküreleriin yüzeyde ulaşılabilir epoksi grubu içeriği literatürde verilen piridin-HCl yöntemi ile tayin edildi [96]. Bu amaçla, 0.5 g mikroküre piridin-HCl çözeltisi (50 ml) ile 20 dakika geri soğutucu altında

etkileştirildi. Reaksiyon sonunda örnek ayarlı NaOH çözeltisi (0.1 M) ile titre edildi.

3.2.3.7 Amin Grubu Tayini

Uzatma kolu takılı olan p(GMA-MMA) mikroküreleri bağlanan amin grubu miktarı, başlangıç ve reaksiyon sonundaki bakiye hekzametilendiamin konsantrasyonunun spektrofotometrik yöntem kullanılarak 211 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ve amin gruplarının titirasyona dayanan ölçüm yöntemleri ile belirlendi. Aminlenen p(GMA-MMA) mikroküreleri üzerine bağlanan amin grupları da yukarıda ifade edildiği gibi literatürde verilen titrasyon yöntemi ile tayin edildi [88].

Hazırlanan sorbentlerin taşıdıkları amin grupları miktarının titrasyon ile belirlenebilmesi için, aminlenen ve/veya uzatma kolu takılı olan p(GMA-MMA) mikroküreleri (0.2 g), distile su içerisinde 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda süzülen mikroküreler 1 saat süresince HCl çözeltisi (2.0 M, 10 ml) ile muamele edilerek ayarlı NaOH çözeltisine (2.0 M) karşı titre edildi.

3.2.3.8. Afinite Mikroküreleere Bağlanan Ligand Miktarının Belirlenmesi

p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite sorbentlerinin yapısındaki histidin ligandı miktarı, çözeltinin başlangıç ve reaksiyon sonundaki bakiye konsantrasyonlarının spektrofotometrik olarak ölçümüyle belirlendi.

3.2.4. Protein Adsorpsiyon Çalışmaları

Uzatma kolu takılı L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) ve L-Histidin bağlı p(GMA-MMA) mikroküreleri sulu ortamdan IgG adsorpsiyon davranışları kesikli sistemde incelendi. Afinite sorbentlerin protein adsorpsiyonuna pH, sorbent dozu, sıcaklık, başlangıç protein konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisi araştırıldı. Deneyler, 1.0 mg ml^{-1} başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 7.5 ml tampon içinde, 50.0 mg afinite sorbentin bulunduğu adsorpsiyon ortamında, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında 4 saat süreyle gerçekleştirildi.

3.2.4.1. pH Etkisi

Adsorpsiyon ortam pH'sının, IgG ayrıştırılması ve saflaştırılmasına etkisi pH 4.0 - 8.0 aralığında farklı tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. pH 4.0-5.0 aralığında asetat tamponu (50 mM CH_3COONa/CH_3COOH) ve pH 6.0-8.0 aralığında fosfat tamponu (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4) kullanıldı. Deneyler 1.0 mg ml^{-1} başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 7.5 ml tampon içinde, 50 mg afinite sorbenti içeren ortamda 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında 4 saat süreyle gerçekleştirildi.

Afinite mikroküreleere adsorplanan IgG miktarı, başlangıç ve 4 saat sonunda adsorpsiyon ortamında kalan protein derişiminin 280 nm dalga boyunda çift ışık demetli UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak absorbanslarının ölçülmesiyle tayin edildi. Sulu ortamdaki protein miktarının

belirlenebilmesi için, başlangıç protein konsantrasyonu 0.125-3.0 mg/ml aralığında tutularak kalibrasyon grafiği elde edildi. Deney sonucunda mikroküreler adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorplanan protein miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q = [(C_o - C) V_S] / m \qquad (3.3)$$

Yukarıdaki eşitlikte q; küreler üzerine adsorplanan IgG miktarını (mg g^{-1}), C_o; proteinin başlangıç konsantrasyonunu (mg ml^{-1}), C; adsorpsiyon sonrası çözelti ortamındaki proteinin denge konsantrasyonunu (mg ml^{-1}), V_S; çözelti hacmini (ml) ve m; adsorpsiyon ortamındaki sorbent miktarını (mg) göstermektedir.

3.2.4.2. Zamanın Etkisi

Hazırlanan her bir yapıdaki afinite mikroküreleriyle sulu ortamdan protein ayrıştırılması işleminin zamana bağlılığını belirlemek, sorbentin sürekli sistemde kullanılma aşamasında önemlidir. p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleriyle adsorpsiyonunun zamanla değişimi tampon çözeltisi içinde protein başlangıç konsantrasyonu 1.0 mg ml^{-1} ve 2.5 mg ml başlangıç protein konsantrasyonunda 6 saat süresi boyunca kesikli sistemde çalışıldı ve (3.3) eşitliği kullanılarak adsorpsiyon hız ve kapasitesi belirlendi.

3.2.4.3. İyonik Şiddet Etkisi

Protein adsorpsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisi, adsorpsiyon koşulları 7.5 ml, 1.0 mg IgG/ml olan fosfat tamponu içerisinde NaCl içeriği 0.0 M, 0.1 M, 0.5 M ve 1.0 M olacak şekilde değiştirilerek gerçekleştirildi. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de gerçekleştirildi.

3.2.4.4. Afinite Sorbent Dozunun Etkisi

Destek materyali miktarının protein adsorpsiyonuna etkisi, sorbent miktarı 12.5 -150 mg aralığında değiştirilerek incelendi. Bu şekilde katı/sıvı oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi belirlendi.

3.2.4.5. Adsorpsiyon İzotermleri

Uzatma kolu takılı L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) ve L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) mikroküreleri adsorpsiyon kapasiteleri, 0.125-3.0 mg ml^{-1} IgG konsantrasyonunda araştırılarak deneysel adsorpsiyon izotermi elde edildi. Adsorpsiyon deneyleri 7.5 ml, 50 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda, 25 °C'de, 4 saat süreyle, 100 rpm hızla devamlı karıştırılarak yapıldı. Deney sonunda mikroküreler, protein çözeltisinden uzaklaştırıldı ve adsorplanan protein miktarı (3.3) eşitliği kullanılarak hesaplandı.

p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleri ile sulu ortamdan IgG adsorpsiyonunda belirlenen

deneysel verilerin teorik olarak türetilen Langmiur ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.

Deneysel verilerden elde edilen C_{den} ve q_{den} değerleri kullanılarak Langmuir eşitliğine göre, C_{den} / q_{den}'ye karşı q_{den} grafiği çizildi. Bu grafiğin kaymasından K_d ve eğimden de q_m değerleri belirlendi. Freundlich modelini ifade eden (2.3) eşitliği kullanılarak ln q* – ln C_{den} grafiği elde edildi ve eğimden n ve kaymadan da K_F parametreleri belirlendi.

3.2.4.6. Sıcaklık Etkisi

Protein adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi dört farklı sıcaklıkta (4, 15, 25 ve 37 °C), fosfat tamponunda (7.5 ml 50mM, pH 7.0) ve 1.0 mg/ml başlangıç protein konsantrasyonu koşullarında araştırıldı.

3.2.4.7. Adsorpsiyon Kinetikleri

Yeni geliştirilen afinite mikroküreler ile sulu ortamdan IgG adsorpsiyonundan elde edilen deney sonuçları birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanarak adsorpsiyon sisteminin kinetiği araştırıldı. Sulu ortamdan adsorpsiyon davranışı için kullanılan birinci dereceden kinetik eşitlik modeli aşağıdaki formül ile ifade edilir [89-91].

$$dq_t / dt = k_1 (q_{den} - q_t) \qquad (3.4)$$

Bu eşitlikte k_1, birinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (dak^{-1}), q_{den} ve q_t sırası ile denge ve t zamanında adsorplanan protein miktarını göstermektedir ($mg\ g^{-1}$).

Eşitliğin integralinin alınması ile (t=0 anında ve t=t olduğunda $q_t = q_t$) aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$log\ (q_{den} - q_t) = log\ q_{den} - (k_1.t)/2{,}303 \qquad (3.5)$$

Elde edilen deneysel verilerin birinci dereceden kinetik modeline uygulanması ile log ($q_{den} - q_t$) - t grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edildi. Bu doğrunun eğiminden k_1 sabiti ve kaymasından ise q_{den} değeri belirlendi.

Ritchie, katı üzerine gazların adsorpsiyonunun kinetiği için, bir ikinci derece hız eşitliği önermiştir [90]. İkinci derece eşitlik, sorbentler üzerine, solutların adsorpsiyonu için uygulanabilir [91]. İkinci derece eşitliği, adsorpsiyon kapasitesine dayanır ve şu şekilde ifade edilebilir:

$$q_m / (q_m - q_t) = k_2\, t + 1 \qquad (3.6)$$

Bu eşitliğin doğrusal şekli (3.7) eşitliği ile verilir.

$$1/q_t = 1/k_2\, q_m\, t + 1/q_m \qquad (3.7)$$

Afinite mikroküreler ile elde edilen deneysel veriler, ikinci dereceden kinetik denklemine uygulanarak, hız kinetiği belirlendi. Bu doğrultuda, eşitlik (3.7) kullanılarak $1/q_t$ 'ye karşı 1/t grafiğe geçirildi, elde edilen doğrunun

kayma ve eğiminden sırasıyla, adsorpsiyon kapasitesi q_m ve hız sabiti k_2 hesaplandı.

3.2.4.8. Protein Desorpsiyonu ve Tekrar Kullanılabilirlik

Destek materyaline adsorplanan IgG desorpsiyonu glisin-HCl (pH,2.6) çözeltisi ile gerçekleştirildi. İmmünoglobulin G adsorplanmış mikroküreler desorpsiyon ortamına yerleştirilerek 100 rpm karıştırma hızında 25 ^{0}C'de 4 saat süre boyunca devamlı karıştırılarak gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda mikroküreler çözelti ortamından uzaklaştırıldı ve 280 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre ile absorbansı ölçüldü. Desorpsiyon ortamına geçen protein miktarı aşağıdaki eşitlik yardımıyla belirlendi.

Desorpsiyon oranı=[Desorbe edilen protein miktarı x 100]/[Mikroküre üzerine adsorplanan protein miktarı] *(3.8)*

Afinite mikroküre lerin tekrar kullanılabilirlikleri adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemi aynı sorbentin 10 kez kullanılması ile test edildi.

3.2.5. HPLC Çalışma Koşulları

Proteinlerin ayrıştırılmasında taşıyıcı faz olarak A hattında; ultra saf su içerisinde % 0,1 trifluoroasetik asit (TFA) ve B hattında ise % 95 asetonitril (AcN) ve % 5 ultra saf su içerisinde % 0,1 oranında TFA kullanıldı. Mobil fazlar kullanılmadan önca filtre edildi. B hattı taşıyıcı fazı, A fazına oranla 20

dakika içerisinde % 25'ten % 60'a çıkarıldı. 4,5 dakika sonunda ise % 60'tan % 25'e indirildi. Hareketli fazın akış hızı 1 ml dakika^{-1} olarak seçildi. Kolon fırın sıcaklığı 25 °C'ye UV-VIS dedektörü ise 220 nm'ye ayarlandı. Her bir örnekten 20 µl enjekte edildi.

3.2.5.1. Kesikli Sistemde Kan Serumundan IgG Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

İnsan serumundan IgG saflaştırma çalışmaları için, Kırıkkale Üniveristesi Tıp Fakültesinden alınan insan serumu 50 mM, pH 7.0 fosfat tamponu ile 1:5 oranında seyreltildi. Adorpsiyon işlemi, toplam 7.5 ml hacim içerisinde, 50 mg sorbent miktarı kullanılarak 25 °C'de, 4 saat süre ile 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi. Kullanılan proteinin kalibrasyonu ve alıkonma zamanı yukarıda verilen gradiyent programı kullanılarak ve en az üç deney sonucunun ortalaması alınarak belirlendi. Başlangıç ve adsorpsiyon sonunda bakiye serum çözeltisindeki IgG miktarı HPLC ile belirlendi.

4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

4.1. Sonuçlar

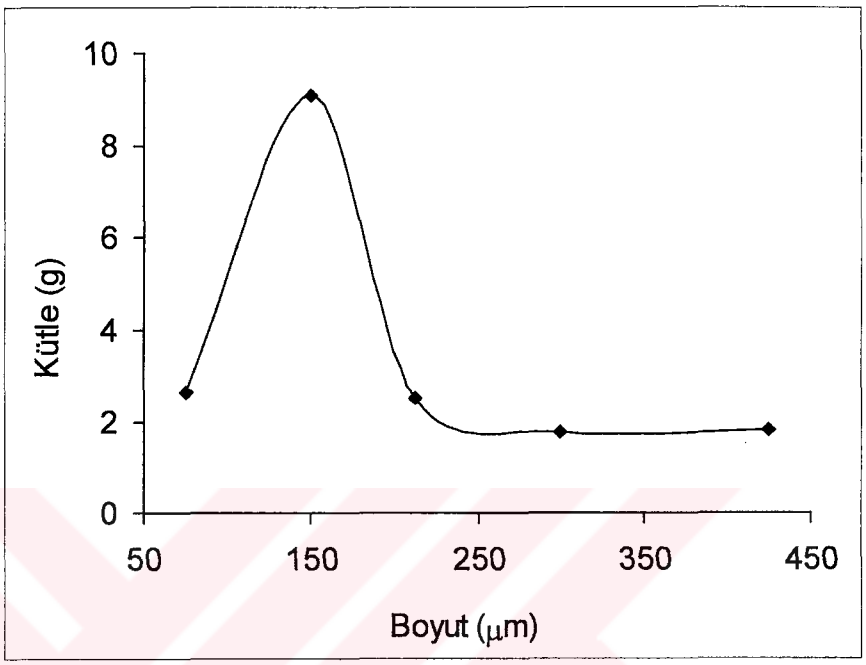
Günümüzde, dünyada yılda 27 ton kadar IgG tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, IgG'ler sitokinler ve kan pıhtılaştırıcı faktörler gibi farmasotik öneme sahip proteinlerin saflaştırılmasında biyoafinite ligandı olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, afinite kromatografisi alanında kullanılmak üzere, insan serumundan tek basamakta immunoglobulin G uzaklaştırılması ve saflaştırılması işleminde, uygulanabilecek yeni bir destek materyali geliştirildi. Bu amaçla, p(GMA-MMA) polimerik destek materyali süspansiyon polimerizasyonu ile küresel yapıda sentezlendi. Bu mikroküreleri yüzeyi aktive edilerek p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-histidin-Cu(II) afinite mikroküreleri pseudospesifik afinite sorbenti olarak hazırlandı.

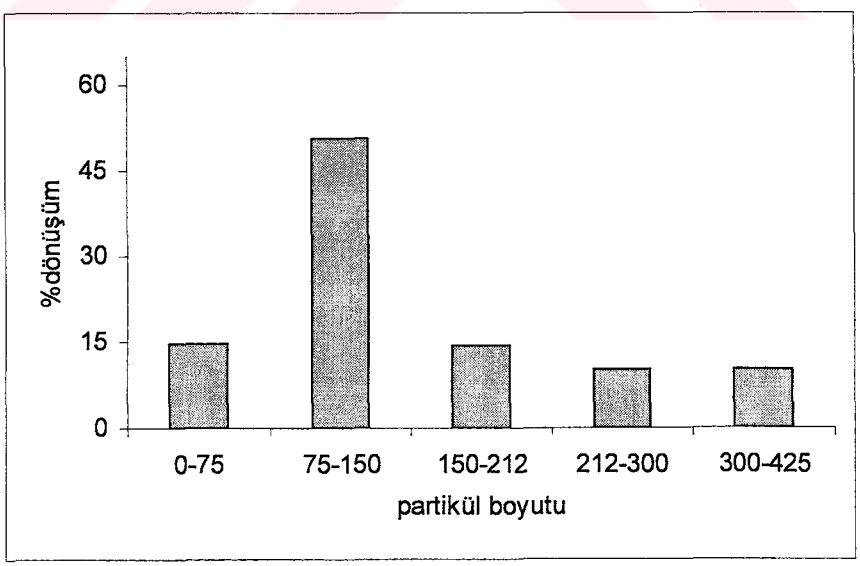
4.1.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen p(GMA-MMA) mikroküreleri, 425-300-212-75-150 μm gözenek çaplı moleküler elekler kullanılarak boy ve boyut dağılımı belirlendi (Şekil 4.1). Polimerizasyon verimi %65 olarak belirlenen 75-150 μm boyut dağılımına sahip olan mikroküreler, deneyde kullanılmak üzere ayrıldı (Şekil 4.2).

Protein adsorpsiyonu çalışmalarında, destek materyalinin su içeriği önemlidir [12]. Metakrilat kökenli olan p(GMA-MMA) kürelerinin şişme oranı 1.3 olarak bulundu. Afinite mikroküreleri yoğunluğu 1.11 g cm^{-3} olarak belirlendi.



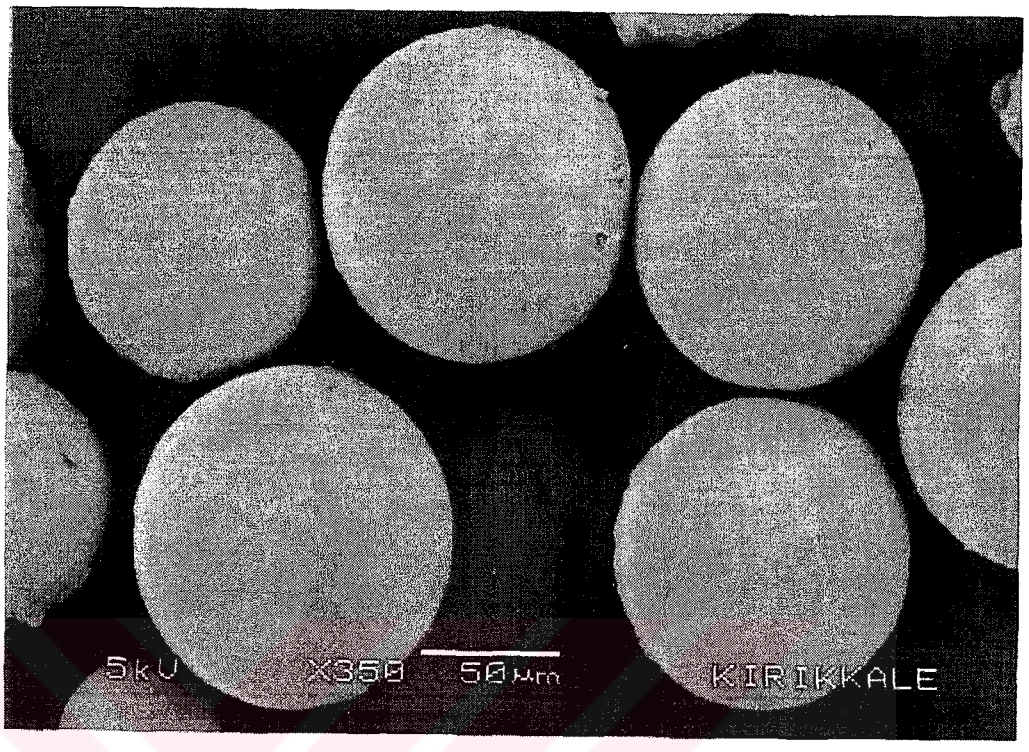
Şekil 4.1. p(GMA-MMA) mikroküreleri̇nin boyut dağılımı



Şekil 4.2. p(GMA-MMA) mikroküreleri̇ne ait boyut dağılımı

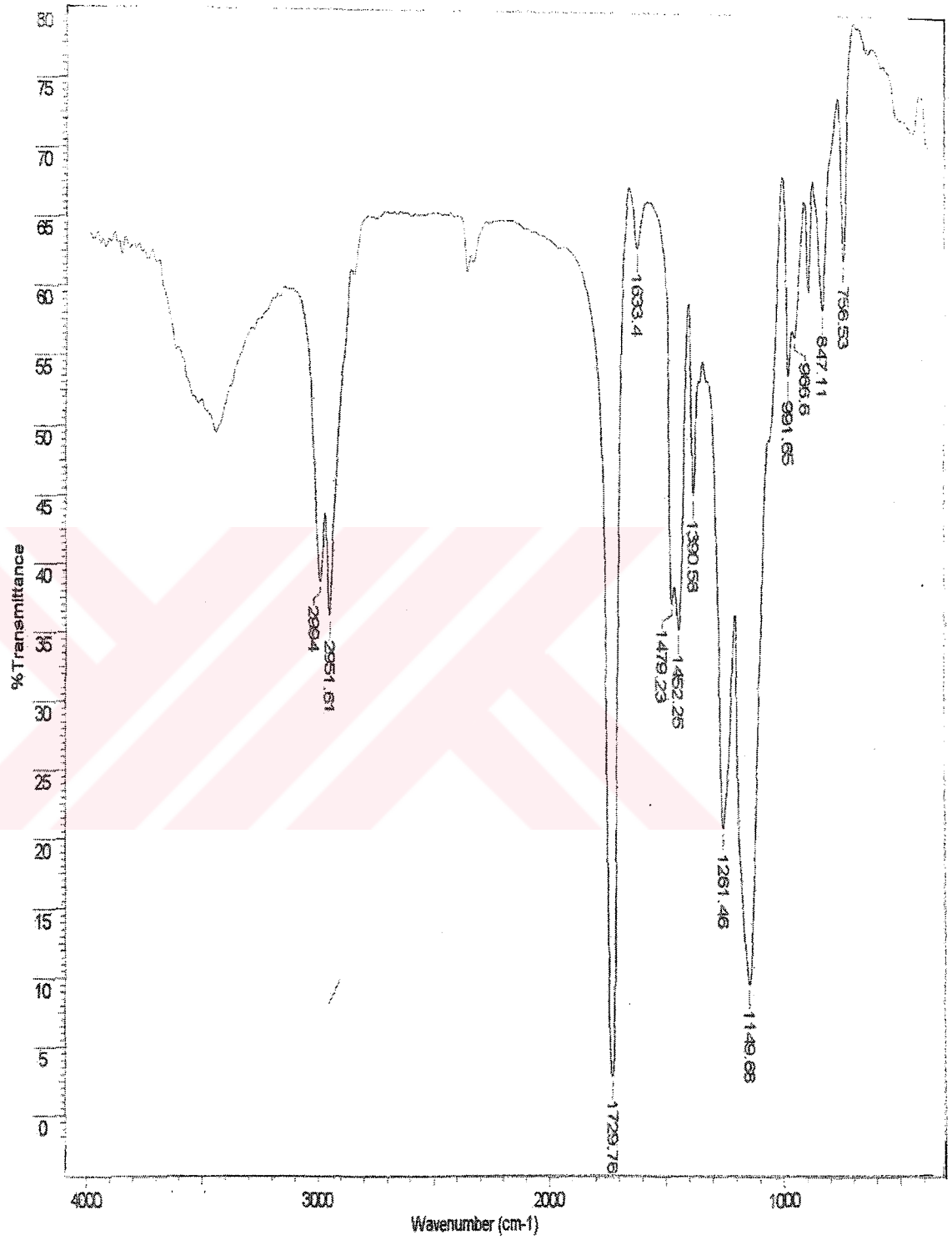
Taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen p(GMA-MMA) mikroküreleriniin yüzey morfolojisi görüntülerinden, gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlendi (Şekil 4.3). Kromatografik amaçla kullanılacak mikroküreleriin gözenekli yüzey yapısı, geniş bir yüzey alanı sağladığından yüksek ligand immobilizasyonu ve yüksek protein adsorblama kapasitesine ulaşılmasını sağlar. Bu sayede destek materyalinde düşük difüzyon direnci elde edilir. 75-150 μm boy ve boyut dağılımına sahip mikroküreleriin spesifik yüzey alanı 19.74 m^2/g olarak bulundu.

İdeal bir destek malzemesinin, protein saflaştırma çalışmalarında kullanılması için kimyasal ve mekanik dirence, üzerinde taşıdığı yeterli fonksiyonel grup sayısına, gözenekli ve hidrofilik bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Çalışmamızda destek malzemesi olarak hazırlanan p(GMA-MMA) mikroküreleri, bu koşulları sağlayabilecek özellikleri taşımaktadır.



Şekil 4.3. p(GMA-MMA) mikroküreleriniin SEM mikrografı

p(GMA-MMA) mikroküreleriin FT-IR spektrumu, Şekil 4.4'de verildi. Spektrumdan görüldüğü gibi,~ 2951 cm^{-1}de görülen metilen ve 2994 cm^{-1}'deki metil titreşimleri glisidil metakrilat ve metil metakrilat'ın karakteristik titreşimleridir. 1730 cm^{-1}'de görülen titreşim glisidil metakrilat ve metil metakrilat'ın ester konfigürasyonuna aittir. Epoksi grubu, 910 cm^{-1}'de bant verir.



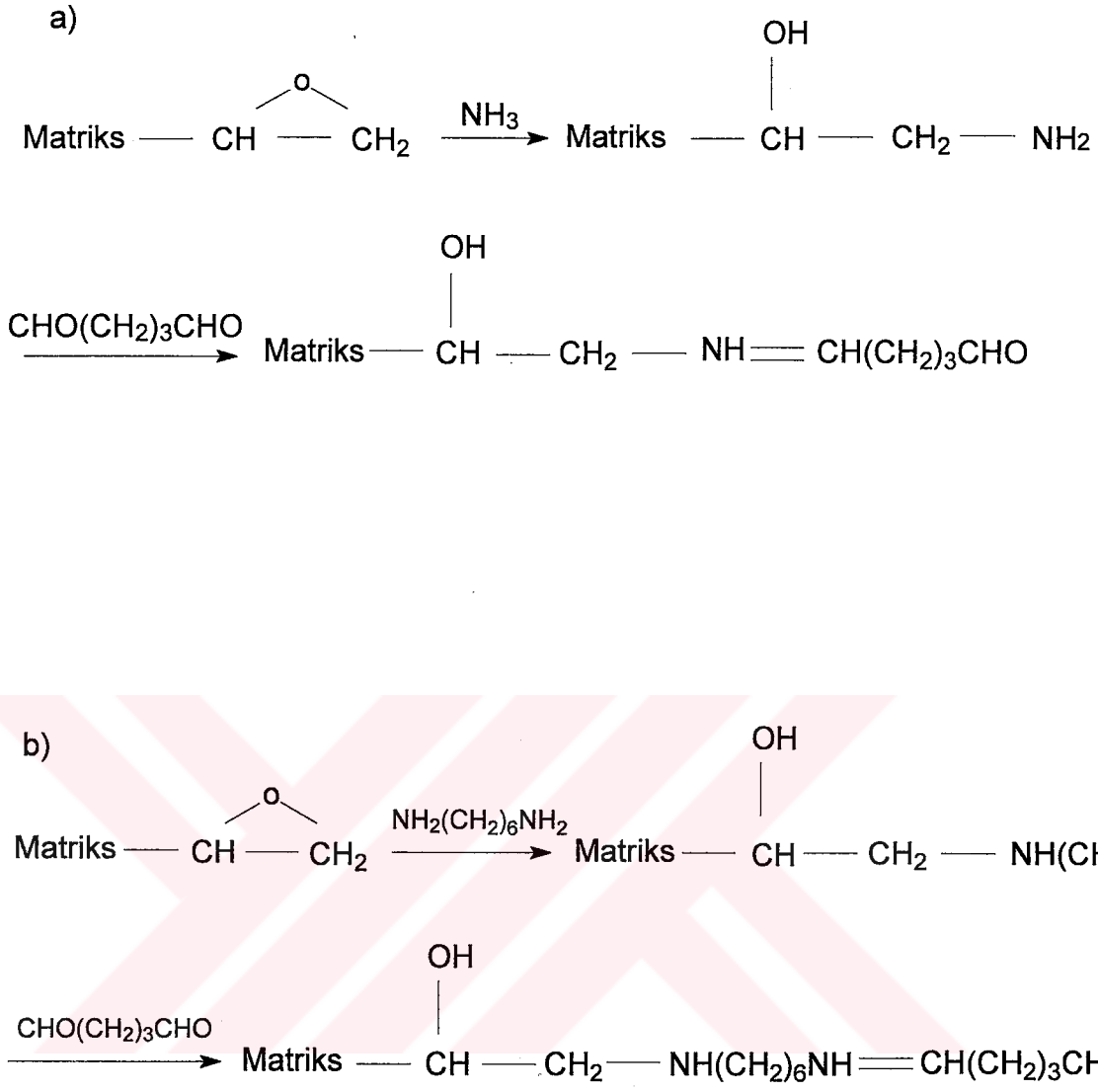
Şekil 4.4. p(GMA-MMA) mikrokürelerinin FT-IR spektrumu

4.1.1.1. Mikroküreleri Aktivasyonu

p(GMA-MMA) mikroküreleri (75-150 μm boyut dağılımında olan) epoksi grupları hidroliz edilerek yüzeyinde hidroksil grubu bulunan *p(GMA-MMA)* mikroküreleri dönüştürüldü ve adsorpsiyon işleminde IgG proteini ile yüzeyinden ligand takılı karşıtlarına karşı kontrol amaçlı kullanıldı.

Çalışmalarımızda IgG saflaştırılmasında kullanılmak üzere üç farklı yöntemle hazırlanan afinite sorbentleri kullanıldı; (1) epoksi grubu taşıyan p(GMA-MMA) mikroküreleri amonyak varlığında aminlenerek yüzeylerinde amin grupları oluşturuldu ve glutarikdialdehit aktivasyonundan (Şekil 4.5a) sonra ligand olarak L-Histidin amino asidi kovalent olarak bağlandı ve *p(GMA-MMA)-L-Histidin* afinite sorbenti olarak isimlendirildi, (2) sorbent yüzeyine altı-karbonlu-uzatma kolu takılmasının protein adsorpsiyonuna olan etkisini araştırmak amacı ile, mikroküreleri hekzametilendiamin uzatma kolu takılarak yüzey aktivasyonu glutarikdialdehid ile yapıldı (Şekil 4.5b) ve L-Histidin amino asidi polimer yüzeyine bağlanarak *p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin* afinite mikroküreleri hazırlandı, (3) uzatma kolu takılı ve L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite mikroküreleri ile Cu(II) metal iyonları arasında şelat oluşturularak immobilize metal selat afinite sorbenti oluşturuldu. Geliştirilen üç farklı afinite sorbenti kullanılarak sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu ve ayrıca, *p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin* afinite sorbenti işlemde kan serumundan IgG nin saflaştırılmasında kullanıldı.

Hazırlanan afinite mikroküreleri kesikli sistemde, sulu ortamdan IgG uzaklaştırılması ve saflaştırılması işleminde optimum parametreler belirlenerek insan serumundan IgG saflaştırılmasında kullanıldı.



Şekil 4.5. p(GMA-MMA) mikroküreleriniin a) aminlenerek b) uzatma kolu takılarak gerçekleştirilen aktivasyonu

4.1.1.2. Afinite Sorbentlerin Karakterizasyonu

p(GMA-MMA) mikroküreleriniin yüzeyde ulaşılabilir epoksi grubu içeriği, pridin-HCl yöntemi kullanılarak 1.27 mmol/g olarak bulundu. Elementel analiz cihazı kullanıldığında aminlenen ve uzatma kolu takılı p(GMA-MMA) mikroküreleriindeki amino gruplarının miktarı literatürde verilen titrasyon yöntemi ile sırası ile 10.4 ve 16.4 mmol/g olarak hesaplandı.

Aminlenen ve uzatma kolu takılı p(GMA-MMA) mikroküreleri aktivasyonunda aktivasyon ajanı olarak kullanılan glutarikdialdehit'in %31 mertebesine kadar küreler üzerine bağlandığı belirlendi.

p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleriinin elementel analizi yapıldı. L-histidin içeriği spektrofotometrik yöntem ile gram polimer başına 3.27 ve 4.46 μmol olarak bulundu. L-Histidin bağlı afinite mikroküreleriin yapılarındaki ligandın polimerik yapıdan ayrılmasının söz konusu olmadığı belirlendi.

En yüksek etkinliğin sağlandığı 100 ppm başlangıç metal iyonu içeren ortamdan p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite sorbentine bağlanan Cu(II) metal iyonu miktarı gram mikroküre başına 1.250 μmol olarak bulundu.

4.1.2. Sulu Çözeltiden IgG Adsorpsiyonu Çalışmaları

4.1.2.1. pH'ın Etkisi

Protein yüzeyindeki amino asitlerin yük dağılımı, matrikse bağlı ligand ile protein arasındaki iyon değişimi etkileşimlerinde önemli bir faktördür. Sulu

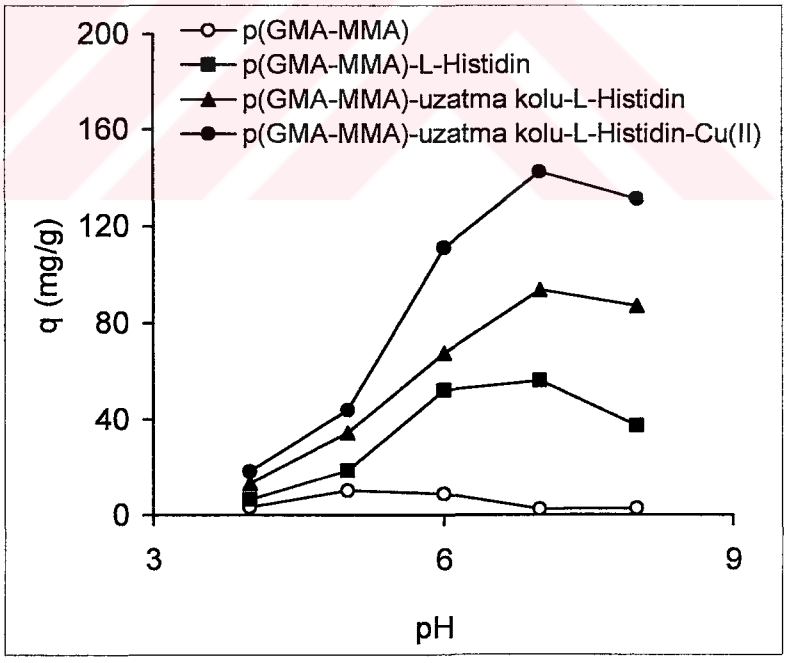
ortamda, polar yada yüklü amino asit kalıntıları yüzeyde olma eğilimindedir. Bununla birlikte, amino asit kalıntıları proteinin birincil yapısından dolayı birbirinden bağımsız olarak dağılamaz çünkü dağılım, bir proteinden diğerine farklılık gösterir [12].

Afinite mirokürelerin adsorpsiyon kapasitesine pH'nın etkisini incelemek için adsorpsiyon çözelti pH'sı 4.0-8.0 aralığında değiştirildi ve sonuçlar Şekil 4.6'da verildi. Kontrol amacı ile kullanılan p(GMA-MMA) mikroküreleere non-spesifik adsorpsiyonun ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi (9.4 mg/g). Düşük pH değerlerinde önemli derecede düşük adsorpsiyon kapasitesi gözlendi. p(GMA-MMA)-L-Histidin, p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II) afinite mikroküreleri ile maksimum IgG adsorpsiyonu pH 7.0'de sırasıyla 56.0, 93.9 ve 142.2 mg/g olarak bulundu. Destek malzemesine altı-karbonlu-uzatma kolunun takılması, aminlenen mikroküre ile kıyaslandığında adsorpsiyon kapasitesini 1.7 kat arttırmıştır.

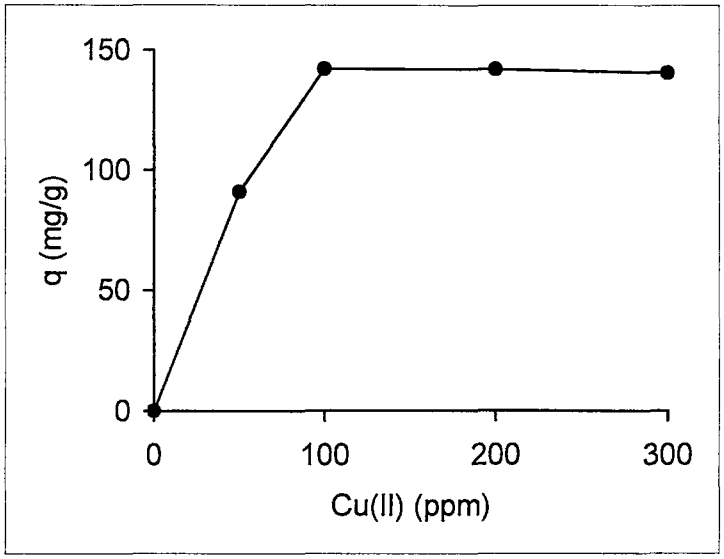
L-Histidin molekülünün karboksil gruplarının pKa değeri 1.8'dir ve pH 7.0'de L-Histidin moleküllerinin %90'dan fazlası imidazol yapıdayken sadece %10'u imidazoliyum şeklinde pozitif yüklü kalmaktadır. Bu sebeple L-Histidin molekülü pH 7.0'de negatif yüklüdür. IgG'nin izoelektrik noktası 6.95'tir ve pH 7.0'de net elektrik yükü sıfırdır. IgG ve L-Histidin molekülü arasındaki spesifik etkileşimler (elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağları) pH 7.0'de afinite mikroküreleerin iyonize olan grupları (karboksil, imidazol, imidazolium, karbonil ve hidroksil) ve IgG molekülünün yan zincir aminoasitleri arasında gerçekleşmektedir.

Cu(II) metal iyonu bağlı afinite mikroküre ile IgG uzaklaştırılmasında 50-300 ppm başlangıç konsantrasyonunda Cu(II) metal iyonu içeren deney ortamının adsorpsiyon kapasitesine etkisi araştırıldı (Şekil 4.7). 100 ppm başlangıç metal iyonu konsantrasyonunda maksimum uzaklaştırma sağlandığından, çalışmamızın bundan sonraki bölümlerinde bu konsantrasyonda çalışıldı.

Hedef proteine karşı daha seçici bir yapı elde etmek amacıyla L-histidin ligandının imidazol halkasından Cu^{+2} iyonu ile metal şelat oluşturulması ile adsorpsiyon kapasitelerinde, p(GMA-MMA)-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikrokürelere göre sırası ile 2.54 ve 1.5 kat artış sağlanmıştır.



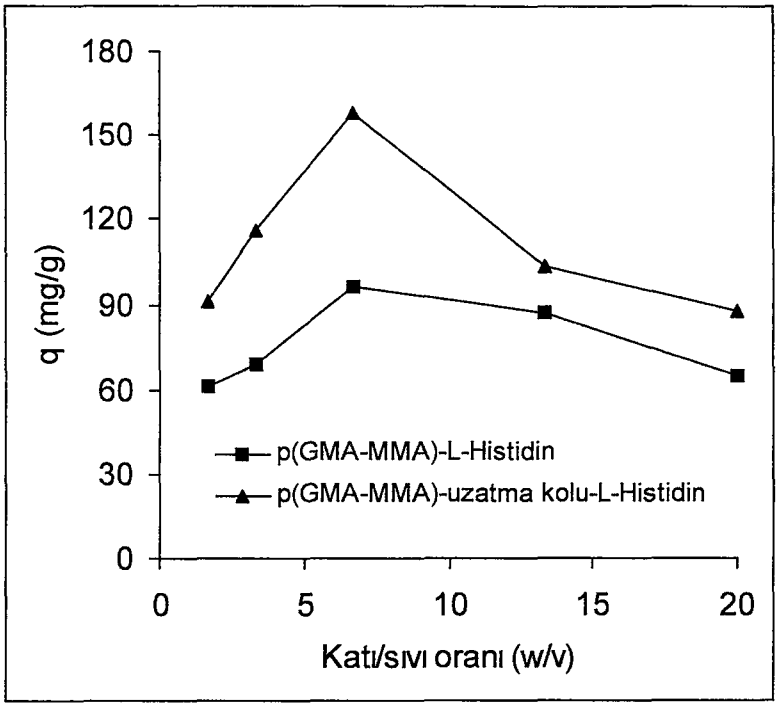
Şekil 4.6. Afinite mikrokürelere IgG adsorpsiyonuna pH etkisi



Şekil 4.7. Başlangıç Cu(II) kosantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi

4.1.2.2. Sorbent Dozunun Etkisi

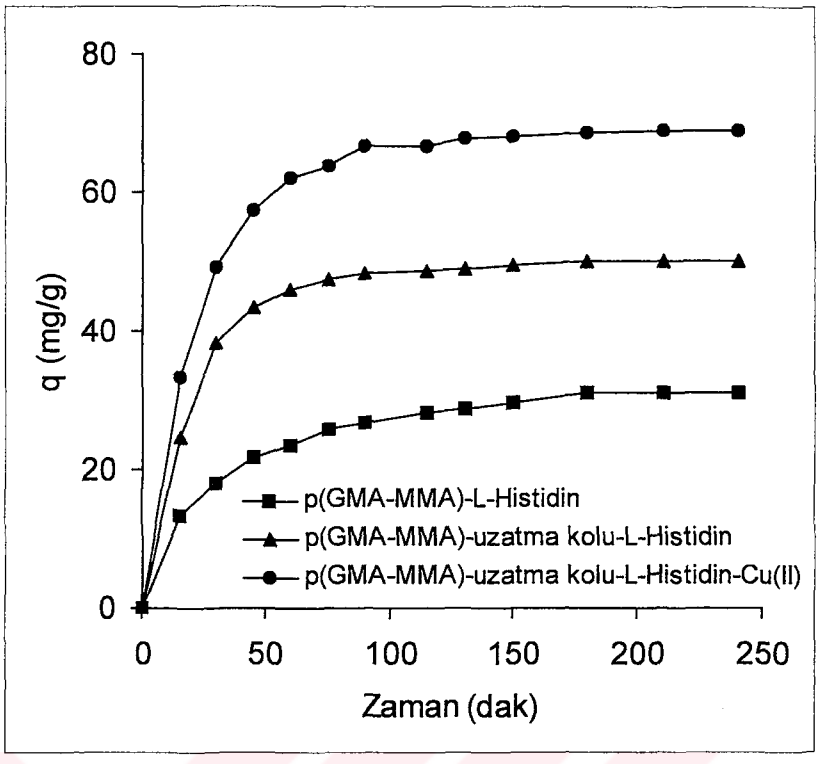
2.0 mg/ml IgG başlangıç konsantrasyonunda, 7.5 ml toplam deney hacminde 12.5-150 mg katı (afinite mikroküre) bileşiminde katı/sıvı oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi araştırıldı. Adsorbent dozunun 50 mg'a kadar arttırılması ile IgG adsorpsiyon kapasitesinde maksimum bir artış gözlenirken katı/sıvı oranının artması ile azaldığı belirlendi (Şekil 4.8). Bu nedenle çalışmamızda 50 mg sorbent dozu kullanıldı.



Şekil 4.8. Afinite mikroküreler ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında sorbent dozunun etkisi

4.1.2.3. Adsorpsiyon Hızı

Uzatma kolu takılı p(GMA-MMA) mikroküre lerine L-Histidin ligandının kovalent olarak bağlanması ve Cu(II) metal iyonu ile şelat oluşturulmasının sulu ortamdan IgG adsorpsiyonu önemli ölçüde arttığı belirlendi (Şekil 4.9). Şekilden de görüldüğü gibi, adsorpsiyon işleminin başlangıcında hızlı bir adsorpsiyon gözlendi ve 130 dakikanın sonunda dengeye ulaştığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı belirlendi. Diğer bir taraftan elde edilen deneysel verilerden adsorpsiyon ortamındaki IgG konsantrasyonundaki artışın adsorpsiyon hızında da artışa neden olduğu belirlendi.



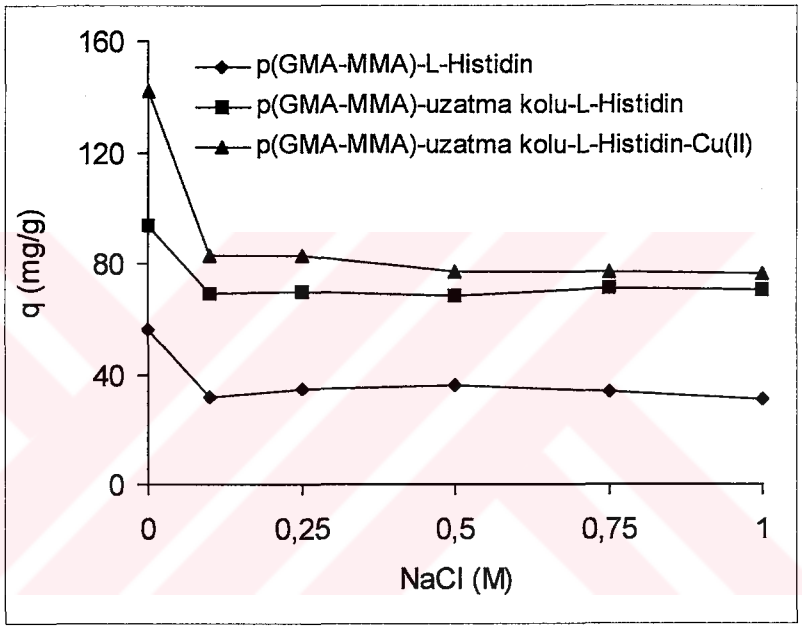
Şekil 4.9. Afinite mikroküreleri̇n IgG adsorpsiyonunda adsorpsiyon süresinin etkisi

4.1.2.4. İyonik Şiddetin Etkisi

Aminlenen, uzatma kolu takılı ve uzatma kolu-Cu(II) immobilize edilmiş L-Histidin bağlı p(GMA-MMA) mikroküreleri̇n, adsorpsiyon ortamında 0.1 M NaCl konsantrasyonu olduğunda adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir azalma gözlendi (Şekil 4.10). Bununla birlikte, daha yüksek elektrolit konsantrasyonlarında adsorpsiyon kapasitesinde değişiklik gözlenmedi.

Debye-Hückel'e göre, adsorpsiyon ortamındaki elektrolitin konsantrasyonu arttırıldığında, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift

tabaka kalınlığı azalır. Van Oss ise, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu arttıkça, protein yüzey yükünün perdelendiğini belirtmiştir. Bu etkiler, moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimin azalmasına sebep olur [91]. Bu nedenle, adsorpsiyon kapasitesinde azalma görülmüş ancak IgG'nin konformasyonal yapısı nedeniyle daha yüksek elektrolit derişimlerinde bir değişim gözlenmemiştir.



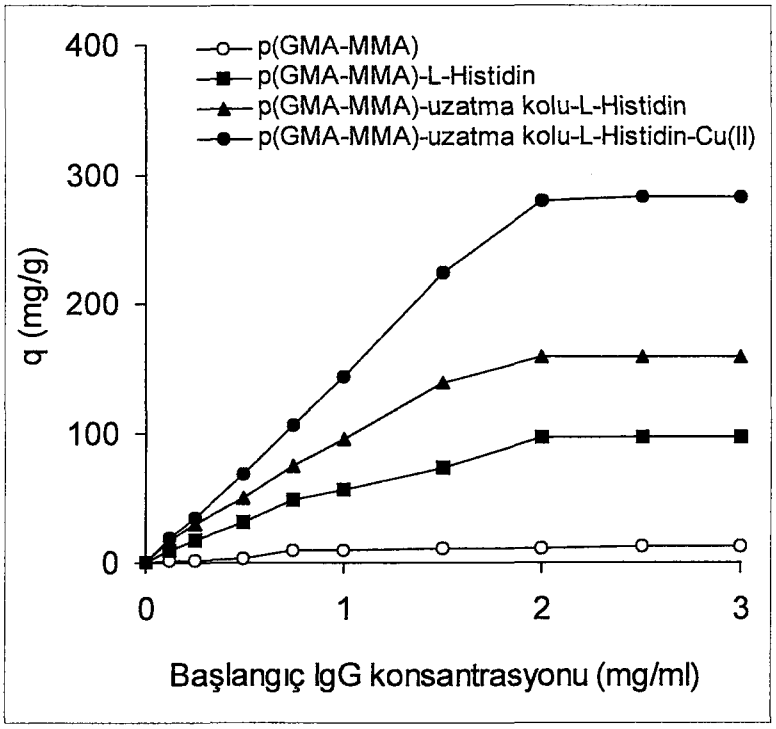
Şekil 4.10. Afinite sorbentlerle IgG adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi

4.1.2.5. IgG Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi

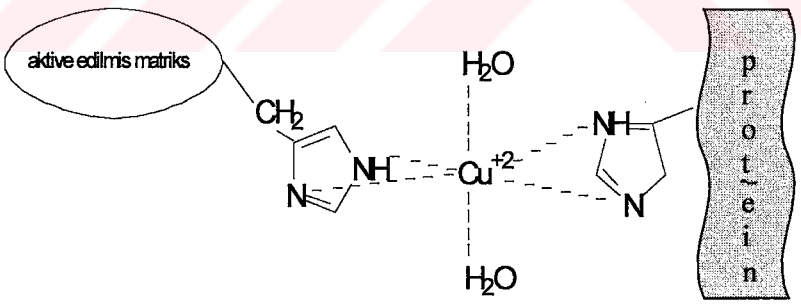
Afinite mikroküreleri̇n adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç IgG konsantrasyonunun etkisi 0.125 - 3.0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, 2 mg/ml IgG konsantrasyonuna kadar arttığı, bu

değerden sonra sabit kaldığı gözlendi. Bu, afinite mikroküreleri etkileşim gruplarının, adsorbe olmuş IgG molekülleri ile doygun hale gelmiş olmasıyla açıklanabilir. p(GMA-MMA), p(GMA-MMA)-L-Histidin, p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II) mikroküreleri ile elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırası ile, 12.1, 96.2 158.0 ve 282.7 mg/g olarak bulundu (Şekil 4.11). Bu sonuçlar literatür ile uyum halindedir.

Grafikden de görüldüğü gibi, yapıya Cu(II) metal iyonu bağlanması ile IgG adsorpsiyonundaki bu artış; IgG, metal iyonu, ligand ve mikroküre arasındaki dörtlü kompleks oluşturma mekanizması ile açıklanabilir (Şekil 4.12). IgG yüzeyinde bir histidin dizisine sahiptir, bu açığa vurulan histidinin yan imidazol halkası, immobilize Cu(II) iyonları ile IgG arasında baskın afinite bölgelerini oluşturur. Adsorbsiyon işlemi sırasında, IgG ve sorbentler arasında farklı etkileşimler olabilir; metal iyonları ve proteinler arasında koordinasyon ve/veya elektrostatik ilişki, ligand ve protein arasında biyomimetik ilişki, protein ve destek materyalinin fonksiyonel grupları arasında non-spesifik bağlanma, protein-protein etkileşimleri [13,92].



Şekil 4.11. Başlangıç IgG konsantrasyonun adsorpsiyon kapasitesine etkisi

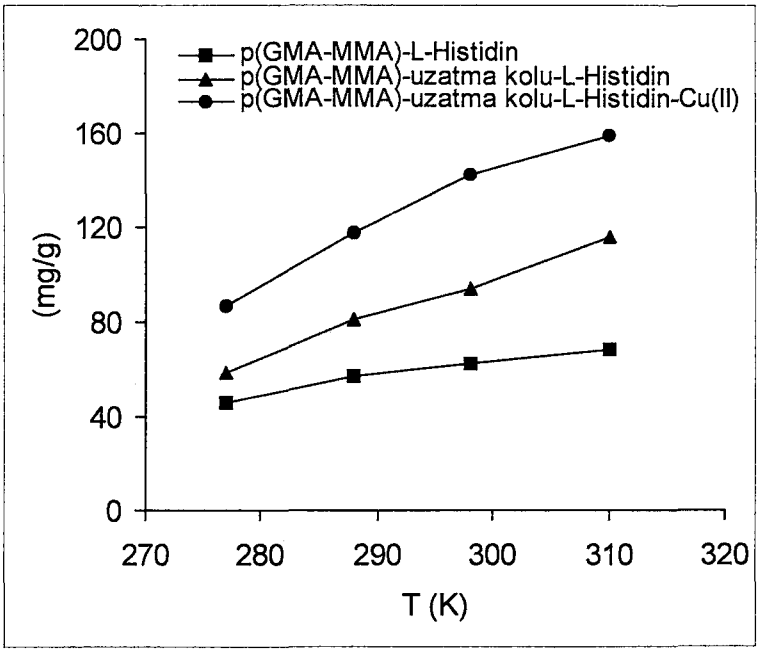


Şekil 4.12. Cu(II) metal iyonu bağlı olan p(GMA-MMA)-uzatma kolu- L-Histidin afinite mikroküreleriyle sulu ortamdan protein adsorpsiyonunun şematik gösterimi

4.1.2.6. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın artması ile protein ve ligandın fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanı artacağı için, L-Histidin ligandı takılı afinite mikroküreleriyle IgG ayrıştırılmasında adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlendi (Şekil 4.13). L-histidin ligandı bağlı mikroküreleriyle IgG adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklıkla artması, IgG molekülünün üç boyutlu konformasyonu ile ilgili olduğu düşünüldü. Sıcaklığın artması ile, proteinin hidrofobik amino asitlerinin molekül yüzeyine çıktığı ve histidin ligandı ile IgG arasındaki etkileşim alanının arttığı düşünüldü.

Sıcaklığın, 4 °C'den 37 °C'e kadar yükseltilmesi ile L-histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA)-L-Histidin, p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin ve p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II) afinite mikroküreleriyle, IgG adsorpsiyon kapasitesindeki artış sırasıyla %33, %51 ve %54 olarak bulundu.



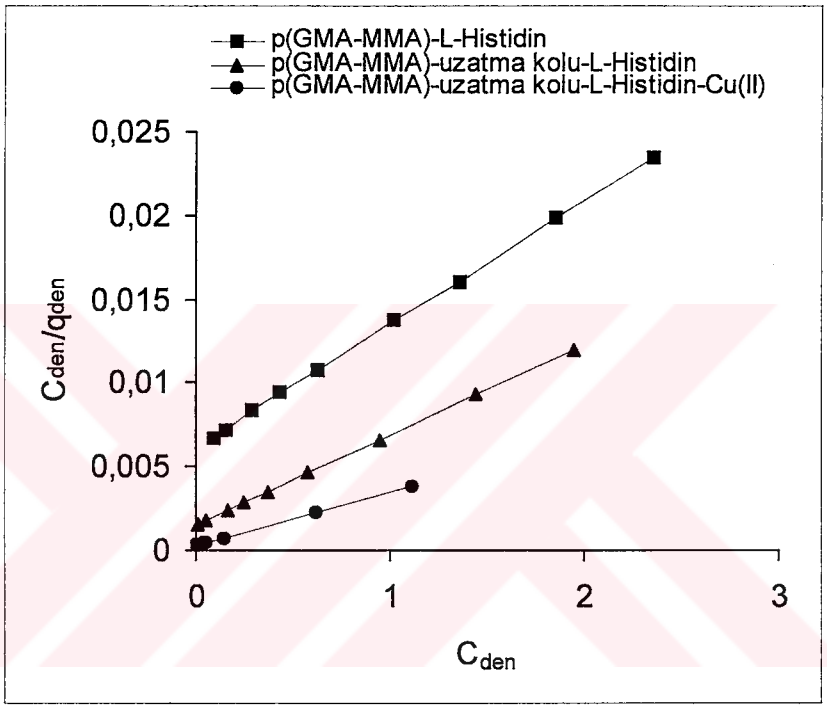
Şekil 4.13. Afinite mikroküreleri̇n IgG adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi

4.1.2.7. Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün matriksle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bununla birlikte, çözeltideki protein derişimi ile matrikse adsorplanmış protein arasındaki ilişkiyi de açıklar. Sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonu çalışmalarında, bu proteinin matriksle ilişkisini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri sırasında elde edilen verilerin, izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı.

Langmiur adosrpsiyon izoterm modelinden elde edilen doğrusal grafik (Şekil 4.14), yüksek korelasyon katsayısı (R^2) ve teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin,q_m, deneysel adsorpsiyon

kapasitelerine, $q_{m(deneysel)}$, eşit olması, afinite mikroküreler ile sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonunun Langmiur İzoterm modeli ile açıklanabileceğini gösterdi (Çizelge 4.1). Langmuir modelinde K_d değeri protein ve sorbentten oluşan kompleksin kararlılığının göstergesidir. Geniş bir K_d değeri proteinin sorbente karşı yüksek bağlanma afinitesi olduğunu göstermektedir.



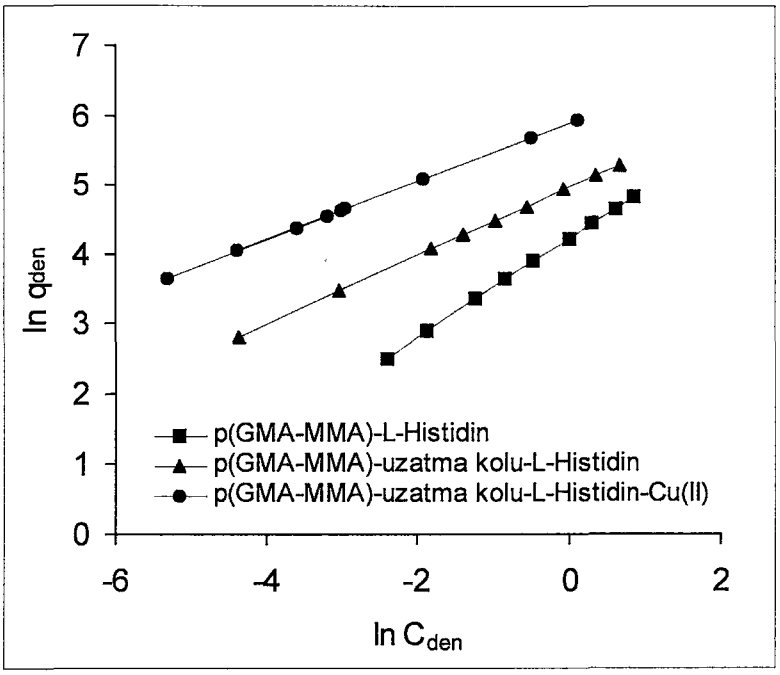
Şekil 4.14. Afinite mikroküreleriyle IgG adsorpsiyonunda belirlenen deneysel verilerin Langmiur izoterm modeline uygulanması

Sulu çözeltiden afinite mikroküreleriye IgG adsorpsiyonundan elde edilen deneysel veriler Freundlich izoterm modeline uygulandı (Şekil 4.15) ve belirlenen karakteristikler Çizelge 4.2'de verildi. K_F ve n değerlerinin yüksek olması L-Histidin ligandı takılı afinite mikroküreleriyle yüksek adsorpsiyon

kapasitesi ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırmanın kolay olduğunu göstermektedir. Afinite mikrokürelere bağlanmanın n değerinin 1'den büyük olması adsorpsiyonun kolay ve doğasının heterojen olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Afinite mikroküreler ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında elde edilen Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline ait sabitler ve korelasyon katsayıları

Afinite Sorbent	$q_{m(deney)}$ (mg/g)	$K_d x10^6$ (M)	q_m (mg/g)	R^2
p(GMA-MMA)	12.10	9.80	19.49	0.945
p(GMA-MMA)-L-Histidin	96.18	5.71	136.99	0.986
p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin	158.20	1.87	185.19	0.989
p(GMA-MMA)-uzatma-L-Histidin-Cu(II)	282.70	0.06	312.5	0.995



Şekil 4.15. Afinite mikroküreleri ile IgG adsorpsiyonunda elde edilen deneysel verilerin Feundlich izoterm modeline uygulanması

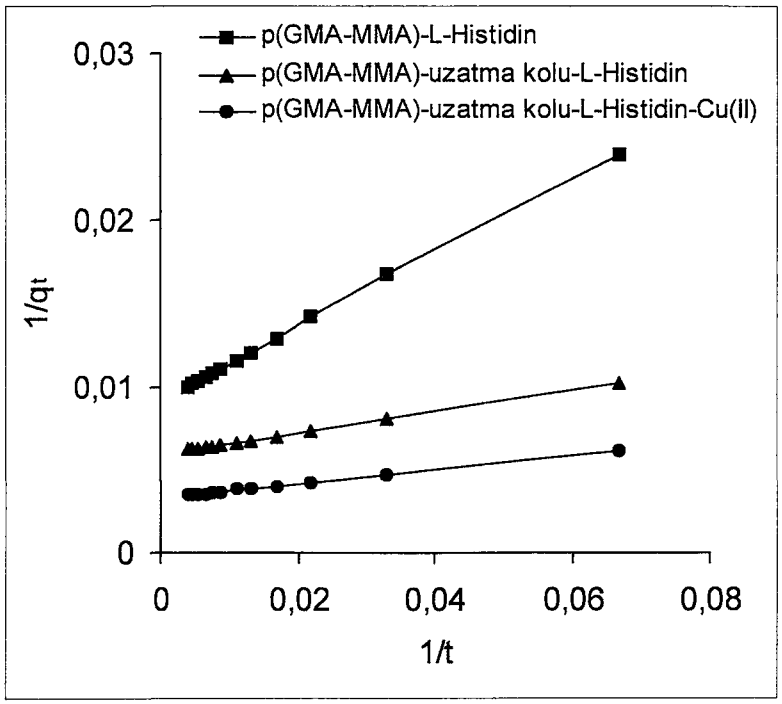
Çizelge 4.2. Afinite mikroküreler ile sulu ortamdan IgG uzaklaştırılmasında elde edilen Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline ait sabitler ve korelasyon katsayıları

Afinite Sorbent	K_F	n	R^2
P(GMA-MMA)	7.38	1.45	0.932
P(GMA-MMA)-L-Histidin	68.15	1.41	0.979
P(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin	141.46	2.06	0.985
P(GMA-MMA)-uzatma-L-Histidin-Cu(II)	361.95	2.37	0.929

4.1.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği

Afinite mikroküreleri sentezinde yüzeyde çeşitli gruplar (amin, karboksil, karbonil, hidroksil ve hidrofobik gruplar) oluşmaktadır. Bu gruplar ligand molekülleri ve IgG ile önemli derecede etkileşim bölgeleri oluşturmaktadır. Afinite mikroküreleri IgG ayrıştırılması işleminde adsorpsiyon kinetiği, deneysel verilerin birinci ve ikinci dereceden kinetik modellere uygulanması ile belirlendi. Deney sonuçları, birinci dereceden kinetik modeline uygulandı ve elde edilen sabitler Çizelge 4.3'de gösterildi.

Deney sonuçlarından elde edilen adsorpsiyon kapasitelerinin, ikinci dereceden kinetik modeline uygulanması ile Şekil 4.16'de verilen grafik elde edildi. Deneysel verilerden hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi ,$q_{den(deney)}$, ile birinci ve ikinci dereceden kinetik modelin uygulanması ile elde edilen teorik denge adsorpsiyon kapasiteleri, q_{den}, karşılaştırıldığında sonuçların ikinci derece kinetik modelinden elde edilen değerlere çok yakın olduğu gözlendi (Çizelge 4.3). Yüksek korrelasyon katsayıları ve maksimum adorpsiyon kapasitelerindeki uyumlu bu sonuçlar afinite mikroküreleri IgG adsorpsiyonunun ikinci dereceden kinetik modeli ile uyumlu olduğunu gösterdi.



Şekil 4.16. Afinite mikroküreleri sulu ortamdan IgG adsorpsiyonunun ikinci derece kinetik modeline uygulanması

Çizelge 4.3. Afinite sorbentlerin sulu ortamdan IgG adsorpsiyon kinetik sabitleri

	Birinci derece hız sabitleri			İkinci derece hız sabitleri		
Afinite Matriks	$k_1 \times 10^2$ (dak^{-1})	q_{den} (mg/g)	R^2	$k_2 \times 10^2$ ($gmg^{-1}dak^{-1}$)	q_{den} (mg/g)	R^2
p(GMA-MMA)-L-Histidin	3.31	131.89	0.947	4.03	110.39	0.997
p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin	3.36	123.03	0.948	9.22	166.67	0.997
p(GMA-MMA)-uzatma-L-Histidin-Cu(II)	4.28	411.15	0.920	7.44	303.03	0.998

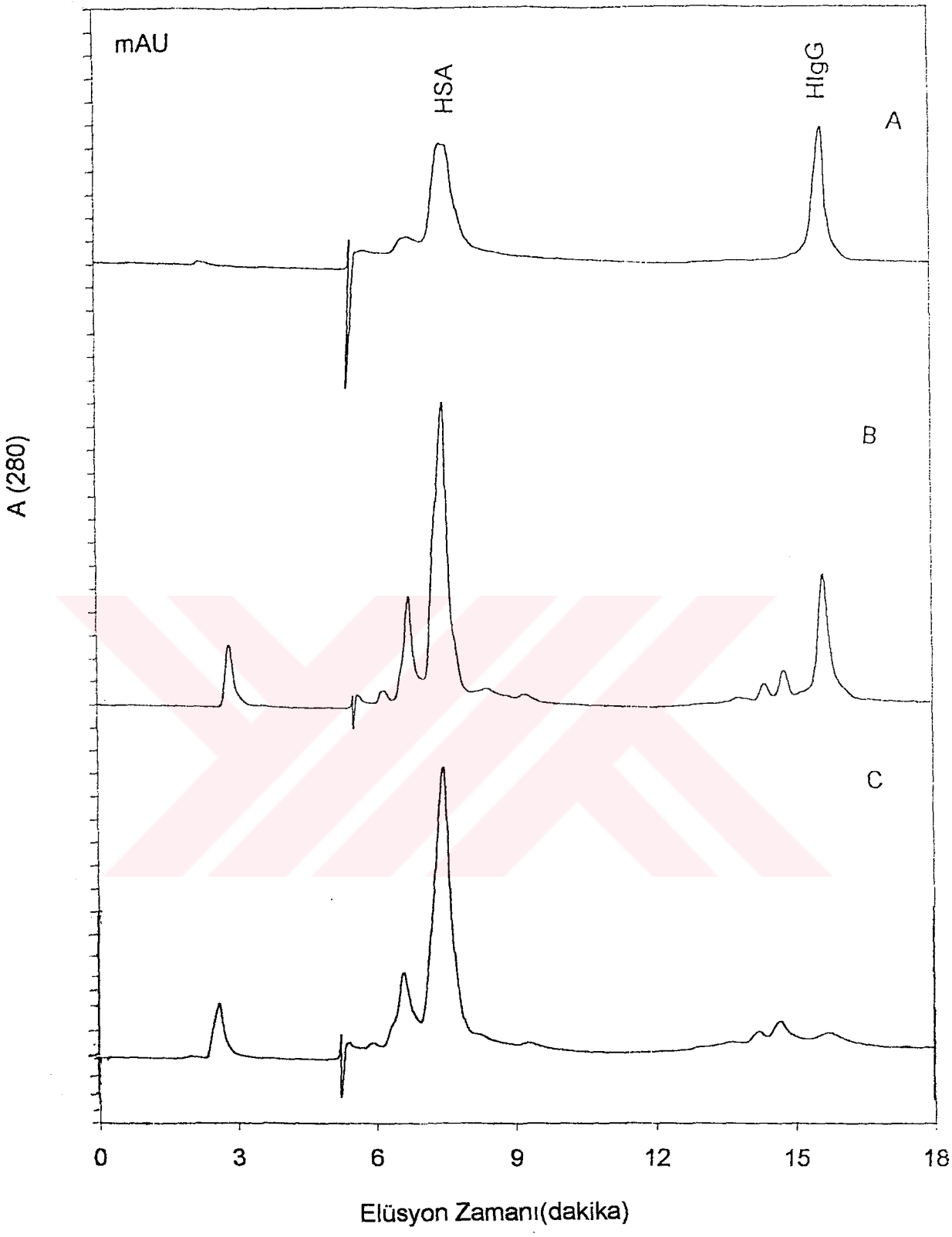
4.1.2.9. Desorpsiyon

Afinite mikroküreler üzerine adsorplanan IgG molekülleri glisin-HCl (pH 2.60) çözeltisi kullanılarak %63 oranında desorbe edildi. Desorpsiyon işleminde, yapısında karboksil ve amin grupları bulunan, hem hidrofobik hem de hidrofilik karaktere sahip olan glisinin IgG molekülleri ile histidin ligandı arasındaki etkileşimleri zayıflatarak protein moleküllerinin afinite mikrokürelerden ayrılmasını sağladığı düşünüldü. Afinite mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği, aynı sorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları tekrarlandığında, her bir afinite mikrokürenin IgG adsorpsiyon kapasitesini

koruduğu gözlendi. Afinite mikroküreleri rejenerasyonu 1 M NaOH çözeltisi ile gerçekleştirildi.

4.1.2.10. İnsan Serumundan IgG Saflaştırılması

İnsan serumundan IgG saflaştırılması çalışmaları kesikli sistemde gerçekleştirildi. Bu işlem için, daha yüksek adsorpsiyon kapasitesinin elde edildiği uzatma kolu takılı L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) mikroküreleri model olarak seçildi. 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile 1:5 oranında seyreltilen 7.5 ml serum örneği, 50 mg p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleri ile 25 °C'de 4 saat boyunca inkübe edildi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrasında alınan örnekler, HPLC'ye yüklendi. Elde edilen kromatogramlar, Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Bölüm 3.2.5'de verilen gradyent program kullanılarak elde edilen kromatogramdan , IgG alıkonma zamanı 15.1 dakika olarak bulundu. Bu yöntem ile serum ve adsorpsiyon sonucunda serum örneğinde kalan bakiye IgG miktarı belirlendi. p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreler ile serum örneğindeki IgG'nin % 84.2 oranında uzaklaştırılmasının mümükün olduğu ve g mikroküre başına 290.4 mg IgG'nin saflaştırma kapasitesine sahip olduğu görüldü. İnsan serumundan tek basamakta IgG saflaştırılmasında p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleri yüksek bağlanma kapasitesi ve IgG için yüksek seçicilik gösterdiği bulundu.



Şekil 4.17. A) Standart HSA ve IgG karışımı B) Adsorpsiyon öncesi C)Adsorpsiyon sonrasında p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin mikroküreleri ile insan serumundan elde edilen HPLC kromatogramları

4.2. Değerlendirme

Biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişme, protein saflaştırılmasında verimliliği yüksek yeni yöntemlerin araştırılmasını ve geliştirilmesini sağlamıştır. Afinite kromatografisi seçici bir saflaştırma yöntemidir. Durgun faza bağlanan ligandlarınçeşitliliğindeki artış, afinite kromatografisinde önemli üstünlükler sağlamıştır. Bu konudaki çalışmaların çoğu, yeni afinite destekleri tasarlamak üzerine odaklanmıştır. Geliştirilen afinite desteklerinin bazı özelliklere sahip olması istenmektedir. Küre yapıdaki destek materyalleri, örnekten proteinin direkt olarak ayrıştırılması ve saflaştırılmasını sağlamasının yanı sıra, kolon uygulamalarında en az difüzyon sınırlaması ile iyi bir akış özelliği sağlar.

Kullanılan afinite desteklerinin çözünmezliği önemli bir parametredir. Adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon aşamalarında, kullanılan çeşitli kimyasal ajanlara karşı kararlılık ve dayanıklılık, desteklerin endüstriyel uygulama alanlarını genişleten önemli faktörlerdir. Bu doğrultuda, çapraz bağlı polimerik destek materyallerinin kullanımı dikkat çekmektedir[1]. Biyolojik olarak uyumlu olan akrilik ve metakrilik polimerler kontakt lens, ilaç salınım sistemleri ve yapay damar olarak çeşitli tıbbi uygulamalarda geniş ölçekli olarak kullanılmaktadır.

İmmunoglobulinler önemli tedavi ajanlarıdır ve dünyada yılda 27 ton kadarı tedavi amaçlı kullanılmaktadır. İnsan İmmunoglobulin G'lerin uygulamalarının en belirgin özellikleri, hastaların enfeksiyonlara karşı olan dirençlerinin artmasıdır. Ayrıca, IgG'ler sitokinler ve kan pıhtılaştırıcı faktörler gibi farmasotik öneme sahip proteinlerin saflaştırılmasında biyoafinite ligandı

olarak kullanılmaktadır. IgG'lerin kromatografik yöntemle saflaştırılmasında kullanılan en etkin yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntemde, ayrımı etkileyen faktörler destek materyalinin yapısı ve ligandın seçiciliğidir.

Protein A afinite kromatografisi, IgG saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kolay bozunması, immobilize edildikleri matriks yapısından sızması ve yüksek maliyeti nedeniyle yerini pseudo-spesifik ligandlara bırakmıştır. Afinite kromatografisinde, biyospesifik ligandların yerine, amino asitler ve şelatlanmış metal iyonları gibi pseudospesifik ligandların kullanımı önem kazanmıştır [1,8]. Histidin, IgG uzaklaştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan etkili bir pseudo-spesifik liganddır. Destek materyaline kolay bağlanan bu amino asit, ekonomik olmasının yanı sıra, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir.

Çalışmamızda, p(GMA-MMA) mikroküreleri, glisidil metakrilat ve metilmetakrilat monomerlerinin süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlandı. Bu materyal, yapısındaki epoksi grubu sayesinde enzim ve proteinlerin immobilizasyonu ve saflaştırılması için elverişlidir. Ayrıca, p(GMA-MMA) mikroküre lerinin yapısındaki epoksi grupları, kolaylıkla hidrolize edilerek hidrofilik karakterde olan diol gruplarına dönüştürülebilir. Bu sayede proteinlerin non-spesifik adsorpsiyonundan kaçınılabilir.

Sentezlenen p(GMA-MMA) mikroküreleri, IgG adsorpsiyon kapasitesini arttırmak amacıyla aktive edildi. İlk olarak, protein molekülleri ve ligand arasındaki spesifik etkileşimi arttırmak için matrikse, hekzametilendiamin bağlandı. Bu sayede, protein ile ligand arasındaki spesifik etkileşim arttırılırken matriks ile protein molekülleri arasında

meydana gelebilecek non-spesifik etkileşimler önlenmiş oldu. Destek materyaline uzatma kolunun takılması ile protein adsorpsiyon kapasitesine etkisi, aminlenen matriks ile mukayeselendirilerek yapıldı. Aminlenen ve uzatma kolu bağlanan mikroküreler glutarikdialdehit ile aktive edildi ve L-Histidin ligandı yüzeye kovalent olarak bağlandı. Glutarikdialdehit, uzatma kolu ve ligand arasında bir köprü oluşturmasının yanı sıra 5 karbonlu yapısı sayesinde uzatma kolu gibi görev yapmaktadır. Çalışmalar sonucunda, IgG için adsorpsiyon kapasitesinin hekzametilendiamin uzatma kolunun takılı olduğu matriks için daha yüksek olduğu bulundu.

Proteinlerin farklı metal iyonlarına ilgi gösterdikleri bilinmektedir. Metal iyonları, proteinlerin üç boyutlu yapılarında yüzeyde açığa çıkan bazı amino asitlerin yan grupları ile (örneğin, histidinin imidazol) koordinasyon kompleksi oluştururlar. Bu doğrultuda, IgG molekülünün yeni geliştirilen küre yapıdaki marikse ilgisinin arttırılması amacıyla, Cu(II) iyonu koordinasyon kompleksi ile histidin ligandına bağlandı.

Adsorpsiyon çalışmalarından önce p(GMA-MMA) mikroküreleriniin karakterizasyon çalışmaları yapıldı. SEM mikrografı çekilen mikroküreleriin, yüzeyinin pürüzlü olduğunu ve polimerizasyon ortamına konulan toluen sayesinde, gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. İkinci aşamada, kromatografik alanda kullanılmak üzere hazırlanan p(GMA-MMA) afinite mikroküreler ile sulu çözeltiden IgG adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. IgG adsorpsiyonunda, herbir mikroküre için optimum pH 7.0 olarak tespit edildi. Bu pH değerinde, non- spesifik adsorpsiyonunun ihmal edilebilir düzeyde olduğu (9.4 mg/g) görüldü. Bu pH değerinde, L- histidin moleküllerinin

karboksil gruplarının ve L- histidin ile etkileşecek ligand bağlı destek malzemesinin uygun konformasyonal yapıda olduğu düşünüldü [12]. p(GMA-MMA)-uzatma kolu-L-Histidin-Cu(II) afinite mikroküreleriniin daha fazla adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Divalent metal iyonu olan (sınır metal iyonu) Cu(II) ile yumuşak Lewis bazları olan azot ve kükürt (histidin amino asit yan gruplarında bulunan) etkileşirler. Cu(II) iyonu özellikle IgG'nin dışa vuran yapısında bulunan histidin amino asitinin imidazol grubuna karşı yüksek afinite gösterir.

Afinite mikroküreleriе sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonunda, protein için denge adsorpsiyonuna 130 dakikada ulaşıldığı ve 240 dakika boyunca dengede kaldığı gözlendi. Sulu ortamdan protein uzaklaştırılması işleminde sıcaklığın artması ile afinite mikroküreleriin adsorpsiyon kapasitesinin de arttığı belirlendi. Adosrpsiyon ortamındaki elektrolit konsantrasyonunun artması ile elektrostatik etkileşimlerin azalması sonucunda, afinite mikroküreleriin adsorpsiyon kapasiteleri de azaldı. Afinite mikroküreleре adsorplanan IgG'nin desorpsiyonu glisin-HCl (pH 2.6) ile gerçekleştirildi. Adsorbe olan IgG'lerin % 63'ü desorbe edildi. Afinite mikroküreleriе serum proteini ayrıştırma işleminin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli ile uyumlu olduğu ve adsorpsiyon hızının ikinci dereceden kinetik eşitlik ile ifade edilebileceği bulundu.

Afinite mikroküreler ile, sulu ortamda yapılan IgG adsorpsiyon çalışmalarının ışığında insan serumundan IgG uzaklaştırılması ve saflaştırılması, uzatma kolu takılı L-Histidin ligandı bağlı p(GMA-MMA) afinite mikroküreler model alınarak kesikli sistemde gerçekleştirildi. p(GMA-MMA) -

uzatma kolu-L-Histidin afinite mikroküreleriyle insan serumundan IgG'nin %84.2 'sinin saflaştırıldığı belirlendi.

Literatürde de insan serumundan IgG saflaştırılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, Arıca ve arkadaşları p(HEMA-MAH) membranlarını kullanarak kesikli sistemde sulu ortamdaki IgG çözeltisinden 13.06 mg/ml adsorpsiyon kapasitesine ve sürekli sistemde yaptıkları çalışmada %93 saflıkta IgG elde etmişlerdir[12]. Arıca ve arkadaşları bir başka çalışmada p(HEMA-MAPA) membranları kullanarak sulu çözeltiden IgG adsorpsiyonu çalışmışlar ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 2.37 mg/g olduğunu rapor etmişlerdir [93]. Denizli ve arkadaşları, protein A tutuklanan p(HEMA) mikroküreleri ile insan serumundan IgG adsorpsiyonu üzerine çalışmış, maksimum adsorpsiyon kapasitesini 24.0 mg/g olduğunu rapor etmişlerdir[95]. Denizli ve Pişkin, DNA tutuklanan p(HEMA) mikroküreler ile 7.5 mg/g IgG adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır [94]. Denizli ve arkadaşları, Cu(II) şelatlanmış p(MMA-MAH) küreleri ile 12.2 mg/g adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır.

Literatürde yer alan sonuçlar ile çalışmamızda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, oldukça yüksek bir adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldığı görülmektedir. Aminlenen veya uzatma kolu takılı ve Cu(II) immobilize edilmiş L-Histidin bağlı p(GMA-MMA) afinite mikroküreleri ile, sulu ortamdan ve insan serumundan gerçekleştirilen uzaklaştırma ve saflaştırma çalışmalarında oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak, p(GMA-MMA) mikrokürelerine takılan uzatma kolu, ligand ile

protein moleküllerinin etkileşim alanını arttırmak suretiyle, adsorpsiyon kapasitesinin oldukça arttırmıştır.

Sonuç olarak, immunolojik hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan IgG'nin, küre yapıdaki p(GMA-MMA) destek materyali modifiye edilerek insan serumundan tek basamakta ve yüksek kapasitede ayrıştırılması sağlandı.

KAYNAKLAR

1. X.Zeng, E.Ruckustein, Biotechnology Progress, **15**,1003-1019,(1999)
2. M.Y.Arıca, A.Denizli, Separation Science and Technology,**35**,2243-2257(2000)
3. M.Y.Arıca, H.N.Testereci and A. Denizli, Journal of Chromatography A, **799**,83-91,(1998)
4. M.Y.Arıca, V.N.Hasırcı, Biomaterials, **8**, 489-495,(1987)
5. A.Denizli, E.Pişkin, J.Biochem. Biophys. Methods,**49**,391-416,(2001)
6. P. Cuatreccasas, M.Wilchck, CB. Anfinsen, Pro Natl Acad Sci USA, **61**,636-43,(1968)
7. Y.D.Clanis,N.E.Labrou,V. Kotsina, C. Mazitsos, S.Melissis,G.Gogolas, Journal of Chromatography A, **891**, 33-44,(2001)
8. A. Denizli, H. Yavuz, M.Arıca, Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, **174**,(2000)
9. H.Y.Gan, Z.H.Shang, J.D. Wang, Journal of Chromatography A, **867**,161-168, (2000)
10. B. Garipcan, N.Bereli, S.Patır, Y.Arıca, A.denizli, Macromolecular Biosience, **1**, 332-340,(2001)
11. Fassina G., Verdoliva A., Palombo G., Ruva M., Cassani G., Journal of Molecular Recognition, **11**, 128-133, (1998)
12. M.Y.Arıca, E. Yalçın, G.Bayramoğlu, Journal of Chromatography B, **807**,315-325, (2004)

13. G.M.S. Finette, Q.M. Mao, M.T.W. Hearn, Journal of Chromatography A, **763**, 71-90,(1997)

14. J.W. Wong, R.L.Albright, N-H.L. Wang, Separation and Purification Methods, **20**, 49-106, (1991)

15. D.A.Skoog, F.J.Holler, T.A. Nieman, Prıncıples of Instrumental Analysis , Fifth Edition

16. F.E. Regnier, Nature, **350**, 634, (1991)

17. D.K. Schisla, P.W.Carr, E.L. Cussler, Hollow Fiber Array Affinity Chromatography, Biotechnol. Prog, **11** , 651-658,(1995)

18. H.Y.Gan, Z.H.Shang, J.D. Wang, Journal of Chromatography A, **867**,161-168, (2000)

19. E.Klein, E. Eichholz, F. Theimer, D.H. Yeager, J.Membr.Science, **95**, 199-204, (1994)

20. O. Pitiot, C. Legallais, L. Darnige, M.A.Vijayalkshmi, J.Membr. Sci. **166**, 221-227,(2000)

21. S. Hu, D.D.Do ,J.Chr., **646**,31-35,(1993)

22. G.Bayramoğlu, B.Kaya, M.Y.Arıca, Chemical Engineering Science,**57**,2323-2334,(2002)

23. M.Saçak, Kimyasal Kinetik, Gazi Kitabevi, Ankara, 2002

24. P.Sridhar, Chem. Eng. Technol, **19**, 398-404,(1996)

25. X.Yang, C.Pin , A.G.Fane, Anal. Chem. Acta,**369**,17-20,(1998)

26. D.K.Schisla ,P.W.Carr, E.L.Cussler, Biotechnol. Prog.,**11**,651-658,(1995)

27. M.B.Tennikova,N.V.Gazdina, T.B.Tennikova, F.Svec, J.Chromatogr.A, **798**, 55-64,(1998)

28. F. Svec, J.M.J. Frechet, Science,**273**, 205-211,(1998)

29. M. Leonard, Journal of Chromatography B, **699**, 3-27, (1997)

30. E. M. Martin del Vale, M.A. Galan , Ind.Eng. Chem. Res, **41**,2296-2304,(2002)

31. R. Thomas, Trends Biotechnol.,**19**, 496.(2001)

32. S.Geoffrey, J. McCarty, Trends Biotechnol, **19**, 491.(2001)

33. M.R.Willkins, Toxicol. Lett. ,**127**,245.(2002)

34. Turkova, J.Bioaffinity Chromatography, Amsterdam, (1993)

35. W.H.Scouten, Affinity Chromatography, New York, Wiley, (1981)

36. P. Matejtschuk, Editor . Affinity Separations, Oxford, IRL Pres,(1997)

37. M.B.Deutscher, Academic Pres., **182**,(1990)

38. J.Turkova,M.A.Vijalakshmi, Theory and Practise of Biochromatogrphy, 142-224,(2002)

39. M.Y. Arıca, H.Yavuz, S.Patır, A.Denizli, Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic **11**, 127-138,(2000)

40. M.Y. Arıca, J. Appl. Polym. Sci, **77**,2000, (2000)

41. J. Rocks, L.Rintoul, F. Vohwinkel, G.George, Polymer, **45**, 6799-6811,(2004)

42. G.Bayramoğlu,S.Akgöl,A.Bulut,A.Denizli,M.Y.Arıca,Biochemical Engineering Journal **14**,117-126,(2003)

43. G. Bayramoğlu,M.Yılmaz,M.Arıca, Food Chemistry, **84**,591-599,(2004)

44. F.Svec, J.M.J.Frechet, Anal.Chem.**64**,820.(1992)

45. F. Svec, J.M.J. Frechet, J.Chromatogr. A,**702**,89,(1995)

46. R. Arshady, J. Chromatogr. **586**,181,(1991)

47. R. Arshady, J. Chromatogr. **586**,199,(1991)

48. H. A. Chase, Trends Biotechnol., **12**, 296-303, (1994)

49. H. A. Chase, N.M.Draeger, J.Chromatogr. **597**, 129-145, (1992)

50. M.Y.Arıca, S.Şenel, N.G.Alaeddinoğlu, S.Patır, A.Denizli, J.Appl. Polym.Sci, **75**,1685.(2000)

51. F.M.Baustiska,M.C.Bravo,J.M.Campeto,A.Gorcia,D.Luna,J.Mol,Catal. B-Enzymatic **6**,473,(1999)

52. M.Y.Arıca, H.A.Öktem,Z.Öktem,A.Tuncel,Polym.Int.**48**,879.(1999)

53. J. H. Kim, M. S. Sudol, El-Aasser, J.W. Vanderhoff, D. M. Kornfelt, Chem. Eng. Sci. **43**, 2025, (1998)

54. E. Pişkin, Polimer Teknolojisine Giriş, İnkılap Kitabevi, Ankara, 1987

55. C. Charcosset, J. Chem. Technol. Biotechnol., **71**, 95-110, (1998)

56. H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, J. Biochem. Biophys. Meth., **49**, 199-240, (2001)

57. T. M. Phillips, Anal. Tech. Immunchem., 50-58, (1992)

58. E. Klein, Affinity Membr., Newyork Wiley, 1991

59. R.R. Walters,Affinity Chromatogr.Anal.Chem.**57**,1099A-114A.,(1985)

60. W.Guo,Z.Shang,Y.Yu,L.Zhou,Biomed.Chromotog.,**8**,142.(1994)

61. A.A.Farooqui,H.C.Yang,L.A.Horrocks,J.Chromatogr.A,**673**,149.(1994)

62. W.C.Lee,Y.Chuong,L.Chen,Y.Chiu,Biotechnol.,Technol,**8**,444,(1994)

63. P.F.Ruhn,S.Garver,D.S.Hage, J.Chromatogr.A,**669**,9.(1994)

64. W.C.Lee,C.Y.Chaung,J.Chromatogr.A,**721**,31.(1996)

65. A.Serres,E.legendre,J.Jozefonwicz,D.muller,J.ChromatogrB,**681**,219.1996

66. U.B.Finger,J.Thommes,D.Kinzeld,M.R.Kula,J.Chromatogr.A,**664**,69(1995)

67. O.W.Reif,V.Nier,U.Bahr, R.Freitach, J.Chromatogr. A, **664**,13.(1994)

68. D.Mislovicova, M.Petro, D.Berek, J.Chromatogr. **646**, 411.(1993)

69. A.Tuncel,A.Denizli,D.Purvis,R.Lowe,E.Pişkin,J.Chromatogr,**634**,161(1993)

70. D.Muller,Schulte,S.Maljini,M.A.Vijayalakshmi,J.Chromatogr,**539**,307(1991)

71. E.Bisse, H.Wieland, J.Chromatogr.,**575**, 223.(1992)

72. F.B.Anspach, J.Chromatogr.A,**672**,35.(1994)

73. M.A. Vijayalakshmi,Molecular Biol. **6**,347.(1996)

74. M.A. Vijayalakshmi, Trends Biotechnol, **7**,71.(1989)

75. G.M.Blackburn,H.L.H.Dodds,D.J.Shire,Biochem.Soci.Symp.**31**,(1970)

76. W.P.Jenks, Biochem.Soci.Symp.**31**,259, (1970)

77. S. Hu, D.D.Do ,J.Chr., **646**,31-35,(1993)

78. A.El-Kak, S.Manjini, M.A. Vijayalksmi,J.Chromatogr.,**604**,29-37,(1992)

79. Q.Luo,H.Zou,Q.Zhang-X.Xiao,Z.Guo,L.Kong,X.Mao,J.Chromatogr. A,,**926**,255-264, (2001)

80. T.W.Hutchens, T.T.Yip,J.Chromatogr.,**500**, 531-542,(1990)

81. S.Özkara,H.Yavuz,A.Denizli, J.Apply.Polym.Sci, **89**, 1567-1572,(2003)

82. I.Narayanan,K.Prakash,R.Verno,V.Gujnal,J.Trop.Ped.**29**,197,1983

83. R.Ghosh, J.Membr.Sci.**237**,109-117,(2004)

84. P.R.Harri, W. Paul, C.P.Sharma, John Wiley&Sons,2000

85. A.Denizli,M.Alkan,B.Garipcan,S.özkara,E.Pişkin,J.Chromatogr.B,**795**, 93-103,(2003)

86. T.Burnof, M.Rodesecich, J.Biochem. Biophys.Methd.,**49**,575,(2001)

87. M.Kim,K.Saito,S.Furusaki,T.Sato,T.Sugo,I.Ishigaki,J.Chromatogr.A,**585**,45 (1991)

88. N.Bıçak,D.C.Sherrindton,S.Sungur,N.Tan,Reactive&Functional Polym.,**54**,141-147,(2003)

89. S.Y.Suen, M.R.Etzel, Chem.Eng.Sci.,**47**,1335-1364,(1992)

90. F.Fang, I.Szleifer.Biophy. Journal,**80**,2568-2589,(2001)

91. C.J.Van Oss,J.Molecular Recognition, **16**,177-190,(2003)

92. R.Blanco,A.Arai,N.Yarmush,D.M.&B.L.Karger, J.Chromatogr.B,**482**,1-12,(1989)

93. M.Y.Arıca,G.A.Öktem, A.Denizli, Colloids and Surfaces,**21**,273-283,(2001)

94. A.Denizli, E.Pişkin, J.Chromatogr. B,**666**,215-222,(1995)

95. A.Denizli, Y.R.Abbas, E.Pişkin, J.Chromatogr. B, **668**,13-19,(1995)

96. S.Sidney, Quantitative Organic Analysis ,3.Baskı, 1967.

97. Jr. WJ. Weber, In Physicochemical Processes For Water Quality Control , New York, Wiley, 206-211,(1972)

98. F.D.Snell and C.T.Snell, Colorimetric Methods of Analysis, 3. bölüm, D.Van Nostrand Company, Canada, Vol.2,(1959)