

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLAZMİT DNA SAFLAŞTIRILMASI İŞLEMİNDE KULLANILMAK
ÜZERE MAGNETİK AFİNİTE MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI

MERAL ÜRÜN

KASIM 2006

ÖZET

PLAZMİT DNA SAFLAŞTIRILMASI İŞLEMİNDE KULLANILMAK ÜZERE MAGNETİK AFİNİTE MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI

ÜRÜN, Meral

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M.Yakup ARICA

Kasım 2006, 53 SAYFA

Bu çalışmada, metilmetakrilat (MMA), metakrilikasit (MAA) ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) monomerleri kullanılarak süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile m-p(MMA-ko-MAA) mikroküreleri sentezlendi. Sentezlenen mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları (spesifik yüzey alanı, partikül boy ve boyut dağılımı, yoğunluğu, şişme oranı, ESR spektrumu, SEM mikrografı, FTIR spektrumu, karboksil grubu tayini) yapıldı ve DNA adsorpsiyonu çalışmalarında kullanıldı. Afinite mikrokürelerin sulu çözeltiden ve bakteriyel hücre lizatından DNA uzaklaştırılması ve saflaştırılmasında performansı incelendi. Tüm afinite mikroküreler için maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 4'de gözlemlendi ve adsorpsiyon miktarı 2.97 mg/gr olarak bulundu.

Bakteriyel hücre lizatından plazmid DNA izolasyonu için miniprep DNA izolasyon yöntemi kullanıldı ve elde edilen plazmid DNA'ların A_{260}/A_{280} oranı 1.7-2.0 arasında bulundu.

Anahtar Kelimeler : Magnetik küre, Plazmid DNA, Adsorpsiyon

ABSTRACT

THE PREPARATION OF THE MAGNETIC AFFINITY MICROBEADS FOR THE PURIFICATION OF PLASMID DNA

ÜRÜN, Meral

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor : Prof. Dr. M.Yakup ARICA

November 2006, 53 pages

In this study, the microbeads of m-p(MMA-ko-MAA) was synthesized by using methylmethacrylate (MMA), methacrylic acid (MAA) and ethyleneglycoldimethacrylate (EGDMA) monomers by the suspension polymerisation method. In order to use in the DNA adsorption study, characterization of the microbeads synthesized (the specific surface area, height, distribution of dimension, density, proportion to swallow, ESR spectrum, SEM microscopy, FTIR spectrum, carboxyl group indication) was carried out. The performans of the microbeads during the DNA removal and purification from the aqueous solution and bacterial cell lysate was studied. The maximum adsorption capacity for all microbeads has been observed at pH 4 and the adsorption amount has been found as 2.97 mg/gr.

Miniprep DNA isolation method was used for plasmid DNA isolation from bacterial cell lysate product and the adsorption proportions of plasmid DNA isolated has been found in the range of 1.7-2.0 .

Keywords : Magnetic bead, Plasmid DNA, Adsorption

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında her türlü yardımını esirgemeyen ve değerli bilgileri ile bana yol gösteren danışmanım, Sayın Prof. Dr. M.Yakup Arıca'ya teşekkür ederim.

Tezimin yapım aşamasında deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem'e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta yararlanmama olanak sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gülay Bayramoğlu'na teşekkür ederim.

Meral Ürün

Kırıkkale, 2006

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | ix |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Kromatografi..... | 4 |
| 1.1.1. Sabit Fazı Oluşturan Destek Materyalleri..... | 4 |
| 1.1.1.1. Süspansiyon Poimerizasyonu..... | 5 |
| 1.1.1.2. Polimerik Materyalin Sahip Olması Gereken Özellikler..... | 6 |
| 1.1.2. Afinite Kromatografisi..... | 8 |
| 1.1.2.1. Magnetik Özellikli Afinite Destek Materyali..... | 9 |
| 1.1.3. Adsorpsiyon..... | 11 |
| 1.2. DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması..... | 11 |
| 1.2.1. Escherichia Coli..... | 13 |
| 1.2.2. Plazmid DNA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri..... | 14 |
| 1.2.3. Aşılamada ve Gen Terapisinde Plazmid DNA..... | 16 |
| 1.3. Çalışmanın Amacı..... | 18 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 19 |
| 2.1. Materyaller..... | 19 |
| 2.1.1. Kimyasal Malzemeler..... | 19 |
| 2.2. Yöntem..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Sentezi..... | 20 |
| 2.2.2. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Karakterizasyonu..... | 21 |
| 2.2.2.1. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Boy ve Boyut Dağılımı..... | 21 |
| 2.2.2.2. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yüzey Alanı..... | 21 |
| 2.2.2.3. Karboksil Grubu Tayini..... | 21 |
| 2.2.2.4. Mikrokürelerin Şişme Oranı..... | 22 |
| 2.2.2.5. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yoğunluğu..... | 22 |
| 2.2.2.6. ESR Spektrumu..... | 22 |
| 2.2.2.7. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yüzey Morfolojileri..... | 23 |
| 2.2.2.8. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin FTIR Spektrumu..... | 23 |
| 2.2.3. m-p(MMA-ko-MAA) Mikroküreler ile Sulu Ortamdan DNA Adsorpsiyonu Çalışmaları..... | 23 |
| 2.2.4. Escherichia Coli'nin Transformasyonu..... | 25 |
| 2.2.4.1. Miniprep DNA İzolasyonu..... | 25 |
| 2.2.4.1.1. İzole Edilen DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analiz..... | 27 |
| 2.2.4.2. Agoroz Jel Elektrofrezisi..... | 28 |
| 2.2.4.3. Fotoğrafın Çekilmesi..... | 28 |
| 3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA..... | 29 |
| 3.1. Magnetik Afinite Kürelerin Karakterizasyonu..... | 29 |
| 3.2. Sulu Çözeltiden DNA Adsorpsiyonu Çalışması..... | 36 |
| 3.2.1. pH Etkisi..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2. İyonik Şiddetin Etkisi..... | 37 |
| 3.2.3. Denge Adasorpsiyon Zamanı..... | 39 |
| 3.2.4. Sıcaklığın Etkisi..... | 40 |
| 3.2.5. Başlangıç DNA Konsantrasyonun Etkisi..... | 41 |
| 3.3. Plazmid DNA'ların İzolasyonu ve Spektrofotometrik Kontrolü..... | 43 |
| 3.3.1. İzole Edilen Plazmid DNA'nın Saflaştırılması..... | 44 |
| 4. SONUÇ..... | 45 |
| KAYNAKLAR..... | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

| | |
|--|----|
| 1.1. Afinite kromatografisinin şematik görünümü..... | 9 |
| 1.2. E. Coli plazmidi..... | 14 |
| 1.3. DNA'nın şematik görünümü..... | 16 |
| 1.4. Plazmid DNA aşılmasında immun cevap..... | 17 |
| 3.1. Magnetik kürelerin ESR spektrumu..... | 32 |
| 3.2. m-p(MMA-ko-MAA) kürelerin SEM mikrografı..... | 33 |
| 3.3. m-p(MMA-ko-MAA) kürelerin FTIR spektrumu..... | 35 |
| 3.4. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna pH etkisi..... | 37 |
| 3.5. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi..... | 38 |
| 3.6. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonunda denge zamanı..... | 40 |
| 3.7. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi..... | 41 |
| 3.8. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonunda sulu çözeltideki başlangıç DNA konsantrasyonunun etkisi..... | 42 |
| 3.9. Plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezi..... | 44 |

1. GİRİŞ

Kromatografi kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan çok sayıda farklı yöntemi içerir. Kromatografik yöntemler arasında en önemli yeri afinite kromatografi almaktadır. Afinite kromatografi saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin, seçici olarak afinite destek materyali üzerinde bulunan liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir ayırma tekniğidir. Bu yolla, çok zor olan çok sayıda ayırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimde hedef molekülün saflaştırılarak elde edilmesi mümkün olmaktadır. Afinite kromatografi yöntemi ile çeşitli antikorlar, taşıyıcı proteinler, enzimler, DNA/RNA ve hücreler yüksek saflık derecesi ile elde edilmektedir ⁽¹⁻³⁾.

Kolon afinite kromatografi yöntemi ile çok sayıda yapılan araştırmalar özellikle laboratuvar ölçeğinde başarı ile kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak, standart kolon sistemleri ile partikül halinde yabancı madde içeren örneklerin saflaştırılma zorluğu sistemin dezavantajını oluşturmaktadır. Bu nedenle, örnek içerisinde bulunan katı ve kirlenmiş bileşikler bulunduğu ayırma veya saflaştırma işlemi için doğrudan saflaştırma yapmak için uygun olmadığı görülmektedir. Sistemin dezavantajını oluşturan bu olumsuzluğun giderilmesi için araştırmacılar magnetik afinite, iyon-değiştirme ve hidrofobik veya adsorpsiyon yöntemi ile kesikli ayırma, magnetik olarak kararlı akışkan yatakların ya da magnetik olarak şekillendirilmiş iki-faz sistemlerinin uygulamalarına yönelmiştir. Son on yıl içerisinde, kromatografik ayırma yöntemleri uygulamalarında magnetik

özelliğe sahip afinite destek materyallerinin kullanıldığı magnetik ayırma tekniği hedef biyomolekülün ayrıştırılması ve DNA/RNA saflaştırılmasında geleneksel ayırma işlemlerine kıyasla sunduğu çeşitli üstünlükler nedeni ile araştırmacıların konu üzerine ilgisi artmıştır ⁽⁴⁾. Afinite destek materyallerinin sahip oldukları güçlü magnetik özellikleri önemli bir avantaj oluşturmaktadır. İlave olarak, magnetik ayırma teknolojisi, hızlı ve kolay bir tekniktir ve hedef molekülü çok daha az mekanik gerilime maruz bırakma konusunda da bir üstünlük sunmaktadır. Bu yeni kombine yöntemle pahalı sıvı kromatografi sistemlerine, santrifüjlere, filtrelere ya da diğer ekipmanlara gerek olmaksızın, ayrıştırma işleminin doğrudan biyolojik ortamlardan süspansiyon katı materyal içeren örneklerde dahil olmak üzere gerçekleştirmek mümkün gözükmektedir. Ayrıca, otomasyona ve mikro-ölçek gerektiren işlemlere daha kolay olarak adapte edilmeleri sistemin sağladığı diğer bir avantaj olarak gözükmektedir.

DNA/RNA bütün hücreyel fonksiyonlarla ilişkili olan proteinlerin sentezlenmesi için gerekli genetik bilgileri ve kodları taşımaktadırlar. Deoksiribonükleik asitlerin polimeri DNA, ribonükleik asitlerin polimeri RNA'dır. DNA ligand olarak plazmadan anti DNA-antikorlarının uzaklaştırılmasında otoimmün hastalıkların (sistemik lupus eritematozus, SLE) tedavisinde de kullanılmaktadır ⁽⁵⁻⁸⁾. Anti-DNA antikorlarının miktarı nefrit ve serebrit gibi hastalık aktivitesi ve ilgili organın reddedilmesini düzenlemektedir. Bu gibi durumlarda, plazmadan anti-DNA antikorlarının taşınması farklı araştırmalara ve klinik gelişmelere yol açmıştır. Bu çalışmaların sonuçları yüksek hız ve kapasitede anti DNA antikorlarının

uzaklaştırılmasının, yüzeylerinde yüksek miktarda immobilize DNA taşıyan polimerik adsorbantlarla başarılabilirliğini göstermiştir ^(9, 10) .

Gen tedavisi, kanser ve AIDS gibi kazanılmış hastalıklar veya sistik fibrozis gibi genetik bozuklukları düzelterken, tedavi eden veya önleyen bir yada birkaç fonksiyonel gen hakkındaki bilgiye dayanırken, oligonükleik asit kökenli DNA aşılı sıtma enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemini güçlendirmektedir ⁽¹¹⁾. Tedavi amaçlı gen transferlerinde kullanılan yöntemlerden biri de hedef doku içerisine çıplak veya lipit kaplı plazmid DNA'nın enjekte edilmesi yöntemidir ⁽¹²⁾.

DNA izolasyonu moleküler biyoloji içinde temel bir tekniktir. Yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın analizi endüstri ve araştırma laboratuvarı içerisinde, DNA parmak izi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP), genomik ve aynı tür sekansların yapımı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi için çok önemlidir. Aynı zamanda DNA'nın saflaştırılması, kompleks farklı dizide DNA molekülleri içinde spesifik DNA sekanslarının çalışılmasında, genom yapısı ve gen ifadesinin analizi içerisinde ilk aşamayı oluşturmaktadır ve DNA'nın nicelik ve niteliği bu sonuçları doğrudan etkilemektedir.

Hücre materyalinin çok küçük bir bölümünü DNA teşkil etmekte ve genellikle tanımlanmış bir bölümünde lokalize halde bulunmaktadır. Prokaryotik hücrelerde DNA hücre stoplazmasında bir membranla ayrılmamış halde lokalize halde bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde DNA'nın hacmi sitoplazma membranından ayrılmış bir organel olan çekirdek içerisinde lokalizedir ve toplam hücresel DNA'nın %90'ını oluşturmaktadır.

Virüsler ve bakterifajları içerisinde DNA protein kılıfı ile sarılmıştır ve viriyonun total hacminin %50-30'unu teşkil eder. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde DNA hücrenin total hacminin yalnızca %1'lik kısmını teşkil etmektedir ⁽¹³⁾ .

1.1. Kromatografi

Kromatografi, bir örnek içindeki maddelerin bir hareketli ve sabit faz arasındaki dağılımlarına bağlı olarak ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan yöntemdir ⁽¹⁴⁾. Bu yöntemde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış olarak sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

1.1.1. Sabit Fazı Oluşturan Destek Materyalleri

Kromatografik ayırımlarda kullanılan ve adsorbent olarak adlandırılan katı destek materyali spesifik olmayan etkileşimleri (elektrostatik, hidrofobik, vb.) minimuma indirilmiş, başka bir ifadeyle inert bir materyalden üretilmiş (genellikle doğal ve/veya sentetik polimerik bazlı) küresel partiküller, membranlar veya fiberler şeklindedir.

Birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen küçük molekül kütleli kimyasal maddeler monomer, çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirine bağlanarak oluşturduğu makromoleküller ise polimer olarak tanımlanır. Polimer kelimesi, çok anlamına gelen poly- ve tanecik, küçük parça anlamına gelen –meros kelimelerinden türemiştir. Doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılan polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli, kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanıma uygun, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir. Bu üstün özelliklerinden dolayı, makine, kimya, tekstil, endüstri, fizik mühendisliği gibi alanlarda çalışanların ilgisini çeken materyallerdir. Tıp, biyokimya, biyofizik, ve moleküler biyoloji açısından da polimerlerin önemi büyüktür.

Polimerler sentez yöntemlerine göre zincir ve kondenzasyon polimerizasyonu olmak üzere iki grupta incelenebilirler. Polimerlerin üretiminde kullanılan endüstriyel teknikler, polimerizasyon ortamının özelliklerine bağlı olarak yığın, çözelti, süspansiyon, emülsüyon ve arayüzey polimerizasyon prosesleri olarak sınıflandırılabilirler. Sunulan tez kapsamında kullanılan DNA'ya spesifik yeni afinite magnetik mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir.

1.1.1.1. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu ilk defa 1909 yılında Holfman ve Delbruch tarafından geliştirildi. Bu polimerizasyon tekniği endüstride büyük

miktarlarda polimer üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Süspansiyon polimerizasyonu sonucu gözenekli veya gözeneksiz partiküller elde edilebilmektedir.

Süspansiyon polimerizasyonunda başlatıcı dağıtma ortamı içerisinde, dağılmış halde bulunan monomer damlacıkları içinde çözünür. Dağıtma ortamı olarak genellikle su kullanılır. Dağıtma ortamındaki monomerlerin çözünürlüğü genelde düşüktür. Süspansiyon polimerizasyonunda, polimerizasyon boyunca damlacıkların stabil olarak ortamda kalabilmeleri ve birbirlerine yapışmalarını engellemek için stabilizörler eklenir. Stabilizörler, organik karakterdeki monomer damlaları ile polar su moleküllerinin temas yüzeylerini azaltan maddelerdir. Sisteme uygun ısıtma programı uygulanarak, sistem başlatıcının bozunma sıcaklığına ısıtıldığında, polimerizasyon başlatıcı moleküllerinin bulunduğu monomer damlacıkların içerisinde başlatılmış olur. Bu işlemde, sistem parametrelerinin ayarlanması ile 10 µm'den 10 nm'ye kadar istenilen boyutta polimer küreler elde edilebilir. Polimer kürelerin boyut dağılımı; reaktörün tipi, başlatıcı derişimi, sıcaklık, kullanılan karıştırıcının hızı ve tipi, monomer fazın hacim fraksiyonu, monomer türü, kullanılan stabilizörün konsantrasyonu ve türüne bağlı olarak değişmektedir.

1.1.1.1. Polimerik Materyalin Sahip Olması Gereken Özellikler

Biyolojik sıvılardan hedeflenen proteinin saflaştırılması ve ayrıştırılmasında, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler,

poliakrilamitler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) destek materyalleri olarak kullanılmaktadır. Bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir.

Geometrik olarak küre, çubuk veya membran yapıların kullanılabilirdiği de hazırlanabilen ayırma yöntemlerinin çoğunda küre yapıdaki destek materyalleri sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilir ^(19–23). Küre yapıda kullanılan destek materyallerin boyutu 50-400 µm aralığındadır. Kürelerin gözenek büyüklüğü, saflaştırılmak istenen hedef molekül veya immobilize edilecek büyük moleküllü ligandların bağlanmasına izin verecek boyutta olmalıdır ⁽²⁴⁾. Küre yapıdaki destek malzemelerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımından direkt izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamanın yanında, işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olur ^(25,26).

Ticari olarak mevcut destek materyallerinin bir bölümü etkileşim yüzey alanını artırmak amacıyla, biyolojik moleküllerin rahatça girebileceği geniş gözenekler içerecek şekilde üretilmiştir. Matriksin, mekanik sağlamlığı ve kolon içinde hidrodinamik açıdan kullanım kolaylığı yanı sıra kimyasal ve biyolojik olarak inert olması gerekmektedir. Destek materyali, yüzeyinde ligandların tutuklanması için hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanısıra hidrofilik ve nötral davranış, sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermeli ve kimyasal reaksiyonlarla aktivasyona veya ligand bağlanması için türevlendirilmeye izin vermelidir. Matriks yüzeyindeki yüklü veya hidrofobik gruplar ile proteinler arasında meydana gelebilecek non-spesifik adsorpsiyonun mümkün olduğunca düşük olması beklenir. Kromatografik ayırımda kullanılacak destek materyali 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.

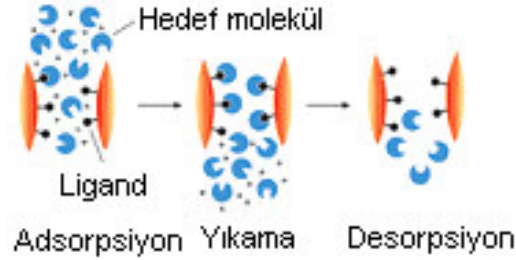
1.1.2. Afinite Kromatografi

Afinite kromatografi biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. 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 ayrıştırılmasında kullanılmıştır ⁽¹⁵⁾.

Bu yöntemle uygun şartlar altında, adsorpsiyon ortamından hedef biyolojik molekül matriks tarafından adsorplanır. Bu işlem hedef molekül içeren ortamın sürekli veya kesikli sistemlerde matriksle temasıyla sağlanır. Daha sonra adsorplanan molekül farklı pH, iyonik şiddet ve uygun spesifik elüentler kullanılarak biyolojik molekül ile matriks arasındaki non-kovalent ilişkinin bozulması ile desorbe edilir (Şekil 1.1) ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Afinite kromatografi sistemlerinde destek materyallerinin verimliliği çok sayıda faktöre bağlıdır. Adsorpsiyonu etkileyen bu faktörler; matriksin kimyasal yapısı ve üzerinde taşıdığı reaktif fonksiyonel grupların sayısı, denge-su içeriği ve partikül boyut dağılımıdır. Afinite kromatografide destek malzemesinin seçiminde, yüzeyde bulunan fonksiyonel gruplar ile non-spesifik adsorpsiyon göz önünde bulundurulmalıdır. Matriksin gözenekli

yapıda olması hedef molekül için yüksek adsorpsiyon kapasitesi sağladığı için destek malzemesinin seçiminde avantaj sağlar.



Şekil 1.1. Afinite kromatografinin şematik görünümü

1.1.2.1. **Magnetik Özellikli Afinite Destek Materyali**

Kromatografinin çeşitli uygulama alanlarında adsorbent olarak magnetik taşıyıcıların geliştirilmesi, dolgulu yatak ve geleneksel akışkan yatak sistemleriyle yapılan kromatografik ayırmalarda karşılaşılan birçok soruna alternatif çözüm üretilmesini sağlamıştır. Süper-paramagnetik katı faz destekleri kullanımına dayanan teknikler, biyolojik sıvılarda teşhis, ilaç hedefleme, moleküler biyoloji alanında araştırmalarda, hücre izolasyonunda, hedef molekül saflaştırılmasında, çeşitli immünolojik analizlerde, kanser tedavisinde, nükleik asitlerin saflaştırılmasında vs. gibi çok sayıda alanda uygulanmaktadır ⁽²⁷⁾ . Hali hazırda kullanılan bir çok partikül süper-paramagnetik özelliği nedeni ile dışarıdan magnetik alan yaratılarak kolayca magnetize edilebilmekte ve ayrıştırma için gerekli denge-zamanına ulaşıldığında hemen yeniden dağıtılabilen magnet uzaklaştırılabilmektedir.

Magnetik taşıyıcılar inorganik malzemeler veya bazı yapay ve doğal polimerler kullanılarak üretilir. İnorganik malzemeler, yüksek mekanik dirençleri, çözünmez olmaları ve çok uzun raf ömürleri nedeniyle taşıyıcı olarak idealdir. İnorganik desteklerin en büyük dezavantajı metal iyonlarıyla kompleksleşme için işlevsel gruplarının kısıtlı olmasıdır. Organik kökenli doğal veya sentetik polimerik materyaller belirli uygulamalara cevap vermek üzere istenen şekilde sentezlenebilmelerini sağlayan çok çeşitli yüzey işlevsel gruplar içermeleri ve gözenekli veya gözeneksiz olarak hazırlanabilmeleri nedeni ile magnetik destek materyali olarak kullanımları tercih edilmektedir. Polivinilbutiral, polietilen glikol, polivinil alkol, poliakrilamid, polimetilmetakrilat ve aljinat, değişik uygulamalarda kullanılan tipik polimer kökenli taşıyıcılara örnek olarak verilebilir ^(28,29) .

Akrilat ve akrilik asit 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 uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik kökenli polimerler yapay damar, kontak lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyolojik uyumluluğu 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. Metakrilik asit iyonize olabilen bir monomer olarak bilinir ve bu nedenden dolayı polimeri pH'a karşı duyarlıdır.

1.1.3. Adsorpsiyon

Atom, iyon ya da moleküllerin bir katı yüzeyine tutunmasına adsorpsiyon, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına desorpsiyon, katı yüzeyine tutunan maddeye adsorplanan, adsorplayan destek malzemesine adsorbent denir. Adsorpsiyon, fiziksel ve kimyasal olarak gerçekleşen bir ara yüzey olayıdır. Fiziksel adsorpsiyon sırasında atom, molekül yada iyon şeklinde olabilen adsorplanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında, uzun van der Waals çekim kuvvetleri etkindir. Kimyasal adsorpsiyon sırasında ise tanecikler ile yüzey arasında bir kimyasal bağ ve genellikle de kovalent bağ oluşmaktadır ⁽³⁰⁾.

1.2. DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

Proteinlerin ve peptidlerin magnetik ayrımları genellikle kullanışlı ve hızlıdır. DNA tutuklanmış destekler, plazmadan anti-DNA antikollarının uzaklaştırılmasını içeren, oto-immün hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır ^(8,10). DNA'nın daha fazla miktarda ve kararlı olarak tutuklanmasının, polimerik sorbent materyallerinin amin grupları ve DNA moleküllerinin fosfor taşıyan bölümleri arasındaki, çoklu iyonik kompleksleşme yoluyla başarılabilirdiği de gösterilmiştir. Bu sebeplerle, poli-L-lizin, poli(etilamin), poli(amidoamin) ve katyonik lipidler gibi küçük polikasyonik moleküller, DNA ile etkileşim için spesifik ligandlar olarak kullanılmıştır. Bu polikasyonik moleküllerin, fizyolojik pH'da pozitif yüklenerek çift zincirli DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına bağlandığı belirtilmiştir

(12,13,15,16). SLE gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde, bir hastanın plazmasından anti-DNA antikorlarının uzaklaştırılması, DNA tutuklanmış polimerik adsorbentler kullanılarak başarılabilir (13,15) .

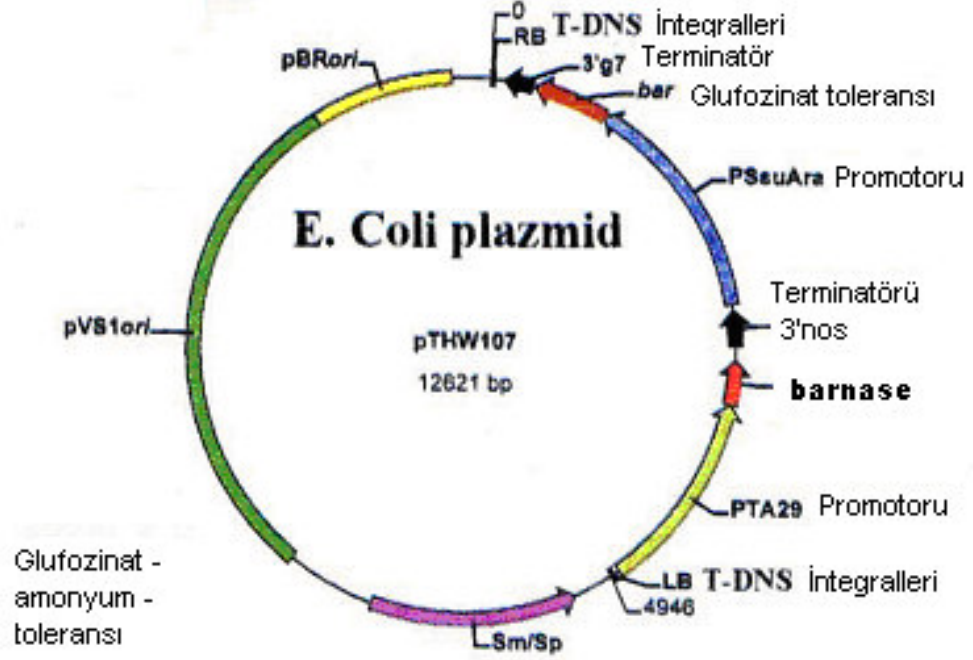
DNA izolasyonu, birçok moleküler biyoloji teknikleri için, önceden yapılması gerekli bir adımdır. Çoğu kez kompleks karışımlardan DNA'nın ayrılması, genel olarak diğer çalışmalardan; sekans, amplifikasyon, hibridleme, belirleme vs. yöntemlerinden önce gereklidir. Proteinler ve RNA gibi hücresel ya da diğer kontamine materyalin büyük miktarlarının varlığı, böyle kompleks karışımlarında, reaksiyonların ve moleküler biyolojide kullanılan tekniklerin çoğunu engeller (4) . Geleneksel DNA ekstraksiyonu için protokol, hücre lizisini takiben proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi kontamine olan hücresel komponentlerin uzaklaştırılmasını içerir; ve sonuç olarak izole edilen DNA, bir seri çöktürme ve santrifügasyon adımlarında kullanılır, otomasyonu ise zordur. Magnetik ayırma temeline dayanan tekniklerin kullanımı ile; ilgili sarfların en aza indirilebilmesi, zorlu ve hassasiyet gerektiren işlem basamaklarının elimine edilebilmesi ve otomasyona uygulanma olasılığına ulaşılırken daha kısa işlem süresinde yüksek saflıkta DNA elde edilebilmektedir. Matsunaga ve arkadaşları (31), E.coli'nin belirlenmesi ve uzaklaştırılması için, bakteriyel magnetik partiküller (BMP) üzerine tutuklanmış, fluoresan izotiyosiyanat (FITC) konjuge monoklonal anti- Escherichia coli antikorları olan, yeni bir fluoroimmünoanaliz metodu geliştirmişlerdir. Aynı araştırma grubu Staphylococcus türlerini belirlemesi için ELISA temelli bir magnetik küre geliştirmişlerdir (32) .

1.2.1. Escherichia Coli

Escherichia Coli (E.Coli); Enterobaktericeae familyasının koliform grubu içerisinde yer alır. Escherichia Coli 2-6 µm boy ve 1-1,5 µm eninde, basil şeklinde, gram(-), çoğu zaman hareketli, fakültatif anaerop, 1-2 mm çapında, S tipi koloniler yapan sporsuz bakterilerdir.

E.Coli nutrient agar, kanlı agar ve enterobakterilerin için geliştirilen seçici besi yerlerinde (MacConkey, EMB agar gibi) 37°C ve 24 saatte gözle görülebilir S tipi koloniler oluştururlar. Mac Conkey agarda pembe, EMB agarda metalik renkler veren koloniler oluştururlar. E.Coli farklı antijenik özellikler ile çok sayıda şuş ve serotipe ayrılmaktadır.

Plazmidler bakteri içerisinde çoğalan küçük, çembersel, ekstrakromozomal, tek gen içeren, çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmidlerin kendilerine ait replikasyon merkezleri vardır ve endojen hücresel mekanizmalarla kendi kendilerini çoğaltabilirler. Antibiyotik direnci, virulans faktörleri ve kendi genetik özelliklerinin diğer bakterilere aktarımından sorumlu genleri taşırlar. Bakterileri ağır metal tuzlarına, UV'ye ve antibiyotiklere dirençli hale getirirler. Plazmidi içeren E.Coli hücreleri o antimikrobiyal ajanı içeren medya içerisinde büyüyebilirler. Modern yüksek-kopya- sayılı plazmidler, yaklaşık olarak 3 kb büyüklüğündedir ve bunlara 15 kb'ye kadar parça yerleştirilebilir (Şekil1.2). Ancak plazmid yapısında kodlanan DNA'nın birçoğu 10 kb'den daha küçüktür. Daha büyük parçalar genellikle kararlı değildir. Böylece sadece küçük DNA parçaları plazmid vektörlerinde klonlanabilir.



Şekil 1.2. E.Coli plazmid

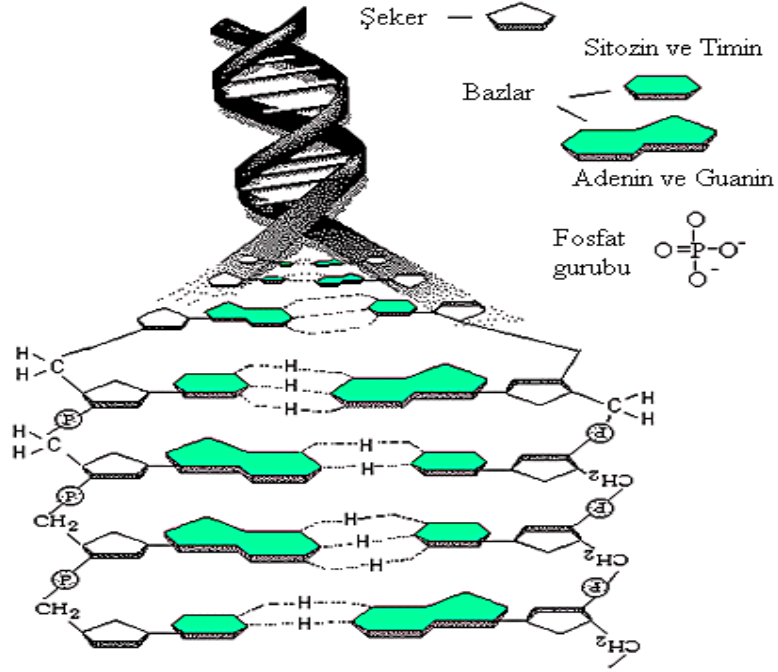
Çeşitli E.Coli şuşlarında bir çok plazmid tipine rastlanmıştır. Ancak en çok bilinenleri, F, R, Col plazmidleridir. Bu plazmidler, bazı özellikleri paylaşıyorlar da, önemli farklılıklara sahiptirler.

1.2.2. Plazmid DNA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Plazmidler kovalent bağlı, iki polinükleotid zincirinden oluşmuş çift sarmal bir yapıya sahiptir. İki polinükleotid zincirindeki bazlar birbirlerine karşılıklı olarak hidrojen bağları ile bağlanmışlardır (Şekil1.3). Her iki zincirde zıt kimyasal polariteye sahiptir. DNA çift sarmalının bir kolu 5'-3' yönünde başlarken diğer kolu 3'-5' yönünden başlar.

Plazmid DNA molekülünün her bir ipliği fosfodiester bağı ile bağlanmış deoksiribonükleotitlerin doğrusal polimeridir. Bu fosfat grupları pH>4 için negatif yüklüdür ⁽³³⁾.

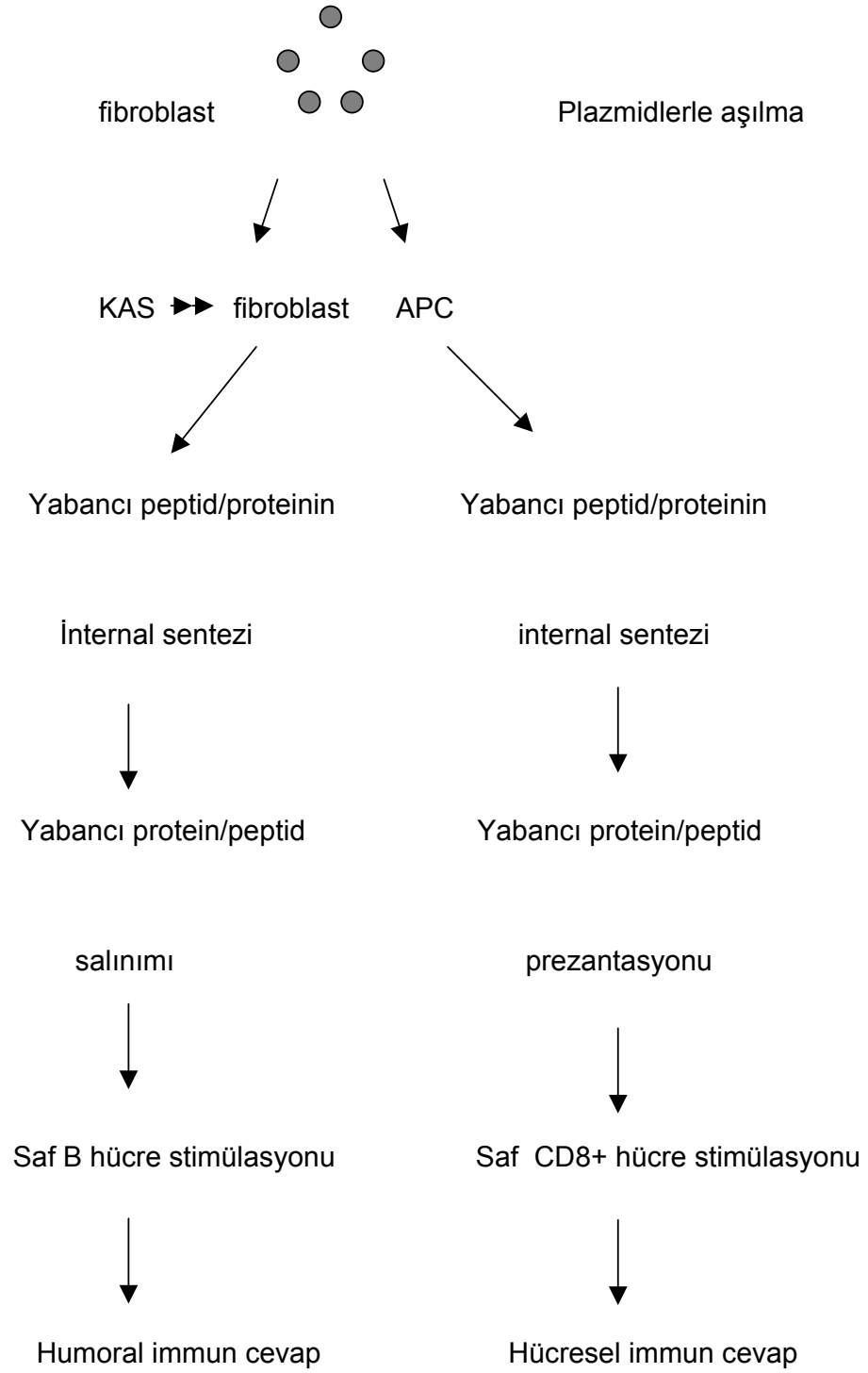
İki anti-paralel DNA zincirlerinin birbirleri etrafında ve ortak bir eksen etrafında birbirlerini sarmaları, AT (Adenin Timin) ve GC (Guanin Sitozin) bazları arasında Watson Crick H bağı ve güçlü bağlarla kararlı olan sağ el çift sarmal yapısını oluşturur ⁽³³⁾. Aromatik bazların kapalı bir şekilde paketlenmesi gereği çift heliksin tabanı yüksek derecede hidrofobiktir. pDNA'nın heliks eksenini süper sarmal pDNA oluşturacak şekilde sarılabilir ⁽³⁴⁾. pDNA molekül popülasyonunun bir fraksiyonu süpersarmal olmayan ya da açık sirküler formdan da oluşabilir. Linear, denatüre veya oligomer şeklindeki pDNA gibi diğer varyantlar hücre lizatında dahi bulunabilir. Fosfodiester bağlarının kopması ile lineer DNA, hidrojen bağlarının kopması ile denatüre DNA oluşur ⁽³⁵⁾.



Şekil 1.3. DNA'nın şematik görünümü

1.2.3. Aşılamada ve Gen Terapisinde Plazmid DNA

Son yıllarda plazmid DNA, gen terapisi ve özellikle aşılamada kayda değer bir ilgi kazandı. Plazmidler DNA kaynaklı aşılarda dizaynında ve gen tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüze kadar 600'ün üzerinde plazmid DNA bazlı gen terapisi, kanser aşısı ve terapötik aşı denemelerine başlandı ⁽³⁶⁻⁴²⁾. Plazmid DNA aşıları sıtma ve AIDS'e karşı verilen savaşta çok cesaret verici sonuçlar sağladı ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Son zamanlarda plazmid DNA aşıları Hepatit B ve C, ve tüberkülozu içeren diğer birçok infeksiyon hastalıklarına karşı da araştırılıyor ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.



Şekil 1.4. Plazmid DNA aşılamasında immun cevap

1.3. Çalışmanın Amacı

Biyolojik sıvılardan hedeflenen proteinin saflaştırılması ve ayrıştırılmasında, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler, poliakrilamitler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) kullanılmaktadır. Küre yapıda kullanılan destek materyalleri 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. Bu doğrultuda tez çalışmamızda DNA'yı sulu ortamlardan ayırma potansiyeline sahip poli(metilmetakrilat-ko-metakrilikasit), p(MMA-ko-MAA), magnetik mikroküreleri süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanarak karakterizasyonunun yapılması ve afinite kromatografi alanında DNA adsorpsiyonunda ve saflaştırmada kullanılmak üzere farklı sistem parametrelerinin etkisinin belirlenmesi hedeflendi.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, bakteriyel hücre lizatından plazmid DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması işleminde kullanılması amacı ile, herhangi bir aktivasyona ve/veya liganda ihtiyaç duymadan afinite kromatografi alanında kullanılabilir, DNA'ya spesifik yeni küre yapıda magnetik afinite destek malzemesinin geliştirilmesi düşünüldü. Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaları; i) afinite süperparamagnetik poli(metilmetakrilat-ko-metakrilik asit), m-p(MMA-ko-MAA), mikrokürelerinin literatürde yer almayan yeni bir yöntemle sentezlenmesi ve karakterizasyonu, ii) DNA'ya spesifik magnetik kürelerin sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu çalışmalarında afinite sorbent olarak kullanılması ve adsorpsiyon sistemine etki eden parametrelerin araştırılarak sistemin optimizasyonu ve iii) belirlenen optimum çalışma koşullarında m-p(MMA-ko-MAA) afinite kürelerle bakteri hücrelerinden plazmid DNA'sı saflaştırılması olarak üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

2.1. Materyaller

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

DNA (Calf thymus) İnvitrogen (Carlsbad,CA,USA) firmasından alındı. Ribonuclease A ve moleküler marker λ /Hind III, 6X Loading Dye Fermantas firmasından temin edildi. Luria Broth (LB) Sigma (St. Lois. MO, ABD) firmasından alındı. Agaroz AppliChem firmasından temin edildi. DNA

izolasyonu ve analizi için kullanılan kimyasalar moleküler derecededir. α - α' azobisizobutirilonitril (AIBN) Sigma firmasından temin edildi. Metil metakrilat ve metakrilik asit Merck AG (Darmstadt,Almanya), etilenglikoldimetakrilat ise Aldrich (USA) firmasından alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) Ropure LP marka ters ozmoz, Barnstead D3804 NANOpure organik/colloidal uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişim kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerinin Sentezi

Küre yapıdaki poli(metilmetakrilat-ko-metakrilik asit), p(MMA-ko-MAA), kopolimeri süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlandı. Metilmetakrilat (7.5 ml) ve metakrilik asit (5.0 ml) komonomerleri α - α' -azobisizobutirilonitril başlatıcısı (200 mg) varlığında çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldimetakrilat (7.5 ml) monomerlerinin ve stabilizatör olarak da, polivinil alkol, PVA, çözeltisinin (%5 w/v) kullanıldığı polimerizasyon sisteminde sentezlendi. Dağıtıcı ortam olarak toluen ve su, elektrolit olarak FeCl₃ (0.05M) çözeltisi kullanıldı. Polimerizasyon işlemi, 250 rpm karıştırma hızında 70 °C'de 2 saat ve 80 °C'de 1 saat mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra, vakum pompası kullanılarak süzülen p(MMA-ko-MAA) mikrokürelerin 100 ml distile su içerisinde FeSO₄ (5 g) çözeltisinin bulunduğu reaktöre aktararak, azot atmosferinde 90 °C'de 1 saat süresince sürekli karıştırılarak amonyak (30ml, %25 v/v) eklendi ve sistemin geri soğutucu altında reflüks edilmesi sağlandı. Birlikte çökme yöntemi ile magnetizasyon işleminin tamamlanması işlemi takiben, süzülen m-p(MMA-ko-MAA) mikroküreleri sırası ile distile su, NaCl çözeltisi ve etanol ile yıkandı.

2.2.2. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

2.2.2.1. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Boy ve Boyut Dağılımı

Vakum etüvünde kurutulan m-p(MMA-ko-MAA) afinite destek materyali moleküler elek ile elenerek boy ve boyut dağılımı belirlendi ve polimerizasyon verimi hesaplandı.

2.2.2.2. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yüzey Alanı

Afinite mikrokürelerin yüzey alanı, BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü ⁽⁴⁹⁾.

2.2.2.3. Karboksil Grubu Tayini

m-p(MMA-ko-MAA) mikrokürelerin yüzeyde erişilebilir karboksil grubunun titrasyon ile belirlenebilmesi için, mikroküreler (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.

2.2.2.4. Mikrokürelerin Şişme Oranı

m-p(MMA-ko-MAA) mikrokürelerinin şişme oranı, distile su içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak tayin edildi.

2.2.2.5. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yoğunluğu

Afinite mikrokürelerin yoğunluğu piknometre yardımıyla, mikroküreler için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

2.2.2.6. ESR Spektrumu

Elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi, 100 kHz magnetik alan modülasyon frekansı, 31.7G modülasyon genişliği ve 0.1 mW dalga boyu gücünde bir geleneksel X-bandı ($\nu = 9.75 \text{ Hz}$) Bruker ESP 300E spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 50 mg magnetik m-p(MMA-ko-MAA) afinite destek küreleri, kuartz tüp içerisine yerleştirildi ve oda sıcaklığında ölçümler alındı. Kuvvet adsorbsiyonunun ilk türevi, uygulanan magnetik alanın bir fonksiyonu olarak kaydedildi.

2.2.2.7. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin Yüzey Morfolojileri

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

2.2.2.8. m-p(MMA-ko-MAA) Mikrokürelerin FTIR Spektrumu

Afinite mikrokürelerine 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.

2.2.3. m-p(MMA-ko-MAA) Mikroküreler ile Sulu Ortamdan DNA Adsorpsiyonu Çalışmaları

Yeni sentezlenen DNA'ya spesifik magnetik mikrokürelerin, m-p(MMA-ko-MAA), sulu ortamdan DNA moleküllerine gösterdikleri afinite araştırılarak adsorpsiyon sistemi karakterize edildi. Magnetik küreler üzerine DNA adsorpsiyonu, asetat (50 mM pH 3.0-5.0) ya da fosfat tamponu (50 mM, pH 6.0-8.0) gibi farklı pH'larda çalışıldı. Sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi çalışması, dört farklı sıcaklıkta (4, 15, 25 ve 37 °C), asetat tamponu (50 mM, pH 4.0) içerisinde gerçekleştirildi. İyonik şiddetin etkisi ise çözelti ortamındaki 0.0-0.5 M aralığında değişen NaCl konsantrasyonunda araştırıldı. Magnetik mikrokürelerin adsorpsiyon

kapasitesini tayin etmek için çözeltideki DNA başlangıç konsantrasyonu, 6.25-200.0 µg/ml arasında değiştirildi.

Her set koşullarında magnetik küreler, 2 ml asetat tamponu çözeltisi (pH 4.0, 50 mM) ile dört kez yıkandı. Bütün adsorpsiyon deneyleri 25 °C sıcaklıkta, 50 mg magnetik küreler ile 4 saat, 100 rpm karıştırma hızında yürütüldü. Bu periyodun sonunda afinite magnetik küreleri, bir magnetik ayırım aygıtı ile ortamdan uzaklaştırıldı. Afinite mikrokürelere adsorplanan DNA miktarı, adsorpsiyon ortamındaki DNA başlangıç ve 4 saat sonundaki adsorpsiyon ortamında kalan bakiye DNA konsantrasyonun çift ışık demetli UV/VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japan, Model 1601) kullanılarak, 260 nm dalga boyunda adsorbanslarının ölçülmesiyle tayin edildi. Bu doğrultuda, kalibrasyon eğrisi hazırlamak için standart DNA çözeltisi kullanıldı. Deney sonucunda mikroküreler adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorplanan DNA miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$q = [(C_0 - C) V_s] / m \quad (1)$$

Yukarıdaki eşitlikte q; küreler üzerine adsorplanan DNA miktarını (mg/g), C₀; başlangıç DNA konsantrasyonu (mg/ml), C; adsorpsiyon işleminden sonra ortamda kalan bakiye DNA konsantrasyonu (mg/ml), V_s; adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (ml) ve m; adsorpsiyon ortamındaki afinite mikrokürelerinin kütlesini (mg) göstermektedir.

2.2.4. Escherichia Coli'nin Transformasyonu

Mevcut competent E.Coli hücreleri buz içerisinde çözündü. Çözünen 100 µl competent E.Coli hücreleri içerisinde 1.0 µg E.Coli plazmidi (PBI 121.23) konularak karıştırıldı ve 45 dakika buz içerisinde inkübe edildi. Inkübasyon işleminden sonra 90 saniye 42 °C 'de bekletildi. Daha sonra buz içerisinde 5 dakika bekletilerek soğuk şok uygulandı. Buz içerisinde alınıp üzerine 900µl Luria Bertani (LB) konularak, toplam hacim 1.0 ml'ye tamamlandı. Daha sonra inkübatörde 37°C'de 45 dakika karıştırıldı. 45 dk sonra inkübatörden alınarak 3000 devir/dakika da 3 dakika süre ile santrifuj edildi. Santrifuj işleminden sonra 800 µl süpernatant kısım atıldı. Ependorf tüpünün alt kısmında çöken pellet kısım ise kalan 200 µl süpernatant ile çözündü.

Steril petri kapları içerisine 100 µg/ml ampisilin içerecek şekilde, 25ml, mikro agar içeren LB döküldü ve besiyerinin katılaşması beklendi. Hazırlanan LB besiyeri üzerine 200 µl bakteri aktarıldı ve yayma yöntemi ile ekimi yapıldı. Ekimi yapılan petripler inkübatörde, 37°C'de bir gece büyümeye bırakıldı.

2.2.4.1. Miniprep DNA İzolasyonu

Falkon tüpleri içerisine 5'er ml, 100 µg/ml ampisilin içeren LB besiyeri aktarıldı ve içerisine E.Coli kolonilerinden steril kürdanla tek saf koloni aktarıldı ve inkübatörde 18 saat 37°C'de büyümeye bırakıldı. Elde edilen bu kültürler plazmid DNA izolasyonunda kullanıldı.

E.Coli hücreleri 1.5 ml olacak şekilde ependorf tüplerine yerleştirilerek 4°C sıcaklıkta, 15000 devir/dakika karıştırma hızında, 20 saniyede çöktürüldü. Bu işlem her bir falkon tüpü için üç kez tekrarlandı. Hücrelerin çöktürülme işleminden sonra üzerinden süpernatant uzaklaştırıldı. Her bir deney tüpüne 100 µl, 20 µg/ml RNase içeren Glukoz/Tris/EDTA (GTE) (50 mM glukoz, 25 mM TrisCl pH:8, 10mM EDTA) eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu yolla hücre patlatma işleminden sonra 200 µl NaOH/SDS (0,2N NaOH, %1 sodyum dodesil sülfat (SDS), ilave edildi ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika buz banyosu içerisinde bekletildi. Bu yolla hücre özütü içerisinde bulunan yağların ve proteinlerin parçalanması sağlandı. Buz banyosu içerisinde çıkarılarak üzerlerine 150 µl, 5 M potasyum asetat solusyonu pH:4,8 (29,5 ml saf asetik asit, 100 ml distile su ve KOH peletleri) eklendi ve 2 saniye süre ile karıştırılıp 5 dakika buz içerisinde bekletildi. Buz içerisinde alınıp santrifüj de 15000 rpm'de 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj işlemiyle kromozomal DNA ve diğer hücre bileşenleri çöktürüldü. Çöktürme işleminden sonra her bir tüpteki süpernatant kısmı yeni ependorf tüpe transfer edildi ve üzerlerine 0,8 ml %95'lik etanol eklenerek 2 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Nükleik asitler çöktürüldükden sonra 1 dakika süre ile 15000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı, tüpte kalan pelletin üzerine 1 ml %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 15000 devir/dakikada 1 dakika süre ile santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı, pellet vakum altında kurutuldu ve üzerine 50 µl Tris-EDTA (TE) tamponu (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH:8) ilave edilerek çözüldü.

2.2.4.1.1. İzole Edilen DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum adsorplama özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki adsorbans değeri nükleik asitlerin miktarının tayin edilmesinde kullanıldı. Genel olarak, DNA'nın nicel miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında tayin edilerek belirlenmektedir. 260 nm dalga boyunda elde edilecek 1 optik densite (OD) değeri tek iplikli DNA için 40 µg /ml, çift iplikli DNA ve plazmidler için 50 µg /ml'ye karşılık geldiği rapor edilmiştir ⁽⁵⁰⁾.

Bu doğrultuda çalışmamızda E.coli'den izole edilen plazmid DNA'ların konsantrasyonu, UV spektrofotometresi kullanılarak 260 nm'de belirlendi ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyon miktarı } (\mu\text{g /ml}) = \text{OD}_{260} \times K \times \text{DF} \quad (2)$$

Burada OD_{260} , 260 nm dalga boyundaki absorbans değerini; DF, seyrelme katsayısını; K, 260 nm dalga boyunda 1 OD değeri veren DNA konsantrasyonunu (µg/ml) göstermektedir. DNA'nın saflığını belirlemede $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ oranından yararlanılır. Bu oranın 1.8-2.0 arsında olması izole edilen DNA'nın yüksek saflıkta olduğunu gösterir. Konsantrasyonları hesaplanan plazmid DNA ları +4°C'de saklandı.

2.2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %0.8 agaroz içeren jel kullanılarak çalışıldı. 50 ml 0.5 M Tris-Borat (TBE) tamponu içerisine 0.4 gr agaroz eklendi ve mikrodalga fırın içerisinde çözüldü. Agaroz çözüldükten sonra, elde edilen jel soğutuldu ve içerisine 5 µl ethidium bromide (10 mg/ml) eklendi. Tarak elektroforez tablasının yüzeyinden yaklaşık olarak 0.5-1 mm yukarısına yerleştirildi. Daha sonra jel elektroforez tablasının içerisine baloncuk oluşmayacak şekilde aktarıldı. Hazırlanan jelin katılmasından sonra tarak çıkartılıp, tabla elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. Tankın içerisine jelin üzerini kapatacak şekilde yürütücü tampon olan, 0.5M TBE tamponu ilave edildi. Çeşitli konsantrasyonlarda izole edilen plazmid DNA'lar jel yükleme tamponu olan Loading Dye (6X) ile toplam hacim 6 µl olacak şekilde hazırlandı ve örnekler kuyucuklara yüklendi. Jelin sağındaki ilk kuyucuğa marker DNA olarak λ Hind III yüklendi. Örneklerin yükleme işleminin tamamlanması sonunda elektroforez tankının kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. 15 dakika 70 V'da, 30 dk 100 V'da yürütüldü. Bu işlemlerin sonucunda, jel UV ışığı altında incelendi.

2.2.4.3. Fotoğrafın Çekilmesi

Elde edilen plazmid DNA'lar agaroz jelde yürütüldükten sonra Vilber Image analiz aleti ile jelin fotoğrafı çekildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Magnetik Afinite Kürelerin Karakterizasyonu

Çalışmamızda sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu ve bakteriyel hücre lizatından izole edilen plazmit DNA'nın saflaştırılması işleminde kullanılan yeni magnetik m-p(MMA-ko-MAA) küreleri, metilmetakrilat ve metakrilikasit monomerlerinin kopolimerizasyonu ile sentezlendi. Kürelere magnetik özellik kazandırma işlemini gerçekleştirmek için öncelikli olarak demir içeren p(MMA-ko-MAA) küreleri, Fe^{+3} iyonları varlığında yukarıda anılan monomerlerin süspansiyon polimerizasyonunu ve ikinci aşamada ise demir oksit kristali oluşumu için Fe^{+2} iyonları içeren $NH_3 \cdot H_2O$ sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonunu kapsamaktadır.

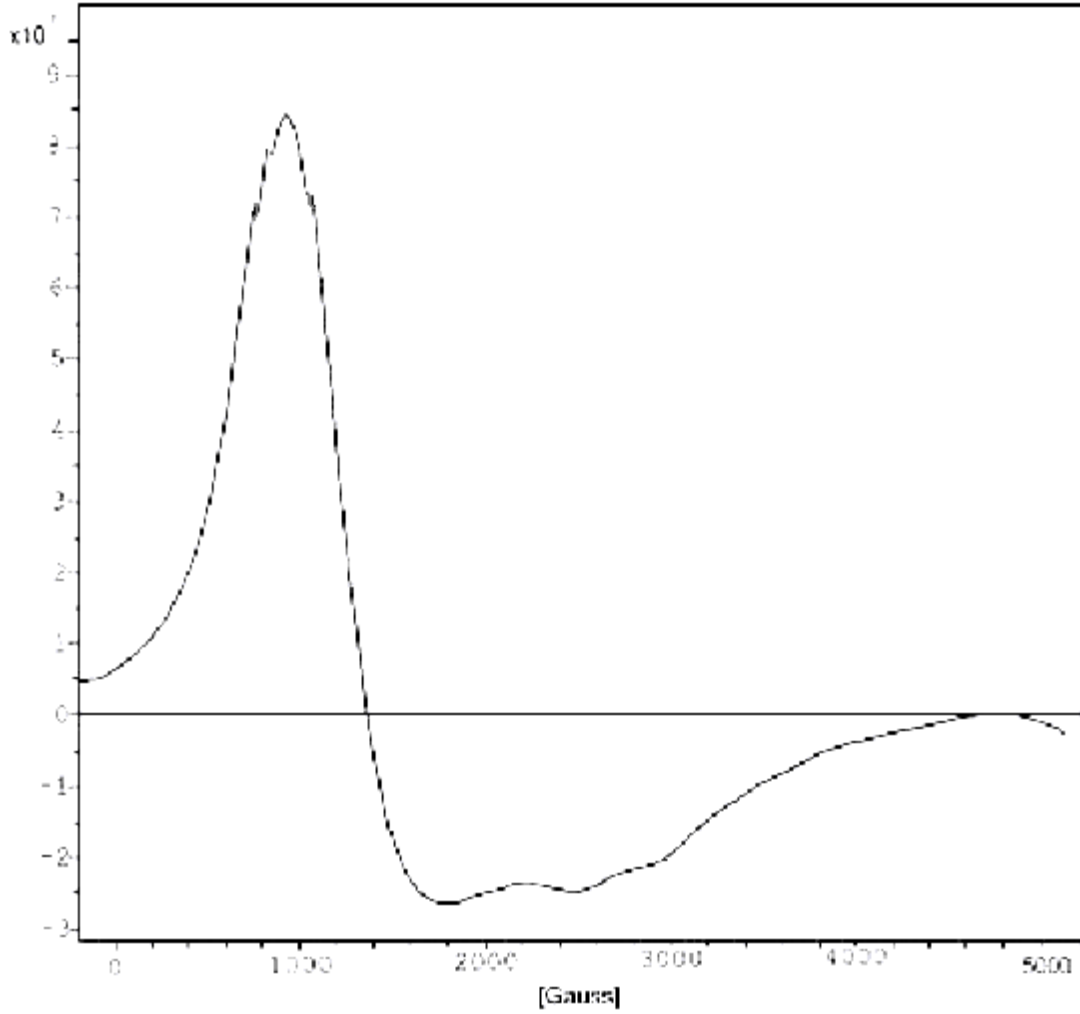
Vakum etüvünde kurutulan m-p(MMA-ko-MAA) destek materyali moleküler elek ile elenerek boy ve boyut dağılımı belirlendi. 53-300 μm arasında farklı fraksiyonlarda polimerizasyon verimi % 95 olarak hesaplandı. 75-150 μm boy ve boyut dağılımına sahip fraksiyonun polimerizasyon verimi % 86 olarak belirlendi. Magnetik m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin spesifik yüzey alanı, BET yöntemiyle ölçüldü ve 29.6 m^2/g küre olarak bulundu. Metakrilikasit monomeri karboksilik grubu taşıması nedeni ile, destek materyalinin yüzeyinde, herhangi bir aktivasyon ve/veya modifikasyona ve ligand bağlama gibi ara basamaklara gereksinim duyulmadan DNA molekülleri ile spesifik etkileşimin gerçekleşebilmesi amacı ile kullanıldı. m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin erişilebilir karboksil grubu miktarı, potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılarak 3.63 mmol/g küre olarak

belirlendi. Bu değerin, karboksil gruplarının bir kısmının magnetik kürelerin iç tarafında kalması nedeni ile analitik tayinler için ulaşılabilir olamaması sonucunda, teorik olarak hesaplanan değerden daha düşük olduğu belirlendi (8.71 mmol/g).

Protein ve enzim ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması çalışmalarında, afinite materyalin dolgulu kolon sistemlerinde kullanımı düşünüldüğünde denge su içeriği oldukça önemlidir. Magnetik m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin denge şişme oranı 1.39, yoğunluğu ise 1.41 g/cm³ olarak belirlendi.

Sentezlenen kürelerinin magnetik yoğunluğu, oda sıcaklığında elektron spin rezonans spektroskopisi (ESR) ile doğrulandı ve magnetik alana (Gauss) karşı magnetik yoğunluk olacak şekilde elde edilen sonuçlar şekil 3.1'de gösterildi. Magnetik destek malzemesinin spektrumunun incelenmesinden, i) tipik bir düşük magnetik alan uygulamasına karşı yüksek yoğunluk ferromagnetik rezonans sinyali elde edildi (2000 Gauss'un yukarısında) ve ii) 5000 Gauss'un üzerinde geniş bir bant pik yayılması olmak üzere iki bileşene sahip olduğu gözlendi. Elde edilen ESR spektrumundan, yaklaşık 1000 Gauss' luk magnetik alanın, hazırlanan magnetik kürelerinin dipol momentlerinin tamamını uyarmak için yeterli olduğu gözlendi. Literatürde, magnetik polimerik malzemeler için bu değerin 1000 ve 20.000 Gauss ⁽⁵¹⁾ arasında olduğu rapor edilmiştir. Literatürdeki çalışmalarla kıyasladığımızda, 1000 ve 20.000 Gauss arasında değişen magnetik yoğunluklar, çalışmamızda yeni geliştirdiğimiz m-p(MMA-ko-MAA) küreleri ile çeşitli kromatografik uygulamalar için daha az magnetik yoğunluk gerektiren magnetik kürelerin sentezlendiğini göstermiştir ⁽⁵¹⁾. Bu nedenle yeni

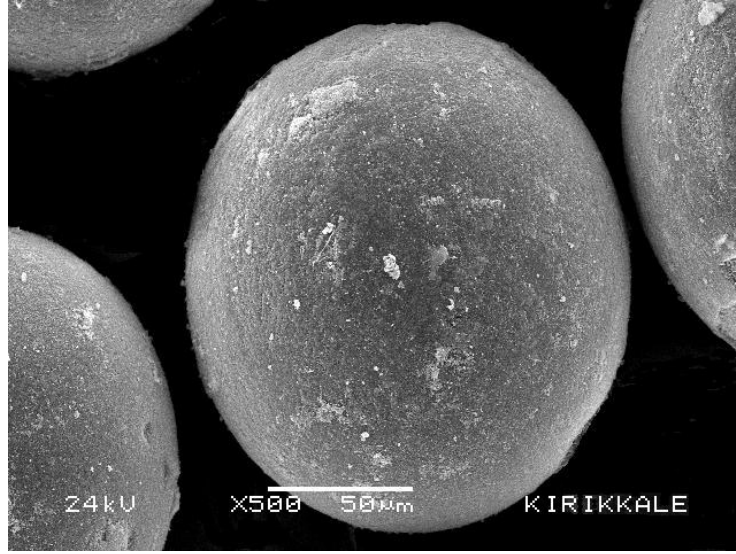
geliştirdiğimiz magnetik küreleri, geleneksel daimi mıknatıs ile çözelti ortamından bir kaç saniyede kolayca ayrılabilmesi ve uygulanan magnetik kuvvet uzaklaştırılması ile magnetik kürelerin basit çalkalama yöntemi ile kolayca dağıtılabilir olduğunu göstermesi açısından önem ifade etmektedir. Ayrıca, mikro ölçekli uygulamalarda önemli bir avantaj sağlayacağı da düşünülmektedir. Bu yolla, magnetik küreler ayırma ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmiş ve tekrar işlemsel döngüye dahil edilerek tekrar kullanımları sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Magnetik kürelerin ESR spektrumu

Magnetik kürelerinin mikrogözenekli yüzey yapısı Şekil 3.2'de taramalı elektron mikroskobu (SEM) mikrografları gösterildi. Kürelerin oldukça düzgün küresel bir yapıya sahip oldukları gözlemlendi. Polimerizasyon işlemi süresince oluşan mikro gözeneklerden dolayı pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu ve elde edilen bu yüzeyin afinite magnetik küreler ile hedef molekülün etkileşimi sırasında dış yüzeyi ve yüzeye yakın gözenek boşluğu arayüzey bölgelerinde

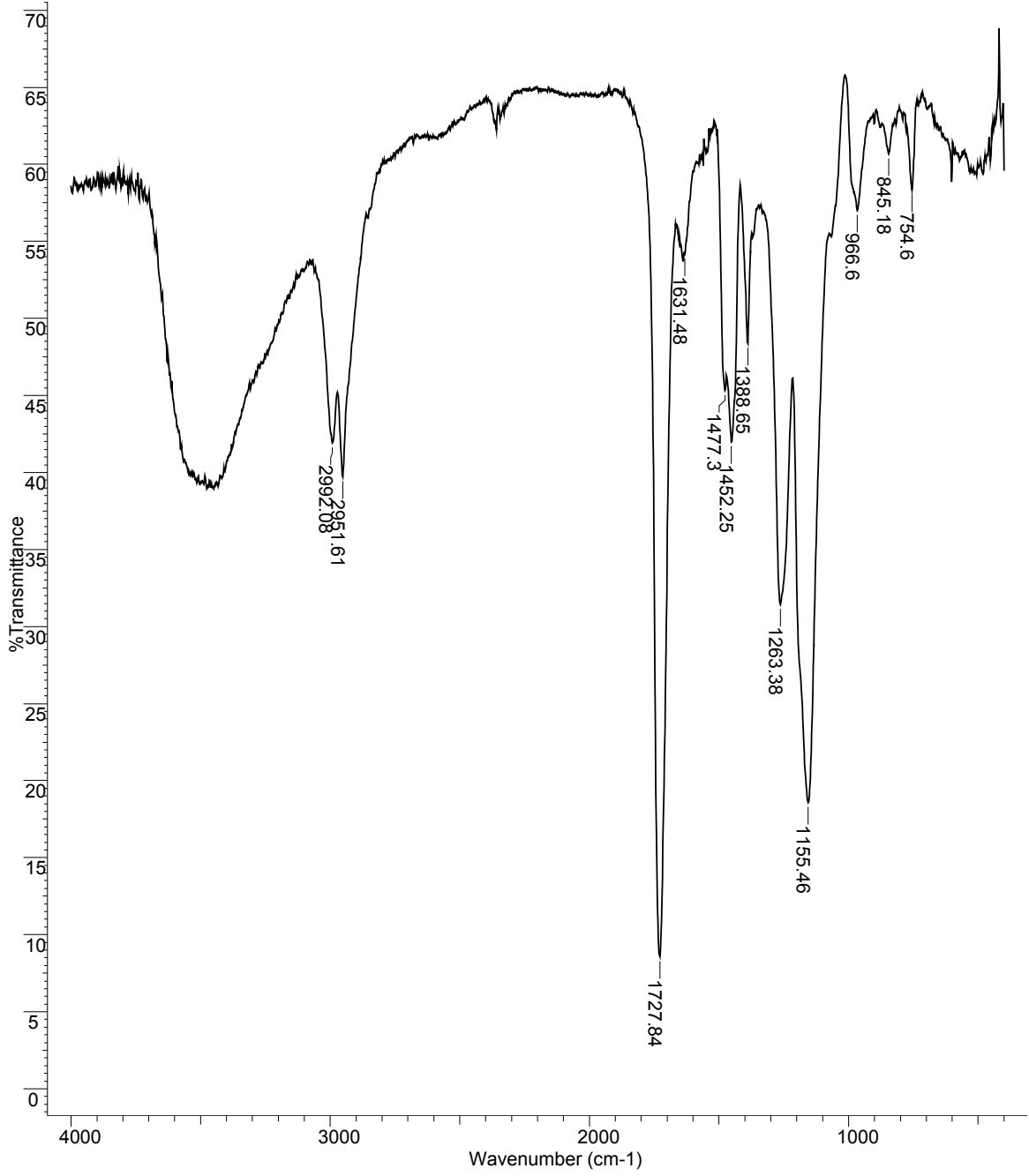
gerçekleşeceğinden, kürenin mikrogözenekli yüzey özelliği sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu ve izole edilen plazmitin izolasyonu işlemleri için geniş bir yüzey alanı sağlayacağı düşünüldü. Bu yolla magnetik m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin hedef biyolojik moleküller için daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi de sağlayacaktır.



Şekil 3.2. m-p(MMA-ko-MAA) kürelerin SEM mikrografı

Magnetik m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin FTIR spektrası, Şekil 3.3'te sunuldu. Magnetik kürelerin FTIR spektrumunda, $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 'de alkolün hidrojen bağının karakteristik gerinim titreşimine sahip olduğu görüldü. $\sim 2952 \text{ cm}^{-1}$ 'de metilen titreşimi MMA'nın karakteristik titreşimleri arasında yer alır. Metakrilikasin karbonil gruplarından ileri gelen ve MMA'nın ester konfigürasyonunu ifade eden absorpsiyon piki ise yaklaşık 1728 cm^{-1} de

gözlendi. 3447, 1632 cm^{-1} deki absorpsiyon bantları C=O piki, 1156 cm^{-1} deki C-O karakteristik piki, 2992 ve 1452'deki C-H gerilim ve titreşim bantlarına ait pikler metilmetakrilat ve metakrilikasit monomerlerinin kopolimer yapıda olduğunun bir göstergesidir. Fe_3O_4 , 600 cm^{-1} 'de karakteristik bir banta sahiptir ve bu m-p(MMA-ko-MAA) kürelerinin yapısı içinde Fe_3O_4 moleküllerinin varlığını göstermektedir. Bu sonuç ayrıca, gravimetrik analiz ile de doğrulanmıştır. Küre yapısındaki çökmüş demir oksit miktarının 134 mg/g küre mertebesinde olduğu da belirlenmiştir.



Şekil 3.3. m-p(MMA-ko-MAA) kürelerin FTIR spektrumu

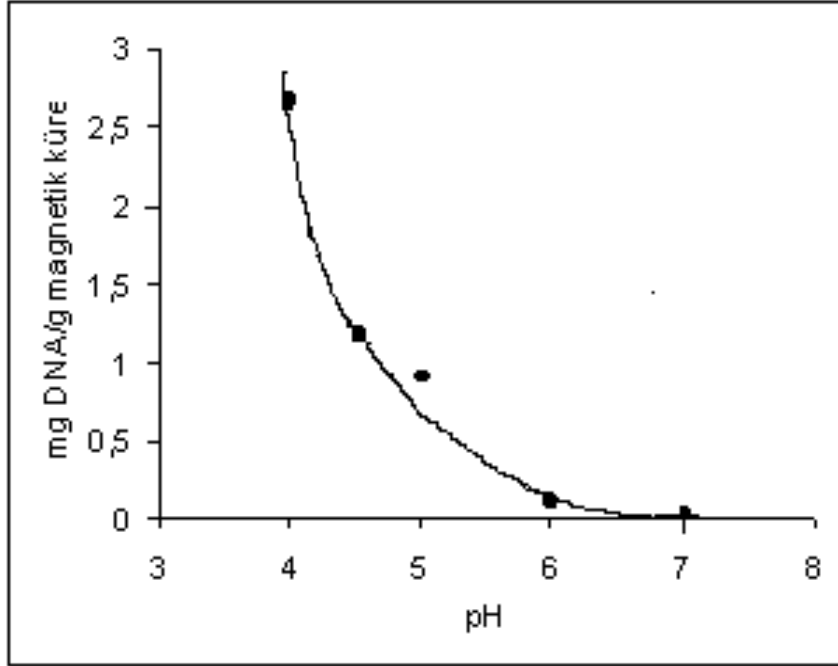
3.2. Sulu Çözeltiden DNA Adsorpsiyonu Çalışmaları

Süperparamagnetik özellikli m-p(MMA-ko-MAA) kürelerin hazırlanması için optimize edilen deney protokolün oluşturulmasını takiben, yeni geliştirilen afinite kürelerin herhangi bir aktivasyon veya modifikasyon işlem basamağı gerektirmeksizin tek basamakta sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilerek DNA moleküllerine karşı gösterdikleri afinite araştırıldı. Adsorpsiyon sistem parametrelerinin belirlenmesinin ardından plazmit DNA'nın saflaştırılması çalışıldı.

3.2.1. pH Etkisi

pH ve iyonik şiddet, arayüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimlerle yönetilen afinite kromatografi sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Hedef molekül yüzeyinde iyonize olabilen gruplar dolayısı ile oluşan yüzey yük dağılımı, magnetik kürelerindeki bağlanma bölgeleri ile spesifik afinite etkileşimlerinde pH oldukça önemli bir faktör olacaktır ⁽⁵²⁾. Magnetik p(MMA-ko-MAA) afinite kürelerle DNA'nın spesifik etkileşimi incelemek için pH'ın etkisi 4.0-6.0 aralığında araştırıldı (Şekil 3.4). Magnetik kürelere 0.5 M NaCl içeren çözeltideki başlangıç derişimi 100 µg/ml olan DNA'nın maksimum adsorpsiyonu pH 4.0'de 2.68 mg/g küre olarak bulundu. Bu spesifik etkileşim DNA'nın bu pH değerinde konformasyonel ve yüzey yük dağılımı durumundan ve destek materyali yüzeyindeki negatif yük yoğunluğuna sahip bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı düşünöldü. İyi bilindiği gibi, bir arayüzey olayı olan biyolojik

molekül adsorpsiyonun da hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları spesifik adsorpsiyondan sorumlu olan başlıca kuvvetlerdir ⁽³⁰⁾.

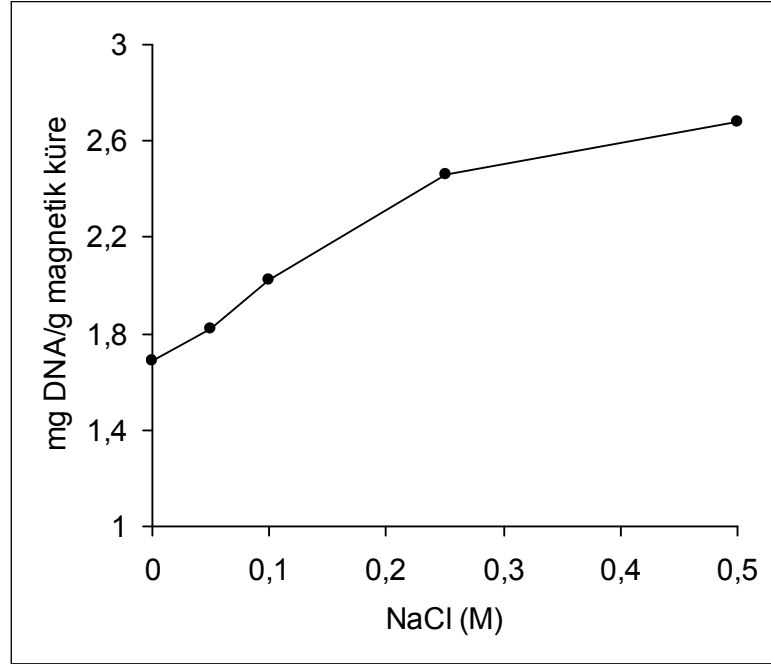


Şekil 3.4. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna pH etkisi

3.2.2. İyonik Şiddet Etkisi

Sulu çözülden DNA adsorpsiyonu, iyonik şiddetin etkisi farklı tuz konsantrasyonlarında, 100 µg/ml başlangıç DNA konsantrasyonunda çalışıldı (Şekil 3.5). Şekilden görülebildiği gibi, maksimum DNA adsorpsiyonu 0.5 M NaCl konsantrasyonu ile elde edildi. Bu, yüksek iyonik şiddette, DNA'nın daha kompakt bir yapısının oluşumu ile açıklanabilir. DNA'ya spesifik bağlanma yerlerinin engellenmesine neden olabileceği ve bu nedenle

magnetik afinite kürelerin hedef moleküle daha düşük adsorpsiyonuna yol açabileceği düşünöldü.



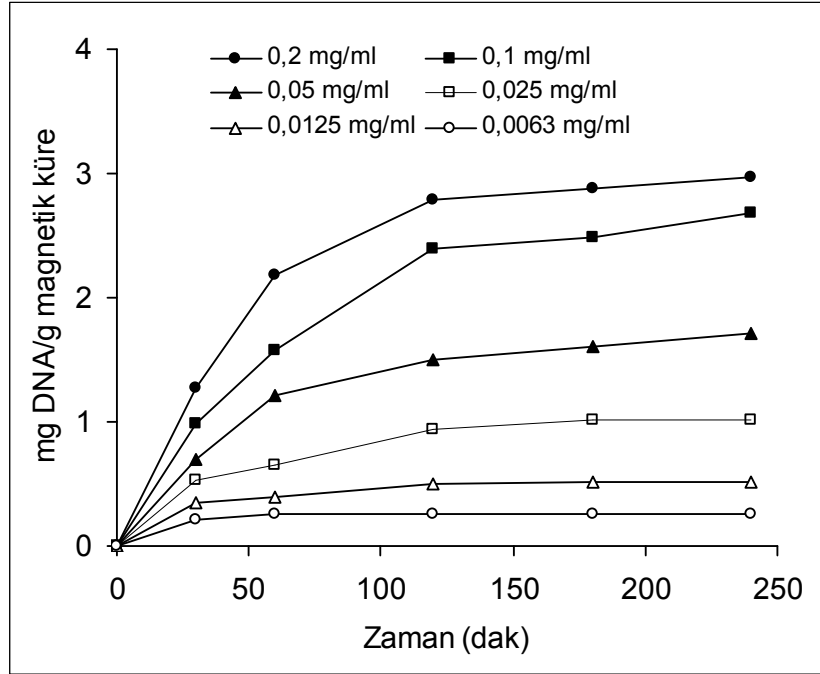
Şekil 3.5. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi

Arıca ve arkadaşları⁽⁸⁾ NaCl konsantrasyonunun 0.0'dan 0.5 M kadar artırıldığında, poli-L-lizin tutuklu pHEMA membranına adsorplanan DNA miktarı, yaklaşık %47 oranında arttığını rapor etmişlerdir . Lee ve arkadaşları⁽⁵³⁾ , tuz içeren sulu ortamda, serbest poli-L-lizin ile sığır timus DNA'sının etkileşimini araştırmışlar ve ortamın iyonik şiddeti arttıkça, sığır timus DNA'sı ile poli-L-lizin'in etkileşim oranının arttığını belirtmişlerdir. Lee ve arkadaşları, DNA adsorpsiyonunda artan iyonik şiddet ve artan pH'la, agregasyon hızının arttığını bildirmişlerdir. İyonik şiddet arttıkça, Debye-Hückel uzunluğu

tarafından verilen, moleküllerin çevresindeki elektriksel çift tabaka azalacaktır. Rustemier ve Killmann ⁽⁵⁴⁾, ortamdaki artan elektrolit konsantrasyonuyla, yüzey yüklerini görüntülemiştir. Bu etkilerin, moleküller arasındaki itme kuvvetinin azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, moleküller arasındaki toplam potansiyel enerji bariyerinin azalması neticesinde sistemlerde agregasyon görülmeye başlamaktadır.

3.2.3. Denge Adsorpsiyon Zamanı

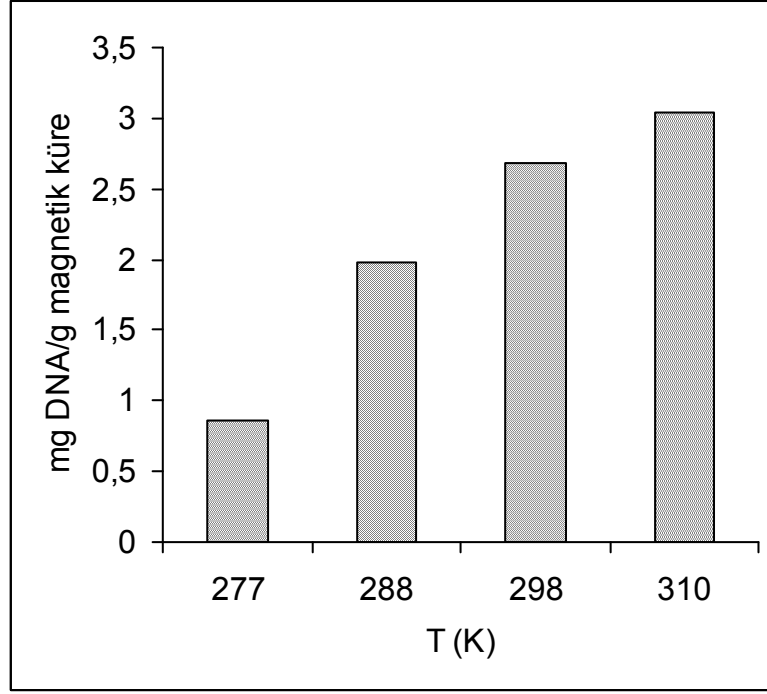
Magnetik m-p(MMA-ko-MAA) kürelere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu işleminde zamanın etkisi araştırılarak denge-zamanı belirlendi. Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki DNA için adsorpsiyon işleminin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı olduğu, 180 dakika içerisinde dengeye ulaştığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 3.6). Adsorpsiyon ortamındaki başlangıç DNA konsantrasyonlarındaki artış adsorpsiyon hızı ve kapasitesinde de artışa neden oldu. Bu nedenle çeşitli koşullar altındaki (farklı adsorpsiyon parametreleri) adsorpsiyon verileri, dengeye ulaşılan 4 saatlik adsorpsiyon işlemi süreci uygulanarak elde edildi.



Şekil 3.6. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonunda denge-zamanı

3.2.4. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın artması ile DNA ve magnetik mikrokürelere fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim alanının arttığı ve dolayısıyla adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.7). Sıcaklığın 4 °C'den 37°C'ye çıkarılması ile birlikte m-p(MMA-ko-MAA) mikrokürelere adsorpsiyon kapasitesindeki bu artışın DNA molekülünün konformasyonel yapısı ile ilgili olduğu düşünüldü.

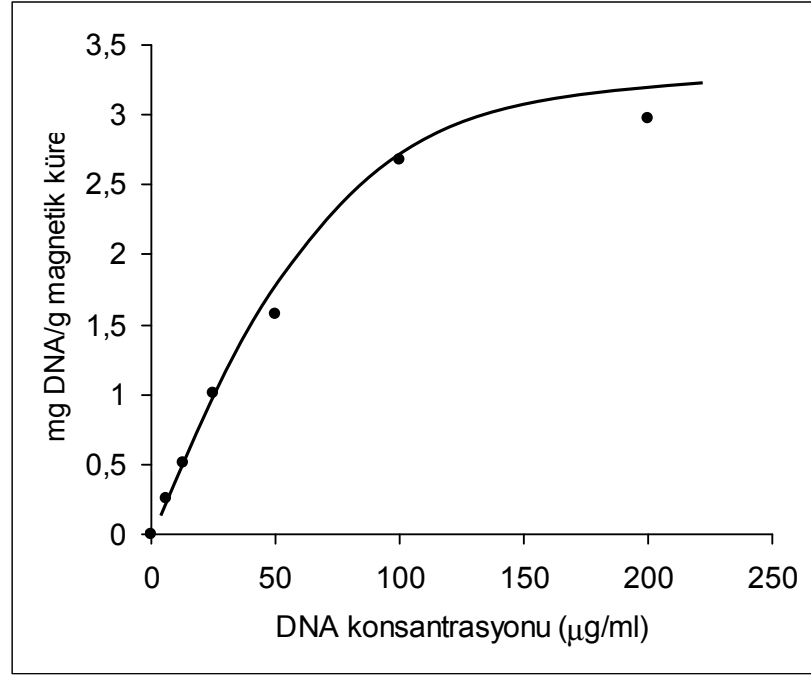


Şekil 3.7. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi

3.2.5. Başlangıç DNA Konsantrasyonunun Etkisi

Afinite magnetik kürelere sulu çözülden DNA uzaklaştırılması için deneysel adsorpsiyon eğrisi Şekil 3.8'da sunuldu. Adsorpsiyon ortamındaki DNA konsantrasyonundaki artış, afinite magnetik kürelere adsorplanan protein miktarında bir artışa neden olmaktadır. Başlangıç DNA konsantrasyonu ve afinite magnetik kürelerin protein adsorpsiyon kapasitesi arasındaki ilişkinin, başlangıç konsantrasyonu 100 µg/ml'den fazla olmadığı derişimler de doğrusal olduğu gözlemlendi. Adsorpsiyon kapasitesinin, artan DNA konsantrasyonu ile arttığı ve 100 µg/ml başlangıç derişim değerinden

sonra sabit kaldığı gözlemlendi. Bu afinite mikrokürelerin spesifik etkileşim gruplarının, DNA molekülleri ile doymuş hale gelmiş olmasıyla açıklanabileceği düşünüldü.



Şekil 3.8. Afinite m-p(MMA-ko-MAA) kürelere DNA adsorpsiyonunda sulu çözeltilerdeki başlangıç DNA konsantrasyonunun etkisi

DNA adsorpsiyonu için literatürde, çok geniş adsorpsiyon kapasitesileri aralığında, çok çeşitli afinite adsorbentleri bildirilmiştir. Kato ve Ikada ⁽⁵⁵⁾, modifiye edilmiş poli(etilen teraftalat) mikrofiberlerin maksimum DNA adsorpsiyon kapasitesini 5.0 mg/g olarak bildirmişlerdir. Unsal ve arkadaşları ⁽⁵⁶⁾ polietilenimid bağlı poli(p-klorometilstiren) kürelerin gramına

290 mg DNA adsorplandığını bulmuşlardır. Arıca ve arkadaşları ⁽⁸⁾, poli-L-lizin tutuklu pHEMA membranı ile 5849 mg/m² adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada geliştirilen magnetik m-p(MMA-ko-MAA) adsorbentlerle başarılan maksimum DNA adsorpsiyonu kapasitesi 2.97 mg/g olarak bulundu.

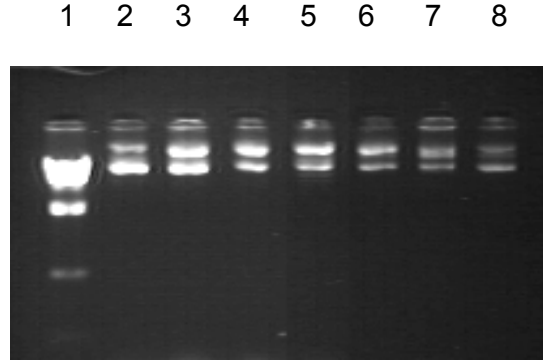
DNA adsorpsiyonundan sonra, magnetik afinite sorbent, DNA-adsorplanan magnetik küre, desorpsiyon ortamına (1.0 M NaCl ve 1.0 mM EDTA içeren, Tris-HCl tamponu, 10 mM, pH 8.0) transfer edildi ve 23 °C'de, 6 saat inkübasyonu sonucunda %72 oranında DNA'nın desorbe edildiği belirlendi.

3.3. Plazmid DNA'ların izolasyonu ve Spektrofotometrik Kontrolü

Plazmidler E.Coli DH5α konak hücrede üretildi ve mikro skalada "miniprep" DNA izolasyon yöntemi ile plazmid DNA sı izole edildi. İzole edilen örneklerdeki DNA miktarları spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edildi. Plazmid DNA'ların kalitesi spektrofotometrik ölçümle elde edilen A_{260}/A_{280} oranı göz önüne alınarak hesaplandı. Plazmid DNA örnekleri için A_{260}/A_{280} oranının 1.7-2.0 arasında değiştiği görüldü.

İzole edilen plazmid DNA'ların saflığının kontrolü ve izole edilen plazmid DNA'ların molekül büyüklüğü agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlendi (Şekil 3.9). Jeldeki gözlenen bantların parlaklığına bakılarak spektroda ölçülen değerle uygunluğu kontrol edildi. Yüksek konsantrasyonda izole edilen plazmid DNA'ların agaroz jeldeki bantlarının parlak, düşük

konsantrasyonda izole edilen plazmid DNA'ların bantlarının ise daha mat olduğu görüldü. Bu sonuç bize spektrofotometrik ölçümler ile agaroz jel elektroforezin sonuçlarının uyumlu olduğunu gösterdi.



Şekil 3.9. Plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezi 1; Marker DNA (λ /Hind III) (2 μ l), 2,3,4,5,6,7,8,9,10; Miniprep DNA izolasyon yöntemi ile değişik konsantrasyonlarda izole edilen plazmid DNA'lar (2 μ l)

3.3.1. İzole Edilen Plazmid DNA'nın Saflaştırılması

Ticari DNA (Calf Thymus) ile yapılan adsorpsiyon çalışması sonucunda elde edilen optimum koşullarda, maksimum adsorpsiyonun gözlemlendiği 0.5 M tuz içeren pH 4.0 tampon sisteminde izole edilen plazmid DNA'nın magnetik m-p(MMA-ko-MAA) afinite küreleri ile saflaştırılması çalışıldı ve 1 g kürenin 0.29 mg plazmid DNA' sı saflaştırabildiği belirlendi.

4.SONUÇ

Biyolojik sıvılardan makromoleküllerin (DNA/RNA, hormon, peptid ve protein gibi) saflaştırılması için magnetik polimerik kürelerin kullanımına olan eğilim dikkat çekicidir. Magnetik destekler biyolojik sıvı karışımlarından, partiküllerin varlığında bile, hedef molekülün spesifik izolasyonlarında başarı ile kullanılabilir. Magnetik destek materyallerinin kullanıldığı afinite kromatografi seçici bir saflaştırma yöntemidir. Afinite kromatografide kullanılan polimerler, kararlı yapıları nedeni ile biyolojik ortamlarda kararlıdır ve enzimatik ve mikrobiyal degradasyona karşı direnç gösterirler. En önemli avantajları kimyasal ve fiziksel olarak oldukça dayanıklı olmalarıdır. Kromatografik yöntemlerin en önemli avantajları büyük ölçekli işletim sistemlerinin oluşturulmasındaki kolaylıktır.

DNA tutuklu adsorbentlerle anti-DNA antikorlarının uzaklaştırılması, bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan yaygın bir yaklaşımdır. Bu çalışmada, bakteriyel hücre lizatından plazmid DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması işleminde kullanılması amacı ile afinite kromatografi alanında kullanılabilir, yeni küre yapıdaki magnetik destek malzemesinin geliştirilmesi hedeflendi. Bu amaçla, metilmetakrilat (MMA), metakrilik asit (MAA) ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) monomerleri kullanılarak süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile m-p(MMA-ko-MAA) mikroküreleri sentezlendi ve karakterizasyon çalışmaları (spesifik yüzey alanı, partikül boy ve boyut dağılımı, yoğunluğu, şişme oranı, ESR spektrumu, SEM mikrografı, FTIR spekturumu, karboksil grubu tayini) yapıldı. SEM mikrografı çekilen

mikrokürelerin, yüzeyinin polimerizasyon ortamında bulunan toluen sayesinde, gözenekli bir yapıya sahip olduğu görüldü. Yeni hazırlanan m-p(MMA-ko-MAA) afinite mikroküreler ile sulu çözeltilerden DNA adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Afinite mikrokürelerinin sulu ortamdan DNA (Calf Thymus) adsorpsiyonu işleminde optimum pH, 4.0 olarak belirlendi. Afinite magnetik kürelere sulu çözeltilerden DNA adsorpsiyonu işleminde başlangıçta hızlı bir adsorpsiyon gözlemlendi ve 180 dakikanın sonunda dengeye ulaştığı gözlemlendi. Adsorpsiyon ortamındaki DNA konsantrasyonunun artırılması ile adsorpsiyon hızı ve kapasitesinin arttığı ve maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 2.97 mg/g olduğu belirlendi.

Plazmid DNA uzun zamandır moleküler biyolojide yaşayan organizmaların modifikasyonu için kalıtsal bir araç olarak kullanılmaktadır. Plazmid DNA'lar antibiyotiklere, metallere ve ilaçlara dirençlilik, toksin formasyonları, pilus oluşumu, virulans faktörleri, fermentasyon özellikleri, nitrojen fiksasyonu vs gibi özel karakterleri taşıdıkları için bakterilere avantajlar sağlamaktadırlar ⁽⁵⁷⁾. Tipik olarak plazmid DNA'nın çok küçük miktarları operasyonlarda ve üretim için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde gereklidir. Bu nedenle kolay, hızlı ve ucuz plazmid DNA saflaştırılması için yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca, elde edilen magnetik küreler immünoadsorbent olarak da kullanım potansiyeline sahip olacağı düşünülmektedir

KAYNAKLAR

1. Axen, R., Porath, J., and Ernback, S., Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen bromide. *Nature*, **214**, 1302-4(1967)
2. Cuatrecasas, P., and Anfinsen, C.B., *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York and London, **345** (1971)
3. Pharmacia. Fine Chemicals, "Affinity Chromatography; principles and methods" Lijungföretagen AB, Örebro, Sweden
4. T. Hultman, S. Stahl, E. Hornes, M. Uhlen, Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support, *Nucleic Acids Research*, **17**, 4937 (1989)
5. L. Stryer, *Biochemistry, Glycolysis*, Freeman, San Francisco, CA, 511(1981)
6. Bruce IJ, Davies MJ, Howard K, Smethurst DE and Todd MJ, Magnetisable solid phase supports for purification of nucleic acids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **48**, 247 (1996)
7. Davies MJ, Smethurst DE Howard KM, Todd MJ, Hippins LM and Bruce IJ, Improved manufacture and application of an agarose magnetizable solid-phase support, *J Appl Biochem Biotechnol* **68**, 95 (1997)
8. Serap Şenel, Gülay Bayramoğlu and M. Yakup Arıca, DNA adsorption on a poly-L-lysine-immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membrane, *Polymer International* **52**, 1169-1174 (2003)

9. Terman DS ,Steward I RobinettoJ, Carr R and Harbeck R, Spesific removal of DNA antibodies invivo with extracorporeal immuno adsorbent, Clinical and Experimental Immunology, **24**, 231(1976)
10. Arica, M.Y., Immobilization of Polyphenol Oxidase on Carboxymethyl Cellulose Hydrogels Beads: Preparation and Characterization, Polymer Int, **49** (7) 775-781(2000).
11. A.Mountain, Gene therapy: the first decade, Trends in Biotechnology, **18**, 119 (2000)
12. F.D. Ledley, Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. Hum. Gene Theraphy, **6**, 1129 (1995)
13. S.Surzycki, Basic Techniques in Moleculer Biology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2000
14. M. Özçimder, A. Demirci, Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Bilim Yayıncılık, Kırıkkale 2004
15. Turkova J, Bioaffinity Chromatography, Elsevier, Amsterdam , (1993)
16. X.Zeng, E.Ruckenstein, Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation, Biotechnology Progress **15**,1003-1019 (1999)
17. F.Ming, J.A.Howell, Resolution and productivity of conalbumin and lysozyme from fresh egg-white loaded at very high flow rate on a 250-mm length CM-HVFM column, Bioseparation **2**, 289(1992)
18. Arica, M.Y., Yılmaz, M., and Bayramoğlu, G., Affinity membrane chromatograohy: Relationship of dye-ligand type to surface polarity and their effect on lysozyme separation and purification, Journal of Chromatography B, **805**, 315-323 (2004).

19. Arica, M.Y. Yalçın, E, Bayramoğlu, G.,. Preparation and characterisation of surface properties of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacryloylamidohistidine): application for purification of HlgG, Journal of Chromatography B, **807**, 315-325 (2004)
20. H.Y.Gan, Z.H.Shang, J.D.Wang, New affinity nylon membrane used for gamma-globulin, Journal of Chromatography A **867**,161-168(2000)
21. Bayramoğlu, G.,. poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan Dye and Different Metals Ion Immobilized Interpenetrating Network Membranes: Preparation and its Application in Metal-Affinity Chromatography, Journal of Applied Polymer Science, **88**,1843-1853(2003)
22. R.Arshady, Beaded polymer supports and gels.I: Manufacturing techniques, Journal of Chromatography, **586**,181-197(1991)
23. R.Arshady, Beaded polymer supports and gels.II: Physico-chemical criteria and functionalization, Journal of Chromatography, **586**,199-219(1991)
24. Arica, M.Y., Epoxy Derived pHEMA Membrane For Use Bioactive Macromolecules Immobilization: Covalently Bound Urease in a Continuous Model System, Journal of Applied Polymer Science, Vol: **77**(9) 2000-2008 (2000)
25. H.A.Chase, Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, Trends Biotechnol. **12**, 296-303(1994)
26. H.A.Chase, N.M.Draeger, Affinity purification of proteins using expanded beds., Journal of Chromatography **597**, 129-145 (1992)
27. Xia Xie, Xu Zhang, Huan Zhang, Depu Chen, Weijiang Fei, Preparation and application of surface- coated superparamagnetic nanobeads in the

isolation of genomic DNA, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **277**,16-23(2004)

28. Arica M.Y., Bayramoğlu G., Arica B., Ito K. and Yagci Y., Design of a novel hydrogel membrane for various biomedical applications based on poly(hydroxyethylmethacrylate/vinylbenzyl-poly(ethyleneoxide)): properties and its drug release characteristics, *Macromolecular Bioscience* **5**(10) 983-992 (2005).

29. Arica MY, Bayramoğlu G, Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **27**, 255-265(2004)

30. Tong X-D, Dong X-Y, Sun Y. , Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent, *Biochem Eng*, **12**, 117-204(2002)

31. Nakamura N., Burgess J.G., Yadiuda K., Kudo S., Sakaguchi T., Matsunaga T., Detection and removal of *Escherichia coli* using fluorescein isothiocyanate conjugated monoclonal antibody immobilized on bacterial magnetic particles, *Analytical Chemistry*, **15**,2036-2039(1993)

32. T. Matsunaga, Y. Hisaghi and N. Tsujimura, Drug Delivery by Magnetoliposomes Containing Magnetic Particle, *Cell Eng.*, **2**,7-11(1997)

33. R.R. Sinden, Nice modern textbook on DNA structure, *DNA Structure and Academic Press*, San Diego, CA, 1994

34. M.M. Diogo, J.A. Queiroz, D.M.F. Prazeres, Chromatography of plasmid DNA, *Journal of Chromatography* **1069** , 3-22(2005)

35. D.K. Summers. *The Biology of Plasmids*, Blackwell, Oxford, UK 1996.

36. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *TIBTECH* **18**, 119-28(2001)

37. Restifo H, Rosenberg S. Developing recombinant and synthetic vaccines for the treatment of melanoma. *Curr Opin Oncol* **11**, 50-7(1999)
38. Ferber D. Gene therapy: safer and virus free. *Science* **294**, 1638-42 (2001)
39. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97**, 1114-23 (1998)
40. Losordo D, Vale P, Symes J, Dunnington C, Esakof D, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Circulation* **98**, 2800-4 (1998)
41. Tang D, Devit M, Johnston S. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-4 (1992)
42. Ulmer J, Donnelly J, Parker S, Rhodes G, Felgner P, Dwarki V, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-9(1993)
43. Doolan D, Hoffman S. DNA- based vaccines against malaria: status and promises of the multi-stage malaria DNA vaccine operation. *Int J Parasitol* **31**, 753-62 (2001)
44. Mascol J, Nabel G. Vaccines for the prevention of HIV-1 disease. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 489-95(2001)
45. Barouch D, Craiu A, Kuroda M, Fu T, Wagner W, et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**, 486-92(2001)
46. Chattergoon M, Boyer J, Weiner D. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutic. *FASEB* **11**, 753-63(1997)

47. Shroff K, Smith L, Baine Y, Higgins T. Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium. *PSTT* **2**, 205-12(1999)
48. Liljeqvist S, Stahl S. Production of recombinant subunit vaccines : protein immunogens , live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology* **73**,1-33(1999)
49. Jr. WJ. Weber, Coagulation and Flocculation., In *Physicochemical Processes For Water Quality Control*, New York, Wiley, 206-211(1972)
50. Temizkan, G., Arda, N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitabevi, 1999
51. Roy, V.A.L., Pode, R.B., Rao, T.K.G., Djuricic, A.B., Baldacchini, G.B., Optical and ESR studies Tris (8-hydroxyquinoline) aluminum, *Mater. Sci. Eng., B* **106**(1),85-8(2004)
52. G. Bayramoğlu, B. Kaya, M.Y. Arica, Procion Brown MX-5BG attached and Lewis metals ion-immobilized poly(hydroxyethyl methacrylate)chitosan IPNs membranes : Their lysozyme adsorption equilibria and kinetics characterization, *Chemical Engineering Science.*, **57**,2323(2002)
53. Lee LK, Mount CN and Shamton PA, Characterization stability of colloidal polycation-DNA complexes for gene therapy and DNA vaccines, *Chem. Eng. Sci.*, **56**,3163(2001)
54. Rustemier O and Killmann E, Electrostatic Interactions and Stability of Poly-L-lysine Covered Polystyrene Latex Particles Investigated by Dynamic Light Scattering, *Journal of Colloid Interface Sci* **290**,360(1997)
55. Kato K ve Ikada Y, Immobilization of DNA onto a polymer support and its potentiality as immunoadsorbent, *Biotechnology and Bioengineering*, **51**,581-590(1996)

56. Unsal E, Bahar T, Tuncel M and Tuncel A, DNA adsorption onto polyethylenimine-attached poly(p-chloromethylstyrene) beads, *Journal of Chromatography A*, **898**,167-77 (2000)
57. Sign, J., Batra, N. and Sobti, R.C., "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSRI", *Process Biochemistry*, **36**:781-785 (2001)

