

**LEKTİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASI**

**BİRNUR AKKAYA
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2009**

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEKTİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASI**

BİRNUR AKKAYA

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
SİVAS-2009**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, Jürimiz tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ferda CANDAN
Üye : Doç. Dr. H.Nursevin ÖZTOP
Üye : Doç. Dr. Handan YAVUZ
Üye : Doç. Dr. Şenay ÇETİNUS
Üye : Doç. Dr. Yusuf TUTAR

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım

24/06/ 2009

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ

**LEKTİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASI**

BİRNUR AKKAYA

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
SİVAS-2009

Danışman
Ferda CANDAN
Adil DENİZLİ

Bölümü-Ünvanı
Biyokimya- Prof. Dr.
Biyokimya- Prof. Dr.

İmza

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 7 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Projenin yürütülmesi için kaynak sağlayan Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (CÜBAP F233) teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim
Recep AKKAYA ve canım oğlum Ali Efe AKKAYA'ya...

ÖZET

LEKTİN AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ İLE ANTİKOR SAFLAŞTIRILMASI

Birnur AKKAYA

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Danışmanları: Prof. Dr. Ferda CANDAN- Prof. Dr. Adil DENİZLİ

2009, 109 sayfa

Bu çalışmada, Konkanavalin A (Con A) immobilize eş boyutlu manyetik poligliseril metakrilat (GMA) mikropartiküller kullanılarak, kesikli ve MSFB (Manyetik olarak kararlaştırılmış akışkan yatak) sistemde sulu çözümlerden ve insan serumundan IgG (İmmünoglobulin G) saflaştırılması çalışıldı. M-poli(GMA) eş boyutlu mikropartiküller, Fe₃O₄ nanopartikül varlığında dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. FT-IR, ¹H NMR, SEM, ESR, VSM analizleri m-poli(GMA)'nın karakterizasyonu için kullanıldı.

Manyetik eş boyutlu poli(GMA) mikropartiküllerdeki epoksi halkaları alkali koşullarda açılarak Con A hidroksil uzantılarından mikropartiküle kovalent olarak bağlandı. Maksimum Con A immobilizasyon değeri pH 7.4 (0,1 M fosfat tamponu)'de 4 °C'de 12.5 mg g⁻¹ olarak bulundu. M-poly(GMA)-Con A mikrokürelere kesikli ve MSFB sistemde maksimum IgG adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 35.5 ve 37.7 mg g⁻¹, olarak saptandı. Her iki sistemde de maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi pH 6.0'da (0.1 M fosfat tamponu) saptandı. MSFB sistemde, akış hızı ve manyetik alan çalışmaları da yapıldı. Adsorpsiyon kapasitesi, akış hızı 1.0'den 4.0 mL dak⁻¹ ya yükseldikçe 37.7'den 10.9 mg g⁻¹ değerine düşmektedir. Manyetik alan artırıldığında ise, artan manyetik alan neticesinde adsorplanan IgG değeri 37.7'den 18.0 mg g⁻¹ değerine düşmüştür. Her iki sistemde polimerik mikropartiküle adsorplanan IgG'nin desorpsiyonu için etilen glikol + glukoz kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı partikül kullanılarak yapılan on tekrarlı adsorpsiyon- desorpsiyon döngüsü sonucunda partikülün adsorpsiyon veriminde anlamlı değişme olmadığı görüldü.

M-poli(GMA)-Con A kullanılarak insan serumundan yapılan IgG adsorpsiyon çalışmaları sonucu gram partikül başına maksimum adsorpsiyon 48 mg g⁻¹ olarak

bulundu. 2.0 M NaCl insan serumundan saflaştırma çalışmalarında partiküle adsorplanan IgG'nin desorplanmasında desorplayıcı ajan olarak kullanıldı. Saflaştırılan IgG'nin saflık kontrolü ise SDS-PAGE yöntemi ile yapıldı. Kan çalışmaları ve desorpsiyon çalışmaları sonucunda ölçümlerin hepsi ELISA yöntemi kullanılarak yapıldı. Adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları süresince IgG molekülünün yapısında değişme olup olmadığı spektrofotometrik çalışmalar ile araştırıldı.

Çalışmaların son kısmını oluşturan SPR (Yüzey Plazmon Rezonans) çalışmaları ise Con A ve IgG arasındaki etkileşimin kinetik açıdan incelendiği aşamadır. Bu amaç doğrultusunda SPR çipe immobilize edilen Con A ile önce plazmon açısı saptandıktan sonra kinetik çalışmalar yapıldı. Kinetik ve bağlanma sabitlerinin bulunabilmesi için kinetik veriye üç farklı izoterm (Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich) uygulandı. Sonuçlardan en uygun grafiğin Langmuir olduğu anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: m-poli(GMA), ConA immobilizasyon, dispersiyon polimerizasyon, lektin afinite kromatografisi, IgG saflaştırma.

SUMMARY

LECTIN AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR ANTIBODY PURIFICATION

Birnur AKKAYA

Ph. Dr. Thesis, Biochemistry Division

Supervisors: Prof. Dr. Ferda CANDAN- Prof. Dr. Adil DENİZLİ

2009, 109 pages

In this study, purification of human immunoglobulin-G (IgG) from aqueous solutions and human serum were studied by using Con A immobilized m-poly-glycidyl methacrylate (GMA) monosize microbeads. M-poly(GMA) monosizes microbeads were prepared by dispersion polymerization in the presence of Fe₃O₄ nanopowder. FT-IR, ¹H NMR, SEM, ESR, VSM were used for characterization of the m-poly(GMA) microbeads.

The epoxy ring of m-poly(GMA) microbeads were opened in alkali conditions. Con A was immobilized by covalent binding onto epoxy ring opened m-poly(GMA) beads via hydroxyl groups. Maximum Con A immobilization value was 12.5 mg g⁻¹ at pH 7.4 (0,1 M phosphate buffer), at 4 °C. The maximum IgG adsorption capacity on m-poly(GMA)-Con A beads in batch system and MSFB system were 35.5 and 37.7 mg g⁻¹, respectively. Maximum adsorption of IgG was observed at pH 6.0 (0.1 M phosphate buffer). In MSFB system, flow rate and magnetic field effect was also studied. The adsorption capacity decreased drastically from 37.7 to 10.9 mg g⁻¹ with the increase of the flow rate from 1.0 to 4.0 mL min⁻¹. When magnetic field was increased, adsorbed IgG was decreased from 37.7 to 18.0 mg g⁻¹. In both system, desorption of adsorbed IgG on polymeric microbeads and reusability of microbeads were investigated by using ethylene glycole + glucose as desorption agent.

The maximum IgG adsorption capacity on m-poly(GMA)-Con A beads from human serum was found 48 mg g⁻¹. 2.0 M NaCl was used for desorption of adsorbed

IgG on m-poly(GMA)-Con A microbeads from human serum. The purity of IgG was investigated by SDS-PAGE. All the measurements were performed by using ELISA techniques. Spectrofluorimetric studies were done for investigating structural change of IgG at the course of adsorption and desorption studies.

Last part of this study include of SPR (Surface Plasmon Resonance) kinetic studies between Con A and IgG molecules. For this aim, Con A was immobilized on SPR chip followed by detecting of plasmon angle and finally kinetic studies were done. In order to determine the kinetic and binding constant three different isotherms, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich, were applied to kinetic data. As seen from the results Langmuir isotherm has high correlation constant.

Key Words: m-poly(GMA), Con A immobilization, dispersion polymerization, lectin affinity chromatography, IgG purification.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezin her aşamasında büyük ilgi ve anlayış göstererek beni destekleyen ve yol gösterici niteliği ile her zaman bana ışık tutan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferda CANDAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarım süresince madden ve manen çok değerleri katkılarını, desteğini benden esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını bana sunan, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi aynı zamanda tez danışmanım Saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün deneysel çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma ve ELISA ölçümlerinde bana yardımcı olan Cumhuriyet Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ömer Poyraz'a ve yine bana laboratuvarını açan Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yusuf TUTAR'a çok teşekkür ederim.

Madden ve manen beni destekleyip, her an yanımda bulunan sevgideğer eşim Recep AKKAYA'ya ve canım oğlum Ali Efe AKKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Biyoafinite Kromatografisi	4
2.2 Lektin Afinite Kromatografisi	7
2.2.1 Lektinler	8
2.2.2 Lektin Seçimi	10
2.2.3 Matrikse Bağlanma	12
2.2.4 Glikoproteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Lektin	
Afinite Kromatografisindeki Kısıtlamalar	13
2.3 İmmünoglobulinler	13
2.3.1 İmmünoglobulinlerin Özellikleri	16
2.3.1.1 İmmünoglobulin G	16
2.3.1.2 İmmünoglobulin M	17
2.3.1.3 İmmünoglobulin A	17
2.3.1.4 İmmünoglobulin D	17
2.3.1.4 İmmünoglobulin E	18
2.4 Polimerizasyon Yöntemleri	18
2.4.1 Yığın Polimerizasyonu	18
2.4.2 Çözelti Polimerizasyonu	18
2.4.3 Emülsiyon Polimerizasyonu	19
2.4.4 Süspansiyon Polimerizasyonu	19
2.4.5 Çöktürme Polimerizasyonu	19
2.4.6 Disperisyon Polimerizasyonu	20
2.5 Manyetik Partiküller	21
2.5.1 Manyetik Ayırma Teknikleri	21
2.6 Protein Nicel Analizi	23
2.6.1 İmmünolojik Yöntemler	23
2.6.2 ELISA	24
2.7 Yüzey Plazmon Rezonans İmmüanalizi	25
2.7.1 İmmüanaliz	25
2.7.2 Yüzey Plazmon Rezonans	26
2.7.3 Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörleri	27
2.7.4 Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi	28
3 MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Materyal	30
3.2 Kullanılan Cihazlar	30
3.3 Manyetik poli(GMA) Mikropartiküllerin Sentezlenmesi	31
3.4 Manyetik poli(GMA) Mikropartiküllerin Karakterizasyonu	32
3.4.1 Yüzey Alanı Ölçümü	32
3.4.2 Şişme Testi	32

3.4.3	Yüzey Morfolojisi	32
3.4.4	Epoksi Grup Analizi	32
3.4.5	¹ H NMR Analizi	32
3.4.6	FTIR Analizi	33
3.4.7	Manyetik Özellikler	33
3.5	Konkanavalin A ile ilgili Çalışmalar	33
3.5.1	Konkanavalin A Optimizasyonu	33
3.5.2	Konkanavalin A İmmobilizasyonu	34
3.5.3	Konkanavalin A İmmobilizasyonu için Adsorpsiyon İzotermi	35
3.6	Kesikli Sistemde İnsan IgG Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	37
3.6.1	pH Taraması	37
3.6.2	Başlangıç Derişim Taraması	37
3.6.3	Zaman Etkisi	37
3.6.4	İyonik Şiddet Etkisi	38
3.6.5	Sıcaklık Taraması	38
3.6.6	Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	38
3.7	Sürekli Sistemde İnsan IgG Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	38
3.7.2	Akış Hızı Etkisi	38
3.7.2	pH Taraması	39
3.7.3	Başlangıç Derişim Taraması	39
3.7.4	Zaman Etkisi	40
3.7.5	İyonik Şiddet Etkisi.	40
3.7.6	Manyetik Alan Etkisi	40
3.7.7	Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	40
3.8	İnsan Serumundan IgG Adsorpsiyonu	40
3.9	İnsan Serumundan IgG Desorpsiyon ve Partikülün Tekrar Kullanılabilirliği	41
3.10	Saklama Kararlılığı	42
3.11	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS/PAGE)	42
3.11.1	Elektrofrezin Hazırlanması	42
3.12	Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Yüzey Modifikasyonu	43
3.12.1	Altın Yüzeyin Aktivasyonu	43
3.12.2	Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri	44
3.12.3	SPR Çiplerle Kinetik Analizler	44
3.12.3.	Denge İzoterm Modelleri	47
3.13	Spektroflorimetrik Ölçüm	47
4	BULGULAR	48
4.1	M-poli (GMA) eşboyutlu mikrokürelerin Karakterizasyonu	48
4.1.1	Yüzey Alanı	48
4.1.2	Şişme Testi	48
4.1.3	Yüzey Morfolojisi	48
4.1.4	Epoksi Grup Analizi	49
4.1.5	¹ H NMR Analizi	49
4.1.6	FTIR Analizi.	49
4.1.7	Manyetik Özellikler	50
4.2	Konkanavalin A Optimizasyonu	52
4.2.1	Ligand Derişiminin Etkisi	52
4.2.2	pH Etkisi	52
4.2.3	Sıcaklık Etkisi	53
4.2.4	İyonik Şiddet Etkisi	53

4.2.5 Adsorpsiyon İzotermi.	54
4.3 Kesikli Sistemde Adsorpsiyon/Desorpsiyon Çalışmaları	56
4.3.1 pH Etkisi	56
4.3.2 IgG Başlangıç Derişiminin Etkisi	57
4.3.3 Adsorpsiyon Kapasitesine Zamanın Etkisi	58
4.3.4 İyonik Şiddet Etkisi	58
4.3.5 Sıcaklık Etkisi	59
4.3.6 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	60
4.4 MSFB Sisteminde Adsorpsiyon/Desorpsiyon Çalışmaları	60
4.4.1 Akış Hızı	60
4.4.2 pH Etkisi	61
4.4.3 IgG Başlangıç Derişiminin Etkisi	62
4.4.4 Zamanın Etkisi	62
4.4.5 İyonik Şiddet Etkisi	63
4.4.6 Manyetik Alan Etkisi	64
4.4.7 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	64
4.5 Kesikli ve MSFB Sistemlerinde İzoterm Modelleri	65
4.6 İnsan Kan Serumundan IgG Adsorpsiyon/Desorpsiyon Çalışmaları	66
4.6.1 Adsorpsiyon Çalışmaları	66
4.6.2 Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	67
4.6.3 Saklama Kararlılığı	68
4.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE)	68
4.8 Spektroflorimetre	69
5 SPR KİNETİK ÇALIŞMALAR	70
5.1 SPR Çip Yüzey Karakterizasyonu	70
5.2 SPR Çip Plazmon Ölçümleri	71
5.3 SPR Kinetik Çalışmalar	72
6 SONUÇLARIN LİTERATÜRLE KARŞILAŞTIRILMASI	84
7 TARTIŞMA VE SONUÇLAR	85
8 KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	107
EKLER	
EK-1 Standart Eğriler	108
EK-2 ELISA 4LP Standart Eğri	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyoafinite kromatografisinin alt başlıkları	5
Şekil 2.2 Kan Proteinleri	13
Şekil 2.3 İmmüoglobulinin A) üç boyutlu B) şematik yapısı	14
Şekil 2.4 ELISA Çalışma Prensibi	25
Şekil 3.1 M-poli(GMA) mikropartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan polimerizasyon sistemi	31
Şekil 3.2 Konkanavalin A immobilizasyonu kimyasal tepkimesi m-poli(GMA)'ya Con A'nın bağlanması	34
Şekil 3.3 Sürekli Sistem (MSFB)	39
Şekil 4.1 Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartikülün SEM analizi	48
Şekil 4.2 Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin ¹ H-NMR analizi	49
Şekil 4.3 Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin FTIR analizi	50
Şekil 4.4 Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin ESRspektrumu	51
Şekil 4.5 Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin manyetik davranışı	51
Şekil 4.6 Con A'nın m-poli(GMA) eş boyutlu mikropartiküllere adsorpsiyon İzotermi	52
Şekil 4.7 Con A adsorpsiyonuna pH etkisi	52
Şekil 4.8 Con A adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	53
Şekil 4.9 Con A adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi	53
Şekil 4.10 Manyetik poli(GMA) ve epoksi halkası açılmış manyetik poli(GMA) mikrokürelerin a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermi	54
Şekil 4.11 Dubinin-Radushkevich adsorpsiyon izotermi	55
Şekil 4.12 IgG adsorpsiyonuna pH etkisi	57
Şekil 4.13 IgG adsorpsiyonuna başlangıç derişim etkisi	57
Şekil 4.14 IgG adsorpsiyonuna zaman etkisi	58
Şekil 4.15 M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin IgG adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi	59
Şekil 4.16 M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi	59
Şekil 4.17 M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin tekrar kullanılabilirliği	60
Şekil 4.18 MSFB sisteminde IgG adsorpsiyonuna akış hızı etkisi	61
Şekil 4.19 Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere IgG adsorpsiyonuna pH etkisi	61
Şekil 4.20 Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere IgG adsorpsiyonuna başlangıç derişim etkisi	62
Şekil 4.21 Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere zaman etkisi	63
Şekil 4.22 Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere İyonik şiddet etkisi	63
Şekil 4.23 Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere manyetik alan etkisi	64
Şekil 4.24 MSFB sisteminde m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerinin tekrar kullanım sayısı	65
Şekil 4.25 Langmuir İzotermi	65
Şekil 4.26 Freundlich İzotermi	66
Şekil 4.27 m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerin kanda tekrar kullanılabilirliği	67

Şekil 4.28 Saklama kararlılığı	68
Şekil 4.29 SDS-PAGE	68
Şekil 4.30 Floresans emisyon spektrumu	69
Şekil 5.1 Elipsometri Grafikleri	70
Şekil 5.2 Plazmon Ölçümleri	71
Şekil 5.3 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.1 mg mL ⁻¹	72
Şekil 5.4 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.2 mg mL ⁻¹ .	73
Şekil 5.5 Kinetik Analizler. A) Reflektivite B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.4 mg mL ⁻¹	74
Şekil 5.6 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.8 mg mL ⁻¹	75
Şekil 5.7 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 1.0 mg mL ⁻¹	76
Şekil 5.8 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 1.5 mg mL ⁻¹	77
Şekil 5.9 Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri (Hepsi Birlikte)	78
Şekil 5.10 Derişim-Reflektivite kayması arasındaki ilişki	79
Şekil 5.11 Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi	80
Şekil 5.12 Adsorpsiyon modelleri	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Biyoafinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler	4
Çizelge 2.2 Glikan spesifik afinite kromatografi tekniklerinin kıyaslanması	8
Çizelge 2.3 Bazı ticari lektinlerin biyokimyasal karakteristikleri ve Özgüllükleri	9
Çizelge 4.1 Konkanavalin A için Langmuir, Freundlich ve Dubinin- Radushkevich Sabitleri	56
Çizelge 4.2 Langmuir ve Freundlich sabitleri	66
Çizelge 4.3 İnsan Kan Serumundan IgG Adsorpsiyonu	67
Çizelge 5.1 Kinetik hız sabitleri	81
Çizelge 5.2 Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	83
Çizelge 6.1 Sonuçların Literatürle Karşılaştırılması	84

KISALTMALAR DİZİNİ

Con A	Concanavalin A
ELISA	Enzim Bağlı İmmüanaliz
IgG	İmmüoglobulin G
Ig	İmmüoglobulin
GMA	Glisidil Metakrilat
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
¹ H NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
ESR	Elektron Spin Rezonans
VSM	Titreşimli Örnek Magnetometresi
AAS	Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
MSFB	Manyetik olarak kararlaştırılmış akışkan yataklı sistem
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
AK	Afinite Kromatografisi
IgA	İmmüoglobulin A
IgD	İmmüoglobulin D
IgE	İmmüoglobulin E
IgM	İmmüoglobulin M
BSA	Bovin Serum Albümin
TMB	Tetrametil Benzidin
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilendiamin
BME	Betamerkaptoetanol
BFB	Bromofenol Mavisi
CBB	Commassi Brilliant Mavisi
PBS	Fosfat Buffer Salın
EMU	Elektromanyetik unite
PDI	Heterojenlik indisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Adsorpsiyon ve kromatografik ayırma işlemleri biyolojik, analitik ve çevresel uygulamalarda önemli rol oynamaktadır. Özellikle biyomoleküllerin ayrılması için adsorpsiyon tekniklerinin geliştirilmesinin, son otuz yılda biyoteknoloji endüstrisinin gelişiminde önemli bir yeri vardır (Liapis,1989; Narayanan, 1994; Hirabayashi ve Kasai, 2006). Ancak bu alandaki önemli ilerlemelere rağmen, özellikle nükleik asit ve virüs gibi büyük mol kütleli biyomoleküllerin üretildikleri ortamdaki ayrılmaları halen önemli bir araştırma konusudur.

Protein saflaştırmada kullanılan yüksek yüzey alanlı biyoafinite adsorbentlerin, hızlı bağlanma kinetiğiyle yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Ma ve ark., 2005 (a, b); Ma ve Ark., 2006; Tuncel ve ark., 1993). Dolayısıyla, yüzey alanını artırmak için ya oldukça gözenekli partiküller ya da gözeneksiz eş boyutlu partiküller kullanılmaktadır. Bundan dolayı biyomoleküllerin ayrılmasında eş boyutlu mikropartiküller tercih edilir ve bu partiküllerin önemli bir avantajı olan partikül içi difüzyon direncinin olmaması proteinlerin analizlerini hızlı yapmaktadır (Takafuji ve ark., 2004). Eş boyutlu mikropartiküller biyoteknoloji, kolloid bilimi ve tıpta sıklıkla kullanılır (Kouassi ve ark., 2005; Safarik ve Safarikova, 1999; Safarik ve Safarikova, 2004; Saiyed ve ark., 2003; Yavuz ve ark., 2004). Gözenekli adsorbentlere dayanan geleneksel uygun polimerlerin yüzey alanı $200-500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ veya daha büyüktür. Bununla birlikte bu tip adsorbentlerin önemli dezavantajları da vardır. Bunlardan birisi adsorbsiyon hızının, gözenek direncinden dolayı çok düşük olmasıdır. Diğer bir dezavantajı ise gözeneklerden dolayı adsorbentlerin sahip olduğu yüksek aktif yüzey alanının, çözünen büyük moleküllere uygun olmamasıdır. Diğer bir deyişle, büyük moleküller bu gözeneklere nüfuz edemez ve büyük moleküller için düşük adsorbsiyon kapasitesi anlamına gelen yüzey alanını kullanamaz. Protein yükleme kapasitesini artırmak için, partikül boyutu $0.1-1.0 \text{ }\mu\text{m}$ 'ye düşürülür, fakat bu tür partiküller yüksek basınçlı ekipmanlar gerektirir. Bu sebepten dolayı, mikron boyutlu gözeneksiz afinite sorbentler 1980'lerin ortasından beri HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) için oldukça dikkat çekmiştir. Sonuç olarak eş boyutlu manyetik poli(GMA) mikropartiküller proteinlerin saflaştırılmasında kullanılabilir.

Manyetik ayırma, biyoayırma alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş oldukça yeni bir tekniktir. Bu tekniğin prensibi bir ligand yardımıyla hedef moleküle bağlanan manyetik partikülün yığın çözeltiden manyetik alan gradyenti uygulanarak ayrılmasıdır. Manyetik karakter bir manyete cevap vermesini sağlar ve örnekle etkileşimini

kolaylaştırır fakat manyetik alan uzaklaştırıldığında manyetizasyon kaybolur. Manyetik taşıyıcılar akışkan yatak ve sabit yatağın en iyi özelliklerini birleştirir (Bohm ve Pitterman, 2000). Yöntem, enzim immobilizasyonu, hücre ayrılması, protein adsorpsiyonu ve saflaştırılması, nükleik asit ayrılması ve ilaç salımı gibi alanlarda uygulamalara sahiptir. Geleneksel ayırma ile karşılaştırıldığında, hız, kesinlik ve basitlik önemli avantajlarından (Odabaşı ve ark., 2004).

Monoklonal antikolar (immünoglobulinler), biyoteknolojide oldukça önemli rol oynamaktadırlar (Duffy ve ark., 1989). Çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç ve tanı ajanı olarak kullanılmalarının yanı sıra diğer birçok farmasötik öneme sahip proteinlerin saflaştırılması için afinite ligandı olarak da kullanılmaktadırlar. Çok sayıda farklı antijen bağlama özgülüğüne sahip potansiyel permutasyonlar arasından belirli antikoların seçilmesi ve üretilmesi için son zamanlarda geliştirilen in-vitro yöntemlerin de pratik uygulamaların artışında önemli payı vardır (Mislovicova ve ark., 1995; Saleemuddin ve Husain, 1991; Turkova, 1999).

Lektin biyoafinite kromatografisi glikoprotein saflaştırılmasında oldukça çok kullanılmaktadır. Etkileşim bir glikoprotein olan İmmünoglobulin G'deki (IgG) karbohidrat uzantıları ile Konkanavalin A (Con A) molekülündeki şeker bağlayan gruplar arasında gerçekleşir (Mislovicova ve ark., 1995). Karbohidratlarla lektinler arasında oluşan bağlar kovalent özellikte olmayıp, zayıf nitelikli hidrojen köprüsü bağlarıdır (Lis, H., Sharon, N., 1977 ; Rini, J.M., 1995; Rüdiger, H. 1997).

Lektin afinite kromatografisinin en önemli avantajı ılımlı (pH: 7.0) koşullarda protein saflaştırmasına izin vermesidir. Dolayısıyla glikoproteinlerin ve glikokonjugatların fraksiyonlanmasında, immobilizasyonunda veya izolasyonunda kullanılmaktadır (Roque ve ark., 2007).

Bu çalışmanın amacı, poli-glisidil metakrilat (GMA) bazlı eş boyutlu (1 µm) manyetik partiküllerin dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanması ve hazırlanan bu partiküllerin Konkanavalin A takılarak insan kanından IgG saflaştırılmasında kullanılmasıdır.

Elde edilen eş boyutlu mikropartiküllerin karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), yüzey alanı ölçümleri, Elektron Spin Rezonans (ESR) ve Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM) kullanılmıştır.

Elde edilen bu eş boyutlu mikropartiküller gerek Konkanavalin A bağlanmasında gerekse IgG adsorpsiyonunda UV-VIS spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. İnsan

serumundan saflaştırılan IgG miktarı ise Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi (ELISA) yöntemiyle saptanmıştır. İnsan kanı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden sağlanmış olup, ELISA deneyleri Cumhuriyet Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında ELISA kiti kullanılarak yapılmıştır. Adsorbentin IgG'ye olan ilgisi pH, başlangıç derişimi, sıcaklık, akış hızı, manyetik alan ve zamana bağlı değişimler ile incelenmiş, adsorbent özelliğinin tekrarlanabilirliği ise aynı partikül desorplanıp tekrar adsorpsiyonda kullanılarak denetlenmiştir. Ayrıca desorpsiyon yüzdesine de bakılmış olup, Konkanavalin A ile IgG arasındaki etkileşim daha ayrıntılı incelemek için Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) deneyleri de yapılmıştır. SPR deneylerinin tüm aşamaları Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Prof. Dr. Adil DENİZLİ'nin araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoafinite Kromatografisi

Biyoafinite kromatografisi, biyolojik olarak aktif maddelerin tamamlayıcı bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir.

Proteinler büyüklük ve şekil, toplam yük, yüzeyde bulunan hidrofobik gruplar, kullanılan durağan faz ile bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklere sahip olduklarından, bu karakteristik özelliklerden biri temel alınarak gerçekleştirilen kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. İyon değişim kromatografisi protein yüküne dayanır. Jel geçirgenlik kromatografisi veya moleküler elek kromatografisi adı ile de bilinen ancak genelde jel filtrasyonu terimi kullanılan kromatografi tekniğinde ise proteinleri ayırmak için proteinlerin şekil ve boyutları önemlidir. Hidrofobik uzantılar gibi protein yüzey özellikleri, hidrofobik etkileşim kromatografisinin temelini oluşturur. Afinitite kromatografik ayırma da proteinlerin yüzey özelliklerine bağlıdır. Afinitite kromatografisi bir biyolojik ligand ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas alan güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir. Afinitite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler Çizelge 2.1’ de verilmiştir (Janson ve Ryden, 1997).

Çizelge 2.1. Biyoafinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler (Janson ve Ryden, 1997).

Ligand	Ligandla Etkileşen Protein
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik aside bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon, Vitamin	Reseptör, Taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlı proteinler

Afinitenin geniş alanda değişik uygulamaları nedeniyle alt afinite teknikleri ortaya çıkmış ve bazıları kendilerine özel isimler almışlardır. Şekil 2.1’de bu tekniklerden bazıları verilmiştir.



Şekil 2.1. Biyoafinite Kromatografisinin alt başlıkları (Janson ve Ryden, 1997).

Biyoafinite kromatografisinde ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan biyomolekül ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık değişimi veya üre, guanidin gibi ayrıştırıcı ajanlar ile) veya ligandın çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi genel

moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliği ve etkinliğini oluşturan en temel etmendir.

Saf glikoproteinlere yapısal ve fonksiyonel çalışmalarda ihtiyaç vardır. Glikoproteinlerin yapısal heterojenliği, çalışmalarda gerekli olan kısımdır. Heterojen karışımlarda her bileşenin farklı özellik göstermesi, yapı aktivite ilişkisi fonksiyonunun doğru hesaplanmasını zorlaştırır (Farach-Carson and Carson, 1989). Sonuçta, glikoproteinlerin homojen şekilde saflaştırılması çalışmalarda çok önem taşımaktadır.

Biyoafinite Kromatografisi tekniklerinden olan ve aynı zamanda glikoproteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bir çok teknik vardır. Glikoprotein saflaştırılmasında kullanılan yöntemler iki ana başlıkta toplanabilir: çöktürme ve kromatografik yöntemler. Antikorların etanol çöktürmesi ile fraksiyonlanması yıllardan beri yapılmaktadır. Plazma fraksiyonlanmasında çöktürme hala seçilen bir yöntemdir. Cohn fraksiyonlanmasında, immünoglobulinler II + III fraksiyonunda (%25 etanol, pH: 6.8, T: -5 °C) çöktürülürler (Curling, 1980). Cohn tarafından geliştirilen soğuk etanol fraksiyonlanması yöntemi üç protein fraksiyonu elde etmede kullanılır (Josic ve Lım, 2001). Albümin ek saflaştırma basamağına gerek olmayan fraksiyona sahiptir. Fakat diğer fraksiyonlardaki proteinler ek saflaştırma prosedürleriyle izole edilmelidir.

Amonyum sülfat gibi tuz ile veya polietilen glikol gibi organik çözücü ile çöktürme de çöktürme metodları arasında yer alıyor. Kromatografik yöntemler ise afinite ve afinite olmayan olmak üzere ikiye ayrılır. Antikor uygulamasına bağlı olarak saflık ve tekrar kazanım saflaştırmanın stratejisini belirler (Josic ve Lım, 2001).

Afinite olmayan kromatografik yöntemler: büyüklük, yük, hidrofobiklik farkına ve hidroksiapatit gibi özgül ortamlarla etkileşime dayanır.

İmmünoglobulinlerin afinite teknikleriyle saflaştırılması yapılarından dolayı iki avantaja sahiptir. Bunlardan birisi antijen bağlayan özgül bölgeye sahip olması diğeri ise yapısındaki Fc sabit bölgeye sahip olmasıdır. Bu sabit bölgeyle etkileşen bir çok ligand vardır. Afinite kromatografisi ile saflaştırma yöntemleri: Antijen kullanılarak antikor saflaştırılması, anti-antikor kullanılarak antikor saflaştırılması, bakteriyel Fc reseptörleri, protein A mimetik ligand, histidin ligand afinite kromatografisi, metal afinite kromatografisi, tiyofilik etkileşim, sentetik ligandlarla afinite kromatografisi, boronat afinite kromatografisi, korumalı boronat afinite kromatografisi, lektin afinite kromatografisi olarak sıralanabilir. Bu çalışmada bu tekniklerden birisi olan lektin afinite kromatografisi kullanılmıştır.

2.2. Lektin Afinite Kromatografisi

Geleneksel saflaştırma yöntemleri kullanılarak tam olarak çözümlenemeyen problemlerden birisi, normal gelişim sürecinde veya patolojik durumlarda hücrel adaptasyon ve sinyal iletiminde çok önemli rolleri olan hücre yüzey glikokonjugatların yeterli miktarlarda elde edilememesidir. Lektin afinite kromatografisinin geliştirilmesi sadece yeterli miktarda hücre yüzey glikokonjugatın saflaştırılmasına olanak sağlamakla kalmamış, aynı zamanda geleneksel yöntemlerin çok ötesinde glikoprotein karışımlarının (şekerlerinde mikroheterojenlik gösteren) tek bir bileşen seviyesine kadar fraksiyonlanıp çözümlenmesine olanak sağlamıştır.

İmmüoglobulinler glikoprotein sınıfındadır ve immobilize lektin afinitesine dayanan afinite kromatografisi ile saflaştırılabilirler (Robertson ve Kennedy, 1996). Köpek serumundaki immüoglobulin G, A, M, ve E'nin Konkanavalin A'ya bağlanması örnek olarak verilebilir (Peng ve ark, 1993). IgE ve IgM'in hepsi IgG'nin 60%'ı ve IgA'nın 58%'i Konkanavalin A-sefaroza bağlanır. Farklı tamponlarla bir dizi süzüntü ile antikor saflaştırılması gerçekleştirilmiş olur. IgE mannoz, metilglukoz ve metilmannozid ile süzülebilir. IgG glukoz, mannoz, metilglukoz ve metilmannozid ile elue edilir. IgA ve IgM sadece metilmannozid ile süzülür.

Prensip olarak lektin afinite kromatografisi diğer afinite kromatografisi türlerine benzemektedir. Heterojen glikoprotein karışımı belirli bir lektinin immobilize olduğu matriks üzerinden geçirilir. Spesifik şeker dizisine sahip olan glikoprotein matrikse adsorplanırken diğer glikoproteinler tamponla yıkanarak uzaklaştırılır ve çıkış akımı olarak toplanır. Yıkama işlemine, kolonda protein kalmayana kadar ilgili dalgaboyunda spektroskopik olarak izlenerek devam edilir. Adsorbe olan glikoprotein komplementer yapıda bir şeker kullanılarak kolonda süzülür. Elde edilen proteinin saflığı jel elektroforezi gibi yöntemlerle kontrol edilir (Satish ve Surolia, 2001).

Konkanavalin A, mercimek lektin, buğday lektini ve hint bezelye lektin kromatografik desteğe immobilize edilebilirler, böylece lektin afinite kromatografisi oluşur. Lektin Afinite Kromatografisi (LAC), glikoprotein, glikolipid ve polisakkaritlerin saflaştırılmasında ve karakterizasyonunda kullanılan bir tekniktir (Lis ve Sharon, 1986). LAC ile başarılı ayırma sağlanması şu şartlara bağlıdır: öncelikle ilgili glikoprotein için ligand olarak seçilen lektinin özgülüğü yüksek olmalıdır. Ayrıca immobilize glikoprotein miktarı ve çalışma koşulları (pH ve iyonik şiddet gibi)

önemlidir (Farach-Carson ve Carson 1989; Robertson ve Kenedy, 1996; Cummings, 1997).

Glikoproteinlerin saflaştırılmasında seri halde birkaç lektinin kullanılması durumunda teknik seri lektin afinite kromatografisi olarak adlandırılır (Cumming ve Kornfeld, 1982b). Bu yaklaşım daha yüksek etkinlikle ayırma sağlar ve N- ve O-glikanların her ikisi için de kullanılır (Cummings, 1997). Çizelge 2.2’de glikan özgül afinite kromatografisi tekniklerinin kıyaslanması verilmiştir.

Çizelge 2.2. Glikan özgül afinite kromatografi tekniklerinin kıyaslanması (West ve Goldring, 1994).

	İmmünoafinite Kromatografisi	Lektin Afinite Kromatografisi	Sentetik Ligand Afinite Kroma.	Örtülü Afinite Kroma.
Özgüllük	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
Kapasite	Orta	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek/orta
Maliyet	Yüksek	Orta	Düşük	Düşük
Teknik Zorluklar	Yüksek/orta	Orta	Yüksek	Düşük/orta

2.2.1. Lektinler

Lektinler, karbohidrat ya da karbohidrat grubuna karşı seçici afinitesi olan proteinlerdir (West ve Goldring, 1994). Lektin kelimesi Latince’den alınmış olup “seçmek” anlamına gelmektedir. Lektinler bitki ve hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Cumming, 1997). Farklı karbohidratlara özgüllüğü olan, çok sayıda elde edilebilir lektin olması, bu proteinlerin medikal ve biyolojik alanda kullanımını artırır.

Konkanavalin A , α -D-glukopiranosil veya α -D-mannopiranosil içeren bileşenlere karşı spesifiktir (Becker ve ark., 1976). Bazı durumlarda lektinler tek karbohidrata karşı özgüllük göstermezler ve farklı glikoproteinle etkileşebilirler. Konkanavalin A’nın özgüllüğü onun serum glikoproteinleri, lizozomal hidrolazlar ve polisakkaritlerle etkileşimini sağlar (Becker ve ark., 1976; West ve Goldring, 1994). İmmobilize lektinin miktarı ve kalitesi arasındaki fark glikoproteinlerin bağlanmasını etkileyebilir (Robertson ve Kennedy, 1996).

Lektinler çoğunlukla tetramer olan bir veya daha fazla alt birimden oluşmuştur. Eğer alt birimler eşdeğerse, lektin tek bir spesifik sakkariti tanıyan çoklu bağlanma bölgesine sahiptir. Ancak fonksiyonel olarak farklı iki alt birim varsa lektin iki farklı sakkarit için mono veya multivalent olarak bağlanma yeteneğine sahip olabilir. Multimerik lektinlerde, bu alt birimlerin farklı oranlarda yer alması, lektinin farklı fonksiyonlar için özelleşmesinde etkili ve önemlidir. En genel birkaç lektin için bazı yapısal krakteristikler Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı ticari lektinlerin biyokimyasal karakteristikleri ve Özgüllükleri (Montrouil ve ark., 1994).

Lektin (kısaltma)	Mol Kütle	Alt Birim	Basit Şeker	Gerekli Metal İyonu
Konkanavalin A (Con A)	55000	2 4	α -D-Man> α -D-Glc> α -DGlcNac	Ca ²⁺ , Mn ²⁺
Mercimek lektin (LCA)	49 000	2	α -D-Man> α -D-Glc> α -D-GlcNac	
Soyafasülyesi lektin (SBA)	110-120 000	4	α -D-GalNac> β -D-GalNac> α -D-Gal	Ca ²⁺ ,Mn ²⁺
Yerfıstığı agglutininin (PNA)	120 000	4	β -D-Gal-(1-3)-GalNac> D-GalNH ₂ = α -D-Gal	
Buğday tohumu Agglutininin (WGA)	36 000	2	(β -D-GlcNac) ₃ >(β-D-GlcNac) ₂	Ca ²⁺ ,Mn ²⁺ , Zn ²⁺
Jacalin	40 000	4	α -D-Glc	

Diğer birçok kullanımın yanı sıra, lektinler, saldırgan organizmalara karşı savunmada, azot sabitleyici bakteri ve bitki kökleri arasında simbiyotik birleşme, virüslerin konakçı hücreyi tanımlarında (Suguna ve ark., 1999), hücresel yapışmada (Moore ve ark., 1991), hücresel tanımda (McEver ve ark., 1995) hücre büyümesi ve farklılaşmasında (Vijayan ve Candra, 1999), hücre yüzeyindeki şeker gruplarının histokimyasal tayininde, elektroforetik olarak ayrılan zar glikokonjugatların işaretlenmesi ve yapısının belirlenmesinde, immüno sit alt birimlerinin ve değişik farklılaşma aşamalarındaki hücrenin ayrılmasında da kullanılmaktadırlar. Biyolojik tanımda önemli bir rol oynayan hücre yüzey karbohidratlarına özgül olarak bağlanabilme yetenekleri nedeniyle, lektinler son zamanlarda hücrelerin ayırt edilmesi- kan gruplarının belirlenmesi gibi, kanser tanısı ve gelişiminin izlenmesi, hücre yüzey

karbohidratlarının yapısının ve dinamiğinin açıklanması, glikokonjugatların saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonu gibi oldukça geniş alanlarda uygulama bulmuştur. Lektinlerin bu kadar çok sayıda ve geniş spektrumda uygulamada yer almalarının nedenleri, doğada dağılımının ve miktarının çok fazla olması ve bunun yanında kolaylıkla yüksek homojenlikte saflaştırılabilmeleri ve karbohidrat bağlama kapasitelerinin genişliğidir. Bu nedenle lektinlerin, biyoloji ve tıp alanlarında çok sayıda uygulamada yer almaları şaşırtıcı değildir (Donaldson ve Shuler, 1999).

Hücre yüzey glikokonjugatları hücreler arası sinyal iletimi gibi olaylarda hücre-ligand ve hücre-hücre etkileşimlerini belirleyen ve kontrol eden yüzey işaretleridir. Bu işlemlerin moleküler mekanizmasının açıklanması yönünde yapılan çalışmalar için öncelikle membran glikokonjugatların yapıları belirlenmelidir. Bu amaç için yeterli miktarda glikokonjugatın saflaştırılması gerekmektedir; bunların geleneksel yöntemlerle saflaştırılmaları oldukça zordur ve içerdikleri mikroheterojenlik nedeniyle oldukça karmaşıktır (Osawa ve Tsuji, 1987) .

Şekerlerin lektinlere olan afinitesinin (10^{-2} - 10^{-6} M) karbohidrat spesifik antikolar (10^{-4} - 10^{-8} M) kadar yüksek olmaması saflaştırma stratejilerinin geliştirilmesinde pratik olarak oldukça önemlidir. Afinitelik ligand olarak karbohidrat özgül antikoların kullanılması durumunda, son basamakta glikokonjugatı adsorbe olduğu matriksten uzaklaştırmak için fizyolojik olmayan kuvvetli koşullar gerekecektir; bu koşullarda saflaştırılan proteinin biyolojik aktivitesi çoğunlukla korunamamaktadır. Bu durumun aksine, lektinler, immobilize edilerek afinitelik ligand olarak kullanıldıklarında ilgilenilen proteinin desorpsiyonu oldukça ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, doğal bulunabilirlikleri ve bollukları nedeniyle de saflaştırılmaları karbohidrat özgül monoklonal antikolar kadar güç değildir.

Tüm bu faktörler göz önüne alındığında lektin afinitelik kromatografisi glikokonjugat türlerinin yeterli miktarlarda saflaştırılabilmeleri için oldukça etkili ve önemli bir yöntemdir.

2.2.2. Lektinin Seçimi

Lektinlerin spesifik karbohidrat gruplarına olan afinitelikleri onları farklı glikoprotein gruplarının saflaştırılması için önemli yapmaktadır. Örneğin; birçok reseptör buğday tohumu agglutinin'e (WGA) bağlanırken sitokinler ve diğer büyüme faktörleri konkanavalin A veya mercimek lektin'e tercihli olarak bağlanmaktadır. Bir

glikoproteini saflaştırmak üzere gerekli olan lektinin seçiminde iki faktör göz önünde bulundurulmalıdır;

a) *Lektinlerin bulunabilirliği*: Lektinlerin saflaştırma işleminde kullanılabilmeleri için glikoproteinlerle özgül olarak bağlanabilecek şekilde katı bir desteğe immobilize edilebilmeleri ve uygun elüsyon şartlarında bu bağlanmanın tersine çevrilebilmesi gereklidir. Saflaştırma işleminin ölçeğine göre gerekli olan lektin miktarı miligramdan gram seviyelerine değişiklik gösterebilir. Bu durum kullanılacak lektin kaynağının seçimini önemli derecede etkiler; genellikle legume bitkilerinin tohumları; bulunabilirliklerinin yüksek olması ve tohumdaki toplam proteinin %3'ünü lektinlerin oluşturması nedeniyle çoğunlukla tercih edilir. Ticari olarak da çok sayıda lektin mevcuttur (Sigma, BDH, Pharmacia-LKB, Pierce, BioInvent gibi). Daha genel lektinler ise doğal kaynaklarından özel afinite yöntemleri ile saflaştırılabilirler. İlgilenilen lektin saf olarak elde edildikten sonra aktive edilmiş katı desteğe immobilize edilebilir.

b) *Lektin kromatografisinde oligosakkarit yapısının önemi*: Glikoproteinler ökaryotik hücrelerce çok sayıda farklı fonksiyonu yerine getirmek üzere sentezlenirler. Lektin kromatografisi sadece doğal ortamlarından değil, rekombinant tekniklerle üretilen glikoproteinlerin saflaştırılmasında da kullanılabilir. Maya veya memeli hücre dizilerince salgılanan bazı proteinler doğal formlarında olmayan oligosakkarit kısımları içerebilirler. Protein, gerek doğal gerekse klonlanmış, oldukça karmaşık olmakla birlikte oligosakkarit yapıları iki gruba ayrılabilir. Her bir grubun karakteristiği lektinin bağlanmasını önemli derecede etkiler ve kromatografi için lektinin seçilmesinde oldukça önemli bir parametredir. şeker kısmı proteine iki temel bağlanma türünden birisi ile bağlıdır;

1)O-glikozilasyon bağlanması, L-serin veya L-treonine kovalent bağlı N-asetilgalaktozamin için baskın olan formdur. Ser/Thr bağlı şeker zincirleri tipik olarak mucinlerde bulunur. Genel lektinlerden galaktoz, şeker özgülüğüne sahip yer fıstığı agglutininin tercihli olarak mucin-tipi zincirlere bağlanır.

2)N-asetilglukozamin ve asparajin arasındaki N-glikozilasyon bağlanması, bu grup oligosakkarit bileşimi ve karmaşıklığı temeline göre yüksek-mannoz-tipi, kompleks-tip ve hibrid tip olmak üzere alt gruplara ayrılabilir. Sık kullanılan lektinlerin çoğu N-bağlı şeker zincirlerine bağlanır. Örneğin castor bean agglutinin, galaktoz bağlayıcı lektin, öncelikle kompleks-tip ve hibrid-tip oligosakkaritlere bağlanır.

Ancak, çoğunlukla, ikinci parametre belirgin değildir. Dolayısıyla, glikoprotein için uygun lektinin bulunabilmesi için bir seri lektinin taranması gerekir. Başlangıç

olarak immobilize mercimek lektin, buğday tohumu agglutinin ve soya fasülyesi agglutinin kullanılarak mevcut oligosakkarit tipi hakkında ipucu elde edilebilir.

2.2.3. Matrikse Bağlanma

Lektinlerin immobilizasyonunda kullanılan bir çok yöntem vardır. En popüler olanı, lektinlerin direkt olarak CNBr aktive edilmiş agarozla bağlanmasıdır. Bununla birlikte immobilize lektinler agaroz, sefaroze 4B, Ultrajel kullanılarak da rahatça hazırlanabilir. Immobilizasyon ve immobilize lektinlerin kullanımı bazı kurallara bağlıdır.

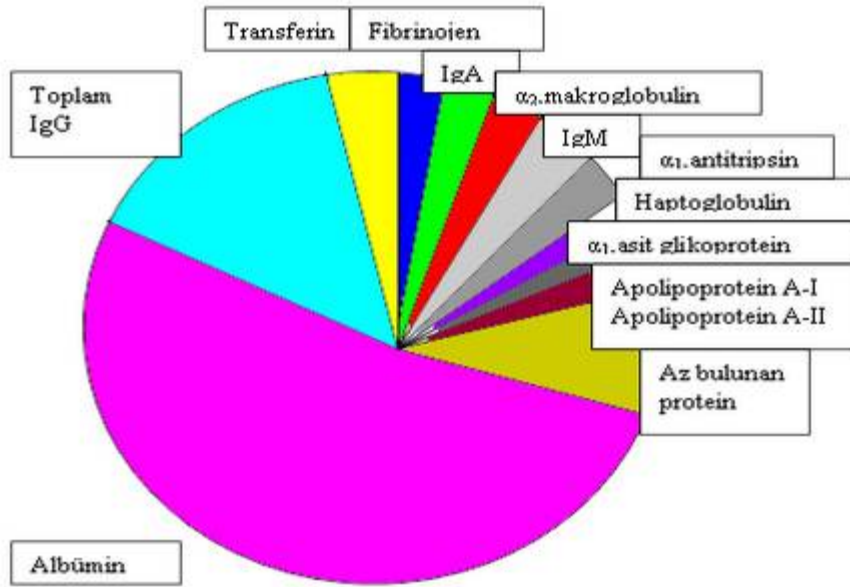
1. Bağlanma tepkimesi süresince, lektin bağlanma bölgesi haptene şeker deneni, lektinin spesifik monosakkariti eklenerek korunmalıdır.
2. Bazı durumlarda, glikoproteinlerin immobilize lektinlere karşı özgül olmayan (hidrofobik veya iyonik) adsorpsiyonları görülmektedir. Bundan kaçınmak için, yeni immobilizasyon matrisi geliştirildi. Örneğin, poliakrilik-hidrazido-agarozla lektinler glüteraldehit ile bağlanabilirler: kararlı, sızmayan, hidrofilik absorbenttir.
3. Immobilize lektinler uzun yıllar aktivite kaybı olmasını önlemek için, 4 °C'de, 0.02% sodyum azid (bakteriyostatik ajan) içeren tamponda saklanmalıdır.
4. Bazı lektinler metal bağlama bölgesine sahiptirler ve ortamdaki metal iyonların varlığı lektinlerin karbohidrat bağlanması için gerekli konformasyonu sağlayacaktır. Mesela, Konkanavalin A tam aktivite göstermesi için Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarına ihtiyacı vardır bu yüzden bu lektin afinite kromatografisinde kullanılacağı zaman tamponda $MnCl_2$ ve $CaCl_2$ (1 mM) olmalıdır.
5. Glikoprotein ile immobilize lektin arasındaki iyonik etkileşim gibi spesifik olmayan etkileşimleri gidermek için tampon belirli iyonik şiddette olmalıdır (0,1-1 M NaCl) (Montreuil ve arkadaşları, 1994).

2.2.4. Glikoproteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Lektin Afinite Kromatografisindeki Kısıtlamalar

Genelde, lektin afinite kromatografisi, lektin reseptörü olarak bilinen, immobilize lektin tarafından tanınan benzer karbohidrat uzantılarına sahip, farklı heterojenlikte glikoproteinlerin zenginleştirilmesinde kullanılır. Farklı lektinler, aynı glikana ait farklı sakkaridik uzantıları tanıdığı için ve bu glikanlar bir çok glikoproteinde ortak olduğu için, farklı lektinler geniş spektrumlu glikoproteinleri tanıyabilirler. Ayrıca, glikoproteinler ile lektinler arasındaki spesifik olmayan etkileşimler bu kromatografinin kullanımını sınırlamaktadır (Montreuil ve ark., 1994).

2.3. İmmüoglobulinler (Antikorlar)

İmmüoglobulinler, antikor aktivitesi gösteren ve kendilerinin oluşmasına neden olan antijenlerle özgül olarak birleşebilme, tepkimelere yol açabilme özelliğinde olan glikoprotein yapısında moleküllerdir. İmmüoglobulinler toplam plazma proteinlerinin % 20'sini oluştururlar. Az miktarda dokularda, hücreler arası sıvılarda bulunurlar. Kan veya plazma pıhtılaşırca serumda yer alırlar. Şekil 2.2'de kan proteinlerinin bulunma oranı pasta dilimi ile verilmiştir.



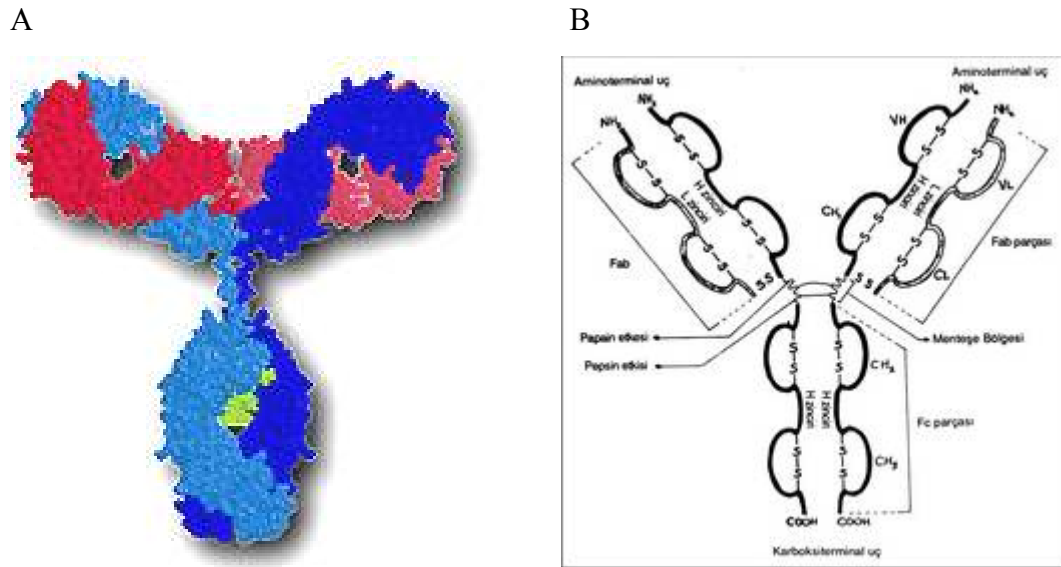
Şekil 2.2. Kan Proteinleri (Radhakrishna ve ark., 2003).

İmmüoglobulinler serum proteinlerinin elektroforezinde, başlıca gamma globulin kısmında yer alırlar. Ayrıca biraz beta globulin, çok az da α-globulin kısmında toplanmalar olur. Bu nedenle antikor aktivitesi gösteren ve proteinlerin globulinler kısmında yer alan ve immünolojik etkinlikleri olan bu maddelere Dünya Sağlık Örgütü'nün de önerisi ile İmmüoglobulinler adı verilmiştir ve Iğ şeklinde sembolize edilmişlerdir.

İmmüoglobulinler (Antikorlar) antijenik uyarım sonucu B-lenfositlerin değişimi ile oluşan plazma hücreleri tarafından sentezlenirler. Antikorlar kimyasal, fiziksel ve immünolojik olarak incelendiklerinde aralarında önemli farklılıklar bulunduğu saptanmıştır. Bu farklılıklar antikor moleküllerinin karbohidrat miktarları, elektroforez

hızları, mol kütleleri, amino asit yapıları, taşıdıkları H (ağır) polipeptit zinciri tipi gibi özelliklere dayanmaktadır. Buna göre de birbirinden farklı beş ayrı özellikte immüoglobulin grubu ayrılmış ve İmmüoglobulin G (IgG), İmmüoglobulin A (IgA), İmmüoglobulin M (IgM), Immüoglobulin D (IgD), İmmüoglobulin E (IgE) olarak adlandırılmışlardır.

İmmüoglobulinler glikoprotein yapısındadırlar ve yaklaşık %90'ı polipeptit, %10'u karbohidrattır. İmmüoglobulinler temelde benzer yapı gösterirler ve bir Ig molekülü "monomer" adı da verilen en az bir temel birimden oluşmuştur. Ig'lerin moleküler yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için, üzerinde en çok çalışılmış, incelenmiş ve monomer bir yapı gösteren IgG molekülünün yapısı örnek olarak anlatılacaktır. Diğer Ig çeşitlerinin farklı özellikleri yeri geldikçe belirtilecektir. Ig yapısı şekil 2.3 incelenerek açıklanabilir.



Şekil 2.3. İmmüoglobulinin A) üç boyutlu(WWW.google.com.tr), B) şematik yapısı. (WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf).

Bir Ig molekülü elektron mikroskopunda incelendiğinde Y harfi şeklinde görülür. Ig'ler globulin yapısında protein olduklarına göre, polipeptid zincirlerinden meydana gelmişlerdir. Monomerden oluşan IgG molekülünde iki çeşit polipeptid zinciri vardır ve her bir çeşitten ikişer adet bulunmaktadır. Bir kişinin kanında bulunan antikorlar bir karışımdır. Çeşitli antijenlerin çeşitli epitoplarına karşı oluşmuşlardır. Ig yapısını incelemek için kimyasal yapısı aynı, özdeş olan Ig'lere gereksinim vardır. Antikor sentezleme ile görevli olan plazma hücreleri tümörleşirse (bu hücrelerin çoğalma

yeteneği olmadığı halde, tümörleşip, kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlarsa) Multiple-Myeloma denen bir hastalık meydana gelir. Myeloma hastalığında tek bir plazma hücresinden gelişen, genetik yapıları aynı plazma hücre kolonileri meydana gelir. Bunların sentezlediği immünoglobulinler de aynı, özdeş kimyasal yapıya sahiptirler. Myeloma hücrelerince sentezlenen homojen yapıdaki bu immünoglobulinlerin araştırılmasıyla Ig yapısı hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

Hafif zincir = L zinciri (L = Light = Hafif) : Mol kütlesi daha az olan kısa zincirlerdir. K (kappa) ve l (lambda) olmak üzere iki tipi vardır. Her iki tip L zinciri de tüm Ig çeşitlerinde bulunabilir. Ancak bir Ig molekülündeki iki kısa zincirin tipi aynıdır ve birbirine özdeştir, biri diğerinden farklı olmaz. Bir antikor molekülünde her iki tip L zinciri beraber bulunmaz.

Ağır zincir = H zinciri (H = Heavy = Ağır) : Mol kütlesi fazla olan, uzun zincirlerdir. Beş Ig çeşidinin de H zincirleri birbirinden farklı yapıdadır. Bunlar sırasıyla şöyle isimlendirilir: IgG g (gamma) H zinciri, IgM μ (mü) H zinciri, IgA a (alfa) H zinciri, IgD d (delta) H zinciri, IgE e (epsilon) H zinciri.

Ig molekülünde hafif zincirler Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında, ağır zincirler ise hem kol, hem de gövde kısmında bulunurlar. Kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları, polipeptit zincirleri bir arada tutarak Ig molekülünü oluştururlar. H ve L zincirlerinde her polipeptid zincirinde olduğu gibi NH₂ ile sonlanan bir amino terminal uç ve COOH ile sonlanan karboksi terminal uç bulunur. Ig molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları amino terminal uçlardır ve antijenler bu kısımlara bağlanır (Fab). H ve L zincirlerinin aminoterminal uca yakın olan kısımlarındaki aminoasitlerin diziliş sırası değişebilir özellikte olduğundan bu bölgelere V Bölgesi (= Variable = değişken) adı verilir. Bu değişken kısımlar Ig molekülünün (yani antikorun) oluşumuna neden olan antijen molekülüne uyacak özellikte sentezlenirler. Polipeptit zincirlerinin geri kalan kısımlarında değişkenlik görülmediğinden bu kısımlara C bölgesi (= Constant = Değişmez) adı verilir (Fc).

■ Ig molekülü üniteleri : Ig molekülünü oluşturan polipeptit zincirlerinde ilmik şeklinde katlanmayla oluşun ve yine disülfid bağlarınca tutulan kıvrım veya kangal şeklinde yapılar vardır. Bunlara domen (= kangal = Domain) adı verilir. Ig'lerin birçok fonksiyonu bu domenlerle ilişkilidir. Değişken bölgedekiler V domenleri (Hafif zincirdekine VL, Ağır zincirdekine VH), değişmez bölgedekiler ise C domenleri (yine hafif zincirdekine CL, ağır zincirdekine, sayıları birden fazla olduğundan CH1, CH2,

CH3) olarak adlandırılırlar. Böylece hafif zincirlerde 2, ağır zincirlerde ise 4 adet ünite bulunur. IgM ve IgE'de ise 5 adet (ek olarak CH₄) ünite vardır (WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf)..

2.3.1 İmmünoglobulinlerin Özellikleri

Antikorun esas fonksiyonu antijenle bağlanmasıdır. Böylece Antijen-Antikor bileşiği (İmmünokompleks) oluşturarak bunların fagositozla dolaşımdan kaldırılmalarını sağlarlar. Antikorlar enfeksiyon etkenlerine bağlanarak onları hareketsiz hale getirir, aglütine eder (biraraya toplar) ve fagositozunu kolaylaştırır (opsonizasyon). Antikorlar bağlandıkları toksin moleküllerini ve virüsleri nötralize eder, etkisiz hale getirirler. IgG ve IgM sınıfı antikorlar komplemanı klasik yoldan aktive ederler. Kompleman vücut savunmasında çok önemli bir faktördür. Antikorlar, mikropların mukozalara tutunmasını ve yerleşmesini engellerler. Canlıya zarar verebilecek bazı makromoleküllerin bağırsaktan emilimine engel olurlar. Antikora bağımlı hücreler sitotoksitede rol alırlar. (IgG ile kaplı hedef hücreler bu antikorların Fc ucundan sitotoksik hücrelere bağlanmasıyla lizise uğrarlar). İmmünoglobulin molekülü B lenfositlerde antijen reseptörü olarak görev yapar.

2.3.1.1 İmmünoglobulin G (IgG)

IgG, normal insan serumundaki immünoglobulinlerin % 75'ini oluşturur. Yukarıda da yapısından geniş olarak sözünü ettiğimiz IgG molekülü Y harfi şeklinde, monomer yapıda ve 150.000 mol kütleindedir. Erişkinde 100 mL serumda 1000 mg IgG bulunur. IgG molekülünde bulunan 2 tane Fab parçasına iki antijen bağlanabilir. Bu nedenle IgG iki değerlidir. IgG'nin kan ve dokulardaki yoğunluğu eşittir. IgG plasenta yoluyla anneden fetüse geçebilen tek Ig'dir. Hamileliğin 3. ve 4. ayında IgG'ler anneden bebeğe geçmeye başlar ve bu geçiş doğuma kadar giderek artan oranlarda devam eder. Yeni doğan bir bebeğin kanında anneden geçen IgG'ler dolaşır. Böylece intrauterin hayatta anneden bebeğe geçen IgG sınıfı özgül antikorlar doğumdan sonraki ilk aylarda bebeği, annenin dirençli olduğu çeşitli enfeksiyonlara karşı korumuş olur. Bebeğin kendi IgG sentezi ise doğumdan itibaren başlar ve iki yaşında erişkin düzeye ulaşır. 40 yaşından sonra IgG düzeyinin tekrar azalmaya başladığı görülür. Kanda bulunan IgG, transüstasyon (sızma) ile external (dış) sıvılara da geçebilir. Annelerin ilk emzirdiği süt olan kolostrumda serumdan sızan IgG'ler vardır ve bebeğin bağırsak mukozasından geçerek, yenidoğan bebeğin bağışıklığını güçlendirirler. IgG moleküllerinde antijenik

ve menteşe gölgesinde iki ağır zincir arasındaki disülfid bağının sayısı açısından farklılık gösteren dört alt grup saptanmıştır. IgG 1'de 2, IgG 2'de 4, IgG 3'de 15 ve IgG 4'te 2 disülfid bağı bulunur. Tüm IgG'lerin %65'i IgG 1'dir. IgG 2 %23'ünü, IgG 3 %8'ini, IgG 4 ise %4'ünü oluşturur. IgG, klasik yoldan komplemanı aktive eden iki Ig'den biridir (diğeri IgM). IgG uzun ömürlü bir antikor olup, özellikle ikincil bağışık yanıtta çok yüksek miktarlara ulaşır. Birçok hücrede (özellikle fagositik hücrelerde) IgG'yi Fc kısmından bağlayan yüzey reseptör bulunur (WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf)..

2.3.1.2. İmmünoglobulin M (IgM)

IgM, normal insan serumundaki immünoglobulinlerin %10'unu oluşturur. En büyük Ig'dir ve makroglobulin de denir. Mol kütlesi 900.000 olan ve 5 temel birimden oluşan bir pentamerdir. Şekil olarak IgG molekülüne benzeyen 5 tane monomerin disülfid bağlarıyla bağlanmasından oluşan yıldız şeklinde bir Ig'dir. IgM molekülünde ayrıca, beş tane monomeri birbirine bağlayan J bağlayıcı polipeptidi bulunur (WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf)..

2.3.1.3. İmmünoglobulin - A (IgA)

Genel olarak yapısı IgG'e benzer. Ancak IgA molekülleri hem IgG gibi monomer halde (bir temel birim), hem de iki veya daha fazla monomerin J bağlayıcı polipeptid zinciri ile bağlanması sonucu dimer (iki temel birimli) veya trimer (üç temel birimli) halde bulunabilmektedir. Mol kütlesi monomer için 160.000, dimer için 400.000 dir. IgA, insan serumundaki Ig'lerin %15'ini oluşturur. IgA sınıfı antikorlar mukozal bağışıklıkta önemli rol oynar. (Sindirim, solunum ve genitoüriner sistem mukozaları sürekli dışarıdan giren mikroorganizmalarla savaşır) .

(WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf).

2.3.1.4. İmmünoglobulin - D (IgD)

Mol kütlesi 180.000 olan, monomer yapıda bir immünoglobulindir. Serumdaki immünoglobulinlerin % 0.2 kadarını oluşturur. Erişkinde 100 ml serumda 3 mg bulunur. Sıcaklık ve proteolitik enzimlerle kolayca parçalanır ve kısa ömürlüdür. IgD'nın antikor aktivitesi olduğu kanıtlanamamıştır ve asıl işlevinin ne olduğu da tam anlaşılamamıştır. IgD, IgM ile birlikte, B lenfositlerin yüzeylerinde bulunur. IgD muhtemelen B-lenfositlerin farklılaşmasında rol oynar.

2.3.1.5. İmmünoglobulin -E (IgE)

Mol kütlesi 190.000 olan monomer yapıda bir Ig'dir. Normalde serumda çok az bulunur ve Ig'lerin %0.004'ünü oluşturur. Erişkinde 100 ml serumdaki miktarı 0.05 mg'dır. IgE, Fc parçası ile mast hücresi ve bazofil lökositlere bağlanabilme özelliğindedir ve bağlandığı zaman bu hücreleri duyarlı hale getirirler. IgE, helmint dediğimiz parazitlere karşı aktif bağışıklıkla, astım, saman nezlesi, ürtiker gibi çabuk tipteki aşırı duyarlılık reaksiyonlarında önemlidir. Hücrelere bağlı haldeki IgE'nin ömrü, serbest IgE'ye göre daha uzundur ve proteolitik enzimlere de daha dayanıklıdır. IgE komplemanı aktive etmez. Diğer Ig'lere göre ısıya daha duyarlıdır. IgE sentezleyen plazma hücreleri daha çok salgısal yüzeylerde (solunum, sindirim vb.) bulunur (WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf).

2.4. Polimerizasyon Yöntemleri

2.4.1. Yığın Polimerizasyonu

Bu polimerizasyon yönteminde, sistem sadece monomer ve polimer bileşenlerinden oluşur. Bu teknik genellikle katalizör varlığında fonksiyonel gruplardan dolayı performans gösteren polimerizasyonda kullanılır (Saunders, 1988). Bu yöntemde monomer veya monomer karışımı doğrudan ısıtılır. Sistemde sıcaklığın yeteri kadar yüksek tutulması gerekmektedir.

Yığın polimerizasyonu genellikle ılımlı ekzotermik tepkimelerde kullanılır. Tepkimelerin çoğu, karışımın viskozitesinin karışmaya, ısı transferine ve kabarcık eliminasyonuna izin verecek en az gerekli miktarda olduğunda gerçekleşir. Bu tür polimerizasyonun kontrolü diğerlerine kıyasla kolay olur (Saunders, 1988).

2.4.2. Çözelti Polimerizasyonu

Monomerler uygun çözültide çözünürler (Nicholson, 1991). Sıcaklık çözelti halinde çok kolay kontrol edilebilir. Bu şekilde ısı ve viskozite problemlerinin üstesinden gelinebilir.

Çözelti polimerizasyonu genellikle gaz fazda çözülmüş vinil monomerlerinin iyonik polimerizasyonunda kullanılır. Çözücü monomer ve başlatıcının etkileşmesini artırır ve ekzotermik tepkimenin ısı kontrolüne yardım eder. Bununla birlikte, tepkime sıcaklığı tepkime hızını sınırlayan, çözücünün kaynama noktasıyla sınırlıdır. Aynı zamanda, üründen çözücü kalıntılarını uzaklaştırmak zordur (Saunders, 1988).

2.4.3. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon, emülsifiyerle başka bir sıvıda tutulan ve dağılan kararlı kolloidal süspansiyondur. Emülsiyon polimerizasyonunda, sürekli ve süreksiz faz vardır. Başlatıcı sürekli fazda bulunurken, monomer/polimer süreksiz fazda bulunur (Billmeyer, 1984).

Emülsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 50 nm den 1µm'nin altına kadar çok düşük boyut aralıklarında mikropartikül sentezlenir. Monomer ortamda kısmen çözünür veya çözünmez fakat emülsifikasyonun olması için ortama sürfaktan eklenir. Monomerin kullanılmadığı ortamda başlatıcı çözünür. Monomer ortamda nanometre boyutunda miseller olarak, damlacık veya sürfaktanın her ikisi şeklinde de bulunabilir. Başlatılan oligomerler kararlı çekirdekler oluşturur ve polimerizasyonun en önemli kısmını oluşturur. Orjinal miçel boyutu üretilen mikropartikül boyutunu vermez çünkü başlatıcı monomerde çözünür değildir. Ürün, radikal davranan oligomerler içeren kararlı misellerle oluşur ve düşük heterojenlik oluşması için aynı boyutta büyümesini sağlar.

2.4.4. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu sulu sistemdeki monomer faz ve dağıtıcı fazdan oluşan bir polimerizasyon yöntemidir. Emülsiyon polimerizasyonundan başlatıcı yerleşimi ve tepkime kinetiği ile ayrılır. Süspansiyon polimerizasyonunda, başlatıcı monomer fazda çözünürken, tepkime kinetiği yağın polimerizasyonu ile aynıdır (Billmeyer, 1984).

Bu yöntem çözültü polimerizasyonu ile çok benzerdir fakat inert çözücüde çözünmez, çözücüde asılı kalır. Mekanik karıştırma ve asıltı ajanları, süspansiyon ortamında monomer damlacıklarının kararlılığının sağlanması için gereklidir (Arshady, 1999).

Dispersiyon ortamı mekanik karıştırma ve kararlaştırıcılarla sağlanır. Monomer damlacıklarının topaklaşmasını önlemek amacıyla çok çeşitli kararlaştırıcı kullanılır. Bu kararlaştırıcılar, jelatin, poli(vinil alkol), elektrolitler gibi suda çözünür organik maddeler olabileceği gibi kaolin, magnezyum silikat ve alüminyum hidroksit gibi suda çözünmeyen inorganik bileşikler de olabilir (Odion, 1970).

2.4.5. Çöktürme Polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonunda, tepkime karışımının başlangıç hali dispersiyon polimerizasyonundaki gibi homojen çözüldür. Bununla birlikte, birincil mikropartiküller tepkime ortamında şişmezler. Bu koşullar altında, başlama ve

polimerizasyon homojen ortamda meydana gelir. Devam eden çekirdek oluşumu bu çekirdeklerin birleşip gittikçe büyümesi ile mikropartikülün büyümesini sağlar. Dolayısıyla, çöktürme polimerizasyonu ile düzensiz şekillerde, heterojen dağılımda mikropartikül oluşur (Odion, 1970).

2.4.6. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu eş boyutlu mikropartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan oldukça önemli bir yöntemdir. Partikül boyutu ve mikropartikül boyut dağılımı (heterojenlik indisi) uygulamalarda önemli olan iki parametredir.

Monomer ve monomerin derişimi, başlatıcı derişimi, tepkime sıcaklığı, kararlaştırıcı varlığı ve derişimi, çözücü polaritesi gibi faktörleri içeren çalışmalar yapılmıştır. Dispersiyon polimerizasyonu homojen çözeltide gerçekleştirildiği için idealdir. Tepkime bileşenlerinin çözünürlüğü önemlidir, çünkü polarite başlangıç bileşenlerini çözünür tutar fakat polimerik mikropartikülleri çöktürerek ayırır.

Dispersiyon polimerizasyonu eş boyutlu mikropartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan tek basamaklı bir yöntemdir.

Poli(vinilpirolidon), mikropartiküllerin dar boyut dağılımlarını kontrol etmek için kullanılan yardımcı kararlaştırıcıdır. Emülsiyon ve süspansiyon polimerizasyonundan farklı olarak dispersiyon polimerizasyonunun tek basamaklı yöntemi monomerin sürekli fazda oluşturduğu homojen çözeltidir. Tseng ve ark.(1986) ve Lok ve Ober (1985) dispersiyon polimerizasyonu ile mikropartikülün oluşumu ve büyümesi ile ilgili mekanizmayı tartışmışlardır. Gerekli sıcaklıkta başlatıcı parçalanır ve serbest radikaller çözücü monomerler ile oligomerik radikalleri oluştururlar. Kritik zincir uzunluğuna gelindiğinde oligomerler homojen çözeltiden çöker ve kararsız çekirdek oluşturur ve kararlı olmak için kararlaştırıcıyı adsorblar. Dispersiyon polimerizasyonunun anahtar özelliği, oluşan bu çekirdeğin homojen çözelti ile karışmaması ve çökerek yeni faz oluşturmasıdır. Yeteri kadar mikropartikül oluştuğunda, yani ortamda tepkimeye girecek radikal ve çekirdek kalmadığında, yeni mikropartikül oluşmaz ve mikropartikül oluşumu tamamlanmış olur (Horak ve Shapoval, 2000). Her fazdaki bağıl miktar ortam koşulları değiştirilerek belirlenir. Cao ve ark.,'a (2000) göre dispersiyon polimerizasyonunun anahtar özelliklerinden birisi, kopolimer kararlaştırıcısıdır, poli(vinil pirolidon) çözeltide sürekli fazda oluşur. Partiküller oluşurken flokulasyon ve agregasyon sağlar. Yani bu yöntem polimerizasyonun erken safhalarında polimerleşen türlerin agregasyonunun başlamasına bağlıdır: mikropartikül sayısı büyüyen çekirdekle

hesaplanır. Monodispersiteye ulaşmak için yardımcı kararlaştırıcının rolü, mikropartiküllerin daha fazla büyümesine izin vermemesidir. Partiküllerin büyümeye devam etmesi ortamda farklı çapta mikropartiküllerin olmasına neden olur. Kararlı mikropartikül oluşma basamağı daha da kısılır, sonuç itibariyle çekirdekleşme zamanı azalır ve bu da dar boyut dağılımlı örnekler oluşturur.

Sistem çözücüsünün ilk görevi, başlatıcı monomer ve stabilizörün karışmamasını sağlamaktır. Çözücü ortamının polaritesi Horak ve Shavopa'a (2000) göre mikropartikülün boyut ve dağılımında anahtar rol oynar çünkü polimer çöküntüsünün üzerindeki kritik mol kütesinin kontrolünü sağlar.

2.5. Manyetik Partiküller

Manyetik partiküller; asıltı katıları içeren sıvılardan seçici olarak uzaklaştırılması, manyetik ayırma ile kolay toplanılması ve gözeneksiz olduklarından az kirlilik, iyi kütle transferi ve az aşınma göstermesi gibi bir çok avantaja sahiptir. Bu şekilde maliyetten de kar sağlar.

L-asparajinaz ve β -galaktozidaz enzimlerinin *Escherichia coli* hücre protoplazmasından saflaştırılmasında (Dunnill ve Lilly, 1974) ve karaciğerden alkol dehidrogenaz enziminin kazanımı için bu tür manyetik partiküller kullanılmıştır (Mosbach ve Andersson, 1977). Küçük ölçekli uygulamalarda kullanılan manyetik mikropartiküller, katalizin geri kazanımı için hem hızlı hem de kolay kazanım sağlamaktadır. Diğer taşıyıcı partiküller için işlem bir çok basamak gerektirdiğinden geniş ölçekli endüstriyel uygulamalarda enerji ve verimlilik açısından manyetik ayırma tercih edilebilir. Munro ve ark., (1977), gözeneksiz manyetik partiküllerin ortama aktardığı kirliliği araştırmak için nikel-kimotripsin partiküllerini soğuk süt ortamında 48 saat tutarak aktivite tayini yapmışlardır. Sonuçta ciddi bir kirlilik oluşturan selüloz desteklere göre aktivite de çok az bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca çalışma ferrit-laktaz katalizi kullanılarak tekrarlanmış ve aynı şekilde aktivitede çok az bir düşüş kaydedilmiştir.

2.5.1. Manyetik Ayırma Teknikleri

Biyomoleküllerin ve hücrelerin manyetik ayrılması manyetik mikropartiküllere dayanır. Biyoafinite tepkimelerine uygulanması; seçicilik, basitlik ve hızlı olması açısından avantajlıdır. Bu teknik analitiksel ve biyoteknoloji uygulamalarında özellikle şu anda,

biyokimyasal analizlerde; hücre, protein ve nükleik asit gibi hedef moleküllerin izolasyonunda kullanılmaktadır.

Bağlı/serbest fraksiyonun birbirinden ayrılması, partiküle bağlı maddenin manyetik alan uygulanarak manyetik olmayan serbest fraksiyondan ayrılması ile büyük ölçüde kolaylaştırıldı. Fen ilminde immünolojik ve biyospesifik afinite tepkimelerinde ayırma işleminde küçük manyetik mikropartiküllerin kullanımı çok iyi bilinmektedir. Küçük manyetik mikropartiküller genelde iki kategoriye ayrılırlar. İlk kategoride kalıcı manyetikliğe sahip mikropartikül varken ikinci kategoride ise sadece manyetik alana tabi tutulduğunda manyetik olan mikropartikül vardır. İkinci kategorideki paramanyetik ve süperparamanyetik mikropartikül olarak bilinir ve kalıcı manyetik mikropartiküle göre daha çok tercih edilir.

Manyetik alanda uygulanan bir çok ayırma tekniği vardır (O'Brien ve ark., 1996; Tsai ve ark., 2002; Meszarosova ve ark., 2003). En çok bilinen teknik ise manyetik kararlı akışkan yataklı (MSFB) sistemdir. MSFB, içerisinde asıltı katı faz bulunan sürekli akış sağlanan kolon ayırma sistemidir. MSFB, manyetik alan ile kararlı hale getirilmiş mikropartikül içeren akışkan bir yataktır. Manyetik kararlı akışkan yataklı sistem, sabit ve akışkan yatağın en iyi özelliklerini bir arada taşır. Bunlar, etkin sıvı-katı kütle transfer özellikleri, partikül karışımının eliminasyonu, iyi sıvı-katı etkileşimi, kirlenmenin önlenmesi, düşük basınç düşmesi ve sürekli ters akım operasyonudur (Bilkova ve ark., 2002). Manyetik adsorbentlerle etkileşim halinde olan yüksek viskos ortamlara değinildiğinde, yüksek konvektif transport hızından dolayı manyetik olarak kararlı akışkan yataklı sistem elverişlidir. Son zamanlarda, biyomolekül bağlamada ve nükleik asit saflaştırmada manyetik adsorbentlerin kullanımına büyük ilgi vardır (O'Brien ve ark., 1996; Tong ve ark., 2001).

Son yıllarda, manyetik taşıyıcı alanındaki gelişmelere katkı olarak önemli işler yapılmıştır. Mikrometre çapındaki mikropartiküle manyetik metal veya oksitleri bağlandığında, oluşan mikropartikül manyetik alana cevap vererek, bir çok uygulama alanlarına yol açmıştır. Yüzeyinde amin veya karboksil gibi fonksiyonel gruba sahip mikropartiküller, tanı alanında, enzim immobilizasyonu ve immünoanalizinde, kemoterapötik ilaçların salınımında, atık sulardaki metal iyonların uzaklaştırılmasında, DNA içeren proteinlerin sentezlenmesi ve ayrılmasında, hücre ayırma gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bergemann ve ark., 1999). Silika veya gözenekli cam gibi inorganik destek maddelerinin en önemli dezavantajı seçici bağlanmayı sağlayan fonksiyonel gruplarının olmayışıdır. Dolayısıyla, seçici amaçla kullanılan

mikropartiküllerde fonksiyonel grupların varlığı oldukça önemlidir. Polistiren ve poli(metil metakrilat) manyetik mikropartiküller arasında sıklıkla kullanılanlardır (Ding ve ark., 1999). Bunlara ilaveten biyobozunur polisakkaritler, dekstran, albümin, selüloz, polilaktik asit ve poli(alkilsiyanoakrilat) da kullanılmaktadır (Vettese-Dadey, 1999). Manyetik ayırma manyetik mikropartikül üzerindeki reaktif gruba bağlı olduğu için, bazı modifikasyonlarla reaktif grubun ortaya çıkarılması gerekmektedir. Dolayısıyla, bu durum modifikasyonu kolay, özel reaktif taşıyıcıların aranmasına yol açmıştır. Örneğin, poli(GMA), en büyük avantajı oksiran grubuna sahip olmasıdır (May, 1988; Lee ve Neville, 1967). Doğrudan etkileşebilecekleri gibi, basit modifikasyonlarla da değişik uygulama alanlarına sahiptir. Kimyasal modifikasyonlar ve poli(GMA)'nın kullanılır hale getirilmesi epoksi halkasının açılarak hidroksi grubunun elde edilmesi ile olur ve sahip olduğu epoksi grubunun yüksek tepkime kabiliyetinden dolayı, kolayca birleşme tepkimesi verirler (Paul ve Ranby , 1976). Glisidil metakrilat polimeri, amin, aminopiridin, propansulton ve fenol ile tepkimeye girer (Azanova ve ark., 1990; Sinclair B., 1998).

Manyetik mikropartiküller farklı yöntemlerle hazırlanabilirler, bunların arasında afinite ligandın bağlanmasında kolaylık sağlayan, çözücü uzaklaştırma yöntemi ile sentetik polimerli süperparamanyetik mikropartikül giydirme yöntemi vardır. Diğer bir seçenek ise, geleneksel destekler manyetik ferrosivularla etkileştirilirler veya manyetik partiküller polimerik matriks içinde çöktürülerek hazırlanırlar. Bunların dışında, manyetik, partikül içerisine emülsiyon polimerizasyonu ile konur (Wang ve Pan, 2000). Muhtemelen en iyi bilinen yöntem ise manyetik eş boyutlu partikülün, çok basamaklı bir yöntemle sentezlenmesidir (Ugelstad ve ark., 1983). Mikrometre aralığında eş boyutlu mikropartikülün tek basamakta sentezlenmesini sağlayan dispersiyon polimerizasyonu, çok basamaklı sistemin basitleştirilmiş örneğidir.

2.6. Protein Nicel Analizi

Protein nicel analizinde genelde spektroskopik yöntemler, Biüret, Lowry, Bradford gibi kimyasal yöntemler ile immünojenik yöntemler kullanılmaktadır.

2.6.1. İmmünolojik Yöntemler

Antikorlar protein derişiminin hesaplanmasında kullanılan yaygın ve özgül araçlardır. Bazı antikorlar hedef proteinin çökmesine neden olarak türbidite oluştururlar, bu şekilde türbidite ve nefelometrik yöntemlerle hedef proteinin ölçülmesini sağlarlar. Ayrıca

antikor miktarı radyoimmünoanaliz (RIA), floresans polarizasyon immünoanaliz (FPI), immünomikroskopik yöntem, enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) gibi yöntemlerle de miktarı tayin edilebilir.

2.6.2. ELISA

Tepkime bileşenlerinden birisi katı faz yüzüne absorblanır, katı faz yüzeyi mikrokuyucuk olabilir. Bu bağlanma işlemi bağlı ve serbest etiketli reaktantların ayrılmasını kolaylaştırır. Bir yüzeye tutturulan antikorların bulunduğu ortama örnek konur ve katı faz yüzündeki antikorlara bağlanması sağlanır. Yıkamadan sonra enzim etiketli antikor eklenir ve sandviç gibi kompleks oluşur. Fazladan, bağlanmadan kalan antijenler yıkanarak uzaklaştırılır ve enzim substratı eklenir. Yani enzim etiketli olan bu sistemde amaç, enzimin substratı ürüne çevirmesidir, yani tepkimeyi katalizlemesidir, ürün miktarı örnekteki antijen miktarıyla orantılıdır, tam tersi işlemle antikor miktarı da tayin edilebilir. Substratla birleşen enzim renkli ürün oluşturarak gözle görülür yorum yapmamızı da sağlar. ELISA ile 1.0 ng mL^{-1} kadar antijen saptamak mümkündür. ELISA iki grupta sınıflandırılır:

I- Katı Faz İmmünoanaliz

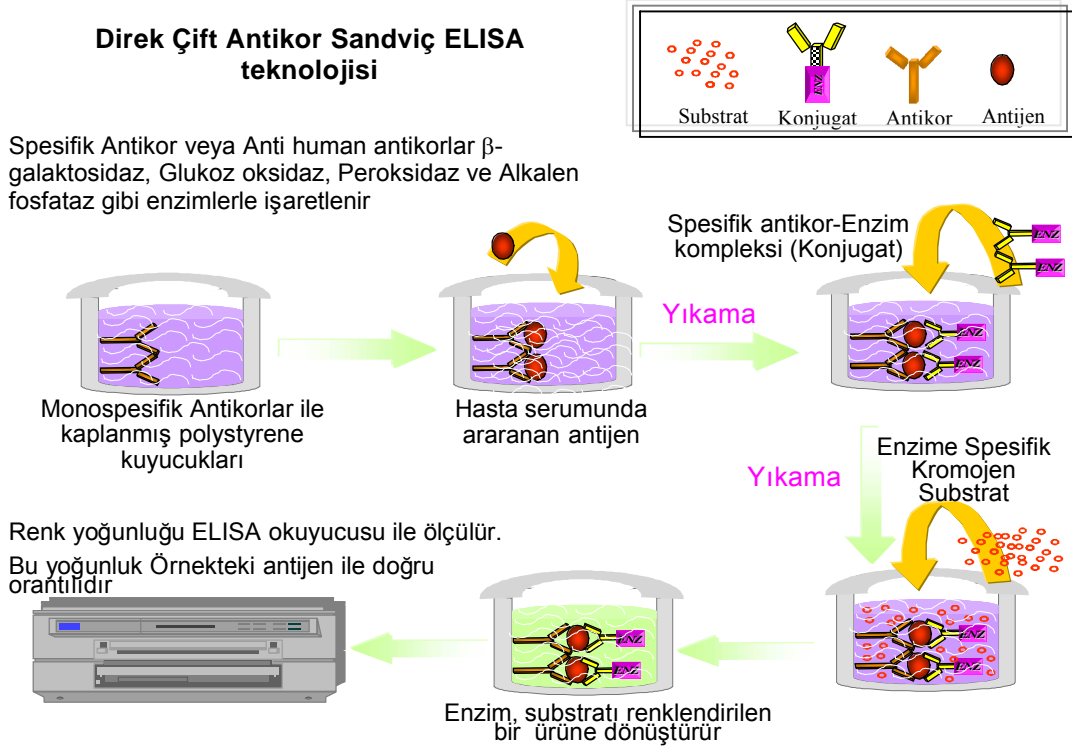
a-Sandviç ELISA

b-İndirekt ELISA

c-Yakalamalı ELISA

II- Membrana Bağlı Katı Faz İmmünoanalizi (Rubenstein KE ve ark., 1972).

Çalışmada kullanılan ELISA yöntemi sandviç ELISA yöntemi olduğu için aşağıda Şekil 2.4'de ELISA sandviç yönteminin çalışma prensibi şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. ELISA Çalışma Prensibi

2.7. Yüze Plazmon Rezonans İmmünoanalizi

2.7.1. İmmünoanaliz

İmmünoanaliz, örnek bileşenlerin hesaplanmasında antikorlara uygulanan analitik metottür. Antikorlar önemli moleküllerdir ve moleküler tanımda çok iş görür. Antijenlere karşı özgül bağlanmalarından dolayı bu bileşenler, kan, idrar, plazma gibi kompleks biyolojik ortamlarda direkt kullanılabilen ve oldukça spesifik olan immünoanaliz yöntemlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bir çok sayıdaki immünoanalizin her biri örnek çeşidi, analizin doğası, analiz koşulları gibi bir takım kriterlere göre sınıflandırılırlar. Bir çok immünoanaliz yöntemi antijen-antikor etkileşimini belirlemek için enzim etiketi, ışık saçılması, lüminesans veya floresans kullanılmasını gerektirir. Bununla birlikte, etiketleme işlemi ve sonuç analizi zaman alıcıdır ve bazı durumlarda, etiketlemenin kendisi analitin yapısını ve aktivitesini değiştirir ve buna bağlı olarak bağlanma özelliklerini de değiştirir.

Yani sonuç olarak, etiketsiz antikorlar ve immünoanaliz için geliştirilmiş formatları üzerinde önemle durulmaktadır. Bağlanma olayını direk belirleyebilen immünoensörlerin gelişmesi ümit verici olmuştur. İmmünoensörler spesifik antikor bağlanmalarını, transdisör yüzeyine immunokimyasal tepkimeler bağlanarak yapılabilir. Transdisör, bağlanma olayını elektronik sinyale dönüştüren bir bölümdür. Bunu kullanan metodlardan birisi de yüzey plazmon rezonansdır.

2.7.2. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey plazmon rezonans (SPR), Wood (1902) tarafından gözlenmesinden beri çok büyük ilerleme gösterdi. Başlangıçta çok çeşitli spektroskopik ve fiziksel karakterizasyonla açıklanmış olup bunlar; artırılmış holografı (Cowan, 1972), yüzey artırılmış Raman saçılması (SERS) veya Koherent anti- Stokes Raman saçılması (CARS) (Schneider, 1982) ve yüzey plazmon mikroskopu (SPM)dur (Rothenbauser ve Knoll, 1988; Hickel ve Knoll, 1989).

SPR, ince metal film yüzeyindeki çok yakın komşular arasındaki refraktif indeks (n) değişimleri kullanılarak ölçüm alınan basit ve duyarlı bir yöntemdir (Otto, 1968). Bu teknikte genellikle altın veya gümüş olan ince metal film, optik sensör yüzey olarak işlev görür. Bu iletkenler refraktif indeksi farklı olan (cam prizma ve örnek çözelti) iki şeffaf ortam arasındadır. Kritik açının üstünde, düzlem polarize ışığı daha yüksek refraktif indekse sahip (cam prizma) ortama girer ve toplam iç refraksiyonu geçirir. Bu koşullar altında, evanescent dalgaboyu olarak adlandırılan ışığın elektromanyetik alan bileşenleri altın filme nüfuz eder. Buna yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı (θ_r) denen spesifik açıda meydana gelir. Bu SPR açısı, altın film yüzeyine analitin eklenmesiyle modifiye edilir, bağlanma olayı monitorlanarak izlenir. SPR tamamıyla özgül değildir. Farklı kimyasal değişikliklerin arasını ayıramaz. Kısıtlama gibi görünmesine rağmen, güçlü bir ayırmadır.

Seçicilik, birbiriyle özgül etkileşen iki moleküle bağlıdır. Birisi detektör diğeri ise hedef analittir. Bu çiftlerden herhangi birisi SPR'ye uydurulabilir. Bu antijen ve antikor, enzim ve substratı, şelatlayıcı ajan ve metal iyonu, lektin ile glikoprotein olabilir.

2.7.3. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörleri

SPR'nin optik biyosensör amaçlı kullanımı Liedberg ve ark.'nın (1983) IgG antikorunu altın duyarlı filme adsorblayıp bir dizi seçici bağlanma ve IgG saptanması ile sonuçlandırmalarıyla anlaşılmıştır (Nylander ve ark., 1982; Liedberg ve ark., 1983). Kısa süren antikor-antijen bağlanma ve ayrışma çalışmalarına dayanan immunokimyasal araştırmalar (Stoecklein ve ark., 1997; Median, 1997; Ohlson ve ark., 1997; Loomans ve ark., 1997, Adamczyk ve ark., 1997; Rauffer-Bruyere ve ark., 1997; Myszka ve ark., 1997; Median ve ark. 1997; Adamczyk ve ark., 1998) yapıldı ve SPR'nin prensipleri yayınlandı (Lundstrom, 1994; Liedberg ve ark., 1995; Morgan ve ark., 1996, Tapuchi ve ark., 1996; Sasaki ve ark., 1998). Genelde, SPR biyosensörleri, yansıyan ışık şiddetindeki direk değişimlerle, kütle veya derişimdeki değişimleri ile karşılıklı etkileşim içerisinde. Bu analitik sinyal çözeltideki ligandın altın yüzeydeki immobilize reseptöre bağlanması ile doğru orantılıdır.

SPR temelli biyosensörler herhangi bir işaretlemeye gerek olmaksızın biyomoleküllerin etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılabilir. Bu özellikleri moleküler etkileşimlerin karakterize edilebilmesi için SPR sensörlere eşsiz bir analitik alet konumu kazandırmaktadır. Gerçek zamanda etkileşimlerin doğrudan ölçülebilmesi, kantitatif olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerin belirlenmesini veya kalitatif olarak ligand ve analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır. Enzim ve radyoişaretleme gibi diğer teknolojilerle karşılaştırıldığında SPR temelli biyosensörler hızlı cevap ve yüksek seçicilik özelliklerine bağlı olarak, protein-protein, antikor-antijen ve reseptör-ligand etkileşimleri gibi çok geniş biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesinde kullanılmaktadır (Hu ve ark., 2006).

Daha önce de belirtildiği gibi optik SPR biyosensörlerin en önemli avantajı, kompleks oluşumunu gerçek zamanda ölçebilmesidir. Bu özellik kompleks oluşumu esnasında birleşme ve ayrılma işlemlerini içeren bağlanma etkileşimleri hakkında kantitatif bilgiler sunmaktadır (Cherif ve ark., 2006). Bağlanma etkileşimleri incelenirken en yaygın olarak kullanılan yöntem basit iki molekül etkileşim sistemidir. İki molekül bir kompleks oluşturmak için birleşmektedir. Bu yöntem basitce A + B' nin AB kompleksini oluşturması şeklinde gösterilmektedir.



Burada; k_a kompleks oluşum hız sabiti, k_b kompleks bozunma hızı sabitidir. Bu kinetik bilgiler moleküllerin bağlanma mekanizmalarını yansıtmakta ve yapı ve fonksiyon arasındaki bilgileri göstermektedir.

SPR biyosensörleri, normal analitik tekniklere göre bir çok avantaja sahiptir. En önemlisi, antikor-antijen etkileşmelerinde biyomoleküllerin floresans ve radyoizotop etiketlenmesine gerek olmadan izlenmesindeki çok yönlülük ve kolaylıktır. Örnek uygulamasıdan sonuç alınmasına kadar geçen süre değişir fakat oldukça kısadır. Çoğu durumda, örneğin sensöre gösterilmesinden önce ön hazırlığa gerek yoktur. Tekli sensör formatı (büyüklük, depolama ve kullanılan protokol, okuyucu v.b.), içerisinde immunolojik, nükleik asit bağlanması, enzimatik, kimyasal ve gaz adsorpsiyonu bulunan bir çok kimyacı tarafından kullanılabilir. Bu da bireysel olarak biyomolekül etkileşiminin bağlanma özgülüğü, kinetik sabiti ve derişiminin gerçek zamanlı hesaplanması konusunda ümit vaat ediyor. Antikor-antijen etkileşimi, peptit/protein-protein etkileşimi, DNA hibridizasyon koşulları, polimerlerin biyoyumluluk çalışmaları, biyomolekül-hücre reseptör etkileşimi, ve DNA reseptör-ligand etkileşimi analiz edilebilir (Pathak ve Savelkoul, 1997).

2.7.4. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Kuantum optikal elektronik temeline dayanan SPR'de ışığın fotonları tarafından taşınan enerji metaldeki elektronlara transfer edilebilir. Enerji transferinin olduğu ışığın açısı metale ve metalin çevresine göre değişir. Metal yüzeyindeki elektronlar ile ışık foton enerjisi arasında rezonans olduğunda enerji transferi meydana gelir. Transfer, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarı ölçülerek gözlenebilir. Işığın büyük kısmının adsorblandığı rezonans açısı dışındaki diğer çoğu açının tüm ışığı yansır.

SPR'de sıklıkla uygulanan geometri, Kretschmann prizma ayarlamasıdır. Bu konfigürasyon, film yüzeyinde yük yoğunluğu salınımını uyaran yüzey içi dalgaboyunu takiben, toplam iç yansımalar tarafından meydana getirilen evanescent dalgaboyunu kullanır. Bu elektron salınımı genellikle yüzey plazmon olarak tanımlanır. Evanescent alanın nüfuzetme derinliği; ışığın dalgaboyuna, refraktif indeks oranına ve foton şiddetine bağlıdır. Alan enerjisi yüzeyden uzaklaştıkça bozunur ve nüfuzetme derinliği hızlıca bozunur.

Prizmanın varlığı yüksek refraktif indeks değerinden dolayı gereklidir çünkü direkt gelen ışığın havadaki yayılması ile yüzey plazmonunun üretilmesi imkansızdır. Gelen ışığın ve yüzey plazmon alanının her ikisinin de dalgaboyu vektörü SPR süresince eşit olmalıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

İnsan immünoglobulin G (IgG, liyofilize), Konkanavalin A (Concanavalin A, Type III, M: 27 kDa) ve Manyetik nanopartikül (Fe_3O_4 20-50 nm çapında) Sigma'dan sağlandı. Glisidil Metakrilat (GMA, Fluka A.G., Buchs, Switzerland) vakum distilasyonu ile saflaştırıldı ve kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Azobisisobutironitril (AIBN) ve poli(vinilpirolidon)(M:30000,BDH Chemicals Ltd., Poole, İngiltere) sırasıyla başlatıcı ve sterik kararlaştırıcı olarak kullanıldı. AIBN metanolden tekrar kristallendirildi. Etanol (Merck, Almanya) seyreltici olarak kullanıldı. ELISA ölçümleri için IgG ELISA kiti (K6510-070802, immünoagnostik) kullanıldı. SPR deneylerinde 50 nm altın kaplı SF11 prizmalı GenOptics SPR çip kullanıldı. Kullanılan tüm diğer kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

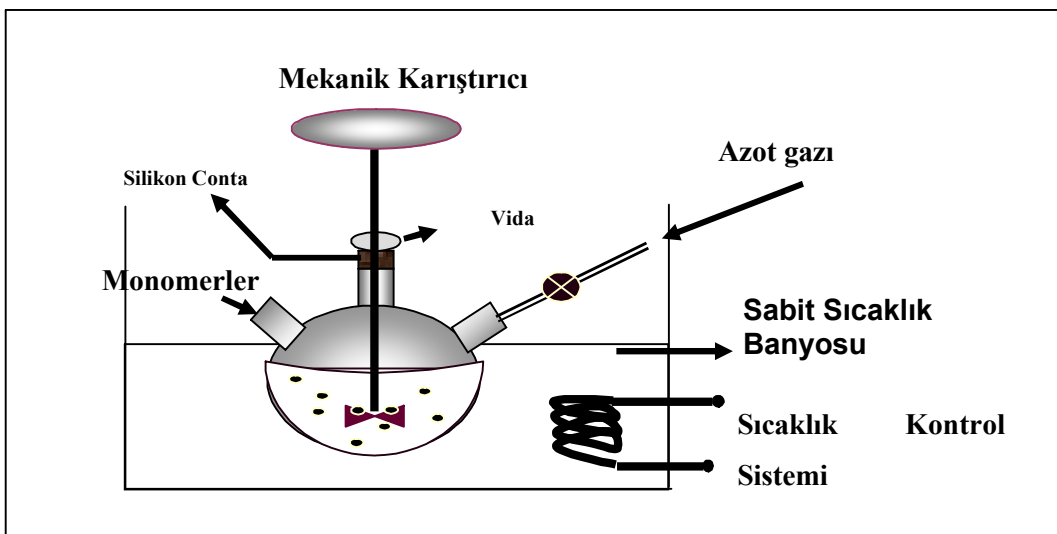
- Taramalı elektron mikroskopu (SEM): JSM 5600 .
- FTIR Spektrometresi: Shimadzu FTIR 8000 Series.
- UV-Vis Spektrofotometresi: UV-2101 PC, UV-Vis.
- Peristaltik pompa: mini pump variable flow, USA.
- Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektroskopisi: EL 9, Varian.
- 1H -NMR: JEOL GX-400 instrument (300 MHz).
- Spektroflorimetre: RI-5301 PC Spectrofluorophotometer SHIMADZU.
- VSM: Princeton Applied Research, Model 150A, USA).
- ELISA: EL 312, Bio-Tek Instruments Inc. Microplate, Bio-Kinetics Reader.
- Elektroforez: Power Station 300-220 V, V10-SCDC, BioRad Mini jel.
- SPR (Yüzey Plazmon Rezonans): GenOptics, Orsay, Fransa.
- AAS (Atomik Absorpsiyon Spektrometresi): 5EA, Carl Zeiss Technology, Zeiss Analytical Systems, Germany.
- BET (Brunnauer-Emmett-Teller): Mikrometrik ASAP 2000 Sorptometre,USA.
- Ultrasonik su banyosu (Bransonic 220, İngiltere).

Deneylerde kullanılan su deiyonize su olup yüksek akış selüloz asetat membranlı (Barnstead D2731) ters osmos ünitesi olan Barnstead (Dubuque.IA) RO pure LP[®] ve takiben Barnstead 3804 NANOPURE[®] organik kolloid uzaklaştırılması ve iyon değişim dolgu yatak sistemiyle elde edildi.

3.3. Manyetik Poli(GMA) Mikropartiküllerin Sentezlenmesi

Dispersiyon polimerizasyonu, sıcaklık kontrollü 500 mL'lik hacme sahip polimerizasyon reaktöründe gerçekleştirildi. Monomer faz, 40 mL GMA ve 1.0 g manyetit (Fe_3O_4 20-50 nm) partiküllerinden oluşmaktadır. Bu ortama 250 mg AIBN (başlatıcı) eklendi ve ultrasonik su banyosunda AIBN çözününceye kadar 5 dakika 200 W'da tutuldu. 4.0 g Poli(vinil piroolidon) % 50 (v/v) etanol su çözeltisinde çözüldükten sonra polimerizasyon reaktörüne kondu. Üzerine monomer faz eklenirken 500 rpm'de 5 dk. karıştırıldı ve daha sonra sıcaklık başlatıldı. Daha sonra reaktör azot kabarcığına 5 dk. bekletildi. Daha sonra reaktör oda sıcaklığında çalkalayıcı su banyosuna kondu. Reaktör sıcaklığı 65 °C'a çıktığında polimerizasyonun başlama zamanı tutuldu. Bundan sonra polimerizasyona azot atmosferinde 65 °C'ta 500 rpm'de 4 saat devam edildi (Şekil 3.1). Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, reaktör oda sıcaklığına soğutuldu ve dispersiyon ortamının uzaklaştırılması için 5000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi. Manyetik poli(GMA) 10 mL etanol'de 3 defa yıkandı ve aynı şekilde santrifüjlendi. Böylece bağlanmayan monomerler ve diğer bileşenler uzaklaştırılmış oldu. Son olarak su ile yıkandı.

M-poli(GMA)'dan sızan manyetiti hesaplamak için 250 mg partikül 10 mL sızdırma ortamına kondu ve çalkalayıcıda 24 saat çalkalandı. Ortama sızan manyetit miktarı Grafit Fırını Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinden hesaplandı. Üç çeşit sızdırma ortamı seçildi: % 50 asetik asit çözeltisi (pH 2.0), 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) ve 50 mM Sodyum Sitrat / NaOH tampon çözeltisi (pH 12.0).



Şekil 3.1. M-poli(GMA) mikropartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan polimerizasyon sistemi.

3.4. Manyetik poli(GMA) Mikropartiküllerin Karakterizasyonu

3.4.1. Yüzey Alanı Ölçümü

Mikropartiküllerin spesifik yüzey alanı Brunnauer-Emmett-Teller (BET) aleti ile ölçüldü. Polimer mikroküreler vakum altında 100 °C’de bir gece kurutuldu ve sonra ölçüm alındı.

3.4.2. Şişme Testi

M-poli(GMA) mikropartiküllerin şişme oranının bulunması için önce kuru partikül tartıldı daha sonra distile su ilave edilerek izotermal su banyosunda (25 ± 0.5 °C) iki saat bekletildi. Daha sonra mikropartiküller sudan alınarak, filtre kağıdıyla kurulandı ve tartıldı. Mikropartiküllerin su içeriği aşağıdaki eşitlikle hesaplandı.

$$\text{Şişme oranı} = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100 \quad [3.1]$$

W_o , W_s sırasıyla suya konmadan önceki ve suya konduktan sonraki partikül kütleleridir.

3.4.3. Yüzey Morfolojisi

Partiküllerin morfolojisi ve büyüklüğü taramalı elektron mikroskopu ile ölçüldü . M-poli(GMA) küreler oda sıcaklığında kurutuldu ve 100 Å civarında ince altın tabaka ile vakumlandı ve x1000 ölçekle elektron mikroskopunda fotoğraflandı. Partikül boyutu SEM’de alınan en az 100 mikropartiküllerin ölçülmesiyle hesaplandı.

3.4.4. Epoksi Grup Analiz

Sentezlenen manyetik poli(GMA) mikropartiküllerin epoksi grup içeriği perklorik asit titrasyon yöntemiyle hesaplandı. M-poli(GMA) mikropartiküller 0.1 mol L⁻¹ asetik asitte ve tetraetil amonyum bromürde çözüldü ve 0.1 mol L⁻¹ perklorik asit çözeltisiyle kristal viyole indikatörünün rengi mavi yeşile dönünceye kadar titre edildi.

3.4.5. ¹H NMR Analizi

M-poli(GMA) mikropartiküllerin ¹H-NMR spektrumunda, döteryumsuz CHCl₃ çözeltisi iç referans olarak kullanıldı. Kimyasal kayma CHCl₃’e bağlı olarak ppm (δ) olarak kaydedildi.

3.4.6. FTIR Analizi

Fourier Dönüşümlü İnfrared (FTIR) ölçümleri, m-p(GMA) mikropartikül vakum altında KBr kullanılarak pelet haline getirilerek normal transmisyonda dedektöründe 4000-400 cm^{-1} aralığında, 2 cm^{-1} rezolusyonda ortalama 64 tarama üzerinden yapıldı.

3.4.7. Manyetik Özellikler

M-poli(GMA) mikropartiküllerin manyetit içerisindeki hacim fraksiyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$\Phi = \frac{\rho_C - \rho_M}{\rho_C - \rho_A} \quad [3.2]$$

ρ_C , ρ_M ve ρ_A sırasıyla manyetik olmayan poli(GMA)'nın, Fe_3O_4 nanopartikül manyetitin ve m-poli(GMA)'nın yoğunluklarıdır.

Polimerik yapıdaki manyetik partiküllerin varlığına elektron spin rezonans spektrofotometresi ile bakıldı. Örneğin manyetizasyonu titreşimli örnek manyetizasyonu ile ölçüldü. g faktörü ise aşağıdaki eşitlik yardımı ile bulundu.

$$g = \frac{h\nu}{\beta H_r} \quad [3.3]$$

h ; Planck sabiti ($6.626 \cdot 10^{-27}$ erg.s), β ; evrensel sabit $9.274 \cdot 10^{-21}$ erg/Gs), ν ; frekans ($9.707 \cdot 10^9$ Hz), H_r ; manyetik alan rezonansı (Gs).

3.5. Konkanavalin A ile İlgili Çalışmalar

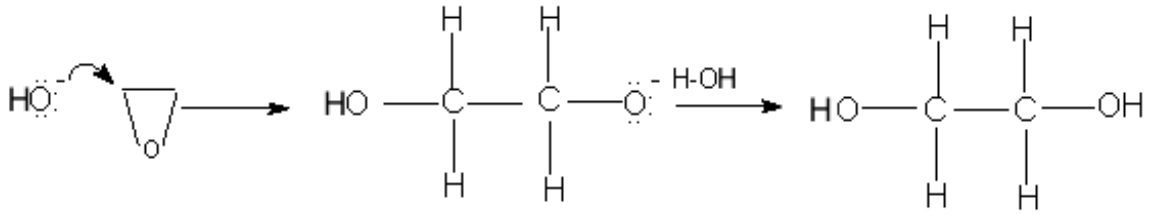
3.5.1. Konkanavalin A Optimizasyonu

Farklı derişimlerde ($0-5.0 \text{ mg mL}^{-1}$) 5.0 mL konkanavalin A çözeltileri daha önceden 4.0 M NaOH çözeltilisinde 4 saat etkileştirilerek epoksi grubu açılıp bu ortamdan uzaklaştırılıp dengeye getirildikten sonra farklı sıcaklık aralıklarında (4, 20, 37 °C), farklı pH fosfat (7.0-9.0) tampon aralıklarında ve farklı tuz derişimlerinde (0.1-1.0 M NaCl) uygun ortamda (100 μM CaCl_2 , 100 μM MnCl_2 ve %2'lik glukoz içeren) kesikli sitemde 24 saat manyetik karıştırıcıda döndürüldü. Başlangıç Konkanavalin A miktarı ve inkübasyon sonrası Konkanavalin A miktarı 280 nm'de U.V spektrofotometresinde bakıldı. Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen BSA çözeltilisi ile yapıldı.

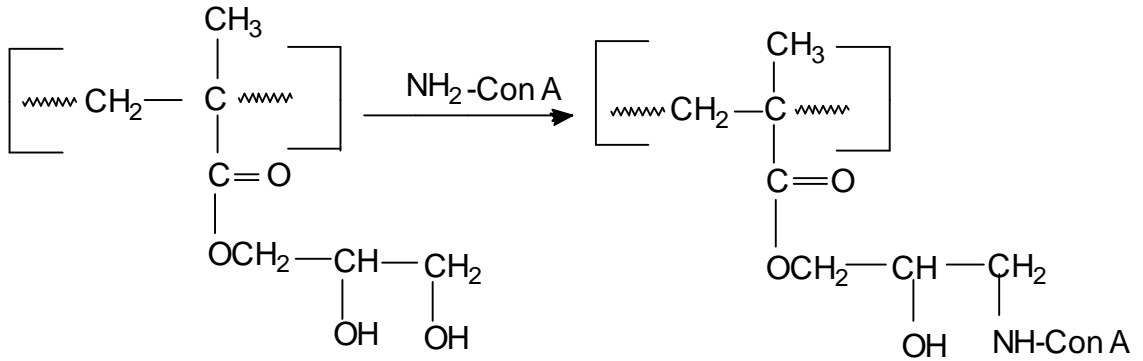
3.5.2. Konkanavalin A İmmobilizasyonu

Yaklaşık 1.0 g hazırlanan partikül 4 saat 4.0 M NaOH çözeltisi ile manyetik karıştırıcıda döndürülerek epoksi grupları açıldı. Partikül dengeye getirildikten sonra santrifujlenen partikül 4 °C’de 25 mL 100 µM CaCl₂, 100 µM MnCl₂ ve % 2’lik glukoz içeren, pH: 7.4 fosfat tamponunda 24 saat manyetik karıştırıcıda döndürüldü. Etkileşim Konkanavalin A molekülündeki serbest amin grupları ile partiküldeki hidroksil grupları arasında gerçekleşmektedir (Şekil 3.2).

(a)



(b)



Şekil 3.2. Konkanavalin A immobilizasyonu kimyasal tepkimesi a) Epoksi halkasının açılma tepkimesi, b) Epoksi halkası açılmış m-poli(GMA)’ya Konkanavalin A’nın bağlanması (Solomons, 1996).

Başlangıç Konkanavalin A miktarı ve inkübasyon sonrası Konkanavalin A miktarı 280 nm’de UV spektrofotometresinde bakıldı. Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen BSA çözeltisi ile yapıldı. İnkübasyon öncesi ve sonrası arasındaki derişim farkı, ortam hacmi ile çarpılıp ortamdaki partiküle bölünmesi ile bağlanan Konkanavalin A miktarı hesaplandı (Eşitlik 3.4). İnkübasyondan sonrası Konkanavalin A bağlı mikropartiküller süzöldü ve distile su ile yıkandı. Fiziksel olarak bağlanan Konkanavalin A moleküllerini uzaklaştırmak için fosfat tamponu ile birkaç defa yıkandı. Süzöntüdeki miktarlar tekrar ölçüm alınarak önceki ölçümlerden çıkarıldı.

$$Q = [(C_i - C_f) \times V] / m \quad [3.4]$$

Q: adsorblanan Con A (mg mL^{-1}), m: ortamdaki partikül miktarı (g), C_i : partikül konmadan önceki Con A derişimi (mg mL^{-1}), C_f : inkübasyon sonrası Con A derişimi (mg mL^{-1}), V: sulu fazın hacmi (mL).

Mikropartiküllerden ligand sızması olup olmadığına fosfat tamponu ile 24 saat etkileştirilerek UV Spektrofotometresi ile 280 nm’de ölçöldü.

3.5.3. Konkanavalin A İmmobilizasyonu için Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon izotermi protein molekülünün adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için kullanıldı. Bu, iki faz dengedeyken, protein derişimi ile destek arasındaki ilişkiyi gösterir.

Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin sabit sayıdaki, her biri sadece bir molekül tutabilen, belirli bölgelere adsorblandığını farzeder. Bu bölgeler aynı zamanda enerjice eşit ve her biri diğerine eşit sayılır, böylece komşu bölgelerce adsorblanan moleküller arasında etkileşim yok sayılır.

Kesikli sistem ve sürekli sistem çalışmaları süresince, adsorpsiyon izotermleri adsorpsiyon özelliklerini görmek için kullanıldı. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 3.5 ile açıklandı:

$$Q = Q_{\max} \cdot b \cdot C_{\text{den}} / (1 + bC_{\text{den}}) \quad [3.5]$$

Q; adsorbente bağılı Con A derişimi (mg g⁻¹), C_{den}; çözeltilde denge Con A derişimi (mg mL⁻¹), b; langmuir sabiti (mL mg⁻¹) ve Q_{max}; maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg g⁻¹). Bu denklem doğrusallaştırıldı ve şu formül elde edildi:

$$1/q = [(1/Q_{\max} \cdot b)] [1/C_{\text{den}}] + [1/Q_{\max}] \quad [3.6]$$

1/C_{den}'ye karşı 1/Q uygulanırsa, grafikten kesim 1/Q_{max} ve eğim 1/Q_{max}.b değerlerini verir.

Diğer iyi bilinen izoterm ise, adsorpsiyonu açıklamada sıklıkla kullanılan Freundlich izotermidir. Bu izoterm heterojen yüzeylerin adsorpsiyonunu açıklayan Langmuir izoterminin diğer şeklidir. Adsorplanan protein miktarı, bütün bağlanma bölgelerine olan adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi, tersinir adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabaka oluşumuyla sınırlanmaz. Bunun basit ifadesi şu şekildedir:

$$Q_{\text{den}} = K_F (C_{\text{den}})^{1/n} \quad [3.7]$$

K_F ve n Freundlich sabitleridir. n eğimden bulunurken, K_F kesimin anti ln değerine eşittir.

Dubin-Radushkevich (DR), adsorpsiyonun yüzey gözenekliliği ve gözenek hacmi ile ilgili olduğu varsayımını esas alan bir modeldir. Bu model, adsorpsiyonu enerjetik açıdan da değerlendirir. Adsorplanan miktar (Q; mol kg⁻¹);

$$Q = X_{\text{DR}} e^{-(K_{\text{DR}} \varepsilon^2)} \quad [3.8]$$

Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (X_{DR}; mol kg⁻¹), ortalama adsorpsiyon enerjisi (E) ile ilgili aktivite katsayısı (K_{DR} ; mol² J²) ve Polanyi potansiyelinin (ε) fonksiyonudur. Polanyi potansiyeli ise;

$$\varepsilon = RT \ln(1 + 1/C_d) \quad [3.9]$$

denkliğinden hesaplandı; R, ideal gaz sabiti (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) ve T ise mutlak sıcaklıktır. Modelin deneysel verilere uygulanması ile çizilen (Q - ε²) grafiğinden elde edilen K_{DR} değeri kullanılarak, bir mol iyonun sonsuz uzaklıktan katı yüzeyine

getirebilmek için gerekli olan enerji olarak tanımlanan ortalama adsorpsiyon enerjisi (E);

$$E = (-2 K)^{-0,5} \quad [3.10]$$

eşitliğinden hesaplandı (Krishna ve ark., 2000 ; Cestari ve ark., 2006).

3.6. Kesikli Sistem İnsan-IgG Adsorbsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

3.6.1. pH Taraması

M-p(GMA)-Con A mikropartiküllerin IgG adsorbsiyonu farklı pH tamponlarında bakıldı. pH 4.5, 5.0, 5.5 asetat tamponu ile 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 fosfat tamponları kullanılarak 0.5 mg mL⁻¹ IgG derişimleri hazırlandı ve 25 °C'de 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ölçümler 280 nm UV spektrometresi kullanılarak alındı. Adsorblanan IgG miktarı (Adsorpsiyon kapasitesi) ise Eşitlik 3.11 kullanılarak hesaplandı.

$$Q = [(C_i - C_f) \times V] / m \quad [3.11]$$

Q: adsorblanan IgG (mg mL⁻¹), m: ortamdaki partikül miktarı (g), C_i: partikül konmadan önceki IgG derişimi (mg mL⁻¹), C_f: inkübasyon sonrası IgG derişimi (mg mL⁻¹), V: sulu fazın hacmi (mL).

3.6.2. Başlangıç Derişim Taraması

M-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerin maksimum adsorbsiyon kapasitelerini bulmak için başlangıç IgG derişim aralığı (0.1-2.0 mg mL⁻¹) olarak kullanıldı. pH 6.0 tamponunda 25 °C'de 2 saat manyetik karıştırıcıda döndürüldü. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile adsorbsiyon kapasitesi Eşitlik 3.11 yardımı ile hesaplandı.

3.6.3. Zaman Etkisi

M-p(GMA)-Con A mikropartiküllerin zaman etkisini incelemek için başlangıç IgG derişim aralığı 0.1-2.0 mg mL⁻¹ olarak alındı ve pH 6.0 fosfat tamponunda 25 °C'de (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 dk.) zaman aralıklarında manyetik karıştırıcıda döndürüldü. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile Eşitlik 3.11 kullanılarak partikülün adsorpsiyon kapasitesi hesaplandı.

3.6.4. İyonik Şiddet Etkisi

0.5 mg mL⁻¹ IgG çözeltilerine 0.01-0.1 M aralığında değişen derişimlerde NaCl eklenerek 25 °C’de 2 saat manyetik karıştırıcıda döndürüldü. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile Eşitlik 3.11 kullanılarak partikülün adsorbsiyon kapasitesi bulundu.

3.6.5. Sıcaklık Taraması

0.5 mg mL⁻¹ IgG çözeltileri 4, 15, 25, 35, 45, 55 °C’de 2 saat çalkalayıcı su banyosunda çalkalandı. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile Eşitlik 3.11 kullanılarak partikülün adsorbsiyon kapasitesi bulundu.

3.6.6 . Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

IgG desorpsiyon çalışmaları %50 etilen glikol + glukoz içeren tampon çözeltide gerçekleştirildi. IgG adsorblanmış manyetik poli(GMA) mikropartiküller desorpsiyon ortamına konuldu ve 100 rpm’de 25 °C’de 1 saat karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki son IgG derişimi spektrofotometreyle hesaplandı. Desorpsiyon oranı mikropartiküle adsorblanan ve desorplanan IgG miktarından hesaplandı.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan IgG}}{\text{Adsorblanan IgG}} \times 100 \quad [3.12]$$

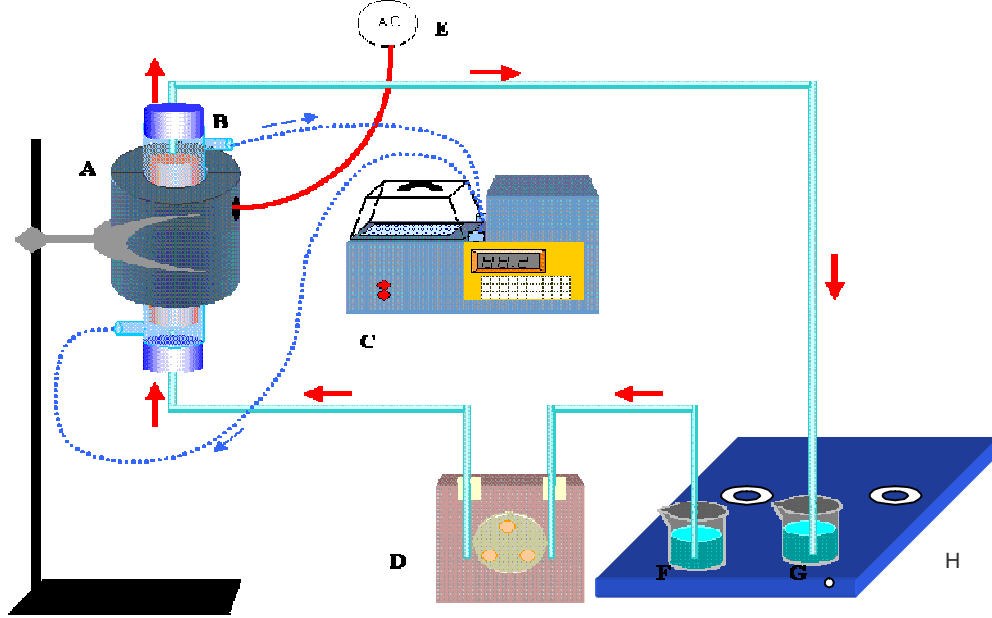
Con A immobilize manyetik poli(GMA) mikropartiküllerin tekrar kullanılabilirliğini kontrol etmek için, IgG adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı adsorbent kullanılarak 10 defa tekrar edildi.

3.7. Sürekli sistemde (MSFB) İnsan-IgG Adsorbsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

3.7.1. Akış Hızı Etkisi

1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mL dk⁻¹ gibi değişik akış hızlarında, Biorad ekonomik kolonlar (uzunluk: 6cm, çap:1cm)’ın kullanıldığı manyetik kararlı akışkan yataklı sistemlerde (MSFB) çalışılmıştır (Şekil 3.3). Bu sistem bir kolon, peristaltik pompa ve manyetik alan kullanılarak oluşturulmuştur. İnsan IgG moleküllerinin manyetik poli(GMA) mikropartiküllerine adsorpsiyonu çalışmalarında pH 7.4’de 25 °C’de 0.5 mg mL⁻¹ IgG çözeltisi kullanılmıştır. Aynı zamanda protein çözeltisi ile manyetik mikropartikül,

manyetik karıştırıcıyla 200 rpm'de karıştırılmıştır. IgG'nin akışı peristaltik pompa ile sağlanmıştır. Ölçümler 280 nm UV spektrometresi kullanılarak alınmıştır. Adsorplanan IgG miktarı ise Eşitlik 3.11 kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Sürekli Sistem (MSFB)

3.7.2. pH Taraması

M-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerin IgG adsorpsiyonu farklı pH tamponlarında bakıldı. pH 4.5, 5.0, 5.5 asetat tamponları 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 fosfat tamponları kullanılarak 0.5 mg mL^{-1} IgG derişimleri hazırlandı ve $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat MSFB sisteminde partikül ile etkileştirildi. Ölçümler 280 nm UV spektrometresi kullanılarak alındı. Adsorblanan IgG miktarı ise Eşitlik 3.11 kullanılarak hesaplandı.

3.7.3. Başlangıç Derişim Taraması

M-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerin maksimum adsorpsiyon kapasitelerini bulmak için başlangıç IgG derişim aralığı $0.1\text{-}2.0 \text{ mg mL}^{-1}$ olarak alındı. pH 6.0 tamponunda $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de MSFB sisteminde mikropartikül ile etkileştirildi. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile Eşitlik 3.11 kullanılarak mikropartikülün adsorpsiyon kapasitesi hesaplandı.

3.7.4. Zaman Etkisi

M-p(GMA)-Con A mikropartiküllerin zaman etkisini incelemek için başlangıç IgG derişim aralığı 0.1-2.0 mg mL⁻¹ olarak alındı ve pH 6.0 fosfat tamponunda 25 °C’de farklı zaman aralıklarında MSFB sisteminde partikül ile etkileştirildi. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler kullanılarak Eşitlik 3.10 yardımı ile adsorbsiyon kapasitesi hesaplandı.

3.7.5. İyonik Şiddet Etkisi

0.5 mg mL⁻¹ IgG çözeltilerine 0.01-0.1 M aralığında değişen tuz derişimleri eklenerek 25 °C’de MSFB sisteminde partikül ile etkileştirildi. İnkübasyon öncesi ve sonrası alınan ölçümler ile Eşitlik 3.11 yardımı ile adsorbsiyon kapasitesi bulundu.

3.7.6. Manyetik Alan Etkisi

0.5 mg mL⁻¹ IgG çözeltilerine 6.0, 13.0, 20.0 mT manyetik alan değerleri MSFB sisteminde uygulanıp manyetik alan etkisinin IgG adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Adsorplanan IgG miktarı Eşitlik 3.11 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

IgG desorpsiyon çalışmaları %50 etilen glikol + glukoz içeren tampon çözeltide yapıldı. IgG adsorblanmış manyetik poli(GMA) mikropartiküller desorpsiyon ortamına konuldu ve 100 rpm’de 25 °C’de bir saat karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki son IgG derişimi spektrofotometreyle hesaplandı. Desorpsiyon oranı Eşitlik 3.12 kullanılarak bulundu.

Con A immobilize manyetik poli(GMA) mikropartiküllerin tekrar kullanılabilirliğini kontrol etmek için, IgG adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı adsorbent kullanılarak 10 defa tekrar edildi.

3.8. İnsan Serumundan IgG Adsorpsiyonu

İnsan serumundan m-poli(GMA) ile IgG saflaştırılması kesikli sistemde çalışıldı. Bunun için sağlıklı taze insan kanı temiz bir tüpe alınarak 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1500 devirde 5 dk santrifüjlendi. Üstte kalan serum alınarak çalışmaya devam edildi. Kesikli sistemde; seyreltilmemiş ve 1:2, 1:4, 1:10 oranlarında 0.1 M NaCl (pH: 7.4) 25 mM fosfat tamponu ile seyreltilmiş kan, 2 saat mikropartikül ile 20 °C’de etkileştirildi. Mikropartiküle adsorblanan IgG miktarı ELISA kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile tayin edildi. İlk inkübasyon basamağında mikro kuyucuklara immobilize olan ve ortamda aşırısı bulunan poliklonal tavşan antikorlarına IgG örnekleri bağlandı.

Bağlanmayan örnekler uzaklaştırıldıktan sonra Peroksidaz etiketli anti-immüoglobulin G antikoru eklendi. İkinci yıkama işleminden sonra substrat görevi gören tetrametilbenzidin (TMB) ile inkübe edildi. Daha sonra oluşan mavi renk asidik durdurma çözeltisi eklenerek sarıya döndürüldü. Oluşan sarı rengin şiddeti ortamdaki IgG ile doğru orantılıdır. Belli derişim aralığındaki kalibratörler kullanılarak oluşturulan 4 PL lineer olmayan standart eğri ile ölçülen absorbans değerleri hesaplandı. Deneyin yapılışı açıkca aşağıdaki gibidir:

- 1) Tepkimelerin gerçekleşeceği mikro kuyucuklar 5 kere yıkama tamponu ile yıkandı.
- 2) Her kuyucuğa 200 µl 0.9% NaCl eklendi.
- 3) Üzerine 10'ar µl standart (0.0, 0.32, 0.8, 2.0, 5.0 mg L⁻¹), kontrol ve 1:10.000 seyreltilen örnekler eklendi.
- 4) Oda sıcaklığında 1 saat yatay çalkalayıcıda inkübe edildi.
- 5) Mikrokuyucuklar 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
- 6) 200 µl 1:1000 oranında seyreltilmiş konjugat (peroksidaz etiketli anti-IgG) eklendi.
- 7) Oda sıcaklığında 1 saat yatay çalkalayıcıda inkübe edildi.
- 8) Arta kalanlar boşaltıldı ve mikro kuyucuklar 5 defa yıkama çözeltisi ile yıkandı.
- 9) 200 µl substrat (TMS) her kuyucuğa eklendi.
- 10) Oda sıcaklığında 10-15 dk. inkübe edildi.
- 11) Tepkimeyi durdurmak için 50 µl asit çözeltisi eklendi.
- 12) Örnekler 450 nm'de ELISA okuyucusu ile okundu.

3.9. İnsan Serumundan IgG Desorpsiyon ve Partikülün Tekrar kullanılabilirliği

IgG'nin desorpsiyonu 2.0 M NaCl ile kesikli sistemde çalışıldı. IgG adsorplanmış m-poli(GMA) mikropartiküller bu desorpsiyon ortamına kondu ve 2 saat 20 °C'de karıştırıldı. Desorpsiyon ortamındaki IgG miktarı yukarıda anlatıldığı gibi ELISA yöntemi ile hesaplandı. Serumdaki toplam IgG miktarı ise 280 nm UV spektrofotometre kullanılarak bulundu. Desorpsiyon oranı adsorblanan IgG'nin desorpsiyon ortamındaki IgG miktarına oranının alınması ile bulundu. Partikülün kan çalışmalarındaki tekrar kullanılabilirliği aynı partikül kullanılarak, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi 5 defa tekrar edilerek yapıldı.

3.10. Saklama Kararlılığı

M-poli(GMA)-Con A partikülü 30 gün boyunca 4 °C’de sodyum azid içeren pH: 7.4 tamponunda bekletildi ve 5 gün aralıklarla adsorpsiyon kapasitesinde düşme olup olmadığına bakıldı.

3.11. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS/PAGE)

3.11.1. Elektrofrezin Hazırlanması

1- Cam plakalar etanol ve su ile temizlenip kurutulduktan sonra arasına 0.75 mm kalınlığında spacer adı verilen boşluk oluşturucular konuldu ve plakalar dik bir vaziyette plaka tutucuya yerleştirildi.

2- Plaka tutucusu içerisine kilitlenen jelsiz cam plaka sistemi jellerin döküleceği tutucu üzerine dikkatle oturtuldu.

3- Bir erlen içerisinde %8’lik ayırma jeli; 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 4.6 mL D.Su, 0.1 mL %10 SDS, 2.7 mL %30 Akrlamid, 0.005 mL TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamin) karıştırılarak hazırlandı. Karışım vakumlandıktan sonra, jel plakalara dökülmeden hemen önce TEMED eklendi.

1 mL’lik Hamilton şırıngası aracılığı ile jel karışımı cam plakalar arasına yukarıdan 2 cm boşluk bırakacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel daha polimerize olmadan üzerine su ile doyrulmuş bütanol ilave edildi ve jel en az 30 dk kadar oda sıcaklığında polimerize olması için bırakıldı. Jel polimerize olunca üzerindeki butanol tabakası su ile yıkanarak temizlendi ve jel yapımında ikinci adım olan yükleme jel yapımına geçildi.

4- %5 lik yükleme jeli hazırlamak için; 1.25 mL 0.5 M Tris.HCl (pH 6.8), 6.8 mL Deiyonize Su, 0.1 mL %10 SDS, 1.7 mL %30 Akrlamid, 0.01 mL TEMED kullanıldı. Karışımın gazı alınarak en son TEMED eklendikten sonra jel beklenmeden ayırma jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı (Laemmli, 1970; Hames ve Rickwood, 1990). Polimerizasyonun tamamlanması için bir gece bekletildi.

5- Örneklerinin Hazırlanması: Protein örnekleri 4x ‘lik bir yükleme tamponu ile karıştırılarak ve 95 °C’de 4 dk ısıtılarak hazırlandılar. Bu 4x’lik yükleme tamponu içerisinde aşağıdaki bileşenler bulunmaktadır: 1.0 mL 0.5 M Tris.HCl (pH 6.8), 4.0 mL D.Su, 1.6 mL %10 SDS, 0.80 mL Gliserol, 0.4 mL BME (Beta merkaptolanol), 0.2 mL BFB (bromofenol mavisi).

Örnekler ısıtıldıktan hemen sonra buz üzerine alındı ve deney süresince buz üzerinde tutuldu. Standart olarak insan IgG'si kullanıldı. Hazırlanan standart IgG derişimi 1 mg mL⁻¹ olarak alındı (IgG derişimin A: 1.36 verisi kullanılarak hazırlandı).

6- Jelin Yürütülmesi: Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine özenle yerleştirildi. Jeli içeren tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Yürütme tamponu (pH 8.3) çözeltisi; 12.0 g Tris, 57.6 g Glisin, 2.0 g SDS çözülerek hacmi deiyonize su ile 2.0 L'ye tamamlanarak hazırlandı. Jel, 120 ile 150 volt arasında bir voltaj seçilerek yürütüldü.

7- Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi-Jelin Boyanması: Protein elektroforezi bittikten sonra jel sistemden alındı. Jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerine sabitlendi (fiksasyon). Bunun için jel, en az 30 dk kadar fiksatif içerisinde tutuldu (%40 metanol , %10 asetik asit içeren bir çözelti). Fiksatiften geçirilen jel, az miktarda distile su ile yıkandıktan sonra boyama işlemine alındı.

8- Coomassie Brilliant Blue (CBB) ile boyama: CBB'nin % 0.25'lik çözeltisi fiksatif içerisinde hazırlandı. Bir gece boya içerisinde bekletildi. Boya jelin yüzeyini tamamen boyadığı için protein olmayan bölgelerden uzaklaştırılması gerekti, bu amaçla jel birkaç kez %7'lik asetik asit çözeltisi ile yıkandı.

3.12. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Yüzey Modifikasyonu

3.12.1. Altın yüzeyin aktivasyonu

Altın yüzeyin temizlenmesi ve hidrosillenmesi: Altın kaplı (50 nm kalınlığında) SPR çip (25 × 12.5 mm), modifikasyonundan önce deiyonize su ve alkol ile 3 kere yıkandı, vakum etüvünde 40 °C'de 200 mmHg'da azot atmosferinde kurutuldu. SPR çipin altın yüzeyi 20 mL bazik pirana çözeltisi (3:1 Amonyak, hidrojen peroksit) ile 10 dk yıkandı. Daha sonra SPR çip su ve etanolle 3 kere yıkanarak vakum etüvünde 40 °C'de 200 mmHg'da azot atmosferinde kurutuldu.

Con A (0.2 mg mL⁻¹, pH: 7.4 fosfat), çözeltisi içerisine, oligopeptit üzerinde bulunan serbest karboksil gruplarının aktivasyonu için N-etil-N'-(dimetilaminopropil) karbodiimid (0.1 mg mL⁻¹) eklendi ve 20 °C'de 5 saat bekletildi. Aktivasyon süresinden sonra, Con A çözeltisi, OH⁻ ile kaplanmış altın yüzeye döküldü ve 24 saat bekletilerek karboksil ucundan yüzeye immobilizasyon gerçekleştirildi.

3.12.2. YüzeY Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri

SPR çiplerin karakterizasyonu için yüzeY plazmon eğrileri yüzeY plazmon rezonans sistemi SPRiLab ile alındı. Plazmon eğrilerinin alınması sırasında SPRview yazılımı kullanıldı. Görüntü alınması sırasında ışığın SPR çipe ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-60.7°) ışığın % kırılma değerleri alındı. Elde edilen değerler SPR1001 yazılımı kullanılarak incelendi ve yüzeY plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirildi.

3.12.3. SPR Çiplerle Kinetik Analizler

GenOptics SPRiLab sistemi analiz çalışmalarında kullanıldı. Sistem, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır. Con A immobilize film halinde hazırlanan SPR çip, kinetik analiz çalışmalarında kullanıldı. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: SPR çip yüzeyi önce 50 mM NaOH çözeltisi (50 mL, 1 mL dk⁻¹ akış hızında) ile yıkandı. Daha sonra, 50 mL deiyonize su ile tekrar yıkandı. Sistemden su geçerken yüzeY plazmon eğrileri alındı ve rezonans kırınma açısı belirlendi. Cihaz bu kırınma açısına ayarlandı ve kinetik çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirildi. Kinetik analiz çalışmalarında SPRview yazılımının kinetik görüntüleme programı kullanıldı. Bu program, dakikada yaklaşık 150 % kırılma miktarı değerini ölçmekte ve anlık olarak % kırılma miktarı değişimini gözlenmesini sağlamaktadır. Plazmon eğrileri alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden 5 dakika süreyle su geçirilmeye devam edildi. Bu dengeleme basamağında sonra, 0.1-1.0 mg mL⁻¹ derişimlerde IgG çözeltisi (25 mL, 1.5 mL dk⁻¹ akış hızı) sisteme verildi. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlendi ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 30 dakika) sisteme 1.0 M etilen glikol çözeltisi (25 mL, 1.5 mL dk⁻¹ akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirildi. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR çip su ile yıkandı. Farklı seyreltmelerdeki örnekler verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlandı. Elde edilen kinetik verileri, SPR1001 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

SPR biyosensörlerde, rezonans sinyalindeki değişimler % kırınma, ΔR , Rezonans birimi (RU) gibi farklı şekillerde ifade edilebilir. Bu değişimler zaman fonksiyonu olarak izlenir ve sensogramlarda gösterilir. Bu verilerden, çip ile analit arasındaki bağlanma kinetik sabitleri hesaplanabilir. Analit (A) ve SPR çip (B) arasında akış hücrelerinde oluşan AB kompleksinin oluşumu basit olarak şu şekilde gösterilebilir;



Burada; k_m analitin yüzeye ve tekrar analite kütle taşınım hız sabiti (her iki yönde de aynıdır); k_a ve k_d kompleks oluşum hız sabitleridir.

İdeal koşullar altında, ne analitin sensör yüzeyine taşınımı ne de yüzeyden çözeltiliye taşınımı bağlanma kinetiğini etkilememektedir. Bu durum, taşınımın bağlanmaya göre daha hızlı gerçekleştiği durumlarda gerçekleşmektedir. Böylelikle analit derişimi çözeltilide sabit kalmakta ve ayrıca başlangıç derişimi ($[B]_o$) etkilenmemektedir (Glaser, 1993). Bu koşullar altında kompleks oluşum hızı şu şekilde tanımlanır:

$$d[AB]/dt = k_a[A]([B]_o - [AB]) - k_d[AB] \quad [3.14]$$

Burada; $[AB]$ bağlanan analit miktarı; $[A]$ serbest analit miktarı; $[B]_o$ sensörün toplam ligand yoğunluğudur. İleri ve geri yöndeki hız sabitleri aşağıda anlatılan iki farklı yaklaşımla hesaplanmaktadır.

a) Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_o$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlelerin derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı psödo-birinci derece koşulları altında bağlanma, Eşitlik 3.14 ile ifade edildi:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad [3.15]$$

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; R ve R_{maks} bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal; C analit derişimi (mg mL^{-1}), k_a bağlanma hız sabiti (mL (mg.s)^{-1}) ve k_d , ayrılma hız sabiti (s^{-1})'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL mg^{-1}), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplandı ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilirse:

$$\Delta R_{\text{denge}} / C = K_A \Delta R_{\text{max}} - K_A \Delta R_{\text{denge}} \quad [3.16]$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{\text{denge}}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplandı. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

b) Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 3.15 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{max}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad [3.17]$$

eşitliği elde edildi.

Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{max} değeri biliniyorsa, tek bir sensogram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erıştirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerekli olduğu için R_{max} 'un deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, bir çok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensogramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad [3.18]$$

S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_o / \Delta R_t) = k_d (t - t_o) \quad [3.19]$$

Burada; ΔR_o ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_o ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir (Lin ve ark., 2005).

3.12.3.1. Denge İzoterm Modelleri

Con A immobilize SPR çip ile IgG arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \left\{ \frac{\Delta R_{\max} [A]}{K_D + [A]} \right\} \quad [3.20]$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{\max} [A]^{1/n} \quad [3.21]$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \left\{ \frac{\Delta R_{\max} [A]^{1/n}}{K_D + [A]^{1/n}} \right\} \quad [3.22]$$

Burada; ΔR_{\max} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge} ; denge halindeki SPR sinyal kayması; $[A]$, analit derişimi; K_A , bağlanma denge sabiti; K_D , ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

3.13. Spektroflorimetrik Ölçüm

Adsorbsiyon desorpsiyon çalışmalarında desoplanan IgG'nin konformasyonel değişikliğinin olup olmadığına, denature IgG, doğal IgG ve desorblanan IgG kullanarak spektroflorimetre ile bakıldı. Ölçümlerde; Uyarılma Dalgaboyu= 280 nm, Emisyon Dalgaboyu aralığı= 300-400 nm, Bant aralığı= 5nm olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. M-poli(GMA) eşboyutlu mikropartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Yüzey Alanı

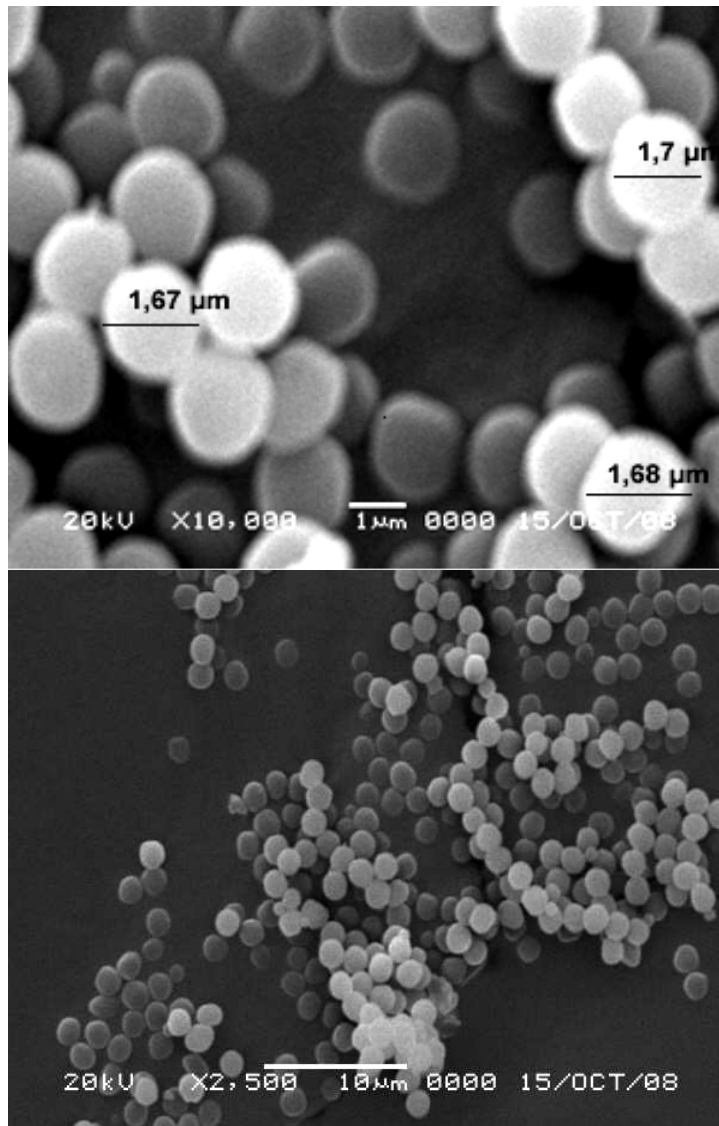
M-poli(GMA) mikropartiküllerin spesifik yüzey alanı $3.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ olarak hesaplandı.

4.1.2. Şişme Testi

Maksimum şişme oranı %52 olarak bulundu.

4.1.3. Yüzey Morfolojisi

Oluşan mikropartiküllerin morfolojisi ve yapısı SEM fotoğrafı ile alındı ve Şekil 4.1’de sunuldu.



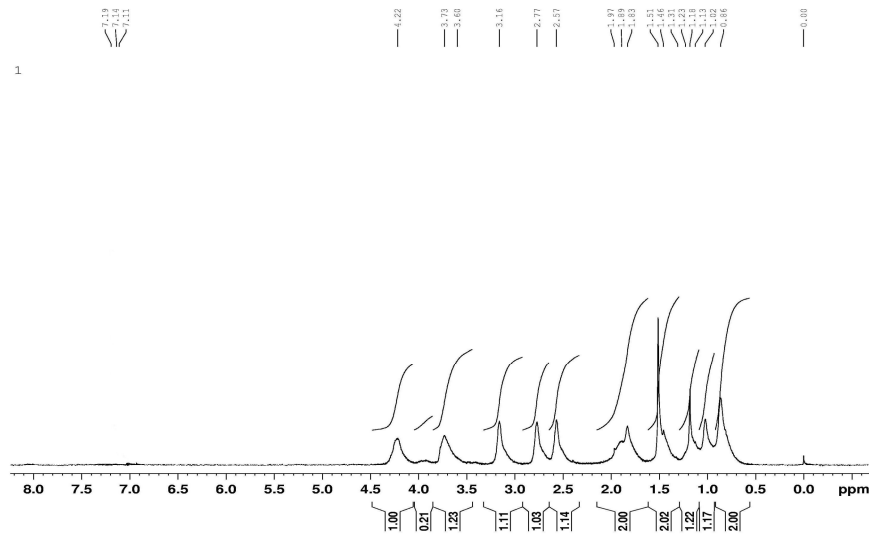
Şekil 4.1. Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikrografi

4.1.4. Epoksi Grup Analizi

Teorik olarak hesaplanan epoksi grubu (ortamdaki GMA'ya göre hesaplanan) 4.2 mmol g⁻¹'dir. M-poli(GMA) mikropartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu ise perklorik asit titrasyonu ile hesaplanmış olup teorik miktardan farklı olarak 3.46 mmol g⁻¹ bulunmuştur.

4.1.5. ¹H-NMR Analizi

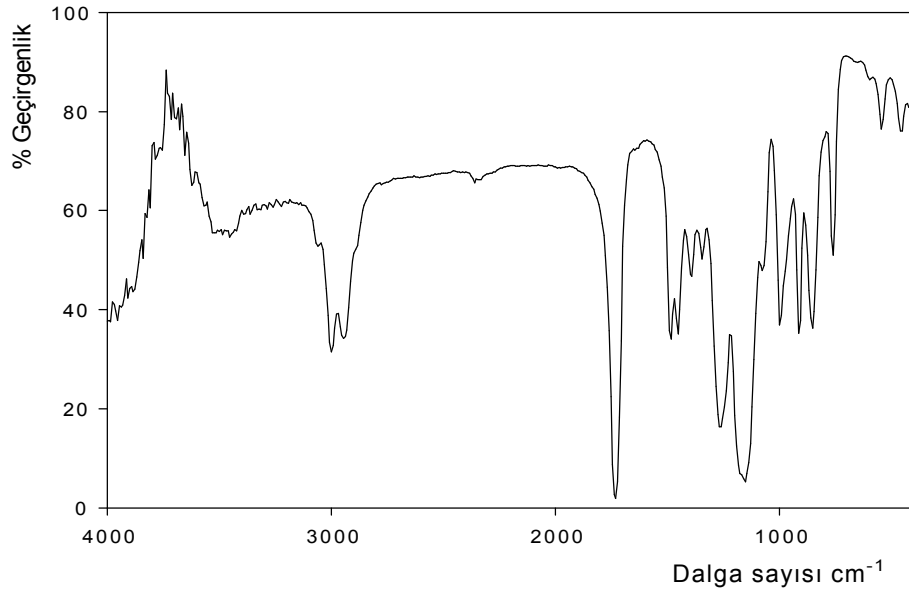
Şekil 4.2'de görüldüğü üzere -CH₂- fonksiyonel grubunun kimyasal kayma değeri 0.6-1.2 ppm, epoksi halkasının kimyasal kayma değeri 2.5-3.4 ppm, -OCH₂ fonksiyonel grubununki ise 3.5-4.5 ppm değerlerinde pik vermektedir.



Şekil 4. 2. Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin ¹H-NMR analizi

4.1.6. FTIR Analizi

Şekil 4.3'te m-poli(GMA)'nın FTIR spektrumu sunulmuştur. 907 cm⁻¹'de epoksi grubunun titreşim bandı görünmektedir. Bu band mikropartiküldeki oksiran grubunun varlığını kanıtlamaktadır. 1740 cm⁻¹ C=O (ester) gerilme titreşimi, 1244 cm⁻¹ epoksi halkasındaki simetrik halka gerilme titreşimi, 760 cm⁻¹ epoksi halkasındaki C-H eğilme titreşimini göstermektedir.



Şekil 4.3. Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin FTIR spektrumu

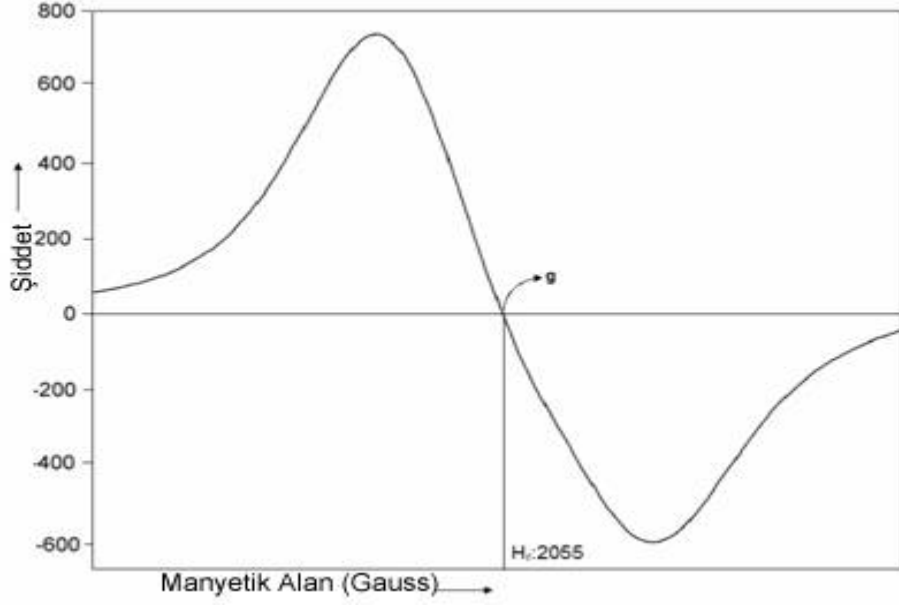
4.1.7. Manyetik Özellikler

M-poli(GMA) mikropartiküllerin sulu yoğunluğu 25 °C’de 1.14 g cm⁻³ olarak ölçüldü. Aynı işlemle, Fe₃O₄ partiküllerinin manyetik yoğunluğu 25 °C’de 1.97 g cm⁻³ olarak bulundu. Manyetik olmayan partiküllerin yoğunluğu ise 1.08 g cm⁻³ olarak bulundu.

Dolayısıyla yoğunluk verileri Eşitlik 3.2’de yerine yazıldığında manyetik mikropartiküller içerisinde m-poli(GMA)’nın jel hacim fraksiyonu 0.955 olarak bulundu. Diğer bir ifade ile, nanopartikül manyetitin m-poli(GMA)’daki hacim fraksiyonu 0.045’dir.

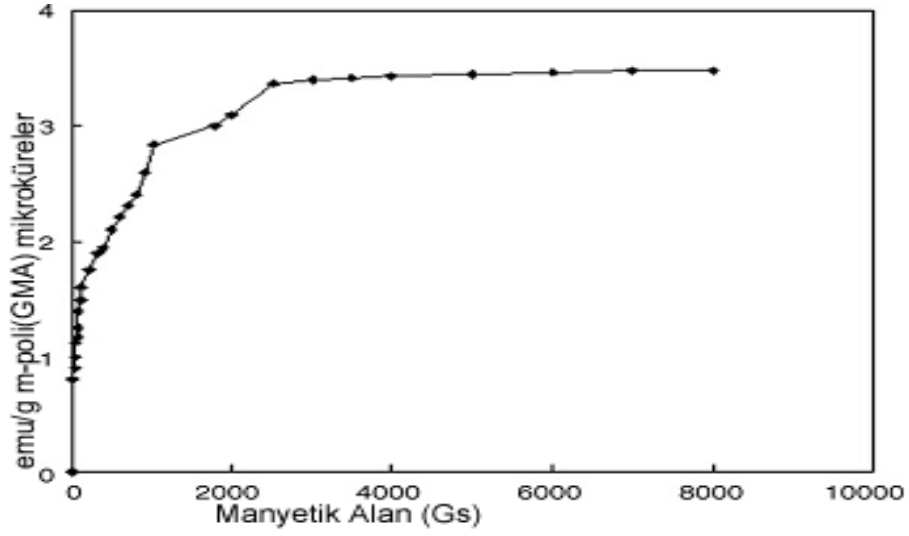
Manyetik alana karşı (Gauss) manyetik pik yoğunluğu Şekil 4.4’de görülmektedir. Manyetik mikropartiküllerin pratik uygulamalardaki önemli parametresi manyetizasyondur. Polimer yapıda varolan manyetik nanopartikül varlığı ESR ile anlaşılmaktadır. Uygulanan dış manyetik alan örnekte iç manyetik alan oluşmasına neden olmuştur, bu da dış manyetik alana eklenir ya da çıkarılır. Elektronik manyetik moment tarafından üretilen bölgesel manyetik alan dış manyetik alana eklenerek etkin alan bulunur.

$$H_{\text{etkin}} = H_{\text{dış}} + H_{\text{bölgesel}} \quad [4.1]$$



Şekil 4.4. Eşboyutlu m-poli (GMA) mikropartiküllerin ESR spektrumu

Şekil 4.5’de ise polimerik yapının manyetik özellikleri elektromanyetik ünite kullanılarak (EMU) gösterildi. Manyetik mikropartiküllerin manyetik alandaki davranışlarını göstermek için titreşimli magnetometre kullanıldı ve H_r dış manyetik alan rezonansı olarak tanımlandı.

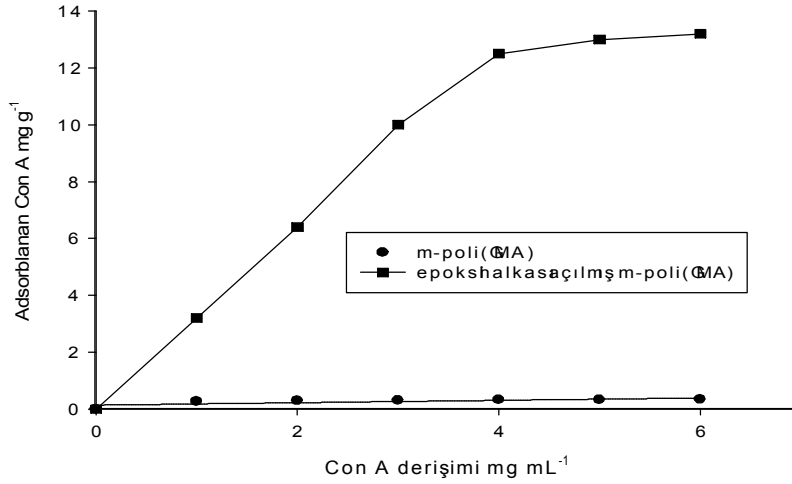


Şekil 4.5. Eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküllerin manyetik davranışı

4.2. Konkanavalin A Optimizasyonu

4.2.1. Ligand Değişiminin Etkisi

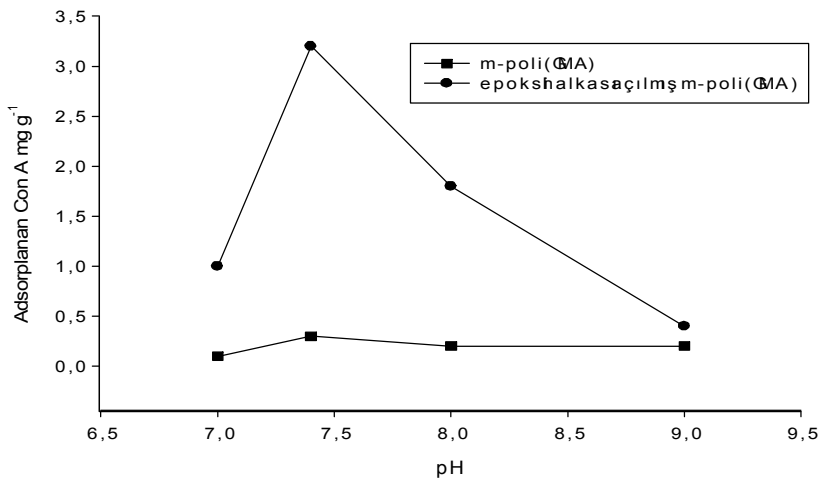
Şekil 4.6'dan görüldüğü gibi ilk başta derişimin artmasıyla artan adsorpsiyon, Konkanavalin A molekülünün artık bağlanma merkezlerinin dolmasıyla birlikte doygunluğa ulaşmaktadır. Maksimumum 4.0 mg mL^{-1} Con A derişiminde, adsorpsiyon gram partikül başına 12.5 mg değerinde platoya ulaşmaktadır.



Şekil 4.6. Con A'nın m-poli(GMA) eş boyutlu mikropartiküllere adsorpsiyon izotermi. pH: 7.4; T: 4°C ve inkübasyon süresi 24 saat.

4.2.2. pH Etkisi

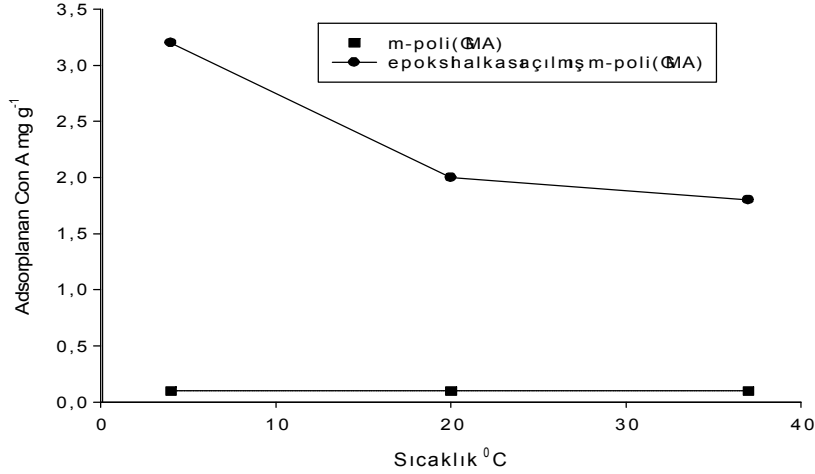
Şekil 4.7'de pH'ın Con A adsorpsiyonuna etkisini gösteren grafik sunulmaktadır. Maksimum Con A adsorpsiyonu 3.2 mg g^{-1} olarak pH: 7.4'de belirlendi.



Şekil 4.7. Con A adsorpsiyonuna pH etkisi . Con A derişimi: 1.0 mg mL^{-1} ; T: 4°C .

4.2.3. Sıcaklık Etkisi

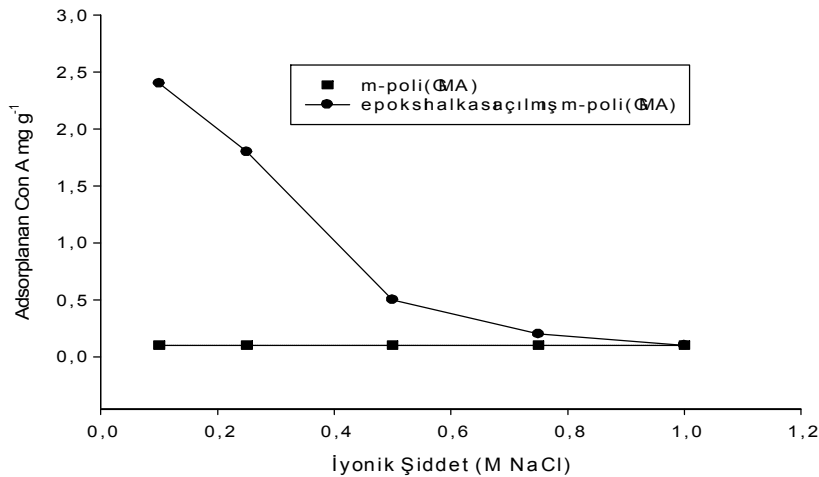
Şekil 4.8’de görüldüğü gibi 4 °C’de adsorpsiyon 3.2 mg g⁻¹ iken sıcaklık arttıkça bu değer 1.8 mg g⁻¹ değerine düşmektedir.



Şekil 4.8. Con A adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. pH: 7.4; Con A derişimi: 1.0 mg L⁻¹.

4.2.4. İyonik Şiddet Etkisi

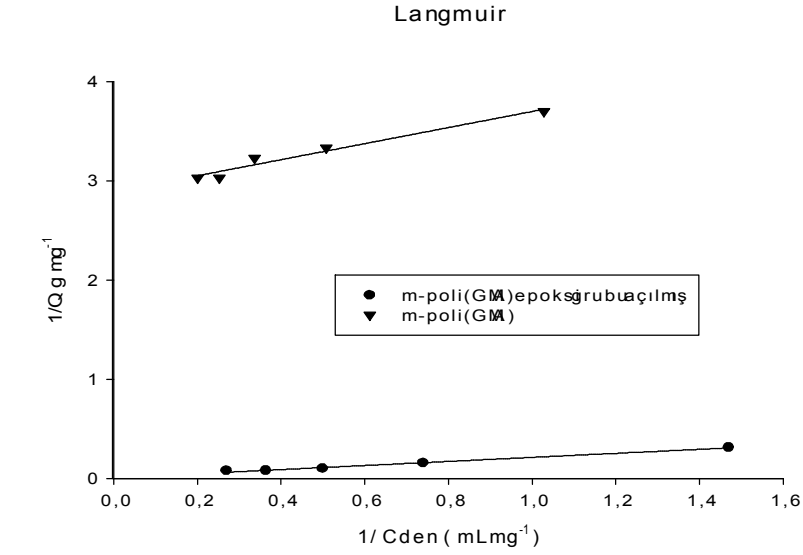
Şekil 4.9’da sunulduğu gibi düşük tuz derişimleri maksimum adsorpsiyon 2.4 mg g⁻¹ iken tuz derişiminin 1.0 M olduğu noktada adsorpsiyon kapasitesi 0.1 mg g⁻¹ değerine düşmüştür.



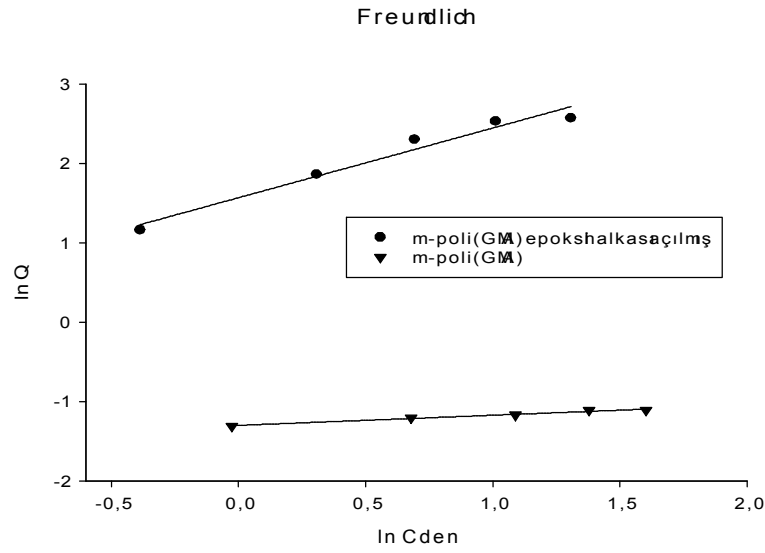
Şekil 4.9. Con A adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi. T: 4 °C; Con A derişimi: 1.0 mg mL⁻¹; pH: 7.4.

4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Şekil 4.10 a ve b grafiklerinde Con A'nın adsorpsiyon izoterm modelleri görülmektedir. Şekil 4.11'de ise Dubinin- Radushkevich grafiği çizilerek bağlanmanın kimyasal olup olmadığı araştırılmıştır.

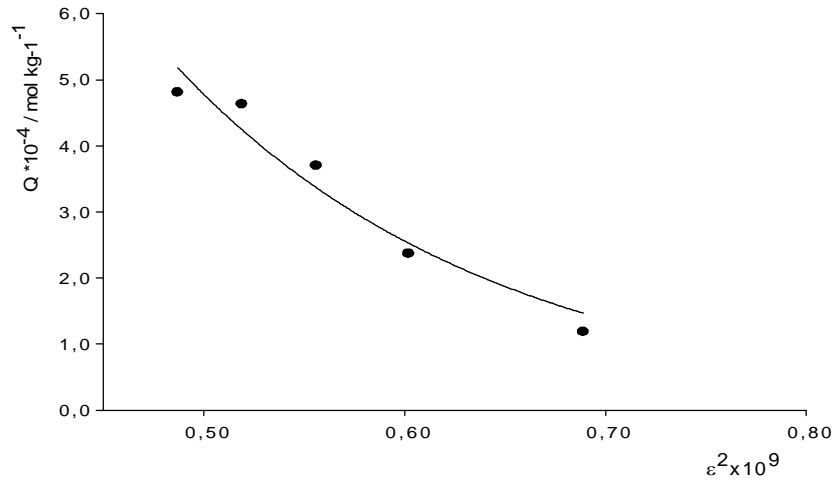


a)



b)

Şekil 4.10. Manyetik poli(GMA) ve epoksi halkası açılmış manyetik poli(GMA) mikropartiküllerin a) Langmuir ve b) Freundlich adsorpsiyon izotermi.



Şekil 4.11. Dubinin-Radushkevich Adsorbsiyon İzotermi.

Freundlich sabitleri olan n , K_F ve korelasyon sabitleri Eşitlik 3.7 kullanılarak; Langmuir sabitleri olan Q_{\max} , b ve korelasyon sabitleri ise Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplandı; Dubinin-Radushkevich sabitleri olan X_{DR} , $-K_{DR} \times 10^9$ ve E_{DR} (kJ mol^{-1}) ve R^2 değerleri de Eşitlik 3.10 yardımıyla hesaplanarak Çizelge 4.1’de sunuldu.

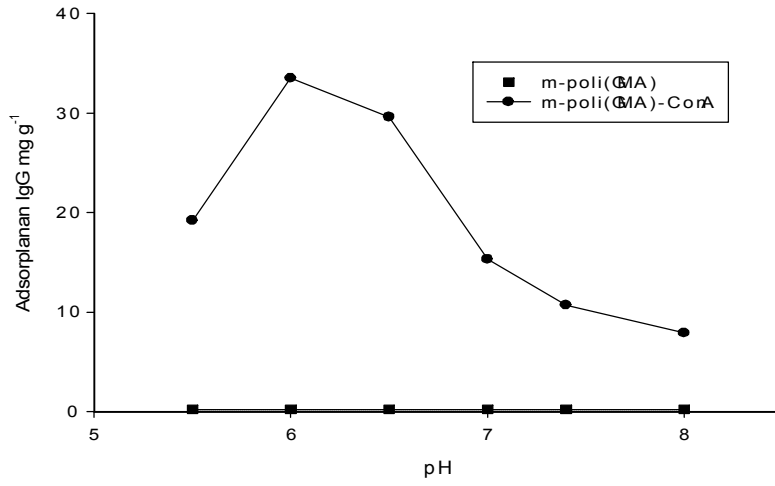
Çizelge 4.1. Con A adsorpsiyonu için Langmuir, Freundlich ve Dubinin- Radushkevich Sabitleri

Adsorpsiyon İzoterm Sabitleri	m-poli(GMA)	epoksi açılmış m-poli(GMA)
Langmuir		
Q_{max} (mg g ⁻¹)	0.35	115
b (mL mg ⁻¹)	3.57	0.043
R²	0.966	0.978
Freundlich		
K_f (mg g ⁻¹)	0.27	4.8
n	0.1278	0.878
R²	0.978	0.966
Dubinin-Radushkevich		
X_{DR}		7.645
-K_{DR}×10⁹		5.982
E_{DR} (kJ mol ⁻¹)		9.0
R²		0.950

4.3. Kesikli Sistemde IgG Adsorpsiyon-Desopsiyon Çalışmaları

4.3.1. pH Etkisi

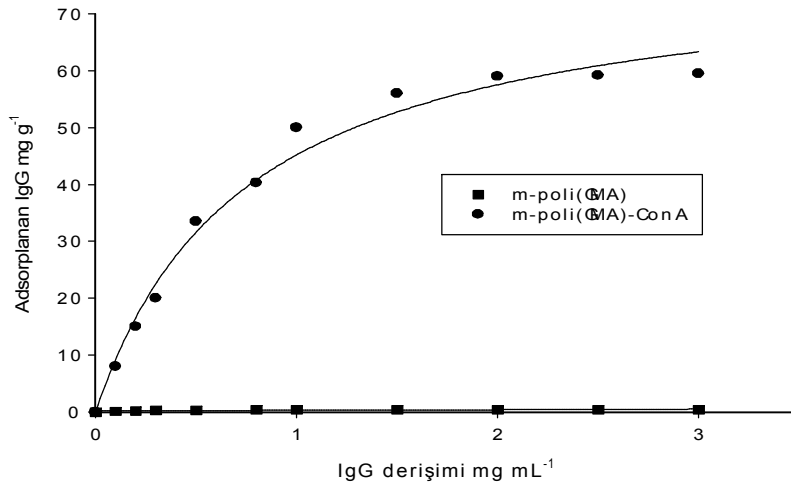
Şekil 4.12’de sunulan grafik pH’ın IgG adsorbsiyonuna etkisini göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi Con A bağlı mikropartiküle adsorplanan IgG, pH: 6.0’da maksimum değere ulaşmaktadır. Bu pH’da maksimum IgG adsorpsiyonu Eşitlik 3.11 kullanılarak gram partikül başına 33.5 mg olarak bulundu .



Şekil 4.12. IgG adsorpsiyonuna pH etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g^{-1} ; IgG derişimi: 0.5 mg mL^{-1} ; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.2. IgG Başlangıç derişiminin Etkisi

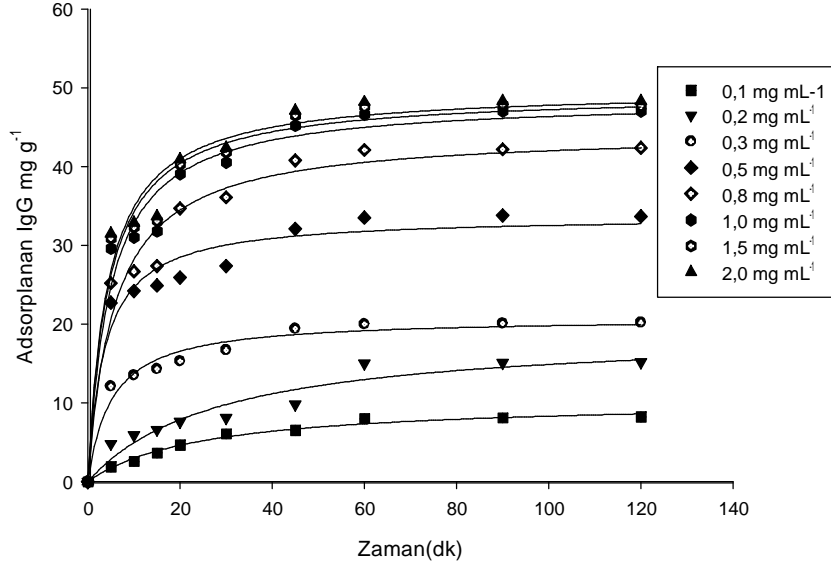
Şekil 4.13’de görüldüğü gibi konkanavalin A bağı olmayan mikropartiküle spesifik olmayan IgG etkileşimi oldukça azdır (0.2 mg g^{-1}), beklenen aktif bölgelerin doygunluğuna ise 2.0 mg mL^{-1} başlangıç derişiminde ulaşıyor. Bu derişimde maksimum IgG adsorpsiyonu ise 59 mg g^{-1} partikül değerine kadar yükseliyor.



Şekil 4.13. IgG adsorpsiyonuna başlangıç derişim etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g^{-1} ; pH: 6.0 ; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.3. Adsorpsiyon Kapasitesine Zamanın Etkisi

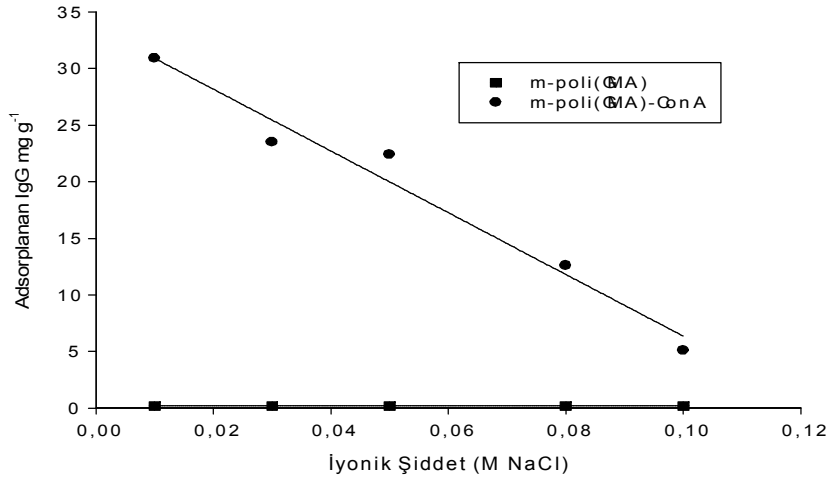
Şekil 4.14’de görüldüğü gibi, farklı IgG derişimlerinde farklı zaman aralıklarında yapılan çalışmalarda maksimum adsorpsiyona, her bir derişim için 60. dakikada ulaşıldığı görülmektedir.



Şekil 4.14. IgG adsorpsiyonuna zaman etkisi. Con A yükleme: 12.5 mg g⁻¹; pH: 6.0; T: 20 °C

4.3.4. İyonik Şiddet Etkisi

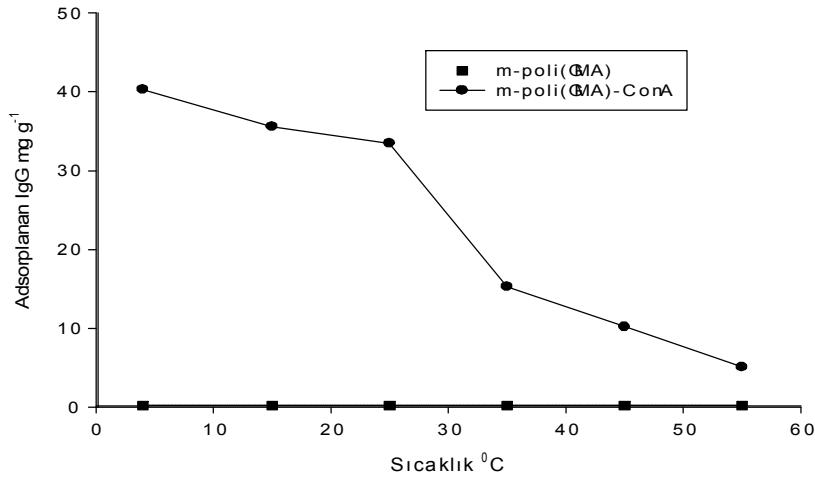
Şekil 4.15’den görüldüğü üzere NaCl tuzu eklenerek ayarlanan iyonik şiddet arttıkça, adsorblanan IgG miktarı 30.9 mg g⁻¹ değerinden 5.1 mg g⁻¹ değerine düşmüştür.



Şekil 4.15. M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin IgG adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi . Con A yükleme: 12.5 mg g^{-1} ; IgG derişimi: 0.5 mg mL^{-1} ; pH:6.0; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.5. Sıcaklık Etkisi

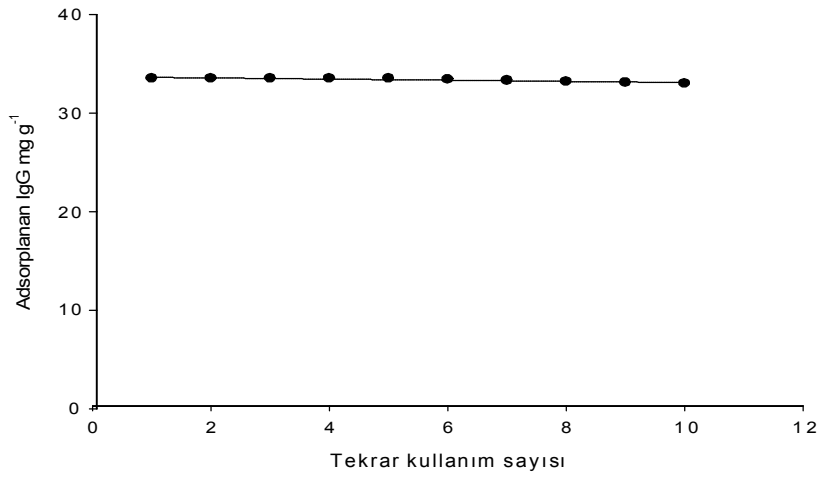
M-p(GMA)-Con A ve m-p-(GMA) mikropartiküllerinin IgG adsorpsiyonunun sıcaklıkla değişimi Şekil 4.16’da görölmektedir. Maksimum IgG adsorpsiyonu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de 40.3 mg g^{-1} partikül olarak bulunmuşken $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de bu değer 5.1 mg g^{-1} ’a kadar düşmüştür.



Şekil 4.16. M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi . Con A yükleme: 12.5 mg g^{-1} , IgG derişimi: 0.5 mg mL^{-1} , pH:6.0 .

4.3.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

IgG adsorplanmış mikropartiküller 1 saat oda sıcaklığında desorplayıcı ajan olarak kullanılan etilen glikol + glukoz ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak etkileştirildiğinde %95 oranında desorpsiyon meydana gelmiştir. Şekil 4.17’de gösterildiği gibi aynı adsorbent ile onuncu kez tekrar kullanımda bile hala %98.5 etkinlikte adsorpsiyon meydana gelmektedir. Desorpsiyon oranı ise Eşitlik 3.12 kullanılarak hesaplandı.

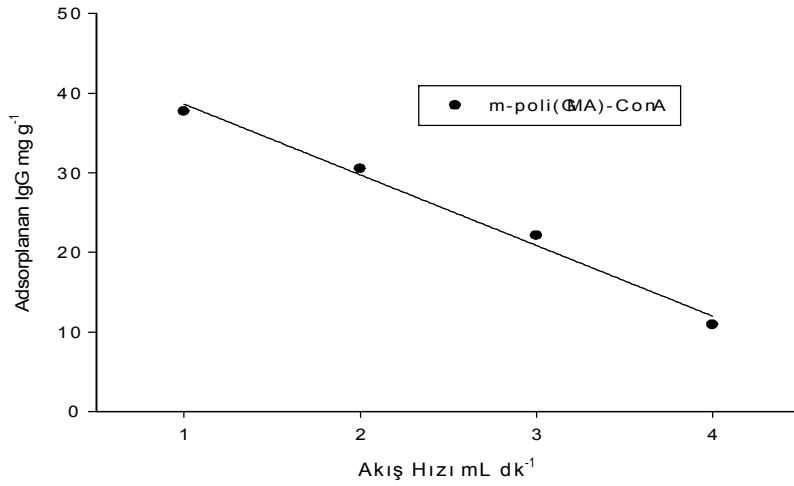


Şekil 4.17. M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllerin tekrar kullanılabilirliği

4.4. MSFB Sisteminde IgG Adsorpsiyon-Desopsiyon Çalışmaları

4.4.1. Akış Hızı

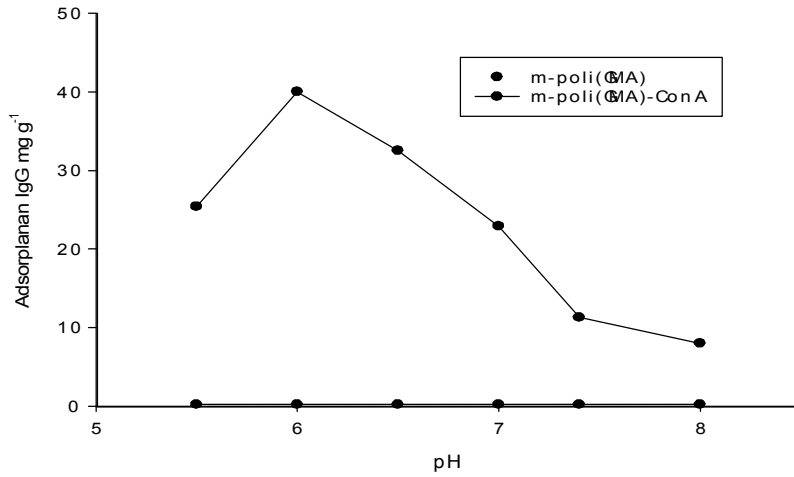
Şekil 4.18’de gösterildiği gibi 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mL dk⁻¹ akış hızlarındaki adsorpsiyon kapasitesi (mikropartikül başına adsorplanan IgG miktarı) Eşitlik 3.11 kullanılarak hesaplandı (Ölçümler 280 nm UV spektrofotometresinden alındı). Akış hızı arttıkça adsorpsiyon kapasitesi 37.7 mg g⁻¹ değerinden 11.1 mg g⁻¹ değerine düştü.



Şekil 4.18. MSFB sisteminde IgG adsorpsiyonuna akış hızı etkisi. pH: 6.0 (fosfat tamponu); T: 20 °C; Con A yüklemesi: 12.5 mg g⁻¹; IgG derişimi: 0.5 mg mL⁻¹; $\Phi=1.0$.

4.4.2. pH Etkisi

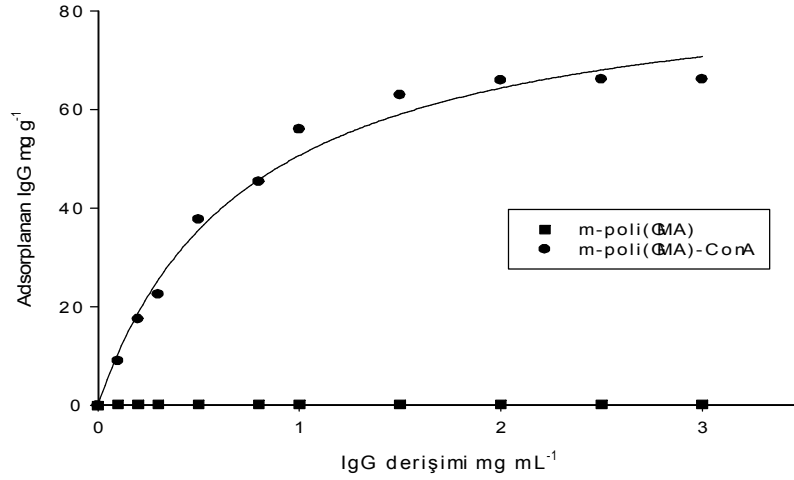
Şekil 4.19’da IgG adsorpsiyonuna pH’in etkisi gösterilmektedir. Konkanavalin A takılı partiküle adsorplanan IgG, pH 6.0’da maksimum 37.7 mg g⁻¹ değerine ulaşmaktadır (IgG’nin izoelektrik noktası 6.2).



Şekil 4.19. Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere IgG adsorpsiyonuna pH etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g⁻¹; IgG derişimi: 0.5 mg mL⁻¹; Akış hızı: 1.0 mL dk⁻¹; $\Phi=1.0$.

4.4.3. IgG Başlangıç Derişiminin Etkisi

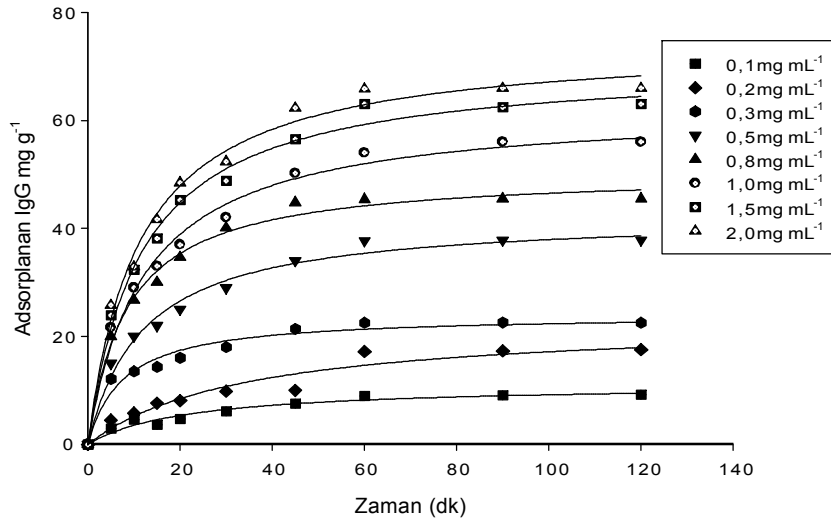
Şekil 4.20'ye bakıldığında, sürekli sistemin başlangıç derişim taramasının kesikli sisitemdeki gibi 2.0 mg mL^{-1} değerinde doygunluğa erdikleri görülüyor. Eğri 66 mg g^{-1} değerinde platoya ulaşmaktadır.



Şekil 4.20. Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerinin IgG adsorpsiyonuna başlangıç derişim etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g^{-1} ; Akış hızı: 1.0 mL dk^{-1} ; $\Phi=1.0$.

4.4.4. Zaman Etkisi

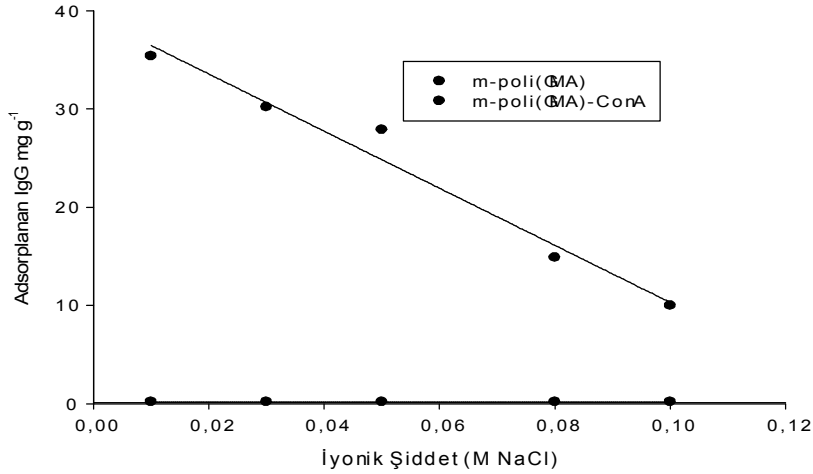
Farklı derişimlerde ve farklı zaman aralıklarında yapılan denge çalışmalarının sonucu Şekil 4.21'de görülmektedir. Her derişim için denge adsorpsiyon değerine 60. dakikada ulaşılmaktadır.



Şekil 4.21. Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere zaman etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g^{-1} ; Akış hızı: 1.0 mL dk^{-1} ; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; pH: 6.0, $\Phi = 1.0$.

4.4.5. İyonik Şiddet Etkisi

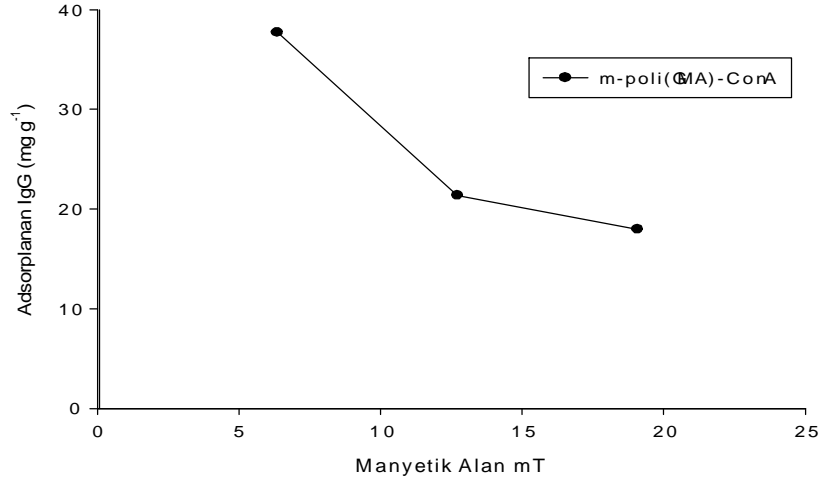
Şekil 4.22'den de görüldüğü gibi 0.01-0.1 M derişim aralığında ortama NaCl eklendiğinde IgG adsorpsiyonu % 28 oranında azalmıştır.



Şekil 4.22. Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere İyonik şiddet etkisi. Con A yüklemesi: 12.5 mg g^{-1} ; IgG derişimi: $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; Akış hızı: 1.0 mL dk^{-1} ; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; pH: 6.0; $\Phi = 1.0$.

4.4.6. Manyetik Alan Etkisi

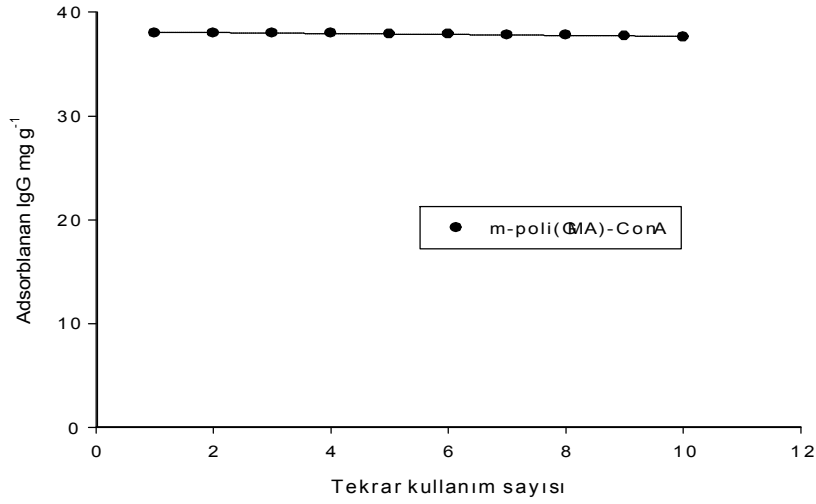
Şekil 4.23’de de sunulduğu gibi manyetik alan arttıkça aynı akış hızında adsorplanan IgG derişimi $37,7 \text{ mg g}^{-1}$ ’den 18 mg g^{-1} ’a kadar azalmaktadır.



Şekil 4.23. Eş boyutlu m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllere Manyetik Alan etkisi. IgG derişimi: $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; T: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; pH:6.0.

4.4.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

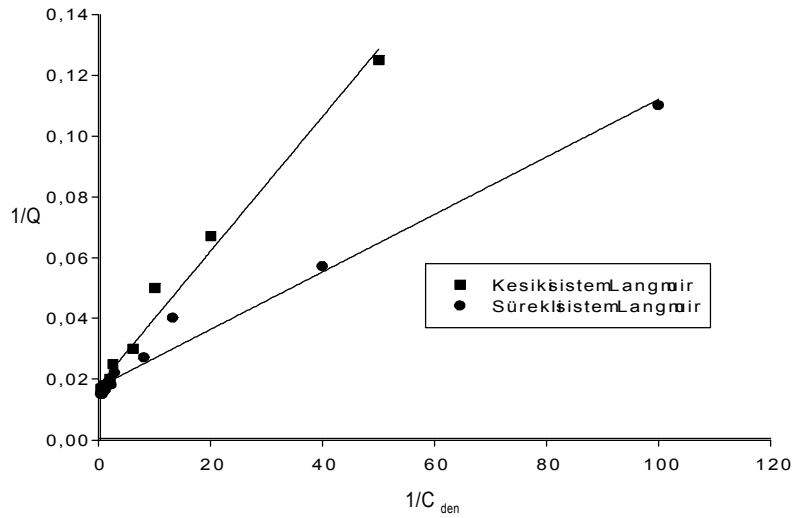
MSFB sisteminde IgG adsorplanmış m-poli(GMA)-Con A mikropartiküller 1 saat oda sıcaklığında etilen glikol + glukoz ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldığında, Eşitlik 3.12’ye göre yapılan hesaplama sonucu %95 oranında desorpsiyon meydana gelmiştir. Şekil 4.24’den de görüldüğü gibi aynı mikroparatikül onuncu döngüde bile hala %99 etkinlikte adsorpsiyon yapabilmıştır.



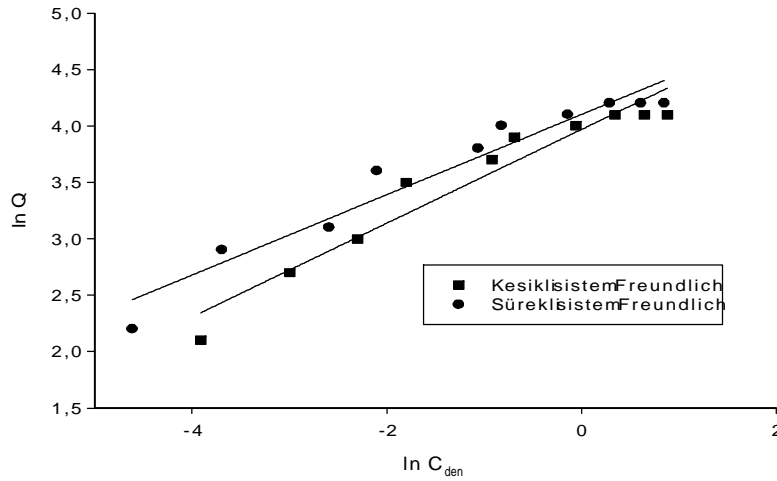
Şekil 4.24. MSFB sisteminde m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerinin tekrar kullanım sayısı.

4.5. Kesikli ve MSFB Sistemlerinde İzoterm Modelleri

Şekil 4.25 ve 4.26'da kesikli ve sürekli sistemin adsorpsiyon modelleri olan Langmuir ve Freundlich sırasıyla sunulmuştur.



Şekil 4.25. Langmuir İzotermi.



Şekil 4.26. Freundlich İzotermi.

Çizelge 4.2’de ise Şekil 4.25 ve 4.26’da sunulan adsorpsiyon izotermelerinden elde edilen sabitler yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich sabitleri

	Langmuir			Freundlich		
	Q_{max} ($mg\ g^{-1}$)	b ($mg\ mL^{-1}$)	R^2	K_f ($mg\ g^{-1}$)	n	R^2
Kesikli sistem	55,9	8,1	0,985	52,9	0,415	0,937
Sürekli sistem	57,2	18,5	0,980	60,5	0,356	0,941

4.6. İnsan Kan Serumundan IgG Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

4.6.1. Adsorpsiyon Çalışmaları

Çizelge 4.3 kan örneklerindeki IgG adsorpsiyon kapasitelerini göstermektedir. PBS (fosfat buffer saline) ile seyreltilmiş serum örneklerinin daha az adsorpsiyon verirken seyreltilmemiş örnekte ise Con A bağlı olmayan m-poli(GMA)’ya sadece $1.1\ mg\ mL^{-1}$ adsorpsiyon gözlenmiş olup bu değer Con A immobilize örnek için $48\ mg\ g^{-1}$ ’e yükselmektedir.

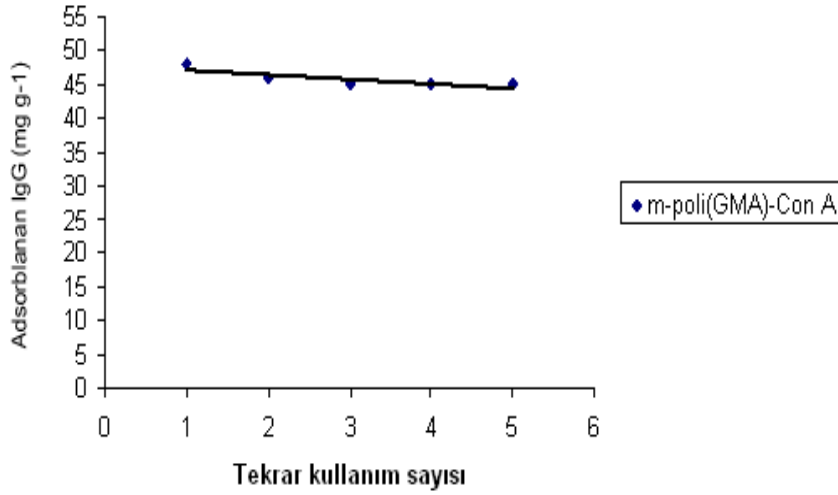
Çizelge 4.3. İnsan Kan Serumundan IgG Adsorpsiyonu

Serum Örnekleri	Adsorplanan IgG (mg g ⁻¹)
Serum	48
1:2 serum	23
1:5 serum	14
1:10 serum	7

4.6.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

M-poli(GMA)-Con A eş boyutlu mikropartiküllere kan serumundan IgG adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışıldığı gibi desorpsiyonu da kesikli sistemde çalışıldı. Adsorplanan biyomolekülün % 85'i tekrar desorplandı. Desorplanan IgG miktarı ELISA ölçümleri ile belirlendi. Desorpsiyon ortamı 2.0 M NaCl olarak seçildi.

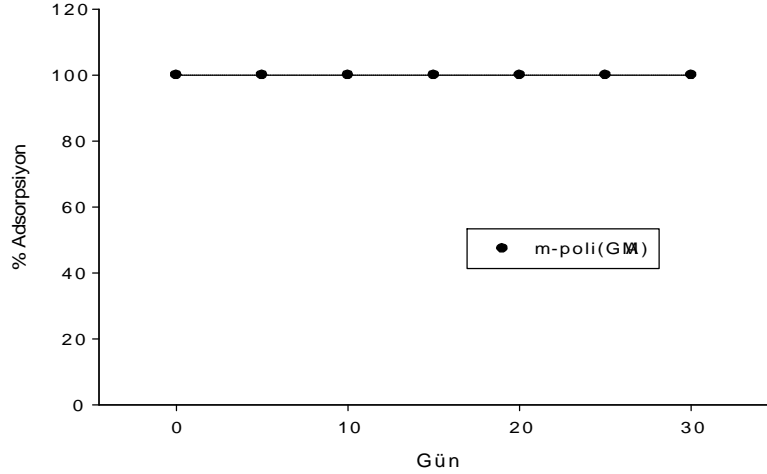
Con A immobilize m-poli(GMA) eş boyutlu mikropartiküllerin kanda tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı partiküle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 defa uygulandı (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. m-poli(GMA)-Con A mikropartiküllerin kanda tekrar kullanılabilirliği.

4.6.3. Saklama Kararlılığı

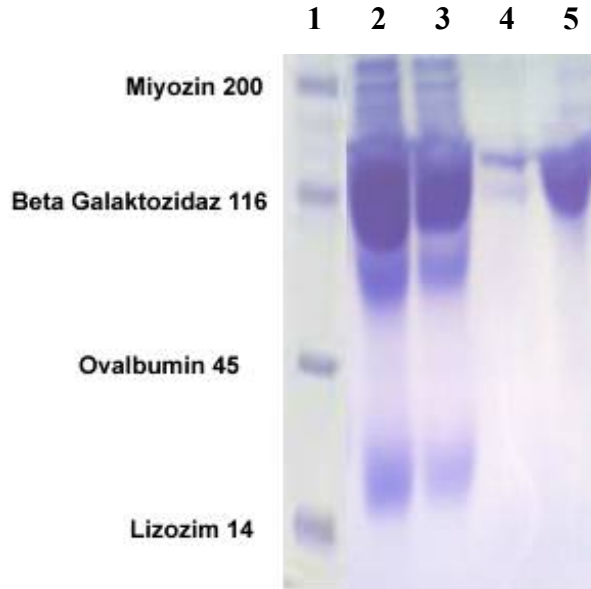
Con A bağılı m-poli(GMA) partiküller 4 °C’de sodyum azid içeren pH: 7.4 fosfat tamponunda bekletilmiştir. 30 gün boyunca adsorpsiyon veriminde hiçbir değişiklik olmadığı Şekil 4.28’den görülmektedir.



Şekil 4.28. Saklama kararlılığı.

4.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

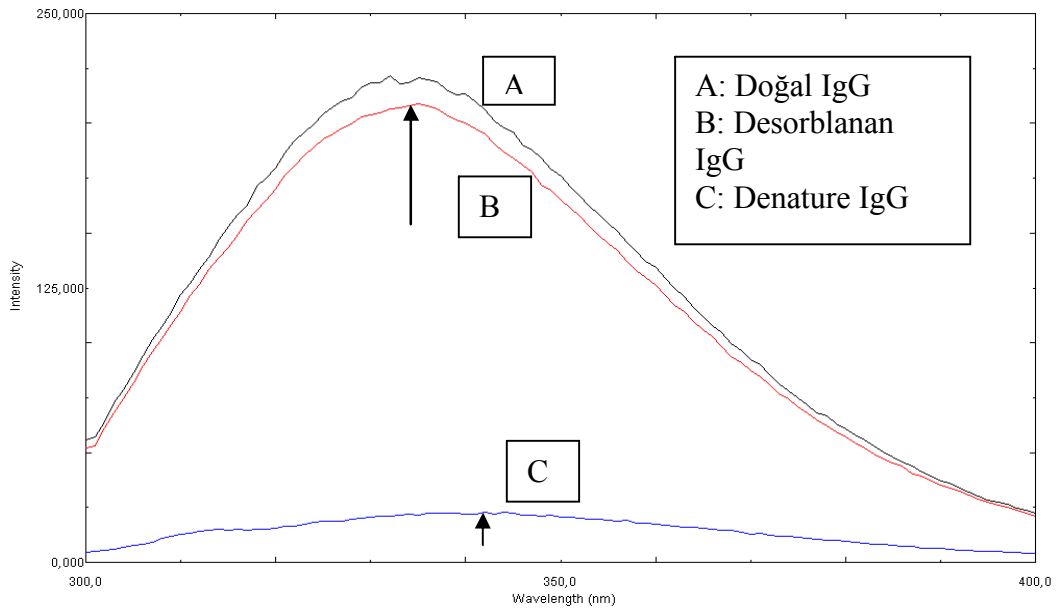
Şekil 4.29’da desorplanan proteinin saflık kontrolü elektrofrez yöntemi olan SDS-PAGE kullanılarak yapıldı.



Şekil 4.29. SDS-PAGE ; 1- Marker, 2- Adsorpsiyon öncesi serum, 3- Adsorpsiyon sonrası serum, 4- Standart İnsan IgG, 5- Desorplanan IgG.

4.8. Spektroflorimetre

Adsorpsiyon ve desorpsiyon süresince IgG molekülünün yapısal değişme geçirip geçirmediğini anlamak için floresans ölçümleri kullanılmıştır. Şekil 4.30'a bakıldığında doğal (A) ve desorplanan (B) proteinin dalgaboyunun her ikisi de 333 nm olduğu ancak denature (C) proteinin dalga boyunun 343 nm'ye kaydığı ve aynı zamanda emisyon şiddetinde azalma olduğu görülmektedir.

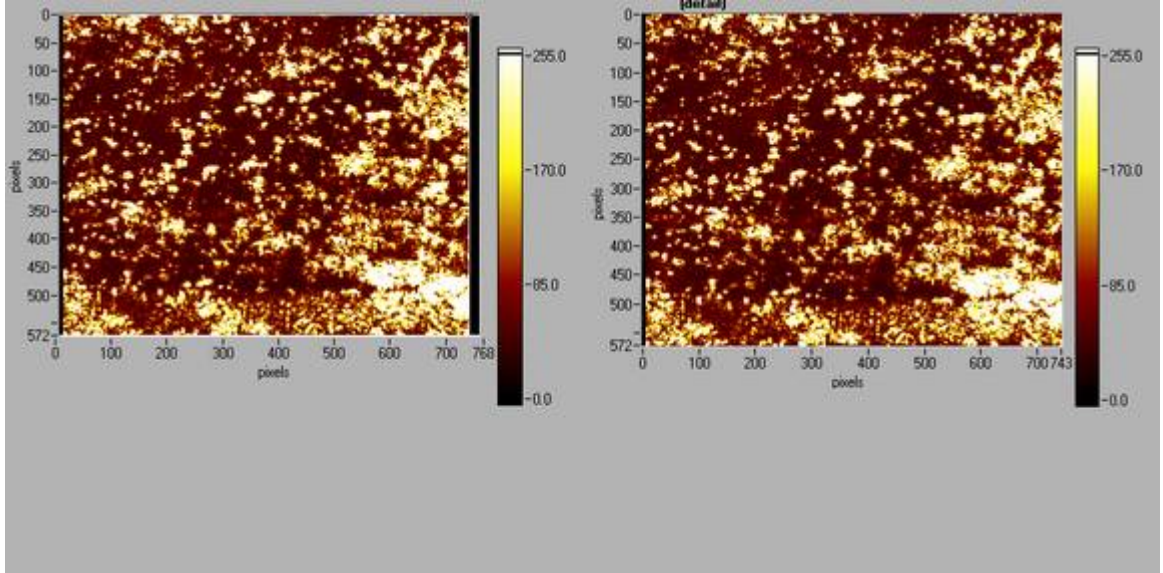


Şekil 4.30. Floresans emisyon spektrumu; (A) doğal, (B) desorblanan, (C) denature IgG (1.0 mg mL^{-1}).

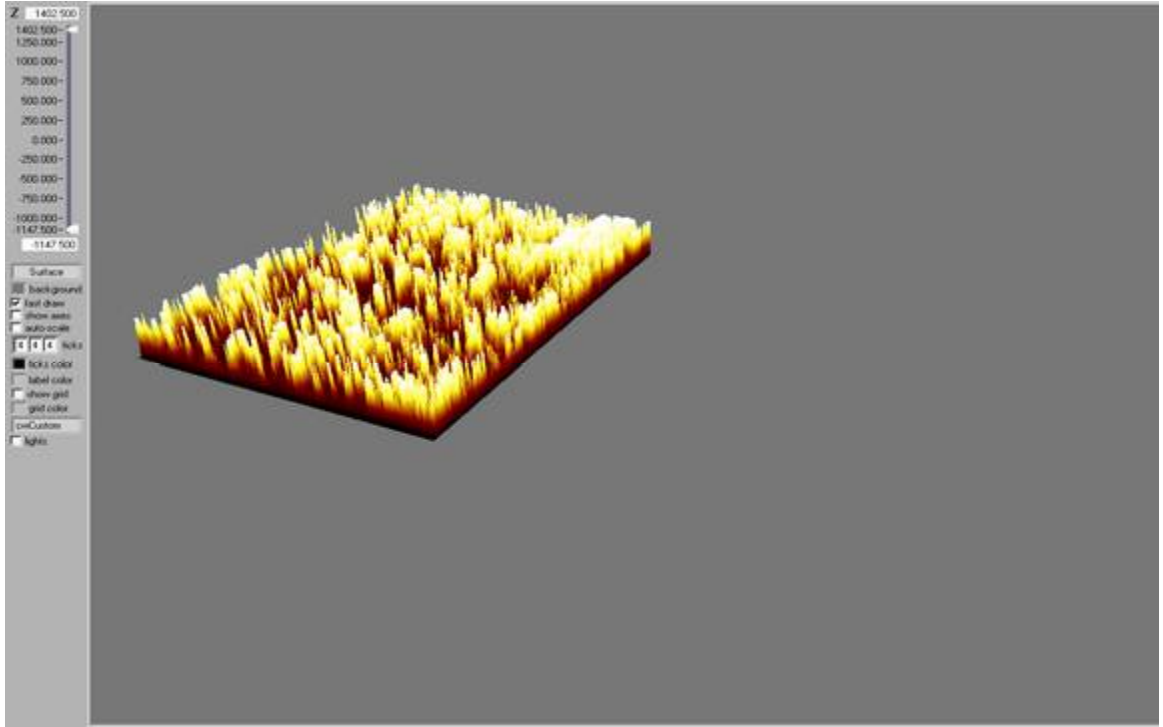
5. SPR KİNETİK ÇALIŞMALAR

5.1. SPR Çip Yüzey Karakterizasyonu

Şekil 5.1’de SPR çipin Con A bağlanmış halinin yüzey görünümü ile üç boyutlu görünümü görülmektedir. Alınan ölçümlerin ortalama sonucu olarak kalınlık 14.7334 nm olarak bulunmuştur.



A

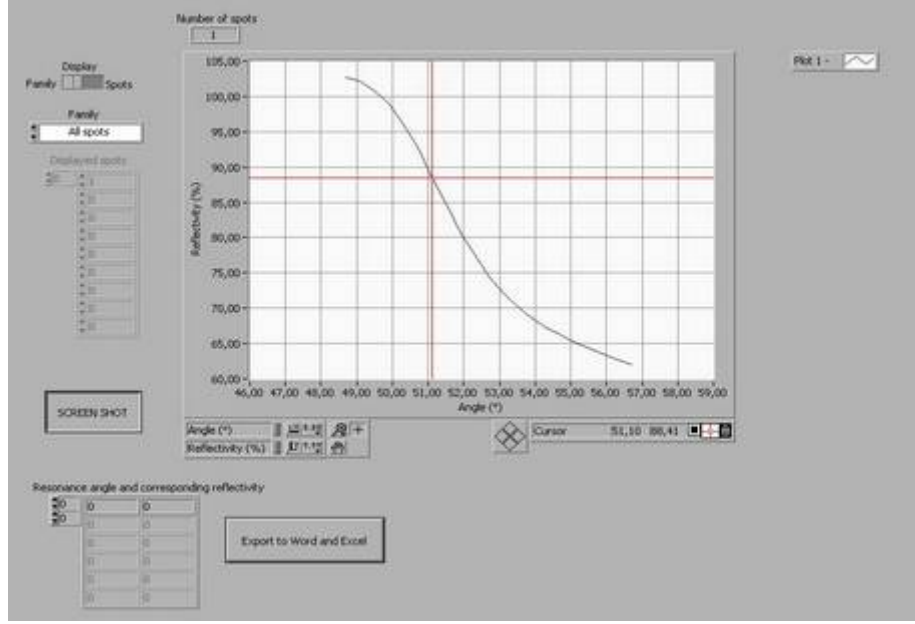


B

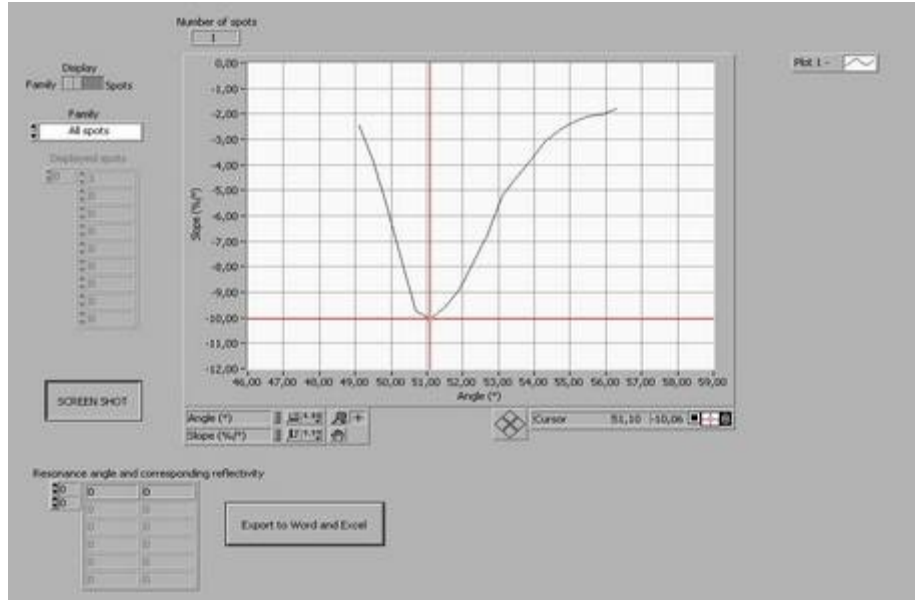
Şekil 5.1. Elipsometri Grafikleri A) Yüzey Görünümü B) 3 Boyutlu Görünümü

5.2. SPR Çip Plazmon Ölçümleri

Plazmon eğrilerinin alınması sırasında SPRview yazılımı kullanılarak ışığın SPR çipe ulaşma açısı $48.7-60.7^{\circ}$ aralığında değiştirilmiştir. Elde edilen değerler SPR1001 yazılımı kullanılarak incelenmiş ve yüzey plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı kırılma açısı ve eğimi grafiğe geçirilmiştir. Şekil 5.2’de elde edilen grafiklerden görüleceği gibi plazmon açısı 51° olarak bulunmuştur.



A

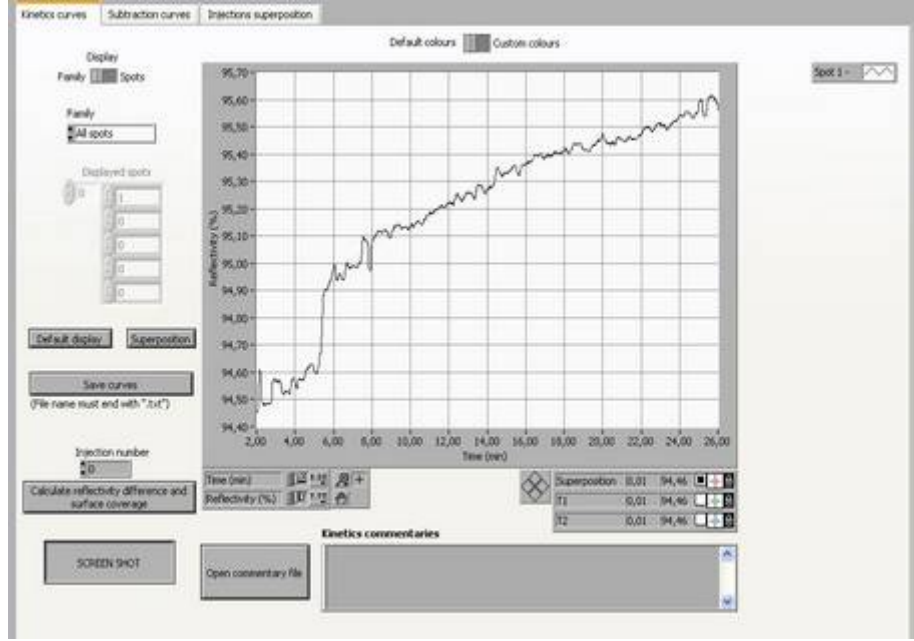


B

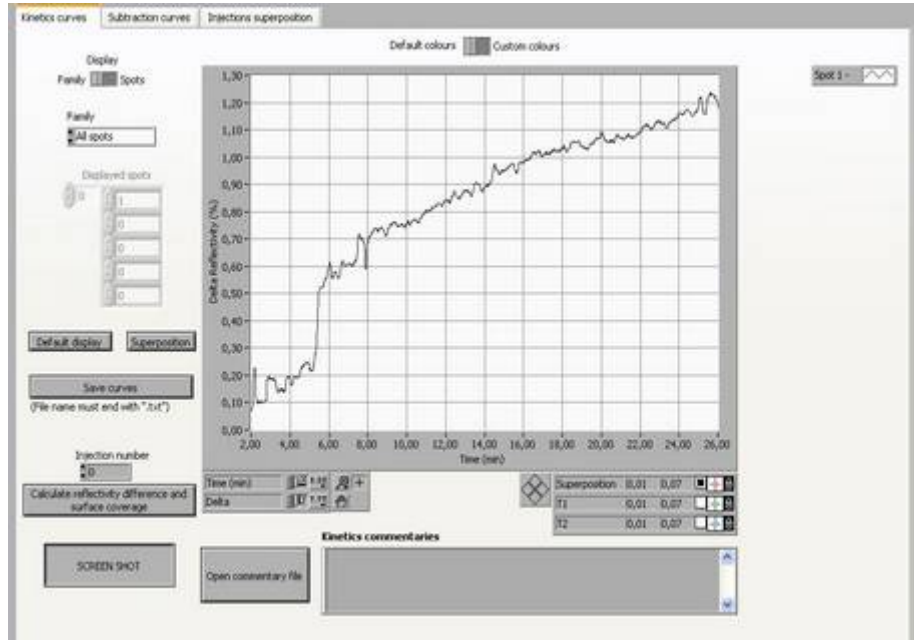
Şekil 5.2. Plazmon Ölçümleri. A) Reflektivite B) Eğim Grafikleri.

5.3. SPR Kinetik Çalışmalar

Şekil 5.3'te Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 0.1 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



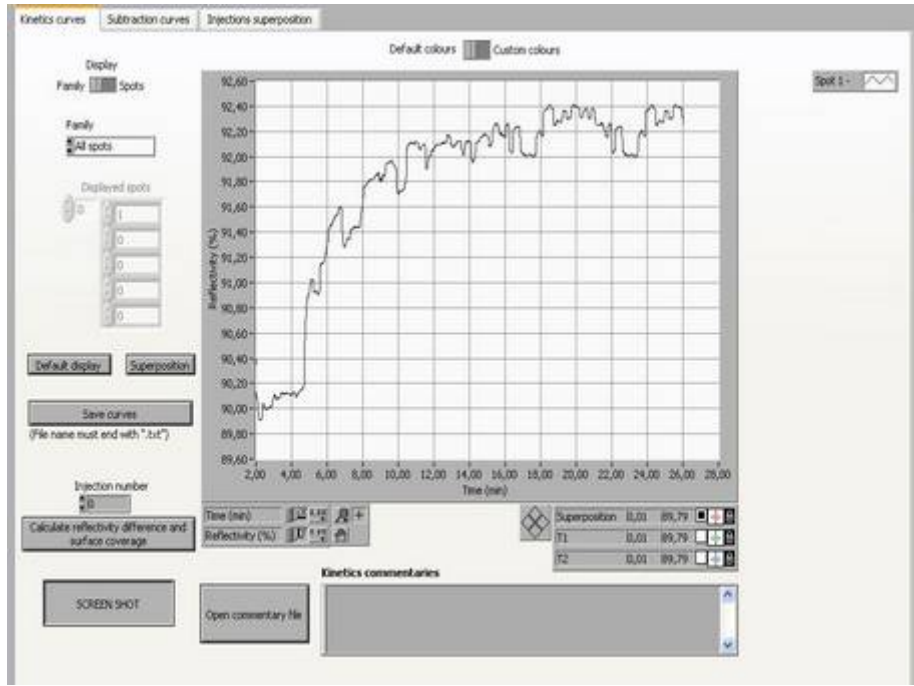
A



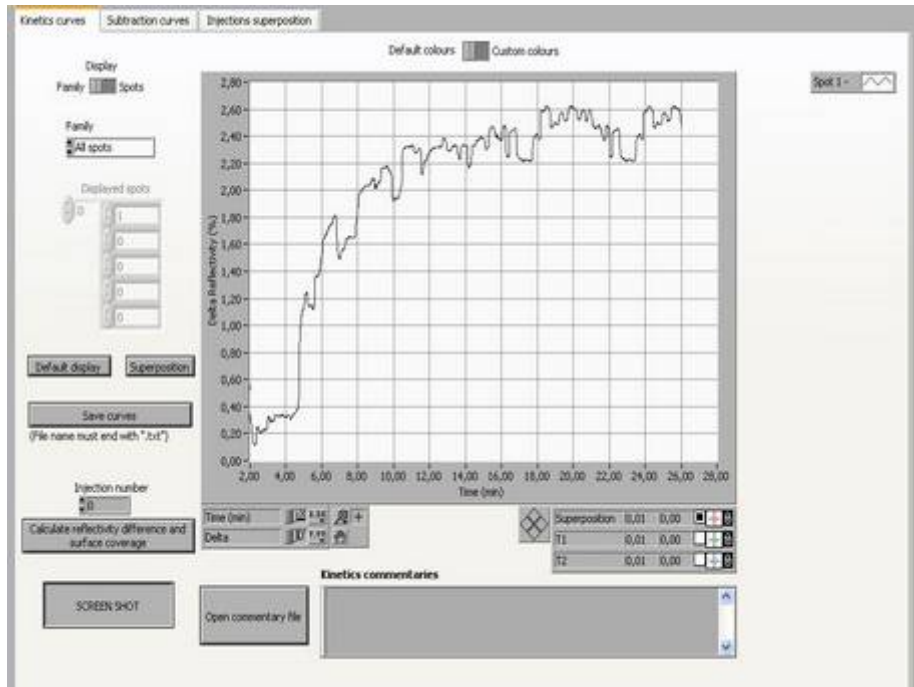
B

Şekil 5.3. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.1 mg mL^{-1} .

Şekil 5.4'te Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 0.2 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



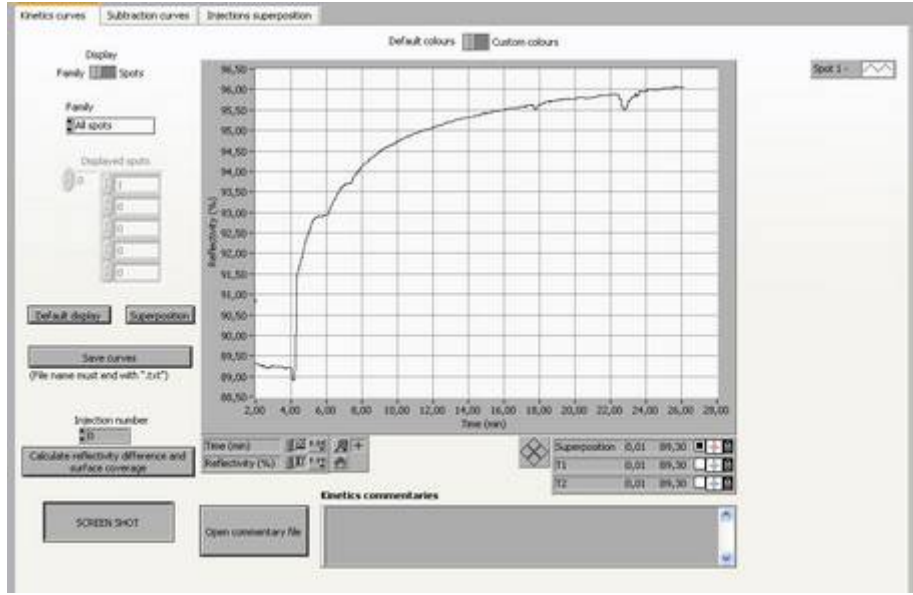
A



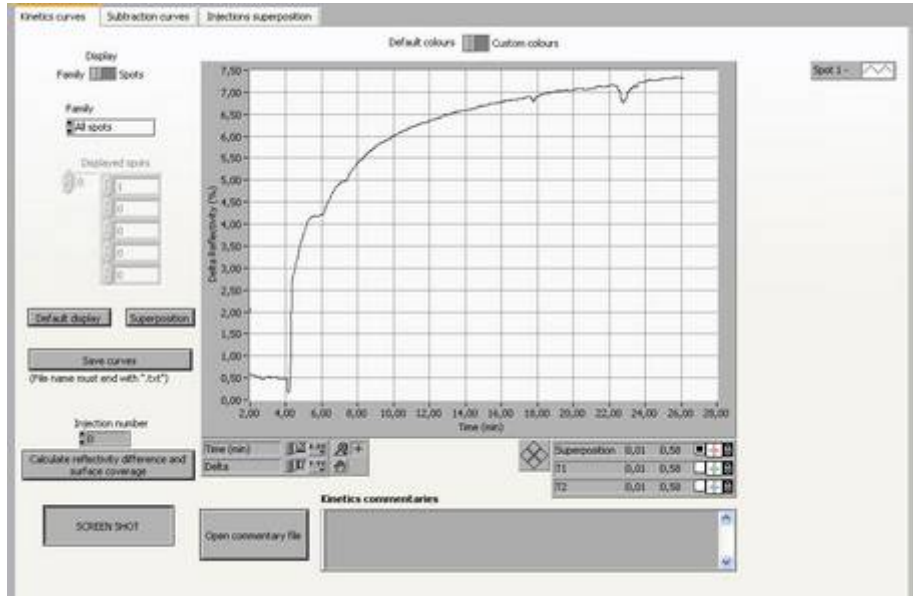
B

Şekil 5.4. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.2 mg mL^{-1} .

Şekil 5.5'te Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 0.4 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



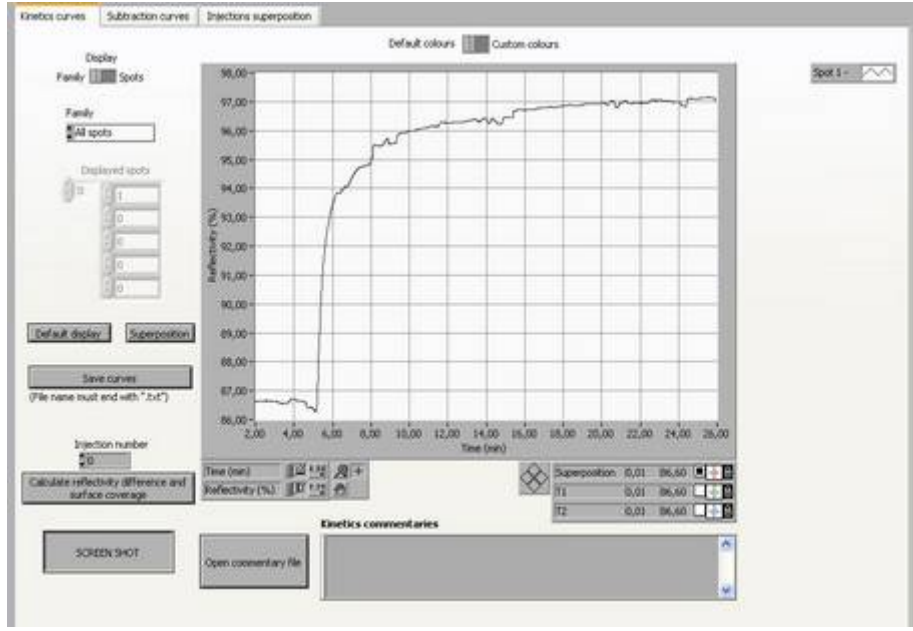
A



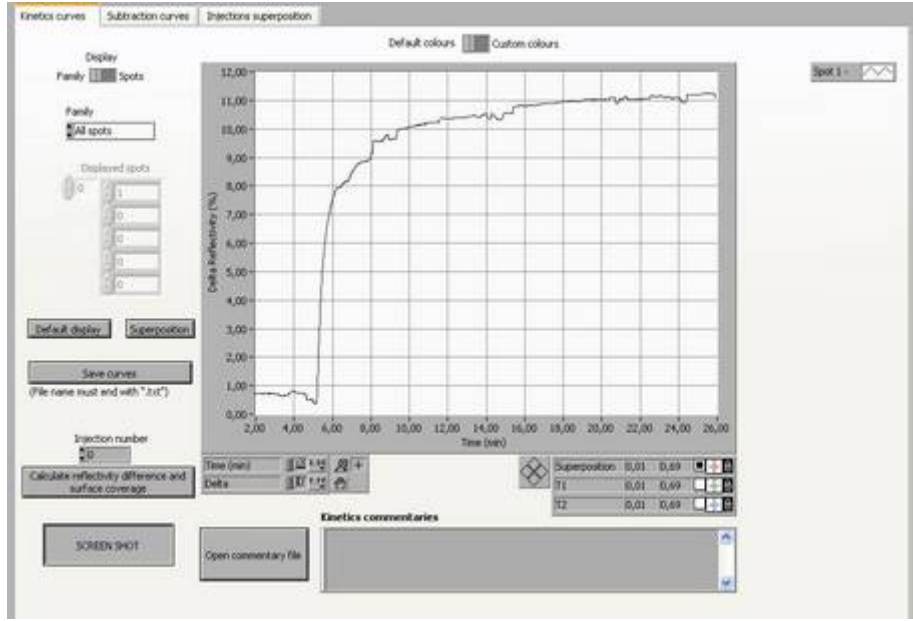
B

Şekil 5.5. Kinetik Analizler. A) Reflektivite B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.4 mg mL^{-1} .

Şekil 5.6'da Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 0.8 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



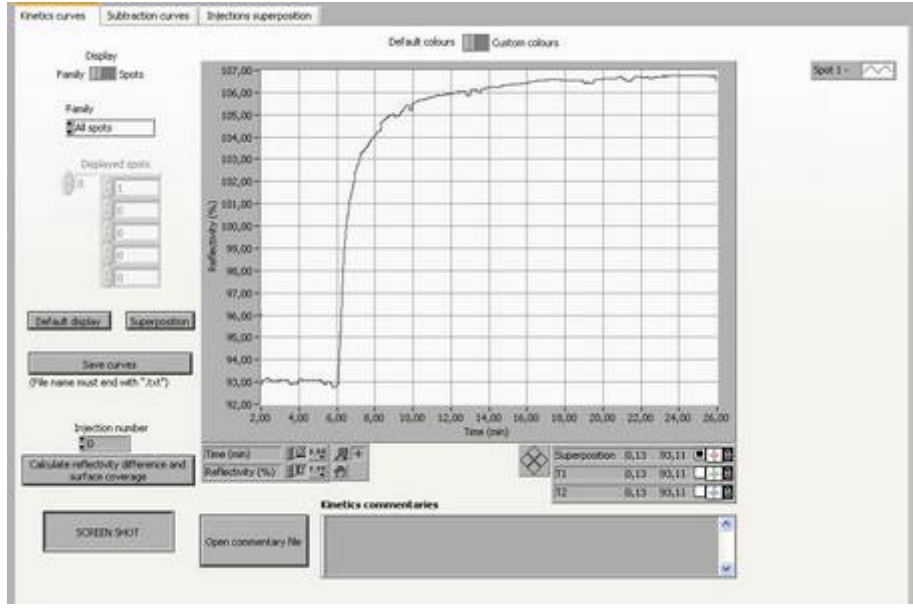
A



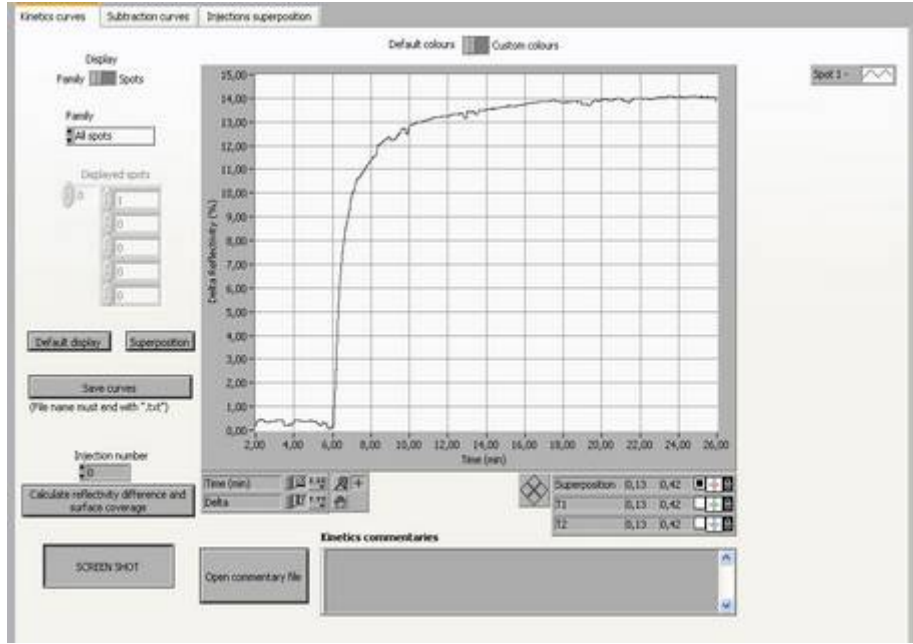
B

Şekil 5.6. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 0.8 mg mL^{-1} .

Şekil 5.7’de Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 1.0 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



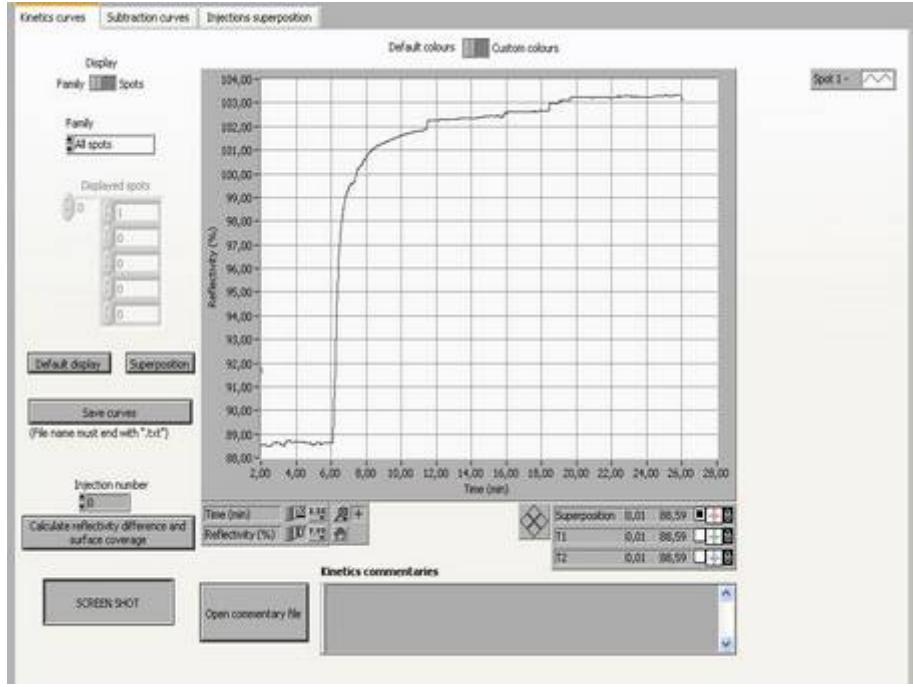
A



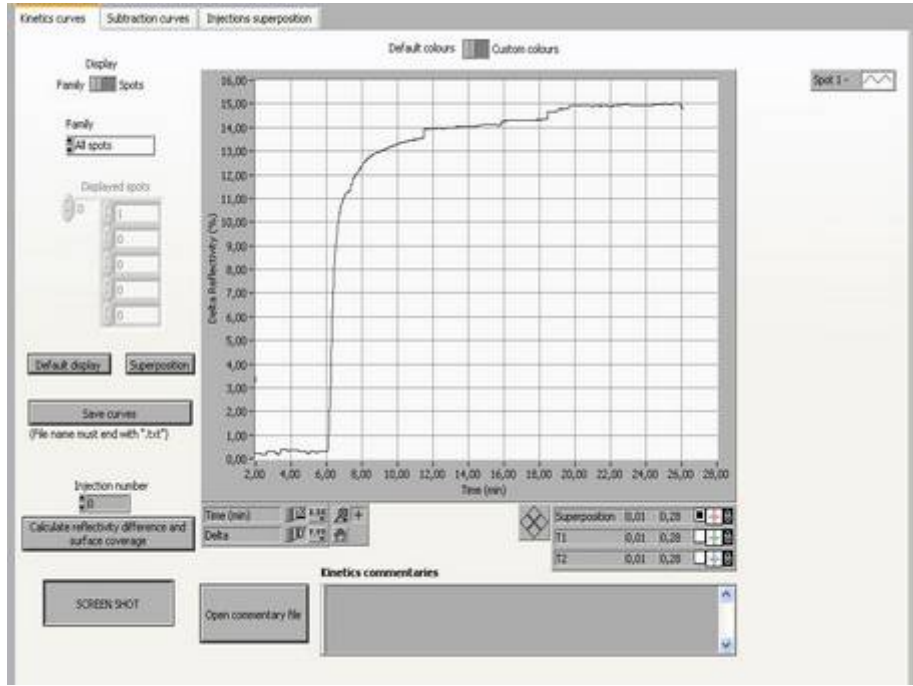
B

Şekil 5.7. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 1.0 mg mL^{-1} .

Şekil 5.8’de Con A ve IgG etkileşiminin kinetik analizinde 1.5 mg mL^{-1} derişimi için reflektivite ve delta reflektivite çalışmaları görülmektedir.



A

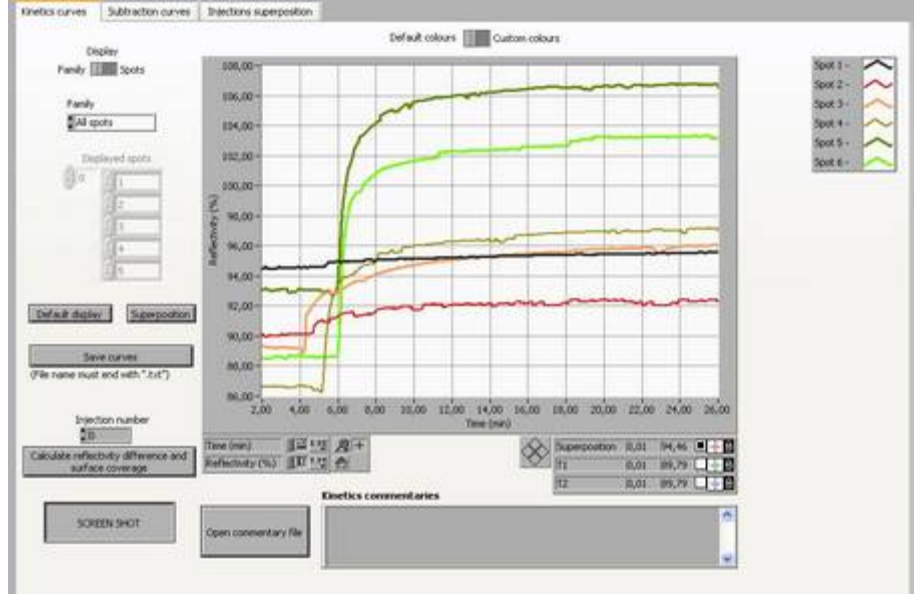


B

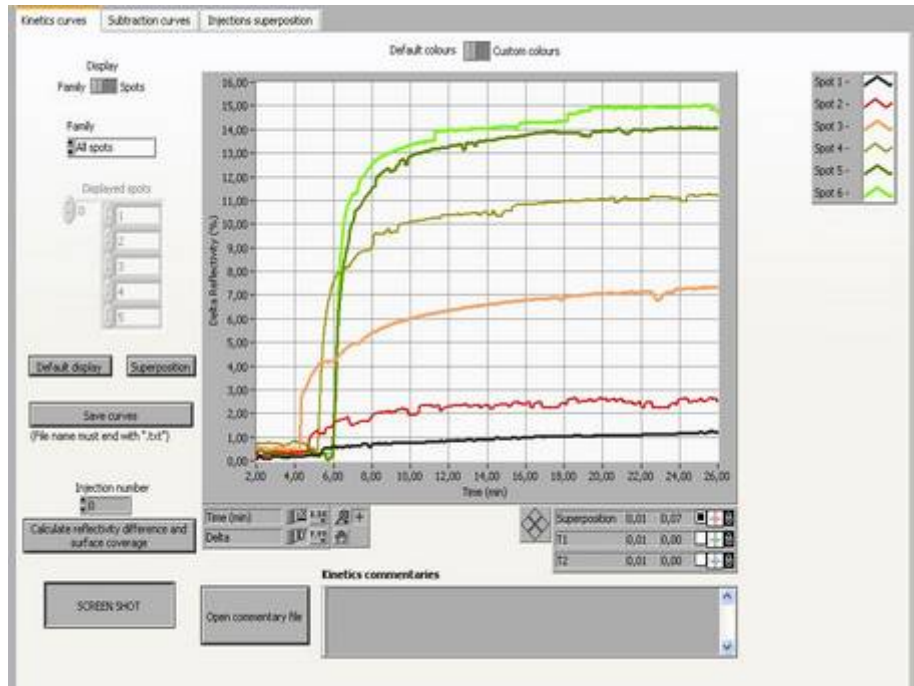
Şekil 5.8. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri. Derişim 1.5 mg mL^{-1} .

Şekil 5.9'un A grafiğinde $0.1-1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ arasındaki derişimlerin SPR kinetik çalışmaları toplu halde sunulmuştur. Grafikten görüldüğü gibi 1.0 ve 1.5 mg mL^{-1} değerlerinin birbirine çok yakın olduğu ve artık bu değerlerde eğrilerin doygunluğa geldiği görülmektedir.

Şekil 5.9'un B grafiğinde sunulan; zaman- ΔR sensogramlarının eğrileri, zaman-% kırılma miktarı eğrileri ile aynıdır. Fakat eğriler bir arada incelendiğinde; değerlendirilmesi açısından daha duyarlı sonuçlar olduğu görülmektedir.



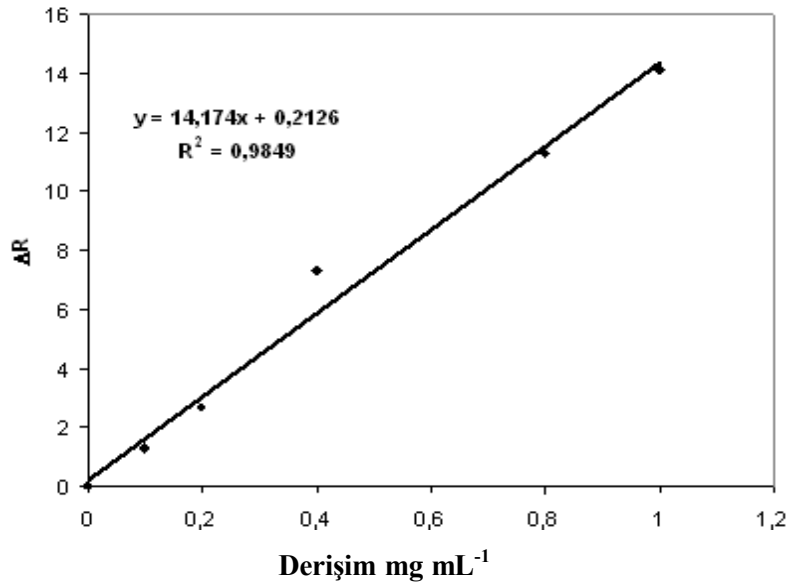
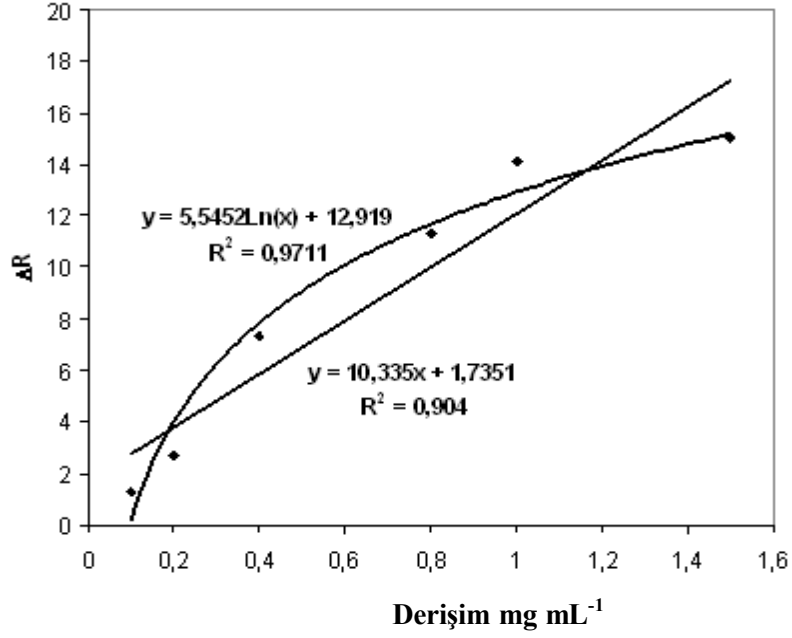
A



B

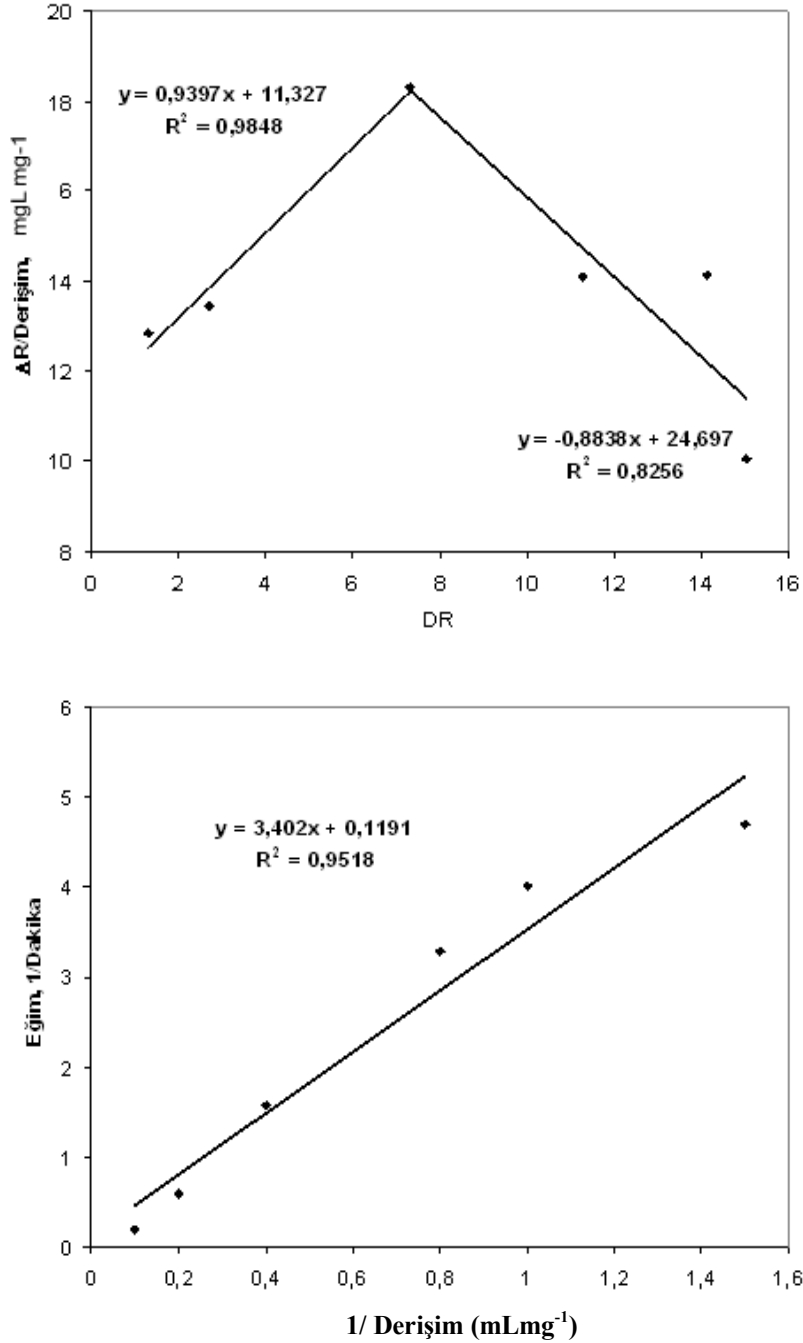
Şekil 5.9. Kinetik Analizler. A) Reflektivite; B) Delta Reflektivite Grafikleri (Hepsi Birlikte). Spot 1: 0.1 mg mL⁻¹; Spot 2: 0.2 mg mL⁻¹; Spot 3: 0.4 mg mL⁻¹; Spot 4: 0.8 mg mL⁻¹; Spot 5: 1.0 mg mL⁻¹; Spot 6: 1.5 mg mL⁻¹.

Şekil 5.10’da Derişim-Reflektivite kayması arasındaki ilişki sunulmuştur.



Şekil 5.10. Derişim-Reflektivite kayması arasındaki ilişki. (A) 0-1.5 mg mL⁻¹ derişim aralığı; (B) 0-1 mg mL⁻¹ aralığı.

Şekil 5.11’de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denge analizi için Eşitlik 3.16 ve bağlanma kinetik analizi için Eşitlik 3.17 ve 3.18 kullanılarak hesaplanan ΔR_{\max} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 5.1’de özetlenmiştir.

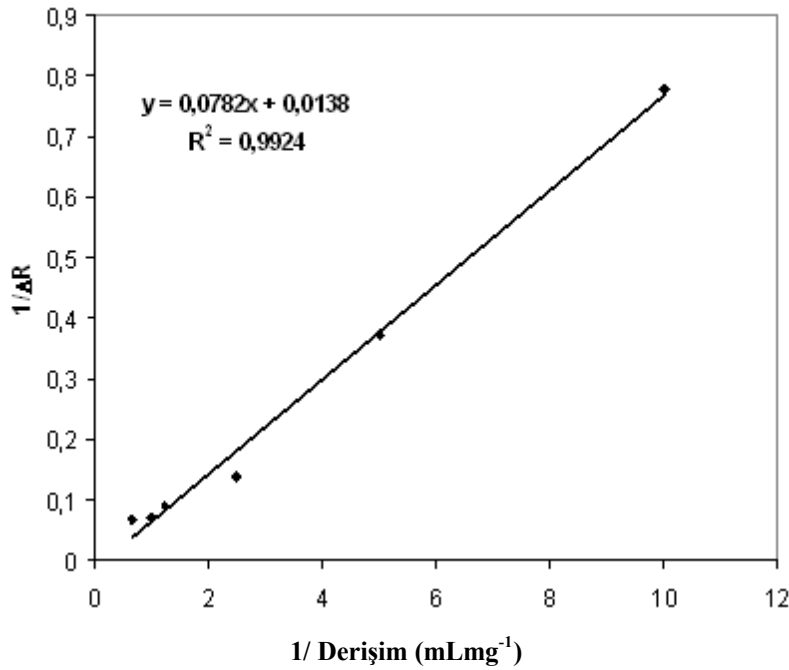


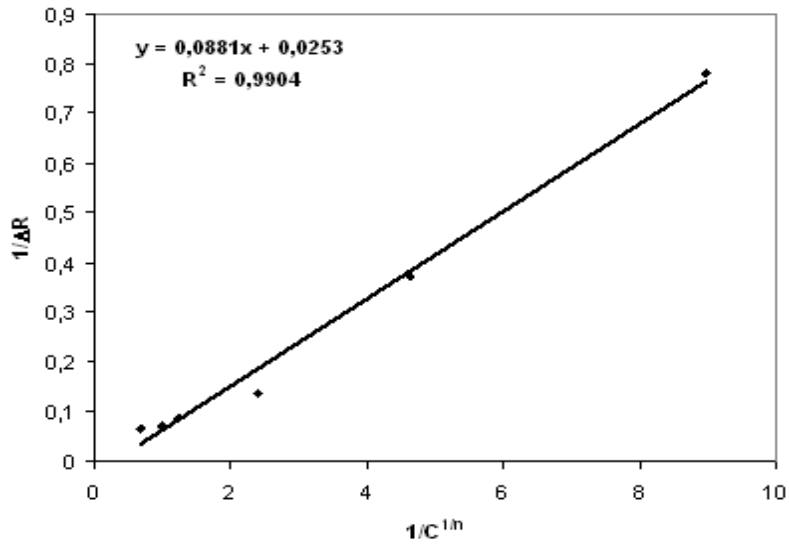
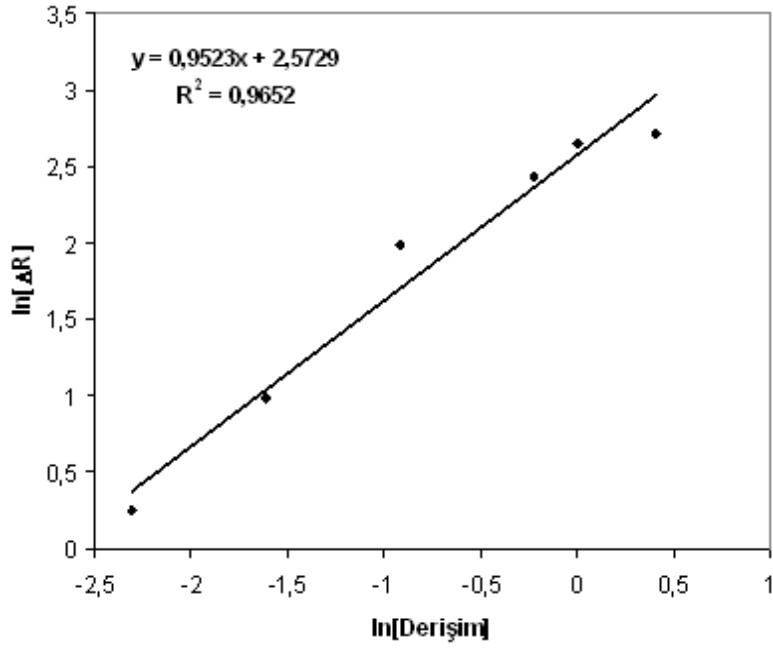
Şekil 5.11. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı

Çizelge 5.1. Kinetik hız sabitleri.

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
$\Delta R_{\text{denge}}/C = K_A \Delta R_{\text{mak}} - K_A \Delta R_{\text{denge}}$		$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{max}} - (k_a C + k_d) \Delta R$	
		$S = k_a C + k_d$	
ΔR_{max}	12.054	$k_a, \text{ mL (mg.dk.)}^{-1}$	3.4021
$K_A, \text{ mL mg}^{-1}$	-0.9397	$k_d, \text{ 1 dk}^{-1}$	0.1191
$K_D, \text{ mg mL}^{-1}$	-1.0642	$K_A, \text{ mL mg}^{-1}$	28.565
R^2	0.9848	$K_D, \text{ mg mL}^{-1}$	0.0035
		R^2	0.9518
ΔR_{max}	27.944		
$K_A, \text{ mL mg}^{-1}$	0.8838		
$K_D, \text{ mg mL}^{-1}$	1.1315		
R^2	0.8526		

Şekil 5.12’de adsorpsiyon izoterm modelleri görülmektedir.





Şekil 5.12. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 5.2’de, Şekil 5.12’deki grafik doğruları ve Eşitlik 3.19, 3.20 ve 3.21 kullanılarak bulunan parametreler sunulmuştur.

Çizelge 5.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R = \{\Delta R_{\max}[A]/K_D + [A]\}$		$\Delta R = \Delta R_{\max}[A]^{1/n}$		$\Delta R = \{\Delta R_{\max}[A]^{1/n}/K_D + [A]^{1/n}\}$	
ΔR_{\max}	72.464	ΔR_{\max}	13.104	ΔR_{\max}	39.526
$\Delta R_{\max}, \text{mg mL}^{-1}$	5.0975	$\Delta R_{\max}, \text{mg mL}^{-1}$	0.9095	$\Delta R_{\max}, \text{mg mL}^{-1}$	2.7736
$K_D, \text{mL mg}^{-1}$	5.6667	1/n	0.9523	1/n	0.9523
$K_D, \text{mL mg}^{-1}$	0.1765	R^2	0.9652	$K_D, \text{mL mg}^{-1}$	3.4822
R^2	0.9924			$K_A, \text{mg mL}^{-1}$	0.2872
				R^2	0.9904

6.SONUÇLARIN LİTERATÜRLE KARŞILAŞTIRILMASI

Çizelge 6.1. Sonuçların Literatürle Karşılaştırılması

Polimer	Ligand	Maksimum adsorpsiyon (mg g ⁻¹)	Kaynaklar
Eupergit	Affigel Protein A	20.1	Füglister, 1989
Polyethylene	Phenylalanine	50.0	Kim ve ark., 1991
Sepharose 4B	L –Histidine	0.23	Müller-Schulte ve ark., 1991
Sartobind	Protein A	0.51	Langlotz ve ark., 1992
PHEMA	Protein A	24.0	Denizli ve ark., 1995
Poly(ethylene vinyl alcohol)	L-Histidine	77.7	Bueno, 1995
Polysulfone	Protein A	8.8	Charcosset ve ark., 1995
Polycaprolactam	Protein A	28.3	Klein ve ark., 1997
Poly(methyl methacrylate)	Protein A/G	6.6	Dancette ve ark., 1999
Sepharose 4B	Biomimetic ligand	25.0	Teng ve ark., 1999
Poly(vinyl alcohol)	Protein A	13.2	Castilho ve ark., 2000
Poli(MMA)	3-Aminophenol	52.0	Teng ve ark., 2000
PHEMA	L-Histidine	44.8	Özkara ve ark., 2002
PHEMA	Methacryloylamidohistidine	73.8	Garipcan ve Denizli, 2002
Poli(methyl methacrylate)	Cu ²⁺	54.3	Denizli ve ark., 2003
PHEMA	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ ve Co ²⁺	79.6	Özkara ve ark., 2003
PHEMA	Con A	69.4	Bereli ve ark., 2004
Poli(EGDMA-MAH)	MAH	262	Özkara ve ark., 2004
Poli(AAm-AGE)	Con A	25.6	Babacan ve ark., 2006
m-poli(EGDMA-MAH)	Cu ²⁺	97.5	Karataş ve ark., 2007
	Ben-His	89.6	Öztürk ve ark., 2007
Bu Çalışmada m-poli(GMA)	Con A	48	Birnur Akkaya Doktora Tezi

7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, IgG saflaştırılmasında kullanılmak üzere tek basamaklı dispersiyon polimerizasyonu ile manyetik poli(GMA) mikropartiküller hazırlandı. Dispersiyon polimerizasyonuna üç modifikasyon uygulandı. Bunlardan birincisi polimer damlacıklarının üniform olmalarını sağlamak amacıyla polimerizasyonun gerçekleştiği polimerizasyon reaktörüne dört kürekli karıştırıcı eklenmesidir. İkincisi, tepkime sıcaklığının artırılarak damlacıkların viskozitesinin azaltılmasıdır. Prosesin sıcaklık kontrolü oldukça kritik bir basamaktır çünkü, sıcaklık kontrolü ile damlacık dağılımı ve damlacık oluşumu sağlanır, aksi taktirde büyük damlacıklar oluşur. Üçüncüsü, kararlaştırıcı olarak kullanılan poli(vinilpirolidon)'un yüksek oranda (monomerin ağırlıkça %10'un üzerinde) eklenmesidir, nedeni ise çok dar boyut dağılımında kararlı eş boyutlu mikropartiküller oluşturmaktır.

M-poli(GMA) mikropartiküllerin spesifik yüzey alanı $3.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ olarak hesaplandı. Oldukça hidrofilik yapıya sahip olan m-poli(GMA) mikropartiküller iki saat süresince farklı zaman aralıklarında denge şişme oranları çalışıldı ve hızlıca şişerek sadece 15 dk'da maksimum şişme oranı olan % 52 değerine ulaştılar.

Oluşan mikropartiküllerin morfolojisi ve yapısı Şekil 4.1'de görüldüğü gibi üniform ve gözeneksizdir. Partikülün gözeneksiz olması partikül içi direnci azaltır bu da difüzyonu kolaylaştırırken adsorbsiyon kapasitesini artırır. Partikül boyutu 1.6-1.7 μm aralığında bulunmuştur. M-poli(GMA)'nın PDI (poli dispersite indeksi) 1.008 civarında bulundu. PDI değeri 1.05'ten küçük olan partiküller monodispers olarak kabul edilir (Chen ve ark., 1999). Dolayısıyla, bu değer, eş boyutlu mikropartiküllerin sentezlendiğini göstermektedir.

Teorik olarak hesaplanan epoksi grubu (ortamdaki GMA'ya göre hesaplanan) 4.2 mmol g^{-1} 'dir. M-poli(GMA) mikropartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu ise perklorik asit titrasyonu ile hesaplanmış olup teorik miktardan farklı olarak 3.46 mmol g^{-1} bulunmuştur. Bunun nedeni de bazı epoksi grupları mikropartikülün içerisinde olup titrasyona cevap vermemiş olmasından dolayıdır.

Şekil 4.2'deki $^1\text{H-NMR}$, $-\text{CH}_2-$ fonksiyonel grubunun kimyasal kayma değeri 0.6-1.2 ppm, epoksi halkasının kimyasal kayma değeri 2.5-3.4 ppm, $-\text{OCH}_2$ fonksiyonel grubunun ki ise 3.5-4.5 ppm değerlerinde pik vermektedir.

Şekil 4.3'deki FTIR grafiğinden, 907 cm^{-1} 'de epoksi grubunun titreşim bandı görülmektedir. Bu da mikropartiküldeki epoksi grubunun varlığını kanıtlamaktadır.

1740 cm^{-1} C=O (ester) gerilme titreşimi, 1244 cm^{-1} epoksi halkasındaki simetrik halka gerilme titreşimi, 760 cm^{-1} epoksi halkasındaki C-H eğilme titreşimini göstermektedir.

M-poli(GMA) mikropartiküllerin sulu yoğunluğu 25 °C'de 1.14 g cm^{-3} olarak ölçülmüştür. Aynı işlemle, Fe_3O_4 partiküllerinin manyetik yoğunluğu 25 °C'de 1.97 g cm^{-3} olarak bulundu. Manyetik olmayan mikropartiküllerin yoğunluğu ise 1.08 g cm^{-3} olarak bulundu. Manyetit (Fe_3O_4 nanopartikül) biyoyumlu süperparamanyetik materyaldir. Düşük toksisite ve yüksek manyetik özelliklere sahiptir (Huang ve ark., 2003). Manyetitin sızması üç farklı ortamda çalışıldı.

1) Asetik asit çözeltisi (%50, v/v, pH 2.0)

2) Fosfat tamponu (pH 7.0)

3) Sodyum sitrat / NaOH tamponu (pH 12.0). Her üçünde de anlamlı sızma olmadığı görüldü.

Dış manyetik alanın varlığının büyük ölçüde aksiyal karışımı azalttığı söylenebilir. Sonuçta, bu adsorbentler manyetik sıvı kararlaştırılmış akışkan yatakta kullanılabilir (Guo ve Sun, 2004).

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi m-poli(GMA) mikropartiküllerin bağlı yoğunluğu 125 olarak bulundu. Bu değer polimerik yapıda varolan manyetitten dolayı bölgesel manyetik alan olduğunu gösterir. Şekil 4.4'de verilen g faktörü, molekülde varolan eşleşmemiş elektronların varlığını gösteren nicel bir özelliktir denebilir ve Eşitlik 3.3 kullanılarak 2.28 olarak bulundu. Bilinmeyen sinyalin g faktörünün bulunması, sinyalin belirlenmesi için önemlidir. Literatürde g faktörü, Fe^{+3} için 1.4-3.1 düşük spin için ve 2.0-9.7 yüksek spinli kompleksler için geçmektedir (Swartz ve ark., 1972).

Şekil 4.5'teki EMU spektrumundan ve H_r değerinden 2055 Gs manyetik alanın 1.0 g m-poli(GMA) örneğindeki varolan bütün manyetik dipolü uyarmak için yeterli olduğu görüldü. Bu değer manyetik akışkan yatak veya manyetik filtrasyonun tasarlanmasında oldukça önemli bir parametredir. Bu manyetik alan değeri akış hızının, mikropartikül boyutunun ve uzaklaştırılan katıların manyetik yatkınlığının fonksiyonudur. Literatürde bu değer 8 kGs ile 20 kGs arasında değişik uygulamalar için değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan manyetik partiküllerin sistemde daha az manyetik yoğunluğa ihtiyacı olduğunu gösterir (Odabaşı ve ark., 2005; Özkara ve ark., 2004; Uzun ve Denizli, 2006; Yavuz ve ark., 2006).

Elde edilen m-poli(GMA) mikropartiküllerin karakterizasyon sonuçlarına bakıldığında ise amaca yönelik IgG saflaştırılmasında kullanılacak özellikte mikropartikül elde edildiği görülmektedir.

İmmobilize afinite ligandın kromatografik performansı, matriksin özellikleri, ligandın özellikleri ve ligandın bağlanma şekline göre değişiklik gösterir. İmmobilizasyon yüzeyi ve immobilizasyon yönteminin daha etkin olduğu bilinmektedir. Hidrofobiklik, yük ve materyal yüzeyinin kimyasal özellikleri, immobilize ligandın oryantasyonunu ve kararlılığını etkiler. Lektinlerin immobilizasyonunda aktive edilmiş epoksi destek materyalleri hem laboratuvar hem de endüstri ölçekli kullanılmaktadır. Daha önce değinildiği gibi bu materyalin epoksi grubu açılarak tepkimeye hazır hale getirilerek lektindeki amino grubu ile bu hidroksil grubu arasında kovalent bağ oluşturarak kararlı taşıyıcı sağlanmış olmaktadır. Bu taşıyıcı nötr sulu ortamda depo süresince oldukça kararlıdır (Mateo ve ark., 2007).

Şekil 4.6'da 4.0 mg mL^{-1} Con A derişiminde maksimum adsorpsiyon 12.5 mg g^{-1} değerine ulaşmaktadır. Bu ligand derişiminde, ligand immobilizasyonu dengeye gelmektedir. Daha yüksek ligand derişimleri glikopeptit veya serbest glikanların bağlanmasında daha çok gereklidir ancak daha düşük ligand derişimi glikoproteinlerle etkileşimde yeterlidir (Becker ve ark., 1976; Cummings, 1997).

Şekil 4.7'de 1.0 mg mL^{-1} derişiminde maksimum Con A adsorpsiyonu pH: 7.4'de 3.2 mg g^{-1} olarak belirlendi. Con A mikropartiküle daha önce belirtildiği üzere ılımlı koşullarda bağlanmaktadır. Bu etkileşim hidroksil grubu ile lektindeki amin grupları arasında olmaktadır. Alkali koşullarda açılmadan, yani epoksi halkası içeren mikropartikül ile yapılan çalışmalar, Şekil 4.7'deki grafik çok az miktarda adsorpsiyon olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.8'de sunulan grafikte 1.0 mg mL^{-1} Con A derişiminde maksimum adsorpsiyonun $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 3.2 mg g^{-1} olduğu görülmektedir. Sıcaklığın artması bir protein olan lektinin yapısını ve aktivitesini değiştirmiş olup mikropartiküle bağlanmasını da zorlaştırmıştır. Buna rağmen, vücut sıcaklığı olan $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de de adsorpsiyon olduğu görülmektedir.

Şekil 4.9'da sunulan grafiğe bakılırsa, 1.0 mg mL^{-1} Con A derişiminde 0.1 M NaCl tuzu eklenerek ayarlanan iyonik şiddette adsorblanan Con A miktarının gram partikül başına 2.4 mg olarak bulunduğu görülür. İyonik şiddetin artması ile adsorplanan IgG miktarı azalmaktadır.

Grafik 4.10 a ve b doğruları kullanılarak oluşturulan ve Çizelge 4.1'de yer alan K_F ve n değerleri, manyetik afinite mikropartiküllerin yüksek adsorpsiyon kapasitesiyle IgG'nin sulu çözeltiden adsorpsiyonunun kolay olduğunu gösterir. Ayrıca langmuir korelasyon sabitinin $0,997$ çıkması adsorpsiyonun bu grafiğe iyi uyduğunu yani tek

tabakalı adsorpsiyon olduğunu ve komşular arasındaki etkileşmenin yok sayıldığı konusunda da bizi aydınlatmaktadır. Con A'nın denge verilerinin ilgili transformasyonu lineer olarak artar, bu da Langmuir modelinin bu sisteme uygulanabileceğini gösterir.

Con A moleküllerinin m-poli(GMA) mikropartiküllere bağlanmasının kimyasal olduğu ise Dubinin-Radushkevich adsorpsiyon grafiği ile araştırıldı. Konuyla ilgili son yıllardaki tartışmalara göre $E_{DR} = 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ değeri bir adsorpsiyon olayının fiziksel veya kimyasal nitelikte olmasını ayırtlayan eşik değer olarak tanımlanmaktadır; $E_{DR} < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ise süreç fiziksel ve $E_{DR} \geq 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ise kimyasaldır (Krishna ve ark., 2000 ve Cestari ve ark., 2006). Bu yaklaşıma göre, Çizelge 4.1'de Dubinin-Radushkevich adsorpsiyon grafiğinden elde edilen E_R değerinin $9,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ çıkmasıyla bu bağlanmanın kimyasal olduğu söylenebilir.

Şekil 4.12'de sunulan grafik pH'ın IgG adsorpsiyonuna etkisini göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi Con A takılı mikropartiküle bağlanan IgG adsorpsiyonu pH: 6.0'da maksimum değer gösteriyor. Bu pH'da maksimum IgG adsorpsiyonu 33.5 mg g^{-1} olarak bulundu.

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi Con A bağlı olmayan partiküle spesifik olmayan IgG etkileşimi oldukça azdır (0.2 mg g^{-1}), beklenen aktif bölgelerin doygunluğuna ise 2.0 mg mL^{-1} başlangıç derişiminde ulaşıyor. Bu derişimde maksimum IgG adsorpsiyonu ise 59 mg g^{-1} partikül değerine kadar çıkıyor. Ayrıca şekilden de görüldüğü gibi başlangıç derişimi arttıkça, aynı inkübasyon ortamında adsorblanan IgG miktarı da artmaktadır.

Şekil 4.15'den görüldüğü gibi NaCl tuzu eklenerek ayarlanan iyonik şiddet arttıkça, adsorblanan IgG miktarı 30.9 mg g^{-1} 'den 5.1 mg g^{-1} değerine düşmektedir. Düşük tuz derişimi spesifik olmayan etkileşmeleri engellemektedir, ancak tuz derişimi arttıkça ortamdaki IgG molekülleri bir araya toplanacağı için adsorpsiyon azalacaktır. İyonik şiddet arttıkça adsorbsiyon kapasitesindeki azalma m-poli(GMA)-Con A ile IgG arasındaki itici elektrostatik etkileşmelerden kaynaklanmış olabilir. Adsorbsiyon ortamındaki tuz derişimi arttığında, immobilize Con A moleküllerinin kendi aralarındaki hidrofobik etkileşmeler artan tuz derişiminden dolayı kuvvetlenir. Sonuç olarak IgG molekülüne ulaşabilecek Con A molekülünün sayısı azalır ve immobilize Con A'ya IgG molekülünün adsorbsiyonu zorlaşır.

Şekil 4.16'da maksimum IgG adsorpsiyonu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 40.3 mg g^{-1} partikül olarak bulunmuşken $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de bu değer 5.1 mg g^{-1} 'a kadar düşmüştür. Tüm sıcaklıklarda IgG'nin Van der Waals kuvvetlerinden doğan spesifik olmayan etkileşimleri oldukça

düşüktür. Bununla birlikte m-poli(GMA)-Con A mikropartikülüne IgG adsorpsiyonu artan sıcaklıkla azalmaktadır. Sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesindeki azalma Con A molekülünün konformasyonunda, dolayısıyla etkileşim sağlanan bölgede meydana gelen değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir. Bir çok immobilize lektin 20 °C ve 4 °C sıcaklık değerlerine kıyasla 37 °C'de daha az etkindir (Montreuil ve ark., 1994).

Şekil 4.17'de gösterildiği gibi aynı mikropartikül, onuncu kez tekrar kullanımda bile hala % 98.5 etkinlikte adsorpsiyon meydana getirmektedir. İmmobilize lektine bağlanan IgG'nin desorpsiyonu için ortama haptetik şeker olan glukoz ve kuvvetli desorplayıcı ajan olan etilen glikol eklenmiştir. Glukoz ile glikoproteinin yerdeğiştirmesi tersinirdir ve denge tamponunun aşırısı ile yıkandıktan sonra immobilize lektin aynı etkinlikte kullanılabilir. Desorpsiyonu kolaylaştırmak için ise oda sıcaklığı seçilmiştir, çünkü adsorpsiyonun sıcaklık etkisinde değinildiği gibi yüksek sıcaklıkta adsorpsiyon zayıf ve dolayısıyla desorpsiyon daha iyi olacaktır.

Şekil 4.18'de akış hızı etkisi grafiğinde gösterildiği gibi 1.0 mL dk⁻¹, 2.0 mL dk⁻¹, 3 mL dk⁻¹, 4.0 mL dk⁻¹ akış hızlarındaki adsorpsiyon kapasitesi akış hızı arttıkça azalmaktadır. Kolonda IgG moleküllerinin alıkonma zamanı akış hızının artmasıyla azalır, çünkü akış hızının artması protein moleküllerinin mikropartikül yüzeyindeki lektinin amino gruplarıyla etkileşmesine yeterli zaman tanımaz. Ayrıca eş boyutlu mikropartiküller yüksek akış hızında hızla sürükleneyeceği için de çözelti ile etkileşmesi zor olacaktır.

Şekil 4.19 pH'nın IgG adsorpsiyonuna etkisini göstermektedir. Maksimum IgG adsorpsiyonu 37.7 mg g⁻¹ olarak pH: 6.0 fosfat tamponunda belirlendi.

Şekil 4.20'de de görüldüğü gibi konkanavalin A bağlı olmayan partiküle spesifik olmayan IgG etkileşimi oldukça azdır (0.2 mg g⁻¹), buna rağmen konkanavalin A bağlı olan partikül ile IgG arasındaki spesifik etkileşim ise 37.7 mg g⁻¹ partikül değerine kadar çıkmaktadır.

Farklı derişimlerde ve zaman aralıklarında yapılan kinetik çalışmalar sonucu Şekil 4.21'de görülmektedir. Her derişim için adsorpsiyon kapasitesi 60. dakikada dengeye gelmektedir. Bu artış elbette Con A bağlı mikropartikül ile IgG arasındaki spesifik etkileşim nedeniyledir. Spesifik bağlanma noktaları doygunluğa geldiğinde ise artık grafikten de görüldüğü gibi maksimum Q değerine ulaşılıyor.

Eşitlik 4.22'de 0.1-1.0 M derişim aralığında ortama eklenen NaCl sonucu IgG adsorpsiyonu %28 azaldı. Azalma protein ile ligand arasındaki itici elektrostatik etkileşmelerden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.23'de sunulduğu üzere manyetik alan arttıkça aynı akış hızında adsorplanan IgG 37.7 mg g^{-1} 'den 18 mg g^{-1} değerine azalmaktadır. Bunun nedeni ise artan manyetik alan ile manyetik mikropartiküller arasında kuvvetli topaklaşma meydana gelmesi ve mikropartiküllerin akışkanlaşmasının zorlaşmasıdır ya da başka bir ifade ile bir araya toplanan mikropartikül ile IgG etkileşiminin azalmasıdır.

Sürekli sistemde tekrar kullanılabilirlik Şekil 4.24'te sunulduğu üzere % 99 etkinliktedir. Partikülün tekrar kullanım aşamasında aynı partikül kullanılarak tekrarlanan on adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda adsorpsiyon kapasitesinin sadece % 1'ni kaybettiği görülmektedir.

Kesikli ve sürekli sistemin pH taraması kıyaslandığında sürekli sistemin aynı pH değerlerinde adsorpsiyon kapasitesinin daha yüksek olduğu görülüyor. Kesikli sistemde maksimum adsorpsiyon 35.5 mg g^{-1} iken sürekli sistemde bu değer 37.7 mg g^{-1} değerine kadar çıkıyor.

Kesikli ve sürekli sistemin başlangıç derişim taramasında iki sistemde de 2.0 mg mL^{-1} değerinde doyunluğa erdikleri görülüyor. Fakat kesikli sistemde maksimum adsorpsiyon 59 mg g^{-1} iken sürekli sistemde bu değer 66 mg g^{-1} değerine yükseliyor.

MSFB ve kesikli sistem çalışmalarında koşullar ve m-poli(GMA) mikropartiküller aynı olduğu halde, MSFB sisteminde adsorpsiyon kapasitesi kesikli sistemde fazladır. Manyetik kararlılık kazandırılmış akışkan yataklı sistemin daha önce değinildiği gibi etkin sıvı (IgG çözeltisi) – katı (mikropartikül) kütle transferi üstünlükleri neticesinde bu adsorpsiyon artışı gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca, manyetik alan altındaki kolonda sürekli taze protein çözeltisi etkileşiyor. Dolayısıyla kolondaki mikropartikül ile etkileşen çözelti derişimi kısmen sabit kalıyor. Kesikli sistemde ise derişim adsorpsiyon devam ettikçe azalır bu da mikropartikülün verimini azaltıyor olabilir.

Con A immobilize örnek için kan serumundan IgG adsorpsiyonu 48 mg g^{-1} 'e yükselmektedir. Adsorplanan biyomolekülün % 85'i tekrar desorplandı.

Con A immobilize m-poli(GMA) eş boyutlu mikropartiküllerin kanda tekrar kullanılabilirliğini göstermek amacıyla yapılan kan çalışmalarının sonucu, sulu çözeltiden adsorpsiyona kıyasla daha düşük çıkmıştır. Sulu çözeltiden adsorpsiyon çalışmaları pH: 6.0'da fosfat tamponu ile yapılmışken kan ortamı pH: 7.4 olduğundan adsorpsiyon için doğru yönlendirilmenin olmamasından kaynaklanmış olabilir.

Serumda bulunan diğer protein olan albüminin partiküle olan adsorpsiyon kapasitesi 2.0 mg g^{-1} olarak bulundu. Toplam protein adsorpsiyonu 50 mg g^{-1} ve sonuçlardan da görüldüğü gibi IgG adsorpsiyonu da 48 mg g^{-1} 'dir. Dolayısıyla bu da

bize Con A immobilize mikropartikülün IgG'ye özgülüğünü göstermektedir. Ortamda bulunan albümin ve diğer çok az miktarda bulunan apo-lipoprotein A1, sero-transferrin, haptoglobulin ve α 1-antitripsin gibi proteinlerin adsorpsiyonu ihmal edilecek derecededir. Con A'nın bu proteinlere olan adsorpsiyonun düşük olmasının nedeni bu mikropartikülün IgG molekülüne karşı özgülüğünün yüksek olmasından dolayıdır. Aynı mikropartiküle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 defa uygulandı. Beşinci döngünün sonunda mikropartikül hala % 94 etkinlikte çalışıyordu. Partikülün veriminde kaydadeğer bir azalma olmadığı elde edilen sonuçlarla görüldü. Bu sonuç bize aynı zamanda doğru desorpsiyon ajanı ile çalışıldığını gösterdi.

Şekil 4.28'de sunulan grafik bizlere mikropartikülün kararlılığını göstermektedir. Uzun süre sonunda dahi mikropartikülün etkinliğinde kaydadeğer bir değişme olmadı.

Şekil 4.29'da SDS-PAGE'e bakıldığında adsorpsiyon öncesi ve sonrası serum örneği arasındaki farkı desorplanan örneğinin kapattığı görülmektedir. İnsan IgG ve marker ile kıyaslandığında desorplanan örneğin İnsan IgG olduğu ortaya çıkmaktadır.

Şekil 4.30'a bakıldığında desorplanan ve doğal proteinin dalgaboyunun her ikisinin de 333 nm olduğu görülmektedir. Fakat denature proteine bakıldığında emisyon şiddetinde azalma ile birlikte dalgaboyu da 343 nm'ye kaymıştır. Bunun nedeni ise immunoglobulin molekülündeki 280 nm de pik veren aromatik halkanın çevresindeki değişiklik olabilir. Saflaştırma için çok önemli olan saflaştırma sonrası protein yapısında bir değişiklik olmamasıdır. Florimetrik çalışma sonuçları saflaştırma öncesi ve sonrası glikoprotein yapısında bir bozulma olmadan elde edildiğini göstermektedir.

Şekil 5.1 incelendiğinde Con A immobilize çipin yüzeyinin kalınlığı ortalama olarak yaklaşık 15 nm olarak bulunmuştur. Bir tek Con A tetrametinin boyutunun 6.7 nm \times 11.3 nm \times 12.2 nm oluşu düşünülürse, 15 nm kalınlıktaki tabakanın bir veya iki Con A içerdiği söylenebilir (Bouckact ve ark., 1996; Lebed ve ark., 2005). Yani bu bilgi bize SPR çipin yüzeyine immobilize Con A olduğunu kanıtlar.

SPR çipe immobilize Con A ve analit olarak 0.1-1.5 mg mL⁻¹ derişim aralığında hazırlanan IgG çözeltileri arasındaki kinetik çaişmalar sonucunda her derişim için ayrı ayrı SPRwiev yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmış olup elde edilen sensogramlar Şekil 5.9'da toplu halde sunulmuştur. Sensogramlara bakıldığında 1.0 ve 1.5 mg mL⁻¹ değerlerinin birbirine çok yakın olduğu ancak çok az bir fark olduğu ve artık bu değerlerde eğrilerin doygunluğa geldiği görülmektedir. Şekil 5.10'da sunulan grafiklerde ise derişime karşı ΔR değerleri çizilmiş olup 0.1-1.0 mg mL⁻¹ değerleri

arasındaki grafikte doğru görülürken 0.1-1.5 mg mL⁻¹ derişim aralığında bu doğrunun hiperbole döndüğü görülmektedir.

SPR çiplerden elde edilen % kırılma değerleri, verilerin değerlendirilmesinde önemli bilgiler sunmaktadır. Ancak, daha duyarlı veri değerlendirilmesi, anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR verileri ile yapılmaktadır (Kugimiya ve Takeuchi, 2001; Guedon ve ark., 2000; Meyer, Hartmann ve Keusgen, 2006; Riboh ve ark., 2003; Haes ve Van Duyne, 2003; Grosjean ve ark., 2006; Cherif ve ark., 2006). Bu yöntemle, SPR çipin anlık hatalarını önlemek mümkündür. Şekil 5.9'da görüldüğü gibi zaman- ΔR sensogramlarının eğrileri, zaman-% kırılma miktarı eğrileri ile aynıdır. Fakat eğriler bir arada incelendiğinde; değerlendirilmesi açısından daha duyarlı sonuçlar olduğu görülmektedir.

Kinetik analiz çalışmalarının sonuçları incelendiğinde, denge kinetik analizine nazaran bağlanma kinetik analizinin R^2 değerinin daha yüksek olduğu dolayısıyla bu yöntemle hesaplanan değerlerin daha uygun olduğu söylenebilir. Buradaki K_D değerine bakıldığında, glikoprotein ile Con A arasındaki etkileşimin gerçek zamanlı ve kinetik olarak ölçülebildiği sonucu çıkmaktadır (Okazaki ve ark., 1995).

Langmuir adsorpsiyon modeli Homojen bağlanma bölgeleri olan ve Freundlich adsorpsiyon modeli heterojen bağlanma bölgeleri olan tek tabakalı adsorpsiyonu ifade eden bir modeldir (Aksu ve Kutsal, 1991; Aksu ve Tezer, 2004). Langmuir-Freundlich modeli (LF), doygunluğa kadar geniş derişim aralığında heterojenite ile ilgili bilgi sağlamakta ve adsorpsiyon davranışı daha tutarlı tanımlamaktadır. Şekil 5.12'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir. Bu grafiklerin çizilmesinde daha önce belirtildiği gibi kütle-derişim dönüşümlerini önlemek amacıyla bazı parametre değişimleri yapılmıştır ($Q_{max}=\Delta R_{max}$, $Q=\Delta R$ gibi). Çizelge 5.2'de ise bulunan değerler özetlenmiştir.

Çizelge 5.2 incelendiğinde SPR çip ile IgG arasındaki etkileşime en uygun model Langmuir izoterm modelidir ($R^2=0,9924$).

SPR çip ile yapılan adsorpsiyon izoterm modelleri ile sulu çözeltide Con A ile IgG arasındaki etkileşim sonucu elde edilen adsorpsiyon izotermeleri kıyaslandığında, ikisinde de en uygun izoterm modelinin Langmuir olduğu görülmektedir.

Bu çalışma kapsamında dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan eş boyutlu m-poli(GMA) mikropartiküller sentezlenmiş olup amaca yönelik olarak öncelikle lektin immobilize edildi. Daha sonra IgG kesikli ve sürekli sistem çalışmalarında kullanıldı. Olumlu sonuç alındıktan sonra kanda IgG saflaştırılmasında

kullanıldı. SDS-PAGE ile saflaştırılan IgG'nin saflık kontrolü yapıldı. Hazırlanan mikropartikül çok defa aynı etkinlikte kullanılabilir. Gerçek zamanlı olarak etkileşimi gösteren SPR çalışmaları sonucu ise yapılan çalışmayı desteklemiştir.

Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında ise özellikle ligand olarak Con A kullanılan çalışma sonuçlarına göre ortalama bir değer göstermektedir.

8.KAYNAKLAR

Adamczyk, M., Gebler, J.C., Gunasekera, A.H., Mattingly, P.G., Pan, Y., (1997). Immunoassay reagents for thyroid testing. 2. Binding properties and energetic parameters of a T₄ monoclonal antibody and its Fab fragment with a library of thyroxine analog biosensors using surface plasmon resonance. *Bioconjug Chem*, (8)2, 133-145.

Adamczyk, M., Johnson, D.D., Mattingly, P.G., Moore, L.A. ve Pan, Y. (1998). Immunoassay Reagents for Thyroid Testing. 3. Determination of the Solution Binding Affinities of a T₄ Monoclonal Antibody Fab Fragment for a Library of Thyroxine Analogs Using Surface Plasmon Resonance, *Bioconjugte Chem.*, 9 , 23-32.

Aksu. Z. and Kutsal, T., "Bioseparation Process for Removing Lead(II) Ions from Waste Water by Using *C.vulgaris*", *J. Chem. Tech. Biotech.*, 52, 109-118 (1991).

Aksu Z, Tezer S (2004) Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. *ProcessBiochemistry* 40, 3-4, 1347-1361.

Arshady, R. (1999). Microspheres, Microcapsules and Liposomes, Citrus Books, *Colloids and Surfaces A: Phycochemical & Eng. Aspects*, 153, 325.

Azanova, V., Hradil, J., Svec, F., Pelzbauer, Z. ve Panarin, E.(1990). Glycidyl Methacrylate-Styrene-Ethylene Dimethacrylate Terpolymers Modified with Strong-Acid Groups, *React. Polym.*, 12, 247-260.

Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Pişkin, E. ve Denizli, A. (2006). Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel, *React. And Func. Polym*, 1263-1271.

Becker, J.W., Cunningham, B.A., Beke, G.N., Wang, J.L. ve Edelman, G.M. (1976). The Molecular Structure of Concanavalin A. In: Bittiger, H. and Schnebli, H.P. Concanavalin A as a tool(33-52). John Wiley and Sons, Ltd., London.

Bereli, N., Akgöl, S., Yavuz, H. ve Denizli, A. (2004). Antibody purification by Concanavalin A Affinity Chromatography, *J Appl. Polym. Scien.*, 97, 1202-1208.

Bergemann, C., Müller-Schulte, D., Oster, J., à Brassard, L. , Lübbe, A.S. (1999). Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications, *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*,(194)1-3, 45-52.

Billmeyer, F. W. (1984). Textbook of Polymer Science, John Wiley and Sons, New York.

Bilkova, Z., Slovakova, M., Lycka, A., Horak, D., Lenfeld, J. ve Turkova, J. (2002). Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres, *J Chromatogr B.*, 770(1-2), 25-34.

Bohm, D., ve Pittermann, B. (2000). Magnetically stabilized beds in biochemical engineering-investigation in hydrodynamics, *Chem. Eng. And Technol.*, 23, 309-312.

Bouckaert, J., Poortmans, F., Wyns, L ve Loris, R. (1996). Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A , *J. Biol. Chem.*, 271, 16144–50.

Bueno, S.M.A., Haupt, K. ve Vijayalakshmi, M.A.(1995). Separation of Immunoglobulin G from Human Serum by Pseudobioaffinity Chromatography Using Immobilized L-Histidine in Hollow Fibre Membranes, *J Chromatogr. B.*, 667, 57-67.

Cao, K., Li, B.F., Huang, Y., Li, B.G. ve Pan, Z.R. (2000). Mechanism and Model of Dispersion Polymerization Using Homopolymer as Dispersant in Polar Media, *Macromolecular Symposia*, 150,187-194.

Castilho, L. R., Deckwer, W. D. ve Anspach, F. B. (2000). Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes, *J Membr Sci*, 172, 269–277.

Cestari, A.R., Eunice V.F.ve Mottos, C.R.S. (2006). Thermodynamics of the Cu (II) adsorption on thin vanillin-modified chitosan membranes, *J. Chem. Thermodyn.*, 38, 1092-1099.

Charcosset, C., Su, Z., Karoor, S., Daun, G. ve Colton, C. K. (1995). Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization, *Biotechnol. Bioeng.* 48, 415–427.

Cherif, B., Villiers C.L., Paranhos-Baccalà, G., Calemczuk, R., Marche, P.N., Livache, T., ve. Villiers, M.B. (2006). Design and Application of a Microarray for Fluorescence and Surface Plasmon Resonance Imaging Analysis of Peptide-Antibody Interactions, *J Biomed. Nanotechnol.*, 2, 29–35(7).

Chen, M.-Q.; Serizawa, T.; Kishida, A.; Akashi, M. (1999). Graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. XXIII. Particle size control of poly(ethylene glycol)-coated polystyrene nanoparticles prepared by macromonomer method, *J Polym Sci A Polym Chem Ed*, 37, 2155-2166.

Christer, J. ve Lars, R. (1997). Protein Purification, New York Pres, New York, 375-679.

Cowan, J. (1972). The Surface ace plasmon resonance effect in holography. *Opt. Commun.* 5, 69-72.

Cumming, R.D. ve Kornfeld, S. (1982b). Fractionation of asparagines-lined oligosaccarides by serial lectin-agarose affinity chromatography. A rapid sensitive and specific technique. *J.Biol. Chem.* 257, 11235-11240.

Cummings, R.D. (1997). Lectins as a tool for glycoconjugate purification and characterization. İn: Gabius HJ and Gabius S Glycoscences (191-199). Chapman&Hall.

Curling J. (1980). Methods of Plazma Protein Fractionation, Academic Pres, London.

Dancette, O.P., Taboureau, J.L., Tournier, E., Charcosset, C. ve Blond, P. (1999). Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography. *J Chromatogr B. Biomed Sci Appl.*, 723, 61–8.

Denizli,A., Rad, A.Y. ve Piskin, E. (1995). Protein A immobilized polyhydroxyethylmethacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin-G. *J. Chromatogr. B* , 668 , 13.

Denizli, A., Alkan, M., Garipcan, B., Özkara, S. ve Pişkin, E. (2003). Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma, *J Chromatogr B*, (1), 795, 93-103.

Ding, Z. Fong, R. B., Long, C. J., Stayton, P. S. ve Hoffman, A. S.(1999). Temperature control of biotin binding and release with a streptavidin-poly(N-isopropylacrylamide) site-specific conjugate. *Bioconj. Chem.* 10, 395-400.

Donaldson, M.S., Shuler, M.L. (1999). The use of lectins to select subpopulations of insect cells, *Biotechnol Bioeng.*, 64, 616–9.

Duffy, S.A., Moellering, B.J., Prior, G.M., Doyle, K.R. ve Prior, C.P. (1989). The recovery of highly purified biopharmaceuticals from perfusion cell-culture bioreactors, *BioPharm.*, 46.

Dunnill, P. ve Lilly, MD. (1974). Purification Of Enzymes Using Magnetic Bio-Affinity Materials. *Biotechnol And Bioengineer.*, 16, 987-990. Farach-Carson, M.C. ve Carson, D.D. (1989). Extraction and isolation of glycoproteins and proteoglycans. *Bio Techniques*, 7, 482-493.

Farach-Carson, M.C. ve Carson D.D. (1989). Extraction and isolation of glycoproteins and proteoglycans, *BioTechniques*, 7, 482-493.

Füglister, P. (1989). Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices, *J Immunol Methods.*, 124, 171.

Garipcan, B. ve Denizli, A. (2002). A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromol Biosci.*, 2, 135.

Glaser, R.W. (1993). Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Anal. Biochem.* 213 ,152–161.

Grosjean, L., Cherif, B., Mercey, E., Roget, A., Levy, Y., Marche, P. N., Villiers M. B. ve Livache, T. (2005). A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal. Biochem.* 347, 193-200.

Guedon, P., Livache, T., Martin, F., Lesbre, F., Roget, A., Bidan, G. ve Levy, Y. (2000). Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 72, 6003-6009..

Guo, Z., ve Sun, Y. (2004). Characteristics of immobilized lipase on hydrophobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterification, *Biotechnology Progress* 20 (2), 500–506.

Haes, A. J. ve Van Duyne, R.P.(2003). Nanoscale Optical Biosensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, Proceedings of the SPIE, 5221, (Plasmonics: Metallic Nanostructures and Their Optical Properties), 47-58.

Hames, B. D. and Rickwood, D. (1990). Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, Second Edition, p. 17, Oxford University Press, New York.

Hickel, W., Knoll, W. (1989). Surface plasmon microscopic imaging of ultrathin metal coating. *Acta Metallica.*, 37, 2141-2 142.

Hirabayashi, J., Kasai, K. (2006). Separation technologies for glycomics, *J. Chromatogr B*, 771(1-2) 67-87.

Horak, D. ve Shapoval, P. (2000). Reactive poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization, *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 38, 3855-63.

Hu, W.P., Chang, G.L., Chen, S.J. ve Kuo, Y.M. (2006). Kinetic analysis of β -amyloid peptide aggregation induced by metal ions based on surface plasmon resonance biosensing, *Journal of Neuroscience Methods*, 154,190–197.

Huang, S.H., Liao, M.H. ve Chen, D.H. (2003). Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnology Progress*, 19(3), 1095-1100.

Janson-C., Ryden L., 1997, Protein Purification. New York Press., New York, 375-679.

Josic, D. ve Lım, Y.P. (2001). Methods for Purification of Antibodies, *Food technol. Biotechnol.* , 39 (3), 215-226.

Karataş, M., Akgöl, S., Yavuz, H., Say, R. ve Denizli, A. (2007). Immunoglobulin G depletion from human serum with metal-chelated beads under magnetic field, *International Journal of Biological Macromolecules* , 40, 254–260.

Kim, M., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T. ve Ishigaki, I. (1991). Protein Adsorption Capacity of a Porous Phenylalanine Containing Membrane Based on a Polyethylene Matrix., *J. Chromatogr.* 1991, 586, 27–33.

Klein, E., Yeager, D., Seshadri, R. ve Baurmeister, U. (1997). Affinity adsorption devices prepared from microporous poly(amide) hollow fiber and sheet membranes. *J. Membr. Sci.* 129 , 31.

Krishna, B.S., Murty, D.S.R. ve Jai Prakash, B.S. (2000). Thermodynamics of Chromium(VI) Anionic Species Sorption onto Surfactant-Modified Montmorillonite Clay, *J. Coll. and Interface Sci.*, 229, 230–236.

Kouassi, G.K., Irudayaraj, J. ve McCarty, G. (2005). Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles, *Biomagnetic Research and Technology* 3 , pp. 1–10.

Kugimiya, A. ve Takeuchi, T. (2001). Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid, *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 1059–1062.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680, p. 367–79.

Langlotz, P., Kroner, K. H. (1992). Surface modified membranes as a matrix for protein purification, *J. Chromatogr.*, 591, 107.

Lebed, K., Pyka-Fosciak, G., Raczowska, J., Lekka, M. ve Styezen J. (2005). Binding activity of patterned concanavalin A studied by atomic force microscopy, *J. Phys:Condens. Matter*, 17,1447-1458.

Lee, H. ve Neville, K. (1967). Handbook of Epoxy Resins, McGraw-Hill Book Company, New York , 4–14.

Liapis, A.I. (1989).Theoretical Aspects Of Affinity-Chromatography, *J. Biotechnol.*, 11 (2-3), 143-160.

Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensor. Actuat.* 4 , 299–304.

Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1995). Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started, *Biosens. Bioelectron.*, 10, i-ix.

Lin, Z., Zou, Q., Ward, E. S.ve Ober, R. J. (2005). Cramer–Rao Lower Bound for Parameter Estimation in Nonlinear Systems, *Ieee Signal Processing Letters*,12, 855.

Lis, H. ve Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools, *Annu. Rev. Biochem.* , 55, 35-67.

Lis, H. ve Sharon, N. (1977). Lectins: Their chemistry and application to immunology. *The Antigens.*, 4, 429-529. Academic Press, New York, London.

Lok, P.K. ve Ober, C.K. (1985). Particle size control in dispersion polymerization of polystyrene, *Canadian Journal of Chemistry*, 63, 209-216.

Loomans, E.E.M.G., Beumer, T.A.M., Damen, K.C.S., Bakker, M.A., Schielen, W. J.G. (1997). Real-time monitoring of peptide-surface and peptide-antibody interaction by means of reflectometry and surface plasmon resonance, *J. Colloid Interface Sci.*, 192, 238-249.

Lundstrom, I. (1994). Real-time biospecific interaction analysis. *Biosens. Bioelectron.* 9, 725-736.

Ma, Z.Y., Guan, Y.P. ve Liu, H.Z. (2005a). Synthesis of monodisperse nonporous crosslinked poly(glycidyl methacrylate) particles with metal affinity ligands for protein adsorption, *Polym. Inter*, 54(11), 1502-1507.

Ma, Z. Y., Guan, Y.P. ve Liu, H. Z.(2006). Affinity adsorption of albumin on Cibacron Blue F3GA-coupled non-porous micrometer-sized magnetic polymer microspheres, *React. and Func. Polym.*, 66 (6), 618-624.

Ma, Z.Y., Guan, Y.P.ve Liu, X. Q.(2005b). Synthesis of magnetic chelator for high-capacity immobilized metal affinity adsorption of protein by cerium initiated graft polymerization, *React. and Func. Polym* ,21(15), 6987-6994.

Mateo, C., Grazú, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R. ve Guisán J.M. (2007). Advanced in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization, *Biochemical Society Transactions*, 35-6.

May, C. A.(1988). *Epoxy Resins, Chemistry and Technology*; Marcel Dekker: New York.

Median, M.B. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 389-94.

Median, M.B., Vanhouten, L, Cooke, P.H., Tu, S.I. (1997). *Biotechnol. Tech.* 11, 173-176.

McEver, R.P., Moore, K.L. ve Cummings, R.D.(1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.*, 270, 11025-8.

Mészárosóvá, H., Veronig, A., Zlobec, P. Ve Karlicky, M.(2003). Analysis of solar narrow band dm-spikes observed at 1420 and 2695 MHz, *A&A*, 407, 1115-1125.

Meyer, M.H.F., Hartmann, M. ve Keusgen, M. (2006). SPR-based immunosensor for the CRP detection—A new method to detect a well known protein, *Biosens Bioelectron* , 21 , 1987–1990.

Mislovicova, D., Chudinova, M., Gemeiner, P. ve Dokolomansky, P. (1995). Affinity chromatography of invertase on concanavalin A bead cellulose matrix: the case of an extraordinary strong binding glycoenzyme. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* , 664 , 145–153.

Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Lemoine, J., Michalski, J. C., Spik, G. ve Strecker, G. (1994). In:Chaplin MF and Kennedy JF , *Carbohydrate Analysis A Practical Approach* second edition ,chapter 5, 181-293. Oxford University Pres, Oxford.

Morgan. C.L., Newman, D.J., Price, C.P. (1996). Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine, *Clin. Chem.*, 42, 193-209.

Moore, K.L., Varki, A.ve McEver, R.P.(1991). GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils:evidence for a lectin-like interaction. *J Cell Biol.*,112, 491–9.

Mosbach, K., Andersson, L. (1977). Magnetic Ferrofluids For Preparation Of Magnetic Polymers And Their Application In Affinity Chromatography., *Nature*, 270, 259-261.

Müller-Schulte, D., Manjini, S. ve Vijayalakshmi, M. A. (1991). Comparative Affinity Chromatographic Studies Using Novel Grafted Polyamide and Poly(Vinyl Alcohol) Media, *J Chromatogr.*, 539, 307-314.

Munro, PA., Dunnill, P. ve Lilly, MD. (1977). Non-Porous Magnetic-Materials As Enzyme Supports - Studies With Immobilized Chymotrypsin. *Biotechnology And Bioengineering*, 19, 101-124.

Myszka, D.G., Morton, T.A., Doyle, M.L., Chaiken, I.M. (1997). Kinetic analysis of a protein antigen—antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor, *Biophys Chem* , 64, 127–137.

Narayanan, S.R. (1994). Preparative Affinity-Chromatography Of Proteins, *J. Chromatogr. A*, 658 (2), 237-258.

Nicholson, J. W. (1991). *The Chemistry of Polymers*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T. (1982). Gas detection by means of surface plasmons resonance. *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88.

O'Brien, S.M., Thomas, O.R.T., Dunnill, P. (1996). Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption. *Journal of Biotechnology*, 50(1), 13-25.

Ober, C.K. ve Lok, K.P. (1987). Formation of Large Monodisperse Copolymer Particles by Dispersion Polymerization, *Macromolecules*, 20, 268-73.

Odabaşı, M., Uzun, L. ve Denizli, A. (2004). Porous magnetic chelator support for albumin adsorption by immobilized metal affinity separation, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 2501-2510.

Odabaşı, M., Özkayar, N., Özkara, S., Ünal, S. ve Denizli, A. (2005). Pathogenic antibody removal using magnetically stabilized fluidized bed. *J Chromatogr. B*, 826 (1–2), 50–57.

Odion, G. (1970). Principles of Polymerization, McGraw Hill, New York.

Ohlson, S., Strandh, M., Nilshans, H. (1997). Detection and Characterization of Weak-Affinity Antibody-Antigen Recognition with Biomolecular Interaction Analysis. *J. Mol. Recognit.* , 10, 135-138.

Okazaki, I., Hasegawa, Y., Shinohara, Y ve Kamasaki, T. (1995). Determination of the interactions between lectins and glycoproteins by surface plasmon resonance, *J. Mol. Recogn.* , 8, 95–99.

Osawa, T. ve Tsuji, T.(1987). Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins. *Annu Rev Biochem* .,56, 21–42.

Otto, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection , *Zeitschrift für Physik.*, 16, 398.

Özkara, S., Yavuz, H., Patır, S., Arıca, M. Y. ve Denizli, A.(2002). Separation of human-immunoglobulin-G from human plasma with l-histidine immobilized pseudo-specific bioaffinity adsorbents , *Sep. Sci. Technol*, 37(3), 717-731.

Özkara, S., Yavuz, H. ve Denizli, A. (2003). Purification of Immunoglobulin G from Human Plasma by Metal-Chelate Affinity Chromatography, *J Appl Polym Sci*, 89, 1576-1572.

Özkara, S., Akgöl, S., Çanak, Y. Ve Denizli, A. (2004). A novel magnetic adsorbent for immunoglobulin-G purification in a magnetically stabilized fluidized bed. *Biotechnol. Progress*, 20(4), 1169–1175.

Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S. ve Denizli, A. (2007). Newly synthesized bentonite-histidine (Bent-His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption, *Colloids and Surface A : Physicochem. Eng. Aspects*, 301, 490-497.

Pathak, S.S., Savelkoul, H.F. (1997). Biosensors in immunoloji: the story so far, *J. Immunol. Today.*, 18, 464-467.

Paul, S. ve Ranby , B. (1976). Studies of methyl methacrylate-glycidyl methacrylate copolymers: Copolymerization to low molecular weights and modification by ring-opening reaction of epoxy side groups, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, 14, 2449.

Peng, Z., Arthur, G., Simons, F.E. ve Becker, A.B.(1993). Binding of dog immunoglobulins G, A, M, and E to concanavalin A, *Vet Immunol Immunopathol*, 36, 83 – 8.

Radhakrishna, S., King, C., DaRue, A., Halem, J., Thomas, P., ve Timothy, D.(2003). Characterization of the low Molecular Weight Human Serum, *Proteomic.Mol Cell Proteomics* , 2, 1096-103.

Rauffer-Bruyere, N., Chatellier, J., Weiss, E., Regenmortel, M.H.V., Altschuh, D. (1997). Cooperative effects of mutations in a recombinant Fab on the kinetics of antigen binding. *Mol. Immunol.*, 34, 165- 174.

Riboh, J.C., Haes, A.J., McFarland, A.D., Yonzon, C.R.ve Duyne, R.P.V. (2003). A nanoscale optical biosensor: real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion, *J. Phys. Chem. B*, 107 (8), 1772-80.

Rini, J.M. (1995). Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 551-577 .

Robertson, E.R.ve Kennedy, J.F. (1996). Glycoproteins: a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterization. *Bioseparation*, 6, 1– 15.

Roque C.A., Silva S.O. ve Taipa M. (2007). Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and Perspectives, *J Chromatogr. A*, 1160, 44-55.

- Rothenbauser, B., Knoll, W. (1988). Surface-plasmon microscopy, *Nature*, 332 , 615-617.
- Rüdiger, H. (1997). Structure and functions of plant lectins, in: *Glycosciences: status and perspectives*, (Gabijs, H.-J. and Gabijs, S., eds), 415-439, Chapman & Hall, Weinheim.
- Rubenstein, K.E., Schneider, R.S. ve Ulman, E.F. (1972). 'homogeneous' enzyme immunassay: New immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 846-851.
- Safarik, I., ve Safarikova, M. (1999). Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *J. Chromatogr B*, 722(1-2), 33-53.
- Safarik, I., & Safarikova, M. (2004). *Biom. Resear. And Technol*, 2,1-17.
- Saiyed, Z.M., Telang, S.D. ve Ramchand, C.N. (2003). Advancement in the field of magnetic fluids for drug discovery, medicine and biotechnology, *Biom. Resear. And Technol*, 11 (4), 358-362.
- Saleemuddin, M. ve Husain, Q. (1991). Concanavalin-A - A Useful Ligand For Glycoenzyme Immobilization -A Review, *Enzyme Microb Technol.*, 13 (4), 290-295 .
- Sasaki, S., Nagata, R., Hock, B., Karube, I. (1998). Novel surface plasmon resonance sensor chip functionalized with organic silica compounds for antibody attachment. *Anal. Chim. Acta*, 368, 71-76.
- Satish, P.R. ve Suralia, A. (2001). Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis, *J. Biochem. Biohys. Methods*, 49-625.
- Saunders, K. J. (1988). *Organic Polymer Chemistry*, Second Edn., Chapman& Hall, New York.
- Schneider, F.W. (1982). *Non-linear Raman Spectroscopy and its Applications*, D. Reidel, Dordrecht, 46, 1-470.
- Sharon, N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci.*, 18, 221-6.
- Sinclair, B. (1998). To bead or not to bead: applications of magnetic bead technology. *Scientist* ,12, (13),17.
- Solomons, T.W.G. (1996). *Organic Chemistry*. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 450-452.
- Stoecklein, W.F.M., Warsinke, A., Michel, B., Hoehne, W., Woller, H., Kempter, G., Scheller, F.W. (1997). *NATO ASI Ser. Ser.2*, 38 , 155-162.

Suguna, K., Surolia, A. ve Vijayan, M. (1999). Structural diversity and carbohydrate specificity of plant lectins. In: Vijayan, M., Yathindra, N., Kosalkar, A.S., editors. Perspectives in structural biology. Hyderabad: Universities Pres.

Swartz, H. M., Bolton, J. R. ve Borg, D. C. (1972). Biological applications of electron spin resonance. Wiley, New York.

Takafuji, M., Ide, S., Ihara, H., ve Xu, Z. (2004). Preparation of poly(1-vinylimidazole)-grafted magnetic nanoparticles and their application for removal of metal ions, *Chem. of Mater.*,16(10),1977-1983.

Tapuchi, E., Venter, E.A., Kfir, R. (1996). Trends in Biosensor development and some potential applications, *S. Afr. J. Chem.*, 49(1-2), 8-25.

Teng, S. F., Sproule, K., Husain, A. ve Lowe, C. R. (2000). Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand. *J. Chromatogr. B* 740, 1–15.

Teng, S. F., Sproule, K., Hussain, A. ve Lowe, C. R. (1999). A strategy for the generation of biomimetic ligands for affinity chromatography. Combinatorial synthesis and biological evaluation of an IgG binding ligand. *J. Mol. Recognit.* **12**, 67–75.

Tong, X.D., Xue, B.ve Sun, Y. (2001). A novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification. *Biotechnology Progress*, 17(1), 134-139.

Tsai, C. C. ve Chou, C. (2002). Diagnosing students' alternative conceptions in science. *Journal of Computer Assisted Learning*, 18, 157-165.

Tseng, C.M., Lu, Y.Y., El-Aasser, M.S. ve Vanderhoff, J.W. (1986). Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerization in Alcohol, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry Edition*, 24, 2995-3007.

Tuncel,A.,Denizli, A., Purvis, D., Liwe, C.R.ve Piskin, E. (1993). Cibacron Blue F3g-A-Attached Monosize Poly(Vinyl Alcohol)-Coated Polystyrene Microspheres For Specific AlbuminAdsorption, *J. Chromatogr. A*, 634(2), 161-168.

Turkova, J. (1999). Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function, *J Chromatogr B.*, 722 (1-2), 11-31.

Ugelstad, J., Söderberg, L. ve Berge, A. Bergström, J. (1983). Monodisperse polymer particles - A step forward for chromatography. *Nature*, 303, 95-96.

Uzun, L .ve Denizli, A. (2006). Bilirubin removal performance of immobilized albumin in a magnetically stabilized fluidized bed, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 17, 791.

Vijayan, M. ve Chandra, N. (1999). Lectins, *Curr Opin Struct Biol.*, 9,707–14.

Vettese-Dadey, M. (1999). Going their separate ways: a profile of products for cell separation, *Scientist* 13, 21–27.

Wang, P.H. ve Pan, C.Y. (2000). Polymer-metal composite particles: Metal particles on poly(St-co-MAA) microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.* 75, 1693.

West, I. ve Goldring, O. (1994). Lectin affinity chromatography, *Mol. Biotechnol.*, 2, 147-155.

Wood, RW. (1902). On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*. 4, 396-402.

WWW.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1213/unite11.pdf

Yavuz, H., Denizli, A., Güngöres, H., Safarikova, M.ve Safarik, I. (2006). Biosorption of mercury on magnetically modified yeast cells, *Separation and Purification Technol.*, 52(2), 253–260.

Yavuz, H., Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., ve Arıca, Y. (2004). Congo Red attached monosize poly(HEMA-co-MMA) microspheres for use in reversible enzyme immobilisation, *Biom. Resear. And Technol*, 10 (1) ,1-8.

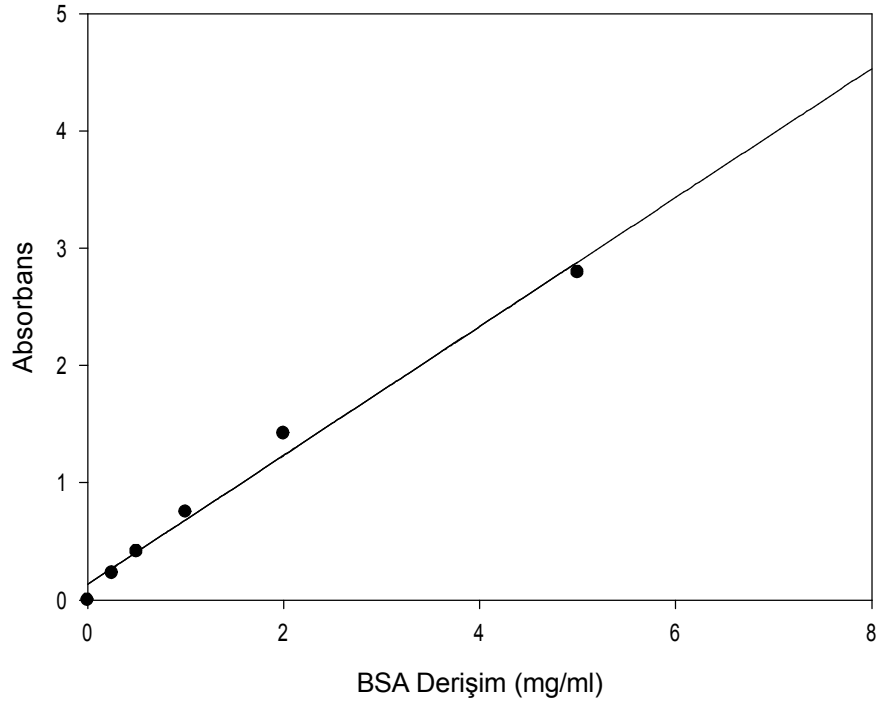
9.ÖZGEÇMİŞ

10.11.1978 yılında Belçika'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Belçika'da lise öğrenimini ise Sivas'ta tamamladı. 1997 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne hazırlık eğitimiyle başlayıp 2002 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2002 yılından beri Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. 2003 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2005 yılında yüksek lisansını tamamlayıp doktora programına başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.

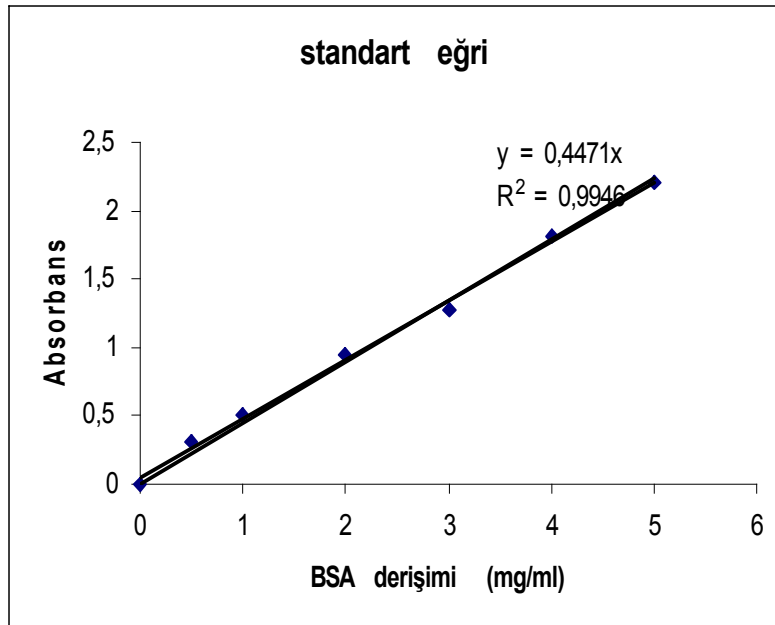
EKLER

EK-1. Konkanavalin A Bağlanması için Standart Eğri

Standart Eğri



EK-2. IgG Bağlanması için Standart Eğri



EK-3. ELİSA için Standart Eğri

ELISA Standart Eğri IgG

