AVİDİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BİYOTİN TABANLI YENİ AFİNİTE KATI DESTEK GELİŞTİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Sevgi DAĞDAŞ

Eskişehir 2018

AVİDİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BİYOTİN TABANLI YENİ AFİNİTE KATI DESTEK GELİŞTİRİLMESİ

Sevgi DAĞDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kasım 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevgi Dağdaş' ın "Avidin Saflaştırılması İçin Biyotin Tabanlı Yeni Afinite Katı Destek Geliştirilmesi" başlıklı tezi 13.11.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**Unvanı Adı Soyadı**	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN	...…….
Üye	: Prof.Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	..…….
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem BİÇEN ÜNLÜER	....……

Prof. Dr. Ersin YÜCEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

AVİDİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BİYOTİN TABANLI YENİ AFİNİTE KATI DESTEK GELİŞTİRİLMESİ

Sevgi DAĞDAŞ
Kimya Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kasım 2018
Danışman: Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

Bu çalışmada, yumurta beyazından Avidin proteininin saflaştırılmasına yönelik yeni bir afinite katı desteği geliştirilmiştir. Bu tez kapsamında Avidinin spesifik olarak afinite gösterdiği çapraz bağlayıcılar eşliğinde biyotin tabanlı bir kriyojel kolon geliştirilmiştir. Sentezlenen kriyojel kolonun karakterizasyonu amacıyla şişme testi, FT-IR ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın diğer bir aşamasında, sentezlenen kriyojel ayırma kolonu kullanılarak yumurta beyazından izole edilen Avidin ham ekstrakttan ayrılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan Avidinin protein içeriği belirlenerek, UV spektrofotometrik ölçümleri ile kriyojel kolonlara Avidin bağlanması, optimizasyon çalışmaları ve tekrar kullanılabilirlik testleri gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan Avidin'in Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile ikincil ve tersiyer yapılarındaki değişim incelenmiş ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Avidin, Kriyojel kolon, Afinite Kromatografisi, Protein Saflaştırma, Biyotin

ABSTRACT

BIOTINE-BASED NEW AFFINITY SOLID SUPPORT ENHANCEMENT FOR PURIFICATION OF AVIDIN

Sevgi DAĞDAŞ

Department of Chemistry
Anadolu University, Graduate School of Sciences, November 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN

In this study, a new affinity solid support was developed for the purification of Avidin protein from egg white. Within the scope of this study, a biotin-based cryogel column which exhibits specific affinity towards Avidin was developed in the presence of cross-linkers. The characterization of the synthesized cryogel column was carried out by swelling test, FT-IR and SEM analyses. In another step of the study, the Avidin was purified from the crude extract by using the synthesized cryogel separation column. The protein content of the purified Avidin was determined and the Avidin binding to the cryogel column, optimization studies and reusability tests were performed by UV spectrophotometric measurements. In addition, Circular Dichroism (CD) Spectroscopy was used to evaluate the changes in secondary and tertiary structures. The molecular weight of the purified Avidin was determined by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

Keywords: Avidine, Cryogel Column, Affinity Chromatography, Protein Purification, Biotin

13/11/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Sevgi DAĞDAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen, sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN'a,

Çalışmamın tüm araştırma ve deneysel sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiren değerli hocalarım Prof. Dr. Rıdvan SAY'a ve Prof. Dr. Arzu ERSÖZ' e,

Tez çalışmalarım boyunca hem deneysel ve teorik olarak desteklerini esirgemeyen hem de lisans eğitimimden bu yana bilimsel anlamda çok şey öğrendiğim hocalarım Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e, Doç. Dr. Filiz YILMAZ' a, Yard. Doç. Dr. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e,

Jürimde yer alarak değerli vaktini ayıran sayın Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK' e

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim değerli arkadaşlarım Fatma DUMAN, Özlem KALABAK, Özlem YAVUZ ve Kardelen ECEVİT'e

Tez yazım aşamasında sabrı ve hoşgörüsüyle hep yanımda yer alan Fatma YEDİYILDIZ' a,

Sevgi, ilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim Biyokimya Laboratuvarı' nda çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda fedakarlığını esirgemeyen, hep yanımda olan babam Bekir MİL, annem Peri MİL ve canım kardeşim Onur MİL' e ve her zaman yanımda olarak beni destekleyen, güvenini hep hissettiren sevgili eşim Mehmet DAĞDAŞ' a

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi DAĞDAŞ

Kasım 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ……..i

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....ii

ÖZET iii

ABSTRACT.....iv

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ..... v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

TABLOLAR DİZİNİ..... x

ŞEKİLLER DİZİNİ.....xi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiii

1. GİRİŞ 1

1.1. Proteinler 2

1.1.1. Proteinlerin yapısı ve genel özellikleri 2

1.1.1.1. *Amino asitler* 2

1.1.2. Proteinlerin adlandırılması ve yapısal özellikleri 4

1.1.3. Proteinlerin sınıflandırılması..... 7

1.1.3.1. *Konformasyonlarına göre proteinler* 7

1.1.3.2. *Kimyasal bileşimine göre proteinler*..... 8

1.1.3.3. *Fonksiyonlarına göre proteinler* 10

1.1.4. Proteinlerin denatürasyonu 12

1.1.5. Avidin..... 12

1.1.5.1. *Avidinin uygulama alanları*..... 15

1.1.6. Biyotin..... 16

1.2. Proteinin Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri 17
1.2.1. Kaynak seçimi 18
1.2.2. Çöktürme 18
1.2.3. Diyaliz ve ultrafiltrasyon 19
1.2.4. Kromatografik yöntemler 19
1.2.5. Afinite kromatografisi 21
1.2.5.1. *Ligandlar* 24
1.2.5.2. *Destek (matriks)* 24
1.2.5.3. *Ara kollar (spacer arms)* 24
1.2.5.4. Kriyojeller 25
1.2.6. Afinite kromatografisi türleri 27
1.2.6.1. *İmmünoafinite kromatografisi (İAK)* 27
1.2.6.2. *Boya afinite kromatografisi* 28
1.2.6.3. *İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK)* 29
1.2.7. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) 30
1.2.8. Afinite kromatografisi ile protein saflaştırmanın önemi 32
1.2.9. Rutenyum tabanlı amino asit monomeriyle fotosentetif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi 33

2. MATERYAL VE METOD 35

2.1. Materyal 35
2.1.1. Kullanılan kimyasallar 35
2.1.2. Kullanılan cihazlar 35

2.2. Metod 36
2.2.1. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması 36
2.2.1.1. *MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin monomerinin sentezi* 36
2.2.1.2. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon sentezi* 36
2.2.2. Karakterizasyon çalışmaları 37
2.2.2.1. *Şişme testi* 37
2.2.2.2. *FT-IR analizi* 37
2.2.2.3. *Yüzey morfolojisi* 38
2.2.3. Yumurta beyazından Avidin izolasyonu 38

2.2.4. Liyofilizasyon 38
2.2.5. Amonyum Sülfat çöktürmesi 39
2.2.6. Ultrafiltrasyon 39
2.2.7. Proteinin saflaştırılması 39
2.2.8. Protein içeriği tayini 40
2.2.9. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi analizleri 41
2.2.10. SDS-PAGE analizi 42

3. BULGULAR 43

3.1. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu 43
3.1.1. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojel kolonun FT-IR spektrumu 43
3.1.2. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojelin yüzey morfolojisi 44
3.1.3. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojel kolonun şişme testi 45
3.1.4. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin kriyojel kolona Avidin bağlanma çalışmaları 45
3.1.4.1. *pH etkisi* 45
3.1.4.2. *Avidin derişiminin etkisi* 46
3.1.4.3. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin kriyojel kolonların tekrar kullanılabilirliği* 47

3.2. Protein Saflaştırılması 48
3.2.1. FPLC analizi 48
3.2.3. Saflaştırılan Avidinin protein miktar tayini 52

3.3. CD Spektroskopisi Analizleri 53

3.4. SDS-PAGE Analizi 54

4. YORUM VE SONUÇ 56

ÖZGEÇMİŞ 67

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. 1. Afinite kromatografisinde yaygın kullanılan moleküller ve bunların ligandları……..……..…22

Tablo 3. 1. Avidine ait saflaştırma tablosu……..……...53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1. Aminoasit yapısı 3
Şekil 1. 2. Peptit bağı oluşumu 4
Şekil 1. 3. Polipeptit zinciri 5
Şekil 1. 4. Sarmal yapılar α-sarmal yapı ve β-kırmalı tabaka (Guttman, 1999) 6
Şekil 1. 5. Proteinlerin pH' a bağlı iyonlaşma dengesi (Taylor, 1997) 7
Şekil 1. 6. Avidinin yapısı (Laitinen, 2007) 13
Şekil 1. 7. Biyotin-Streptavidin etkileşimi (Howart, 2006) 15
Şekil 1. 8. Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi 16
Şekil 1. 9. Biyotinin molekül yapısı 17
Şekil 1. 10. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması 20
Şekil 1. 11. Afinite kromatografisi işlem basamakları (Urh, 2009) 23
Şekil 1. 12. Afinite kromatografisinin temel bileşenleri (Magdeldin, 2012) 23
Şekil 1. 13. Kriyojelasyon (Plieva, 2008) 26
Şekil 1. 14. FPLC cihazı ana bileşenleri 31
Şekil 2. 1. MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin'in açık yapısı 36
Şekil 2. 2. Bu çalışmada kullanılan FPLC sistemi 40
Şekil 3. 1. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ kriyojeline ait FT-IR spektrumu 43
Şekil 3. 2. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojeline ait FT-IR spektrumu 44
Şekil 3. 3. (A) Poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü, (B) Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojelin SEM görüntüleri 45
Şekil 3. 4. Avidin elüsyonuna pH' ın etkisi C_{avidin}: 80 ppm 46
Şekil 3. 5. Avidin derişiminin bağlanma üzerine etkisi pH: 7,0 47
Şekil 3. 6. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği 48
Şekil 3. 7. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonu ile Avidin saflaştırılmasına ait kromatogram 49
Şekil 3. 8. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonuna yüklenen ticari Avidine ait kromatogram 50
Şekil 3. 9. Poli(HEMA) kriyojel kolonuna yüklenen Avidine ait kromatogram 50

Şekil 3. 10. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolonuna yüklenen Avidin-HRP konjugasyonu 51
Şekil 3. 11. Standart Avidin kalibrasyon grafiği 52
Şekil 3. 12. Saflaştırılan Avidine ait CD spektrumu 54
Şekil 3. 13. Ticari Avidine ait CD spekturumu 54
Şekil 3. 14. SDS-PAGE görüntüsü 55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS **:** Amonyum persülfat

TEMED **:** N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin

HEMA **:** Hidroksietilmetakrilat

MBA **:** N'N, Metilenbisakrilamit

PAGE **:** Poliakrilamid Jel Elektroforez

SDS **:** Sodyum N-Dodesil Sülfat

CD **:** Dairesel Dikroizm Spektroskopisi

FPLC **:** Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi

kDA **:** Kilodalton

HABA : 2-(4-Hidroksifenilazo) benzoik asit

TMB : 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin

HRP : Horseradish Peroksidaz

MATrp : Metakriloil amido triptofan

bipyr : Bipiridil

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, disiplinler arası bir bilim dalıdır. Biyoteknolojinin gelişmesine fizik, kimya, biyokimya, genetik, fizyoloji, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji gibi disiplinlerin ortak bir buluşma noktasındadır (Yan, 2015). Hücre ve doku biyolojisi kültürü, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimleri yanında mühendislik ve bilgisayar mühendisliğinden yararlanarak, DNA teknolojisiyle bitki, hayvan ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya ihtiyacımız kadar üretilemeyen yeni ve az bulunan maddeler (ürünleri) elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Zamanın ilerlemesiyle, biyoteknolojinin kullanım alanları genişlemiştir ve yeni farkındalıkları ortaya çıkarmıştır (Campbell, 1998).

Biyoteknolojinin tıbbi, tarım ve hayvancılık, gıda, çevre ve endüstriyel biyoteknoloji olmak üzere beş temel alanı bulunmaktadır. Dünya ölçeğinde biyoteknolojik olarak üretilen ürünlerin dünya pazarlardaki payları; gıda sektörü (%77), antibiyotik (%12), ilaç-kit (%7), tarım (%3) sektörlerine aittir. Görüldüğü gibi biyoteknolojideki gelişmeler, insan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji üretimine kadar yaşamın pek çok alanı bu teknolojinin kapsamına girmiştir (Drepper, 2006). Bu doğrultuda biyoteknoloji de alt dallara ayrılmıştır. Alt dalları ise renk kodlarıyla tanımlanmaktadır (Kolankaya, 2000).

Avidin (C.A.S. 1405-69-2) bazik özellikte olan bir glikoproteindir (Chivers, 2010). Avidin ve benzeri proteinler (Hytönen, 2005) yakın zamanda geliştirilmiştir (Määttä, 2011). Avidin biyokimyasal, biyofiziksel, farmasötik (Chivers, 2010) ve tıbbi uygulama gibi geniş yelpazede sayısız (Wilchek, 2006) avantajlara sahiptir:

i. Avidin, suda çözünen H vitamini olan biyotine karşı son derece yüksek afinite gösterir (Kd ~10−15 M) (Wilchek, 1990). Biyotinin kendisi proteinin foksiyonel özelliklerine zarar verme olasılığı çok düşük olan ve proteine kovalent olarak kolayca bağlanabilen çok küçük bir moleküldür (Laitinen, 2007).

ii. Sistem çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilir ve ucuz bir yöntemdir (Green, 1963).

iii. Avidin/Biyotin etkileşiminin çok sağlam ve güvenilir olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, yumurta beyazından (Strept)avidin proteininin saflaştırılmasına yönelik yeni nesil kriyojel temelli afinite saflaştırma kolonları geliştirilmiştir. Saflaştırma işlemi hazırlanan kriyojel saflaştırma kolonları kullanılarak Hızlı Protein Sıvı Kromatografi (FPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Yumurta beyazından Saflaştırılan (Strept)avidinin protein içeriği belirlenerek, UV spektrofotometrik ölçümleri ile kriyojel kolonlara (Strept)avidin bağlanması, maksimum bağlanmanın tespiti için optimizasyon çalışmaları ve tekrar kullanılabilirlik testleri gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, saflaştırılan (Strept)avidin'in CD Spektroskopisi ile ikincil ve tersiyer yapılarındaki değişim incelenerek Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

1.1. Proteinler

1.1.1. Proteinlerin yapısı ve genel özellikleri

Maddeleri meydana getiren atomlar belirli sıralarda ve belirli bağlarla birbirlerine bağlanarak, "molekül" adı verilen özel grupları oluştururlar. Bu çok önemli bir konudur, çünkü atomların farklı şekilde gruplanmaları ve organize olmaları ile canlı ve cansız maddeler birbirinden ayrılırlar. Canlılığı oluşturan dört büyük temel molekül grubu vardır. Bunlar: Nükleik asitler, Lipitler, Karbonhidratlar ve Proteinlerdir. Proteinlerin yapı ve işlevlerini anlayabilmek için, amino asitlerin yapı ve işlevlerini mutlaka bilmemiz gerekmektedir (Conn, 1976).

1.1.1.1. *Amino asitler*

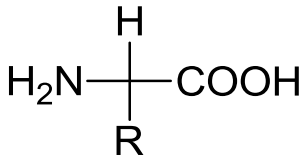
Proteinler amino asitlerin bir araya gelmesiyle oluşan polimerleridir. Her bir aminoasit kalıntısı yanındakine özel bir kovalent-peptit bağı ile bağlanarak oluşmaktadır. Proteinler pek çok farklı yöntemlerle yapısal amino asitlerine hidrolizlenebilir. Bütün amino asitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri sahip oldukları yan zincire bağlıdır. Bütün 20 amino asitte de ortak olan yapılar vardır. Bunlar bir C atomuna bağlı olarak;

– H

- Karboksil grup (-COOH)

- Amino grup (-NH2)

- Değişken Yan zincirler (R1…R20) bulunmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. *Aminoasit yapısı*

Aminoasit molekülleri, bir ucunda "amino grubu(-NH_2)" diğer ucunda ise "karboksil(-COOH)" grubu bulundururlar. Aminoasitlerin bir araya gelip zincirler oluşturarak proteinleri sentezlemesi, bu iki grubun aralarında kovalent veya iyonik bağların oluşmasıyla gerçekleşmektedir. İki aminoasit yan yana geldiğinde karboksil ve amino grupları arasında bağlanma meydana gelir. Bu bağa da "peptit bağı" adı verilir. Bağlanma esnasında bir su molekülü ayrılır. İki aminoasidin yan yana gelerek oluşturdukları peptit bağına "dipeptit", üç veya daha fazla (yüzlerce ya da binlerce) aminoasidin yan yana gelerek oluşturdukları zincirdeki peptit bağlarına ise "polipeptit" olarak adlandırılır. Proteinler her ne kadar düz aminoasit zincirlerinden meydana gelse de oldukça karmaşık yapılara sahiptir. Bunun nedeni ise zincirdeki bazı aminoasitlerin birbirleriyle ikinci veya üçüncü bir bağ yapmasından kaynaklanmaktadır. Aminoasitlerin net yük, çözünürlük, kimyasal reaktiflik, hidrojen bağlama gücü gibi bazı fizikokimyasal özellikleri R grubunun kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir. Genellikle proteinlerde büyüklük, şekil, yük, hidrojen bağlama yeteneği ve kimyasal etkileşimde farklı 20 çeşit yan zincir bulunmaktadır (Bingöl, 1983).

Standart amino asitler, R yan gruplarının polarite veya biyolojik pH'da su ile etkileşmeye eğilim özelliklerine göre dört sınıfa ayrılırlar:

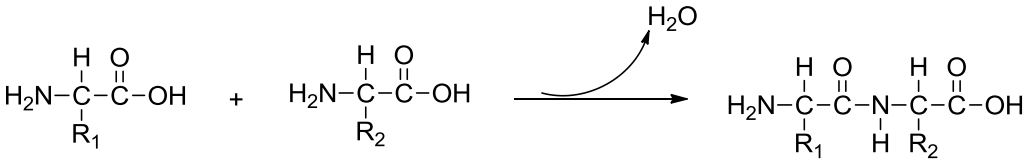
1. Nonpolar R gruplu amino asitler: 2 sınıfa ayrılırlar. NonPolar Alifatik R gruplu amino asitler, suda çok az çözünürler. Bu amino asidin sınıfındaki R grupları polar olmayan yapıdadır ve hidrofobiktir. Nonpolar Aromatik R gruplu amino asitler ise aromatik yan zincirli fenilalanin, tirozin ve triptofan göreceli polar olmayanlardır. Tümü de hidrofobik etkileşimlere katılabilir.
2. Polar R gruplu amino asitler: Suda oldukça iyi çözünür. Su ile H bağı yaparlar. Sistindeki gibi disülfit köprüleri, birçok proteinde meydana gelir ve

proteinin yapısını dengede tutarlar. Sistin iki sistein molekülünün veya kalıntısının disülfit bağıyla bağlanmış halini teşkil eder. Bu disülfit- bağlı kalıntı kuvvetli bir hidrofobiktir . Disülfit bağları protein molekülünün kısımları arasında veya farklı protein zincirleri arasında kovalent bağ yaparak birçok proteinin yapısı için özel bir görev üstlenir.

3. Asidik (Negatif Yüklü) R gruplu amino asitler: İkinci karboksil grubuna sahip Asparajin, Glutamin pH 7.0' de net negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asittir.
4. Bazik (Pozitif Yüklü) R gruplu amino asitler: Hidrofilik R gruplarının pek çoğu pozitif veya negatif yüklüdür. Lizin, arjinin, histidin pH 7,0'de pozitif yüklü R- grubu içeren amino asitlerdir. Histidin nötrale yakın pKa değerine sahip iyonize olabilen yan zincir barındıran tek standart amino asittir (Harwey, 2007).

1.1.2. Proteinlerin adlandırılması ve yapısal özellikleri

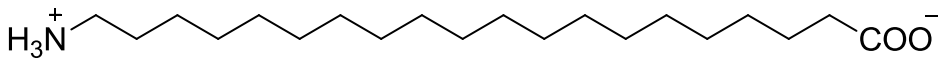
Proteinler aminoasitlerin birbirlerine yan yana bağlanması sonucu oluşur. Bir aminoasidin α– karboksil grubu ile diğer bir aminoasidin α– amino grubu arasından 1 mol H_2O' nun açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bağa peptit bağı adı verilir (Şekil 1.2). Peptit bağı bir çeşit amid bağıdır.



Şekil 1. 2. *Peptit bağı oluşumu*

İki aminoasidin birleşmesiyle dipeptit oluşurken, üç aminoasidin birleşmesiyle tripeptit ve çok sayıda aminoasidin birleşmesiyle ise polipeptit zinciri ve bu zincirin üç boyutlu yapı kazanmasıyla da proteinler oluşur (Çekmen, 1997).

Bir polipeptit zincirinin serbest halde bulunurken bir –COOH ve bir de -NH_2 ucu vardır. Bunların nötral ortamda iyonlaştıkları düşünülür ise bir polipeptit zinciri Şekil 1.3' teki gibi gösterilebilir.



Şekil 1. 3. *Polipeptit zinciri*

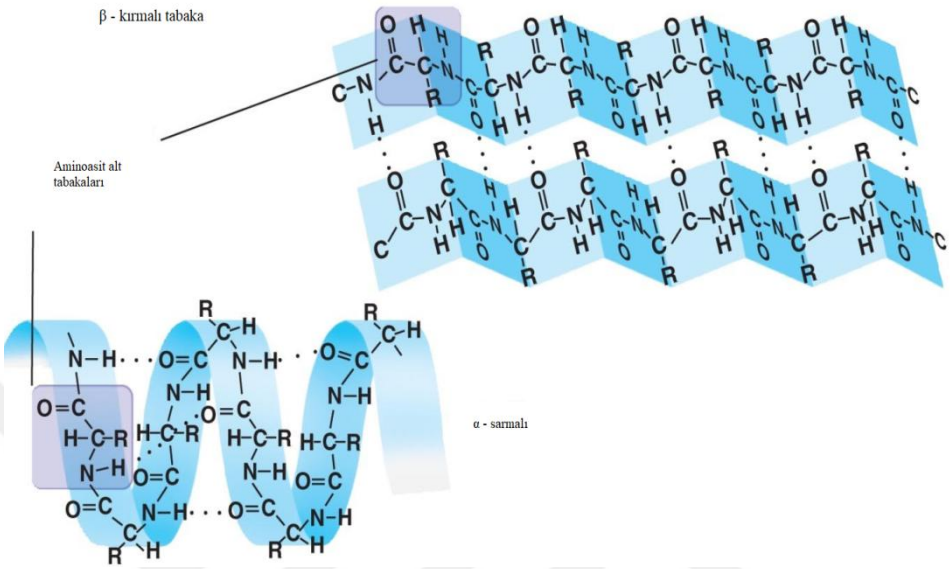
Adlandırma yapılırken bir polipeptit zincirinin aminoasit bileşenlerinin okunmasına N– ucundan başlanır ve her bir amino asidin isminin sonuna –il eki getirilir ve C– ucundaki amino asit aynen okunur. Örneğin; (N-ucu) H_3N + -(Ala–Glu–Gly–Lys)-COO(C-ucu) tetra peptiti için; alanil-glutamil-glisillizin şeklinde isimlendirilmektedir.

Proteinlerin yapılarını kazanmalarına bakacak olursak, proteinler biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için gerekli olan üç boyutlu yapılarını (konformasyonlarını) açıkladığımız periyodik motifleri de içeren dört basamakta kazanırlar:

1. Primer Yapı: Polipeptit zincirinde yer alan aminoasitlerin dizilişi primer (birincil) yapıyı oluşturur. Primer yapı protein molekülünde yer alan aminoasitlerin diziliş sırasını verir ve proteinin omurgasını oluşturur. Disülfit çapraz kovalent bağları varsa bu yapıya katkıda bulunur. Bu yapı DNA'daki nükleotit dizilişi tarafından şifrelenmektedir. Protein molekülündeki aminoasit sıralanışını kromozomal DNA'daki genler belirlemektedir. Kalıtım molekülü olan DNA'daki nükleotitlerin sırası RNA'daki nükleotitlerin tamamlayıcı sırasını belirler. Proteinler temelde aynı mekanizma ile aminoasitlerin peptit bağıyla bir araya gelmesiyle sentezlenir. Primer yapı proteinin üç boyutlu aktif konformasyonundan birinci derece sorumlu olmaktadır. Birincil yapı bir proteinin ya da peptidin polipeptit zincirini oluşturan aminoasitlerin amino ucundan karboksil ucuna doğru sıranmasıyla olur. Bu yapıya polipeptit zincirindeki bütün disülfür köprüleri dahil bütün kovalent bağlar dahildir.

2. Sekonder Yapı: Aminoasitlerin –R grupları dikkate alınmaksızın oluşan polipeptid zincirinin uzaydaki konumudur. Lineer dizilişte birbirine yakın aminoasit kalıntıları arasındaki etkileşimler sonucu sekonder (ikincil) yapı meydana gelir. Bu etkileşimlerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. α– sarmalı, β–kırmalı tabaka ve kollajen sarmal bu yapılardandır. α–sarmalı, α–keratinlerde en yaygın bulunan yapıdır (Şekil 1.4). Çünkü molekül içi hidrojen bağları için en uygun bu yapıdır. Bir protein zincirinin bazı bölgelerindeki bu

yapılanmayı hidrojen bağları oluştururken, bazı yapılanmayı da –R gruplarından kaynaklanan etkileşimler bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağına karar verir.



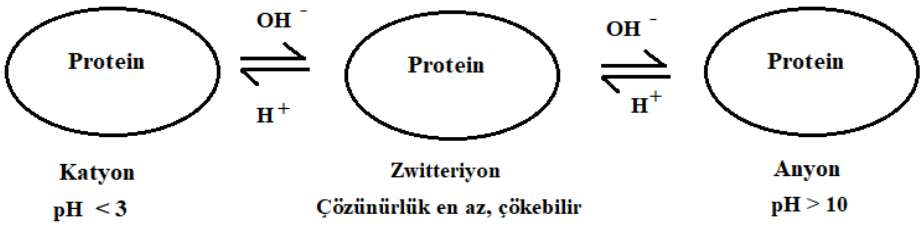
Şekil 1. 4. *Sarmal yapılar α-sarmal yapı ve β-kırmalı tabaka (Guttman, 1999)*

3. Tersiyer Yapı: Protein molekülünde bu sefer –R grubundakiler de dahil tüm atomların uzaydaki konumudur. Tersiyer(üçüncül) yapı bir proteinde bulunan bütün atomların 3-boyutlu düzenini içinde barındırır. Bu yapı düzeyi aminoasitlerin yan zincirlerdeki atomlar ve prostetik grup olarak adlandırılan kovalent bağlı yapılarda bulunan atomlar arasındaki etkileşimleri de içene almaktadır. Polipeptit zincirinde farklı bölgelerde bulunan aminoasit birimlerinin yan zincirlerindeki gruplar arasındaki etkileşimlerle ve çeşitli sekonder yapıların katlanması sonucu ortaya çıkan 3-boyutlu yapı üçüncül yapıyı oluşturur (Van Ginkel, 1990). Böylelikle bu katlanmalarla birbirinden uzakta olan aminoasitler de bir araya gelirler. Böylece proteinin hem kararlı bir yapı kazanmasını hem de biyolojik fonksiyonunu tam olarak yerine getirebilmesi için gerekli olan bölgelerin oluşumunu sağlamış olurlar.

4. Kuaterner Yapı: Birincil, ikincil ve üçüncül yapıya sahip olan polipeptid zincirinin daha büyük yapılı gruplar halinde bir araya gelmesiyle oluşur. Kuaterner (dördüncül) yapının oluşmasını sağlayan her bir alt birime monomer adı verilir. Bu monomerler, bir araya gelirken hidrojen bağları, Van der Waals

etkileşimleri ve iyonik bağlanmalar etkisiyle polimerize olmuşlardır. Doğal durumda her proteinin karakteristik bir üç boyutlu yapısı vardır (Montgomery, 2000).

Bir proteinin asit–baz özellikleri çoğunlukla aminoasitlerinin iyonlaşabilir -R grupları tarafından tayin edilir. Proteinin üç boyutlu yapısında iyonlaşabilir -R grupları çevrelerindeki diğer -R gruplarından çok etkilenir. Polipeptit zincirlerinin N- ucu (amino) ve C- ucu (karboksil) gruplarının asit-baz özelliklerine katkısı çok çok azdır. Proteinler de aynı aminoasitler gibi kendilerine özgü bir izoelektrik pH'a sahiptirler. Yüksek oranda bazik aminoasitler içeren proteinlerin izoelektrik pH'ları yediden büyük, asidik aminoasitler içeren proteinlerin izoelektrik pH'ları ise yediden küçüktür (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5. *Proteinlerin pH' a bağlı iyonlaşma dengesi (Taylor, 1997)*

İzoelektrik pH'nın üstünde proteinler negatif yüklü olup elektriksel alanda anoda (+) doğru göç ederler. İzoelektrik pH'ın altında ise pozitif yüklü olarak çözünür ve katoda (–) göç ederler.

1.1.3. Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler konformasyonlarına ve kimyasal bileşimlerine göre iki sınıfta incelenirler. Konformasyonlarına göre proteinler de fibröz (lifimsi, çubuğumsu) ve globuler (küresel) yapıda olmak üzere ikiye ayrılır.

1.1.3.1. *Konformasyonlarına göre proteinler*

1. Fibröz Proteinler: Fibröz proteinlerin tümü suda ve seyreltik tuz çözeltilerinde bile çözünmeyen sağlam yapılı moleküllerdir. Bu özellik proteinin hem iç kısmında hem de yüzeyinde bulunan hidrofobik aminoasit kalıntılarından

kaynaklanmaktadır. Fibröz proteinlerin polipeptit zinciri tek bir çizgi boyu paralel düzenlenmiş ve uzun lifler (α–sarmalı) veya tabakalar (β–kırmalı tabaka) oluşturmuşlardır. Fibröz proteinler bulundukları yapıya güç veya esneklik kazandırırlar. Daha çok vücutta sağlam yapıyı gerektiren ve vücudu koruyuculuk görevi yapan yerlerde bulunmaktadırlar. Mesela deride epidermin, kemik kollageni, tırnak, boynuz ve saç keratini ve bağ dokusu elastini bu proteinler arasında yer almaktadırlar (Tüzün, 1992). Fibröz proteinler yüksek hayvan ve bitki organizmalarının bağ dokularının temel yapısal elemanlarıdırlar.

2. Globüler Proteinler: Bir polipeptit zincirinin farklı bölümleri veya birçok polipeptid zincirinin birbiri üzerine katlanıp sıkı bir yumak halini almasıyla meydana gelen yapıdır. Katlanma aynı zamanda proteinlerin geniş kapsamlı işlevlerini yerine getirebilmeleri için yapısal çeşitliliği kolaylaştırıp sağlarlar. Bu tip proteinlerin çoğu sulu çözeltilerde çözünürler ve kolayca difüze olurlar. Globüler proteinlerin hücrede çok önemli dinamik görevleri bulunmaktadır. Bilinen enzimlerin çoğu, antikorlar, bazı hormonlar, serum albumin ve hemoglobin gibi taşıma görevi yapan proteinler globüler yapıda proteinlere örnektirler. Bazı proteinler ise hem fibröz hem de globüler özelliğe sahip olabilmektedirler. Bu tip proteinler fibröz proteinler gibi uzun, çubuğumsu şekillere sahipken, aynı globüler proteinler gibi tuz çözeltilerinde de çözünürler. Bu tür proteinlere önemli bir yapısal protein olan kas miyozini ve kan pıhtılaşmasında görev alan fibrinin ön maddesi olan fibrinojen örnek olarak verilebilir. Fibrinojen kan plazmasının çözünür proteinidir.

1.1.3.2. *Kimyasal bileşimine göre proteinler*

Kimyasal bileşimine göre proteinler basit ve bileşik proteinlerdir.

1. Basit Proteinler: Yapılarında yalnız α–aminoasitleri bulunduran proteinlere basit proteinler denir. Hidroliz edildiklerinde ise serbest α–aminoasitler ve onların bazı türevleri oluşur (Tekman, 1981). Basit proteinler aşağıdaki gibi alt gruplara ayrılır:

a. Albüminler: Suda çözünen ve ısıtıldıklarında pıhtılaşan proteinlere denir. Albüminler doygun tuz çözeltisi, özellikle doygun $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi yardımıyla çöktürülürler. Basit proteinlere serum albümin, yumurta akı ovalbümini, süt laktalbümini örnek olarakgösterilebilir.

b. Globülinler: Seyreltik tuz çözeltilerinde çözünebilen ancak suda çözünmeyen proteinlerdir. Globulinler ısıtılınca pıhtılaşırlar. % 50' lik $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile çöktürülürler. Örnek olarak serum globülin, ovoglobülin ve bitki tohumu globülinleri verilebilir.

c. Glutelinler: Bitkisel proteinlerdir. Seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünürler. Su ve alkol gibi nötral çözücülerde çözünmezler. Isıtılınca pıhtılaşırlar. buğday gluteni, pirinç orizenini örnek olarak verilebilir.

d. Prolaminler: Bunlar bitkisel proteinlerdir. Suda veya nötral çözücülerde çözünmezler. % 70' lik alkolde çözünürlerken, mutlak alkolde çözünmezler. Buğday gliadini, mısır zeini örnek olarak verilebilir.

e. Histonlar: Suda ve seyreltik asit çözeltilerinde çözünürler fakat ısıyla pıhtılaşmazlar. Arginin ve lizin gibi bazik aminoasitlerin yapılarında bol miktarda bulunurlar. Vücut hücrelerinin çekirdeğinde, nükleik asitlerle kompleks yapı oluşturan proteinlerdir. Hayvansal kaynaklı bir proteindir. Hemoglobinin globin proteini bu grup kapsamında yer alır.

f. Protaminler: En basit proteinlerdir. Seyreltik NH_3 çözeltisinde ve suda çözünen bazik polipeptidlerdir. Isıyla pıhtılaşmazlar. Bazik aminoasitler yapılarında bolca (% 87 arginin) bulundurur ve diğer proteinleri çöktürürler.

g. Skleroproteinler (Albuminoidler): Nötral çözücülerde, seyreltik asit ve baz çözeltilerinde hiç çözünmezler. Vücutta bağ ve destek dokusu proteinleridir. Kollajen, α–keratin ve elastin bu grup içerisinde yer alır. İnsan sindirim sisteminde aminoasitlere hidrolizlenemediğinden besin değerleri pek yoktur. Kollagenin hidroliziyle hazırlanan jelatin besinlerde koyulaştırıcı özellik olarak kullanılır.

2. Bileşik Proteinler: Biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için protein yapısında olmayan gruplara bağlanan proteinlerdir. Protein yapısında olmayan, proteine bağlı böyle gruplara prostetik grup denir. Bileşik proteinler aşağıdaki şekilde gruplara ayrılır (Kılıç, 2005).

a. Nükleoproteinler: Bir veya daha fazla protein molekülünün nükleik asitlerle biraraya gelerek yapmış olduğu komplekslerdir. Hücre çekirdeği kromozomlar ve virüsler örnek olarak verilebilir.

b. Glikoproteinler: Prostetik grup olarak karbohidratları içeren proteinlerdir. Proetinlerin karbohidratlara bağlanarak oluşturduğu komplekslere denir. Tükürük salgısı ve mukus salgısı musinleri, immünoglobulinler, yumurta ovomukoidi, avidin ve serum elektroforezi sonucu oluşan α1– ve α2– fraksiyonları örnek olarak verilebilir.

c. Fosfoproteinler: Çoğunlukla serin aminoasidi kalıntısı üzerinden fosfat grubuna bağlı olan proteinlerdir. En yaygın bilinen örneği süt kazeinidir. Yumurta sarısı proteinlerinden olan vitellin ve glikojen sentetaz da bu grup içerisinde bulunur.

d. Kromoproteinler: Prostetik grup olarak renkli bir kısım (kromofor grup) grubu içeren proteinlerdir. Hemoglobin, flavoproteinler ve sitokromlar bunlara örnek olarak verilebilir.

e. Lipoproteinler: Proteinlerin nötral yağlar, fosfolipidler ve kolesterol ile yapmış oldukları kompleks yapılı proteinlere denir. Serum lipoproteinleri (şilomikronlar, VLDL, LDL, HDL) ve yumurta sarısı proteinleri örnek olarak gösterilebilir.

f. Metaloproteinler: Metal iyonlarına koordinasyon bağları ile bağlı olan proteinlerdir. Zn^{+2} –karbonik anhidraz, Fe^{+2} –transferin, Cu^{+2} – seruplazmin bu grup proteinlerdir (Gözükara, 1997).

1.1.3.3. *Fonksiyonlarına göre proteinler*

1. Katalitik proteinler: Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimler, yüksek derecede spesialize (özgülleşmiş) proteinlerdir. Amilaz, pepsin, lipaz önemli katalitik protein veya enzim örnekleri olarak verilebilir.

2. Taşıyıcı proteinler (transport proteinleri): Spesifik molekülleri veya iyonları bağlayıp bir organdan bir başka organa veya hücre membranının bir tarafından diğer bir tarafına transfer eden proteinlere denir. Serum albümin, en iyi bilinen taşıyıcı proteindir. Bunun yanı sıra bilirubin, kalsiyum, yağ asitleri ve birçok ilaç serum albümine bağlanarak taşınırlar. Hemoglobin, oksijen taşıyan; lipoproteinler, lipid taşıyan; transferrin, demir taşıyan önemli taşıyıcı protein örnekleri arasında yer alırlar. Bütün organizmaların plazma membranlarında ve intrasellüler membranlarında bulunan taşıyıcı proteinler, glukoz, aminoasitler ve

diğer maddeleri bağlarlar ve bunları membranın bir tarafından diğer tarafına taşırlar.

3. Besleyici ve depo proteinler: Yumurta akının esas proteini olan ovalbümin, sütün esas proteini olan kazein birer besleyici proteinlerdir. Birçok bitki tohumu da çimlenen tohumun sağlıklı büyümesi için gerekli besleyici proteinleri depolamıştır. Ferritin, demir depolayan proteindir.

4. Kontraktil proteinler: Kasılabilen veya kendiliğinden hareket edebilen proteinlere denir. Miyozin ve aktin, iskelet kaslarının kontraktil sisteminde ve aynı zamanda birçok kas olmayan hücrede rol oynarlar. Tubulin, mikrotubilleri oluşturan proteindir.

5. Yapısal proteinler: Tendonların ve kıkırdağın esas yapısını, çok yüksek gerilme gücüne sahip kollajen oluşturmuştur. Örneğin kösele, hemen hemen saf kollajendir. Ligamentler, iki boyutta gerilme yeteneğine sahip bir yapısal protein olan elastini içerirler. Saç, tırnak ve tüyler, keratin içerirler. İpek liflerinin ve örümcek ağlarının asıl komponenti fibroindir. Bazı böceklerin kanat eksenleri, resilinden meydana gelmiştir.

6. Savunma (defans) proteinleri: Organizmaları diğer türler tarafından istilaya karşı savunan, organizmayı hasardan koruyan proteinlere denir. İmmünoglobülinler, omurgalıların lenfositleri tarafından yapılan, özel proteinlerdir. Organizmayı istila eden bakterileri, virüsleri veya başka türlerdeki yabancı proteinleri (antijenler) tanıyabilirler, çöktürebilirler veya nötralize edebilirler. Fibrinojen ve trombin gibi kan pıhtılaşma proteinleri, vasküler sistem yaralandığı anda yaralanan yerin kan pıhtısı ile kapatılarak kan kaybının önlenmesini sağlarlar. Yılan zehirleri, bakteriyel toksinler ve risin gibi toksik bitki proteinleri, aynı zamanda savunucu fonksiyonlara sahip gibi görünmektedirler. Savunma proteinlerinin fibrinojen, trombin ve bazı zehirler dahil bazıları, aynı zamanda da enzimdirler.

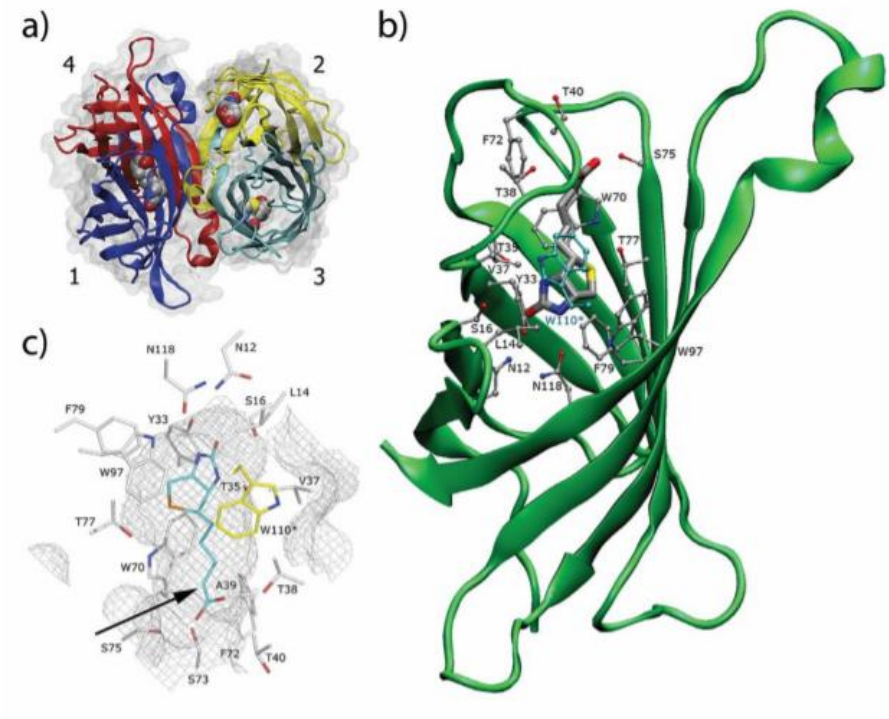
7. Düzenleyici proteinler: Sellüler düzenleme veya fizyolojik aktiviteye yardım eden proteinlere düzenleyici proteinler denir. İnsülin, büyüme hormonu gibi bazı hormonlar, düzenleyici proteinlere örnek olarak verilebilir.

1.1.4. Proteinlerin denatürasyonu

Bir polipeptidin doğal konformasyonuna ulaşması için sentez esnasında ve sonrasında katlanması gerekmektedir. Protein yapıları, belirli hücresel şartlar altında rol almak üzere değişim geçirirler. Hücredeki ortam şartlarından, farklı şartlarda protein yapısında küçük veya büyük oranda değişim meydana gelir. Biyolojik fonksiyon kaybının oluşmasına neden olan üç boyutlu yapının bozulmasına denatürasyon adı verilir. Proteinlerin birçoğu biyolojik aktivitelerini belirli kimyasal ortamlarda, sınırlı pH ve sıcaklıkta koruyabilmektedirler. Çok asidik ve bazik ortamlarda, yüksek sıcaklıkta ve bazı kimyasal maddelerin bulunduğu ortamlarda proteinlerin üç boyutlu yapılarında yani biyolojik aktivite gösteren yapılarında değişmeler meydana gelebilir (Gürdöl, 2006). Örneğin denatüre olan bir protein eğer enzimse katalik aktivite gösteremez. Denatüre olan proteinin çözünürlüğü azalır, hatta çökelme olur. Denatürasyonun iki önemli sonucu ise; biyolojik aktivitenin kaybı ve çözünürlüğün önemli oranda azalmasıdır. Birçok protein 50–60 °C' nin üzerinde ve 10–15 °C' nin altında denatüre olurlar. Yumurta akının ısıtılmasıyla (70°C' da 5 dakika) beyaz renkli bir pelte oluşumu dönüşümsüz denatürasyondur. Yani denatürasyona neden olan etkenler ortadan kaldırılsa dahi protein tekrar doğal üç boyutlu yapısına katlanamaz. Birçok protein pH = 4' ün altında ve 10'un üstünde denatüre olur.

1.1.5. Avidin

Avidin kuş, sürüngen yumurtalarında bulunan bir glikoproteindir ve ticari olarak tanıma reaktifi olarak kullanılmaktadır. İlk olarak 1940'lı yıllarda tavuk yumurtası beyazından izole edilmiş ve "avidin" olarak adlandırılmıştır (Thompson, 1941). Avidin proteini, her biri 128 amino asitten oluşan dört özdeş alt birim içeren bir homotetramerdir (DeLange, 1971). Karbonhidrat parçası dört glukozamin ve beş mannoz kalıntısından oluşmaktadır. Ayrıca hem prokaryotlarda hem ökaryotlarda benzer avidinler bulunmuştur fakat henüz herhangi bir memelide bulunmamıştır. Avidin yaklaşık 66 kDa molekül ağırlığına sahiptir (White, 1987).



Şekil 1. 6. *Avidinin yapısı (Laitinen, 2007)*

Şekil 1.6' da görüldüğü gibi (a) dört alt birimden oluşan Avidin tetrameri bu 4 kısmına biyotini Wander vals etkileşimleri ile bağlamaktadır, moleküler yüzey şeffaf gri renkte gösterilmiştir. Çizgilerle gösterilenler proteine ait ikincil yapı elemanlarıdır. (b) Biyotin bağlanmasına katkıda bulunan amino asit kalıntılarını gösteren ve bağlı biyotin içeren avidin monomerini göstermektedir. (c) Biyotin bağlı kısımları oluşturan avidin kalıntılarıdır. Gri örgü ve kalıntı zincirleri içinde 4Å bağlı biyotin çubukları ligand bağlama kısımlarında görülmektedir. Her biyotin bağlayıcı kısım birbirine köprü durumunda olan Cys4 ve Cys83 arasında oluşan disülfür köprülerinden meydana gelmektedir (Livnah, 1993) .

Avidin pozitif yüklü bazik bir proteindir (pI 10) (Melamed, 1963). Bu pozitiflik her monomerin sahip olduğu sekiz arjinin ve dokuz lisin tortusundan kaynaklanmaktadır (DeLange, 1971). Avidinin her bir alt ünite biriminin içinde bir disülfür köprüsü oluşturan iki sistein kalıntısı bulunmaktadır. Yumurta beyazı avidinine ek olarak tavuk avidin gen ailesi de avidin homologları içerir: Bu homologlara ait yedi üye avidinle ilgili genler (AVRs) olarak bilinir. Diğer AVR'ler %94-99 oranında özdeştir. Avidin ile diğer AVR'ler arasındaki kimlik %91-95 arasında değişmektedir.

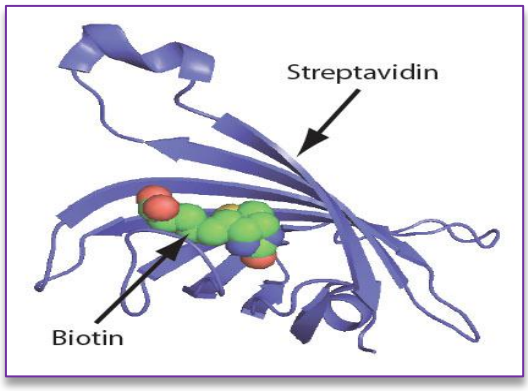
Farklı AVR genlerinin sayısı farklı tavuklar arasında hatta aynı tavuklardaki hücrelerde dahi farklılık gösterebilmektedir (Kunnas, 1993). Avidin ile karşılaştırıldıklarında AVR proteinleri %69-78 oranında avidin dizi kimliğindedir. AVR proteinlerinin alt birimlerini biyotin bağlayıcı kısımları korunan, çok sayıda aminoasit kalıntısı içermektedir. Buna rağmen avidininkine benzer kararlı tetramerler oluştururlar. Bununla birlikte biyotin bağlamada ve glikozilasyon ve yük özellikleri gibi fizikokimyasal özelliklerde farklılıklar gösterirler (Hytönen, 2005).

Biyotine bağlanıcı proteinler arasında en kayda değer olanı avidindir. Avidinin karbonhidrat içeriği ve bazik pI'ya sahip olmasından dolayı daha yüksek nonspesifik bağlanma görülmektedir.

Yumurta beyazından elde edilmiş olan avidin, streptavidin ile % 33 dizi benzerliğe sahiptir ama ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları neredeyse aynıdır. Avidinin biyotine olan afinitesi daha yüksektir (Kd ~ 10^{-15} M) Streptavidin ise *Streptomyces avidini* bakterisinden elde edilen tetramerik bir proteindir. Molekül ağırlığı yaklaşık 60 kDa'dur (John Cazin,1988). Biyotine olan afinitesinin yanı sıra aşırı pH, sıcaklık, organik çözücüler, deterjanlar (SDS, Triton gibi) ve proteolitik enzimler bu proteinin biotine bağlanmasını etkilemediği gibi Streptavidin de moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılır. Streptavidin 159 amino asit kalıntılı proteindir. Ancak işlemlendikten sonra N- ve C- ucu ayrılır ve 13-139 Kalıntı kalmaktadır. Alt birimlerini ayırmak için ancak % 0,2'lik SDS içinde 100 °C' de 20 dk. maruz bırakmak gerekir. Avidin ve streptavidin yapılarına bakıldığında her ikisinde de,

- Ortak bir tetrametik yapı
- Avidin ile streptavidinin aminoasit dizilimindeki %33'lük benzerlik
- Homolog iç kısım (çekirdek) olmak üzere benzer özellikler taşımaktadırlar.
- Streptavidinin izoelektrik noktası ise (pI) 5'tir. Biraz asidiktir.

Streptavidin proteini hücre dışına salgılandıktan sonra ortamdaki biyotin moleküllerine bağlanıp (Şekil 1.7) onları başka mikroorganizmalar tarafından kullanılmaz hale getirmesi sebebiyle bu proteinin bir antibiyotik görevine sahip olabileceği öne sürülmüştür (Hendrickson, 1989). Deglikosile edilmiş avidin, büyüklüğü, pI ve nonspesifik özellikleri ile streptavidine benzer.



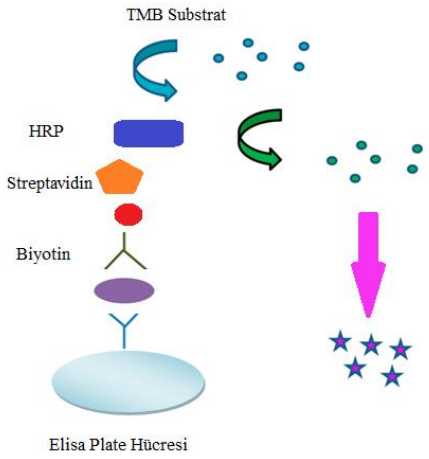
Şekil 1. 7. *Biyotin-Streptavidin etkileşimi (Howart, 2006)*

1.1.5.1. *Avidinin uygulama alanları*

Tavuk avidininin ve bakteri streptavidinin rekombinant formları (Airenne, 1997) laboratuvarlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Collot, 2003). Örneğin, protein saflaştırma, etiketleme teknikleri, nanoteknoloji, teşhis ve hedefe yönelik ilaç dağıtımı gibi alanlarda sıklıkla tercih edilmektedir (Kramer, 2000). Bakterilerden verimli şekilde üretilebilmekte ve yumurtadan izole edilebilmektedir (Sano, 1990). Biyotin bağlama bölgelerinde Cys4 ve Cys83 arasında meydana gelen disülfür köprüleri avidinin stabilitesi için önemli olduğu gösterilmiştir. Avidin-biyotin teknolojisi avidinin yüksek stabilitelerinin yanı sıra avidin-biyotin arasındaki çok yüksek ve spesifik afiniteye ($Kd \approx 10^{-14}$–10^{-16} M) dayanmaktadır. Avidin ısıya, denatürasyona, düşük ve yüksek pH' a dirençlidir. Proteolitik enzimler karşısında da dayanıklıdır. Avidin esnek bir protein iskelesi ile farklı yaklaşımlarda kullanılabilir ve biyotinle farklı moleküllere kolayca bağlanabilir. Bu özellikleriyle çok yönlü ve çok amaçlı iskeleler sağlayabilen nadir bir protein sınıfıdır (Laitinen, 2006). Yıllar boyunca, avidin modifiye edilmiştir. Avidin, streptavidinden daha erken bulunmasına rağmen, 1995 yılına kadar klonlanmamıştır (Wallén,1995). Oysa streptavidin 1986 yılında klonlanmıştır (Argarana,1986).

Biyotinlenmiş enzimler ELISA tipi deneylerde avidine en etkili şekildeki bağlanmalarda kullanılmaktadır. Son yıllarda, enzimle işaretlemede, testin duyarlılığını artırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin-biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan komplekslerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır.

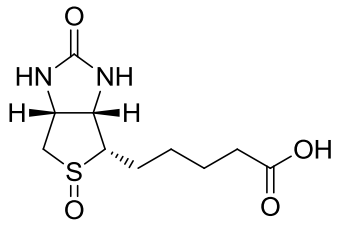
Yaban turbu peroksidazı (HRP) için substrat tetrametilbenzidin (TMB)' dir. Bu enzimin en önemli özelliği önceden renksiz olup reaksiyona girdiğinde renkli ürün oluşturan substratlarıyla birleşmesiyle renk değişimine uğramasıdır. Son yıllarda işaretleme maddesi olarak kullanılan biyotin-avidin sistemleri, moleküller arasında bağlanma bölgelerinin daha fazla olması, bağlanmalarının daha özgül ve kuvvetli olması gibi nedenlerle, oluşan sinyal miktarını artırmakta ve böylece ELISA yöntemlerinin duyarlılığını yükseltmektedir (Köhler, 1975). Bu yöntemde herhangi bir antikor biyotin ile işaretlidir, ortama enzimle işaretli avidin eklendiğinde biyotin ile kuvvetle bağlanır ve daha soma substratın eklenmesiyle renk değişimi ortaya çıkar (Engvall, 1971) (Şekil 1.8).



Şekil 1. 8. *Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi*

1.1.6. Biyotin

Biyotin, H vitamini veya B_7 vitamini olarak da adlandırılan ve normalde karşımıza sıklıkla "güzellik vitamini" adıyla çıkan bir vitamindir (Şekil 1.9). Vücudumuzda kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından da üretilen biyotin sağlıklı bir hayat için ihtiyacımız olan önemli bir vitamindir.



Şekil 1. 9. *Biyotinin molekül yapısı*

Biyotin; yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmalarında yer alan bir koenzimdir. Aynı zamanda hücre gelişimine de katkısı vardır. Ayrıca, kanın şeker seviyesinin ortalama düzeyde kalmasına yardımcı olur. Özellikle kemik iliği için çok önemli olmakla birlikte sağlıklı sinir dokularının olması için gereklidir.

Biyotin proteinlere bağlanarak karbondioksit fiksasyonunu veya dekarboksilasyonda enzimlerin prostetik grubu olarak işlev görür. Piruvat karboksilaz enzimi tarafından katalizlenen piruvatın oksaloasetata çevrilmesinde rol alır.

Biyotin; biyolojik temelli uygulamalarında önemli bir moleküldür. (Chapman, 1999). Örneğin, biyotin bağımlı karboksilaz enzimlerinde bikarbonattan karbondioksit fiksasyonunun kimyasal işlevi açısından kritik bir kofaktördür (Knowles 1989, Attwood 1995). Ayrıca, avidinin biyotin molekülüne karşı yüksek afiniteye sahip olduğu ve 1: 4 oranında biyotin ile kompleks bir iyon oluşturduğu bilinmektedir (Marttila, 1998). Bu hareketlilik saflaştırma, etiketleme ve bağlanma için kullanılabilmektedir.

1.2. Proteinin Ön Deriştirme ve Saflaştırma Yöntemleri

Proteinler ticari olarak satın alınabildikleri gibi, laboratuvar ortamlarında da fazla miktarda, ucuz ve kolay yollarla elde edilebilirler. Bunun için istenilen proteinin seçilen bir kaynaktan izolasyonu, ön deriştirilme işleminin yapılması ve son olarak da saflaştırılması gerekmektedir. Doğal kaynaklardan (bitki, alg, mikroorganizma) izole edilen biyomoleküller ve proteinler beraberinde istenmeyen türleri, küçük molekülleri ve başka proteinleri de taşıdıkları için bunlardan uzaklaştırılmak için bazı ön işlemlerden geçirilmeleri gerekmektedir. Bu işlemlerdeki hedef ve prensip elde edilmek istenilen proteini veya ilgilenilen proteinin dışında kalan türleri ham ekstrakttan uzaklaştırmak ve çalışılacak proteini daha temiz ve derişik getirmektir. Bunun için çöktürme, filtrasyon, diyaliz, kolon kromatografisi gibi pek çok yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler sadece istenilen biyomolekülü ortamdaki diğer türlerden

uzaklaştırmakla kalmayıp proteinleri saflaştırmak için de kullanılabilir. Spesifik bir ayırma ve saflaştırma işlemi yapmak istiyorsak afinite kromatografisi ve türleri kullanılmalıdır.

1.2.1. Kaynak seçimi

Proteinin izole edileceği kaynağın temininin ucuz ve kolay yollardan gerçekleşmesi önemlidir. Bunun yanı sıra seçilen kaynak türü hedef proteini bol miktarda bulundurmalı, izolasyon koşullarına (dondurma, ısıtma, karıştırma, parçalama) dirençli olmalı, çabuk denatüre olmamalı, çabuk tükenmemeli ve çevreye bir zarar vermemelidir. Hayvansal kaynaklar karmaşık yapılarla çalışılması gerektiğinden ve bazı durumlarda bilim etiğini ihlal ettiğinden fazla tercih edilmemektedir. Bitkiler bu açıdan hayvansal kaynaklara göre daha avantajlıdır. Ancak kullanılmadan önce ekilmesi, büyütülmesi gibi vakit alan süreçlere ihtiyaç vardır (Ertuğrul, 2007).

1.2.2. Çöktürme

Bu basamağa geçmeden önce numuneye santrifüj işlemi uygulanır. Bu işlemle farklı ağırlık ve yoğunluktaki moleküller farklı hızlara göre çökerler. Bu esnada sürtünmeden dolayı açığa çıkan ısının proteinleri denatüre etmesini önlemek amacıyla işlem +4 °C' de yapılmalıdır. İlgili proteinin diğer proteinlerden ayrılmasında ve proteinlerin deriştirilmesinde kullanılan çöktürme işlemi, saflaştırma işlemlerinin hemen hepsinde kullanılmaktadır. Amaca uygun olarak çöktürme işlemi santrifüjleme, filtrasyonla elde edilen fraksiyonda da yapılabilir. Protein özellikleri dikkate alınarak ve amaca uygun olarak farklı şekillerde çöktürme işlemi yapılmaktadır. Bunlar pH, ısı, organik çözücüler, tuzlar vb. dir. Genellikle tuz ile çöktürme tercih edilmektedir. En çok tercih edilen amonyum sülfat nötral tuzudur. Çöktürme işleminden santrifüjleme ile elde edilen çökelti uygun bir hacimde tamponda çözülür. Aslında bu aşamada kısmi bir saflaştırma yapılmış olunur.

Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde proteinlerin genellikle iç kısımlarında bulunan hidrofobik grupların etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Bu durumda hidrofobik grupların birbirleriyle olan etkileşimleri artarak bu proteinleri denatüre olmaksızın çöktürürler. Bu işlemin amacı ham ekstrakt bünyesinde bulunan proteinlerin tuz iyonlarının etkisiyle birbirlerinden ayrılmasıdır.

Etanol ve aseton gibi polar organik çözücüler, sulu çözeltilerde su ile yer değiştirdiklerinde çözeltinin çözme kabiliyetini düşürürler ayrıca dielektrik sabitleri düşmektedir. Böylece proteinlerin dibe çökmesine neden olurlar. Organik çözücüler daha çok serum proteinlerini çöktürmede tercih edilen çöktürücü maddelerdir.

Proteinlerin çöktürülmesinde tercih edilen diğer bir yöntem ise ortamın pH' ının değiştirilmesidir. Bu yöntem de kolay ve ucuz bir yoldur. Her proteinin negatif ve pozitif yük sayısının eşit olduğu değere izoelektrik nokta denir. Proteinler izoelektrik noktalarına ulaştıklarında nötr olduklarından, çözünürlükleri azalır ve dibe çökerler. Bu yöntem de çoğunlukla serum proteinlerinin ayrıştırılmasında ve insülin saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Şengel, 2007).

1.2.3. Diyaliz ve ultrafiltrasyon

Proteinleri düşük molekül ağırlıklı tuzlardan (NaCl) uzaklaştırmak için genellikle diyaliz yöntemi kullanılır.

Diyaliz yönteminde, yarı geçirgen bir membran içerisine konulan protein çözeltisindeki küçük moleküller, gözeneklerden membranın dışında bulunan su veya uygun tampon çözeltiye geçerler. Proteinler büyük moleküllü olduklarından bu gözeneklerden geçemezler. Bu sayede istenmeyen kirlilikler proteinlerden uzaklaşırken membran dışında bulunan sulu çözeltideki moleküller de proteinlere bağlanır. Bu moleküller daha sonra liyofilizasyon ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Belirli sürelerle tamponunun değiştirilmesiyle küçük moleküller protein çözeltisinden uzaklaşmış olurlar.

Ultrafiltrasyon yöntemi de aynı prensiple çalışan bir ayırma ve ön deriştirme yolu olarak kullanılmaktadır. Diyalizden farklı yönü ise, küçük moleküllerin uzaklaştırılması için santrifüj kuvvetinin devreye girmesidir. Diyalize göre çok daha hızlı, kısa sürede ve verimli bir ayrım sağlamaktadır. Uygulanması ucuz, kolay ve verimli bir yoldur. Ağırlıkları 1 kDa-300 kDa arasında değişen molekülleri ayırmak için geliştirilen farklı ultrafiltrasyon tüpleri biyokimyasal çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır (Şengel, 2007).

1.2.4. Kromatografik yöntemler

Kromatografi ilk kez botanik alanında bitki pigmentlerinin renkli kısımlarını ayırmak için kullanılmıştır. Kromatografi moleküllerin bir sabit ve hareketli faz arasında fiziksel etkileşimlerine dayanan ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Birçok

kimyasal alanda olduğu gibi protein saflaştırma çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle kolon kromatografisi sıklıkla tercih edilmektedir. Kromatografi kendi içerisinde ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tiplerine göre (Şekil 1.10) sınıflandırılmaktadır (Cutler, 1996).

Şekil 1. 10. *Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması*

Sıcaklık, pH ve tampon bileşimi gibi uygun çalışma koşulları sağlandığında bütün adsorpsiyon kromatografisi türleri proteinleri barındıkları ortam içinde deriştirme ve yüksek verimle saflaştırma işlevlerine sahiptir. Fakat verimli bir saflaştırma için tek bir yöntem yeterli değildir ve çoğunlukla kromatografik yöntemler de kullanılır. Bunlardan en yaygın ve sık tercih edileni iyon değişim kromatografisidir. Saflaştırma çalışmalarının yaklaşık % 67' sinde birkaç basamak halinde uygulanan bu yöntemde numunenin sahip olduğu uygun yük ve büyüklükteki iyonlar, mobil fazın iyonlarıyla yarışarak sabit faza bağlanır. Ardından ortamın iyonik şiddetinin değiştirilmesiyle de kolondan ayrılarak ortamı terk ederler. En çok kullanılan kolon malzemeleri dietilaminoetil (DEAE)anyon değiştirici ve karboksimetil (CM) katyon değiştirici reçinelerdir.

Bir diğer yöntem de jel filtrasyon kromatografisidir. Bu yöntem molekülleri boyutlarına ve şekillerine göre ayıran, % 60 oranında tercih edilen ikinci bir kromatografi çeşitidir. Sabit faz olarak, gözenekli yapıda olan agaroz, dekstran, poliakrilamid gibi maddeler veya bunların belirli oranlarda karışımları bir araya getirilerek uygulanan bu kromatografi türünde, kolona yüklenen örnek molekülleri, porların boyutundan çok büyükse, matriks tarafından tutulmaz ve kolonu ilk olarak terk

ederler. Küçük moleküller ise porlara girer ve burada tutulur. Böylece ayrım sağlanmış olur. Jel filtrasyon kromatografisi genellikle saflaştırmanın başlangıç basamağında yer alsa da birkaç kez yinelenmesi gerekebilir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ise bu iki yönteme göre daha az (çalışmaların % 18' inde) tercih edilmektedir. Bu yöntem ters faz hızlı protein sıvı kromatografisi (HPLC) ile benzer özellik göstermektedir. Bu kromatografi tekniğinde numune, apolar bir sabit faz üzerinden polar olan bir çözücü ile geçirilir. Çoğunlukla kullanılan hidrofilik özellikteki destek materyalleri, hidrofobik etkileşim kuvvetindeki artışa göre bütil, oktil veya fenil fonksiyonel gruplarını içeren çapraz bağlı agaroz materyalleridir Hidrofobik özellikteki moleküller, Van der Waals etkileşimleri sayesinde sabit fazın yüzeyindeki hidrofobik kısımlara tutunur ve ardından bağlanan moleküller hareketli fazın polaritesinin düşürülmesi yoluyla kolondan ayrılarak toplanır.

Spesifik bir ayırma ve verimli bir saflaştırma sağlayan afinite kromatografisi pahalı bir yöntem olması nedeniyle son yıllara kadar çok tercih edilmemiş olsa bile biyoteknoloji alanında yapılan çalışmalar (alternatif afinite ligandlarının ve destek materyallerinin geliştirilmesi) afinite kromatografisi yöntemlerinin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Afinite kromatografisi başarılı bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir (Saxena, 2003; Ward, 2009).

1.2.5. Afinite kromatografisi

Afinite sözcüğü kelime anlamı Latincede ilgi duyma anlamına gelen "affinitas" kelimesinden türemiştir. Afinite kromatografisinin ilk uygulaması, 1971 yılında, amilazın seçici olarak çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonu ile olmuştur. Fakat o yıllarda, kullanışlı bir matriksin sentezine ve bu matrikse ligandın kovalent olarak bağlanmasına izin veren kompleks organik kimya tekniklerinin geliştirilememiş olması, afinite kromatografisinin laboratuvarlarda kullanılmasını fazlasıyla geciktirmiştir. 1967 yılında ise Axen, Porath ve Ernback tarafından yayınlanan bir makalede (Axen, 1967), birincil amino grubu içeren moleküllerin, siyanojen bromid (BrCN) ile polisakkarit matrikslere bağlandığı rapor edilmiştir. Bu rapor, günümüzde rutin olarak kullanılan afinite kromatografisinin kullanılmaya başlamasını temsil etmektedir ve BrCN aktivasyonu ile ligandların matrikse bağlanması da günümüzde kullanılan en yaygın metoddur. Başlarda enzimlerin saflaştırılması için geliştirilmiş olan afinite kromatografisi daha sonra antikorların, antijenlerin, nükleotidlerin, nükleik asitlerin,

DNA-bağlayıcı proteinlerin, immünoglobilinlerin, membran reseptörlerinin ve hatta hücrelerin saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır.

Afinite kromatografisi, kompleks karışımlardan belirli bir molekül ve ya molekül grubunu saflaştırmak için çok güçlü yöntemlerden biridir (Wilchek, 1999). Bu yöntemin çalışma prensibi, biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, karbonhidratlar vb.) moleküler tanıma ve tanınma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Afinite kromatografisinde ayırma başarısı, büyük oranda kolonun hareketsiz ligandının seçimine bağlıdır. Kullanılan yaygın biyomoleküller ve bunların ligandları Tablo 1.1' de verilmektedir. Antikorlar, lektinler ve serum proteinleri gibi ligandların çoğu biyolojik bir kaynaktan elde edilirler. Boronik asit, metal şelatlar, sentetik ajanlar ya da anorganik moleküller olan triazin boyalar da afinite kromatografisinde kullanılabilecek yararlı ligandlardandır (Tombach, 2001; Yadav, 2012).

Tablo 1.1. *Afinite kromatografisinde yaygın kullanılan moleküller ve bunların ligandları*

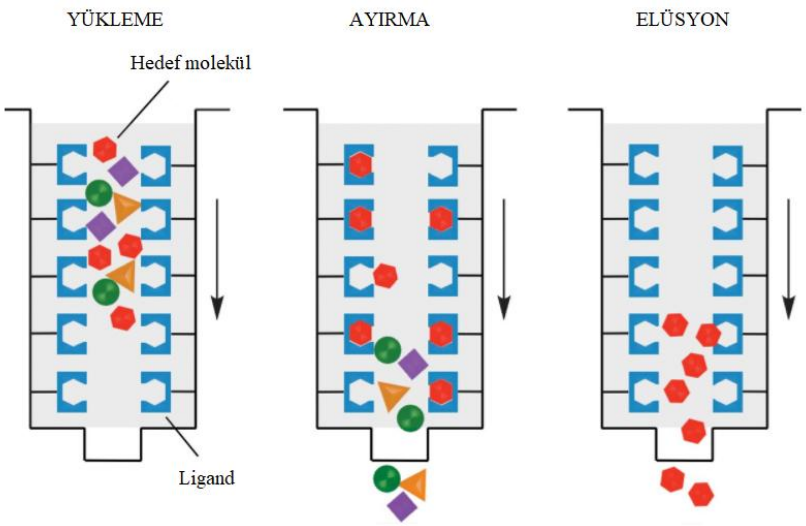
Saflaştırılacak biyomolekül	**Ligand**
Enzim	Substrat analoğu, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, hücre
Nükleik asit	Histonlar, nükleik asit polimeraz, bağlama proteini
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi özgül protein, lektin

Afinite kromatografisi antijen ile antikor, hormon ile reseptör gibi iki molekül arasında spesifik bir biyolojik etkileşime dayanır. Bu etkileşim elektrostatik veya hidrofobik etkileşimlerle, Van der Waals kuvvetleriyle ya da hidrojen bağları ile tersinir olarak meydana gelmektedir.

Geri dönüşümlü olan bu etkileşimler, hedef molekül mobil fazda iken, sabit fazı oluşturmak için bir katı matriks üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ligand saflaştırma için kullanılır . Daha sonra saflaştırılmak istenen hedef bileşik, bir yükleme tamponu varlığında afinite kolon üzerine uygulanır (Şekil 1.11). Tutunamayan örnek bileşenleri elüsyon tamponuyla kolondan uzaklaştırılır. Hedef analit ise elüsyon

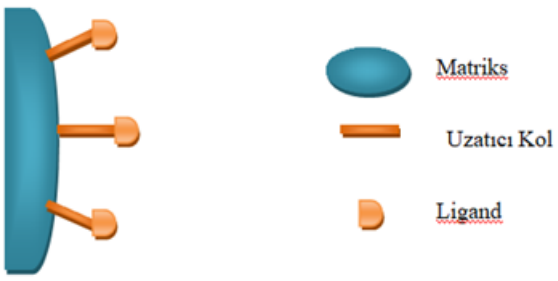
tamponuyla kolondan toplanır. Bu amaçla ortama ya yarışmacı başka bir ligand ilave edilir ya da hareketli fazın iyonik şiddeti, pH' ı veya polaritesi değiştirilir (Magdeldin, 2012). Böylece kolondan ayrılan biyomolekül saf bir şekilde elde edilmiş olur.

Kolon daha sonra uygulama tamponu ile tekrar yıkanır ve yeni bir örnek yüklemek için hazır hale getirilir (Cabrera, 2004).



Şekil 1. 11. *Afinite kromatografisi işlem basamakları (Urh, 2009)*

Afinite tabanlı kromatografik saflaştırma işlemlerinde hedef molekülün bağlandığı maddeye ligand denmekte iken, ligandın üzerine tutunduğu katı materyal ise matriks olarak adlandırılır (Şekil 1.12).



Şekil 1. 12. *Afinite kromatografisinin temel bileşenleri (Magdeldin, 2012)*

1.2.5.1. *Ligandlar*

Afinite ligandları iki temel sınıfa ayrılabilir. Bunlar, yüksek spesifitede olan ligandlar ve genel ligandlardır. Yüksek spesifite liganları, bir ya da birkaç ilgili hedefleri tutan maddelerdir. Genel ligandlara örnek olarak metal bağlayıcı aminoasitler için metal şelatlar, şekerler, polisakkaritler için lektinler, enzim ve proteinler için bazı boya türleri, protein A ya da G için immünoglobülinler verilebilirken; özel ligandlara ise antijenlerin bağlanması için antikorlar, enzimlerin bağlanması için substrat ya da inhibitörler, DNA ya da RNA'nın bağlanması için nükleik asitler verilebilir. Genel ligandlar, daha çok ajanları ilgili moleküller ya da yapısal olarak benzeyen hedeflere bağlayan sınıftır.

1.2.5.2. *Destek (matriks)*

Afinite kromatografisini kullanmak için bir sistem tasarlanırken, dikkate alınması gereken önemli bir nokta da ligandın bağlanması için kullanılan destek maddesinin seçimidir. Bu destek maddesi, saflaştırılmak istenen hedef molekülle hiçbir etkileşime girmeyecek ve ligandın bağlanmasını değiştirmek kolay olamalıdır. Ayrıca, matriks uygulanan basınç ve akış hızı için dayanıklı olmalıdır. Agaroz, sıklıkla kullanılan geleneksel afinite kolon maddesidir. Başka bir yaygın kullanılan polisakkarit matriks türü selülozdur. Spesifik olmayan immobilizasyon teknikleri, bir ligandın bir matrikse fiziksel adsorpsiyonunu içerir.

1.2.5.3. *Ara kollar (spacer arms)*

Matriks ile liganda bağlanacak olan molekülden kaynaklanan sterik engellemeden dolayı genellikle matrik ile ligand arasına bir ara kol koymak, bağlanma için avantajdır. Böylece, ligandın matriks yüzeyinden uzaklaştırılması sağlanarak, ligand ile hedef molekülün etkili bir şekilde bağlanması sağlanmış olur. Ara kolların uzunlukları ise oldukça önemlidir. Şayet, ara kolun uzunluğu çok kısa olursa, ligand hedef molekülü bağlayamayacaktır. Eğer çok uzun olursa da, ligand ile hedef moleküller arasında spesifik olmayan etkileşimler meydana gelecektir. O'Carra ve arkadaşları (O'Carra, 1973) çok uzun olan ara kolların örnek molekül ile hidrofobik etkileşimler ile ligandın bağlandıklarını

göstermişlerdir. Ara kollar için ideal uzunluk 6-10 karbon atom zincirleridir (Magdeldin, 2012).

1.2.5.4. *Kriyojeller*

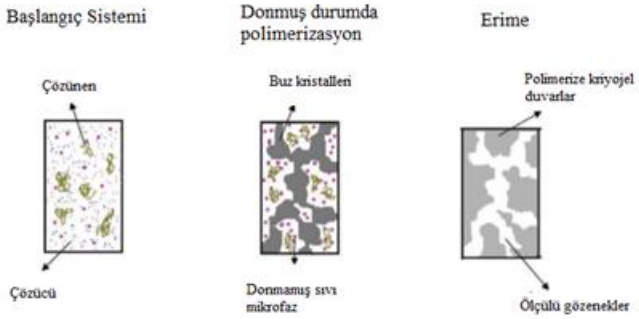
"Kriyo, (cryo)" kelimesi eski yunancada "soğuk, buz" anlamlarına gelmektedir. Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında oluşan birbirine bağlantılı büyük gözenekli jel matrikslerdir. Polimerleşme şartlarına ve yapısal farklılıklarına göre jeller yedi şekilde sınıflandırılır. Bunlar; kemotropik jeller, iyonotropik jeller, şelatotropik jeller, solvatotropik jeller, termotropik jeller, psikotropik jeller, kryotropik jellerdir.

Kriyojelasyon bir dondurma ve eritme süreciyle basamaklı olarak gerçekleşen işlemler zinciridir. Jel çözeltisi çözücünün kristallenme noktasının altındaki sıcaklıklarda dondurulur. Burada en önemli etken kriyojelasyon esnasında sıcaklığın aşamalı bir şekilde düşürülmesidir. Elde edilen donmuş sistem heterojendir ve hala sıvı halde mikro faz içerir. Çözücünün donması sonucu jelin oluşturulmasını sağlayacak ajanlar sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır ve bu işlem de kriyoderiştirme adını alır. Jelleşmeyi hızlandıran ise jel haline gelecek karışımın sıvı mikrofazda yoğunlaşmasıdır. Gözenek oluşturucu ajan olarak görev alan ise çözücünün donmuş kristalleridir. Eritme işlemi sonuçlandığında çözücü ile dolu boşluklar ve makro gözenekler oluşur. Gözenek yüzeyinin pürüzsüz, gözenek yapısının ise yuvarlaklaşmasını sağlayan özellik çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey geriliminden kaynaklanmaktadır (Peoples, 2007).

Kriyojeller sıcaklık, çapraz bağlayıcı ve monomer miktarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedirler. Düşük sıcaklıklara doğru küçük kristal oluşumunun değişik yerlerden başlaması gözenek boyutunu azaltır ve yoğun gözenek yapısı oluşumuna sebep olur. Yüksek sıcaklıklarda ise büyük gözenek yapısı oluşurken, çözeltinin donmama riski söz konusu olmaktadır. Bir başka etken olan çapraz bağlayıcı oranı ise sudaki kriyojelin şişme oranı ile ters orantılıdır. Monomer derişimi yüksek ise kırılgan ve yoğun matriks yapılı bir

kriyojel gözlenir. Kullanım alanlarına göre ise kriyojeller kolon ya da disk yapısında sentezlenebilir.

Kriyojellerin sentezlenme süreci kriyojelasyon olarak adlandırılır ve üç ana basamakta incelenebilir (Şekil 1.13).



Şekil 1. 13. *Kriyojelasyon (Plieva, 2008)*

Kriyojellerin en önemli özelliği nano ve mikro boyutlarda difüzyon sorununu ortadan kaldırdığı için süpermakro gözenek yapısına sahip olmalarıdır. Kriyojellerin gözenek yapıları ve süngerimsi özelliği biyomalzemelerle uygun bir çalışma olanağı sunmaktadır. Örneğin kromotografik çalışmalarda kolon malzemesi olarak kriyojellerin tercih edilmelerinin sebebi elastik yapısı sayesinde sistemde oluşacak geri basıncı önleyerek biyoteknolojik alanda kullanımına olanak sağlamasıdır. Kriyojellerin bu alandaki kullanımına bakıldığında protein (Daoud-Attieh, 2013), nükleik asit (Çimen, 2012) ve enzimlerin saflaştırılmasında (Keçili, 2006) kullanılmıştır.

Büyük ve içten bağlı büyük gözeneklerin varlığından dolayı, kriyojeller bu yapıları bozulmadan kurutulabilir. Kurutma kriyojelin depolanmasını kolaylaştırdığı için bu hidrofilik materyallerin en önemli özelliklerinden birisidir. Düşük ve yüksek molekül kütleli öncüllerden hazırlanan kriyojeller hızlı tekrar-şişme kinetikleri ile dikkat çekmektedirler ve kuru örnekler sulu ortama bırakıldıklarında birkaç dakika içinde tekrar orijinal boyutuna geri dönerler. Büyük ve yoğun içten bağlı makrogözeneklerin varlığı onların çok düşük akış dirençlerine sahip olmasını sağlamaktadır (Dainiak, 2007).

Kriyojeller geliştirildikleri tarihten günümüze dek enzim, protein, hormon, karbonhidrat (Biçen, 2009), nükleik asit ve antibadi (Johnson, 2012) gibi moleküllerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında, ayrıca enzim immobilizasyonu (Tüzmen, 2012) uygulamalarında sıklıkla kullanılmıştır.

Kriyojeller sahip oldukları çapraz bağlar onlara fiziksel açıdan dayanıklı, kimyasal açıdan ise kararlı olma özelliğini kazandırmaktadır. Yapılarında bulunan süper makrogözenekler ise kriyojelleri biyomoleküllerin ayrılmasında çok kullanışlı ve avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca kriyojellerin sahip olduğu süngerimsi, esnek yapı istenilen şekillerde sentezlenebilmeleri sayesinde ve kolay modifiye edilebilmeleri bu maddeleri sadece saflaştırma çalışmalarında değil, biyomedikal malzemelerin tasarlanmasında ve uygulamalarında da avantajlı haline getirmektedir (Peoples, 2007).

1.2.6. Afinite kromatografisi türleri

1.2.6.1. *İmmünoafinite kromatografisi (İAK)*

İmmünoafinite kromatografisinde antikorlar ya da antijenler saflaştırılacak olan maddenin tutunması için immünoadsorbentler olarak kullanılmaktadır. Özellikle saflaştırılacak olan antijenin bilinen bir ligandının bulunmadığı durumlarda, antikorlar bu tip antijenlerin saflaştırılmasında oldukça kullanışlı immünoadsorbentleri oluşturmaktadır. Günümüzde ise monoklonal antikorlara dayalı adsorbentler, poliklonal antikorlara dayalı immünoadsorbentlerin yerini almış durumdadır. Buna rağmen, hem poliklonal hemde monoklonal antikorların kullanıldığı immünoadsorbentler bulunmaktadır (Henriksen, 2014). Bu immünoadsorbentler ise birbirine göre hem avantajlara hem de dezavantajlara sahiptirler. İmmünoafinite kromatografisinin uygulanması için gerekli olan immünoadsorbentlerin hazırlanması ve protein saflaştırılmasında uygulanan temel aşamalar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. İmmünoadsorbentin hazırlanmasında matrikse bağlanacak olan ligandın (antikor) elde edilmesi için gerekli olan protein (antijen) diğer protein saflaştırma teknikleri ile saflaştırılır. Saflaştırılan protein ise bu proteinin elde edildiği kaynaktan evrimsel olarak farklı bir memeli hayvanın immünizasyonunda kullanılır. Monoklonal antikorların üretimi için

genelde fare, poliklonal antikorların üretimi için ise tavşan ve ya keçi kullanılır.

2. Antijene karşı antikorların üretilmesi sağlanır. Poliklonal antikor üretimi için kullanılan antijenin oldukça saf olması gerekir. Aksi takdirde, eser miktarda dahi olsa kirletici olarak bulunan diğer proteinlerin antijenitesi çok daha yüksek olabilir. Sonuçta karışık özgüllükte antikor üretimine yol açabilir. Monoklonal antikor üretimi için kullanılacak olan antijenin saflığı ise eğer, uygun klonların seçimi için bir tarama prosedürü kullanılacaksa, daha az önemlidir. Gerçekte ise tarama prosedürleri sonucunda kirletici proteinlere ait antikor klonlarının elemine edilmesi nedeniyle %1 oranında hedef protein içeren antijenlere karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar izole edilebilmektedir.

3. Antikor, tavşan serumundan (poliklonal) çökeltmeyle kısmi olarak saflaştırılır. Antikorların saflaştırılmasını sağlayan daha iyi bir prosedür ise ters immünoafinite kromatografisidir. Bu prosedürde, tutuklanmış antijeni içeren kolon materyali ile doldurulmuş olan kolona serum yüklenir. Serumdaki özgül antikorlar tutuklu antijenlerine tutunurken, serum ve diğer kirleticiler kolondan ayırılır.

4. Saflaştırılmış olan antikorlar ise bikarbonat/karbonat tamponu (pH: 8-9) ile aktive kolon matriksine (siyanojen bromid, tosil, vinilsülfon-aktive v.b) bağlanır.

5. Saflaştırılmak istenen proteini içeren örnek materyalinin ham özütü kolona yüklenir. Bağlanmamış materyallerin kolondan uzaklaştırılması için uygun bir tampon ile kolon yıkanır.

6. Hedef protein kolondan elüe edilir.

İmmünoafinite kromatografisinin uygulanmasında yukarıda sıralanan basamaklar arasında en zor olanlarını ise 1, 2 ve 6 numaralı basamaklar oluşturmaktadır (Magdeldin, 2012).

1.2.6.2. *Boya afinite kromatografisi*

Boyaların ligand olarak kullanılması ise 1960'lı yıllarda, Amersham Pharmacia Biotech Fine Chemicals (Uppsala, İsveç) firması tarafından Cibacron

Blue F3GA olarak bilinen mavi bir boyanın, yüksek moleküler kütleli çözünür agaroza bağlanarak, jel filtrasyon kromatografisinde boşluk hacminin belirlenmesi amacı ile markır olarak kullanılması sonucunda başlamıştır. Takip eden yıllarda ise özellikle dehidrogenazlar olmak üzere, pürivat kinazın, fosfofruktokinaz enzimlerinin de bu boyaya karşı afinite gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ise hem konjuge halkalar, hemde iyonik gruplar içeren sentetik bazı triazin boyaların, bazı proteinleri bağlama yeteneğinde oldukları belirlenmiştir. Bu yüzden, afinite kromatografisinde ligand olarak kullanılan boyaları tanımlamak için pseudo-ligandlar terimi kullanılmıştır.

Boyaların proteinleri bağlama özelliğine sahip olması, bu boyaların triazin metodu ile Sepharose 4B gibi matrikslere bağlanarak boya-ligandlarının oluşturulmasına, bu nedenle de proteinlerin saflaştırılmasına olanak sağlamıştır. Tekniğin iyi tarafı ise boyaların ucuz olması, yaygın olarak kullanılmakta olan kolon materyallerine kolayca bağlanabilmesi ve oldukça kararlı olmasıdır. En yaygın olarak kullanılan boyalar ise Cibacron Blue F3GA ve Procion Red H-E3B'dir. Bu boyalar, NAD^+ ve $NADP^+$ gibi doğal olarak oluşan kofaktörlere yapısal olarak benzeyen bazı özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde boyalar, kinazlar, dehidrogenezlar, karboksipeptidazlar G, plazminojen içeren maddelere ihtiyaç duyan diğer enzimler gibi, pek çok proteini bağlama yeteneğine sahiptirler (Turkova, 1978). Özel bir proteinin saflaştırılması için kullanılacak olan boyanın seçimi, deneysel olarak elde edilir ve deneme-yanılma yoluyla belirlenir.

1.2.6.3. *İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK)*

İlk defa 1975 yılından Porath ve arkadaşları (Porath, 1975) tarafından uygulanan metal şelat afinite kromatografisi, günümüze kadar yavaş yavaş da olsa geliştirilerek protein saflaştırma tekniklerinden birisi olarak kullanılmaktadır. Cu^{2+}, Zn^{2+}, Hg^{2+} ve ya Cd^{2+} gibi tutuklanmış metal iyonlarının ya da Fe^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2} ve ya Mn^{+2} gibi geçiş metal iyonlarının, histidin kalıntılarının imidazol gruplarıyla, sistein kalıntılarının disülfid gruplarıyla ve triptofan kalıntılarının ise indol gruplarıyla oluşturduğu reaksiyonlarla, proteinleri ve peptidleri seçici olarak tutuklu metal liganda bağlamak için kullanılan özel bir afinite kromatografisi şeklidir. Metal şelat afinite kromatografisi ile ayrıştırılması gerçekleştirilen

proteinler arasında fibrinojen, süperoksit dismutaz ve histon olmayan nüklear proteinleri içeren bir grup protein de sayılabilir.

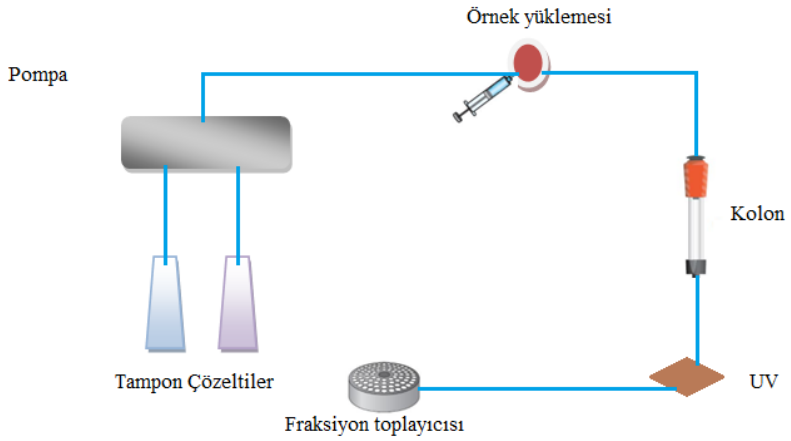
Genellikle, bir iminodiasetat (IDA), tris(karboksimetil)-etilendiamin (TED) ve ya nitrilo triasetik asitin (NTA) kovalent olarak bağlandığı agaroz matriksleri, metal ligandların tutuklanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ticari olarak temin edilen kolon materyalleri şelatlanmış metal içermediklerinden, bu matriksler kullanılmadan önce istenilen metal iyonu ile yüklenmelidirler. Kolon materyalinin metal iyonları ile yüklenmesi ise genellikle 50 mM uygun metal tuzunu ($ZnCl_2$, $CuSO_4$ v.b) içeren su ile yıkanması şeklinde gerçekleştirilir. Metal iyonları ile yüklenmiş olan matriks ise örnek tamponu ile yıkanmalıdır. Ayrıca, zayıf olarak bağlanmış metal iyonlarının aktif olarak kolondan uzaklaştırılması gerektiği durumlarda ise 1-10 mM imidazol ve ya 500 mM glisin gibi zayıf kopleks oluşturan ajanlarla kolonun yıkanması gerekebilir.

Örnek ise başlangıç tamponu içinde çözünmelidir. İyi bir bağlanmanın elde edilebilmesi için nötral ve ya hafif alkali pH'daki tamponların kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılabilecek tamponlar ise tris asetat (50 mM), sodyum fosfat (20-50 mM) ve Tris-HCl (20-50 mM)'dir. Tris-HCl, bağlanmayı azaltma eğiliminde olduğundan bu tampon, sadece metal-protein afinitesinin oldukça yüksek olduğu durumlarda kullanılmalıdır. Başlangıç tamponunda yüksek derişimde tuz ve ya deterjanların bulunması, normalde proteinlerin bağlanmasını etkilemez. Bu nedenle, yüksek tuz derişimleri istenmeyen iyon-değişimi etkisinin önlenmesi için yüksek iyonik gücün (örneğin, 0,5-1 M NaCl) oluşturulmasına katkıda bulunurlar (Arnold 1991).

1.2.7. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC)

FPLC proteinlerin saflaştırılması, bulundukları ortamdan ayrıştırılması, nicel olarak belirlenmesi ve nitelendirilmesi, peptit vb. ayrımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla geliştirilmiş bir sıvı kolon kromatografisi sistemidir. Özellikle membran proteinleri başta olmak üzere, biyomoleküllerin tek basamakta saflaştırılmasını sağlamasından dolayı son zamanlarda yapılan biyokimyasal çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistemin temeli basit bir kromatografik ayırma metoduna dayanmaktadır. Saflaştırılacak hedef

biyomolekül, enzim veya protein, uygun bir hareketli faz ile hazırlanan kolon sisteminden geçirilir. Kolona tutunmayan türler kolonu hemen terk ederler. Kolona tersinir olarak tutunan biyomolekül ise uygun elüsyon çözeltisi ile kolondan saf bir şekilde geri kazanılır.



Şekil 1. 14. *FPLC cihazı ana bileşenleri*

Şekil 1.14' te görüldüğü gibi FPLC cihazı temel olarak; çözücü kabı, pompa, enjeksiyon ünitesi, saflaştırmanın gerçekleşeceği kolon, dedektör, fraksiyon toplama ünitesi ve veri kaydediciden (bilgisayar) oluşmaktadır. Çözücü kaplarında kolonu şartlandırma tamponu ve tutunan numuneyi kolondan sökme amacıyla elüsyon çözeltisi bulunur. Pompa yardımıyla bu çözeltiler cihaza verilen komut yardımıyla kolon üzerinden geçirilir. Enjeksiyon ünitesinden cihaza yüklenen numune de alınarak, belirli bir hızda kolondan geçirir. Kolonu terk eden türler ard arda dedektöre ulaşır ve belirli fraksiyonlarda örnekler, örnek toplama ünitesindeki tüplerde toplanır. Bilgisayar yardımıyla dedektörden gelen sinyaller oluşan piklerin kromatogram halinde görüntülenmesini sağlar. Gözlenen ilk pik kolona tutunmadan gelen türlere aittir. Bu türler şartlandırma çözeltisiyle beraber kolondan ayrılır. Kolon malzemesine afinite, hidrofobik etkileşim, iyonik yük ve büyüklük gibi çeşitli etkenlerle ve zayıf bağlarla bağlanan saflaştırılacak olan biyomolekül ise, sistemden elüsyon çözeltisinin (uygulamaya göre değişir ancak saflaştırma çalışmalarında genellikle NaCl içeren tampon çözeltiler tercih edilir) geçirilmesiyle kolondan elüe edilir ve dedektöre ulaşır. Böylece kromatogramda

ikinci bir pik daha oluşur ve bu pik kromatografi yardımıyla tek basamakta saflaştırılan biyomoleküle aittir.

1.2.8. Afinite kromatografisi ile protein saflaştırmanın önemi

Bir hücreden veya dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi oldukça güçtür. Bu proteinin konsantrasyonu düşük ise farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine en uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemler ard arda uygulandığında protein yüksek saflıkta elde edilebilmektedir. Pekçok enzim ve proteinin saf halde izole edilmesi gerçekleştirilmiştir (Safarik, 2004). Örneğin bir proteinin amino asit dizilişini, molekül ağırlığını ve diğer fiziksel özelliklerini çalışmak istersek öncelikle proteinin saflaştırılması gereklidir. Bir doku, hücre ortamından proteinleri izole edebilmek için öncelikle yapılması gereken birtakım işlemler vardır. İlk olarak saflaştırılacak proteinin en fazla bulunduğu kaynak seçilir. Hedef proteini denatüre etmeyecek tampon çözeltiler kullanılarak kaynak homojenize edilir. Daha sonra bu homojenat belirli hızlarda santrifüjle muamele edilerek biyomolekül partiküllerinden arındırılır. Böylece elde edilen protein karışımı süpernatant halinde alınarak saflaştırma yöntemlerinden uygun olan yöntem kullanılarak proteinlerin saf halde izole edilmesi sağlanır. Özellikle hedef proteine uygulanacak saflaştırma yöntemi yüksek verimle ve proteinin yapısını, kararlığını bozmadan çalışmalıdır. Diğer bir önemli ölçüt ise yöntemin düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olanın tercih edilmesidir. Seçilen yöntem tekniğinde kullanılacak saflaştırma bileşenleri tekrarlanabilir özellikte analizlere uygun olmalı ve çok düşük derişimlerdeki örneklerle dahi çalışılabilmelidir.

Afinite kromatografisi, biyomolekülleri tek basamakta, verimli bir şekilde ve spesifik bir bağlanma gerçekleştirerek saflaştırılmasını sağlamaktadır. Aslında pahalı olarak bilinen bu yöntem saflaştırılacak proteinin afinite gösterdiği uygun bir molekülün ligand olarak seçilmesiyle ucuz bir yöntem haline gelebilmektedir. İyon değişim gibi yük, jel filtrasyon gibi boyuta göre ayrım yapan kromatografik yöntemler ne kadar seçici olurlarsa olsunlar spesifik bir ayırma yerine daha çok

grup ayırması gerçekleştirmektedir. Bu nedenle, aynı numunede avidinin yanı sıra flavoprotein gibi benzer yapıdaki proteinleri bahsedilen yöntemlerle birbirinden ayırmak zor olabilmektedir. Afinite kromatografisi ise proteinler ve bunların spesifik ligandları arasındaki moleküler tanımaya ve bunun sonucu olarak spesifik bağlanmalara dayanarak ayrım gerçekleştirir. Yalnızca saflaştırılmak istenen proteinin, bulunduğu kaynaktan ayrılmasını sağlamaktadır. Saflaştırılmak istenen proteinin bulunduğu ortamda miktarı oldukça az olsa bile verimli bir saflaştırma gerçekleşmektedir.

Protein saflaştırma, etiketleme teknikleri (Manger, 1992), nanoteknoloji (Ramsden, 2013), rekombinant sistemlerde (Young, 2012) sıklıkla tercih edilen proteinlerin en verimli şekilde elde edilebilmeleri oldukça önemlidir. Afinite kromatografisi sahip olduğu spesifiklik, verimlilik, tekrarlanabilirlik, kolay uygulanabilirlik gibi avantajları sayesinde protein saflaştırma çalışmalarında kullanılabilecek ve yeni ligandlarla yeni kolon sistemlerinin geliştirilmesiyle daha da geliştirilebilecek bir yöntemdir.

1.2.9. Rutenyum tabanlı amino asit monomeriyle fotosentetif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi

ANADOLUCA yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpining Conjugation Approach), rutenyum tabanlı, fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezleri, proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanması işlemlerini kapsamaktadır (Ersöz, 2011; ABD Patent No. WO/2011/070402 , 2011). Farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için istenen mikro veya nanoyapılar bütünleştirilebilir. Bu yöntemde fotosensitif monomerler, kovalent ve çapraz bağlanma işlemi sebebiyle doğru antikor oryantasyonu için yönlendirme sağlanmakta ve denatürasyon engellenmektedir.

ANADOLUCA, tasarlanması ve hazırlanma metodu ile silika materyallerine, süperparamanyetik nanopartiküllere, nanokristallere, quantum noktalara, karbon nanopartiküllere, Ag/Au nanopartiküllere ve nanokümelere, Au yüzeyine ve polimerik malzemelere kullanım kolaylığı sağlar. Yöntem, protein konformasyonu ve işlevselliğine zarar vermeden sistein, triptofan, tirozin amino

asitlerine rutenyum tabanlı monomerler tarafından çapraz bağlı konjugasyon meydana gelmesiyle gerçekleşmektedir. Sentezlenen fotosensetif monomerler çeşitli nano ve mikro yapılarda kullanılarak denatürasyon olmaksızın çalışılmaya imkan sağlamaktadır.

ANADOLUCA, tekrar kullanılabilir, nanoprotein içerikli biyosensör ve biyokataliz uygulamalarını barındıran nanobiyokonjugatların sentezlendiği (Say, 2014) bir konsept yöntemdir. Yöntem biyouyumlu, sıcaklık ve pH'dan bağımsız nanobiyokonjugatların sentezine imkân sağlamakla beraber tayin ve teşhis amaçlı sistemlerde kullanılabilirliği nedeniyle oldukça avantajlıdır. Diğer yandan bu tez kapsamında bir ilk olarak Avidinin saflaştırılması için biyotin tabanlı yeni afinite katı destek, patentli ANADOLUCA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada yumurta beyazından elde edilen avidin ticari olarak Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA), firmasından temin edilmiştir. Jel elektroforez ve kriyojel kolon sentezleme işlemlerinde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar (Haverhill, ABD) firmasından alınmıştır. N,N' Metilenbisakrilamit (MBA), Trizma base Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından, Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros (Geel, Belçika) firmasından, Amonyum persülfat (APS), Tetraetilmetilendiamin (TEMED) Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından, Coomassie Blue Appli Chem (Darmstadt, Germany) firmasından, Akrilamid Merck (New Jersey, ABD) firmasından temin edilmiştir. Çalışmaların kalan kısmında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup farklı firmalardan alınmıştır. Asetik asit (CH_3COOH) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen (Honeywell Riedel-de Haën, USA) firmasından temin edilmiştir. Metanol (CH_3OH), Etanol (C_2H_5OH), 2-(4-Hidroksifenilazo) benzoik asit (HABA) Sodyum fosfat monobasic, Glisin, Potasyum fosfat dibasic, Biyotin Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından, Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) Appli Chem (Darmstadt, Germany) firmasından, Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan (Ankara, Tütkiye) firmasından, Hidroklorik asit (HCl) Merck (New Jersey, ABD) firmasından alınarak uygun koşullarda saklanmıştır. Saf su Thermo Scientific (Waltham, ABD) firmasından alınan saf su cihazından elde edilmiş olup iletkenliği 18 MΩ/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FT-IR) kullanılmıştır. Protein saflaştırma işlemi AKTA P-920 UPC-900 model FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) cihazı ile yapılmış, protein içeriği BioTek Synergy H1 ELISA Reader ile yapılan UV absorbans ölçümleri ile tayin edilmiştir. Saflaştırılan proteinin konformasyonel değişimleri Applied

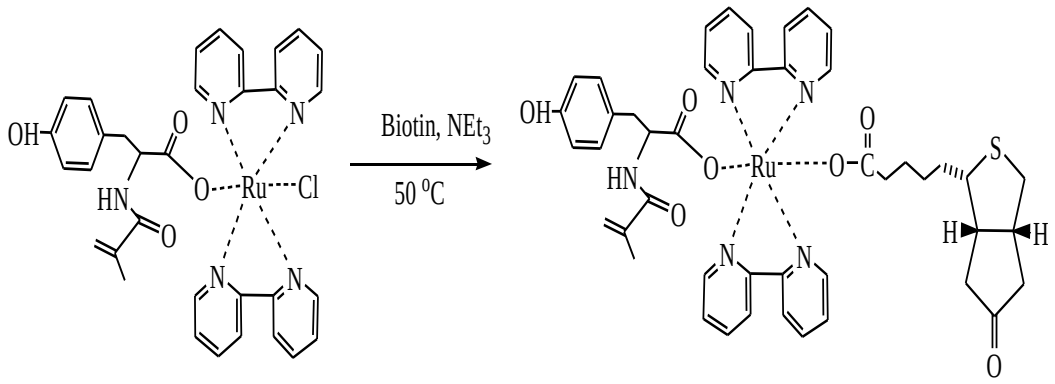
Photophysics-Chirascan Plus model CD Spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) analizi ise Thermo Scientific elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince hazırlanan tampon çözeltilerin pH' ları HANNA H1 2211 pH/ORP metre ile ölçülmüştür.

2.2. Metod

2.2.1. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması

2.2.1.1. *MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin monomerinin sentezi*

(Metakriloil amido triptofan)(bipiridil)$_2$Rutenyum Klorür ((MATrp)(bipy)$_2$RuCl) (0,2 g, 2,8x10^{-4} mmol)' nin 10 mL metanolde çözülmesi ile hazırlanan çözeltisine 5 mL metanolde çözünmüş biotin (0,345 g, 2.8x10^{-4} mmol) çözeltisi, N_2 atmosferinde damla damla ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı 60°C 'de 6 sa boyunca reflaks edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 12 sa karışmaya bırakılmış ve reaksiyon bitiminde çözücü, döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen katı madde eterle yıkanmış ve ardından vakum altında kurutulmuştur (m: 0,168 g ; % 65 verim) (Şekil 2.1). Ayrıca sentezlenen monomer, MALDI-TOF/MS ile karakterize edilmiştir. Sentez reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



Şekil 2. 1. *MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin'in açık yapısı*

2.2.1.2. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon sentezi*

Biotin bağlı kriyojelin sentezi için monomer olarak 75 µL HEMA, çapraz bağlayıcı olarak 14.15 mg MBAAm 897 µL deiyonize su içerisinde çözülmüştür.

1 dk karıştırıldıktan sonra üzerine 288 µL MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin ilave edilmiş ve çözelti 5 dk vakum altında degaze edilmiştir. Serbest radikal polimerizasyonu 1,3 mg APS ve 1,2 µL TEMED ilavesiyle başlatılmış ve APS ilavesinden sonra çözelti 5 dak buz banyosu içerisinde soğutulmuştur. Reaksiyon karışımı TEMED ilave edilerek 1 dk karıştırıldıktan sonra karışım, plastik enjektör (5 mL, id. 0,8 cm) içine dökülmüştür. Şırınga içerisindeki karışım -16 °C'de 18 sa boyunca polimerleştirildikten sonra, donmuş haldeki kriyojel oda sıcaklığında çözülerek 50 mL deiyonize su ile yıkanmıştır (Brugging, 1998).

2.2.2. Karakterizasyon çalışmaları

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmaları için kolonun su tutma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla şişme testi yapılmıştır. Bunun yanı sıra FT-IR analizi ve yüzey morfolojisinin incelenmesi için SEM görüntüleri alınarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. *Şişme testi*

Sentezlenen Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolonun şişme kapasitesi aşağıdaki yöntem izlenerek tespit edilmiştir.

Öncelikle kuru kriyojel ± 0.0001 duyarlıkla tartılmış ve 24 sa boyunca, oda sıcaklığında, 50 mL saf su içerisinde bekletilmiştir. Bir gün sonunda sudan çıkarılan polimerin yüzeyindeki su süzgeç kağıdı yardımı ile alındıktan sonra polimer tekrar tartılmıştır. Polimerin ilk ağırlığı (Wi) ile son ağırlığı (Ws) kaydedilmiş ve Eşitlik 2.1 kullanılarak Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojelin yüzde su tutma kapasitesi hesaplanmıştır (Ws = 2557,6 mg; Wi = 278 mg

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \left[\frac{Ws-Wi}{Wi}\right] \times 100 \qquad (2.1)$$

2.2.2.2. *FT-IR analizi*

FT-IR ile direkt olarak atomik düzeyde bilgiye ulaşılıp, moleküllerde meydana gelen çok küçük değişimler bile tespit edilebilmektedir. Belli moleküller

kızılötesi ışığa maruz kaldıklarında (lipid, protein, karbonhidrat vs.) belirli frekanslarda (cm-1) verdikleri moleküler bağ titreşimi sinyalleriyle karakterize olurlar. Bu sinyaller üzerinden farklı koşullardaki değişim FT-IR analizi ile rahatlıkla izlenebilir.

Eğer örnek katı ise spektroskopik potasyum bromür (KBr) yardımı ile birkaç tonluk basınç altında ince şeffaf bir pellet oluşturularak spektrum alınır. KBr'nin kızılötesi bölgesinde absorpsiyonu olmadığı için kullanılması uygundur.

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin), Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$) 'den ve katı KBr vakum etüvünde 50^{o}C sıcaklığında 18 sa. kurutulmuştur. Numunelerden yaklaşık 0.1-0.2 g kadar tartılarak havanda bir miktar KBr ile öğütülmüştür ve pellet oluşturulmuştur. Her bir numunenin FT-IR spektrumu alınmıştır.

2.2.2.3. *Yüzey morfolojisi*

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$) kriyojelin ve Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) monolitlerinden alınan kesitler altın kaplanmadan önce oda sıcaklığında bir gece boyunca kurutulmuştur. Çapı 5mm ve yüksekliği 10mm olan silindirik olacak şekilde dikkatlice kesilerek SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilmiş ve vakum altında 2 dk süreyle 50 mA'lik bir akımla altın tabakası ile kaplanmıştır. Ardından taramalı elektron mikroskobu ile polimerlerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

2.2.3. Yumurta beyazından Avidin izolasyonu

Avidin saflaştırılması için yumurtanın kolay bulunabilir ve maliyetinin düşük olması nedeniyle yumurta tercih edilmiştir. 1 adet yumurta beyazı, sarısından ayrılarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyon, ultra saf su kullanılarak yapılmıştır.

2.2.4. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon; numunelerin dondurularak kurutma işlemidir. Genel olarak numunelerin temel özelliklerini kaybetmeden, dehidrasyonu için kullanılmaktadır.

Homojenizasyonda kullanılan su, öncelikle numune dondurularak liyofilizasyon sonucu ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylelikle 2 g katı elde edilmiştir. Bu katı materyal 0.1 M CH_3COONa tamponu, pH: 5.5, kullanılarak çözülmüş ve ham ekstrakt +4 ℃'de muhafaza edilmiştir (Green, 1970).

2.2.5. Amonyum Sülfat çöktürmesi

Yumurta beyazından izole edilen Avidin için ham ekstrakt ile Eşitlik 2.2 kullanılarak %60'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapılmış ve protein miktarları belirlenmiştir. Ham ekstrakt proteinler, $(NH_4)_2SO_4$ ile +4 °C'de çöktürülmesi için 16,98 g $(NH_4)_2SO_4$ 47 mL ham ekstrakta yavaş yavaş ilave edilerek 2 sa boyunca +4 °C'de karıştırılmıştır. Oluşan çökelek, 12000 rpm hızda 30 dak boyunca santrifüj edilerek toplanmış ve az bir hacimde 0,1 M CH_3COONa tamponu, pH: 5,5, kullanılarak çözüldükten sonra ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Katı amonyum sülfat miktarı Eşitlik 2.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$(NH_4)_2SO_4 \text{ miktarı (g)} = \frac{1{,}77\ x\ V\ x\ (S_2 - S_1)}{3{,}54 - S_2} \qquad (2.2)$$

2.2.6. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon işlemi yardımıyla düşük molekül ağırlıklı yapılar çözelti ortamından uzaklaştırılırken, büyük moleküllü yapılar ise çözelti ortamında kalmaya devam etmektedir.

Bu işlem için 30.000 Da' luk ultrafiltrasyon tüplerinden yararlanılarak 4000 rpm hızda +4 °C'de santirüfüj işlemi yapılmıştır. Böylece düşük molekül ağırlıklı yapılar ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2.2.7. Proteinin saflaştırılması

Yumurta beyazından izole edilen avidin afinite kromatografisi ile Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır (Şekil 2.2).

Şekil 2. 2. *Bu çalışmada kullanılan FPLC sistemi*

Kolonu yıkama ve numuneyi kolona yükleme çözeltisi olarak içeren 0,1 M sodyum-fosfat tamponu pH:7,5 0,15 M NaCl içeren tampon çözelti kullanılmıştır. Saflaştırılmak istenilen avidini kolon sisteminden tekrar alabilmek amacıyla elüsyon çözeltisi olarak pH: 2,5 olan 0,1 M Glisin- HCl çözeltisi kullanılmıştır. Kriyojeller (5 mL, id. 0,8 cm)' lik hacme sahip plastik enjektörlere hazırlanmıştır. FPLC sisteminde 0,2 $mldk^{-1}$ akış hızında saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolon sistemine 100 µl numune yüklenmiştir. Yükleme çözeltisi 45 dk kolondan geçirilmiştir. Elüsyon çözeltisi ise 30 dk kolon üzerinden geçirilmiştir.

Hazırlanan ekstrakt Avidin proteininin spesifik olarak ilgi gösterdiği Biotini içeren Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon üzerinden hazırlanmış tampon çözelti (pH:7,5 0,15 M NaCl) içeren 0,1 M sodyum-fosfat tamponu ile kolona yüklenmiştir. Avidin proteini, biotine karşı gösterdiği afinite ve moleküler tanıma sonucu kolona tutunmuştur. Daha sonra elüsyon çözeltisi kolondan geçirilmiştir.

2.2.8. Protein içeriği tayini

Yumurta beyazından izole edilen avidin için ham ekstrakt ile % 60'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapılmış ve örneklerin protein miktarları aşağıda özetlenen şekilde belirlenmiştir (Obermeier, 2004).

Bunun için, pH: 7,0 sodyum fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (avidin) içeren örnekler hazırlanmış ve bu örnekler 2-(4-

Hidroksifenilazo) benzoik asit (HABA) çözeltisi ile reaksiyona sokularak 500 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ardından biyotin çözeltisi ilave edilerek 500 nm dalgaboyunda tekrar absorbans değerleri ölçülmüştür.
Farklı derişimlerdeki avidin standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin denkleminden (y=mx+n) yola çıkılarak absorbansı bilinen numunelerin (y) içerdikleri protein miktarı (x) belirlenmiştir.

2.2.9. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi analizleri

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, moleküllere ait dairesel spektrumları belirli dalga boylarında ölçen spektroskopik bir yöntemdir. CD, dairesel polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farktır ve Eşitlik 2.3 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{\text{sol yönlü polarize ışık}} - A(\lambda)_{\text{sağ yönlü polarize ışık}} \quad (2.3)$$

CD spektroskopisi, proteinlerin ikincil yapılarının sıcaklık, pH değişimleri ve ortam koşullarına bağlı olarak değişimleri ve diğer moleküllerle etkileşimini incelemek amacıyla geliştirilmiş olup, makro moleküllerin yapısal, kinetik ve termodinamik özellikleri hakkında bilgi vermektedir. Spektrofotometrik ölçümler, elektronik geçişlerin gözlemlendiği elektromanyetik spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Ölçümler, proteinlerin ikincil yapılarına ait α-heliks, β-katlanmaları ve düzensiz sarmal yapılarının yanı sıra, tersiyer yapılarındaki aromatik grupların da varlığını gösteren bilgiler vermektedir.

CD spektroskopisinin genellikle biyomoleküllere uygulanmasının nedeni, moleküllerin sağa ve sola çevirici kiralitelerinden ileri gelir. Proteinlerin konformasyon değişikliklerinin ifade edilmesinde CD spektroskopisi oldukça önem taşımaktadır. Örneğin, sıcaklık, denatüre edici ajanlar ya da bu ajanların derişimleriyle proteinlerin ikincil yapılarındaki değişiklikleri incelemek amacıyla kullanımı yaygındır (Siligardi, 2010).

Bu çalışmada, yumurta beyazından izole edilen ve Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon ile saflaştırılan avidinin CD spektroskopisi ile ticari avidinin CD spektroskopisi karşılaştırılarak saflaştırma işlemi sonrasında yapısındaki değişim karakterize edilmiştir.

2.2.10. SDS-PAGE analizi

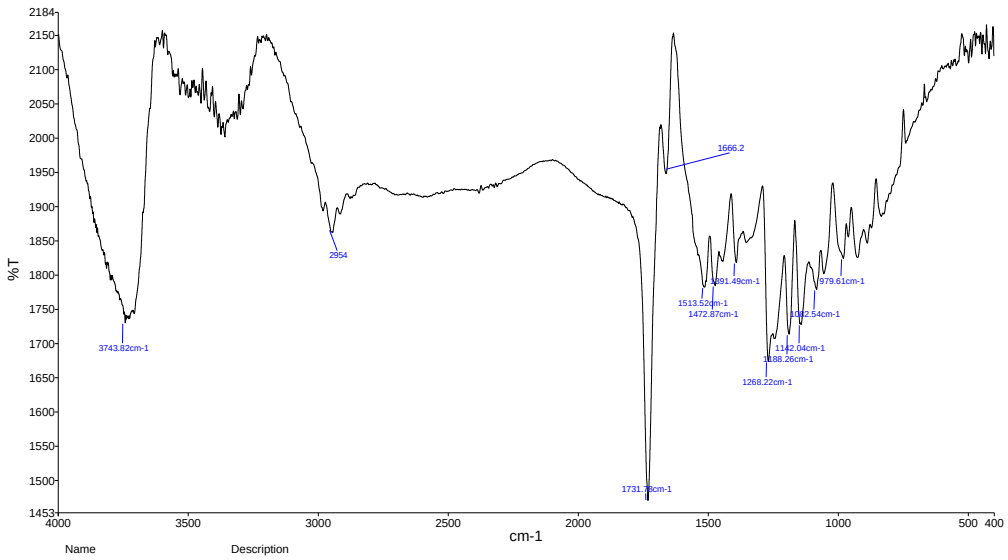
SDS-PAGE analizi için öncelikle 29:1 oranında akrilamid-bis monomerleri ile, TEMED, APS, SDS ve pH 8.8 Tris tamponu kullanılarak % 10' luk poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Analizi yapılacak numunelerden 15' er µL alınarak her biri 15 µL Coomassie Blue G boyası ile karıştırılmış, karışımın homojen bir şekilde olması için numuneler bir süre ısıtılmıştır. Ardından tanka dökülen jelde uygun bir tarak ile eşit hacimde kuyucuklar açılmış, tank tampon çözelti ile doldurulmuş, numuneler açılan kuyucuklar üzerinden jele yüklenmiştir. Protein örneklerinin jelde ilerlemesi için 25-35 mA akım kullanılmıştır. Analiz sonunda tanktan çıkarılan jel önce Coomassie Blue boya çözeltisi içinde bekletilmiş daha sonra proteinlere ait bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla yıkama çözeltisi (35 mL asetik asit + 25 mL metanol) ile yıkanmıştır. Saflaştırılan avidin' in saflığı ve molekül ağırlığı bu örneğe ait ham ekstrakt, amonyum sülfat çöktürmesi, saflaştırma sonrasına ait bant ile ticari avidin' e ait bandın karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

3. BULGULAR

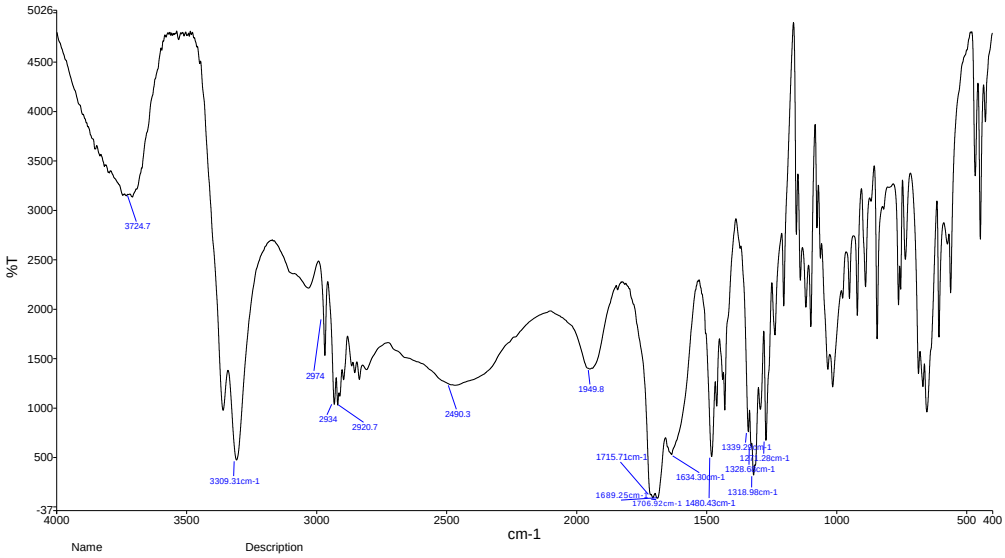
3.1. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu

3.1.1. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojel kolonun FT-IR spektrumu

Sentezlenen kriyojeller öncelikle FT-IR spektroskopisiyle karakterize edilmiştir. Şekil 3.1. (A)' da görüldüğü gibi poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ kriyojelinde (-CO-O-C) fonksiyonel grubundaki 1731 cm^{-1}' de C=O piki, 1142 cm^{-1}' de C-O gerilmesi görülmektedir. 1472 cm^{-1}' de C-H eğilme bandı, 1513 cm^{-1}' de C=C piki görülmektedir. 3743 cm^{-1}' de –OH titreşimleri görülmektedir. poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojeli ise Şekil 3.1. (B)' de olduğu gibi; (-HN-C=O) titreşimindeki 3309 cm^{-1}'de (-NH) ait karakteristik bant, 1715 cm^{-1}' de (-CO-O-C) grubunda bulunan (C=O) karbonil gerilmesine ait karakteristik pik gözlenmektedir. 3724 cm^{-1}'de (-CO-OH) karboksil grubundaki (-OH) hidroksile ait pik görülmektedir. 1318 cm^{-1}'de S=O titreşimleri görülmektedir.Gözlenen bu bantlar biyotinin polimerik kriyojel yapısında bulunduğuna işaret etmektedir.



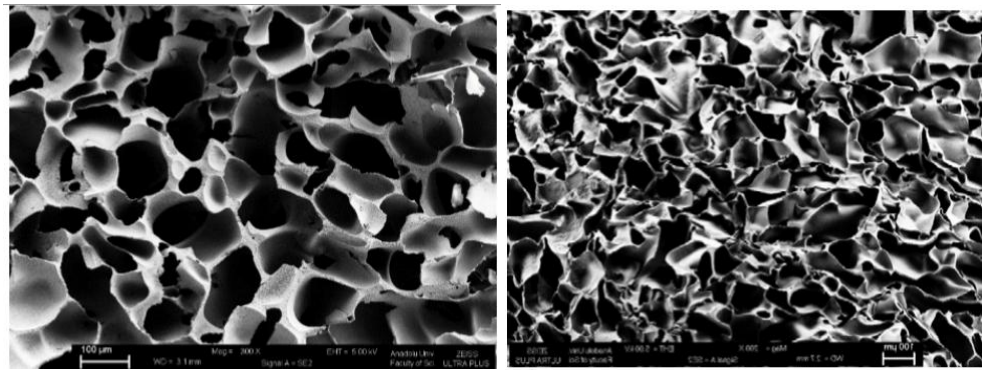
Şekil 3. 1. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ kriyojeline ait FT-IR spektrumu*



Şekil 3. 2. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojeline ait FT-IR spektrumu*

3.1.2. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojelin yüzey morfolojisi

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojelin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.3 'te Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojellerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi kriyojeller 100 µm boyutlarında süper makrogözeneklere sahiptirler. Polimerik yapı oldukça geniş gözeneklere ve bu gözenekler nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Böylece, hareketli fazın sürekli akışını ve avidin molekülünün kolayca geçişini sağlayabilecek kanalların fonksiyonelliği sağlanabilecektir.



(A) (B)

Şekil 3. 3. *(A) Poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü , (B) Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojelin SEM görüntüleri*

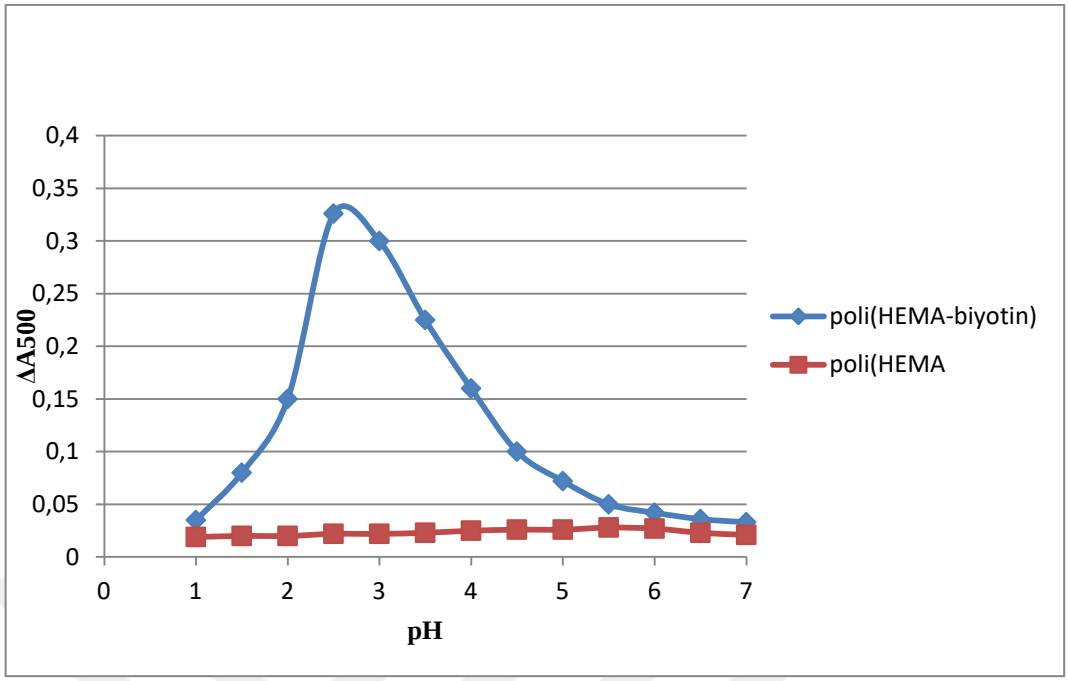
3.1.3. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojel kolonun şişme testi

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ ve Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) hidrofilik özellik gösteren ve çapraz bağlar içeren polimerlerdir. Polimerik yapıda olmaları nedeniyle yüksek molekül ağırlığına sahiptirler ve suda çözünmezler. Ancak çapraz bağ derecesi ile hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alırlar ve şişme özelliği gösterirler. Bu çalışmada sentezlenen Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ kriyojel kolonun su tutma kapasitesi %850 olarak, Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)2-Biotin) kriyojel kolonun su tutma kapasitesi ise % 820 olarak hesaplanmıştır. Yapıya biotin girmesi ile şişme oranının azaldığı gözlenmektedir. Her iki yapı da hidrofilik özellikte olup su tutma kapasiteleri arasındaki fark biotin bağlanmasıyla azalan yüzey alanından kaynaklanmaktadır.

3.1.4. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin kriyojel kolona Avidin bağlanma çalışmaları

3.1.4.1. *pH etkisi*

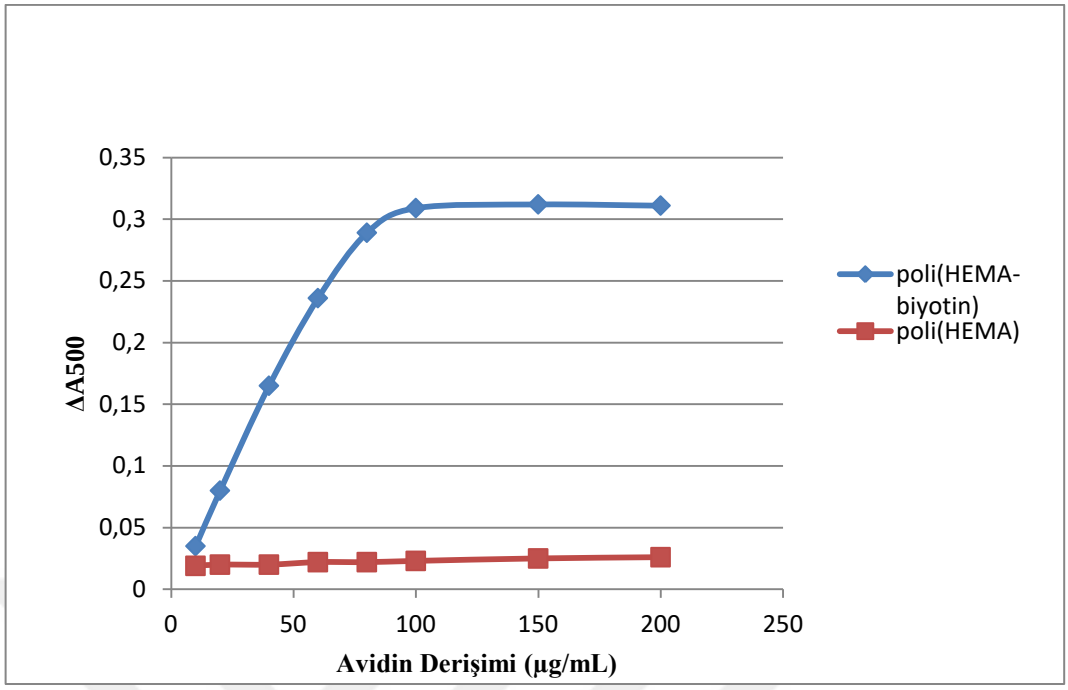
Saflaştırılmak istenilen avidin için en uygun pH'ı saptayabilmek amacıyla çeşitli pH değerleri hem Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$) hem Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kolonlar üzerinde denenmiştir (Şekil 3.4). pH 1 ile 7 arası tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, proteinin farklı absorbanslar verdiği gözlenmiştir. Avidin proteinin elüsyonu için en uygun olan pH 2,5 değerinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. pH 2,5'nin üstünde ve altındaki değerlerde elüe edilememiştir. Kontrol kriyojelinde ise kayda değer bir bağlanma gözlenmemiştir. Çalışmalar için en uygun pH 2,5 olarak seçilmiştir.



Şekil 3. 4. *Avidin elüsyonuna pH' ın etkisi* C_{avidin}*: 80 ppm*

3.1.4.2. *Avidin derişiminin etkisi*

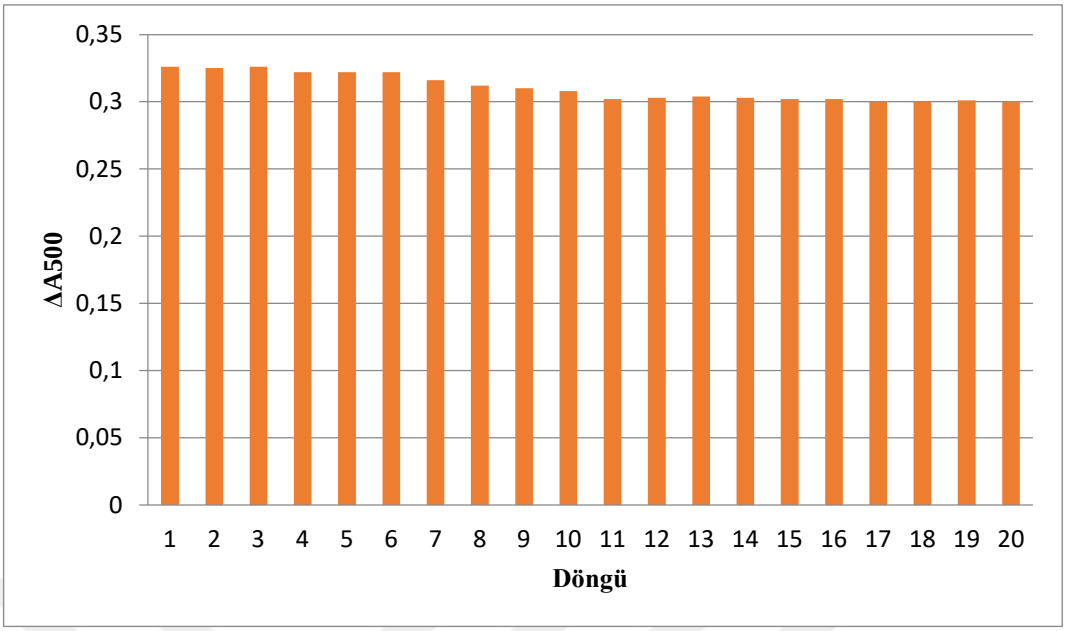
Reaksiyon ortamındaki Avidin derişimi arttıkça bağlanma miktarı da artış gösterecektir. Fakat yüksek Avidin derişiminde proteinin biyotin bağlama bölgesi tamamen doygunluğa ulaşacağı için derişim miktarındaki artış bağlanma üzerinde etki etmez. 10-200 µg/mL aralığındaki derişimlerde hem Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$) hem de Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kolonlar üzerinde denemeler yapılmıştır (Şekil 3.5). Yapılan analizler sonucunda 80 µg/mL Avidin derişiminde maksimum absorbans değişimi gözlenmiş olup, bu nokta itibariyle Avidin derişimi arttıkça bağlanma miktarı değişmemiştir.



Şekil 3. 5. *Avidin derişiminin bağlanma üzerine etkisi pH: 7,0*

3.1.4.3. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin kriyojel kolonların tekrar kullanılabilirliği*

Kolon malzemesinde aranılan önemli özelliklerden biri de, bu malzemenin ayırma ve saflaştırma işlemlerinde defalarca kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kulanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik sonucunda aynı malzeme defalarca kullanılarak analizin maliyeti önemli ölçüde azaltılır. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojellerinin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini test etmek amacıyla Avidin bağlama ve elüsyon döngüsü 20 kez tekrarlanmıştır. Kriyojellerin 20 döngüden sonra bile çok kararlı oldukları görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. *Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği*

3.2. Protein Saflaştırılması

3.2.1. FPLC analizi

Yumurta beyazından izole edilen avidin afinite kromatografisi ile FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde, saflaştırılmak istenen (hedef) proteinin spesifik olarak ilgi gösterdiği uygun bir molekül ligand olarak matrikse tutturulur ve bu proteini içeren numune kolon üzerinden uygun pH' da hazırlanmış tampon çözelti ile birlikte geçirilir. Bu çalışmada proteini bulunduran ekstrakt, avidin proteininin spesifik olarak ilgi gösterdiği biyotini içeren Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolondan geçirilmiştir. Avidin, biotine karşı gösterdiği afinite ve moleküler tanıma sonucu pH:7,5 0,15 M NaCl içeren sodyum-fosfat tamponu ile kolona tutunmuştur.

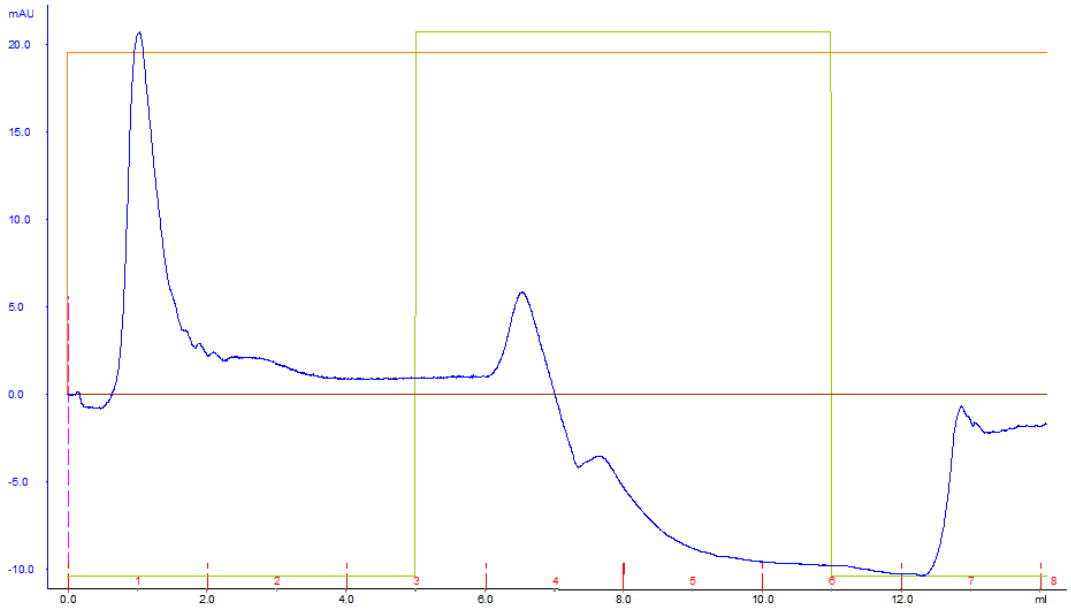
Şekil 3.7' deki kromatogramda görülen ilk pik kolona tutunmadan çıkan türleri göstermektedir. Elüsyon çözeltisi kolondan geçirilmeye başlandıktan sonra ise (yeşil çizgi kolondan geçen elüsyon çözeltisinin (pH:2,5 0,1 M Glisin-HCl) derişimini ifade etmektedir); kolona tersinir ve zayıf bağlarla tutunmuş olan avidin proteini kolondan ayrılır. Kromatogramda görülen, alıkonma zamanı (t_R) 32,5 dk olan ikinci pik ise saflaştırılan avidin proteinine aittir.

Aynı kolona ticari Avidin örneği yüklendiğinde Şekil 3.8' de verilen kromatogram elde edilmiştir. Bu kromatogramda görülen ilk pik hazırlanan kolonun

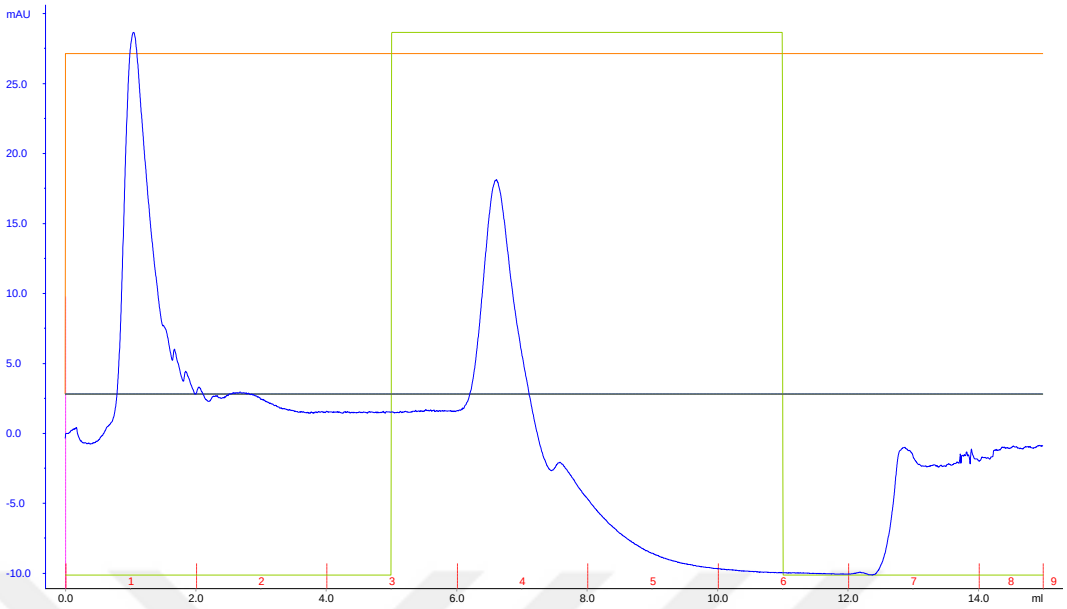
tutma kapasitesine bağlı olarak kolona tutunamadan çıkan avidin proteinlerine aittir. İkinci pik ise elüsyon çözeltisi kolondan geçirilmeye başlandıktan sonra kolona tersinir olarak tutunmuş olan avidin proteinine ait piktir. Elüsyon tamponu olarak pH:2,5 glisin-HCl tamponu kullanıldığından iletkenlik değeri sıfırın altına düşmüştür. Elüsyon tamponunun geçirilmesi durdurulduğunda ise iletkenlik değeri artmıştır. Asidik olarak toplanan numunenin bozulmaması için de toplanan fraksiyonlara 100 μLml^{-1} olacak şekilde 1,0 M pH: 7,0 Tris-HCl tamponu eklenmiştir.

Aynı işlem kontrol amacıyla, biotin içermeyen poli(HEMA) kriyojel kolonu ile de tekrarlanmış, bu kolonların avidin saflaştırmadaki etkinliği incelenmiştir. Bu ayırma işlemlerine ait FPLC kromatogramları Şekil 3.9 'da verilmiştir.

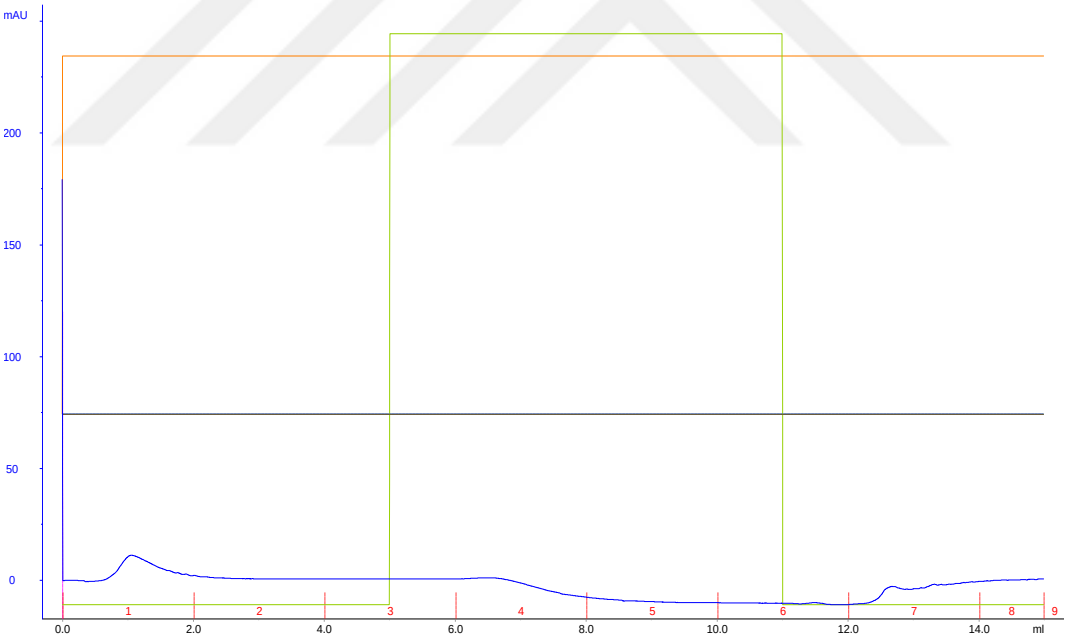
Kromatogramlarda gelen piklerin alıkonma süresi akış hızına bağlı olarak değişmektedir. Kromatogramlarda da görüldüğü gibi hem saflaştırılan avidinin hem de ticari avidinin akış hızları ve kolonların aynı olmasından dolayı alıkonma süreleri de aynıdır ve 32,5 dakikadır.



Şekil 3. 7. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonu ile Avidin saflaştırılmasına ait kromatogram*



Şekil 3. 8. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonuna yüklenen ticari Avidine ait kromatogram*



Şekil 3. 9. *Poli(HEMA) kriyojel kolonuna yüklenen Avidine ait kromatogram*

Avidinin tanı-teşhis için oldukça önemlidir. Avidinin varlığını gözleyebilmek için HRP-Avidin kolon konjugasyon sistemi yardımıyla, Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) bağlı kriyojel kolona avidin-HRP konjugasyonu ilave edilmiştir. HRP'nin substratı olan TMB kolona eklendiğinde ise renk değişimi gözlenmiştir. Bu da bize avidinin kolona tutunduğunu göstermektedir (Şekil 3.10).

Şekil 3. 10. *Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolonuna yüklenen Avidin-HRP konjugasyonu*

Geliştirilen bu kolon sistemi yardımıyla tanı-teşhis için önemli bir yeri olan Avidinin saflaştırılmasında afinite kromatografisi yardımıyla spesifik bir ayırım gerçekleştirilebilmektedir. Seçiciliği çok yüksek olması sebebiyle afinite kromatografisi analizlerde büyük avantaj sağlamaktadır. Biyomoleküller tersinir olarakbağlanmakta ve denatüre olmadan saf bir şekilde elde edilebilmektedir. Ayrıca konjugasyon yardımıyla da gözle görülür bir değişimin olması önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Kolonun kapasite faktörü 5,5 olarak Eşitlik 2.4 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{2.4}$$

t_R: Alıkonma süresi

t_M: Ölü zaman

Kolonun akış hızı sabit olduğundan kapasite faktörü hesaplanmıştır. Kapasite faktörü 1<k'<10 aralığında olduğundan kolonun kapasitesi oldukça iyidir. Akış hızının ve aynı kolon sistemi kullanıldığından avidinin alıkonma süreleri de aynıdır ve 32,5 dakikadır.

Ayrıca kolonun verimliliği de Eşitlik 2.5 yardmıyla hesaplanmıştır.

$$N = 16 \text{ x } (\frac{t_R}{W})^2 \quad (2.5)$$

N: Kolon verimliliği

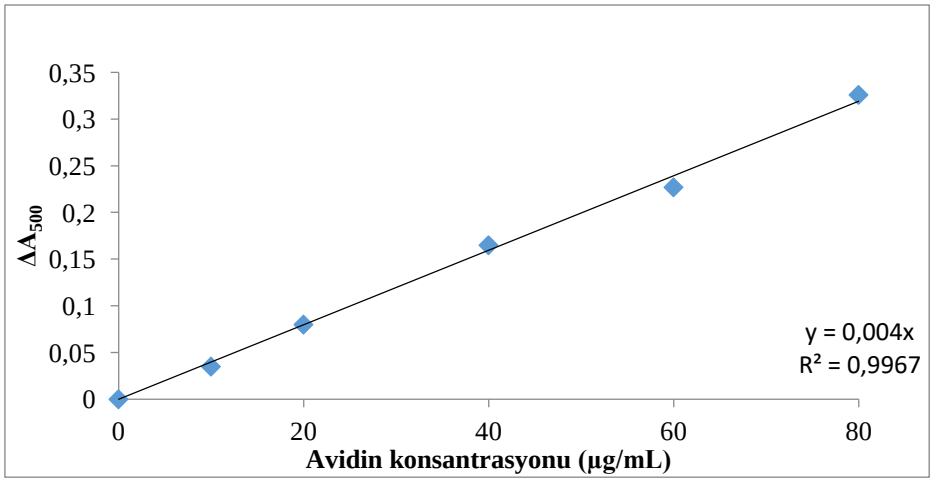
t_R: Alıkonma süresi

W: Pik genişliği

Böylece kolonun verimliliği, 469 olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Saflaştırılan Avidinin protein miktar tayini

Yumurta beyazından izole edilen avidin için ham ekstrakt ile % 60'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapılmış ve örneklerin protein miktarları belirlenmiştir. Bunun için, pH: 7,0 sodyum fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (avidin) içeren örnekler hazırlanmış ve bu örnekler 2-(4-Hidroksifenilazo) benzoik asit (HABA) çözeltisi ile reaksiyona sokularak 500 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ardından biotin çözeltisi ilave edilerek 500 nm dalgaboyunda tekrar absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği (Şekil 3.11) oluşturulmuş ve numunelerin protein içerikleri bu grafiğe göre belirlenmiştir.



Şekil 3. 11. *Standart Avidin kalibrasyon grafiği*

Şekildeki standart avidin kalibrasyon grafiği kullanılarak amonyum sülfat çöktürmesi sonrası Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolonu ile saflaştırılan avidinin miktarı 4,5 µgmL^{-1} olarak belirlenmiştir. Alınan sonuçlar Tablo 3.1' de gösterilmiştir. Saflaştırma basamaklarında elde edilen protein derişimleri

edilmektedir. Protein içeriği ml başına μg avidin olacak şekilde bulunmuştur. Tek bir yumurtadan bile %32 verimle geri kazanım başarılı bir şekilde sağlanmıştır.

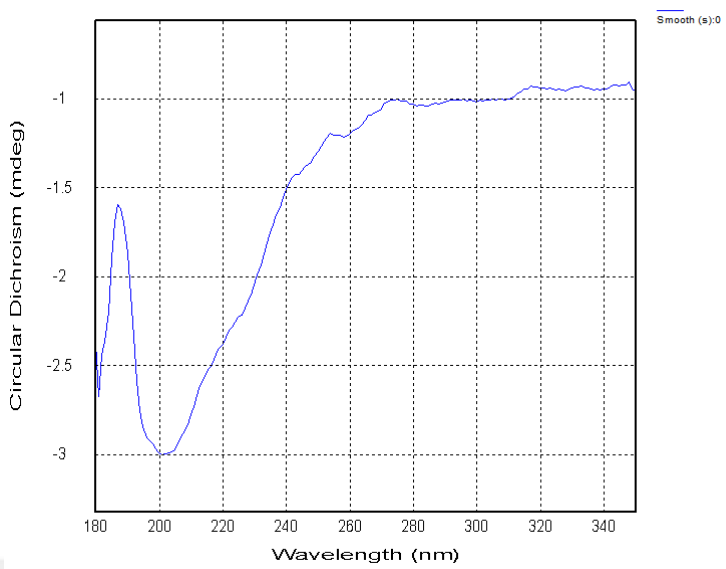
Saflaştırma sonrası Avidin ortamda bulunan diğer moleküllerinden başarılı bir şekilde ayrıldığı için FPLC' den toplanan numunenin protein içeriği ham ekstrakt ve tuz ile çöktürülmüş örneklere göre daha düşüktür.

Tablo 3. 1. *Avidine ait saflaştırma tablosu*

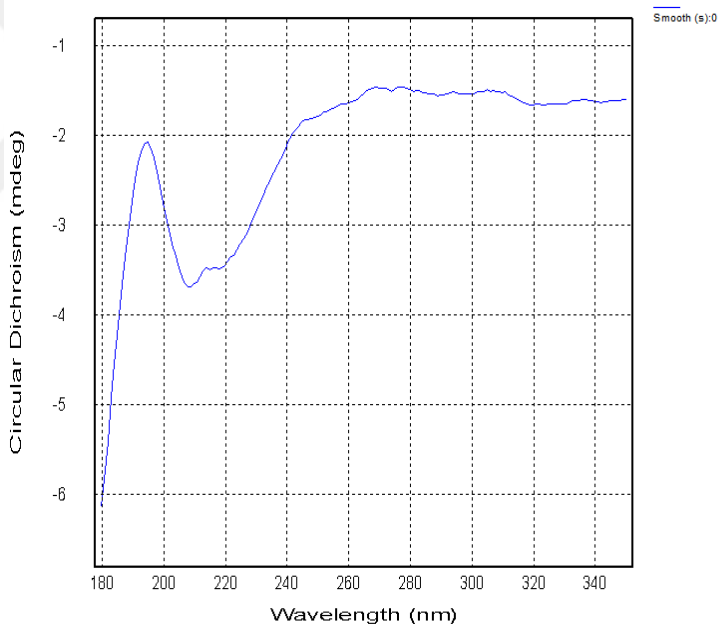
Numune	Avidin (μgmL^{-1})	% Verim
Ham Ekstrakt	10	100
%60 Amonyum Sülfat Çöktürme Sonrası	4,5	45
Poli(HEMA-MAT-Bio) kriyojeli ile saflaştırma sonrası	3,2	32

3.3. CD Spektroskopisi Analizleri

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon kullanılarak yumurta beyazından saflaştırılan avidinin ikincil ve tersiyer yapılarının araştırılması ve ticari avidin ile kıyaslanması amacıyla CD spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Avidin ve ticari avidin proteini için bu analizlerden elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 3.12 ve 3.13' te verilmiştir. Elde edilen spektrumlarda proteinin 190-210 nm dalga boyunda α-heliks yapısına ait pik gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, 210-230 nm dalga boyu aralığında elde edilen zayıf pikler yapıdaki β katlanmalarına işaret etmektedir. Ancak elde edilen bu sonuçlardan saflaştırılan avidinin ikincil yapısında değişimler olduğu görülmüştür. Bu değişim numunenin dondurulup eritilmesi ve spektrum alınması için geçen süre farkından kaynaklanmaktadır. Protein miktar tayini, SDS-PAGE analizi işlemlerin hemen ardından yapıldığı için avidinin yapısındaki bu değişimin çalışmaya olumsuz bir etkisi olmamıştır.



Şekil 3. 12. *Saflaştırılan Avidine ait CD spektrumu*

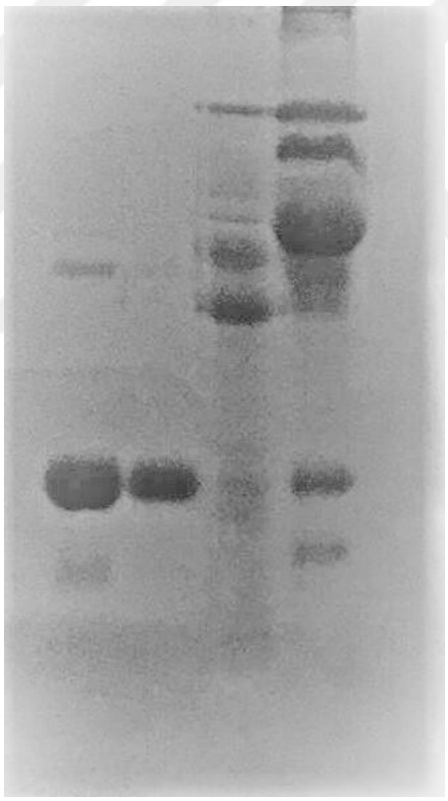


Şekil 3. 13. *Ticari Avidine ait CD spekturumu*

3.4. SDS-PAGE Analizi

Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biotin) kriyojel kolon kullanılarak yumurta beyazından izole edilen avidinin saflığı SDS-PAGE analizi yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, örnek %12' lik poliakrilamid jelde, denatüre edici ajan SDS varlığında basamaklı olarak ham ekstrakt, amonyumsülfat çöktürmesi, saflaştırılan avidin ve ticari

avidin olmak üzere yürütülmüş ve saflaştırılan avidin için tek bir bant gözlenmiştir (Şekil 3.11). Bu bant, ticari avidin proteinine ait bant ile karşılaştırıldığında aynı yerde geldiği gözlenmiştir. Saflaştırılan avidin proteininin molekül ağırlığı ticari avidinin saflığına yakın olduğu anlaşılmıştır. En fazla sayıda bant ham ekstraktta gözlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi kısmi bir saflaştırma gerçekleştirilmiş olup proteinlerin çökmesi sağlanmıştır ve ham ekstrakta göre gözlenen bant sayısında azalma meydana gelmiştir. (Şekil 3.14)' te de 1. Kısımda gözlenen bant ticari avidine, 2. Kısımdaki bant saflaştırılan avidine, 3. Kısımdaki bant amonyum sülfat çöktürmesi ve 4. Kısımdaki bant ise ham ekstrakta ait bantlardır.



1. Ticari avidin
2. Saflaştırılan avidin
3. %60 Amonyum sülfat çöktürmesi
4. Ham ekstrakt

Şekil 3. 14. *SDS-PAGE görüntüsü*

4. YORUM VE SONUÇ

Bu çalışmada, yumurta beyazından avidin proteininin saflaştırılmasına yönelik yeni nesil kriyojel temelli afinite saflaştırma kolonları geliştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, avidin saflaştırılmasında kullanılmak üzere hazırlanan kriyojel kolonlarda monomer olarak HEMA, ligand olarak proteinin spesifik olarak bağlandığı biyotin molekülü seçilerek kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. Böylece biyotinin, çapraz bağlayıcı MBA varlığında HEMA monomeri kriyopolimerizasyonu ile kriyojel afinite kolonu hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojel kolonlar süper makrogözenekli yapıya ve birbiri ile bağlantılı sürekli kanal sistemine sahip oldukları için, kromatografik sistemlerde düşük basınçlarda çalışmaya izin vererek proteinin denatüre olmadan saflaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Hazırlanan poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonunun FT-IR spektrumları incelendiğinde kriyojele ait karakteristik piklerin olduğu ve liganda ait spesifik piklerin bulunduğu gözlenmiştir. Hazırlanan poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonunun denge şişme oranı % 820 olarak bulunmuştur. Poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$ kriyojel kolona ait şişme oranı ise % 850 olarak hesaplanmıştır. Her iki kriyojel de su tutma kapasitesi yüksek olarak tespit edilmiştir. Biotin bağlı kriyojel kolonda yüzel alanının azalmasına bağlı olarak su tutma oranında bir miktar azalma gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında yumurtanın beyazından avidin proteini izole edilmiştir. Literatür bilgilerine göre ise fazla miktarda yumurta kullanarak bu saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Piskarev, 1990). Bu da maliyeti arttıran bir sebeptir. Bu tez kapsamında az miktarda yumurta kullanılarak düşük maliyette avidin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ham ekstrakta ön deriştirme amacıyla % 60’ lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve numunedeki protein içeriği belirlenmiştir fakat başka proteinler de ortamda bulunmaktadır. Tuzla çöktürme sonrası ön deriştirilen numune daha sonra, hazırlanan afinite kolonuna yüklenmiştir. FPLC ile yapılan kromatografik saflaştırma sonucunda avidin proteini belli fraksiyonlarda toplanmıştır. Literatür bilgilerine göre ise elüsyon tamponu olarak Guanidin-HCl (pH: 1,5) kullanılmış olup protein denatüre

olmuştur (Durance, 1988). Elde edilen örneğin geri kazanımı, protein içeriği ve SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir. Saflaştırma işlemi sonucunda 3,2 μg/ml avidin elde edilmiştir. Proteinin %32'lik bir oranla geri kazanımı sağlanmıştır. Tek bir yumurtadan bile uygun saflaştırma yöntemi kullanılarak proteinin geri kazanımı sağlanmıştır. Ticari ve saflaştırılan avidinin CD spektrumları incelendiğinde avidinin saflaştırma sonrasında yapısında değişim olduğu gözlenmiştir. Bu sonucun dondurulup eritmeden kaynaklandığı ve spektrum alınasıya kadar geçen süreden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak yapı α Heliks yapısını korumaktadır ve işlevselliği devam etmektedir. CD analizi son aşamalarda yapıldığından yapının değişmesi diğer analizler için olumsuz bir duruma sebep olmamıştır. Ayrıca, kolona yüklenen avidin-HRP konjugasyonu sonucunda, HRP'nin substratı olan TMB kolona eklendiğinde renk değişimi gözlenmiş, renk şeffaftan maviye dönmüştür. Bu sonuç da avidinin hazırlanan kriyojel kolona etkin bir şekilde tutunduğuna işaret etmiştir. Daha sonra avidinin alıkonma süresine bakılmıştır. Kromatogramlarda gelen piklerin alıkonma süresi akış hızına bağlı olarak değişmektedir. Hem saflaştırılan avidinin hem de ticari avidinin akış hızları ve kolonların aynı olmasından dolayı alıkonma süreleri de aynıdır ve 32,5 dakika olarak tespit edilmiştir. Kolonun akış hızı sabit olduğundan kapasite faktörü hesaplanabilmiştir. Kapasite faktörü 5,5 olarak bulunmuştur ve $1< k' <10$ aralığında olduğundan kolonun kapasite faktörü oldukça iyidir. Literatürde olmayan ve bu tez kapsamında geliştirilen yeni nesil biyotin tabanlı kriyojel kolon üzerinde kapasite faktörü ilk kez çalışılmıştır. Ayrıca kolonun verimliliği 469 olarak hesaplanmıştır ve sentez kolonlarına göre verimliliği oldukça iyidir (Sepaniak, 1987)

Proteinlerin saflaştırılması işleminde bir ard arda ayırma metodu yer almaktadır. Saflaştırma işleminin mümkün olduğu kadar az aşamada ve kısa sürede gerçekleştirilmesi, işlemin maliyeti açısından önemlidir. Ayrıca işlem sırasında gerçekleşen ürün kayıplarını da en aza indirmektedir. Bu yüzden, saflaştırma işleminde ürün özelliklerini göz önünde bulundurarak en etkili ve verimli ayırma yöntemini seçmek gerekmektedir. Bu tez kapsamında da bu amaçla en uygun saflaştırma yöntemi seçilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Afinite kromatografisinin spesifik ve tersinir bağlanma özelliğinden yararlanılarak

saflaştırma tablosunda da görüldüğü gibi madde kaybı en az olabilecek şekilde saflaştırma basamakları gerçekleştirilmiştir. Literatür bilgilerine göre, avidinin kısmen saflaştırılması sağlanmıştır. Bunun için de en uygun yöntem olarak iyon değişim kromatografisi görülmüştür (Durance, 1988).

SDS-PAGE analizi sonucunda jelde ham ekstrakt, amonyum sülfat çöktürmesi, saflaştırılan avidin ve ticari avidine ait bantlar gözlenmiştir. Bu da bize proteinin hazırlanan poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel afinite kolonu kullanılarak başarılı bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir. Literatür bilgilerine göre ise avidin saflaştırılması yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılmış olup saflaştırılan kısımda başka bantlara da rastlanmıştır (Piskarev, 1990).

Bununla birlikte kriyojel kolonlardan avidin elüsyonun, maksimum bağlanmanın tespiti için optimizasyon çalışmaları ve tekrar kullanılabilirlik testleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonlardan avidin elüsyonu için pH 2.5 değerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucu 80 μg/mL avidin derişiminde maksimum absorbans değişimi gözlenmiş, bu derişim değerinden sonra avidin derişimi arttıkça bağlanmada bir değişim gözlenmemiştir. Hazırlanan poli(HEMA-ko-MATrp-Ru(bipyr)$_2$-Biyotin) kriyojel kolonların tekrar kullanılabilirliğini test etmek amacıyla (Strept)avidin bağlama ve elüsyon döngüsü 20 kez tekrarlanmıştır. Kriyojellerin 20 döngüden sonra bile çok kararlı oldukları görülmüştür. Böylelikle aynı malzeme defalarca kullanılarak analizin maliyeti önemli ölçüde azaltılmaktadır.

Sonuç olarak, literatürde yer almayan ve ilk kez bu tez çalışması kapsamında avidin proteininin saflaştırılmasına yönelik yeni nesil kriyojel temelli afinite kolonları patentli ANADOLUCA tekniği ile geliştirilmiş ve etkin bir şekilde Avidin saflaştırmasında kullanılmıştır.

KAYNAKÇA

Airenne, K. J., Oker-Blom, C., Marjomäki, V. S., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Kulomaa, M. S. (1997). *Production of biologically active recombinant avidin in baculovirus-infected insect cells. Protein expression and purification*, 9(1), 100-108.

Argarana, C. E., Kuntz, I. D., Birken, S., Axel, R., & Cantor, C. R. (1986). *Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. Nucleic acids research*, 14(4), 1871-1882.

Arnold, F. H. (1991). *Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing*. Nature biotechnology, 9(2), 151.

Attwood, P. V. (1995). *The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase*. The international journal of biochemistry & cell biology, 27(3), 231-249.

Biçen, Ö. (2009). *Moleküler Baskılanmış Polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Bingöl, D., Canbazoğlu, M., & Aydoğan, S. (2005). *Dissolution kinetics of malachite in ammonia/ammonium carbonate leaching*. Hydrometallurgy, 76(1-2), 55-62.

Bruggink, A., Roos, E. C., & de Vroom, E. (1998). *Penicillin acylase in the industrial production of β-lactam antibiotics*. *Organic process research & development*, *2*(2), 128-133..

Cabrera, K. (2004). J. Sep. Sci., 27, 843-852.

Campbell, C. J., & Laherrère, J. H. (1998). *The end of cheap oil*. Scientific American, 278(3), 78-83.

Cazin Jr, J., Suter, M., & Butler, J. E. (1988). P*roduction of streptavidin in a synthetic medium*. Journal of immunological methods, 113(1), 75-81.

Chapman-Smith, A., & Cronan Jr, J. E. (1999). *Molecular biology of biotin attachment to proteins.* The Journal of nutrition, 129(2), 477S-484S.

Chivers, C. E., Crozat, E., Chu, C., Moy, V. T., Sherratt, D. J., & Howarth, M. (2010). *A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability*. *Nature methods*, *7*(5), 391-393.

Collot, J., Gradinaru, J., Humbert, N., Skander, M., Zocchi, A., & Ward, T. R. (2003). *Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis based on biotin− avidin*. Journal of the American Chemical Society, 125(30), 9030-9031.

Conn, H. O., & Blitzer, B. L. (1976). *Nonassociation of adrenocorticosteroid therapy and peptic ulcer*. New England Journal of Medicine, 294(9), 473-479.

Cutler, P. (1996). *Affinity chromatography*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) (Vol. 59).

Çekmen, M. B., Türköz, Y., Turgut, M., & Gözükara, E. M. (1997). *Lipoprotein (a): Genel bir bakış ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi.* Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 4(4).

Çimen, D., & Denizli, A. (2012). *Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. Colloids and Surfaces B:* Biointerfaces, 93, 29–35.

Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Kumar, A., Plieva, F. M., & Mattiasson, B. (2007). *Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels*. In Cell Separation (pp. 101-127). Springer, Berlin, Heidelberg.

Daoud-Attieh, M., Chaib, H., Armutcu, C., Uzun, L., Elkak, A., & Denizli, A. (2013). *Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels*. Separation and Purification Technology, 118, 816-822.

DeLange, R. J., & Smith, E. L. (1971). *Histones: structure and function*. Annual review of biochemistry, 40(1), 279-314.

Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., ... & Jaeger, K. E. (2006). *Novel biocatalysts for white biotechnology*. Biotechnology journal, 1(7-8), 777-786.

Durance, T. D., & Nakai, S. (1988). Purification of avidin by cation exchange, gel filtration, metal chelate interaction and hydrophobic interaction chromatography. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, *21*(3), 279-286.

Engvall, E., Jonsson, K., & Perlmann, P. (1971). *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Str

Ersoz, A., Hur, D., Yilmaz, F., Denizli, A., Ozcan, A. A., Diltemiz, S. E., ... & Saka, G. (2011). U.S. Patent Application No. 13/203,833.

Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). *Isolation of lipase producing Bacillus sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity.* Journal of Hazardous Materials, 149(3), 720–724.

Giuliano Siligardi, Rohanah Hussain.(2010). *Applications of Circular Dichroism*. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry 9-14.

Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G. M., Baird, A., & Böhlent, P. (1984). Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(22), 6963-6967.

Gözükara, E.M., (1997), Biyokimya (Cilt 1 ve Cilt 2), İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, Üçüncü Baskı.

Green, N. M. (1963). *Avidin. 4. Stability at extremes of pH and dissociation into sub-units by guanidine hydrochloride.* Biochemical Journal, 89(3), 609.

Green, N. M., & Toms, E. J. (1970). *Purification and crystallization of avidin.* Biochemical Journal, 118(1), 67-70.

Greenfield, N. J. (1999). *Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 18(4), 236-244.

Gürdöl, F., Ademoğlu, E., (2006), Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. ISBN: 975-420-462-4.

Harvey, R. A. (2007). Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins.

Henriksen, M. L., Madsen, K. L., Skjoedt, K., & Hansen, S. (2014). *Calcium-sensitive immunoaffinity chromatography: Gentle and highly specific retrieval of a scarce plasma antigen, collectin-LK (CL-LK). Journal of immunological methods*, *413*, 25-31.

Howarth, M., Chinnapen, D. J., Gerrow, K., Dorrestein, P. C., Grandy, M. R., Kelleher, N. L., ... & Ting, A. Y. (2006). *A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site*. Nature methods, 3(4), 267.

Hytönen, V. P., Määttä, J. A., Nyholm, T. K., Livnah, O., Eisenberg-Domovich, Y., Hyre, D., ... & Kulomaa, T. (2005). *Design and construction of highly stable,*

protease-resistant chimeric avidins. Journal of Biological Chemistry, 280(11), 10228-10233.

Janson, J. C. (Ed.). (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications* (Vol. 151). John Wiley & Sons. (tarih yok).

Jávorfi, T., Hussain, R., Myatt, D., & Siligardi, G. (2010). *Measuring circular dichroism in a capillary cell using the b23 synchrotron radiation CD beamline at diamond light source*. Chirality, 22(1E).

Johnson, W., & Makame, Y. M. M. (2012). *Activity of enzyme trypsin immobilized onto macroporous poly (epoxy-acrylamide) cryogel.* Tanzania Journal of Science, 38(3), 54-64.

Keçili, R., Say, R., & Yavuz, H. (2006). *Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification*. International journal of biological macromolecules, 39(4-5), 250-255.

Kılıç, N., Ankara, Palme Yayıncılık, Üçüncü Baskıdan Çeviri 2005, ISBN:1-57259-931-6.

Knowles, J. R. (1989). *The mechanism of biotin-dependent enzymes*. Annual review of biochemistry, 58(1), 195-221.

Kolankaya N. *Biyoteknolojiye Bir Bakış: Dünya ve Türkiye, "Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik*" Sempozyum Bildirileri Kitabı, T.C. Çevre Bakanlığı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Biyoteknoloji Derneği Ortak Yayını-Ankara. (2000) 1–6.

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 256(5517), 495.

Kunnas, T. A., Wallén, M. J., & Kulomaa, M. S. (1993). *Induction of chicken avidin and related mRNAs after bacterial infection*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1216(3), 441-445.

Laitinen, O. H., Hytönen, V. P., Nordlund, H. R., & Kulomaa, M. S. (2006). *Genetically engineered avidins and streptavidins*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 63(24), 2992-3017.

Laitinen, O. H., Nordlund, H. R., Hytönen, V. P., and Kulomaa, M. S. (2007) *Brave new (strept)avidins in biotechnology.* Trends Biotechnol. 25, 269–277.

Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Sussman, J. L. (1993). *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(11), 5076-5080.

Lozinsky, V. I. (2002). *Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application*. Russian Chemical Reviews, 71(6), 489-511.

Määttä, J.A.; Eisenberg-Domovich, Y.; Nordlund, H.R.; Hayouka, R.; Kulomaa, M.S.; Livnah, O.; Hytönen, V.P. *Chimeric avidin shows stability against harsh chemical conditions—biochemical analysis and 3D structure*. Biotechnol. Bioeng. 2011, 108, 481–490.

Magdeldin, S., Moser, A. (2012). *"Affinity Chromatography: Principles and Applications," Affinity Chromatography*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0325-7, 3-28.

Manger, I. D., Wong, S. Y. C., Rademacher, T. W., & Dwek, R. A. (1992). *Synthesis of 1-N-glycyl. beta.-oligosaccharide derivatives. Reactivity of Lens culinaris lectin with a fluorescent labeled streptavidin pseudoglycoprotein and immobilized neoglycolipid.* Biochemistry, 31(44), 10733-10740.

Marttila, A. T., Airenne, K. J., Laitinen, O. H., Kulik, T., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Kulomaa, M. S. (1998). *Engineering of chicken avidin: a progressive series of reduced charge mutants*. FEBS letters, 441(2), 313-317.

Melamed, N. T. (1963). *Optical properties of powders. Part I. Optical absorption coefficients and the absolute value of the diffuse reflectance.* Part II. Properties of luminescent powders. Journal of Applied Physics, 34(3), 560-570.

Montgomery, S., Lucotte, M., & Cournoyer, L. (2000). *The use of stable carbon isotopes to evaluate the importance of fine suspended particulate matter in the transfer of methylmercury to biota in boreal flooded environments*. Science of the Total Environme.

Obermeier, W., Schloessmann, T., & Wedekind, F. (2004). *Purification of Biotinylated Enzymes Using Streptavidin Mutein Matrix.* BIOCHEMICA-MANNHEIM-, (1), 22-26.

Pauling, L., Corey, R. B., & Branson, H. R. (1951). T*he structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 37(4), 205-211.

Peoples, M. C., Phillips, T. M., & Karnes, H. T. (2007). *A capillary-based microfluidic instrument suitable for immunoaffinity chromatography*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 848(2), 200–207.

Peoples, M. C., Phillips, T. M., & Karnes, H. T. (2007). *A capillary-based microfluidic instrument suitable for immunoaffinity chromatography*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 848(2), 200–207.

Piskarev, V. E., Shuster, A. M., Gabibov, A. G., & Rabinkov, A. G. (1990). A novel preparative method for the isolation of avidin and riboflavin-binding glycoprotein from chicken egg-white by the use of high-performance liquid chromatography. *Biochemical Journal*, *265*(1), 301-304.

Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., & Mattiasson, B. (2008). *Cryogel applications in microbiology*. Trends in microbiology, 16(11), 543-551.

Ramsden, J. (2013). Applied nanotechnology: the conversion of research results to products. William Andrew.

Sano, T., & Cantor, C. R. (1990). *Expression of a cloned streptavidin gene in Escherichia coli.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(1), 142-146.

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). *Purification strategies for microbial lipases*. Journal of Microbiological Methods, 52(1), 1–18.

Say, R., Cinar, E., Unluer, O. B., & Ersoz, A. (2017). *Resuable Pectinase Nano Polymeric Particles*. Journal of Proteomics & Enzymology, 2014.

Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., & Ersöz, A. (2011). *A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase*. Process Biochemistry, 46(8), 1688-1692.

Sepaniak, M. J., & Cole, R. O. (1987). Column efficiency in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytical Chemistry*, *59*(3), 472-476.

Şengel, B. Ş. (2007). *Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşullarının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tekman, Ş., Öner, N., (1981), Ankara, Genel Biyokimya, İstanbul Üniversitesi yayınları No. 2810, Eczacılık Fakültesi No. 30, Üçüncü Baskı. İstanbul.

Thompson, R. C., Eakin, R. E., & Williams, R. J. (1941). *The extraction of biotin from tissues*. Science (Washington), 94, 589-590.

Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R. M., & Chemnitius, G. C. (2001). *Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients*. Clinica Chimica Acta, 312(1-2), 129–134.

Turková, J., & Seifertova, A. (1978). *Affinity chromtography of proteases on hydroxyalkyl methacrylate gels with covalently attached inhibitors*. Journal of Chromatography A, 148(1), 293-297.

Tüzmen, N., Kalburcu, T., & Denizli, A. (2012). *Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels.* Process Biochemistry, 47(1), 26–33.

Tüzün, C., (1992), Biyokimya, Ankara, Palme Yayınları, İkinci Baskı, Tıp Serisi: 111.

Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). *Affinity chromatography: general methods*. In Methods in enzymology (Vol. 463, pp. 417-438). Academic Press.

Van Ginkel, M. F., Van der Voet, G. B., Van Eijk, H. G., & De Wolff, F. A. (1990). *Aluminium binding to serum constituents: a role for transferrin and for citrate*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 28(7), 459-464.

Wallén, M. J., Laukkanen, M. O., & Kulomaa, M. S. (1995). *Cloning and sequencing of the chicken egg-white avidin-encoding gene and its relationship with the avidin-related genes Avrl-Avr5*. Gene, 161(2), 205-209.

Ward, W., & Swiatek, G. (2009). *Protein Purification*. Current Analytical Chemistry, 5(2), 85–105.

Wei, R.-D.; Wright, L.D. *Heat Stability of Avidin and Avidin-Biotin Complex and Influence of Ionic Strength on Affinity of Avidin for Biotin.* Exp. Biol. Med. 1964, 117, 341–344.

White Jr, J. F., & Bultman, T. L. (1987). *Endophyte-host associations in forage grasses*. VIII. Heterothallism in Epichloë typhina. American Journal of Botany, 1716-1721.

Wilchek, M., & Miron, T. (1999). *Thirty years of affinity chromatography*. Reactive and Functional Polymers, 41(1), 263–268.

Wilchek, M., Bayer, E. A., & Livnah, O. (2006). *Essentials of biorecognition: The (strept) avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction*. Immunology letters, 103(1), 27-32.

Wilchek, M., & Bayer, E. A. (1990). [2] *Introduction to avidin-biotin technology. In Methods in enzymology* (Vol. 184, pp. 5-13). Academic Press.

Yadav, S., Devi, R., Bhar, P., Singhla, S., & Pundir, C. S. (2012). *Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine.* Enzyme and microbial technology, 50(4-5), 247-254.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevgi DAĞDAŞ

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : Mersin / 1990

E-Posta : smil@anadolu.edu.tr

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2014, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya

Yayınları:

- Mil, S. 2018. Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase. Adsorption Science & Technology, 36(3-4), 1199-1212.

Ödülleri:

- Anadolu Üniversitesi Uygulama Projeleri Sunum Etkinliği İkinciliği

Kuruluş Üyelikleri:

- 2014, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Kulübü, Eskişehir