

**PROTEİN G SAFLAŞTIRILMASI İÇİN  
BİYOKROMATOĞRAFI  
MATERYALI GELİŞTİRİLMESİ**

Umut ÇELİKOĞLU  
Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı  
Haziran 2015

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Umut Çelikoğlu'nun "Protein G Saflaştırılması İçin Biyokromatografi Materyali Geliştirilmesi" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 11.06.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	.....
Üye	Prof. Dr. Rıdvan SAY	.....
Üye	Doç. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Protein G Saflaştırılması İçin Biyokromatografi Materyali Geliştirilmesi

Umut ÇELİKOĞLU

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ  
2015, 51 sayfa

Bu çalışmada Streptokokal Protein G saflaştırılmasına yönelik IgG bağlı makro gözenekli kriyojel kolon dolgu materyali geliştirilmiş ve bu kolon dolgu materyalinin Protein G saflaştırılmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla; çalışmanın ilk aşamasında fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomeri, bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum(II) kullanılarak ANADOLUCA metoduna göre poli(HEMA-ko-IgG) makro gözenekli kriyojel sentezlenmiştir. Sentezlenen kolon dolgu materyali, şişme testi, SEM ve FT-IR analizleri ile karakterize edilmiştir. Poli(HEMA-ko-IgG)'nin bağlama kapasitesi çalışmaları rekombinat Protein G kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; gerçek numune ile kolonun etkinliği incelenmiştir. Bu amaçla *Streptococcus equi* bakterisi kültüre edilmiş, hücre duvarı parçalanmış ve uygun ön deriştirme işlemlerinden sonra poli(HEMA-ko-IgG) kriyojeli kullanılarak Protein G saflaştırılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında ise saflaştırılmış Protein G'nin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak molekül ağırlığı ve saflığı kontrol edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Protein G, Fotosensitif Amino Asit Monomeri, Kriyojel, Protein Saflaştırma

**ABSTRACT**  
**Master of Science Thesis**  
**Development of Biochromatography Material for Protein G Purification**  
**Umut ÇELİKOĞLU**

**Anadolu University**  
**Graduate School of Sciences**  
**Chemistry Program**

**Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**  
**2015, 51 pages**

In this study, IgG-bound macroporous cryogel column packing material has been developed and the effectiveness of this column packing material has been evaluated for Protein G purification from *Streptococcus*. For this purpose, in the first phase of the study, macroporous poly(HEMA-co-IgG) cryogel have been synthesized by using photosensitive ruthenium-based amino acid monomer, bis(2,2'-bipyridil)MATrp-MATrp-ruthenium(II), according to ANADOLUCA method. Characterization of the prepared cryogel columns has been carried out by swelling tests, SEM and FT-IR analyses. The binding capacity studies for poly(HEMA-co-IgG) have been performed using recombinant Protein G.

In the second step of the study, the efficacy of column has been investigated for real samples. For this purpose, *Streptococcus equi* bacteria has been cultured, the cell wall has been broken and then, Protein G has been purified using poly(HEMA-co-IgG) cryogel after the appropriate pre-concentration process.

In the final step of the study, the molecular weight and purity of purified Protein G have been determined using SDS-PAGE method.

**Keywords:** Protein G, Photosensitive Amino Acid Monomer, Cryogel, Protein Purification

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, birçok konuda etkin bir şekilde çalışmama olanak sağlayan, bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Çalışmalarım süresince desteğini, değerli fikirlerini ve yardımlarını eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Tez çalışmam süresince destekleriyle hep yanımda olan Sayın Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e

Her anımda her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Uzm. Dr. Rüstem KEÇİLİ'ye

Deneysel çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan değerli arkadaşım Sayın Sevgi MİL'e

Maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Ailem'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen TÜBİTAK'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Umut ÇELİKOĞLU

Haziran 2015

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	x

<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Bakteriyel Membran Proteinleri .....	2
1.2. Immünglobulinlerin Fc Bölgesine Bağlanan Proteinler .....	3
1.3. Streptokoklar ve Streptokokkal Protein G .....	4
1.4. Protein Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler .....	8
1.4.1. Çöktürme.....	8
1.4.2. Ultrafiltrasyon.....	9
1.4.3. İyon değiş-tokuş kromatografisi.....	9
1.4.4. Kuru formda Sephadex G-25 ilavesi.....	10
1.4.5. Diyaliz ve liyofilizasyon.....	10
1.4.6. Jel filtrasyon kromatografisi.....	11
1.4.7. Afinite kromatografisi.....	12
1.4.8. ANADOLUCA metodu.....	13
1.5. Kriyojel.....	14
1.5.1. Biyoayırma için kriyojeller.....	15
1.5.2. Kriyojellerin karakterizasyonları .....	16
1.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS PAGE) .....	17

<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>19</b>
2.1. Materyal.....	19
2.2. Poli(HEMA-ko-IgG) Sentezi.....	20
2.2.1. N-metakriloil-L-triptofan sentezi (MA-Trp).....	20
2.2.2. Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomeri bis(2,2'-bipiridil) MATrp-MATrp-rutenyum (II) sentezi.....	20
2.2.3. Kriyojelin hazırlanması.....	21
2.3. Kriyojelin Karakterizasyonu.....	22
2.3.1. Şişme testi.....	22
2.3.2. Elektron mikroskobu ile yüzey morfolojisinin incelenmesi.....	23
2.3.3. FT-IR spektroskopisi.....	23
2.3.4. Yüzey alanı ölçümü.....	23
2.4. Adsorbsiyon Çalışmaları.....	24
2.4.1. Protein G standart grafiğinin hazırlanması.....	24
2.4.2. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine derişim etkisi.....	24
2.4.3. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine pH etkisi.....	25
2.4.4. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirlik çalışması.....	25
2.5. Poli(HEMA-ko-IgG) ile <i>S. equi</i> 'den Protein G saflaştırılması.....	25
2.5.1. <i>S. equi</i> 'nin kültüre edilmesi.....	25
2.5.2. <i>S. equi</i> 'nin parçalanması.....	26
2.5.3. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	26
2.5.4. Sephadex G-25 kromatografisi.....	27
2.5.5. Sephadex G-100 kromatografisi.....	28
2.5.6. Poli(HEMA-ko-IgG) afinite kromatografisi.....	29

2.5.7. Protein tayini.....	29
2.5.8. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	30
2.5.9. Aglütinasyon testi.....	31
<b>3. BULGULAR</b>	<b>32</b>
3.1. Poli(HEMA-ko-IgG) Sentezi.....	32
3.1.1. N-metakriloil-L-triptofan karakterizasyonu.....	32
3.1.2. Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomeri bis(2,2'- bipiridil)MATrp-MATrp-ruthenium (II) karakterizasyonu.....	32
3.2. Kriyojelin karakterizasyonu.....	33
3.2.1. Şişme testi.....	33
3.2.2. Elektron mikroskobu ile yüzey morfolojisinin incelenmesi .....	33
3.2.3. FT-IR spektroskopisi.....	34
3.2.4. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelinin yüzey alanı ölçümü.....	35
3.3. Adsorbsiyon Çalışmaları .....	35
3.3.1. Protein G standart grafiği.....	35
3.3.2. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine derişim etkisi.....	36
3.3.3. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine pH etkisi .....	37
3.3.4. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun tekrar kullanabilirlik çalışması	38
3.4. Poli(HEMA-ko-IgG) ile <i>S. equi</i> 'den Protein G saflaştırılması.....	39
3.4.1. <i>S. equi</i> 'nin kültüre edilmesi.....	39
3.4.2. <i>S. equi</i> 'nin parçalanması.....	40
3.4.3. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	40
3.4.4. Sephadex G-25 kromatografisi.....	41
3.4.5. Sephadex G-100 kromatografisi.....	41



3.4.6. Poli(HEMA-ko-IgG) afinite Kromatografisi.....	42
3.4.7. Protein tayini.....	42
3.4.8. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	42
3.4.9. Aglütinasyon testi.....	43
<b>4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>47</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gram pozitif ve Gram negatif hücre duvarı.....	2
Şekil 1.2. IgG yapısı.....	3
Şekil 1.3. <i>Streptococcus sp.</i> hücre yüzeyinde altın işaretli insan serum albümin elektron mikroskobu görüntüsü.....	3
Şekil 1.4. <i>Streptococcus sp.</i> mikroskobik görünüş .....	5
Şekil 1.5. Protein G ve Protein A'nın yapısı.....	6
Şekil 1.6. Jel filtrasyon Kromatografisi.....	12
Şekil 2.1. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolon.....	21
Şekil 2.2. Kriyojel şişme testi. ....	22
Şekil 2.3. Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu .....	23
Şekil 2.4. Peristaltik pompa ile sürekli sistem .....	24
Şekil 2.5. Columbia broth kültür ortamı.....	26
Şekil 2.6. Sephadex G-25 kolon sistemi. ....	28
Şekil 2.7. Sephadex G-100 kolon sistemi .....	29
Şekil 3.1. (A) ve (B) Poli(HEMA) kriyojeline ait SEM görüntüleri .....	34
Şekil 3.2. (A) ve (B) Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojeline ait SEM görüntüsü... ..	34
Şekil 3.3. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel numunesine ait FT-IR spektrumu .....	35
Şekil 3.4. Protein G standart grafiği.....	36
Şekil 3.5. Derişim-Protein G bağlama kapasitesi ilişkisi.....	37
Şekil 3.6. pH-Bağlama kapasitesi (%) ilişkisi .....	38
Şekil 3.7. Tekrarlanabilirlik-Bağlama kapasitesi ilişkisi .....	39
Şekil 3.8. Bakteri üreme grafiği .....	40
Şekil 3.9. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatogramı .....	41
Şekil 3.10. Bovine serum albümin standart grafiği .....	42
Şekil 3.11. SDS-PAGE analizi ile örneklerin görüntülenmesi .....	43
Şekil 3.12. Saflaştırılan örneğin IgG ile aglütinasyonu .....	43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> IgG'nin Fc bağlanan bakteriyel protein sınıfları .....	4
<b>Çizelge 1.2.</b> Protein A ve Protein G'nin farklı türlere ait IgG moleküllerini bağlama kuvvetleri.....	6
<b>Çizelge 1.3.</b> C40, G148 ve G43 Protein G molekül ağırlığı ve IgG afinitesi .....	7
<b>Çizelge 1.4.</b> Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan ticari jel materyalleri.....	11

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BET	: Brunauer Emmett Teller
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
Fab	: Fragment antigen-binding
Fc	: Fragment crystallizable
FT-IR	: Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
HEMA	: 2-hidroksietilmetakrilat
Ig	: İmmünoglobulin
MA-Trp	: N-metakriloil-L-triptofan
MBAAm	: N,N'-Metilenbisakrilamid
Q	: Adsorbsiyon kapasitesi
SEM	: Scanning Electron Microscope
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
UV-VIS-NIR	: Mor Ötesi-Görünür Bölge-Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi

## 1. GİRİŞ

Protein G, immünohistokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılan proteinlerden biridir. İmmünoglobulin G (IgG)'lerin Fc bölgesine seçici olarak bağlanmasının yanı sıra IgG'nin çok sayıda alt sınıfına afinite göstermesi bu proteinin önemini ortaya çıkarmaktadır. Çok sayıda araştırmacı Protein G ile Ig arasında güçlü bir afinite olduğunu bildirmiştir (Bjorck ve Kronvall. 1984; Akerstrom ve ark. 1985; Akerstrom ve Bjorck. 1986; Guss ve ark. 1986; Eliasson ve ark. 1988; Eliasson ve ark. 1989)

Günümüzde biyoteknoloji ve biyofarmakoloji endüstrisi, immünoterapi ve immünoagnostik alandaki bilimsel araştırmalarda kullanılmak üzere çok yüksek saflıkta antikorlara ihtiyaç duymaktadır (Glassy ve Dilmann, 1988; Siegel, 2002). Antikorların saflaştırılması için geleneksel kromatografik teknikler (jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak; yüksek saflıkta antikorlar bu geleneksel yöntemler ile elde edilememektedir. Bu nedenle günümüzde yüksek saflıkta antikor eldesinde en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisinde ilgili antikoru saflaştırmak için en çok kullanılan moleküller Protein A ve Protein G'dir (Ma ve Ramakrishna, 2008). Bu moleküllerin saflığı ne kadar yüksek olursa saflaştırılan antikoru saflığı da o kadar yüksek olmaktadır. Protein G'nin yüksek saflıkta elde edilmesi çalışmamızın temel amaçlarından biridir.

Protein G, immunoglobulinlerin Fc bölgesine seçici olarak bağlandığı için ELISA tanı kitlerinde ve nanopartiküllerde antikor yönlendiricisi olarak kullanılmaktadır (Sheiban ve Gershon, 1990). Antikorların kontrolsüz bağlanmasını engellediği için daha fazla antikoru antijen bağlama bölgesi açıkta kalmakta ve kullanılan tanı kitindeki tayin sınırlarını düşürerek çok küçük derişimlerdeki antijenlerin saptanmasına olanak sağlamaktadır.

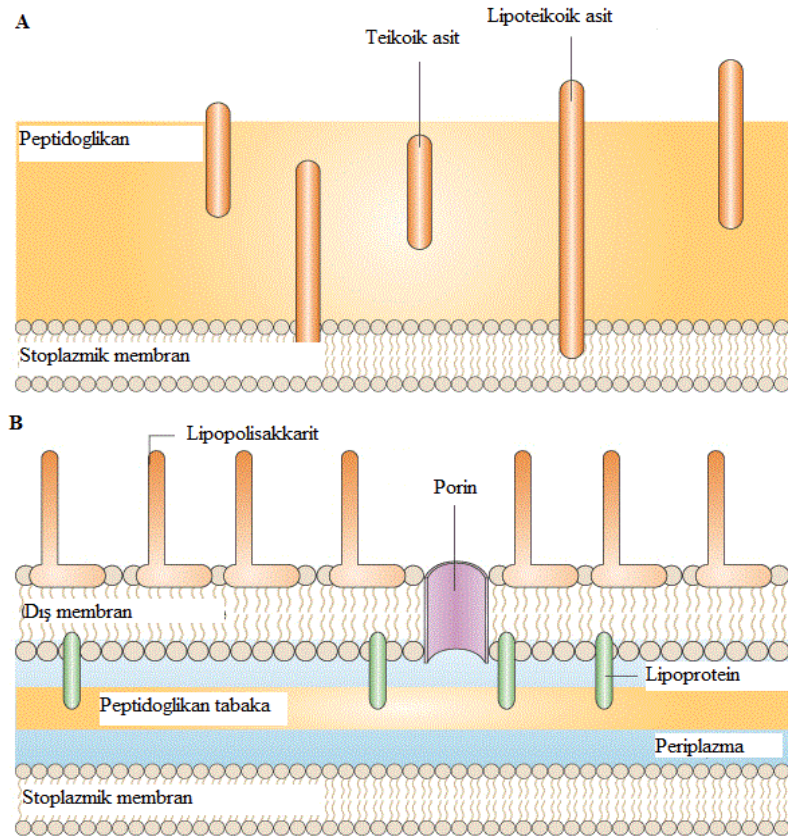
Bu çalışmamızda; immünohistokimyasal çalışmalarda büyük öneme sahip Protein G'nin saflaştırılması için fotosensitif amino asit monomerleri kullanılarak tamamen yeni makro gözenekli kriyojel destek materyali geliştirilmesi hedeflenmiştir. Fotosensitif amino asit monomerleri ile hazırlanan destek materyallerinin yüksek stabiliteye sahip olmaları, tekrarlanabilirliklerinin

fazla olması ve çalışmalar esnasında toksitesi fazla olan kimyasalların kullanılmaması bu monomerlerin seçimi için en büyük etkidir.

### 1.1. Bakteriyel Membran Proteinleri

Gram pozitif bakterilerin hücre membranında (Şekil 1.1) yer alan proteinler hücre büyümesi ve bölünmesinde önemli rol oynar. Literatürde ilk olarak tanımlanan hücre yüzey proteini A grubu Streptokoklardan izole edilen M antijenidir (Lancefield, 1928). M antijeni, Streptococcus pyogenes'ten sıcak asit muamelesi ile ekstrakte edilmiş ve 1920'lerin başlarında serolojik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır.

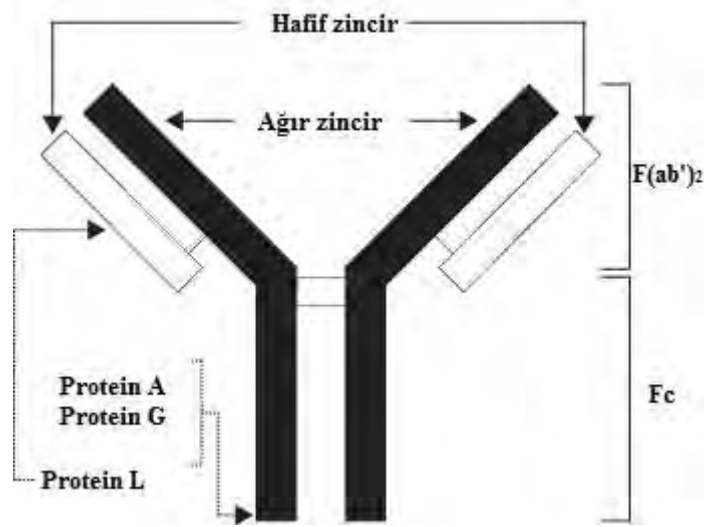
Gram pozitif bakterilerin hücre membran proteinleri hakkındaki son çalışmalar özellikle Staphylococcus ve Streptococcus gibi patojenik bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu proteinler kollajen, antikorlar, fibrinojen, fibronektin, laminin, plazmin ve protrombin gibi memeli proteinleriyle etkileşerek enfeksiyona sebep olmaktadır.



Şekil 1.1. Gram pozitif ve Gram negatif hücre duvarı (Cabeen ve Jacobs-Wagner, 2005)

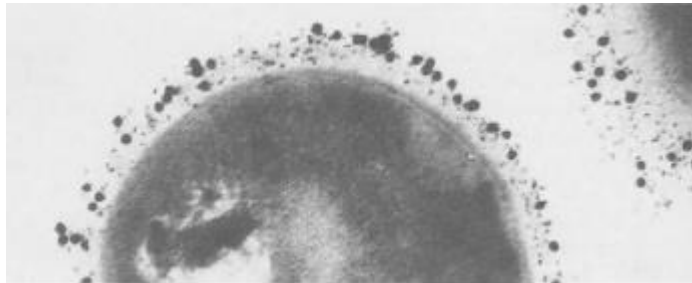
## 1.2. Immüoglobulinlerin Fc Bölgesine Bağlanan Proteinler

1966 yılında Forsgren ve Sjoquist, *S. aureus*'dan izole edilen Protein A'nın gamma immüoglobulinlere Fc domaini aracılığıyla bağlandığını göstermişlerdir. Birkaç yıl boyunca Protein A'nın immüoglobulinlerin Fc bölgesine bağlanan tek protein olduğu düşünülmüş, 1970'lerde A, C ve G grubu Streptococ'lardan izole edilen Protein G'nin de Ig Fc bölgesine bağlandığı bulunmuştur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. IgG yapısı

Fc reseptörlerinin hücredeki konumu ile ilgili immüoelektron mikroskopu teknikleri reseptörlerin sadece dış membranın hücre yüzeyinde (Şekil 1.3) olduğunu göstermektedir (Boyle, 1990).



Şekil 1.3. *Streptococcus sp.* hücre yüzeyinde altın işaretli insan serum albümin elektron mikroskopu görüntüsü

IgG'nin Fc bölgesine bağlanan bakteriyel proteinler, insan IgG alt sınıfları ve çeşitli hayvan IgG'lerine olan afinitelerine göre beş sınıfta (tip I-V) toplanmaktadır. Çizelge 1.1'de IgG'nin Fc bölgesine bağlanan bakteriyel proteinler sınıflandırılmıştır. *S. aureus*'dan izole edilen Protein A Tip I IgG Fc bağlanma proteini'dir. Protein A *S. aureus*'un bütün suşları arasında korunmuştur ve diğer IgG, Fc bağlanma proteinleri çok az homoloji göstermektedir. Tip III IgG Fc bağlanma proteinleri *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae* ve insanlardan izole edilen G grubu Streptococcus'dan izole edilen Protein G'dir. Farklı suşlardaki tekrar sekansları hem Protein G'nin büyüklüğünde hem de bağlanma bölgesinde değişikliğe sebep olabilmektedir (Neuberger ve Deenen, 1994).

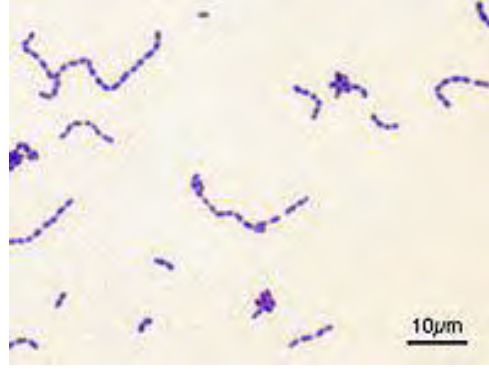
**Çizelge 1.1.** IgG'nin Fc bağlanan bakteriyel protein sınıfları

Protein Tipleri	Bakteri Cinsleri
Tip I (Protein A)	<i>S. aureus</i>
Tip II (Protein H)	<i>S. pyogenes</i>
Tip III (Protein G)	<i>S. equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , G grubu Streptokoklar
Tip IV	<i>S. zooepidemicus</i>
Tip V	<i>S. zooepidemicus</i>

### 1.3. Streptokoklar ve Streptokokkal Protein G

Streptokoklar yuvarlak veya oval şekilli, uzun ve kısa zincirler yaparak üreyen, sporsuz, fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz negatif, gram pozitif kok ve çiftler halinde bulunan zincir oluşturmaya eğilimli mikroorganizmalardır. Morfolojik olarak kendilerine çok benzeyen ve insan infeksiyonlarından sıklıkla izole edilen stafilokoklardan ayıran en önemli özellikleri katalaz enzimi üretmemeleridir (Cengiz, 1999; Mandell ve ark. 2005).





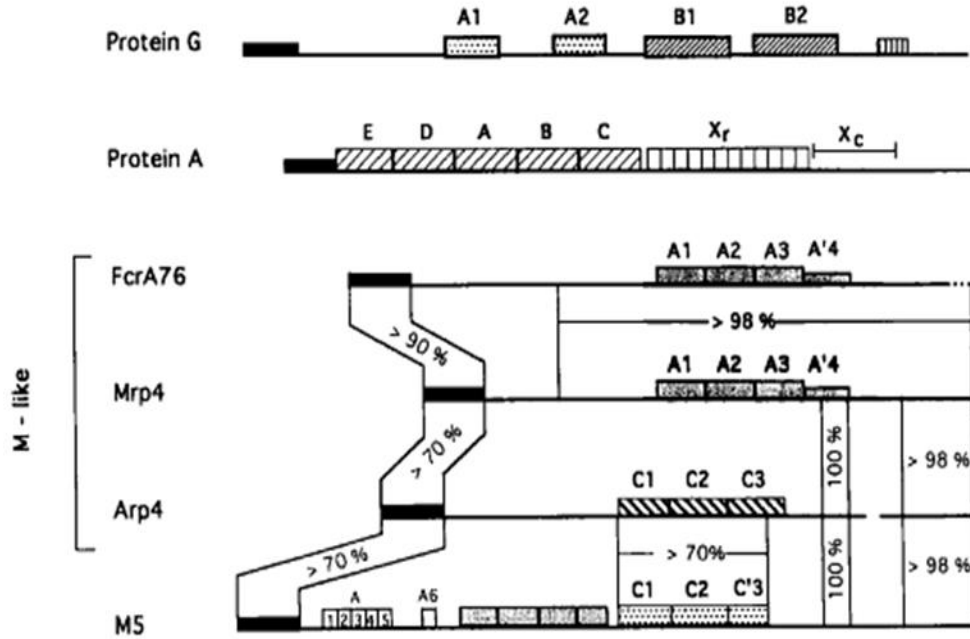
Şekil 1.4. *Streptococcus* sp. mikroskopik görünüş

Streptokokların sınıflandırılmasında üç temel ölçüt kullanılmaktadır. Bunlar kanlı agar plak kültürlerinde oluşturulan hemoliz, biyokimyasal özellikler ve immünolojik karakterlerdir. 1933'de Rebecca Lancefield tarafından yapılan ve  $\beta$  hemolitikleri içine alan gruplandırma Streptokokların hücre duvarında bulunan C polisakarit maddesi ile bu maddeye karşı tavşanlardan elde edilen bağışık serum arasındaki presipitasyon reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu reaksiyonlara göre streptokoklar A'dan V'ye kadar harfler ile gösterilen serolojik gruplara ayrılmıştır. A, B, C, D, F ve G grupları genellikle insanlarda sık enfeksiyon etkenidirler (Cengiz, 1999; Forbes ve ark. 2002; Ruoff ve ark. 2003).

Hastalık yapıcı birçok mikroorganizma hücre yüzeyinde memeli immüoglobulinlerine bağlanan hücre yüzey proteinleri içermektedir. *Staphylococcus aureus*'dan izole edilen Protein A ve grup C ve G Streptococcus türlerinden izole edilen Protein G bu proteinlere örnek olarak verilebilir. Streptococcal Protein G birçok memeli IgG'nin Fc bölgesine bağlanan iki ya da üç domainden oluşmaktadır. Protein G yaklaşık 600 aminoasit içermekte (Kato ve ark. 1995) ve Protein A'dan daha yüksek bir afinite ile IgG'nin dört alt sınıfına bağlanmaktadır. Protein A ve G'nin farklı türlere ait bağlanma kuvvetleri birbirinden farklıdır; Protein G fare ve rat monoklonal antikorlarına bağlanabilirken Protein A insan IgG<sub>3</sub> ve rat IgG'ye bağlanamaz (Çizelge 1.2) (Sauer-Eriksson ve ark. 1995).

**Çizelge 1.2.** Protein A ve Protein G'nin farklı türlere ait IgG moleküllerini bağlama kuvvetleri

Tür	Protein A	Protein G
Tavuk	-	-
İnek	+	++
Köpek	++	+
Keçi	+	++
Gine Domuzu	++	+
At	-	++
İnsan		
IgG <sub>1</sub>	++	++
IgG <sub>2</sub>	++	++
IgG <sub>3</sub>	-	++
IgG <sub>4</sub>	++	++
Fare	+	+
Tavşan	++	++
Rat	-	+
Koyun	-	++



**Şekil 1.5.** Protein G ve Protein A'nın yapısı

Protein G ve Protein A'nın her ikisi de IgG'ye bağlanmasına rağmen üç boyutlu yapıları birbirinden oldukça farklıdır (Kato ve ark. 1995; Graille ve ark. 2000). Bunun yanısıra Protein G Protein A'ya göre immüoglobulinlerin Fc bölgesine daha yüksek bir ilgi ile bağlanmaktadır (Frick ve ark. 1992).

C grubu *Streptococcus* sp. tarafından üretilen Protein G, C40 olarak ve G grubu *Streptococcus* sp. tarafından üretilen Protein G, G148 ve G43 olarak tanımlanmaktadır. G148, G43 ve C40 kodlu Protein G'nin molekül ağırlığı ve IgG afinitesi birbirinden farklıdır (Çizelge 1.3). G148, G43 ve C40 kodlu Protein G üretiminden sorumlu gen bölgesi incelendiğinde, G43 ve C40 kodlu Protein G için IgG bağlanmasından sorumlu gen bölgesinde 210 baz çifti eksikliği bulunmaktadır. Bu durum G43 ve C40 için IgG bağlanmasındaki afinite düşüklüğünü açıklamaktadır. G43 kodlu Protein G üretiminden sorumlu gen bölgesinin 5' ucunda 450 baz çifti eksikliği mevcuttur. Bu durum G43 kodlu Protein G'nin insan serum albüminine afinitesinin olmamasını açıklamaktadır (Sjöbring ve ark. 1991).

**Çizelge 1.3.** C40, G148 ve G43 Protein G molekül ağırlığı ve IgG afinitesi

<b>Protein G</b>	<b>C40</b>	<b>G148</b>	<b>G43</b>
<i>Molekül Ağırlığı</i>	<i>58 kDa</i>	<i>65 kDa</i>	<i>40 kDa</i>
<i>IgG Afinitesi</i>	+	+++++	+
<i>İnsan Serum Albumin Afinitesi</i>	+	+	-

Streptokokkal Protein G, monoklonal antikorların saflaştırılmasında, immün komplekslerin izolasyonunda, serumdan immüoglobulinlerin izolasyonunda, uzaklaştırılmasında, saflaştırılmasında, antikorların yönlendirilmesinde ve Protein G konjugatlarının eldesinde kullanılmaktadır.

## 1.4. Protein Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Protein saflaştırılmasında kullanılan yöntemler çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle; saflaştırılacak proteine uygun saflaştırma stratejisinin seçilmesi hem saflaştırma verimi hem de saflaştırılmış proteinin çalışması için hayati önem taşımaktadır.

Saflaştırılacak hedef protein saflaştırma işlemlerinin ilk aşamasında genelde seyreltik olarak bulunmaktadır. Çok fazla miktarda örnekle çalışmak çoğu zaman mümkün olmadığı için örneklerin deriştirilmesi gerekmektedir.

Protein özütlerinin yoğunlaştırılmasında kullanılan en yaygın metotlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- i. Çöktürme
- ii. Ultrafiltrasyon
- iii. İyon değiş-tokuş kromatografisi
- iv. Diafiltrasyon
- v. Liyofilizasyon
- vi. Kuru formdaki Sephadex G-25 ilavesi

### 1.4.1. Çöktürme

Ham protein özütlerinden hedef proteinin çökmesi sağlanarak fraksiyonlanması, nötral tuzlar, organik çözücüler ve yüksek moleküler kütleli polimerler gibi ajanlar kullanılarak veya protein solüsyonunun pH'sının ya da sıcaklığının belirli bir değere ayarlanması ile başarılabilir (Tuncer, 2008). Çöktürme yöntemleri içerisinde ucuz ve uygulamasının kolay olmasından dolayı tuz ile çöktürme en çok tercih edilenidir.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  protein çöktürmesinde yaygın olarak kullanılan tuzlardandır. Yüksek çözünürlüğü, saflığı yüksek olarak kolay temin edilmesi, yüksek iyonik güç oluşturarak salting out etkisi yaratması ve çöktürmeden sonra proteinlerin geri kazanımının fazla olmasından dolayı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pek çok saflaştırma işleminde ön deriştirme yöntemi olarak kullanılmaktadır (Burgess, 2009).

### **1.4.2. Ultrafiltrasyon**

Hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekli uygulamalarda, protein çözeltilerinin hızlı ve güvenli bir şekilde yoğunlaştırılmasında kullanılan diğer bir metot ise ultrafiltrasyondur. Fermentasyon sıvılarından veya hücre kültür sıvılarından, hücrelerin ve hücre kalıntılarının filtrasyonunda kullanılan filtrelerin gözenek çapları, genellikle 1-10 µm aralığındadır. Bu tipteki filtreler, hücre ve büyük katı materyallerin sıvılardan ayrılmasını sağladıkları halde, protein gibi makro moleküllerin ayrılmasında yetersiz kalmaktadırlar. Bu nedenle, ultrafiltrasyonda kullanılan ultrafiltrelerin gözenek çapları genellikle 1-20 nm arasında değişmektedir. Bu tipteki ultrafiltreler ise küçük moleküler kütleli protein moleküllerini dahi sıvılardan ayırma kapasitesine sahiptirler. Ticari olarak bulunan ultrafiltrelerin gözenek çapları ise 1-300 kDa arasındaki molekülleri tutma kapasitesindedirler. Protein özütlerinin yoğunlaştırılmasında ve özüt içindeki küçük kirleticilerin uzaklaştırılarak kısmen saflaştırılmasında kullanılan ultrafiltrelerin moleküler kütle seçicilikleri ise genellikle 3, 10, 30, 50 ve 100 kDa'dur (Tuncer, 2008).

### **1.4.3. İyon değiş-tokuş kromatografisi**

İyon değişim kromatografisi zıt yüklü moleküllerin çekilmesini temel almaktadır. Proteinlerin taşıdığı yükler ortamın pH ve pI değerine bağlıdır. İyon değiştirici destek materyali genellikle porlu ve proteinin adsorbsiyonu için yeterli yüzey alanına sahiptir. Bu destek materyaline pozitif veya negatif yüklü bir ligand immobilize edilmektedir. Katyon değiştiriciler negatif yüklü anyon değiştiriciler ise pozitif yüklüdür. Protein saflaştırılması ve deriştirilmesinde proteinin yüküne göre iyon değiştirici materyal seçilmektedir (Jungbauer ve Hahn, 2009).

#### **1.4.4. Kuru formda Sephadex G-25 ilavesi**

Seyreltik protein özütleri üzerine kuru formdaki Sephadex G-25'in (veya analogu) eklenmesi, jel partiküllerinin şişmesine yol açmaktadır. Jel partiküllerinin hidrasyonu esnasında, protein özütündeki su molekülleri jel partiküllerinin iç kısımlarına girmektedir. Fakat protein molekülleri, jel matriksinin içine giremeyecek kadar büyük olduklarından, jeli saran fakat hacmi orijinal solüsyona oranla azalmış olan sıvı içerisinde kalacakları için etkili bir şekilde yoğunlaştırılmış olmaktadır. Diğer tekniklerin aksine, protein özütlerine kuru formdaki Sephadex G-25'in eklenerek yoğunlaştırılması, özellikle endüstriyel uygulamalar için uygun olmamaktadır. Büyük-ölçekli uygulamalarda, protein özütlerinin yoğunlaştırılmasında çökeltme, iyon değiş-tokuş kromatografisi veya ultrafiltrasyon daha uygun olmaktadır (Tuncer, 2008).

#### **1.4.5. Diyaliz ve liyofilizasyon**

Diyaliz, çözelti ortamında yarı geçirgen bir membran vasıtasıyla moleküllerin seçici difüzyonla ayrılmalarını sağlamaktadır. Bu yöntem protein çözeltilerinden düşük molekül ağırlıklı çözünenleri ayırmada kullanılan en popüler yöntemdir. Özellikle denatüre edici tuzların uzaklaştırılmasında ve tampon çözeltinin değiştirilmesinde kullanılmaktadır. Diyalizin mekanizmasının değişmemesine rağmen son on yıl içinde uygulamasında değişiklikler olmuştur. Membranların daha esnek hale gelmesi, küçük hacimlerde çalışma ve en az protein kaybıyla işlemin tamamlanması bu değişikliklere örnek olarak verilebilir (Burgess ve Deutscher, 2009).

Çözeltilerde bir bileşenin derişiminin arttırılması amacıyla buharlaştırma, kaynatma gibi yöntemler uygulanabilir. Protein çözeltilerinde çözücüyü ısı temelli yöntemlerle uzaklaştırmak proteini hızlı bir şekilde denatüre etmektedir. Liyofilizasyon yönteminde ortamın atmosfer basıncı güçlü bir vakum yardımıyla düşürüleceği için dondurulmuş örnekteki çözücü sıvı hale geçmeden buharlaşmaktadır. Sıcaklıkta herhangi bir yükselme olmayacağı için proteinlerin deriştirilmesi denatürasyon meydana gelmeden tamamlanmaktadır (Jennings, 1999; Costantino ve Pikal, 2004; Przic ve ark. 2004).

#### 1.4.6. Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi veya jel geçirgenlik (Moore, 1964) kromatografisi, çözümlenen biyolojik kökenli, yüksek molekül ağırlıklı bileşenlerin ve polimerik materyallerin etkili bir şekilde ayrılmasında kullanılan genel bir teknik olarak bilinmektedir (Porath ve Flodin, 1959).

Bu metot genel olarak şişirilmiş bir jel içerisinde biyolojik örnekteki çözümlenen her bir numunenin boyutlarının farkından yararlanılarak her bir çözümlenenin ayrılmasını sağlamaktadır (Porath ve Flodin, 1963).

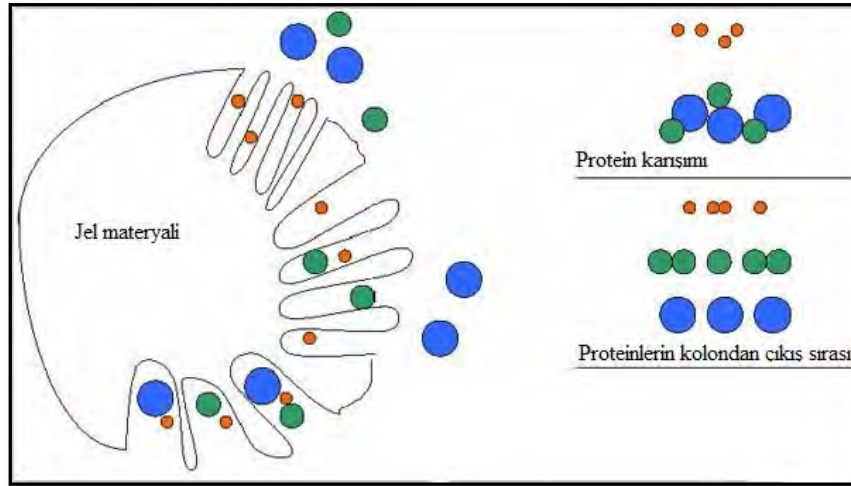
Bu yöntemde seçilen jel ortamı ve kolon boyutları çok önemlidir. Jel filtrasyon kromatografisinde, öncelikle saflaştırılacak proteinin molekül büyüklüğüne uygun gözenek büyüklüğüne sahip polimerik materyal seçimi yapılmaktadır. Çizelge 1.4.'de jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan jellerin özellikleri gösterilmektedir.

**Çizelge 1.4.** Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan ticari jel materyalleri

Jel	Su tutma kapasitesi (mL g <sup>-1</sup> )	Dışlama limiti (Dalton)
Sephadex G-10	1	700
Sephadex G-25	2,5	5000
Sephadex G-50	5	30000
Sephadex G-75	7,5	70000
Sephadex G-100	10	150000
Sephadex G-150	15	300000
Sephadex G-200	20	600000
Bio-Gel P-2	1,5	1800
Bio-Gel P-4	2,4	4000
Bio-Gel P-6	3,7	6000
Bio-Gel P-10	4,5	20000
Bio-Gel P-30	5,7	40000
Bio-Gel P-60	7,2	60000
Bio-Gel P-100	7,5	100000
Bio-Gel P-150	9,2	150000
Bio-Gel P-200	14,7	200000
Bio-Gel P-300	18,0	400000

Jel materyalinin seçiminden sonra bu materyalin kolona paketlenmesi düzgün biçimde yapılmalıdır. Bu amaçla öncelikle jel materyali kolonu dengelemek için kullanılan tampon çözelti içerisine aktarılır ve burada şişirilmektedir. Şişirilmiş materyal kolona aktarıldıktan sonra dengeleme tamponu ile kolon dengelenmektedir. Dengeleme işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı kolona verilen tampon çözelti ile kolondan çıkan çözeltinin absorpsiyon, iletkenlik ve pH ölçüm değerlerinin aynı olması ile kontrol edilmektedir.

Saflaştırılacak proteini içeren homojen karışım kolona tatbik edildikten sonra büyük molekül ağırlığına sahip proteinler jel materyalinin gözeneklerine girmeden ilerleyeceği için kolondan önce çıkmakta ve daha küçük moleküller gözeneklere gireceğinden daha sonra çıkmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Jel filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisinde protein saflaştırması için genellikle boyu uzun, çapı dar olan kolonlar tercih edilmekteyken tuz uzaklaştırma işlemleri için kısa ve geniş kolonlar seçilir.

#### 1.4.7. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, hedef proteinler ile immobilize ligandlar arasındaki spesifik etkileşimleri temel alan çok güçlü bir protein saflaştırma metodudur (Lee ve Lee, 2003). Çok seyreltik çözeltilerde bile hedef proteinin



saflaştırılması için kullanılacak en uygun metottur (Narayanan ve Crane, 1990). Tek bir adımda 3000 kat gibi yüksek bir saflaştırma kapasitesine sahip olmasına rağmen preparatif ölçekte bu yöntemin kullanımı yüksek maliyeti yüzünden oldukça zordur (Knight, 1990). Bu nedenle bu alanda verimi yüksek ve maliyeti düşük materyallerin geliştirilmesi çok önemlidir.

Afinite kromatografisi ile saflaştırılma uygulandığında bu yöntemin en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için dört önemli faktör vardır. Bunlar;

- a. Başlangıç materyalindeki hedeflenen örneğin derişimi,
- b. Başlangıç materyalinde bulunan hedef protein dışındaki moleküllerin kompozisyonu,
- c. Bu moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri,
- d. Ürün için hedeflenen saflık

olarak sıralanabilir (Soffer ve Nystrom, 1989). Bu sıralanan faktörlerden sonra amaca uygun destek materyali seçilmekte ve modifiye edilmektedir. Seçilen destek materyali inert, hidrofilik, kimyasal ve fiziksel olarak dirençli, kolon içine kolayca paketlenen, makro gözenekli ve kolayca türevlendirilen özelliğe sahip olmalıdır (Cabrera ve Wilcbek, 1988). Yaygın olarak kullanılan çok sayıda ticari destek materyali mevcuttur. Çalışmamız kapsamında afinite tekniğine dayalı kriyojel tabanlı destek materyali geliştirilmiş ve fotosensitif amino asit monomeri kullanarak destek materyali modifiye edilmiştir.

#### **1.4.8. ANADOLUCA metodu**

“ANADOLUCA” AmiNoAsit Dekore Edilmiş Işık Destekli Konjugasyon yaklaşımı (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach)'nın kısaltmasıdır ve yeni nesil sentetik malzemeler ve uygulamalarını içeren bir konsepttir. Bu konsept ile Nano-enzim ve Nano-protein gibi tekrar kullanılabilen, tampon ve su ortamında çözünmeyen maddeler sentezlenebilmektedir.

ANADOLUCA konseptince poli(HEMA-ko-IgG) gibi yeni nesil polimerik malzeme geliştirilirken ek bir basamağa ihtiyaç duymadan immünglobulin G kolon materyaline bağlanmaktadır. Sentez esnasında kullanılan triptofan içeren Rutenyum bazlı metal şelat kompleksi ( $[Ru(bipy)_2(MA-Trp)_2]$ )

vasıtasıyla immünoglobulin G, fotosensitif ve kovalent olarak kolon materyaline çapraz bağlanmaktadır. Bu bağlanma esnasında immünoglobulin G konformasyon ve özelliklerini kaybetmemektedir.

ANADOLUCA konsepti ile hazırlanan nano-proteinler, nano-enzimler ve nano-antikorlar herhangi bir platform kullanmadan doğrudan monomer olarak kullanılabilen ya da ilaçlar ve biyomoleküller bu nano-protein yapılarına konjuge olabilmektedir (Say, 2011).

### **1.5. Kriyojel**

Kriyojeller, dondurulmuş çözeltilerden oluşan monomerik ve polimerik jel matrikslerinden oluşmaktadır. Kriyojellerin eşsiz yapıları, ozmotik, kimyasal ve mekanik stabiliteleri ile uyum halindedir. Bu da onları biyolojik nanopartiküller ve tüm hücreler için cazip hale getirmektedir. Polimer kriyojeller, biyolojik moleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için önemli taşıyıcılardır. Kriyojeller, biyoteknolojide önemli bir yere sahip polimer jellerdir. Anlamı buz ve don olan Yunanca Krios (kryos)'dan gelmektedir. Kriyojeller, düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı maddelerden oluşmaktadır. Kriyojellerin özellikleri, ilk rapor edildiğinde diğer polimer jellerden farklı olarak alışık olunmayan yanları dikkat çekmiştir (Lozinsky, 2002). Polimerik malzemeler jel adı altında birleştirilmiştir. Yani; makro moleküllerin bağlanmasıyla oluşturulan hareketsizleştirilmiş çözücülerdir. Jeller önemli ölçüde tahribe ve deformasyona dayanıklıdır. Polimerdeki bağların özelliğine göre kimyasal ve fiziksel jeller olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kriyojeller biyoteknolojik uygulamalarda özellikle diğer jel türlerinden daha fazla kullanılmaktadır. Kriyojeller, kovalent, iyonik ve kovalent olmayan tipte olabilmektedir. Dondurma ve kurutma işlemiyle bu polimerik malzemeler makro veya mikro yapıda gözenekler içermektedirler. Çözücü kısmın süblimleşmesi ile elde edilen dondurulmuş jel, yani polimerik malzeme birbirlerine bağlı gözenekler ile oluşturulmuştur. Ayrıca; kriyojellerin oluşturulma prosedürü (dondurma-kurutma aşaması) diğer yöntemlerden daha basit ve kolaydır.

### 1.5.1. Biyoayırma için kriyojeller

Ayırma ve saflaştırma biyoteknolojide çok önemli bir işlem sürecidir. Kromatografi, analitik ve büyük ölçekli ayırımlar için geliştirilmiştir. Ancak; yüksek bir çözme gücü olmasına rağmen sınırlayıcı yanları vardır. Örneğin, hücre süspansiyonları ya da ham hücre homojenatları gibi.

Kriyojellerin süper makro gözenekliliği, kromatografik malzemeler için onları uygun aday yapmaktadır (Kumakura, 2001). Süper makro poröz ve birbirine bağlı gözenek yapısı sayesinde kromatografik matriks çok düşük akış hızına sahiptir. Kriyojellerin büyük gözenek boyutuyla, ham homojenatlar doğrudan işlenebilecektirler.

Hücre immobilizasyonu, biyopolimerlerin immobilizasyonu ile benzer şekilde kriyojel tipi taşıyıcılar kullanılarak başarılı olabilmektedir (örneğin; kovalent ya da adsorpsiyon şeklinde). Hücrelerin immobilizasyonu, süper makro poröz kriyojellerin içinde ince hücre tutuklanması ve makroporöz kriyojellerin içindeki hücre tutuklanması olarak iki şekilde gerçekleşir. Süngerimsi kriyojellere hücre tutuklanması amacıyla bir biyokütle (mikroplar, sporlar, organeller) jel öncü çözeltileri içinde süspansiyon edilmektedir (Sutani ve ark. 2001; Kumakura, 2001). Biyokütle içeren malzemeler sadece organik maddelerden üretilmemektedirler. İnorganik polimerlerden örneğin; kriyo-silika jellerden de üretilmektedirler.

Süper makro poröz jeller biyoteknoloji için birçok ilginç olanaklar sunmaktadır. Partikül-madde ayrılması, çözünmüş ortam içinde parçacık yakalama ve ayrıca biyokatalizlerin etkin immobilizasyonları gibi uygulama alanları vardır (Lozinsky, 2003). Polimer kriyojeller makrogözenekli yapısı nedeniyle biyomoleküllerin immobilizasyonu için benzersiz taşıyıcılardır. Mekanik stabiliteleri sağlamdır ve farklı kimyasal fonksiyonları bulunmaktadır. Biyolojik olarak kriyojellere epoksi ve hidroksi işlevselliği ile aktif maddesinin kullanımı daha yaygın bir yaklaşımdır. Antijen antibadi iyileştirilmelerinde, antikorun immobilizasyonu ile antijen yakalanması optimize edilmiştir (Ehrhart ve ark. 2008; Nagare ve Mukherji, 2009). İmmobilize edilmiş antikorlar üzerinde antijen-antibadi bağlama özgülüğü kullanılmaktadır. Ancak antijen adsorpsiyon aktivitesi ve bağlayıcı verimliliği önceden immobilize edilmiş antikorlarla sağlanmaktadır. Burada biyo ligand bağlanma stratejisine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Optimum immobilizasyon gereksinimi, çoğunlukla polimerin yüzey aktif antikörlerinin yüksek yoğunlukta olmasıyla sağlanmaktadır (Blagoi ve ark. 2008). Antikörlerin immobilizasyonlarında basit fiziksel adsorpsiyon sorunları oluşabilmektedir (Tedeschi ve ark. 2003; Oura ve ark. 2004). Bu nedenle, antikörün immobilizasyonu için kovalent bağ yöntemi tercih edilmektedir (Gebbert ve ark. 1992; Koyama ve ark. 1994). Bu da genellikle antikörlerin uygun fonksiyonel gruplarla yüzeylere kovalent bağlarla bağlanması ile gerçekleştirilmektedir. Monoklonal antikörler, çok çeşitli metodlar kullanılarak katı destek üzerine immobilize edilerek kullanılmaktadırlar (Hermanson, 1992). Antikör, antijen ile etkileşimi için aktif alanları koruyan bir şekilde bağlanmaktadır. Bu nedenle, destek üzerine immobilize olmuş antikörlerin yoğunluğu ve antikörlerin aktivitesi kontrollü olmak zorundadır. Hem çoklu bağlanma hem de rastgele eğilimlerden kaçınılmalıdır (Rao ve ark. 1998).

### **1.5.2. Kriyojellerin karakterizasyonları**

Farklı monomerler kullanılarak sentezlenen kriyojellerin, taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)'nin azaltılmış toplam yansıma (ATR) moduyla, azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle ve şişme testlerinin uygulanmasıyla karakterizasyonları gerçekleştirilmektedir.

SEM cihazı ile analiz sonucu elde edilen görüntülerle kriyojel yapısındaki gözenek dağılımı, gözenek boyutları, yapıyı meydana getiren gözenek örgüsü gibi bilgiler elde edilmektedir. SEM ile görüntüleme yapmak için ilk önce örnekler kurutulmakta ve ardından altın ile kaplama yapılmaktadır. FT-IR analizi ile sentezlenen kriyojeldeki fonksiyonel gruplar aydınlatılır ve buna göre, kriyojel gözeneklerinin amaca yönelik bir madde için modifikasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği belirlenmektedir. Kriyojellerin FT-IR spektrumları katı halde, IR spektroskopi cihazının ATR modunda çalışılarak alınmaktadır. Bu yöntemde kuru haldeki kriyojeller kristal üzerine konulmakta ve üzerine infrared ışığı gönderilerek maddenin spektrumu alınmaktadır. BET yöntemiyle, kriyojelin yüzey alanı, gözenek boyutu, gözenek hacmi, parçacık boyutu ve gözenek dağılımı gibi özellikleri belirlenmektedir. BET metoduna göre yapılan analizlerle -

198 °C deki sıvı azot ortamında azot (N<sub>2</sub>) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> olarak yüzey alanları ölçülebilmektedir. Şişme testiyle, kriyojellerin hidrofilik karakter göstermeleri nedeniyle hacimlerinin % 150 sine kadar su tutma kapasiteleri bulunduğundan, sentezlenen kriyojele özgü bünyesinde su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme miktarı belirlenebilmektedir.

Bir kriyojel kolonda su tutma kapasitesinin fazla olması kolonun istenilen süngerimsi gözenek yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Esneme oranı fazla olduğunda ise kriyojel kolonun gözenek boyutu kolondan geçecek her molekülün boyutuna uyum sağlayabileceği ve hedef molekül kolondan geçerken gözenekli yapının herhangi bir zarar görmeyeceği anlamına gelmektedir. Böylece; kriyojel kolonlar tekrar tekrar kullanılarak düşük maliyette ve yüksek saflıkta ürünler elde edilmiş olacaktır.

#### **1.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS PAGE)**

Poliakrilamid jel elektrofrez protein karışımını büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılan analitik bir metoddur. Teknik elektriksel bir alanda yüklü moleküllerin zıt yüke doğru göçüne dayanmaktadır. Genel elektrofrez teknikleri ile proteinlerin molekül ağırlığı belirlenmemektedir. Çünkü jeldeki göç hem molekül büyüklüğüne hem de molekülün yüküne bağlıdır. Bu durumun üstesinden gelmek için protein moleküllerine tek tip yük kazandırılır. Bu amaçla sodyum dodesil sülfat kullanılmaktadır. SDS hem hidrofobik uç (dodesil grubu), hem de hidrofilik uç (sülfat grubu) barındıran bir deterjandır. SDS molekülleri sülfat grubu sayesinde proteinleri negatif yükle kuşatmaktadır. Farklı büyüklükteki protein molekülleri SDS ve β-mercaptoethanol kullanılarak denatüre edilerek ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarını kaybetmektedirler. Birincil yapılarına dönen ve negatif yüklenen proteinler poliakrilamid jelde pozitif yüke doğru göç etmekte ve boyutlarına göre ayrılmaktadırlar. Proteinin molekül ağırlığını belirleyebilmek için molekül ağırlığı bilinen markerlar kullanılmaktadır. Jelde proteinleri görünür hale getirmek için ise protein spesifik boyama yöntemleri

(Coomassie brilliant blue G/R-250, gümüş boyama vb.) kullanılmaktadır  
(Anonim, 2011; Anonim 2012).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada Protein G kaynağı olarak kullanılacak *Streptococcus equi* Ankara Türk Halk Sağlığı merkezinden, *S. equi*'nin kültüre edilmesinde kullanılan Columbia broth besiyeri Acumedia Neogen firmasından, standart olarak kullanılan rekombinat Protein G ve IgG (Human serum) Sigma Aldrich'den temin edilmiştir. Örneklerin protein içeriğinin belirlenmesinde faydalanılan Bovine Serum Albumin (BSA), Folin Ciocalteau Reagent, Na-K Tartarat Sigma'dan alınmıştır. Denatüre Dikey jel elektroforezi işlemlerinde ve kriyojelllerin sentezlenmesinde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar'dan, N,N'-Metilenbisakrilamid (MBAAm) Sigma Aldrich' den, 2-Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros'dan, Amonyum persülfat (APS) ve Tetraetilmetilendiamin (TEMED) Sigma'dan, Coomassie Brilliant Blue Appli Chem'den, Akrilamid Merck'den temin edilmiştir. Safaştırma işlemlerinde kullanılan Sephadex G-25 ve Sephadex G-100 Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Çalışmaların diğer kısmında kullanılan kimyasallardan olan Potasyum bromür (KBr) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen firmasından, Metanol (CH<sub>3</sub>OH), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), Potasyum fosfat monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Potasyum fosfat dibasic (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Sigma'dan, Amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Panreac'dan, Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan'dan, Tris(hidroksimetil)aminometan ve Hidroklorik asit (HCl) Merck'den, Metakriloil klorür, L-Triptofan, Sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>), Potasyum karbonat (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) Sigma-Aldrich'den alınarak uygun koşullarda saklanmıştır.

Bu çalışmada sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometresi, yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı ve polimerlerin yüzey alanının belirlenmesinde Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır. *S. equi*'nin kültüre edilmesi için besiyerinin sterilizasyonunda JSR JSAC-40 model otoklav ve kültürün inkübasyonunda Thermo Forma Orbital Shaker kullanılmıştır. Bandelin Sonopuls HD2070 sonikatör kullanılarak bakteriler parçalanmıştır. Adsorbsiyon çalışmaları sırasında Heidolph Pumpdrive 5101 ile istenilen akış hızı sağlanmıştır.

Standart grafiklerin oluşturulmasında ve örnek çözeltilerinin absorbanlarının ölçülmesinde Shimadzu (UV-3500) UV-VIS-NIR spektrofotometre kullanılmıştır. Örneğin karakterizasyon işlemleri için SDS PAGE analizi Thermo Scientific P9DS dikey elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmalar esnasında tüm tartımlar Ohaus Pioneer analitik terazi, tüm pH ölçümleri HANNA HI 2211 pH/ORP metre, karıştırma işlemleri Jeiotech Multi-Channel manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Saf su Thermo Scientific Smart Pure saf su cihazından sağlanmıştır.

## **2.2. Poli(HEMA-ko-IgG) Sentezi**

Protein G'nin saflaştırılması amacıyla çalışmamızın ilk aşamasında poli(HEMA-ko-IgG) kriyojeli sentezlenmiştir. Bu kriyojelin sentezlenmesinde kullanılan fotosensitif rutenyum tabanlı bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum (II) aminoasit monomeri Rıdvan Say ve ekibinden temin edilmiştir.

### **2.2.1. N-metakriloil-L-triptofan sentezi (MA-Trp)**

Uygun miktarda L-triptofan 1 M NaOH içerisinde çözünerek balon içerisine alınmıştır. 25 mL 1,4-dioksan içerisindeki 1 eşdeğer metakroil benzotriazol (MA-Bt) aminoasit çözeltisine yavaşça ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 10-20 dak karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen rezidü su ile seyreltilmiş ve 1H-benzotriazolu ortamdaki uzaklaştırmak için etil asetat ile (3x50 mL) ekstrakte edilmiştir. Toplanan sulu fazlar % 10'luk HCl kullanılarak pH 6-7'ye nötralize edilmiştir. Su döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Say 2011).

### **2.2.2. Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomeri bis(2,2'-bipiridil) MATrp-MATrp-rutenyum (II) sentezi**

1 eşdeğer RuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub> su içerisinde çözülmüş ve çözelti 0 °C'ye soğutulmuş üzerine NEt<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Daha sonra üzerine damla damla 2 eşdeğer MATrp eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında 30 dak boyunca karıştırılmıştır. Karışım 80 °C sıcaklıkta yaklaşık 24 s süreyle reflüks edilmiştir.



Kahverengi bis(2,2'-bipiridil) MATrp-MATrp-rutenyum (II) kompleksi süzülerek ortamdan ayrılmış ve eter ile yıkanarak vakum altında kurutulmuştur (Say 2011).

### 2.2.3. Kriyojelin hazırlanması

Kriyojel kolon sentezi ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla; 1185  $\mu$ L deiyonize su içerisinde monomer olarak 75  $\mu$ L HEMA çözülmüştür. Karışım üzerine çapraz bağlayıcı olarak 14,15 mg MBAAm ilave edilerek çözününceye kadar karıştırılmıştır. Sonra karışıma 10  $\mu$ L MATrp-Ru-MATrp, 5 mg IgG (Human serum) eklenmiş ve azot atmosferi altında 2 saat karıştırılmıştır. Serbest radikal polimerizasyonunun başlaması için 1,3 mg APS, 1,25  $\mu$ L TEMED 0 °C'de bir buz banyosu üzerindeki karışıma eklenmiş ve 1 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı plastik bir enjektöre dökülmüş ve -16 °C'de 18 s süren dondurma işleminden sonra oda sıcaklığına alınan IgG bağlı kriyojel kolonun buzu çözündürülmüştür. Şekil 2.1.'de sentezlenen poli(HEMA) ve poli (HEMA-ko-IgG) kolon gösterilmiştir. Bağlanmayan monomerleri ve safsızlıkları uzaklaştırmak için kriyojel 50 mL deiyonize su ile yıkanmıştır (Say 2011; Perçin ve ark. 2013).



Şekil 2.1.Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolon

### 2.3. Kriyojelin Karakterizasyonu

Bölüm 2.2.3.'de anlatıldığı gibi poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelleri sentezlenmiş ve karakterizasyon işlemlerinde sırasıyla şişme testi (Şekil 2.2), SEM analizi ile yüzey morfolojisinin incelenmesi, BET ile yüzey alanı ölçümü ve FT-IR spektroskopisi uygulanmıştır.

#### 2.3.1. Şişme testi

Hazırlanan kriyojel kolonlar ağırlıkları sabit oluncaya kadar oda sıcaklığında bir hafta boyunca kurutulup tartılmıştır. Kuru haldeki kriyojeller bir kap içerisinde 15 dak suya maruz bırakılmış ve yaş ağırlığı ile tekrar tartılmıştır. Şişme derecesi eşitlik (2.1)'de verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (Uzun ve ark. 2011).

$$SD = (W_1 - W_0) / W_0 \dots\dots\dots(2.1)$$

$W_0$ = Kuru polimerin ağırlığı

$W_1$ : Şişirilmiş polimerin ağırlığı

SD: Şişme Derecesi



Şekil 2.2. Kriyojel şişme testi

### 2.3.2. Elektron mikroskobu ile yüzey morfolojisinin incelenmesi

Numuneler, SEM analizi için altın kaplamadan önce sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmış etüvde bir gece boyunca kurutulmuştur. Çapı 5 mm ve yüksekliği 10 mm olan silindirik numune dikkatli bir şekilde kesilmiştir. SEM ile gözlem yapabilmek için numunenin üzeri 2 dak süreyle 50 mA'lık bir akımla vakum altında altın kaplanmıştır (Kudaibergenov ve ark. 2012). Altın kaplanmış numuneler Şekil 2.3.'deki Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 2.3. Zeiss Ultra Plus taramalı elektron mikroskobu

### 2.3.3. FT-IR spektroskopisi

Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) numunelerinden bir miktar alınarak etüvde bir gece boyunca kurutulmuş ve daha sonra nemi uzaklaştırılmış KBr ile pellet oluşturulmuştur. FT-IR cihazı kullanılarak her bir numunenin spektrumu alınmıştır.

### 2.3.4. Yüzey alanı ölçümü

Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelinin spesifik yüzey alanı BET cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bu amaçla yaklaşık 1 g kriyojel tartılmış ve cihaza

yerleştirilmiştir. Kriyojelin gözeneklerinde bulunan suyu uzaklaştırmak amacıyla sıvı azot ile muamele edilmiş ve 10 noktada analiz yapılarak 1 g kriyojelin yüzey alanı hesaplanmıştır.

#### 2.4. Adsorbsiyon Çalışmaları

Adsorbsiyon çalışmaları Bölüm 2.2.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelinin gramı başına ne kadar Protein G tuttuğunu belirlemek için yapılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla kontrol polimeri olarak poli(HEMA) kriyojeli kullanılmıştır

##### 2.4.1. Protein G standart grafiğinin hazırlanması

Standart grafiği hazırlamak amacıyla 1000; 500; 250; 100; 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerinde Protein G çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin 280 nm'de absorbansı ölçülerek absorbansa karşı derişim grafiği çizilmiştir.

##### 2.4.2. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine derişim etkisi

Bağlama kapasitesi çalışmasında standart Protein G'nin farklı derişimleri (65, 125, 265, 525, 1025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) kullanılmıştır. Bu çalışmada kolona verilmeden önce 2 mL örneğin 280 nm'deki absorbansı (ODi) ölçülmüş ve peristaltik pompa yardımıyla (Şekil 2.4) akış hızı 1 mL  $\text{dak}^{-1}$  olacak şekilde sürekli sistemde işlem 30 dak devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda kolondan çıkan örneğin 280 nm'deki absorbansı (ODf) ölçülerek işlem sonlandırılmıştır.



Şekil 2.4. Peristaltik pompa ile sürekli sistem

### **2.4.3. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine pH etkisi**

Bağlama kapasitesi üzerine pH etkisi çalışmalarında standart Protein G'nin 525 mg L<sup>-1</sup> derişimi kullanılmıştır. Bu çalışmada 2 mL örneğin kolona verilmeden önce 280 nm'deki absorbansı (ODi) ölçülmüş ve peristaltik pompa yardımıyla akış hızı 1 mL dak<sup>-1</sup> olacak şekilde sürekli sistemde işlem 30 dak devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda kolondan çıkan örneğin 280 nm'deki absorbansı (ODf) ölçülerek işlem sonlandırılmıştır. Bu çalışmada, tampon çözelti olarak 50 mM Glisin-HCl (pH 3); 50 mM Sitrat (pH 4-5); 50 mM fosfat (pH 6-7) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8-9) tamponları tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

### **2.4.4. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirlik çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 125 mg L<sup>-1</sup> derişiminde standart Protein G çözeltisi kullanılmıştır. 2 mL örnek kolona verdikten sonra sırasıyla örneğin 30 dak süre ile kolonda bekletilmesi, bağlanmayan maddelerin uzaklaştırılması, elüsyon işlemi ve kolonun rejenerasyonu işlemleri yapılmıştır.

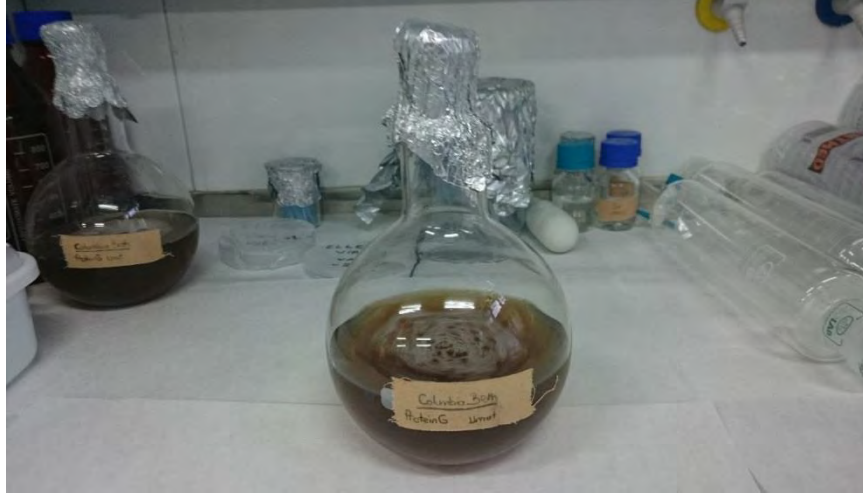
## **2.5. Poli(HEMA-ko-IgG) ile *S. equi*'den Protein G saflaştırılması**

Gerçek numuneden Protein G saflaştırılması işleminde sırasıyla bakterinin kültüre edilmesi, parçalanması, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-25 jel filtrasyon kromatografisi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ve poli(HEMA-ko-IgG) afinite kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır.

### **2.5.1. *S. equi*'nin kültüre edilmesi**

*S. equi*'nin kültüre edilmesi amacıyla Columbia Broth (Şekil 2.5) (Trypton 5 g L<sup>-1</sup>; Pepton 23 g L<sup>-1</sup>; Sodyum klorür 5 g L<sup>-1</sup>; Dekstroz 2,5 g L<sup>-1</sup>; L-sistin 0,1 g L<sup>-1</sup>; Magnezyum sülfat 0,1 g L<sup>-1</sup>; Demir (II) sülfat 0,02 g L<sup>-1</sup>; Tris (hidroksimetil) aminometan 0,83 g L<sup>-1</sup>; Tris (hidroksimetil) aminometan-HCl 2,86 g L<sup>-1</sup>; Sodyum karbonat 0,6 g L<sup>-1</sup>) kullanılmıştır. Besiyeri 121 °C sıcaklıkta 15 dak

süre ile otoklavlanarak steril edilmesi sağlanmış ve daha sonra *S. equi* besiyeri ortamına ekilerek 37 °C sıcaklıkta 120 rpm çalkalama hızında 24 s süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra bu ortam 14000 rpm devir hızında 15 dak santrifüj edilmiş ve çöken bakteri peleti ortamdaki alınıp bir sonraki çalışma için saklanmıştır.



Şekil 2.5. Columbia broth kültür ortamı

### 2.5.2. *S. equi*'nin parçalanması

Bakteriler parçalanmadan önce bakteri peleti önce üç kez 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile sonra içerisinde 1 M NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile iki kez ve son olarak tekrar 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile bir kez yıkanmıştır. Bakteri peleti 30 mL fosfat tamponunda süspansiyon edilerek sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. İşlem 60 W güç uygulaması ve 50 sn'lik 5 döngü şeklinde buz-su banyosunda yapılmıştır.

### 2.5.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

Amonyum sülfat yöntemi proteinlerin farklı iyonik şiddette çökme özelliğinden yararlanılarak yapılan bir ayırma işlemidir. Proteinler çok değerlikli elektrolitler olduğundan iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz derişimlerinde, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su

molekülleri, tuzdaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker. Bu çökmede molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla farklı tuz derişimlerinde farklı proteinler çöker (Lehninger ve ark. 1993).

Bu yöntemde önce % 0-30 arası doyurma için gereken  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı hesaplanmış ve süpernatant içerisine yavaş yavaş ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde buz-su banyosunda karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 14000 rpm devir hızında 30 dak süre ile santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve çökelek kısmı atılmıştır. Daha sonra % 30-70 arası doyurma yapmak amacı ile  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı hesaplanmış ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  elde edilen süpernatant kısmın üzerine manyetik karıştırıcı üzerinde düşük sıcaklıkta karıştırılarak ilave edilmiştir. 14000 rpm devir hızında 30 dak süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelek kısmı denatüre proteinlerden uzaklaştırıldıktan sonra kolon uygulaması için en az miktardaki 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) içinde çözülerek -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Kullanılan amonyum sülfat miktarı eşitlik (2.2)'ye göre hesaplanmıştır (Ninfali ve ark. 1990).

$$\text{Amonyum sülfat miktarı (g)} = [1.77 \times V \times (S_2 - S_1)] / (3.54 - S_2) \quad \dots\dots\dots(2.2)$$

V: Çözelti hacmi

S<sub>2</sub>: Son tuz yüzdesi

S<sub>1</sub>: İlk tuz yüzdesi

#### **2.5.4. Sephadex G-25 kromatografisi**

Bir miktar Sephadex G-25 alınarak hacminin 20 katı tamponun içerisine koyulmuş ve 90 °C sıcaklıkta 3 s bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra vakum altında gazı alınarak kolona doldurulmuştur.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  basamağında ortamda fazlaca kalan tuzların uzaklaştırılması için en ucuz ve kullanışlı olan bu yöntem seçilmiştir.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  basamağından elde edilen 2 mL örnek 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiş Sephadex G-25 (7 cm x 1 cm) kolona (Şekil 2.6) yüklenmiş ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı ile kolondan geçirilerek aktif fraksiyonlar toplanmıştır.





Şekil 2.6. Sphadex G-25 kolon sistemi

### 2.5.5. Sphadex G-100 kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisinde moleküllerin büyüklüklerinden yararlanılarak ayırma işlemi gerçekleştirilir. Bu çalışmada kolon dolgu maddesi olarak Sphadex G-100, kolon olarak ise 40 cm x 1,5 cm boyutlarında ceketli cam kolon seçilmiştir. Bir miktar Sphadex G-100 havası alınmış deiyonize su içinde 6 s bekletilerek bu maddenin şişmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra tekrar havası alınarak içinde deiyonize su bulunan kolona yavaş bir şekilde tatbik edilmiş ve dolgu maddesinin kolona yerleştirilmesinden sonra kolon (Şekil 2.7) 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiştir. En az miktardaki çözücüde çözülmüş olan protein çökeleği kolona enjekte edilmiş ve akış hızı  $30 \text{ mL s}^{-1}$  olacak şekilde ayarlandıktan sonra elüatlar toplanmıştır. Her bir tüpteki çözeltinin absorbanı ölçülerek derişime karşı grafiği çizilmiştir (Akel ve ark. 2009).





Şekil 2.7. Sephadex G-100 kolon sistemi

### 2.5.6. Poli(HEMA-ko-IgG) afinite kromatografisi

Saflaştırma işlemine geçilmeden daha önceden hazırlanmış olan kriyojel kolon 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiştir. Sephadex G-100 basamağından elde edilen fraksiyonun 2 mL'si kriyojel kolona yüklendikten sonra peristaltik pompa yardımıyla akış hızı 1 mL dak<sup>-1</sup> olacak şekilde 30 dak boyunca sürekli olarak kolondan geçirilmiştir. Daha sonra kolon 30 mL fosfat tamponu ile yıkanmış ve 50 mM Glisin-HCl tamponu (pH 2,5) ile kriyojele tutunan madde elüe edilmiştir. Elüant toplanarak daha sonraki işlem için kullanılmıştır.

### 2.5.7. Protein tayini

Örneklerin toplam protein içeriği Lowry (1951) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla ilk önce sığır serum albümin kullanılarak standart protein grafiği hazırlanmıştır.

Standart grafik oluşturmak amacı ile  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde sığır serum albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden sırasıyla 0, 25, 75, 125, 175, 250, 300  $\mu\text{L}$  alınarak deney tüplerinin içerisine koyulmuştur. Daha sonra her bir tüp üzerine sırasıyla 500, 475, 425, 375, 250, 200  $\mu\text{L}$  50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 8,4) eklenmiştir. Seyreltmeleri yapılmış örneklerin üzerine 5 mL % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  içerisinde % 1 Na-K tartarat ve % 0,5  $\text{CuSO}_4$  içeren çözeltiden eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. Vorteks üzerinde karıştırılan her bir tüp üzerine 500  $\mu\text{L}$  0,5 N Folin belirteci ilave edilmiştir. 30 dak oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildikten sonra 660 nm'de kör çözeltisine karşı absorbans değeri ölçülmüştür (Temizkan ve Arda, 2008).

Örneklerin protein içeriği belirlenirken örnek çözeltisinden 500  $\mu\text{L}$  alınarak deney tüpünün içerisine koyulmuş ve üzerine 5 mL % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  içerisinde % 1 Na-K tartarat ve % 0,5  $\text{CuSO}_4$  içeren çözeltiden eklendikten sonra 10 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 500  $\mu\text{L}$  0,5 N Folin belirteci vorteks üzerinde karıştırılarak ilave edilmiş ve 30 dak oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildikten sonra 660 nm'de kör çözeltisine karşı absorbans değeri ölçülmüştür. Standart grafikten yararlanılarak örneğin protein miktarı hesaplanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

#### **2.5.8. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE analizi Laemmli (1970) metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla % 15'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. Örnekler ve standart protein karışımı yükleme jeline uygulandıktan sonra sistemden 16 mA akım geçecek şekilde güç kaynağına bağlanarak boya, ayırma jeline geldiğinde akım 30 mA olacak şekilde ayarlanmıştır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tank içerisinden çıkarılarak fiksatif içinde 2 s boyunca 20 rpm hızında çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra fiksatif dökülmüş ve Coomassie boyama amacıyla boya çözeltisi eklenmiştir. 30 dak bekledikten sonra boya çözeltisi dökülmüş ve fiksatif ile kısa bir süre çalkalanmıştır. Fiksatif dökülerek yerine yıkama çözeltisi koyulmuş ve 2 s süreyle hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra elde edilen bantların fotoğrafları çekilmiştir.

### **2.5.9. Aglutinasyon testi**

Uygun miktardaki örnek ve fosfat tamponu, IgG (human serum) ile dış ortamda karıştırılmış ve 30 dak 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her iki tüpteki çözeltinin bulanıklığı karşılaştırılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Poli(HEMA-ko-IgG) Sentezi

Poli(HEMA-ko-IgG) Bölüm 2.2.3.'de anlatıldığı gibi sentezlenmiştir. Adsorbsiyon testlerinde kontrol olarak kullanılmak üzere poli(HEMA) kriyojel kolonun sentezi de aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.1. N-metakriloil-L-triptofan karakterizasyonu

Sentezlenen monomere ait verim yüzdesi % 85 olup <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR sonuçları aşağıdaki gibi bulunmuştur.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- d<sub>6</sub>), δ: 10.7 (s, 1H), 7.45 (d, 1H, J= 7.89 Hz), 7.22-7.38 (m, 2H), 6.96-7.1 (m, 2H), 6.87 (t, 1H, J= 7.40, 14.86Hz), 5.48 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.05 (dd, 1H, J= 4.80, 9.70Hz), 3.28 (dd, 1H, J= 4.60, 14.16Hz), 3.09 (dd, 1H, J= 4.60, 14.16Hz), 1.78 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ: 19.0, 27.5, 55.5, 111.5, 112.0, 118.5, 119.0, 119.5, 121.0, 124.0, 129.0, 136.0, 141.0, 166.0, 173.5 ppm (Say 2011).

##### 3.1.2. Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomeri bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-ruthenium (II) karakterizasyonu

Bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum (II) aminoasit monomeri sentezlendikten sonra karakterizasyon işlemlerinde erime noktası tayini, elementel analiz, <sup>1</sup>H-NMR ve MALDI-TOF-MS kullanılmıştır.

Bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum (II) aminoasit monomerine ait erime noktası 200 °C üzerinde bulunmuştur.

C<sub>35</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Ru için elementel analiz sonuçları; % 61,97 (C), % 4,3 (H), % 10,8 (N) şeklinde olup hesaplanan değerler % 62,82 (C), % 4,85 (H), % 11,72 (N) şeklindedir.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ppm: 10.74 (d, 2H, J= 14.9 Hz), 9.76 (s, 1H), 7.99 (d, 1H, J= 7.68 Hz), 7.91 (d, 1H, J= 7.57 Hz), 7.54 (d, 2H, J= 7.94 Hz), 7.46 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.31 (t, 4H, J=6.76 Hz), 7.16 (s, 1H), 7.1 (d, 2H, J= 11.7

Hz), 7.07-7.00 (q, 5H, J= 8.0 Hz), 5.6(d, 2H, J= 6.6 Hz), 5.3 (s, 2H), 4.57(m, 1H, 4.39(m, 2H), 1.24 (s, 3H).

MALDI-TOF-MS: 79 ve 155 m/e değerlerindeki iyon pikleri bipridil, 272, 373, 413, 529 ve 685'teki pikler sırasıyla RuCl, RubpyCl, Ru(bpy)<sub>2</sub>, ve Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl'e aittir. 272, 408, 529 ve 564 değerleri ise yapıda sırasıyla MATrp, Ru-MATrp, Ru(bpy)<sub>2</sub>, Ru(bpy)-MATrp ve Ru(bpy)<sub>2</sub> MATrp varlığına işaretler (Say 2011).

### 3.2. Kriyojelin karakterizasyonu

Kriyojellerin karakterizasyon işlemleri Bölüm 2.3.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

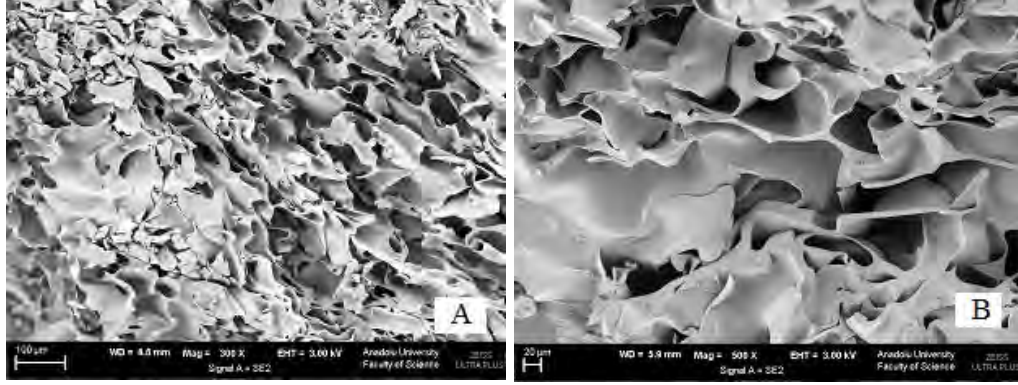
#### 3.2.1. Şişme testi

Saflaştırma ve karakterizasyon için hazırlanmış olan poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonlardan küçük birer parça alınmış ve kurutulmuştur. Kuru ağırlıkları sırasıyla,  $W_{0[\text{poli(HEMA)}}]$  ve  $W_{0[\text{poli(HEMA-ko-IgG)}}$ , 0,103 g ve 0,117 g olarak bulunmuştur. Kriyojeller bir miktar saf suya maruz bırakıldıktan sonra emilmeyen suyun fazlası ortamdan uzaklaştırılmış ve tekrar tartılmıştır. Şişmiş kriyojellerin ağırlıkları sırasıyla,  $W_{1[\text{poli(HEMA)}}]$  ve  $W_{1[\text{poli(HEMA-ko-IgG)}}$ , 1,19 g ve 1,12 g olarak bulunmuştur. Eşitlik (2.1) kullanılarak hesaplanan şişme dereceleri sırasıyla 10,6 ve 8,57'dir.

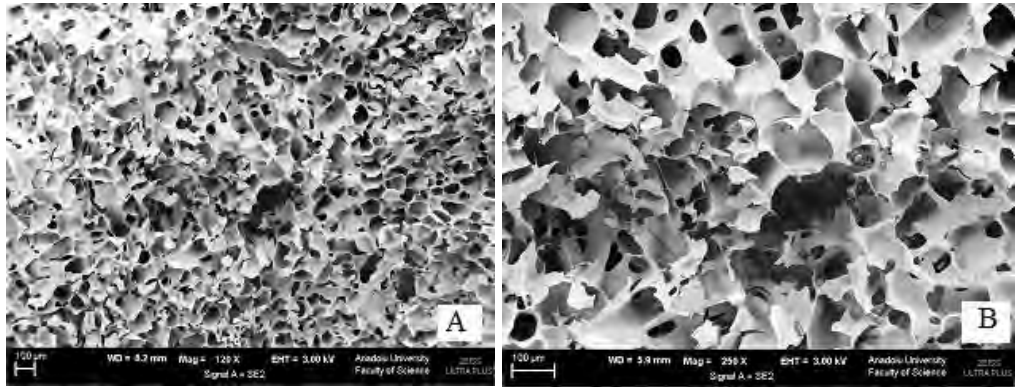
#### 3.2.2. Elektron mikroskobu ile yüzey morfolojisinin incelenmesi

Poli(HEMA) (Şekil 3.1) ve poli(HEMA-ko-IgG) (Şekil 3.2) kriyojel numunelerine ait SEM görüntüleri aşağıdadır. Kriyojel morfolojisine ait gözenek yapısı her iki numune için de beklenen gibidir. Gözenek büyüklüğü ortalama 10-200 µm arasındadır. Dainiak ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada kriyojeller için gözenek büyüklüğü ortalama 10-200 µm'dir. Bu değerler bizim verilerimizle uyumluluk göstermektedir. Fotosensitif amino asit monomeri bis(2,2'-

bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum (II) ile hazırlanan poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelinin gözenek büyüklüğünde herhangi bir azalma görülmemiştir.



Şekil 3.1. (A) ve (B) Poli(HEMA) kriyojeline ait SEM görüntüleri

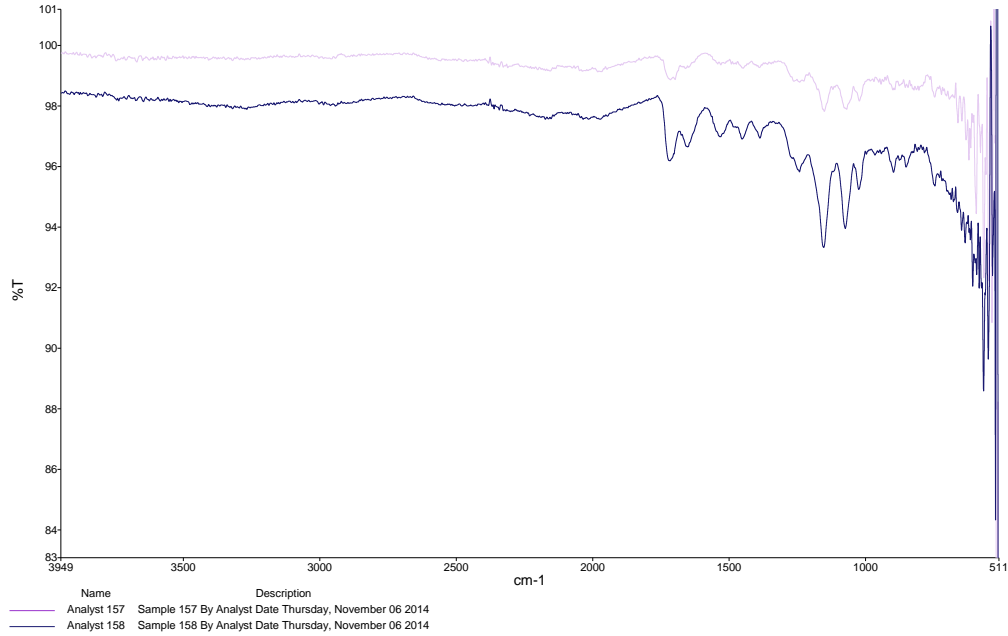


Şekil 3.2. (A) ve (B) Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojeline ait SEM görüntüsü

### 3.2.3. FT-IR spektroskopisi

Bölüm 2.3.3. içerisinde anlatıldığı üzere FT-IR ile karakterize edilen poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojeline ait spektrumlar Şekil 3.3'te verilmiştir. Şekil 3.3.'de görüleceği gibi poli(HEMA)'ya ait karakteristik bantlar  $3411\text{ cm}^{-1}$ 'de (-OH gerilme),  $1728\text{ cm}^{-1}$ 'de (C=O gerilme),  $2948\text{ cm}^{-1}$ 'de ( $\text{CH}_2$  gerilme) ve  $1248\text{-}850\text{ cm}^{-1}$  (C-O ve C-O-C gerilme frekansları) aralığında gözlenmiştir. Poli(HEMA)'nın yapısında amid grubu bulunmamaktadır. Bununla birlikte  $1658\text{ cm}^{-1}$ 'da görülen zayıf amid-I bandı (-CONH), Poli (HEMA)'nın polimerizasyonunda kullanılan metilen bisakrilamite aittir. Poli(HEMA-ko-

IgG'nin yapısında bulunan antikora ait amino asitlere ait karboksilik asitlerin hidroksil bandı  $3300\text{ cm}^{-1}$  civarındaki genişlemeden anlaşılmaktadır.



Şekil 3.3. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel numunesine ait FT-IR spektrumu

### 3.2.4. Poli(HEMA-co-IgG) kriyojelinin yüzey alanı ölçümü

Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonunun BET cihazı ile yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu spesifik yüzey alanı  $94\text{ m}^2\text{g}^{-1}$  polimer bulunmuştur.

## 3.3. Adsorbsiyon Çalışmaları

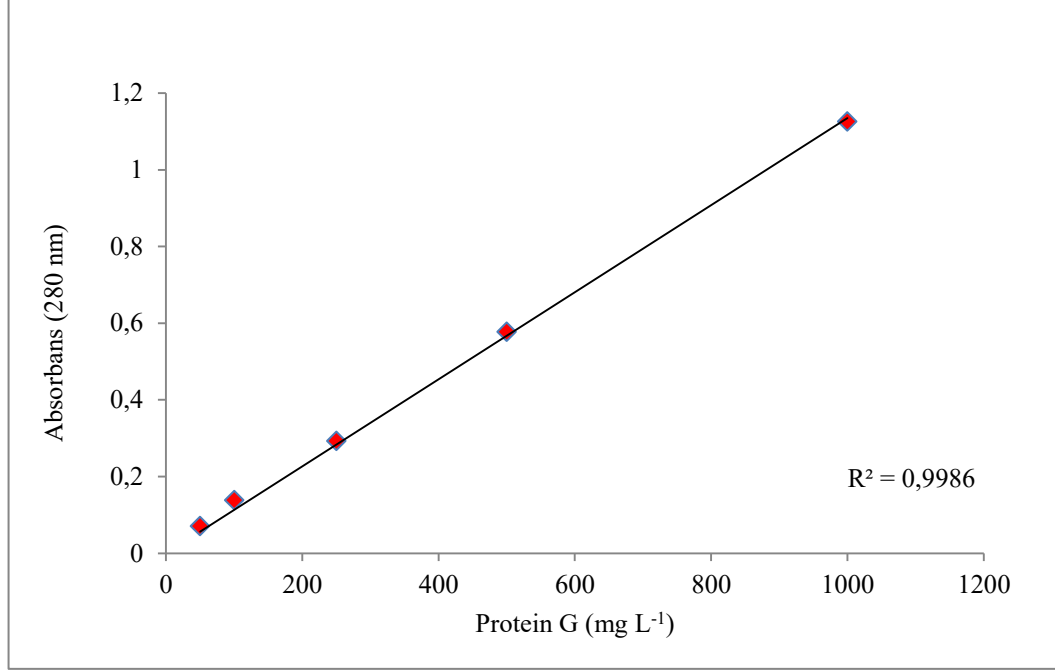
Adsorbsiyon çalışmaları kapsamında önce Protein G standart grafiği çizilmiş daha sonra sentezlenen poli(HEMA), poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelleri için Protein G'nin farklı derişim ve pH değerlerinde adsorbsiyon çalışması yapılmıştır.

### 3.3.1. Protein G standart grafiği

Bölüm 2.4.1. içerisinde anlatıldığı gibi ölçülen absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 3.4'de verilen grafik elde edilmiştir.

Grafikten gözükmele birlikte  $R^2 = 0,9986$  olup aşağıdaki eşitlik (3.1) elde edilmiştir.

$$y = 0,0011x \dots\dots\dots(3.1)$$

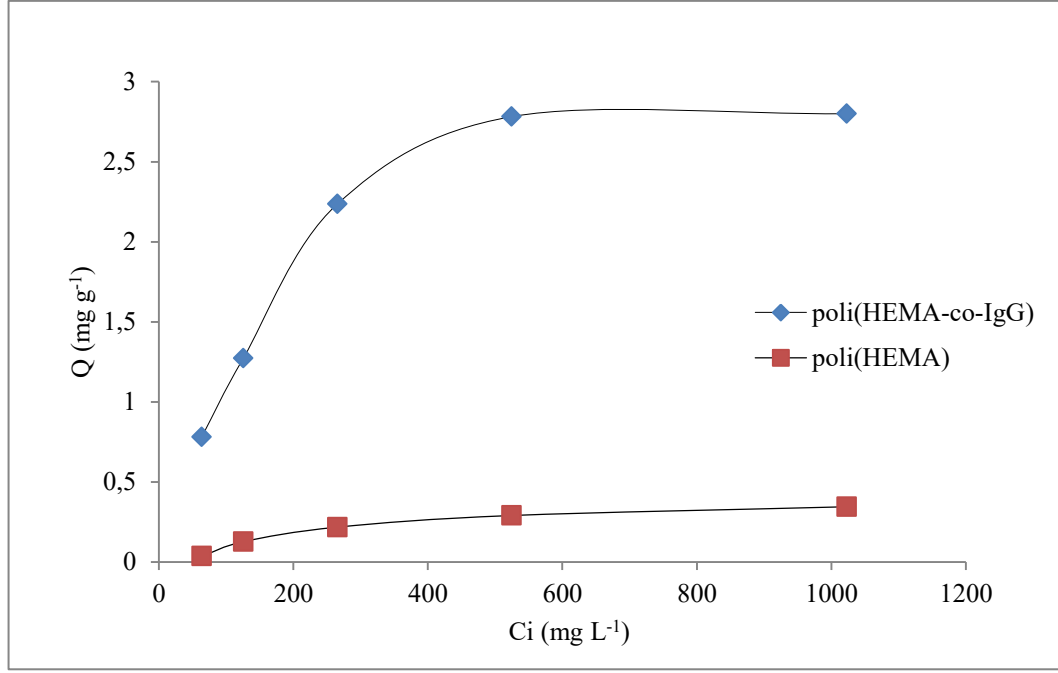


Şekil 3.4. Protein G standart grafiği

### 3.3.2. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine derişim etkisi

Şekil 3.5.'te görüldüğü üzere Poli(HEMA) kriyojel kolonun bağlama kapasitesi Protein G'nin derişimi arttıkça herhangi bir değişiklik göstermeksizin poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun bağlama kapasitesi maksimum noktasına kadar artış göstermiş ve bu noktadan sonra sabit kalmıştır. Hazırlanan bu poli(HEMA-ko-IgG) kriyojelinin  $Q_{max}$  (maksimum bağlama kapasitesi) değeri  $2,78 \text{ mg}_{(\text{Protein G})}/\text{g}_{(\text{polimer})}$  olarak bulunmuştur. Kolon ortamına gönderilen standart Protein G molekülünün % 33'ünü bağlamış olup 1 g'lık bir kolon dolgu materyali ile 2,78 mg Protein G molekülü saflaştırılabilir.

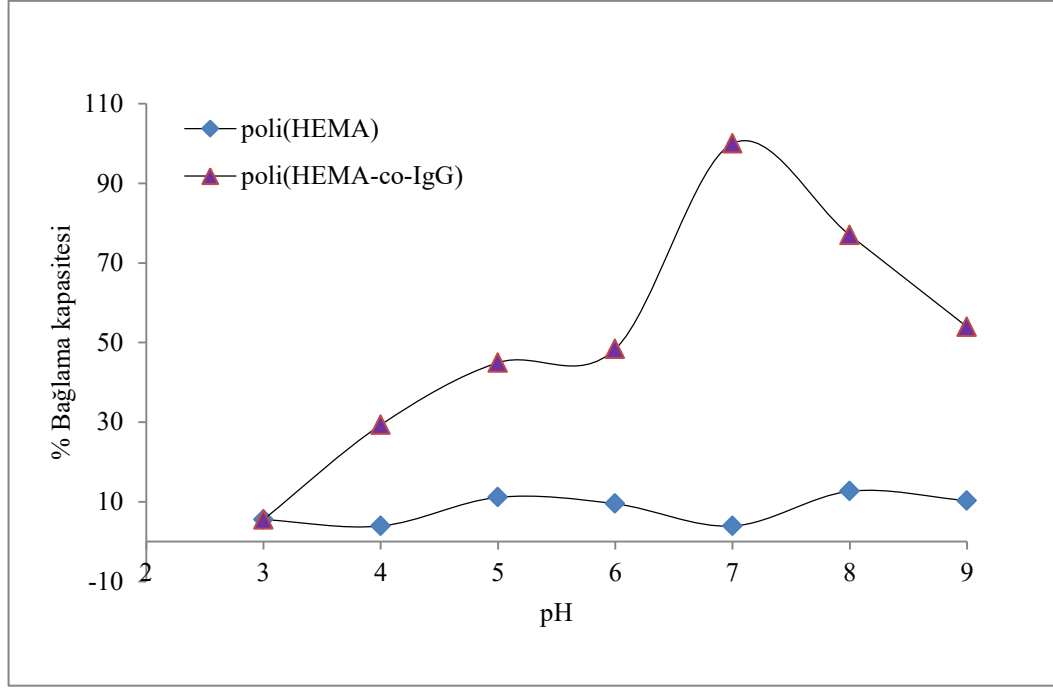




Şekil 3.5. Derişim-Protein G bağlama kapasitesi ilişkisi

### 3.3.3. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun Protein G bağlama kapasitesi üzerine pH etkisi

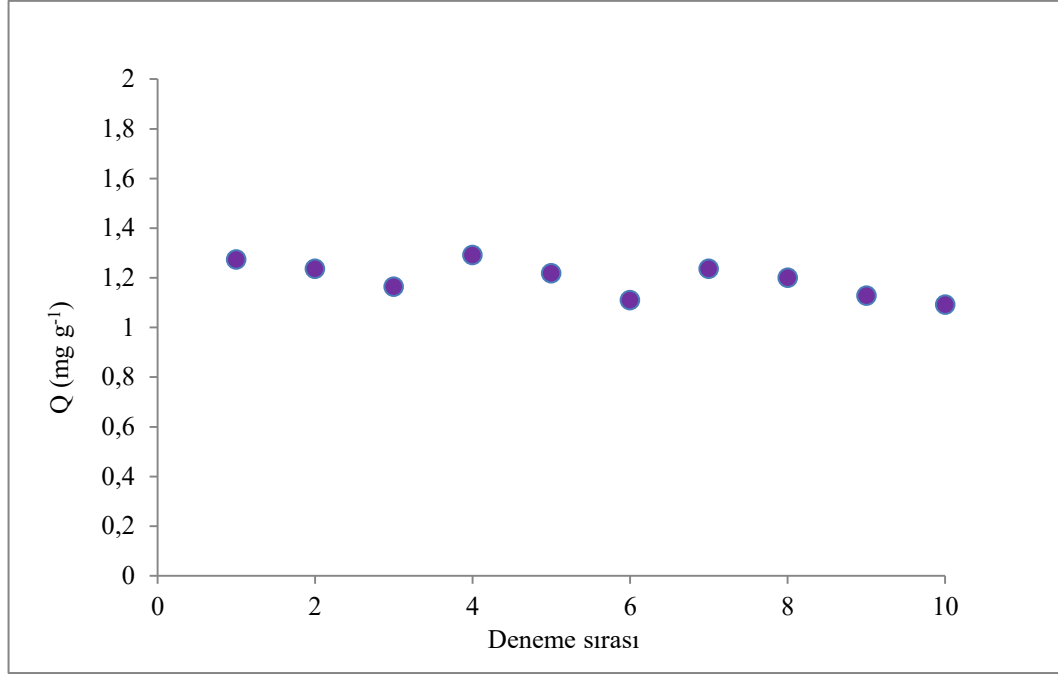
Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun bağlama kapasitesi pH ile oldukça değişim göstermektedir. Şekil 3.6.'da görüldüğü üzere en yüksek bağlama yüzdesi pH 7-8 aralığında olmuştur. En düşük bağlanma pH 3 civarında gerçekleşmiştir. Bu nedenle *S. equi*'den Protein G saflaştırma işlemlerinde bağlama tamponu olarak 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ve elüsyon çözeltisi olarak 50 mM Glisin-HCl tamponu (pH 2,5) seçilmiştir.



Şekil 3.6. pH-Bağlama kapasitesi (%) ilişkisi

### 3.3.4. Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirlik çalışması

Poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolonun standart Protein G ile yapılan tekrarlanabilirlik çalışması 10 kez denenmiştir. Şekil 3.7.'den açıkça görüldüğü gibi bu denemeler sonunda kolonun bağlama kapasitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sırasında kolonun bağlama kapasitesindeki değişiklik ilk ölçüme göre +% 1,4 ve -% 14,3 arasında değişmektedir.



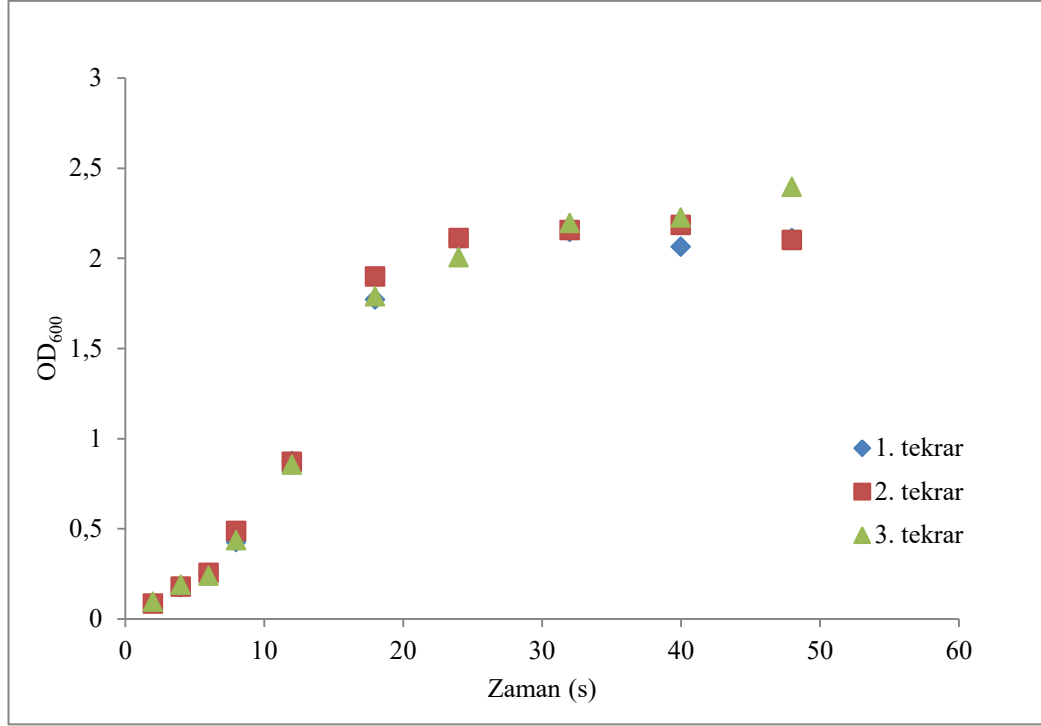
Şekil 3.7. Tekrarlanabilirlik-Bağlama kapasitesi ilişkisi

### 3.4. Poli(HEMA-ko-IgG) ile *S. equi*'den Protein G saflaştırılması

Protein G saflaştırılması için öncelikle Türkiye Halk Sağlığı Kurumundan temin edilen *Streptococcus equi* Columbia broth ortamında geliştirilmiş daha sonra hücreler parçalanarak yüzey proteinleri açığa çıkarılmış ve sırasıyla  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi, Sephadex G-25 jel filtrasyon kromatografisi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ve poli(HEMA-ko-IgG) afinite Kromatografisi yapılmıştır.

#### 3.4.1. *S. equi*'nin kültüre edilmesi

*S. equi*'nin üremesi uygun bir şekilde gerçekleşmiş olup üreme zaman ilişkisi Şekil 3.8.'deki grafikte gösterilmiştir. Bu grafiğe göre 0-20 saatler arasında üreme hızlı bir şekilde gerçekleşmiş olup bu saatten sonra durağan faza geçmiştir.



Şekil 3.8. Bakteri üreme grafiği

### 3.4.2. *S. equi*'nin parçalanması

Bölüm 2.5.2. içerisinde anlatıldığı üzere bakteri parçalanmıştır. Bu işlemden sonra elde edilen süpernatant içerisindeki protein derişimi Lowry metoduna göre hesaplanmış olup  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  civarındadır. Elde edilen bu değer bakterinin parçalanmasından sonra ortamdaki protein miktarını ifade etmektedir.

### 3.4.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

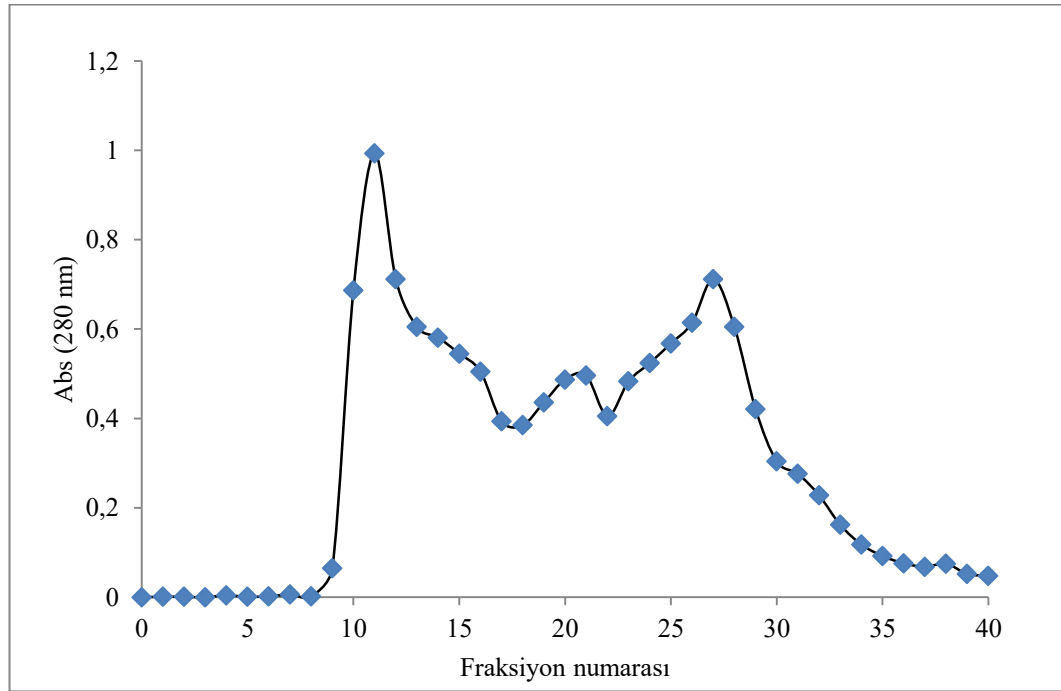
Parçalanmadan sonraki çözelti içerisindeki protein  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi ile deriştirilmiştir. Minimum miktardaki tampon çözelti içerisinde çözülen numunedeki denatüre olmuş proteinler santrifüj yöntemiyle ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı  $3,4 \text{ g L}^{-1}$  civarındadır. Bakterinin parçalanmasından sonra L başına düşen protein miktarı yaklaşık 2,8 kat arttırılmıştır.

### 3.4.4. Sephadex G-25 kromatografisi

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi basamağında kalan fazla tuzlar ve küçük yapıdaki proteinler örneğin bu kolondan geçirilmesi ile uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla örneğin kolona verilmeden önceki ve kolondan çıktıktan sonraki absorbans ve iletkenlik değerleri ölçülmüş olup bu değerlerde başlangıç ölçümlerine oranla azalma gözlenmiştir.

### 3.4.5. Sephadex G-100 kromatografisi

Sephadex G-25 kromatografisinden sonra liyofilize edilmiş örnek en az miktardaki pH'sı 7,5 fosfat tamponunda çözülerek Sephadex G-100 kolona yüklenmiş ve Şekil 3.9.'da verilen kromatogram elde edilmiştir. Fraksiyonlar 9-18, 19-22 ve 23-32 olmak üzere 3 ana grupta toplanmış ve her bir grup için aglütinasyon testi uygulanmıştır. 19-22 arası fraksiyonlar IgG ile reaksiyon verdiği için afinite kromatografisi basamağında bu grup ile çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 3.9. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatogramı

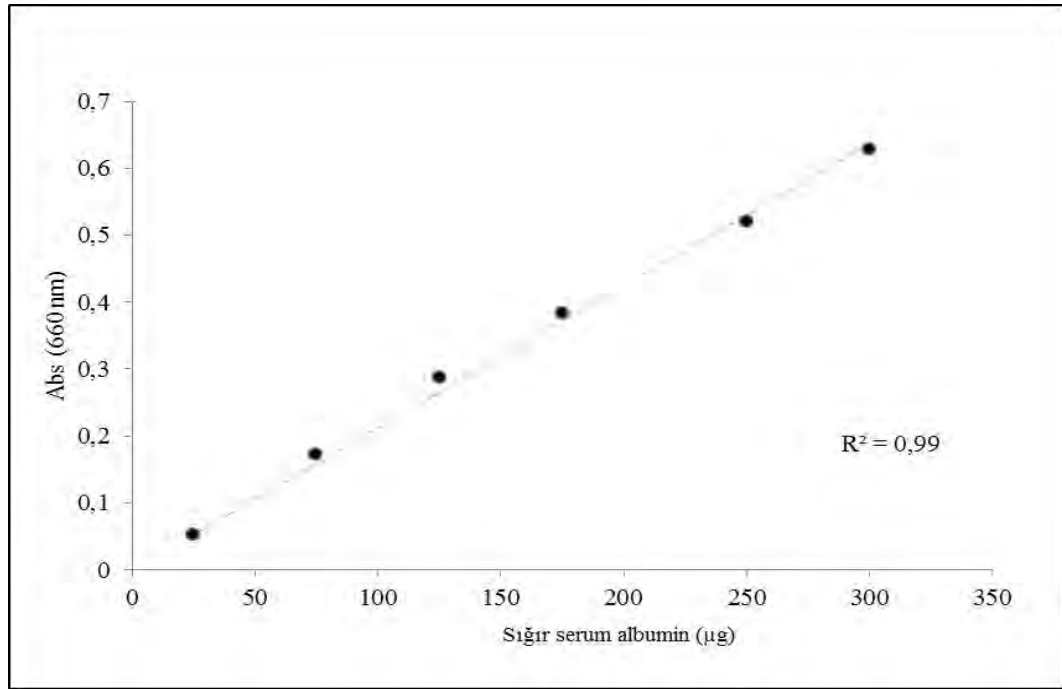
### 3.4.6. Poli(HEMA-ko-IgG) afinite Kromatografisi

Bölüm 2.5.6.'da anlatıldığı gibi afinite kromatografisi işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolona bağlanan Protein G 50 mM Glisin-HCl (pH 2,5) tamponu ile elüe edilmiş ve SDS-PAGE ile analiz edilmiştir.

### 3.4.7. Protein tayini

Lowry yöntemine göre sığır serum albüminin standart olarak kullanılmasıyla elde edilen grafiğe ait denklem eşitlik (3.2)'de gösterilmiş olup bu grafiğe ait  $R^2 = 0,99$  olarak bulunmuştur. Toplam proteinin kantitatif miktarı eşitlik (3.2)'ye göre hesaplanmıştır

$$y = 0,00212x \dots\dots\dots(3.2)$$

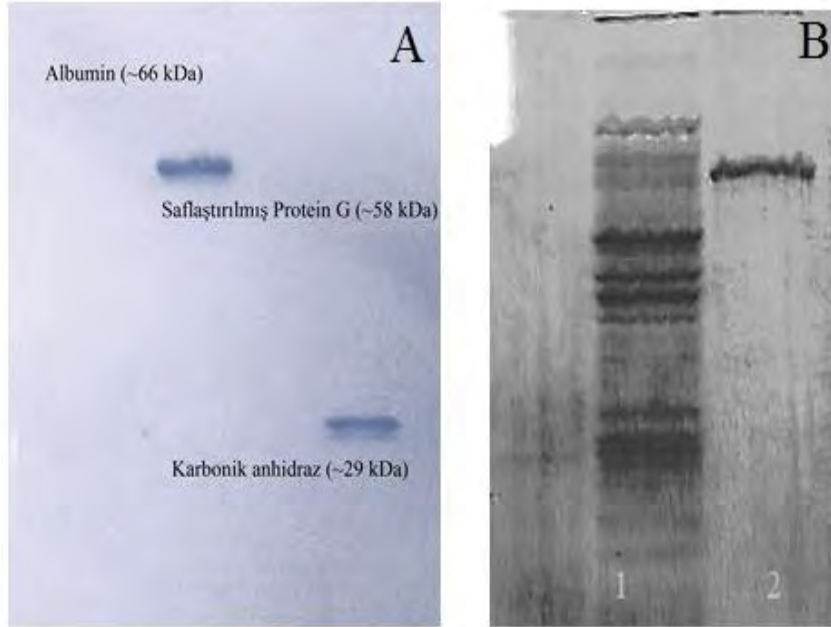


Şekil 3.10. Bovine serum albümin standart grafiği

### 3.4.8. Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

% 15'lik ayırma jeli üzerinde yapılan SDS-PAGE işleminde aşağıdaki bantlar elde edilmiştir. Şekil 3.11-A üzerinde sığır serum albümin (~66 kDa),

karbonik anhidraz (~29 kDa) ve saflaştırılmış Protein G (~58 kDa) gösterilmiştir. Şekil 3.11-B üzerinde 1 numaralı hat bakterinin parçalanmasından sonra protein profilini gösterirken 2 numaralı hat saflaştırılmış protein G'yi göstermektedir.



Şekil 3.11. SDS-PAGE analizi ile örneklerin görüntülenmesi

### 3.4.9. Aglütinasyon testi

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen Protein G 0,5 mL'lik tüp içerisinde IgG çözeltisiyle etkileştirilmiş ve IgG ile reaksiyon verdiği için bulanıklık oluşturduğu gözlenmiştir. Şekil 3.12.'de 1. tüp içerisinde fosfat tamponu+IgG ve 2. tüp içerisinde saflaştırılmış örnek+IgG bulunmaktadır.



Şekil 3.12. Saflaştırılan örneğin IgG ile aglütinasyonu

#### 4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Protein G, saflaştırılması oldukça zor olan hücre duvarı proteinidir. Kalın peptidoglikan tabakasına gömülü olması bu proteinin serbest kalmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Proteinin çözünür hale getirilmesinde kullanılan yöntemler bu proteinin denatüre olmasına neden olduğu için saflaştırma sonunda verimi düşürmektedir (Guss ve ark., 1986). Literatürde bu proteinin saflaştırılması için izlenen stratejiler çok çeşitlilik göstermemektedir.

Protein G saflaştırılması için kullanılan ticari materyal çeşitlerinin az ve pahalı ve tekrar kullanılabilirliklerinin düşük olması, yurtdışından ülkemize nakil esnasında uygun koşullarda taşınamamaları, viskozitesi yüksek ortamlarda bu kolon dolgu maddelerinin performanslı çalışmaması bizleri yeni materyal sentezlemeye teşvik etmiştir.

Bu çalışmada, öncelikle Protein G'nin afinitesinin yüksek olduğu IgG (human serum) seçilmiştir (Akerström ve Björck, 1984). Say ve ark. (2011) tarafından sentezlenen, bir fotosensitif aminoasit monomeri olan bis(2,2'-bipiridil)MATrp-MATrp-rutenyum(II) kompleksi, yeni kolon sentezlememiz esnasında hem monomer hem de çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Sentezlenen poli(HEMA-ko-IgG) yapısal olarak elektron mikroskobu, şişme testi ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. SEM ile yüzey morfolojisi incelemeleri sonucunda kriyojelin makro gözenekleri açıkça görülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda gözenek büyüklüğü ortalama olarak 10-200 µm arasında bulunmuştur. Bu gözenek büyüklüğü Dainiak ve ark. (2005) yaptığı çalışma ile uyumluluk göstermektedir ve bu sayede kolon içerisindeki akış çok rahat bir şekilde gerçekleşmiştir. Kontrol grubu olarak sentezlenen poli(HEMA) ve saflaştırma materyali olarak sentezlenen poli(HEMA-ko-IgG)'nin şişme testleri sonucunda şişme dereceleri sırasıyla 10,6 ve 8,57 g<sub>(H2O)</sub> g<sup>-1</sup><sub>(polimer)</sub> olarak bulunmuş olup hidrofilitelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Tamahkar ve ark. (2014) poli(HEMA) kriyojelleri ile yaptığı çalışmada poli(HEMA-MAH) kriyojeline ait şişme derecesini 6,97 g<sub>(H2O)</sub> g<sup>-1</sup><sub>(polimer)</sub> olarak bulmuşlardır. Bu değer bizim poli(HEMA) ve poli(HEMA-ko-IgG) için bulduğumuz değerler ile uyumluluk göstermektedir. Poli(HEMA-ko-IgG)'nin yapısında kullanılan



fotosensitif amino asit monomeri aynı zamanda çapraz bağlayıcı olarak görev yaptığı için kriyojel iskeletini sıkılaştırmış ve şişme derecesini bir miktar azaltmıştır. Kolonun bağlama kapasitesi çalışmaları rekombinat Protein G kullanılarak yapılmıştır. Derişimin bağlama kapasitesi üzerine etkisi incelenmiş ve poli(HEMA) kriyojel ile kıyaslanmıştır. Poli(HEMA-ko-IgG)'ye ait bağlama kapasitesi  $2,78 \text{ mg}_{(\text{Protein G})}/\text{g}_{(\text{polimer})}$  olarak bulunmuştur. Literatürde kolon maddesinin bağlama kapasitesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmadığı için kıyaslama yapılamamıştır. Antikor yönlendirmesi yapıldığı takdirde bağlama kapasitesinin artacağı düşünülmektedir. Protein G'nin IgG (human serum) ile optimum olarak pH 3-10 arasında bağlanacağı bilinmektedir (Akerström ve Björck, 1986). Yaptığımız pH-bağlama kapasitesi çalışmasında bağlanma için en uygun pH'nın 7-8 aralığında olduğu bulunmuştur. Bu değer, literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında kolon 10 kez aynı koşullarda kullanılmıştır. Yapılan tekrarlar arasında ilk ölçüme göre bağlama kapasitesinde sadece +% 1,4 ve -% 14,3'lük bir fark gözlenmiştir. Bu durum kolonun bağlama kapasitesinde önemli bir azalmanın olmadığını ve tutarlı çalıştığını açıkça göstermiştir.

Gerçek numune çalışmamızda, *S. Equi*, Columbia Broth besiyerinde kültüre edilmiş, hücre duvarı sonikatör ile parçalanmış, ortamdaki proteinler amonyum sülfat çöktürmesi ile çöktürülmüş, küçük proteinler ve ortamdaki fazla tuz Sephadex G-25 ile uzaklaştırılmış, en son Sephadex G-100 kullanılarak ön saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ön saflaştırmadan sonra elde edilen numune fotosensitif monomerler kullanılarak ANADOLUCA yöntemiyle sentezlenmiş poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolondan geçirilmiş ve Protein G saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış Protein G'nin saflığı SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiştir. Şekil 3.11-A'daki Protein G'ye ait tek bant molekülün yüksek saflıkta olduğunu açıkça göstermiştir. Buradan örneğin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 58 kDa olarak bulunmuştur. Şekil 3.11-B'de 1. hattaki ham numuneye ait profil ile 2. hatta saflaştırdığımız numuneye ait profil saflaştırmada kullandığımız yöntemin ve materyalin doğru olduğunun bir kanıtıdır. Çalışmamızda kullandığımız poli(HEMA-ko-IgG) kriyojel kolon gerçek numunedan Protein G

saflaştırmasında defalarca kullanılmış ve analizler için yeterli numuneyi bize sağlamıştır.

Gerçek numuneden Protein G saflaştırılmasına ilişkin literatür bilgileri mevcuttur. Sjöbring ve ark. (1990), Protein G saflaştırılması çalışmasında öncelikle insan bademciklerinden G ve C grubu Streptokoklar izole etmişlerdir. Elde ettikleri izolatları Todd-Hewitt broth besiyerinde kültüre etmişler, bakterileri ısı müdahalesi ile parçalamışlardır. Sephadex G-200 ve IgG-Sepharose ticari kolon dolgu materyallerini kullanarak Protein G'yi saflaştırmışlardır. 31 izolat üzerinde yaptıkları çalışmada 40, 58 ve 65 kDa ağırlıklarında üç farklı Protein G molekülü elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz 58 kDa'luk Protein G Sjöbring ve ark. (1990) C grubu Streptokoklardan elde ettiği Protein G ile uyumluluk göstermektedir.

Guss ve ark. (1986), G grubu Streptokoklardan Protein G saflaştırılması yapmışlardır. Bu amaçla büyük miktarlarda bakteri kültür etmişlerdir. Hücre duvarını papain enzimiyle parçalayarak polipeptidleri açığa çıkarmışlar ve IgG-Sepharose 4B ticari kolon materyali kullanarak Protein G'yi saflaştırmışlardır. Bu çalışmada elde ettikleri elüatlardaki proteinlerin molekül ağırlığı ~12-30 kDa olarak bulunmuştur. Yaptıkları bu çalışmada kullandıkları yöntemlerin, ürünlerinin heterojen olmasına ve verimlerinin düşmesine neden olduğunu ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen ürün homojen olarak tek bir bant halinde elde edilmiştir. Kullandığımız saflaştırma adımları sonucunda elde edilen ürün IgG (human serum) ile etkileştirilmiş ve çökme reaksiyonu vermiş olup saflaştırdığımız Protein G'nin çalıştığını göstermektedir.

Tez kapsamında yaptığımız bu çalışma; kullandığımız fotosensitif monomer ve çapraz bağlayıcının bundan sonraki diğer Protein G saflaştırmaları için yeni bir materyal olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Daha fazla serbest antijen bağlama bölgesi açıkta bırakmak amacıyla antikor yönlendirmesi yapılarak saflaştırma veriminin arttırılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Akel, H., Al-Quadan, F., Yousef, T.K. (2009), *Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic Bacillus Strain HUTBS71*, *European Journal of Scientific Research*, 31(2), 280-288.
- Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L. (1985), *Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies*. *J Immunol.*, 135(4):2589-92.
- Akerström, B., Björck, L. (1986), *A Physicochemical Study of Protein G, a Molecule with Unique Immunoglobulin G-binding Properties*, *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 10240-10247.
- Anonim 2011, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=186&sim=319&cnt=1>
- Anonim 2012, *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*, [http://www.babec.org/files/GFP\\_Labs\\_2012/PAGEAnalysis\\_SV.pdf](http://www.babec.org/files/GFP_Labs_2012/PAGEAnalysis_SV.pdf)
- Björck, L., Kronvall, G. (1984), *Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent*, *J Immunol.*;133(2):969-74.
- Blagoi, G., Keller, S., Johansson, A., Boisen, A., Dufva, M. (2008), *Functionalization of SU-8 photoresist surfaces with IgG proteins*. *Appl Surf Sci*, 255:2896-2902.
- Boyle, M.D.P., *Bacterial Immunoglobulin Binding Proteins*, Academic press, San Diego, 1990.
- Burgess, A., Mornon, J.P., de Saint-Basile, G., Callebaut, I. (2009), *A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family*, *Bioinformatics*. 15;25(10):1219-1222.
- Burgess, R.R., Deutscher, M.P. *Methods In Enzymology Guide To Protein Purification, 2nd Edition*, San Diego, CA: Academic Press, 2009.
- Cabeen, M.T., Jacobs-Wagner, C. (2005), *Bacterial cell shape*, *Nature Reviews Microbiology*, 3, 601-610.
- Cabrera, K.E., Wilchek, M. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, 19 (1988) 145.
- Cengiz A.T. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
- Costantino, H.R., Pikal, M.J. (2004), *Lyophilization of biopharmaceuticals*, Arlington, VA, AAPS Press, 2004.
- Dainiak, M. B., Plieva, F. M.; Galaev, I. Y., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (2005), *Cell chromatography: separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns*, *Biotechnol.Prog.*, 2, 644-649.

- Ehrhart, J.C., Bennetau, B., Renaud, L., Madrange, J.P., Thomas, L., Morisot, J., Brosseau, A., Allano, S., Tauc, P., Tran, P.L. (2008), *A new immunosensor for breast cancer cell detection using antibody-coated long alkylsilane self-assembled monolayers in a parallel plate flow chamber*, *Biosens Bioelectron.* 15;24(3):467-474.
- Eliasson M, Andersson R, Olsson A, Wigzell H, Uhlén M. (1989), *Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG*, *J Immunol.*,142(2):575-81.
- Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, Lindberg M, Uhlén M. (1988), *Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G*, *J Biol Chem.*, 263(9):4323-7.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*, St. Louis, Mosby, 2002.
- Forsgren, A., Sjoquist, J. (1966), *Protein A from S. aureus. I. Pseudo-immune reaction with human  $\gamma$  globulin*, *J. Immunol.* 97:822-827.
- Frick, I.-M., Wikström, M., Forsén, S., Drakenberg, T., Gomi, H., Sjöbring, U., Björck, L. (1992) *Convergent evolution among immunoglobulin G-binding bacterial proteins*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8532–8536.
- Gebbert, A., Alvarezicaza, M., Stocklein, W., Schmid, R.D. (1992), *Real-time monitoring of immunochemical interactions with a tantalum capacitance flow-through cell*. *Anal Chem*, 64:997-1003.
- Glassy, M.C., Dillman, R.O. (1988), *Molecular biotherapy with human monoclonal antibodies*, *Mol. Biother.*, L 7-13.
- Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., B.J., Sutton, Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., Silverman, G.J. (2000), *Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity*, *Biological Sciences - Immunology*, 97 (10) 5399-5404.
- Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlén, M., Frej, A.K., Jörnvall, H., Flock, J.I., Lindberg, M. (1986), *Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G*, *EMBO J*, 5(7), 1567-1575.
- Hermanson, G.T. *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego, CA: Academic Press; 1992.
- Jennings, T.A. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*, US, CRC Press. 1999.

- Josic, D., Buchacher, A. ve Jungbauer, A. (2001), “*Monoliths as stationary phases for separation of protein and polynucleotide and enzymatic conversion*”, *J.Chromatogr.B.*,752, 191-205.
- Jungbauer, A., Hahn, R. (2009), *Ion-exchange chromatography, Methods in Enzymology*, 463, 349-371.
- Kato, K., Lian, L.Y., Barsukov I.L., Derrick, J.P., Kim, H., Tanaka, R., Yoshino, A., Shiraishi, M., Shimada, I., Arata, Y., Roberts, G.C.K., (1995), *Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution*, *Current Biology*, 3(1),79-85.
- Knight, P. (1990), *Bioseparations: Media and modes*, *Bio/Technology.*, 8 200-201.
- Koyama, K., Yamaguchi, N., Miyasaka, T. (1994), *Antibody-mediated bacteriorhodopsin orientation for molecular device architectures*. *Science*, 265,762-765.
- Kudaibergenov, S., Adilov, Zh., Berillo, D., Tatykhanova, G., Sadakbaeva, Zh., Abdullin, Kh., Galaev, I. (2012). *Novel macroporous amphoteric gels: Preparation and characterization*, *eXPRESS Polymer Letters*, 6(5), 346-353.
- Kumakura, M. (2001) *Preparation method of porous polymer materials by radiation technique and its application*. *Polym. Adv. Technol.* 12, 415–421.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>*, *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lancefield, R.C. (1928). *The antigenic complex of Streptococcus hemolyticus*, *J Exp Med*,47 (1): 9–10.
- Lancefield, R.C. (1933), *A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci*, *J Exp Med*,57(4): 571–595.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 1993.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B. (2003), *Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*, *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445–451.
- Lozinsky, V.I. (2002), *Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and areas of implementation*. *Russ. Chem. Rev.*, 71, 489–511.

- Ma, Z., Ramakrishna, S. (2008), *Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification*, *Journal of Membrane Science*, 319, (1–2) 23–28.
- Mandell, G.L. Bennett, J.E., Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, 2005.
- Moore, J. C. (1964), *Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers*, *J. Polymer Sci. A2*, 835-843
- Nagare, G.D., Mukherji, S. (2009), *Characterization of silanization and antibody immobilization on spin-on glass (SOG) surface*. *Appl Surf Sci*, 255, 3696–3700.
- Narayanan, S.R., Crane, L.J., (1990), *Affinity chromatography supports: a look at performance requirements*. *Trends Biotechnol.*, 8, 12-16.
- Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M. *Bacterial Cell Wall*, The Netherlands, 1994.
- Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani, L. and Rapa, S. (1990). *Rapid purification of glucose-6 phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocyte*, *Preparative Biochemistry*, 20, 297–309.
- Oura, K., Lifshits, V.G., Saranin, A.A., Zotov, A.V., Katayama, M. *Surface sciencedan introduction*. Berlin: Springer; 2004.
- Perçin, I., Aksöz, E., Denizli, A. (2013). *Gelatin-immobilised poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for affinity purification of fibronectin*, *Appl Biochem Biotechnol.* 171(2):352-65.
- Porath, J., Flodin, P., *Protides of the Biological Fluids*, American Elsevier, New York, 1963.
- Porath, J., Flodin, P. (1959) *Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation*, *Nature*, 183, 1657
- Przic, D. S., Ruzic, D. S., Nenad, N. L., Petrovic, S. D. (2004), *Lyophilization The process and industrial use*. *Chem. Ind.* 58, 552.
- Rao, S.V., Anderson, K.W., Bachas, L.G. (1998), *Oriented immobilization of proteins*. *Mikrochim Acta*, 128:127-143.
- Ruoff, K.L., Whiley, R.A., Beighton, D. *Manual of Clinical Microbiolog*, ASM Press, Washington, 2003.
- Sauer-Eriksson, A.E., Kleywegt, G.J., Uhlen, M., Jones, T.A., (1995) *Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG*. *Structure* 3: 265–278.

- Say, R., *Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology*, TR. Patent No: 0311505 A1, 2011.
- Sheiban, E., Gershon H., (1990), *The specific blocking of an IgG dependent erythrophagocytosis assay by protein G and ELISA determination of in situ bound IgG on erythrocytes of normal donors*, *Journal of Immunological Methods*, 135 (1-2): 139-46.
- Siegel, D.L., (2002), *Recombinant monoclonal antibody technology*, *Transfus Clin Biol.*, 9(1):15-22.
- Sjöbring, U., Björck, L., Kastern, W. (1991), *Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties*, *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 399-405.
- Soffer, G.K., Nystrom, L.E. *Process Chromatography, A Practical Guide*, Academic Press, New York, 1989.
- Sutani, K., Kaetsu, I., Uchida, K. (2001) *The synthesis and the electric-responsiveness of hydrogels entrapping natural polyelectrolyte*. *Radiat. Phys. Chem.* 61, 49–54
- Svec, F., Peters, E.C., Sykora, D., Yu, C. ve Echet J.M. (2000), “ *Monolithic stationary phases for capillary electrochromatography based on synthetic Polymers: Design and Applications*”, *J .HighResol.Chromatogr.*, 23, 3-18.
- Tamahkar, E., Bereli, N., Denizli, A. 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2014.
- Tedeschi, L., Domenici, C., Ahluwalia, A., Baldini, F., Mencaglia, A. (2003), *Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors*. *Biosens Bioelectron*, 19:85-93.
- Temizkan, G., Arda, N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, Yayın No:2, 2008.
- Tuncer M. *Protein Saflaştırma I: Kromatografik Teknikler*. Mersin Üniversitesi Yayınları. Yayın No:14., 2008.
- Uzun, L., Say, R., Denizli, A. (2005), *Porous poly(hydroxyethylmethacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography*, *React.Funct.Polym.*,64, 93-102.