



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**DNA SAFLAŞTIRILMASINA YÖNELİK BAKTERİYEL KÖKENLİ
EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMER KOMPOZİT KRİYOJELLERİN
İMAK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu ÖNAL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2018



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**DNA SAFLAŞTIRILMASINA YÖNELİK BAKTERİYEL KÖKENLİ
EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMER KOMPOZİT KRİYOJELLERİN
İMAK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu ÖNAL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2018

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 162305402 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu ÖNAL tarafından hazırlanan "DNA SAFLAŞTIRILMASINA YÖNELİK BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMER KOMPOZİT KRİYOJELLERİN İMAK UYGULAMALARI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Ayşe Müge ANDAÇ ÖZDİL

Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhsin KARAARSLAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 17/12/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Burcu ÖNAL



TEŞEKKÜR

Bilime ve hayata bakış açısı ile bize ışık tutan ve bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, tez çalışmalarımda kullandığım EPS temininde bana yardımcı olan Prof. Dr. Fatma Gürbüz'e, engin bilgilerinden her zaman faydalandığımız Dr. Demet ERDÖNMEZ'e, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Ömür ACET, Özlem ARSLAN, Miren ŞEN, Nurullah BANİ ve Sema AKAY'a hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve maddi, manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burcu ÖNAL
AKSARAY, 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kromatografi Nedir ?	1
1.1.1 Biyoafinite kromatografisi ve ilkeleri.....	1
1.1.2 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi.....	4
1.1.3 İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel ilkeleri	4
1.1.5 İMAK nasıl uygulanır?	5
1.1.6 İMAK uygulamaları.....	6
1.1.7 Doğru matriks kullanımı	6
1.1.8 Ligand seçimi	7
1.2 İMAK'ı Etkileyen Faktörler	7
1.3 Ekstraselüler Polimerik Maddeler ve Özellikleri.....	8
1.3.1 EPS biyosentezi	9
1.4 Kriyojeller	10
1.4.1 Kriyojel oluşumu	11
1.4.2 Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu.....	12
1.4.3 Kriyojellerin Avantajları	13
1.5 DNA	14
1.5.1 Plazmid DNA	14
1.5.2 DNA'nın izolasyon işlemleri ve saflaştırılması.....	15
1.5.3 Aşılamada ve gen terapisinde plazmid DNA teknolojisi	16
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1 Malzemeler	19
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Siyanobakteri üretimi ve EPS ekstraksiyonu	19
3.2.2 EPS -PHEMA kompozit kriyojellerin hazırlanması	20
3.2.3 EPS-PHEMA kompozit kriyojele Fe ³⁺ iyonlarının bağlanması	21
3.2.4 Fe ³⁺ takılı EPS-PHEMA kompozit kriyojelin şişme testleri	22

3.2.5 Sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu	22
3.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	23
3.2.7 <i>E.coli DH5α</i> lizatından faydalanılarak plazmid DNA saflaştırılması	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1 Fe ³⁺ takılı EPS-PHEMA Karakterizasyonu	25
4.1.1 EPS-PHEMA kompozit kriyojele Fe ³⁺ iyonlarının immobilizasyonu.....	25
4.1.2 Fe ³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojelin şişme testleri.....	26
4.1.3 Taramalı elektron mikroskop ile karakterizasyon	27
4.2 Fe ³⁺ bağlı EPS-PHEMA Kompozit Kriyojellere DNA Adsorpsiyon Çalışmaları	29
4.2.1 pH'nın etkisi.....	29
4.2.2 Adsorpsiyona DNA başlangıç derişiminin etkisi	29
4.2.3 Adsorpsiyon izotermi.....	31
4.2.4 Adsorpsiyon kinetiği modellemesi	34
4.2.5 İyonik şiddetin etkisi.....	36
4.2.6 Akış hızının etkisi	37
4.2.7 Sıcaklığın etkisi	38
4.2.8 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	40
4.2.9 <i>E.coli</i> lizatından faydalanılarak plazmid DNA saflaştırılması	40
5. SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	48

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DNA SAFLAŞTIRILMASINA YÖNELİK BAKTERİYEL KÖKENLİ EKSTRASELÜLER BİYOPOLİMER KOMPOZİT KRIYOJELLERİN İMAK UYGULAMALARI

Burcu ÖNAL

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ÖZET

Bu çalışmada, DNA'nın etkili bir yolla ayrılması için kullanılan afinite kromatografisi metotları arasında olan ve son zamanlarda yoğun bir uygulama sahası bulan, immobilize metal afinite kromatografisinden (İMAK) yararlanılmıştır. Çalışmada, Fe^{+3} bağlı EPS-poli(2-hidroksietil metakrilat) kompozit kriyojeller sentezlenmiştir. Bu amaçla, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomer olarak, *N,N'*-metilen-bis-akrilamid (MBAAm) çapraz bağlayıcı olarak, amonyum persülfat (APS)/ *N,N,N',N'*-tetrametiletlen diamin (TEMED) başlatıcı/aktivatör olarak kullanılmıştır. Poimerizasyon ortamına ekstraselüler polimerik maddeler (EPS)'in eklenmesinin ardından, karışım 2,5 mL'lik plastik şırıngalara dökülmüş ve $-12^{\circ}C$ 'de polimerizasyona bırakılmıştır. Sentezlenen kompozit kriyojellere, Fe^{+3} iyonu bağlandıktan sonra, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. pH, başlangıç DNA konsantrasyonu, iyonik şiddet, akış hızı ve sıcaklığın adsorpsiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. En yüksek adsorpsiyon değeri pH 6 asetat tamponunda, 2 mg/mL başlangıç DNA derişiminde, 0,5 mL/dk akış hızında ve $25^{\circ}C$ ortam sıcaklığında 39,66 mg/g polimer olarak gözlenmiştir. Aynı zamanda, Fe^{+3} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellere DNA'nın defalarca adsorplanıp desorplanabildiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Afinite, DNA, Kompozit Kriyojel, İMAK, Adsorpsiyon

Aralık, 2018; 48 sayfa

IMAC APPLICATIONS FOR DNA PURIFICATION OF BACTERIAL ORIGINATED EXTRACELLULAR BIOPOLYMERIC COMPOSITE CRYOGELS

Burcu ÖNAL

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ABSTRACT

In this study, Immobilized Metal Affinity Chromatograph (IMAC) finding a wide field of application among affinity chromatography techniques in the last years was operated efficiently for separation of DNA from aqueous solutions. In the study, Fe^{+3} binded EPS- poly(2-hydroxyethyl methacrylate) composite cryogels was synthesized. For this aim, as monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), as cross-linker *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBAAm), as initiator/activator pairs ammonium persulfate (APS) and *N,N,N',N'*- tetramethyl ethylene diamine (TEMED) were used. After adding of extracellular polymeric substances (EPS) to polymerization media, obtained mixture was poured into a plastic syringe of 2,5 mL and left for polymerization in -12°C . After binding of Fe^{+3} ions, Fe^{+3} binded EPS-PHEMA composite cryogels were analyzed by, SEM, swelling tests measurements. The effect of pH, initial DNA concentration, ionic strength, flow rate and temperature on adsorption were conducted. The highest amount of DNA adsorption from aqueous solution was 39,7 mg/g particles in acetate buffer at pH 6 with initial DNA concentration of 2 mg/mL with the 0,5 mL/min flow rate, at 25°C temperature. It was also made observation that DNA could be over and over adsorbed and desorbed on the Fe^{+3} binded EPS-PHEMA composite cryogels.

Key words: Affinity, DNA, Composite Cryogel, IMAC, Adsorption

December, 2018; 48 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Afinite kromatografisinin alt başlıkları.....	3
Şekil 1.2.	Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.3.	İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel prensibi.....	5
Şekil 1.4.	Sentezlenen monolitik kriyojel.....	11
Şekil 1.5.	Kriyojel oluşum aşamaları.....	12
Şekil 1.6.	Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1; çözeltideki makromolekül, 2; çözücü, 3; düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri, 4; dondurulmuş çözücünün polikristalleri, 5; donmamış sıvı mikrofaz, 6; polimerik kriyojel, 7; makrogözenekler; 8; çözücü.....	13
Şekil 1.7.	DNA'nın yapısı.....	15
Şekil 1.8.	<i>E. coli</i> hücrelerinin bileşimi.....	16
Şekil 4.1.	EPS gömülü ve EPS olmayan boş kriyojele Fe^{+3} iyonlarının immobilizasyonu sonucu oluşan final çözeltileri.....	26
Şekil 4.2.	EPS gömülü ve boş kriyojele Fe^{+3} iyonlarının immobilizasyonu sonucu oluşan kriyojeller.....	27
Şekil 4.3.	Polimerizasyonu tamamlanmışve su ile şişirilmiş Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojel.....	28
Şekil 4.4.	A. Boş Kriyojelin; B.EPS'nin; C. EPS-PHEMA kompozit kriyojelin SEM görüntüleri.....	29
Şekil 4.5.	DNA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi (pH 6-8: Asetat tamponu; pH 5-6: MOPS tamponu; 7-8. Co: 0,05 mg/mL, akış hızı: 0,5 mL/dk, T: 25°C.....	30
Şekil 4.6.	DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25°.....	31
Şekil 4.7.	Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	33
Şekil 4.8.	Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	34
Şekil 4.9.	Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için birinci dereceden kinetik modellemesi	37
Şekil 4.10.	Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için ikinci dereceden kinetik modellemesi.....	37
Şekil 4.11.	DNAadsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. DNA derişimi: 0,05 mg/mL; pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25°C.....	38
Şekil 4.12.	DNAadsorpsiyonuna akış hızının etkisi. DNA derişimi: 0,05 mg/mL; pH 6 asetat tamponu; T: 25°C.....	39
Şekil 4.13.	DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi, DNA derişimi: 0,05 mg/mL, pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk.....	40
Şekil 4.14.	DNA adsorpsiyon ve desorpsiyon döngüsünün aşamaları.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler.....	2
Çizelge 1.2.	Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış.....	14
Çizelge 4.1.	Fe ³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	34
Çizelge 4.2.	Ayırma faktörünün izoterm şekline etki	35
Çizelge 4.3.	Langmuir eşitliğine dayalı <i>RL</i> değerleri.....	35
Çizelge 4.4.	Bakteri kültür ortamından izole edilen pDNA'ların nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları.....	42



SİMGELER VE KISALTMALAR

AAm	Akrilamid
APS	Amonyum Persülfat
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekstraselülerik Polimerik Maddeler
Fe⁺³-EPS	Demir bağlı EPS
FT-IR	Fourier Transform Infrared
gr	Gram
İMAK	İmmobilize Metal iyon Afinite Kromatografisi
İMAM	İmmobilize Metal Afinite Membranları
kDA	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Litre
m	Mili
M	Molarite
MBAAm	<i>N, N'</i> -metilen-bis-akrilamid
Me	Metal
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimolar
MOPS	3-Morfolinopropan-1-sülfonik asit
nm	Nanometre
°C	Derece santigrat
pAAM	Poliakrilamid
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
ppm	mg çözünen/L
RNA	Ribonükleikasit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilen Diamin
V	Hacim
V/V%	Hacimce Yüzde
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

1.1 Kromatografi Nedir ?

Kromatografi, birbirinden farklı bileşiklerin, moleküllerin veya karışımın bileşenlerini farklı fazlarda dağılması tekniğine dayanır. Kromatografik metotlar temel olarak iki faza dayanır. Bunlardan ilki sabit faz (stationary phase), ikincisi ise hareketli faz veya mobil faz (mobile phase) olarak isimlendirilir. Hareketli faz, durağan fazın üzerinden geçtiği esnada ayrılması beklenen maddeyi de birlikte sürükler. Ayrımı yapılacak maddenin bileşenleri farklı derecelerde durağan fazla etkileşimde bulunurlar. Mobil fazda bulunan komponentler, sabit fazda destek maddesiyle etkileşimleri nedeni ile bir miktar tutunurlar. Bu tutunmanın, numunedeki farklı bileşenler için farklı oranlarda olması beklenir. Bu metotla bileşenler sabit fazın sonlarında, farklı hızlarda göçleri nedeni ile birbirinden ayrılmış olarak sabit fazdan farklı zaman dilimlerinde ayrılırlar. Bundan dolayı, sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri elverişli bir yöntemle ölçülür. Sabit fazla etkileşimi fazla olan komponentler daha geç, etkileşimi az olanlar ise daha çabuk hareket ederek birbirinden ayrılırlar. Bileşenlerin ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasında oluşan etkileşimlerin doğasına göre değişik kromatografik metotlar geliştirilmiştir. Bu etkileşimler; molekülün polaritesine, spesifik bağlanma özelliğine, büyüklüğüne veya elektrostatik çekim gücü gibi parametrelere bağlı olabilir.

1.1.1 Biyoafinite kromatografisi ve ilkeleri

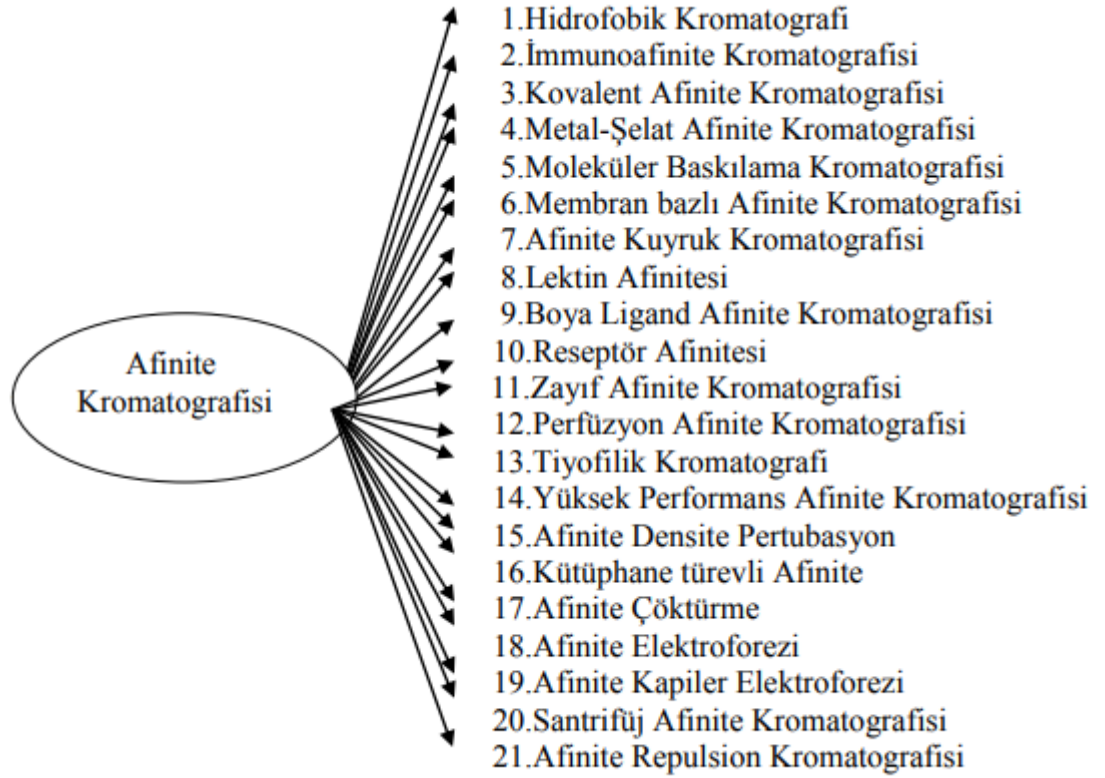
Biyoafinite kromatografisi, biyolojik açıdan etkin maddelerin tamamlayıcı bileşenlerini çok spesifik ve geri dönüşümlü olarak bağlama kabiliyetine bağlı bir tür adsorpsiyon kromatografisidir [3]. Klasik metotlardan farklı olarak, biyolojik moleküller oldukça seçici ve spesifik olarak biyolojik tanıma niteliğine sahip taşıyıcılardan yararlanılarak saflaştırılır. Afinite kromatografisi temelde moleküler tanıma esaslıdır ve günümüzde fizyolojik olarak ve yapısal açıdan etkileşime giren proteinleri saflaştırmak amacı ile faydalanan en güvenilir tekniklerdendir. Bu teknik ile ayrıştırılan proteinler, genetik mühendisliği alanında çalışılan enzimlerin, hormonların işleyişi, protein-protein ya da hücre-hücre etkileşimlerinin yanı sıra diğer etkileşimler gibi önemli biyolojik prosedürlerde gerekli bir yöntem olmuştur. Biyotanıma veya moleküler tanımayı esas alan ilgili yöntemlerin ortaya çıkması sonucu biyolojik bilimlerin birçoğunun araştırma alanları da etkilenmiştir. Proteinler;

bazı özelliklerden alınarak faydalanılarak saflaştırılabilirler. Bu özellikler proteinlerin; büyüklüğü, şekli, toplam yükü, yüzeyde bulunan hidrofobik gruplar ve kullanılan durağan fazın bağlama kapasitesidir. İyon değişim kromatografisi protein yüküne dayanır. Jel geçirgenlik kromatografisi olarak adlandırılan fakat çoğunlukla jel filtrasyonu adı ile de kullanılan kromatografi metodunda ise proteinleri ayırmak için şekil ve boyutlarından yararlanılır. Hidrofobik uzantılara sahip proteinler, hidrofobik etkileşim kromatografisinden faydalanılarak ayrılır. Afinite kromatografisi proteinlerin yüzeylerindeki özelliklere doğrudan bağlıdır. Afinite kromatografisinde ise kullanılan biyolojik etkileşimler Çizelge 1.1’de verilmiştir.

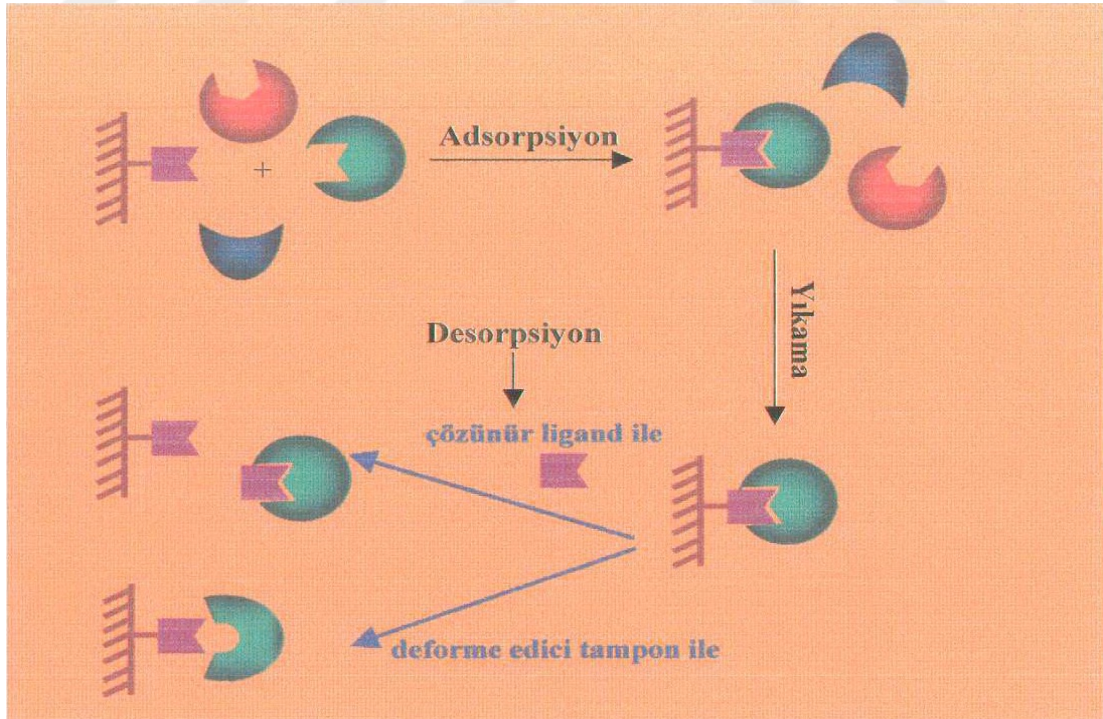
Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde yararlanılan biyolojik etkileşimler.

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

Afinite kromatografisi, büyük ölçekte çeşitli uygulamaları sebebiyle afinite uygulamalarının alt dalları oluşmuştur ve bu dallar kendilerine ait özel başlıklarda adlandırılmışlardır. Şekil 1.1’de görüleceği üzere uygulamalardan başlıcaları verilmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin alt başlıkları.



Şekil 1.2. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi [3].

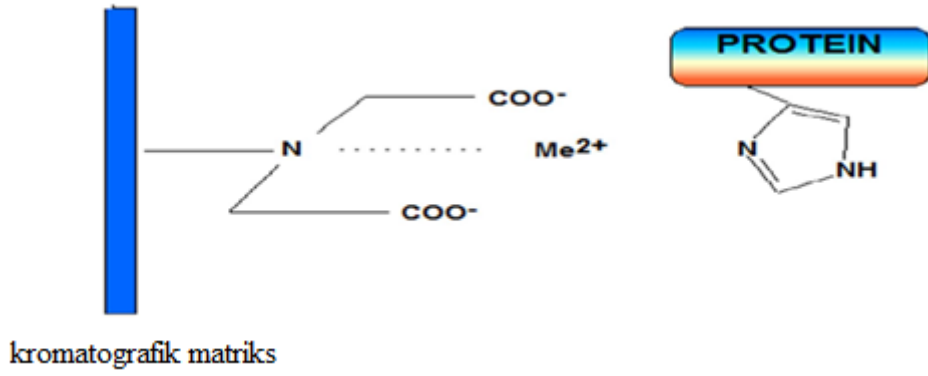
1.1.2 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi

Porath vd., (1975) tarafından literatüre kazandırılan immobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) tekniği, Zn(II), Cu(II), Ni(II), ve Co(II) gibi geçiş metal iyonlarının sulu çözeltilerdeki afinitesidir. Bu metot sulu çözeltilerdeki proteinleri saflaştırmak için bir matrikse immobilize edilmiş metal iyonlarının kullanılması dizayn edilerek geliştirilmiştir [2].

Bu teknik metal-şelat kromatografisi ya da metal-iyon etkileşim kromatografisi olarak da adlandırılır. İMAK'da immobilizasyon prosesi; metal iyonlarının, hidrofilik matrikse kovalent yolla bağlanan, metal şelatlayıcıların kompleksleştirilmesi aracılığıyla oluşur. Protein çözeltisini içeren karışım İMAK kolonundan geçtiği sırada, dış yüzeyinde lokalize olan elektron verici aminoasit rezidüleri bulunduran proteinlerden bazıları, şelat halindeki metallere koordinasyon bağlarıyla vasıtası ile bağlanarak tutunur. Tutunmayan proteinler ise kolondan dışarı akar. İMAK tekniği aminoasit [4] nükleotidler [5, 6] ve aminler gibi [7] küçük moleküllerin ayrılması ve membran glikoproteinleri gibi çeşitli proteinlerin saflaştırılmasını kapsar [8].

1.1.3 İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel ilkeleri

Metal iyon afinite kromatografisinde ayırma yapmak için ana unsur, immobilize-metal afinite (İMA) denilen tekniği doğru bir şekilde uygulamakta yatar. Bu olay proteinlerin üzerindeki aminoasitlerin bazıları veya nükleik asitlerdeki pürin ve pirimidin bazlarının destek maddesine şelatlanmış metal iyonlarına bağlanmasından ibarettir. İMAK işleminde, etkileşimden yararlanmak üzere, metal iyonları çözünmeyen bir desteğe kovalent yolla bağlı olan metal şelatöre koordinasyon yoluyla sabitlenir. Prensip, İMAK'da faydalanılabilecek farklı türde metal iyonu var olmasına karşın, bakır (Cu(II)), nikel (Ni(II)), kobalt (Co(II)) ve çinko (Zn(II)) gibi geçiş metalleri, protein-metal etkileşim çalışmalarında sıklıkla kullanılırlar [2, 9, 10].



Şekil 1.3. İmmobilize metal afinite kromatografisinin temel prensibi.

İmmobilize metal afinite kromatografisinde; spesifik bir metal katyonu için özgül bir selektiviteyle ayrı biyopolimerlerden yararlanılarak ligand değişim kromatografisi uygulanmaktadır. Sıklıkla Fe(II), Zn(II) ve Cu(II) gibi belirli metal katyonları için metal iyon afinite kromatografisinden faydalanılır [11]. Bir proteinde elektron verme niteliğine sahip ulaşılabilir yüzeyinde aminoasit rezidüleri olan Porath'ın üçlüsü olarak da atfedilen “triptofan, histidin ve sistein” bu tür rezidülerdendir. [12]. Bu rezidüler, geçiş metal şelatının proteine bağlanmasında açıklayıcı olmaktadır [13]. Bir proteinin kalıntı miktarı, yüzey ulaşılabilirliği ve mikro yapısı bütün metal şelat koordinasyonuna sahip bir proteinin alıkonmasının belirlenmesinde yol göstericidir. [14].

Nükleotid-geçiş metali arasındaki meydana gelen etkileşimler de İMAK metodu ile araştırılmıştır. Örnek olarak, pirimidin ve pürin mono-nükleotid ve di-nükleotid grupları agaroz ya da silika tabanlı bakır şelat adsorbentleri yardımı ile sağlanmıştır [5, 15].

1.1.5 İMAK nasıl uygulanır?

İmmobilize metal afinite kromatografisi uygulanırken; adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon gibi üç temel unsura dikkat edilir ve adsorpsiyon esaslı afinite kromatografisine başvurulur.

Bu üç unsur;

- Ligand,
- Protein ve polipeptid yapısına,
- Kimyasal etkileşime,
- Termodinamik ve kinetik karakteristik özelliklerine,
- Adsorbent ve ligandın stabilitesine bağlıdır.

1.1.6 İMAK uygulamaları

Kırk yıllık kullanımına rağmen, İMAK en yaygın kullanılan saflaştırma yöntemleri arasında trendini kaybetmemiştir. İMAK'ın bu popüleritesi birçok çeşitli saflaştırma tekniklerini içerdiği içindir. Son zamanlarda, His-etiketli rekombinat proteinlerin ve endüstriyel proteinlerin saflaştırılmasının yanı sıra nükleotidlerin saflaştırılması için de yoğun şekilde kullanılmaktadır.

Bir hücre kültüründe üretilen veya bir biyolojik sıvı içinde bulunan tek bir proteinin izolasyonu, karmaşık birçok problemi beraberinde getirir. Aynı anda etkin ve spesifik bir saflaştırma sisteminin oluşturulması, birbiriyle ilişkili bazı adımları da zorunlu kılar. Ligand dizaynı, uygun immobilizasyon kimyası ve adsorpsiyon ve elüsyon koşulları gibi afinite kromatografi ortamlarının kullanımı son derece önem arz eder. İMAK ile, plazmid DNA'nın etkin bir şekilde saflaştırılması için kullanılabileceği literatürde vardır [16].

1.1.7 Doğru matriks kullanımı

Afinite kromatografisinde en önemli unsurlardan biri de matriks seçimidir. Afinite kromatografisinin geniş bir skalada kullanımının en temel etmenlerinden birisi arzu edilen özelliklere sahip taşıyıcıların geliştirilmesi ile meydana gelmiştir. Taşıyıcı ve afinite ligandı arasındaki etkileşim kromatografik ayırmanın temeli olduğundan taşıyıcıların uygun seçilmesi en önemli noktalardandır. Matriks, bazen ligand molekülleri bulunan doğal ortamın kendisi olabilir. Farklı tür ve sayıda taşıyıcı ticari olarak piyasada mevcuttur.

Taşıyıcının sahip olması gereken bazı özellikler aşağıdaki gibidir:

- Çözünmemelidir.
- Elverişli bir geçirgenliğe, mevcut iç yüzey alanı uygun genişlikte olmalıdır.
- Uygun partikül şekli esastır
- Seçici olmayan adsorpsiyon değeri düşük olmalıdır.
- Afinite ligandının yapıya takılabilmesi için fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır.

- Ligandın immobilizasyonu durumu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon kimyasal açıdan stabil olmalıdır.
- Mikrobiyal ve enzimatik reaksiyonlara karşı kuvvetli olmalıdır.
- Hidrofilisitesi iyi olmalıdır.

1.1.8 Ligand seçimi

Afinite kromatografisinin uygulanacağı ligandın iki temel özelliği taşıması gerekmektedir.

- Saflaştırılacak protein ile tersinir ve seçici bir yapı oluşturmmalıdır.
- Taşıyıcıya bağlanmasına imkan veren fonksiyonel grupların var olması gerekmektedir.

Bu iki şartı sağlayan farklı ligandlar mevcuttur. Afinite kromatografisi temel prensiplerinin pratiğe uygulanmasında;

- Amaca uygun faydalanılan ligandların çeşitliliği,
- Grup spesifik ligandların kullanımı,
- Bir proteinin saflaştırılması için uygulanabilecek ligandların türevliliği metodun etkinliğini belirler.

1.2 İMAK'ı Etkileyen Faktörler

İmmobilize metal afinite kromatografisinde indirgeyici ajanlar, katotropikler, tuzlar, organik çözügenler, deterjanlar ve indirgeyici etkenler gibi farklı çeşitte kimyasallar, İMAK destek materyallerinin kullanışlılığını, spesifik proteinlerin ayrışmasını pratikleştirir. NaCl (0.3-1.0 M aralığında), proteinler ve reçineler arasındaki iyonik etkileşimleri düşürmek için tamponlarda sıklıkla kullanılır. Gliserol (%50 oranına kadar) veya etanol (% 20 oranına kadar) proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri kısıtlamak için tampona ilave edilebilir. Ana maddeleri içeren bir halde istenen proteinin saflaştırılmasında 8,0 M'lık veya 6,0 M'lık guanidinyum klorür gibi denatüre edici etken ajanları içeren tamponlar, İMAK için efektif olabilir. Aynı zamanda hafif alkali bir pH'a sahip yükleme tamponundan yoğun bir şekilde yararlanılır. Bu durum, protein yüzeyindeki elektron verici grupların bu pH'da

protonlanmamış olması ve bağlanmaya olanak tanınması nedeniyledir. Bu alkali pH'larda, protein yüzeyindeki bazı amino fonksiyonel gruplarına bağlanma daha basittir ve bu seçiciliği azaltacaktır. Fosfat ve asetat tamponları, şelatlanmış metal iyonlarının koordinasyon bölgelerine etkileşime girmeyeceğinden en geniş ölçekte kullanılan tamponlardır. İMAK, birçok non-iyonik deterjan ile uyum sağlar. Deterjan eklenmesi spesifiteyi arttırarak, bütün tamponların performansına katkı sağlar ve verimini arttırır [17].

1.3 Ekstraselüler Polimerik Maddeler ve Özellikleri

Mikroorganizmalar tarafından intraselüler (depo) ve ekstraselüler polisakkaritler olarak da bilinen (EPS) polisakkarit olarak sentezlenir. EPS yapıları hücre duvarıyla birleşmiş olan kapsüler maddeler olup yüksek oranlarda hücre duvarının dış tarafında toplanan ve kültür ortamında yayılan bağımsız salgılar olarak sentezlenen yapılardır [18, 19].

Athrospira siyanobakteri türü, yüksek protein içeriği (kuru ağırlığının maddesinin % 50-70'i) kanıtlanmış biyolojik etkinliklerinden dolayı da yoğun şekilde bilim insanlarının araştırma konusu olmuştur [20]. 81-98 kDa gibi bir kütleyle sahip olması büyük oranda (glukoz, galaktoz, fruktoz, ramnoz, ksiloz manoz ve arabinoz) proteinler ve uronik asitler gibi polisakkaritleri içermesinden dolayıdır. Bu polimerler hücre dışı polimerik maddeler (EPS) salgırlar [21, 22]. EPS'nin yüksek seviyelerine üronik asitlerden dolayı metallerle diğer (inorganik) fazlardan daha güçlü bağlanması literatürde yerini almıştır [23, 24].

Bakteriyel orijinli EPS'lerin çoğu immunojenik olup in vitro çalışmalarda EPS'lerin bulunduğu katı besi ortamlarında mukoid koloni halindedir. Sıvı besi ortamlarındaysa neredeyse tamamen viskoz bir görünüm ile saptanır [25]. Bakterinin dış tarafını örten EPS, kapsül veya slim yapıda olabilir. Kapsüler EPS formları bakteri hücre yüzeyinde bulunan fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ yardımı ile bağlanmaktadır [26, 27]. EPS'ler suda çözünebilir polimer formda olup iyonik ya da non-iyonik yapılarda bulunabilirler [28].

EPS'ler glikozid bağları ve şeker birimlerinden meydana gelmektedir. Bakteriyel EPS'lerin birçoğu düzenli olarak oligosakkaritlerin tekrar eden ünitelerinden meydana gelmiş heteropolisakkarid formda, bazı bakteriyel EPS'ler ise

homopolisakkarid yapıda tek cins şekerden oluşmuştur. EPS'yi içeren homopolisakkaritlerin çoğunluğu nötr olsa bile, çoğunlukla bakteriyel EPS yüksek kütleyle sahip olup negatif yük taşır. Aynı zamanda polisakkaritler hidrofilitesi yüksek olması ile birlikte çoğu yapılar lipofilik, hidrofilik ve biyofilm formda bulunabilen heterojenlerdir. [25, 28, 29]. EPS'ler bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasına ve farklı yüzeylere tutunmasına imkan vermektedir. Polisakkaritler enerji kaynağı olarak kullanılmazlar fakat mikroorganizmayı korur, tehlike arz eden faktörleri ortamdan uzaklaştırırlar [30, 31]. EPS bakteriyi koruyucu kaplama ile sarmakta ve muhtemel risklere karşı korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma niteliği, antibiyotiklere karşı fiziksel bir savunma şeklinde de ortaya çıkabilir. Ayrıca, bulunan ortamdaki metalik iyonların tutulmasına da imkan verir. Bitki, insan ve hayvan patojenlerinin salgıladıkları EPS'lerin virüs unsurları oldukları da literatürde yer almaktadır [25, 32]. EPS yapıları, bitkiler ve bakteriler arasında da iyi bir etkileşim aracıdır. Özetle, yüksek moleküler forma sahip EPS'ler koloninin dayanıklılık ve stabilitesini meydana getirmektedir [33].

1.3.1 EPS biyosentezi

Polisakkaritler, bazı bakteri gruplarının çoğalmaları esnasında çoğalma evresinin değişik basamaklarına göre değişen şartlarda sentezlenirler. Sentez evresi hücre dışında olabileceği gibi membranda da oluşabilir [18]. Genel olarak, EPS sentezinin Sutherland tarafından ortaya koyulan modele göre gerçekleştiği fikri ağırlık kazanmıştır. EPS'lerin oluşumunda [34], polisakkarit sentezine spesifik olmayan, UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi birçok enzim işlev görür.

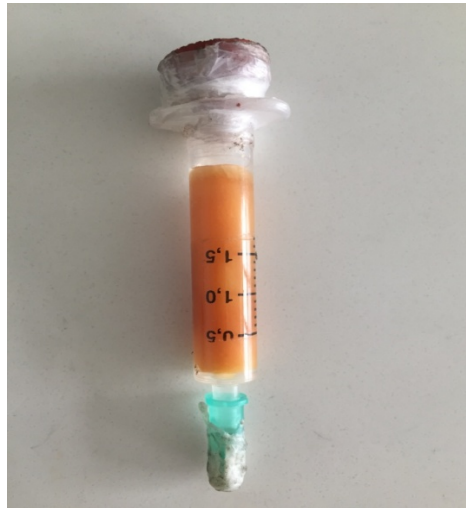
Heteropolisakkaridler hücre içerisinde sentezlenseler bile, hücre dışına belirli etkenlerle çıkarılarak hücrenin çevresini sararlar. Bu prosedürler için birçok enzimin mevcudiyetine gereksinim vardır. Bu enzimlerin birçoğundan lipopolisakkaridlerin sentezinde de yararlanılmaktadır. Nötral homopolisakkaridlerin sentezi farklı olup, nötral levan ve dekstran homopolisakkaridin oluşumu birbirine benzememektedir. Hücre dışında sentezlenen bu EPS'ler sukroz varlığında sırasıyla levansukraz ve dekstransukraz enzimlerinin aktivitesi yardımı ile ekstraselüler olarak sentezlenmektedirler [26, 35].

1.4 Kriyojeller

Kriyojeller 1960'lı yıllarda ilk kez rapor edilse de biyoteknoloji uygulamaları için yeni keşfedilmiş sayılırlar [36]. Kelime kökeni olarak, Yunanca krios (buz ya da donma) kelimesinden türeyen ve kısmen donmuş monomerik veya polimerik çözeltilerle sentezlenen üç boyutlu jel destek matrisleridir. Makrogözenekli ya da süper makrogözenekli formda olan kriyojeller süngerimsi bir yapıya sahiptirler. Sahip oldukları bu makrogözenekli morfoloji ile birlikte difüzyon akışı ve kütle aktarımını aktif bir şekilde başarırlar [37].

Mekanik, ozmotik ve kimyasal stabiliteleri sebebiyle biyolojik kullanımlarda kriyojeller büyük bir önem kazanmıştır. Bu nedenle birçok uygulamalarda kendilerine yer bulmuşlardır. Bu uygulamalar; biyolojik nanopartiküllerin kromatografisinde [38, 39] veya biyopolimerlerin [40, 41] hücrelerin [42] immobilizasyonunda faydalanılmıştır. Aynı zamanda, kriyojeller makrogözenekli formu ile hızlı şişme kinetiği gösterir ve bu özelliği ile kriyojeller, birçok disiplinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Kriyojeller; polimerik yapıların fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanmasıyla meydana gelebilir. Kriyotropik jelleşme ile oluşturulan polimer yapısı donmamış sistemlere nispeten çok farklıdır. Kriyojeller, kullanım hedeflerine göre silindirik, granüller veya disk halinde oluşturulurlar.

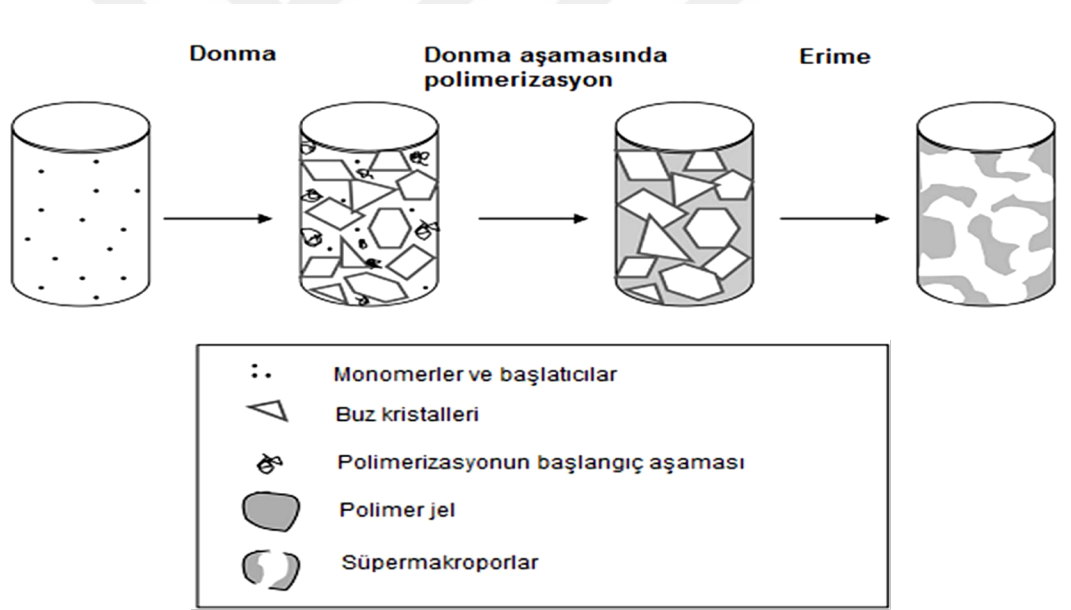


Şekil 1.4. Sentezlenen monolitik kriyojel.

Makrogözenekler ve süngerimsi yapılar kriyojellerin en belirgin özelliklerindendir. Makrogözeneklerine su alıp şişebilirler. Mekaniksel baskı uygulanması ile makrogözeneklerdeki su dışarı çıkarılabilir. Kriyojellerin morfolojik özellikleri sıcaklık, kriyojelin donmuş durumda kalma zamanı, donma/erime hızları, çözücü türü, çözünen veya çözünmeyen katkı maddeleri gibi etkenler ile değişebilir [44].

1.4.1 Kriyojel oluşumu

Kriyojel oluşumu; makroskopik olarak donmuş karışım içerisinde bulunan donmamış sıvı mikrofaz içerisinde gerçekleşir. Bütün reaksiyona giren maddeler donmamış halde bulunan sıvı mikrofazda toplanmış iken, çözücünün belirli bir bölümü donmadan kalır. Donmamış halde bulunan sıvı mikrofazda yürütülen kimyasal tepkimelerin hızlandırılmasında; çoğunlukla sıfırın altında bir sıcaklıkta belirlenmiş aralık gözlenmektedir.



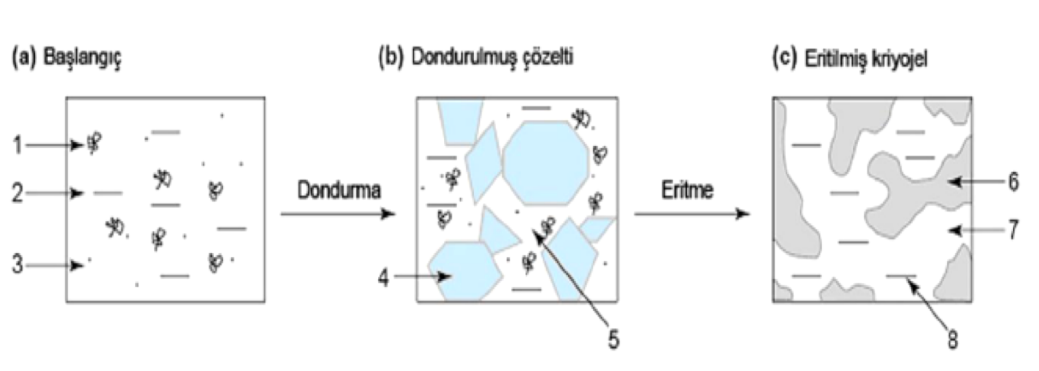
Şekil 1.5. Kriyojel oluşum aşamaları [45].

Buz kristallerinin erimesinden sonra sürekli ve birbirine bağlı por (gözenek) sistemleri meydana gelmektedir. Yapının ve kristal yapıların büyüklüğü buz çözülmesinden sonra meydana gelen porların şekil ve büyüklüğüyle saptanmaktadır. Donmanın meydana geldiği sıcaklık, çözeltideki monomer/makromerler, reaksiyon karışımının polimerizasyon zamanı, çapraz bağlayıcı, numune büyüklüğü, çekirdeklenme gibi etkenler içeriğin ilk yoğunluğuna bağlıdır [46, 49].

Tekrarlanabilir bir donma kalıp oluşturmak için bütün deneysel şartlarda itinalı bir kontrol gerektirir.

1.4.2 Kriyojellerin hazırlanışı ve karakterizasyonu

Kriyojel oluşum hızının en verimli biçimde kontrolünün sağlanması elverişli niteliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasıyla sağlanır. Kriyojelleşme olayında, meydana gelen buz kristalleri porojen bir şekilde ve erimesinin ardından birbirine bağlı olan gözenekler için kalıp gibi davranırlar. Kriyojeller genel olarak -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklık aralıklarında sulu ortamda sentezlenirler. Tepkime ortamı soğumaya bırakıldığında donmuş halde bulunan monolitik blok yapısı iki temel parçadan meydana gelir. Kimyasal etkileşim donmamış sıvı mikrofaz içerisinde meydana gelir. Reaktif bulunmayan çözücünün kristalleri donma esnasında büyür. Ayrıca, donmuş kalıp devamlı bir sistem meydana gelene dek öteki kristal yapılarla bağlantı kurar. Kimyasal tepkimeler sona erdikten sonra erime olayıyla beraber sistemde bulunan sıvı çözücüyle dondurulmuş devamlı olarak makrogözenekli kanalları olan bir matriksten meydana gelir [45]. Yarı donmuş tepkime ortamında ise çözünmüş reaktifler (jel öncülleri) kimyasal tepkimenin olduğu donmamış olan sıvı mikrofazda yoğunlaşır. Bu nedenle, polimer zincirleri gözeneklerden gözenek çeperlerine taşınarak kriyojeller oluşur ve şekillenir. Geleneksel bir jeldeki polimer konsantrasyonu ile mukayese edildiğinde gözenek (por) çeperleri daha fazla polimer derişimine sahip olur. Gözenek duvarlarındaki yükselen polimer derişimi kriyojelin sertliğinin mekaniksel olarak memnun edici seviyede olmasına imkan verir [38, 46].



Şekil 1.6. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1; çözeltideki makromolekül, 2; çözücü, 3; düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri, 4; dondurulmuş çözücünün polikristalleri, 5; donmamış sıvı mikrofaz, 6; polimerik kriyojel, 7; makrogözenekler; 8; çözücü [50].

1.4.3 Kriyojellerin Avantajları

Son zamanlarda İMAK uygulamalarında yoğun şekilde kullanılan kriyojellerin avantajları aşağıda sıralanmıştır;

1. Kriyojeller kimyasal-kovalent, iyonik veya kovalent olmayan bağlardan meydana gelebilirler.
2. Yönteme ve hedef moleküle uygun olacak şekilde silindir, tüp ve disk şeklinde üretilebilirler.
3. Üç boyutlu gözenek morfolojisine sahip yapıda elde edilebilirler.
4. Üretimi oldukça ucuz olup uzun süreli kullanılabilirler.
5. Morfolojileri heterofaz ve süngerimsi yapıya sahip olması avantajları arasında sayılabilir.

Çizelge 1.2. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış [45].

Monomer/ Polimer Öncülleri	Gösterim	Por Boyutu (µm)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Akrilamid	pAAm	1-200	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Akrilamid	Aşı-pAAm	1-100	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi
Dimetilakrilamid	Pdmaa	1-120	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçacık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Polivinilalkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulmayan veya monolitik kromatografi ortamı için kalıplar
Polivinilalkol	b-PVA	0,1-1	Elastik	Mekanik olarak kafesleme yoluyla hücrenin immobilizasyonu. Enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonu
Hidroksietilmetakrilat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Hidroksietilmetakrilat	HEMA-	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulabilen kalıplar
Dekstran Agaroza	Ags-MG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Polietilenglikol	PEG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
N-izopropil akrilamid	NIPAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar

1.5 DNA

Deoksiribo nükleik asit ya da diğer kısaltılmış adı ile DNA, tüm organizmaların ve bazı virüslerin canlılık fonksiyonları ve biyolojik olarak büyümeleri için gereken genetik bilgileri taşıyan bir nükleik asittir. DNA molekülünün iki ana göreve sahiptir:

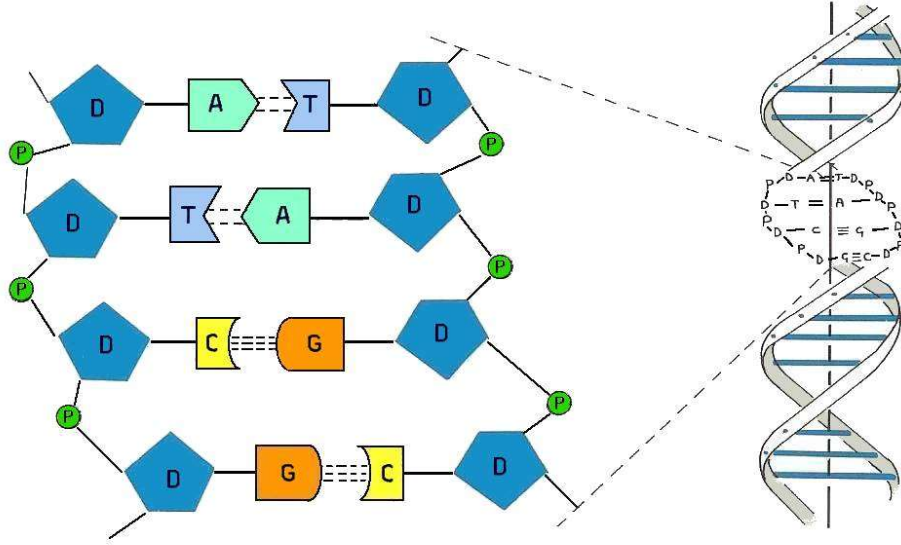
-Metabolik olayların denetimi

-Kalıtım

DNA molekülü hücrede kullanılacak olan proteinlere ait bilgiyi taşıdığından dolayı hücrede meydana gelen protein sentezinin kontrolünü sağlar. Böylece, enzim sentezini (biyokimyasal olayların kontrolü) sağlar. DNA molekülü kendini eşleme özelliğine sahip olduğundan bilgilerin yeni hücrelere aktarılmasını sağlar.

1.5.1 Plazmid DNA

Plazmidler kromozom dışı, çift iplikli, hücre çekirdeği dışında bağımsız var olabilen ve replikasyona uğrama kabiliyeti olan dairesel DNA molekülleridir [51]. Plazmid DNA (pDNA); birçok disiplin için kullanılır ve bunların başında; tıp, tarım, moleküler biyoloji ve endüstri alanları gelir, bu alanlarda plazmid DNA'nın önemi çok büyüktür. Başlıca klonlama teknolojisinde, gen terapisinde, enzimatik modifikasyon uygulamalarında, DNA aşılama ve büyük ölçekte protein üretmek üzere pDNA ihtiyacı oldukça fazladır. Aşılama tekniğinde, bağışıklık sistemini arttırmak; gen terapisinde ise genetik formun modifikasyonunda viral olmayan vektör olarak işlev görür. Konjüгатif olan cinsi, konjügasyon esnasında kromozomal DNA ve plazmid DNA transferinden yükümlü genleri içerir. Nonkonjüгатif cins ise konjügasyonu başlatamaz, kendi transferini denetlemeyebilir, fakat konjüгатif plazmidler desteği ile transfer edilebilirler. pDNA'da fermentasyon için çok faydalanan konakçı *Escherichia coli* (*E.Coli*) 'dir. pDNA'lar, oldukça esnek moleküllerdir. Biyolojik, immünolojik, viral veya bakteriyel antijenleri içeren çok sayıda gen türünü klonlama yeteneğine sahiptir.

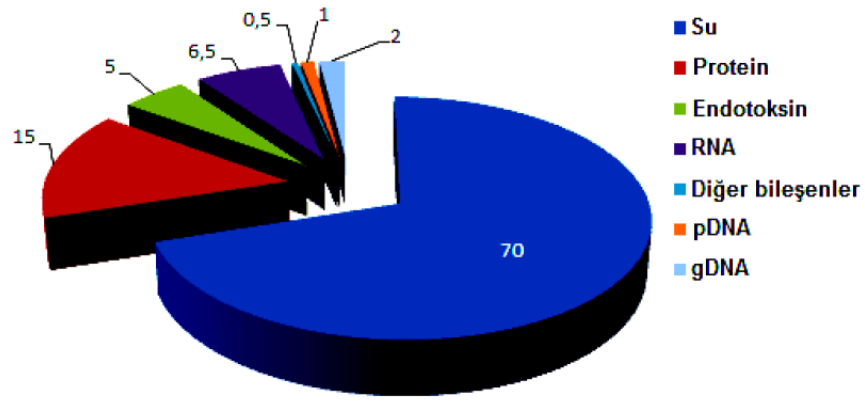


Şekil 1.7. DNA'nın yapısı.

1.5.2 DNA'nın izolasyon işlemleri ve saflaştırılması

E.coli fermantasyondan sonra santrifüj ve ardından filtrasyon ile ayrılan bakteri hücreleri tampon ortamında, pDNA'nın zarar görmemesi için alkali lizis methodu ile dağıtılır. Lizis solüsyonu sodyum hidroksit ve sodyum dodesil sülfat içeren bir ortamdır. Hücre duvarı parçalandıktan sonra hücre membran komponentleri çözünür hale getirilir ve pDNA'lı membran proteinleri denatürasyona uğratılır. Fakat pDNA'nın daimi olarak denatürasyona uğramaması için pH değeri 12.2-12.4 civarında sabitlenir. Alkali süspansiyon çözeltinin, potasyum asetat ile birlikte nötralizasyonu neticesinde diğer komponentler agregasyona uğrar, pDNA ortamda kalır.

pDNA saflaştırılması amacı ile organik çözücü ya da tuzlarla çöktürme oluşturulup, böylece bu ajan sayesinde, molekülleri hidrate edip su molekülleri miktarı düşürülür. Çözünen molekülün yüzeyindeki su moleküllerinin ortamdaki uzaklaşması ile hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler sayesinde biyomolekülün çökmesine yardım edecek gruplar meydana gelir. Çökme işleminde en çok kullanılan izopropil alkol, polietilen glikol veya etiltrimetilamonyum bromürdür [52]. pDNA değişik bir hale getirilir. *E. coli*, hücre zarının parçalanması ile açığa çıkan hücre içeriğinin % 1'i kadar süper dairesel (SC) formda pDNA bulundurur [53]. Temel safsızlıklar; RNA, gDNA ve endotoksinlerdir. Amaçlanan tür ve kontaminasyonların benzerlikleri (yük, fiziksel davranış, yapı) izolasyonda sorun oluşturur.



Şekil 1.8. *E. coli* hücrelerinin bileşimi [54].

pDNA bazı çöktürme yöntemleriyle konsantre edilip sonraki işlemlerde kullanılabilir [55].

1.5.3 Aşılamada ve gen terapisinde plazmid DNA teknolojisi

Son zamanlarda plazmid DNA, gen terapisi ve bilhassa aşılama tekniğinde yoğun bir ilgi kazanmış durumdadır. Şu ana kadar 600'ü geçkin plazmid DNA kaynaklı gen terapisi, kanser aşısı ve terapötik aşı denemelerine başlanmış durumdadır [56, 57].

Plazmid DNA bazlı aşılar sıtma ve AIDS ile mücadelede olumlu sonuçlar vermiştir [58, 59]. Yine son yapılan plazmid DNA bazlı aşı çalışmaları tüberküloz, Hepatit B ve C'ye karşı birçok infeksiyon hastalıkları için de araştırılmaktadır [60, 61].

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Odabaşı vd., (2005); poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) bazlı manyetik kürecikler ile sistemik lupus eritematosus (SLE) hasta plazmasından anti-DNA antikorlarını uzaklaştırmayı hedeflemişlerdir. 80-120 µm aralığında sentezlenen küreciklere DNA bağlamayı başarmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucuna göre; maksimum DNA adsorpsiyonu 87,6 mg/g polimerdir. DNA afinite membranların tekrar kullanılması noktasında adsorpsiyon kapasiteleri önemli ölçüde düşmemektedir [62].

Odabaşı vd., (2009); Metal-şelatlanmış poli (HEMA-MAH) monolitik kriyojelleri DNA adsorpsiyonunu incelemek üzere hazırlamışlardır. Maksimum DNA adsorpsiyonu miktarı pH 7'de tris tamponu eşliğinde 32,93 mg/g olarak elde edilmiştir. Hazırlanan kriyojellerin DNA adsorpsiyon/desorpsiyon kapasitesinde belirgin bir kayıp olmadan defalarca kullanılabileceği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, yüksek miktarlarda DNA adsorpsiyonu için poli (HEMA-MAH) kriyojeller umut vericidir [63].

Çimen vd., (2015); bakteri lizatından plazmid DNA'nın saflaştırılması için mega-gözenek yapısında boya afinite kriyojel diskleri hazırlamışlardır. Afinite ligandı olarak Cibacron Blue F3GA kullanılmıştır (yükleme miktarı: 68.9 µmol / g polimer). Yapılan deneyler sonucunda, PHEMA-Cibacron Blue F3GA kriyojel disklerin pDNA için yüksek seçiciliği olduğunu ve DNA için afinite gösterdiğini kanıtlamaktadır [43].

Ceylan vd., (2013); DNA adsorpsiyon çalışmaları için Fe⁺³ takılı sporopollen partiküller hazırlamış olup monomer olarak 2-hidroksietil metakrilatın (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak N, N'-metilenbis-akrilamid (MBAAm) ile doğrudan bir kriyo-kopolimerizasyon tekniği ile şırınga içerisinde kompozit bir kriyojel sentezlemişlerdir. DNA adsorsiyonu 109 mg/g polimer olarak bulunmuştur [64].

Perçin vd., (2011); tarafından yapılan çalışmada ise, poli (hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(l)-histidin metil ester) (PHEMAH) bazlı süpermakro gözenek yapısına sahip ve spesifik olarak plazmid DNA saflaştırmak üzere dizayn edilen kriyojeller hazırlanmışlardır. Bu çalışmada, PHEMAH kriyojeller, serbest radikal polimerizasyonu ile üretilmiştir. N-metakriloil-(l)-histidin metil ester (MAH), psödospesifik ligand ve komonomer olarak seçilmiştir. DNA'nın toplam geri kazanımı % 90 olarak hesaplanmıştır. PHEMAH kriyojel disklerinin pDNA için yüksek seçiciliği vaad ettiğini göstermektedir [65].



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Deneyde yararlanılan EPS Aksaray Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fatma Gürbüz tarafından üretilmiş ve temin edilmiştir. Monomer olarak Fluka A.G'den alınan 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) kullanılmıştır (Buchs, Switzerland) ve hidrokinon inhibitörü eşliğinde indirgenmiş basınçta damıtılarak kullanılıncaya dek +4°C'de korunarak saklanmıştır. Amonyum persülfat (APS), *N,N,N',N'*-tetrametilen diamin (TEMED) ve *N'*-metilen-bis-akrilamid Sigma'dan temin edilmiştir (St. Louis, USA). Deneylerde kullanılan DNA Aldrich (Munich, Germany)'den satın alınmıştır. Agaroz AppliChem firmasından temin edilmiştir. DNA izolasyonu ve diğer analizler için kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Deneyde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE® ile ters osmos birimi Barnstead (Dubuque.IA) RO pure LP® organik/kolloid uzaklaştırılması ve iyon değişim dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılan aletten yararlanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Siyanobakteri üretimi ve EPS ekstraksiyonu

Arthrospira maxima'dan elde edilen hücre dışı polimerik yapılar (EPS) kullanılarak afinite membranlar sentezlendi ve İMAK yöntemi ile DNA adsorpsiyon performansları incelendi. Bu amaçla, *A. maxima* için [65] besi yeri kullanılarak üretimleri gerçekleştirildi. EPS ekstraksiyonu ve analizi, fiziksel olarak santrifüj ve sonikatörde 2 dakika ve bunu takiben kimyasal olarak (Formaldehit + NaOH) [66] daha önceki çalışmalarda literatüre verildiği gibi yapıldı.

EPS miktarını belirlemek için glukoz standardı ile fenol-sülfirik asit yöntemi kullanıldı [67]. Liyofilize EPS suda çözündürülüp, seyrelttikten sonra 0.2 mL

alınır, 0.2 mL % 5'lik (w/v) fenol (suda) ve 1 mL % 98'lik (v/v) sülfürik asit ile karıştırılarak, 490 nm absorbandsda ölçölüp, EPS miktarı mg/L olarak besi yerinde glukoz ağırlığı olarak hesaplandı.

Elde edilen biyopolimerik yapılar, aşırı şişmelerini engellemek amacıyla belirli derişimlerde glutraldehit (aşırı şişmesini engellemek için çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı) ile muamele edildikten sonra şırıngılarda uygun polimerizasyon ortamına alındı.

Elde edilen biyopolimerik yapılar kriyojellere, polimerizasyon sırasında gömölüp hazırlanan kriyojellere $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (pH 4,5) çözeltisinde Fe^{3+} iyonu bağlandıktan sonra, yüzey karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımı ile incelendi. Çalışma kapsamında Fe^{3+} takılı ekstraselüler biyopolimerik membranların sulu çözeltiden DNA adsorpsiyonuna karşı davranışları incelendi.

3.2.2 EPS -PHEMA kompozit kriyojellerin hazırlanması

Ekstraselüler polimerik maddelerin (EPS), Poli (2-Hidroksietil metakrilat) (PHEMA) ile oluşturduğu kompozit kriyojelinin hazırlanması serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir [64]. Buna göre: 0,06 mL HEMA monomer olarak ve 40 mg MBAAm çapraz bağlayıcı olarak 2,2 mL deiyonize suda çözünmeye bırakıldı. Karışım, çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için 5 dakika azot atmosferine maruz bırakıldı. 100 mg EPS polimerizasyon ortamına ilave edildi. %10'luk amonyum persülfat (APS, 0,1 mL) çözeltisi karışıma koyulmasının ardından hazırlanan çözelti bir buz banyosunda 5 dakika bekletilip soğutuldu. Ardından, karışım alt çıkışı kapalı sistemli plastik şırıngaya (2,5 mL, iç çapı yaklaşık 0,5 cm) alındı. Tetraetilmetilendiamin (TEMED, 0,01 mL) ilave edilip, serbest radikal polimerizasyonu başlamadan monomer karışımı içeren şırıngalar, 24 saat süreyle -12 °C'de buzdolabında bekletildi. Bu işlemten sonra, polimerizasyon çözeltisi oda sıcaklığına bırakılarak tepkimenin tamamlanması beklendi. Meydana gelen kompozit kriyojel başlatıcıyı ve reaksiyona girmeyen monomeri uzaklaştırmak için uzun bir yıkama işlemine tabi tutuldu. Seyretilik HCl çözeltisi ve su-etanol karışımı yıkama çözeltisi olarak kullanıldı ve belirli bir akış hızında monolitik kriyojel kolondan geçirildi.

3.2.3 EPS-PHEMA kompozit kriyojelle Fe³⁺ iyonlarının bağlanması

EPS-PHEMA kompozit kriyojellere Fe³⁺ bağlanması için yapılan işlemler sırası ile şöyledir; 100 mL, 50 ppm'lik Fe³⁺ iyonları içeren çözelti hazırlanıp pH 4,5'e ayarlandı (0,01M HCl çözeltisi ile). EPS-PHEMA kompozit kriyojeller, peristaltik pompa ile 1 saat boyunca Fe³⁺ iyonları ile etkileşime bırakıldı. Fe³⁺ iyonları bağlandıktan sonra Fe³⁺- EPS-PHEMA kompozit kriyojeller bir gün boyunca saf su ile yıkandı ve daha sonra % 0,02'lik sodyum azid içeren çözeltide +4°C'da bekletildi. Fe³⁺ iyonları kaynağı olarak 1000 ppm atomik absorpsiyon standart çözeltisinden (%10 HNO₃ içeren) yararlanıldı. İmmobilizasyon işleminden sonra, Fe³⁺ başlangıç ve denge çözeltileri iyonlarının derişimi grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AA800, Perkin Elmer, Bodenseewerk, Germany) aracılığıyla saptandı. Adsorplanan Fe³⁺ iyonları, başlangıç çözeltisindeki Fe³⁺ iyonları ve dengedeki çözeltide Fe³⁺ iyonlarından faydalanılarak hesaplandı (Eşitlik 3.1).

$$Q = [(C_o - C)V]/m \quad (3.1)$$

Buradaki eşitlikte, Q ; 0,1 g EPS moleküllerine adsorplanmış olan metal iyon miktarını (mg/g); C_o ve C sırası ile sulu çözeltide bulunan metal iyonunun başlangıç ve son derişim değerini (mg/mL); V sulu fazın hacmini (mL); m ise deneyde kullanılan kompleksin miktarını (g) göstermektedir.

Fe³⁺ bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerde Fe³⁺ sızma kontrolü, pH 4-8 arasında olan ve 1,0 M NaSCN bulunan bir ortamda kontrol edildi. Fe³⁺ -EPS-PHEMA kompozit kriyojeller 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Elde edilen çözeltiler, AAS cihazında okundu.

PHEMA ve EPS-PHEMA kompozit kriyojeller, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yüzey morfolojileri açısından incelendi. Örnekler, saf suda şişirildikten sonra mutlak alkolde beklemeye alındı. Böylece, örnekteki su molekülleri ile etanol moleküllerinin yer değişimi sağlandıktan sonra, örnekler 60°C'da vakum etüvünde alkolün buharlaşması için bekletildi. Örnekler üçboyutlu yapılarını kaybetmeden SEM incelemesine alındı.

3.2.4 Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kompozit kriyojelin şişme testleri

Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kompozit kriyojelin şişme deneyleri, deiyonize sudaki denge şişme oranlarının saptanması ile hesaplandı. Denge şişme oranının saptanmasında kullanılan yöntem şöyledir: 60°C'da vakum etüvünde kurumaya Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojel hassas bir şekilde tartılmasından sonra, damıtık su (20 mL) bulunan bir behere konuldu. Belirli sıcaklıkta 25±0.5°C'de yaklaşık 2 saat bekletilmesinin ardından, Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojel alındı ve SCALTEC marka terazi (Germany) ile (1x 10⁻⁴ duyarlılıkta) tartıldı. Kuru ve şişmiş Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojel ağırlıkları kaydedildi. Her kriyojelin su içeriği Eşitlik 3.2'de belirtilen denklem ile ayrı ayrı hesaplandı:

$$\text{Şişme oranı} = (W_s - W_o) / W_o \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte; W_o: kuru ağırlık (g) W_s: şiştikten sonraki ağırlığı (g) temsil etmektedir. Ayrıca Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojelin sahip olduğu makrogözeneklilik yüzdesinin saptanması için faydalanan yöntem de şu şekildedir:

Denge şişme oranını tamamlamış olan örnek kriyojel (W₁) tartıldı. Ardından, şişmiş kriyojel numunesi bir enjektöre alındı ve kriyojelin makrogözeneklerindeki suyun giderilmesi için kriyojel enjektör vasıtası ile sıkıldı ve kriyojeller (W₂) tartıldı. Kriyojellerdeki makrogözeneklilik yüzdesi Eşitlik 3.3'den faydalanılarak hesaplandı.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.5 Sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu

Sulu ortamdan DNA adsorpsiyonu incelenirken; ortam pH'sı, başlangıç DNA derişimi, akış hızı, iyonik şiddet vesıcaklık gibi parametrelerin adsorpsiyon üzerine etkileri incelendi. Fe³⁺ bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojeller su ile yıkanmasının ardından (30 mL) sonra 20 mL çalışma tamponu, 0,5 mL/dk akış hızında 20 dakika boyunca kolondan geçirildi. Çalışmalar 25°C'da gerçekleştirildi. Adsorpsiyona ortam pH'sının, DNA adsorpsiyonuna etkisi incelenirken, 0,05 mg/mL'lik DNA derişiminde ve pH 5 ile 8 aralığında çalışmalar yapıldı (pH 5 ile 6 arası asetat, pH 7 ile 8 arası MOPS (3-Morfolinopropan-1-sülfonik asit tamponu). Başlangıç derişim miktarının adsorpsiyona etkisi ise pH 6 asetat tamponunda, 0-2,0 mg/mL başlangıç derişimine sahip DNA çözeltileri ile deneyler yürütüldü. Bu çalışmalarda, deneysel ve teorik maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin saptanabilmesi hedeflenmiştir. Sulu

ortamdan DNA adsorpsiyon performanslarının sıcaklıkla değişimi 5°C, 15°C, 25°C ve 35°C sıcaklıklarında incelendi. Sıcaklık taraması için, sürekli sistemde su ceketli cam kolon sisteminden yararlanıldı. İyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi, pH 6'da 0,05 mg/mL DNA çözeltisinin NaCl derişimin 0-3,0 M arası değiştirilmesi ile gerçekleştirildi. Akış hızının adsorpsiyon üzerine etkisi ise, pH 6'da 0,05 mg/mL DNA çözeltisinin 20 mL'sinin, 0,5–1,5 mL/dk arasında akış hızlarıyla kolona gönderilmesi ile incelendi.

Yürütülen deneylerin her aşamasında adsorplanan DNA miktarı (adsorpsiyon öncesi ve adsorpsiyon sonrasında ortamdan alınan çözeltilerin), UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) 260 nm dalga boyunda okutulması ile saptandı ve Eşitlik 3.4'den yararlanıldı.

$$Q = [(Co-C) V]/m \quad (3.4)$$

Burada Q ; Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerde adsorblanan DNA miktarını (mg/g), Co ; DNA çözeltisindeki başlangıç derişimini (mg/mL), C ; adsorpsiyon sonrası sulu fazın DNA konsantrasyonu (mg/mL), V ; çözeltinin hacmini (mL) ve m ise deneyde kullanılan Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin kütlesini (g) vermektedir.

3.2.6 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

DNA desorpsiyonunda, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl çözeltisi kullanıldı. DNA adsorplanmış Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojel kolonlardan desorpsiyon ajanı, 1 mL/dk akış hızında ve 20 dakika süre ile geçirildi. Desorpsiyon ortamındaki DNA miktarı 260 nm'de spektrofotometrik yöntem kullanılarak saptandı. Desorpsiyon sırasında ortamdaki DNA derişimi ile kriyojele adsorbe olan DNA miktarından desorpsiyon oranı Eşitlik 3.5'ten yararlanılarak bulundu.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan DNA} \times 100}{\text{Adsorplanan DNA}} \quad (3.5)$$

Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojelin defalarca kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi adına aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon adımları 35 defa gerçekleştirildi. Desorpsiyon işlemlerinin hepsinin ardından, Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojeller, 50 mM NaOH çözeltisi ile rejenerasyon ve sterilizasyon için temizlenip yıkandı ilgili çalışma tamponu ile dengeye getirildi.

3.2.7 *E.coli DH5α* lizatından faydalanılarak plazmid DNA saflaştırılması

Bakteri kültürü Aksaray Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Arş. Gör. Dr. Demet Erdönmez'den temin edilmiştir. Bakteri kültür ortamından izole edilen pDNA, sulu çözeltiden adsorpsiyon çalışmalarında saptanan standart koşullar dikkate alınarak ve aşağıdaki yöntem uygulanarak saflaştırılmıştır.

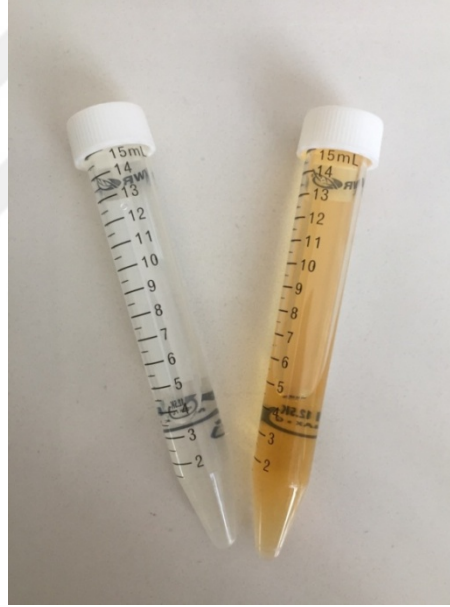
pMAD plazmidi içeren *E.coli DH5α* suşundan alkalın lizis metodu ile plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 1,5 mL Luria Bertani-ampisilin içeren sıvı besiyerinde üretilen *E.coli* kültürü, 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet, üzerine 200 µL 50 mM Tris-10 mM EDTA solüsyonu ve 4 µL RNaz eklenerek vortekslendi. 200 µL 0.2 M NaOH ve %1 SDS solüsyonu eklenerek karışım el ile alt-üst edildi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak eldeki karışımın üzerine 200 µL 2.55 M KAc pH 4.8 çözeltisinden eklenerek 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip, üst faz yeni bir tüpe aktararak üzerine eşit hacimde izopropanol eklendi ve 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüpteki tüm süpernatant boşaltıldı ve üzerine 300 µL %70'lik etanol solüsyonundan eklenerek 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Tüpteki tüm etanol boşaltılarak plazmid DNA bulunan tüpler oda ısısında kurumaya bırakıldı. Elde edilen DNA'lar 30 µL dH₂O içerisinde çözülerek çalışmalarda kullanıldı. Plazmid DNA spektrofotometrik ölçümle elde edilen A₂₆₀/A₂₈₀ oranı göz önüne alınarak hesaplandı. Bakteri lizatındaki ve elüsyondaki, plazmid oranının belirlenebilmesi için nano drop spektrofotometresinden (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Scientific) yararlanıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA Karakterizasyonu

4.1.1 EPS-PHEMA kompozit kriyojelle Fe³⁺ iyonlarının immobilizasyonu

EPS-PHEMA kompozit kriyojellere ve boş PHEMA kriyojellere, Fe³⁺ bağlanma miktarları sırasıyla, 22,5 mg/g ve 3,8 mg/g olarak bulundu. Sonuçlardan, 18,7 mg/g lık bir Fe³⁺ miktarının EPS farkından kaynaklı olduğunu göstermektedir. EPS-PHEMA kompozit kriyojel kolona Fe³⁺ çözeltisi gönderilmeden önceki ve gönderildikten sonraki çözeltiler Şekil 4.1’de verilmiştir. Ayrıca, Fe³⁺ çözeltisi geçirilmiş EPS-PHEMA kompozit kriyojel ile boş kriyojel kolonların optik fotoğrafları da Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekillerden de görülmektedir ki, EPS’nin Fe³⁺ iyonlarının bağlanması üzerine oldukça yüksek bir etkisi bulunmaktadır.



Şekil 4.1. EPS-PHEMA ve PHEMA kriyojelle Fe³⁺ iyonlarının immobilizasyonu sonucu oluşan final çözeltileri.



Şekil 4.2. EPS gömülü ve boş kriyojele Fe^{3+} iyonlarının immobilizasyonu sonucu oluşan kriyojeller.

4.1.2 Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojelin şişme testleri

Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojeller, çapraz bağlı olup hidrofilik formda destek matriksleridir. Diğer yandan; bu kompozitler, süngerimsi ve elastik yapıdadır. Yapısındaki çapraz-bağ oranına ve destek matriksin hidrofilitesine ilişkili olarak yapılarına su alarak şişerler. Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilecek seviyededir. Su ile muamele edilen kriyojel parçası kısa bir süre içerisinde asıl boyut ve şeklini tekrar kazanabilmektedir. Kriyojellerin şişme testleri yapılırken, su ile şişirilmiş hacim, Kriyojelin gözenekliliği ve toplam su fraksiyonu gibi parametrelere bakılır. Su ile şişirilmiş hacim incelenirken, belirli bir parça kriyojel su ile dengeye getirildikten sonra, içinde belli hacimde su bulunan bir mezüre bırakılır. Mezürün başlangıç hacmi V_1 ile son hacmi V_2 arasındaki fark olan V_o hesaplanır.

$$V_o = V_2 - V_1 \quad (4.1)$$

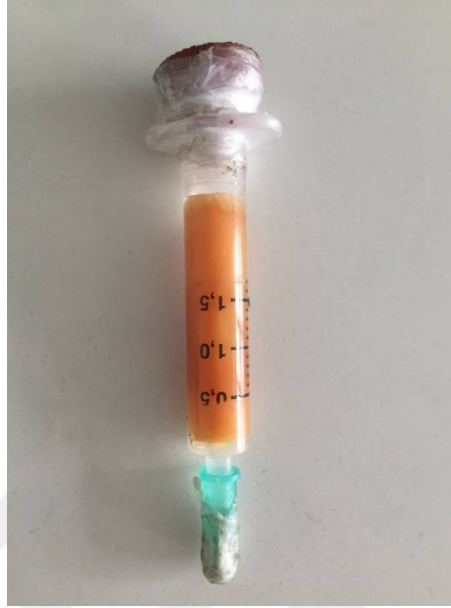
Su ile doyurulmuş kriyojelin miktarı (m_w), ve sıkılmış miktarı da (m_s) gram olarak tartıldığında, suyun yoğunluğu ρ_w olarak dikkate alınır ve aşağıdaki formülle kriyojelin gözenekliliği (ϕ) hesaplanır:

$$\phi = (m_w - m_s) / \rho_w V_o \times 100 \quad (4.2)$$

Son olarak, toplam su fraksiyonu (TSF) ise, $60^\circ C$ 'ta kurutulmuş kriyojelin gram ağırlığında (m_d) kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$TSF = (m_w - m_d) / \rho_w V_o \times 100 \quad (4.3)$$

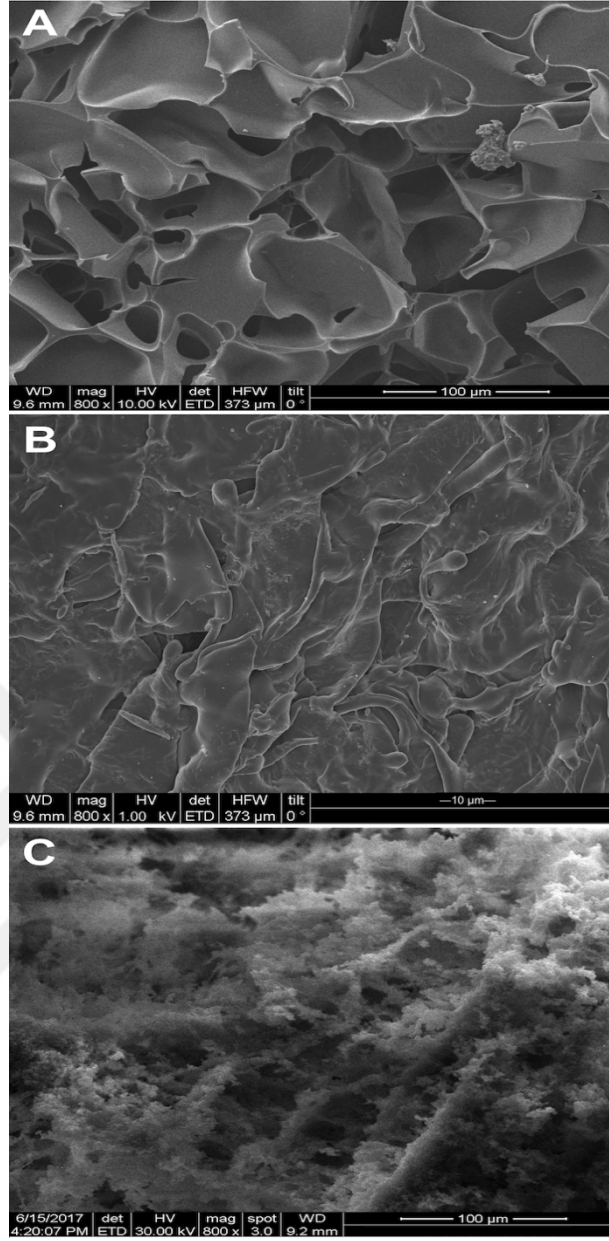
Yukarıdaki formüller kullanılarak, T_{SF} ve ϕ sırasıyla %94 ve 69 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan, kriyojelin mikrogözenekli duvarlarının, yaklaşık %25 su tuttuğu sonucu çıkartılabilir.



Şekil 4.3. Polimerizasyonu tamamlanmış ve su ile şişirilmiş Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojel.

4.1.3 Taramalı elektron mikroskop ile karakterizasyon

Boş PHEMA, EPS ve EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin yüzey yapılarını analiz etmek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Üç yapının da SEM görüntüleri Şekil 4.5 A, B ve C'de verilmiştir. Alınan mikrograflardan da görüleceği üzere, boş PHEMA geniş gözeneklere ve düşük yüzey alanına sahip bir polimerik yapıdır. EPS ise fazla gözenekli olmayan fakat engembeli bir yığın yüzeye sahip iken, iki yapının kompozit olması, gözenekli ve daha geniş bir yüzey alanı sunmaktadır. EPS yapısı, kriyojelin çeperlerine homojen olarak dağılarak, boş kriyojele göre daha geniş bir yüzey alanı sağlamıştır. DNA gibi büyük moleküler yapılara sahip maddeleri barındıran hareketli fazın bile, gözeneklerde konvektif akışı sebebi ile kütle aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilecek seviyededir. Bu durum adsorplanan DNA miktarının artmasıyla sonuçlanmıştır.



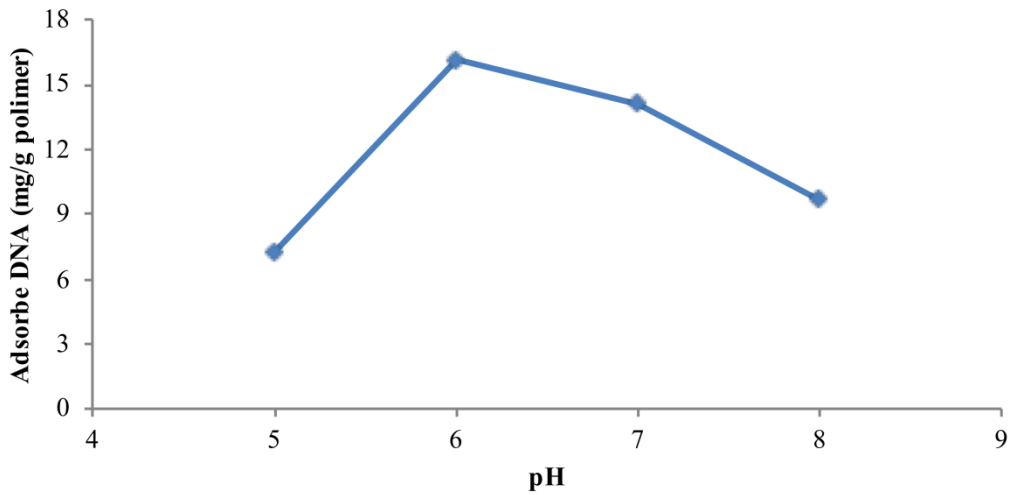
Şekil 4.4. A. Boş Kriyojelin; B. EPS'nin; C. EPS-PHEMA kompozit kriyojelin SEM görüntüleri.

4.2 Fe³⁺ bağı EPS-PHEMA Kompozit Kriyojellere DNA Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1 pH'nın etkisi

İmmobilize metal afinite kromatografisinde DNA adsorpsiyonu esas olarak metal iyonları ile fosfat omurgası veya DNA bazları arasında gerçekleşir. DNA'nın izoelektrik pH'sı 5 civarındadır. Bu pH'nın üzerinde DNA negatif yükleneceğinden, DNA adsorpsiyonu zayıf alkali pH değerinde maksimum gözlenir [64].

Şekil 4.6'da Fe³⁺ bağı EPS-PHEMA kompozit kriyojele DNA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi verilmiştir. Grafikten görüleceği gibi, DNA adsorpsiyonu pH 6'da maksimumdur. Bu pH değeri yukarıda belirtilen literatür çalışmasını da desteklemektedir. pH faktörü arayüzeyde bulunan kovalent olmayan etkileşimlerle yönetilen afinite kromatografi metodunda büyük bir rol oynamaktadır. Bu pH değeri altında ve üzerindeki pH' larda adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir.

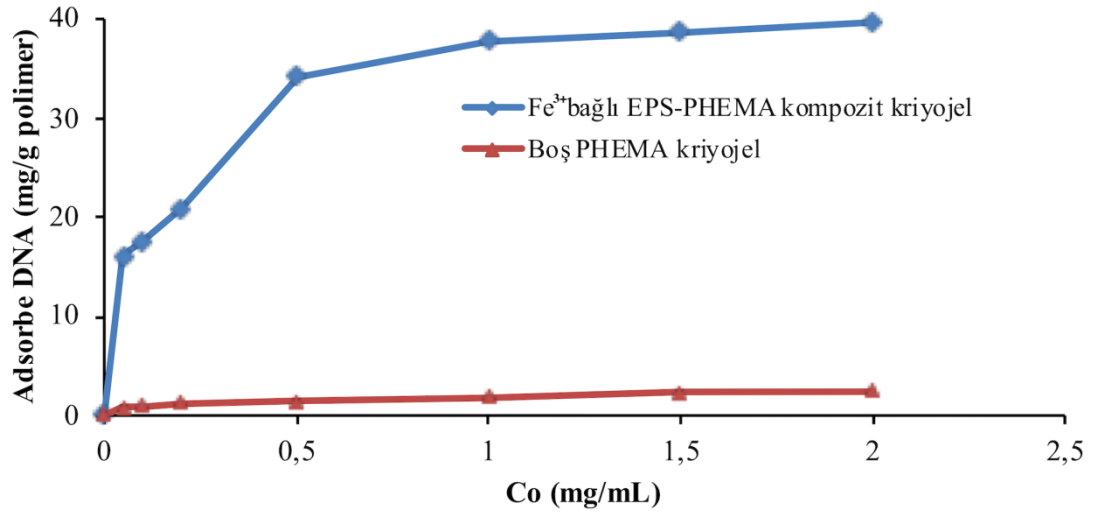


Şekil 4.5. DNA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi (pH 6-8: Asetat tamponu; pH 5-6: MOPS tamponu; 7-8. Co: 0,05 mg/mL, akış hızı: 0,5 mL/dk, T: 25°C.

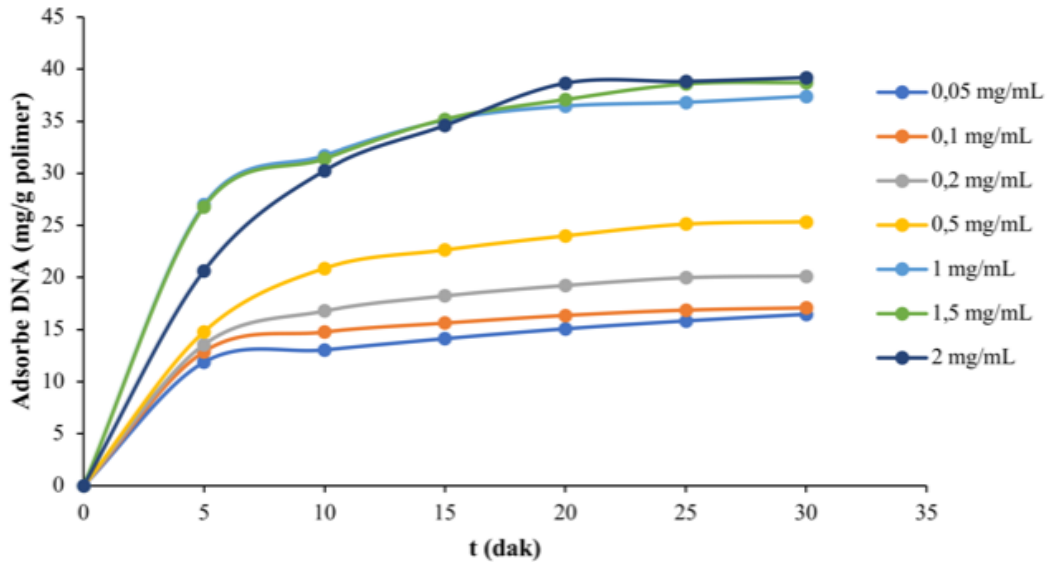
4.2.2 Adsorpsiyona DNA başlangıç derişiminin etkisi

Şekil 4.6'da, Fe³⁺ bağı EPS-PHEMA kompozit kriyojellere DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi gösterilmiştir. Çalışılan derişim taramasında, 1 mg/mL'den itibaren denge adsorpsiyon değerine yaklaşıldığı, 2 mg/mL derişimde ise 39,7 mg/g polimer ile maksimuma ulaştığı görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda, Fe³⁺ takılı EPS-PHEMA kriyojele DNA adsorpsiyonu oldukça yüksektir (39,6623 mg/g polimer). Şekil 4.6'dan da anlaşılacağı gibi, adsorpsiyon aktif

bölgeleri doygunluğa ulaştığından dolayı, 2mg/mL lik başlangıç DNA derişiminde adsorpsiyon platoya ulaşmıştır. Bu derişimden itibaren, Fe^{3+} bağı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin özgü etkileşim gruplarının, DNA molekülleriyle doygun hale gelmesiyle adsorpsiyon hızında bir yavaşlama olduğu düşünölmüştür [68]. Ayrıca, Fe^{3+} bağı EPS katkısının adsorpsiyona etkisini görmek için boş PHEMA kriyojelin DNA'ya karşı davranışı incelenmiş ve ihmal edilebilecek kadar düşük seviyede olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.6. DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi; pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25°.



Şekil 4.7. DNA adsorpsiyonunun zamana karşı grafiğı.

4.2.3 Adsorpsiyon izotermi

Literatürde, protein ve protein bağlayıcı bölgelerdeki etkileşimlerin Langmuir izotermi ile ifade edilebileceği gösterilmiştir [69]. Aslına bakılacak olursa, adsorpsiyon bir denge reaksiyonu olup, çözelti belirli seviyede adsorplayıcı ile etkileştirildiğinde, çözeltide adsorplanan miktar derişimi, adsorplayıcı yüzeyindeki gruplarla dengeye gelene kadar düşer. Adsorpsiyon dengesi oluştuktan sonra, adsorplanan maddenin çözelti ortamındaki derişimi sabit kalır. Genellikle, adsorplanan madde seviyesi, belirli bir sabit sıcaklıkta konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak saptanır. Sabit sıcaklık ve denge hallerinde çözeltide kalan çözünen derişimine karşı, birim adsorplayıcı madde ağırlığında, adsorplanan çözünen madde miktarı grafiği çizilerek adsorpsiyon izotermi adı verilen bir fonksiyon oluşturulur. Langmuir izotermine uyumlu kütle-transfer hız eşitliği tanımlanmıştır (Eşitlik 4.4).

$$d_q/d_t = k_1 C_e (Q_m - Q_e) - k_2 Q_e \quad (4.4)$$

Bu eşitlikteki C_e serbest molekül, Q_e adsorplanan molekül derişimi, q_m molekülün en yüksek bağlanma kapasitesinin ölçüsü ve t zamanı ifade eder. Hız sabitleri k_1 ve k_2 kütle transfer engellemesini de hesaba katarak molekülün adsorplayıcı bölgelerine adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünü belirten “toplu” parametrelerdir. Bütün bağlanma bölgelerinin eş enerjiye sahip ve birbirinden bağımsız ve dengede oluşan etkileşimin bir noktadan meydana geldiği farzedilirse, Eşitlik 4.4 ve Eşitlik 4.5'de gösterilen adsorpsiyon izotermine çevrilebilir.

$$Q_e = Q_m C_e / (K_d + C_e) \quad (4.5)$$

Burada K_d ayrışma sabiti olup $[(k_2/k_1);$ ileri ve geri tepkime hızlarının birbirine oranı]. K_d konsantrasyonun bir ölçütüdür ve küçük değerlerde molekülün bağlanma potansiyeli kuvvetlidir. Polimerin yüzeyinde bulunan bağımsız bulunan etkileşim bölgelerinin mevcudiyetinin geçerliliğini belirtmek için Eşitlik 4.6'daki için semireciprocal (yarım-taraflı düzenleme) eşitliği çalışılmıştır ve oluşturulan grafik Şekil 4.6'da verilmiştir [70].

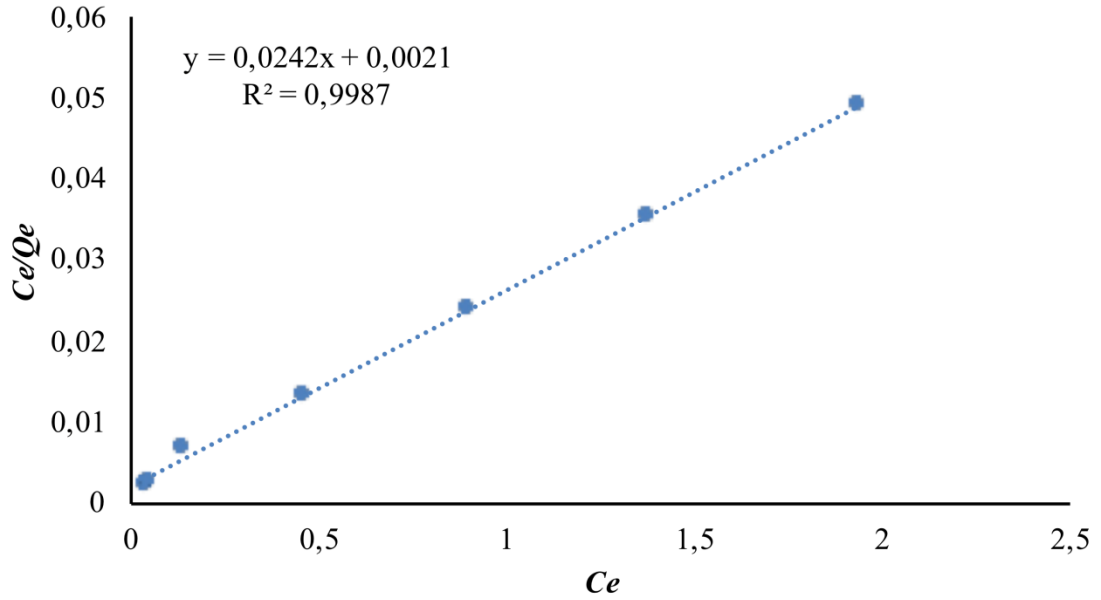
$$C_e/Q_e = K_d/K_m + C_e/Q_m \quad (4.6)$$

C_e : Adsorpsiyon ardından dengede olan maddenin derişimi (mg/mL)

Q_e : Birim adsorbent üzerinde tutunan maddenim miktarı (mg/g adsorbent)

Q_m : Adsorbentin maksimum tutma kapasitesi

K_d : Ayırışma sabitidir



Şekil 4.8. Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Yukarıdaki grafikte verilen eğim $1/Q_m$ 'yi doğrunun y eksenini kestiği nokta ise K_d/Q_m 'yi belirtmektedir. Adsorpsiyon karakterlerini belirlemek için yararlanılan diğer bir izotermse Freundlich olarak adlandırılan adsorpsiyon izotermidir. Langmuir adsorpsiyon izoterminde; tek tabaka adsorpsiyon işlemi ile oluşurken, Freundlich adsorpsiyon izotermi tek tabakadan ibaret değildir. Freundlich çözeltilerin adsorpsiyon karakterini belirlemek için Eşitlik 4.7 çıkarılmıştır. Bu çıkarımda, Eşitlik 4.8'deki gibi uyarlanmış olan grafik Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

$$Q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (4.7)$$

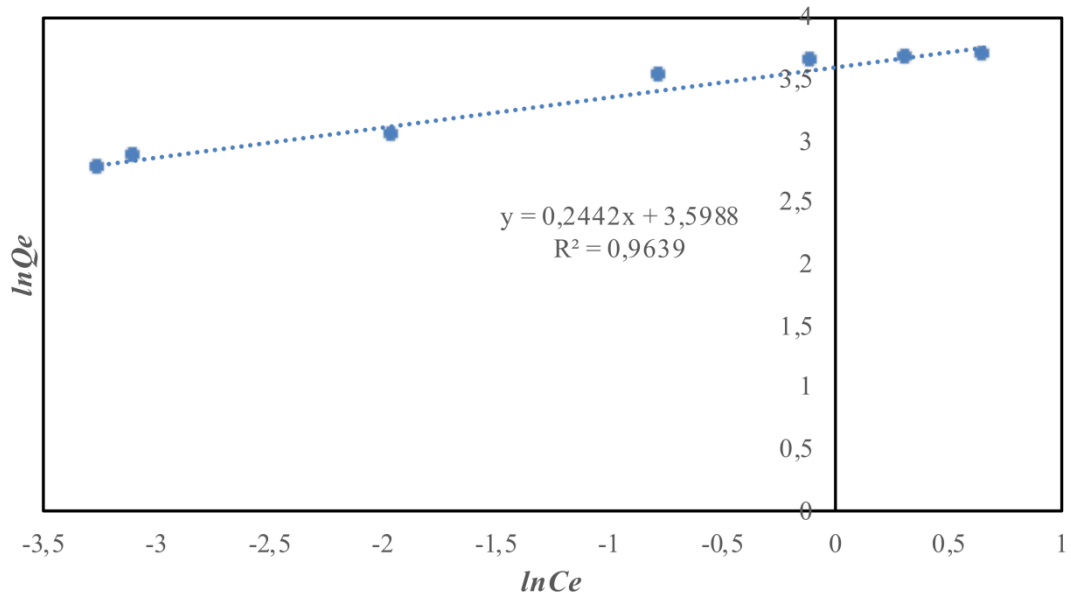
$$\ln Q_e = 1/n \cdot \ln C_e + \ln K_f \quad (4.8)$$

C_e : Adsorpsiyon ardından dengede olan maddenin derişimi (mg/mL)

Q_e : Birim adsorbent üzerinde tutunan maddenim miktarı (mg/g adsorbent)

K_f : Freundlich adsorpsiyon sabiti (mg/g)

n : Adsorpsiyon yoğunluğudur



Şekil 4.9. Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Verilen doğrunun Şekil 4.9'da gösterildiği gibi y eksenini kestiği nokta K_f değerini verirken, eğim $1/n$ 'yi vermektedir. Burada adsorpsiyon prosesinin, $n > 1$ değeri uygun olduğunu belirtmektedir [71].

Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerinden sağlanan veriler ışığında Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
Q_m	B	R^2	K_f	N	R^2
41.32	11.52	0,9987	36.55	4.09	0.9639

Çizelge 4.1'deki korelasyon katsayılarına baktığımızda, Langmuir adsorpsiyon izotermine bu çalışmaya daha elverişli olduğunu sayısal olarak görmekteyiz. Bu sonuçlar, adsorpsiyonun tek tabakalı bir adsorpsiyon olduğunu göstermektedir.

İzoterm davranışının adsorpsiyon sistemlerinde “tercihli” ya da “tercihsiz” olmak üzere belirlenmesinin de bir ölçütü olabileceği literatüre girmiştir [72].

Langmuir izotermine kayda değer karakteristikleri, boyutsuz bir sabit olan ayırma faktörü veya denge parametresi ile, R_L cinsinden Eşitlik 4.9'daki gibi tanımlanabilir:

$$R_L = 1/(1 + bC_0) \quad (4.9)$$

C_0 : Başlangıç DNA konsantrasyonu (mg/mL)

b : (1/ K_d) Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir (mL/mg)

Çizelge 4.2. Ayırma faktörünün izoterm şekline etkisi.

R_L Değeri	İzoterm Türü
$R_L > 1$	İstemsiz
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	İstemli
$R_L = 0$	Tersinmez

Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA adsorpsiyonuna, DNA başlangıç derişimleri için hesaplanan R_L değerleri Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Langmuir eşitliğine dayalı R_L değerleri.

DNA Derişimi (mg/mL)	R_L
0,05	0,634
0,1	0,464
0,2	0,302
0,5	0,148
1,0	0,079
1,5	0,055
2,0	0,042

Çizelge 4.3'de görüleceği üzere R_L değerlerinin 0 ile 1 arasında oluşu Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA adsorpsiyonuna karşı istemli olduğunu göstermektedir.

4.2.4 Adsorpsiyon kinetiği modellemesi

Adsorpsiyon kontrol mekanizmasını incelemek için kütle transferi ve kinetik modeller gibi deneysel veriler kullanılır [73]. Şekil 4.7'den yola çıkarak kinetik modelleri türetildi. Kinetik modeller, pseudo (yalancı) birinci ve ikinci derece denklemleri) ölçülen konsantrasyonların adsorbentin yüzey konsantrasyonlarına eşit olduğu varsayılarak kullanılabilir. Lagergren'in birinci dereceden hız denklemi sıvı bir çözeltideki çözünen maddelerin adsorpsiyon işlemlerinde en yaygın olarak kullanılanlardan olup aşağıdaki temsil edilebilir:

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (4.10)$$

k_1 , Pseudo-birinci derece adsorpsiyonunun hız sabiti (1/dk) ve q_{eq} and q_t ise t zamanında dengede olan adsorbe protein miktarını (mg/g) verir.

$$\log [q_{eq}/(q_{eq} - q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.11)$$

Sınır koşulları uygulandıktan sonra,

$t = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t'$ 'de $q_t = q_{t'}$, değerlerini verir.

Eşitlik 11'deki denklemin düzenlemesi ile denklemin lineer formu elde edilir.

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log q_{eq} - k_1 t/2.303 \quad (4.12)$$

Kinetik modelin uygulanabilirliğini doğrulamak için, $\log q_{eq}$ 'ye karşı lineer düz bir çizgi vermelidir. Gerçek birinci mertebeden bir işlemde, $\log q_{eq}$, çizginin altında kalan alanın t üzerinden $\log(q_{eq}-q_t)$ kesişme noktasına eşit olmalıdır. Buna ek olarak ikinci derece denklem eşitliği aşağıdaki formdaki gibi ifade edilebilir.

$$d_q/d_t = k_2(q_{eq} - q_t)^2 \quad (4.13)$$

Bu eşitlikte k_2 (g/mg.min), adsorpsiyon sürecinde görünür birinci dereceli denklemin hız sabitidir. Eşitlik. (12) ile bütünleşen tepkime sonucunda $t=0$ anında $q_t = 0$, $q_t = q_t$ anında $t = t$ sonucuna neden olur.

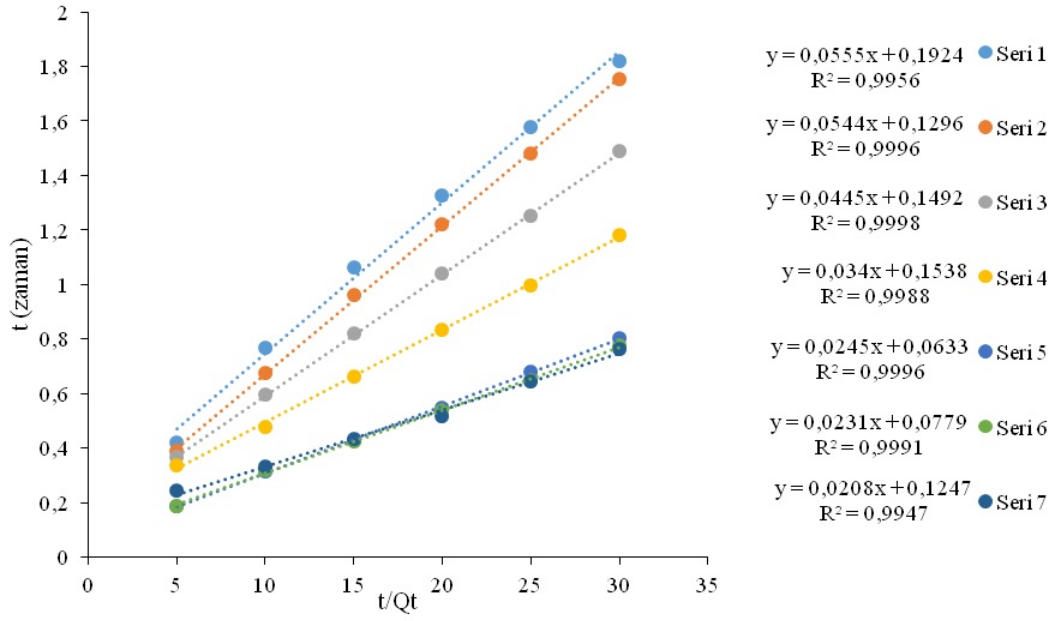
$$1/(q_{eq} - q_t) = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (4.14)$$

Gerekli düzenlemeler sonucunda doğrusal formu aşağıdaki eşitliğe denk olur.

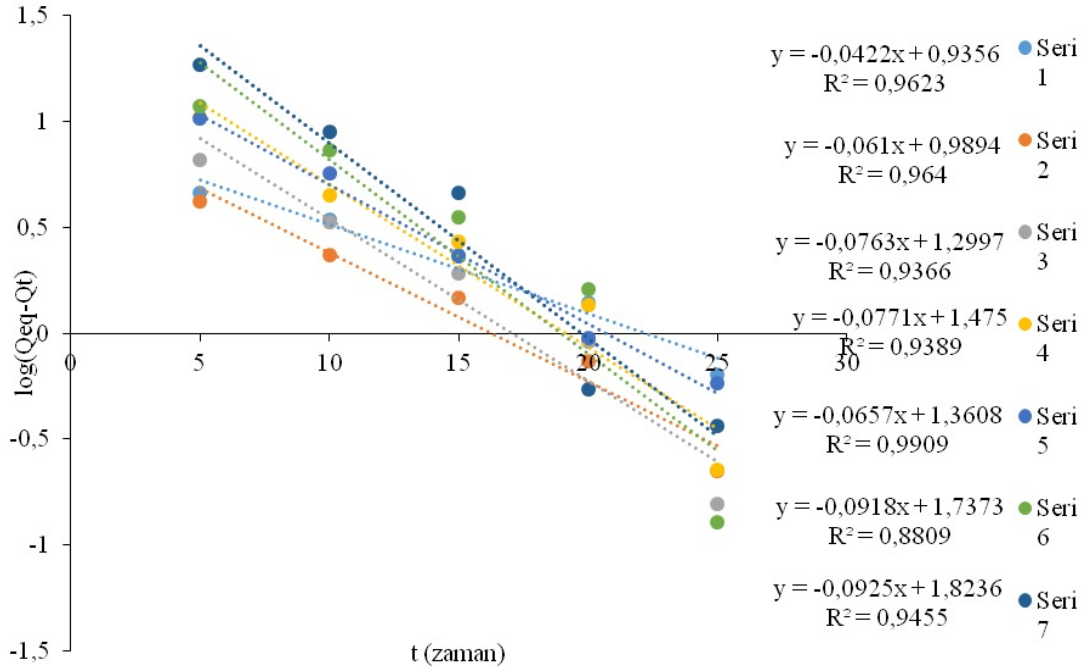
$$t/q_t = 1/(k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.15)$$

İkinci dereceden bir hız denklemi için (t/q_t) karşı grafik çizimi, uygulanabilirlik için doğrusal bir ilişki vermek zorundadır. Dengedeki adsorpsiyon olan (q_{eq}) ve hız sabiti olan (k_2) grafik üzerindeki kesişim ve eğimden elde edilebilir.

Şekil 4.10 ve 4.11'deki pseudo birinci ve ikinci derece grafiklerdeki R^2 'lerinden, birinci derece R^2 değerlerin daha büyük olduğu görülmektedir. Bu da etkileşim de fiziksel etkileşimlerin baskın olduğu yorumunu çıkarmaktadır [74].



Şekil 4.10. Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için birinci dereceden kinetik modellemesi.

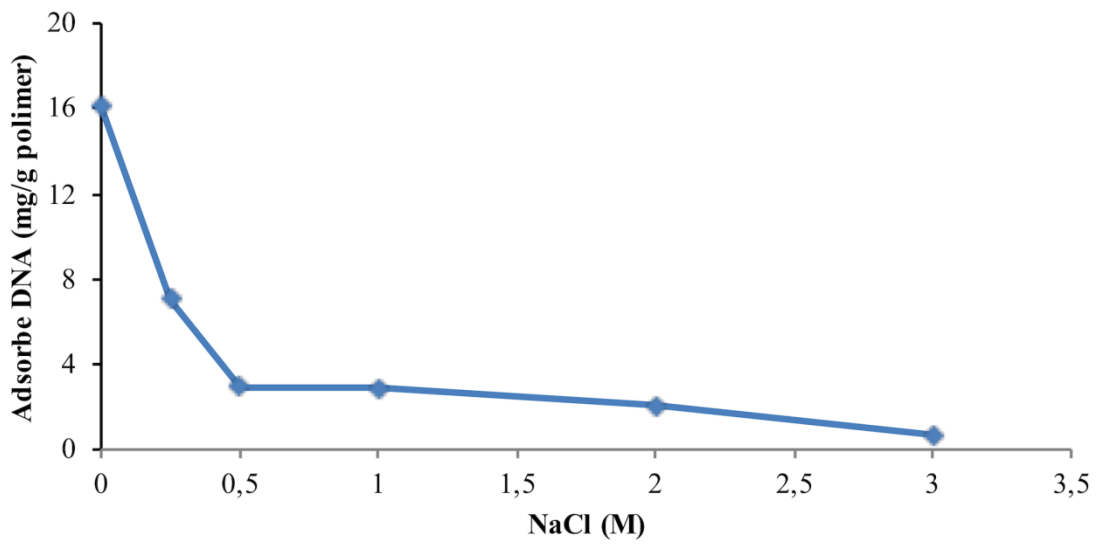


Şekil 4.11. Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojellerin DNA için ikinci dereceden kinetik modellemesi.

4.2.5 İyonik şiddetin etkisi

Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin DNA adsorpsiyonuna tuz konsatrasyonu (NaCl) etkisi de araştırılmıştır. İyonik şiddet derecesi ile bağlanma

gücünün zayıfladığı görülmüştür. Bu durum iki şekilde yorumlanabilir. İlk olarak, tuz iyonları yük-yük etkileşiminde bulunarak bağlanma bölgelerini kapatabilme olasılığı yüksek bir ihtimal olup, ikinci etken ise iyonik şiddet arttıkça Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojeller DNA arasında elektrostatik itmeler sebebi ile adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir. Adsorpsiyon ortamında tuz derişiminin artması ile tuz çözeltisindeki klor iyonları ile demir iyonu koordinasyonuna sebep olmakta bu olay ise düşük adsorpsiyonuna yol açmaktadır. Ortamdaki tuz konsantrasyonu fonksiyonel grupları maskeler ve bu sonuçla birlikte DNA adsorpsiyon kapasitesi oldukça azalır [75].

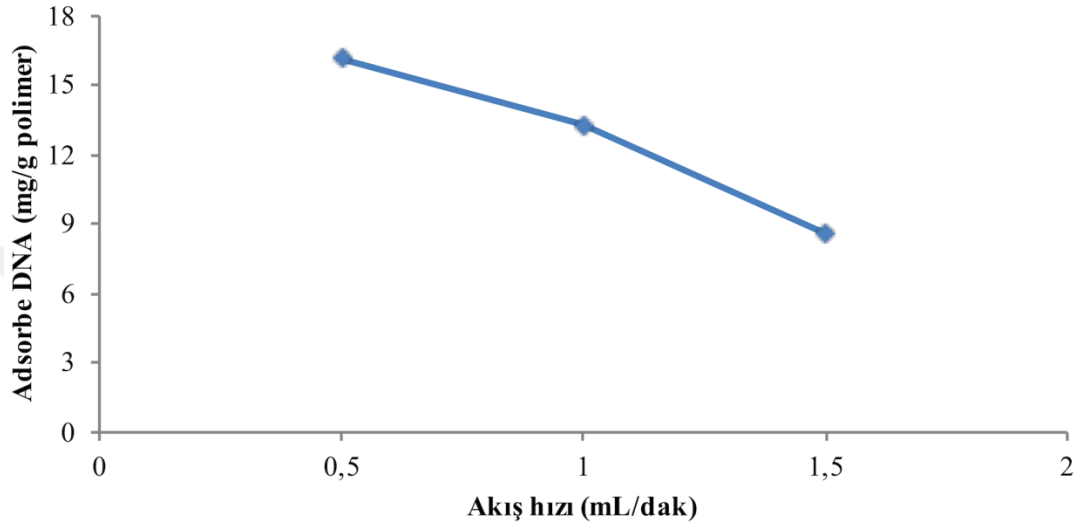


Şekil 4.12. DNA adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. DNA derişimi: 0,05 mg/mL; pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25°C.

4.2.6 Akış hızının etkisi

Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellere adsorplanmış olan DNA miktarına akış hızı ile ilişkisi Şekil 4.13'teki gibidir. 0,5 mL/dk'dan 2 mL/dk'ya akış hızının çıkması ile DNA adsorpsiyon kapasitesi 16,14 mg/g'dan 8,60 mg/g'a inmektedir. Akış hızındaki değişim 0,5 mL/dk'dan 2 mL/dk'ya çıkmasıyla kolondan geçen DNA çözelti hacmi artmakta ve dolayısı ile DNA'nın Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojel kolonundan alıkonma zamanı düşmektedir. Birim zamandaki akış hızının azalması ile kolon içinde DNA ile ligand arasındaki etkileşim zamanı artar. Böylelikle, DNA moleküllerinin kriyojelin gözenekli duvarlarına yayılması, Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojele bağlanması için uygun süre alacağından daha iyi bir DNA adsorpsiyon kapasitesi gözlenir. Bunun yanı sıra, kolonun çalışması için

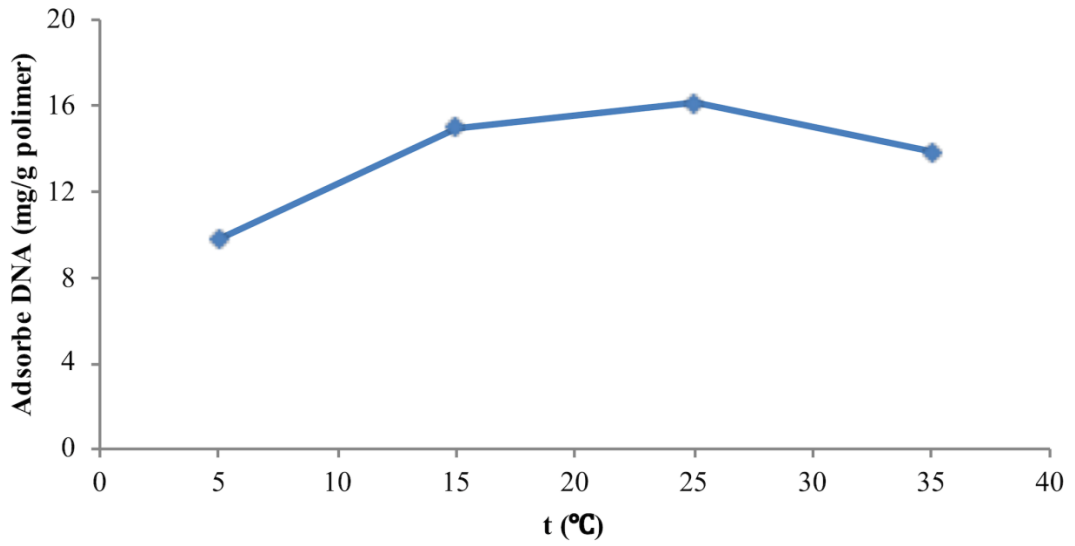
kriyojel devamlı olarak taze bir DNA çözeltisiyle etkileştirilmektedir. Sonuçta kolondaki fonksiyonel gruplar ile temas eden çözelti içindeki DNA derişimi nispeten sabittir. Ayrıca kriyojelin makrogözenekleri açık, geniş bir kanal oluşturacak şekilde birbirilerine bağlıdır. Hareketli DNA fazı, bu kanal sistemlerinden geçerek Fe^{3+} iyonlarına taşınır. Bu olgu, hareketli DNA fazı ile sabit Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojel fazı arasında konvektif akışa imkan verir.



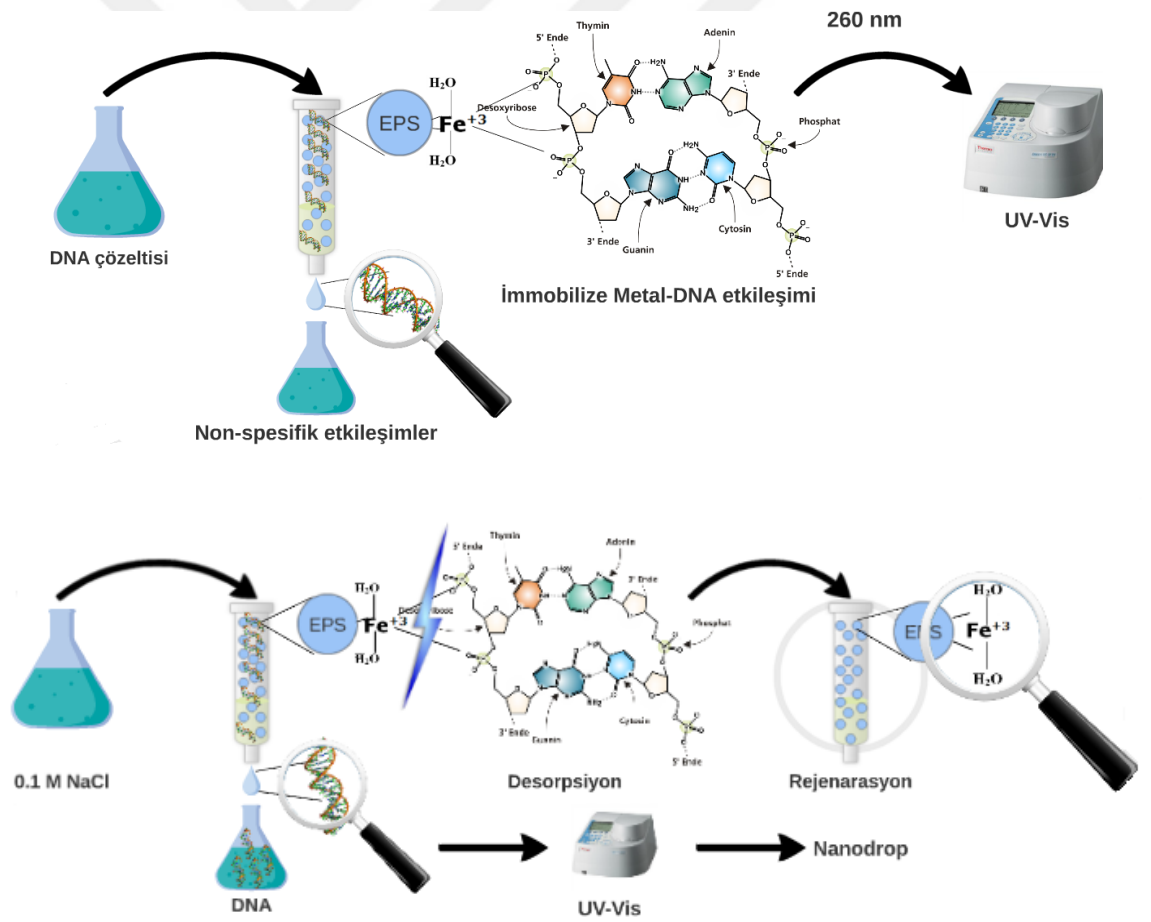
Şekil 4.13. DNA adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. DNA derişimi: 0,05 mg/mL; pH 6 asetat tamponu; T: 25°C.

4.2.7 Sıcaklığın etkisi

DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 5°C-35°C arasında çalışıldı. Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin DNA denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla artmıştır ve maksimum adsorpsiyona 25°C’de ulaşılmıştır (Şekil 4.14). 25°C sıcaklığının üzerinde adsorpsiyon kapasitesinde düşüş gözlenmiştir. Sıcaklığın artması ile DNA’nın adsorpsiyonun düşmesinin nedeni, bağlanmada elektrostatik etkileşimlerin baskınlığına atfedilebilir.



Şekil 4.14. DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi, DNA derişimi: 0,05 mg/mL, pH 6 asetat tamponu; akış hızı: 0,5 mL/dk.



Şekil 4.15. DNA adsorpsiyon ve desorpsiyon döngüsünün aşamaları.

4.2.8 Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Afinite kromatografisinin son basamağında hedef, adsorplanan biyomolekölün mümkün olan en yüksek derişimde ve en kısa sürede desorplanmasıdır. Bu işlem, her basamağın ardından afinite adsorbentlerinin rejenerasyon etkinliğinin saptanması için önemlidir. Burada yapılan çalışmada, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl kullanıldı ve adsorplanan DNA'nın %95'inden fazlası desorbe edildi. Desorpsiyonda yüksek oranda iyi sonuçlar alınması NaCl'nin, DNA için uygun bir desorpsiyon ajanı olduğunu kanıtlamıştır. Kriyojellerin defalarca kullanılabilir olduğunun gösterilmesi için, adsorpsiyon-desorpsiyon adımları, aynı kriyojeller kullanılarak 35 kez tekrar edildi. Bu adımlardan sonra, kapasite %5 oranında düşmüştür. Adsorpsiyon-desorpsiyon deneylerinden sonra ise, Fe³⁺ bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin şeklinde kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. Bu olay kullanılan sorbentlerin kararlılığını göstermektedir.

4.2.9 *E.coli* lizatından faydalanılarak plazmid DNA saflaştırılması

Bakteri kültür ortamından izole edilen pDNA, sulu çözeltiden adsorpsiyon çalışmalarında saptanan standart koşullar dikkate alınarak saflaştırılmıştır. Plazmid DNA nanodrop spektrofotometresi yardımı ile 260 nm'de okunmuştur. Nanodrop cihazından alınan grafikler doğrultusunda adsorpsiyon öncesi 4126.1 ng/μL seviyesindeki *E.coli* lizatındaki plazmid DNA oranı, adsorpsiyon işlemi sonrasında 271.2 ng/μL seviyesine kadar düşmüştür. Elde edilen bu veri ile Fe³⁺ bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin pMAD plasmidini %93,42 oranında tuttuğu görülmektedir. Desorpsiyon işleminden sonra alınan spektrofotometrik sonuçlardan da görüleceği üzere ortamda 1320.1 ng/μL plazmid DNA olduğu, tutunan DNA'nın 2534.8 ng/μL ile %65'lik kısmının kolondan ayrılmadığı görülmektedir. Grafiklerde herhangi bir kırılma olmaması Fe³⁺ bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin, DNA saflaştırılması için uygun bir sorbent olduğunu net bir şekilde göstermektedir.

Çizelge 4.4. Bakteri kültür ortamından izole edilen pDNA'ların nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları.

Adsorpsiyon Öncesi	4136,1 ng/μl
Adsorpsiyon Sonrası	271.2 ng/μl
Desorpsiyon Sonrası	1320.1 ng/μl

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması ile, DNA'nın sulu ortamdan etkin bir biçimde adsorpsiyonu için, yeni nesil bir sorbent olan Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojeller tasarlanmıştır. Hazırlanan sorbentin toplam su fraksiyonu ve gözenekliliği %94, %69 olarak belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskop (SEM) fotoğraflarından kriyojel yapısının, geniş akış kanallarına ve süper makrogözenekler gibi özellikleri kompozit kriyojelin geleneksel jellere göre üstünlükleridir. Sulu ortamdan DNA adsorpsiyon çalışmaları, Fe^{3+} takılı EPS-PHEMA kriyojeller ile yürütülmüştür. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH 6 asetat tamponunda, 2 mg/mL başlangıç DNA konsantrasyonunda, 25°C sıcaklıkta, 0,5 mL/dk akış hızında ve 39,7 mg/g polimer olarak hesaplanmıştır. Adsorpsiyon özelliklerini belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinden yararlanılmış ve 0,9987 korelasyon katsayısına sahip Langmuir izoterm modelinin bu çalışma için uygulanabilir adsorpsiyon modeli olduğu bulunmuştur. Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellere DNA adsorpsiyonunda çalışılan ortamın tuz derişimine etkisi araştırıldığında, yüksek iyonik şiddetin, bağlanmanın zayıfladığı gözlemlenmiştir. DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi ise 5°C-35°C arasında çalışılmıştır. Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin denge adsorpsiyonu, sıcaklığın artmasıyla artmış, maksimum adsorpsiyon 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiş, 25°C sıcaklığının üzerinde ise adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. 1 M NaCl çözeltisi desorpsiyon ajanı olarak seçilmiş olup, DNA'yı 30 dakikada desorbe edebilmektedir. Desorpsiyon sonuçları ile birlikte NaCl'nin, DNA için elverişli bir desorpsiyon ajanı olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin, literatürde bulunan İMAK çalışmalarıyla kıyaslanabilecek derecede, DNA adsorpsiyon seviyesine ulaştığı görülmüştür. Ayrıca, nonspesifik adsorpsiyonun ise düşük olduğu gözlenmiştir. Plazmid DNA saflaştırılması sonuçları ile Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin DNA için iyi bir sorbent olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada sulu çözeltiden spesifik olarak DNA adsorpsiyonunda, sentezlenen Fe^{3+} bağlı EPS-PHEMA kompozit kriyojellerin etkin bir şekilde tekrar kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Davankov, V.A. ve Semechkin, A.V., 1977. Ligand-exchange chromatography, Journal of Chromatography A. 141, 3, 313-353.
- [2] Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., ve Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, Nature. 258, 5536, 598.
- [3] Denizli, A., Biyoayırma ve Polimerik Taşıyıcılar. Türkiye Bilimler Akademisi. Vol. 1. 2011. 86.
- [4] Hemdan, E.S. ve Porath, J., 1985. Development of immobilized metal affinity chromatography: II. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate, Journal of Chromatography A. 323, 2, 255-264.
- [5] Hubert, P. ve Porath, J., 1980. Metal chelate affinity chromatography: I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds, Journal of Chromatography A. 198, 3, 247-255.
- [6] Fanou-Ayi, L. ve Vijayalakshmi, M., 1983. Metal-Chelate Affinity Chromatography as a Separation Tool, Annals of the New York Academy of Sciences. 413, 1, 300-306.
- [7] Liu, Y. ve Yu, S., 1990. Copper (II)-iminodiacetic acid chelating resin as a stationary phase in the immobilized metal ion affinity chromatography of some aromatic amines, Journal of Chromatography A. 515, 169-173.
- [8] Sulkowski, E., 1985. Purification of proteins by IMAC, Trends in Biotechnology. 3, 1, 1-7.
- [9] Lönnnerdal, B. ve Keen, C., 1982. Metal chelate affinity chromatography of proteins, J. Appl. Biochem. 4, 203-8.
- [10] Porath, J. ve Olin, B., 1983. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, Biochemistry. 22, 7, 1621-1630.
- [11] Majors, R.E. ve Carr, P.W., 2001. Glossary of liquid-phase separation terms, LC GC. 19, 2, 124-163.
- [12] Andersson, L. ve Sulkowski, E., 1992. Evaluation of the interaction of protein α -amino groups with M (II) by immobilized metal ion affinity chromatography, Journal of Chromatography A. 604, 1, 13-17.
- [13] Burgess, R., 1987. Protein purification: micro to macro, Alan R. Liss Inc., New York.
- [14] Imam-Sghiouar, N., Joubert-Caron, R., ve Caron, M., 2005. Application of metal-chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome, Amino Acids. 28, 1, 105-109.

- [15] Willson, R., Murphy, J., ve Jewell, D. Immobilized-metal affinity separation of nucleic acids. in Abstracts of Papers of The American Chemical Society. 2001. American Chemical Society. 1155 16th St, Nw, Washington, Dc 20036 USA.
- [16] Forier, C., Boschetti, E., Ouhammouch, M., Cibiel, A., Ducongé, F., Nogré, M., Tellier, M., Bataille, D., Bihoreau, N., ve Santambien, P., 2017. DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources, *Journal of Chromatography A*. 1489, 39-50.
- [17] Cheung, R.C.F., Wong, J.H., ve Ng, T.B., 2012. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96, 6, 1411-1420.
- [18] Sutherland, I.W., 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides, *Trends in Biotechnology*. 16, 1, 41-46.
- [19] Ramesh, H.P. ve Tharanathan, R.N., 2003. Carbohydrates—the renewable raw materials of high biotechnological value, *Critical Reviews in Biotechnology*. 23, 2, 149-173.
- [20] Challouf, R., Trabelsi, L., Ben Dhieb, R., El Abed, O., Yahia, A., Ghozzi, K., Ben Ammar, J., Omran, H., ve Ben Ouada, H., 2011. Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54, 4, 831-838.
- [21] Trabelsi, L., M'sakni, N.H., Ouada, H.B., Bacha, H., ve Roudesli, S., 2009. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 1, 27-31.
- [22] Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., ve Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides, *Biotechnology advances*. 34, 7, 1159-1179.
- [23] Quigley, M.S., Santschi, P.H., Hung, C.-C., Guo, L., ve Honeyman, B.D., 2002. Importance of acid polysaccharides for ²³⁴Th complexation to marine organic matter, *Limnology and Oceanography*. 47, 2, 367-377.
- [24] Gutierrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K., ve Green, D.H., 2008. Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12, *Appl Environ Microbiol*. 74, 15, 4867-76.
- [25] Gugliandolo, C., Maugeri, T.L., Caccamo, D., ve Stackebrandt, E., 2003. *Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy), *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 2, 172-176.
- [26] Sutherland, I.W., *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Vol. 9. 1990: Cambridge University Press.

- [27] Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., ve James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche, *Journal of Bacteriology*. 176, 8, 2137.
- [28] Calazans, G., Lopes, C., Lima, R., ve De Franc, F., 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains, *Biotechnology Letters*. 19, 1, 19-21.
- [29] Kenne, L. ve Lindberg, B., Bacterial polysaccharides, in *The polysaccharides*. 1983, Elsevier. p. 287-363.
- [30] Moriello, V.S., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T., Gambacorta, A., ve Nicolaus, B., 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30, 2, 95-101.
- [31] Ophir, T. ve Gutnick, D.L., 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation, *Applied and environmental microbiology*. 60, 2, 740-745.
- [32] Denny, T., 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis, *Annual Review of Phytopathology*. 33, 1, 173-197.
- [33] Allison, D.G., 1998. Exopolysaccharide production in bacterial biofilms.
- [34] Sutherland, I., Microbial exopolysaccharide synthesis. 1977, ACS Publications.
- [35] Yılmaz, M., 2006. Bazı *Bacillus* Türlerinin Ekzopolisakkarid (Eps) Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde Üniversitesi, Niğde, Türkiye.
- [36] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., ve Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*. 21, 10, 445-451.
- [37] Baran, N.Y., Acet, Ö., ve Odabaşı, M., 2017. Efficient adsorption of hemoglobin from aqueous solutions by hybrid monolithic cryogel column, *Materials Science and Engineering: C*. 73, 15-20.
- [38] Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., ve Mattiasson, B., 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *Journal of Chromatography A*. 986, 2, 275-290.
- [39] Njayou, M. ve Quash, G., 1991. Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: a comparative study, *Journal of Virological Methods*. 32, 1, 67-77.
- [40] Kokufuta, E. ve Jinbo, E., 1992. A hydrogel capable of facilitating polymer diffusion through the gel porosity and its application in enzyme immobilization, *Macromolecules*. 25, 13, 3549-3552.

- [41] Kumakura, M., 2001. Preparation method of porous polymer materials by radiation technique and its application, *Polymers for Advanced Technologies*. 12, 7, 415-421.
- [42] Scardi, V., [25] Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin, in *Methods in enzymology*. 1987, Elsevier. p. 293-299.
- [43] Çimen, D., Yılmaz, F., Perçin, I., Türkmen, D., ve Denizli, A., 2015. Dye affinity cryogels for plasmid DNA purification, *Materials Science and Engineering: C*. 56, 318-324.
- [44] Öncel, P., 2013. İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar.
- [45] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., ve Mattiasson, B., 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *Journal of separation science*. 30, 11, 1657-1671.
- [46] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., ve Galaev, I.Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*. 1, 4, 303-309.
- [47] Ozmen, M.M. ve Okay, O., 2005. Superfast responsive ionic hydrogels with controllable pore size, *Polymer*. 46, 19, 8119-8127.
- [48] Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., ve Mattiasson, B., 2004. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography B*. 807, 1, 129-137.
- [49] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., ve Mattiasson, B., 2001. The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*. 10, 4-5, 163-188.
- [50] Denizli, A. ve Küfrevioğlu, Ö., 2009. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti. 61-71.
- [51] Levinson, W. ve Jawetz, E., 2008. Major histocompatibility complex and transplantation, *Review of medical microbiology and immunology*. Tenth Edition. New York: McGraw-Hill Publishing.
- [52] Freitas, S., Santos, J., ve Prazeres, D., 2006. Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA, *Biotechnology progress*. 22, 4, 1179-1186.
- [53] Ferreira, G.N., 2005. Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination, *Chemical engineering & technology*. 28, 11, 1285-1294.
- [54] Üzek, R., 2011. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Plazmid DNA Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi: Ankara, Türkiye.

- [55] Trindade, I.P., Diogo, M.M., Prazeres, D.M., ve Marcos, J.C., 2005. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1082, 2, 176-184.
- [56] Mountain, A., 2000. Gene therapy: the first decade, *Trends in Biotechnology*. 18, 3, 119-128.
- [57] Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., ve Friedman, A., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science*. 259, 5102, 1745-1749.
- [58] Doolan, D.L. ve Hoffman, S.L., 2001. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation, *International Journal for Parasitology*. 31, 8, 753-762.
- [59] Barouch, D.H., Santra, S., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Fu, T.-M., Wagner, W., Bilska, M., Craiu, A., Zheng, X.X., ve Krivulka, G.R., 2000. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination, *Science*. 290, 5491, 486-492.
- [60] Chattergoon, M., Boyer, J., ve Weiner, D.B., 1997. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics, *The FASEB Journal*. 11, 10, 753-763.
- [61] Liljeqvist, S. ve Ståhl, S., 1999. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines, *Journal of Biotechnology*. 73, 1, 1-33.
- [62] Odabaşı, M. ve Denizli, A., 2001. Polyhydroxyethylmethacrylate-based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 760, 1, 137-148.
- [63] Odabaşı, M., Baydemir, G., Karataş, M., ve Derazshamshir, A., 2010. Preparation and characterization of metal-chelated poly (HEMA-MAH) monolithic cryogels and their use for DNA adsorption, *Journal of applied polymer science*. 116, 3, 1306-1312.
- [64] Ceylan, Ş. ve Odabaşı, M., 2013. Novel adsorbent for DNA adsorption: Fe³⁺-attached sporopollenin particles embedded composite cryogels, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 41, 6, 376-383.
- [65] Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E., ve Denizli, A., 2011. Poly (hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, *International journal of biological macromolecules*. 48, 4, 577-582.
- [66] Comte, S., Guibaud, G., ve Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight

EPS extraction methods, *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 1-2, 237-245.

- [67] Zarrouk, C., 1966. Contribution a l'etude d'une Cyanophyce. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*, Thesis. University of Paris, France.
- [68] Ceylan, Ş., Kalburcu, T., Gedikli, M., ve Odabaşı, M., 2011. Application of Cu²⁺-attached magnetite nanoparticles embedded supermacroporous monolithic composite cryogels for DNA adsorption, *Hacettepe Journal Biology and Chemistry*. 39, 163-172.
- [69] Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical Society*. 40, 9, 1361-1403.
- [70] Hanes, C.S., 1932. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *Biochemical Journal*. 26, 5, 1406.
- [71] Chiou, M.-S. ve Li, H.-Y., 2002. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads, *Journal of Hazardous Materials*. 93, 2, 233-248.
- [72] Ngah, W.W., Endud, C., ve Mayanar, R., 2002. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, *Reactive and Functional Polymers*. 50, 2, 181-190.
- [73] McKay, G. ve Ho, Y., 1999. Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochemistry*. 34, 5, 451-465.
- [74] Erzenin, M., Ünlü, N., ve Odabaşı, M., 2011. A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles, *Journal of Chromatography A*. 1218, 3, 484-490.
- [75] Sun, J., Su, Y., Rao, S., ve Yang, Y., 2011. Separation of lysozyme using superparamagnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles, *Journal of Chromatography B*. 879, 23, 2194-2200.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Burcu Önal

Doğum Tarihi ve Yeri:23.02.1992 - Fatsa

E-posta adresi :brconl33@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gazi Üniversitesi, 2010-2015

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2016-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Saray Tuz/Yaz Staj
2. Universidad Rey Juan Carlos (Erasmus Staj)