

**İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN TiO₂
BAZLI SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE BİYOMOLEKÜL
İZOLASYONUNDA KULLANIMI**

**SYNTHESIS OF TiO₂ BASED STATIONARY PHASES FOR
IMMOBILIZED METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND
THEIR USAGE FOR ISOLATION OF BIOMOLECULES**

SEZGİ ALPASLAN

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

Sezgi ALPASLAN'ın hazırladığı “İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi İçin TiO₂ Bazlı Sabit Fazların Sentezi ve Biyomolekül İzolasyonunda Kullanımı” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

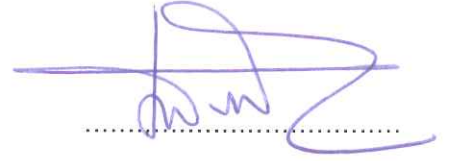
Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

Başkan



Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Danışman



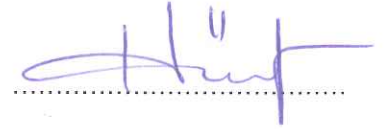
Prof. Dr. Nuray OKTAR

Üye



Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

Üye



Dr. Öğretim Üyesi Eda ÇELİK AKDUR

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 11/06/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

06 / 07 / 2018



Sezgi Alpaslan



Canım aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11/06/2018

SEZGİ ALPASLAN

ÖZET

İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN TiO_2 BAZLI SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE BİYOMOLEKÜL İZOLASYONUNDA KULLANIMI

Sezgi ALPASLAN

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL

Haziran 2018, 70 sayfa

İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) ile histidin etiketli protein saflaştırılması için titanyum dioksit bazlı yeni bir sorbent geliştirilmiştir. Monodispers gözenekli formda, 5 μm boyutundaki titanyum dioksit mikrokürelerinin sentezi, kalıp malzemesi olarak poli (3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-ko-etilen glikol dimetakrilat) (poli (HPMA-Cl-co-EDMA)) mikroküreleri kullanılarak, sol-jel kalıplama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Silanizasyon reaksiyonu ile, iminodiasetik asit-3-glisidoksisipril trimetoksisilan kompleksi (IDA-GLYMO) titanyum dioksit mikrokürelerinin üzerine kovalent olarak bağlanmıştır. Bu mikroküreler üzerinde bulunan karboksil grupları üzerinden metal-şelat kompleksi oluşumu ile Ni^{2+} iyonları mikrokürelere bağlanmıştır. Geliştirilen

sorbent, histidin açısından zengin proteinlerin kesikli sistemde immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemiyle izolasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla, histidin açısından zengin bir protein olan bovin hemoglobinin (BHb) ve referans protein olarak seçilen bovin serum albümin (BSA)'in izolasyonu, Ni^{2+} bağlı-monodispers gözenekli titanyum mikrokürelerin (Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂) sorbent olarak kullanılmasıyla kesikli sistemde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Maksimum denge BHb adsorpsiyon kapasitesi, 140 mg BHb/g mikroküre olarak belirlenmiştir. BHb, sulu tampon ortamında kantitatif desorpsiyon verimi ile izole edilmiştir. Referans olarak seçilen BSA, sınırlı bir denge adsorpsiyonu göstermiş olmasına rağmen, sorbentten yüksek verimle desorplanmamıştır. Geliştirilen sorbent aynı zamanda kesikli ve sürekli formdaki mikro-immobilize metal afinite kromatografisi (MIMAC) sistemlerinde insan kanından hemoglobin izolasyonu için kullanılmış, kesikli ve MIMAC sistemlerde sırasıyla ≥ 95 ve %85 saflık oranında Hb izole edilmiştir. Sonuçlar, geliştirilen sorbentin histidin açısından zengin protein olarak seçilen BHb için yüksek seçicilik ve yüksek verimle izolasyona imkan verdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Monodispers-gözenekli titanyum, immobilize metal afinite kromatografisi, sorbent, histidin açısından zengin protein, hemoglobin, albümin

ABSTRACT

SYNTHESIS OF TiO₂ BASED STATIONARY PHASES FOR IMMOBILIZED METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND THEIR USAGE FOR ISOLATION OF BIOMOLECULES

Sezgi ALPASLAN

Graduate Degree, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL

June 2018, 70 pages

A titania based sorbent was developed for His-tagged protein purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The synthesis of monodisperse porous titania microbeads ca 5 μm in size was performed by a staged shape template sol-gel method using poly(3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) poly(HPMA-Cl-co-EDMA) microbeads as the template material. Iminodiacetic acid-3-glycidoxypropyl trimethoxysilane complex (IDA-GLYMO) was covalently attached onto the titania microbeads via silanization reaction. Ni²⁺ ions were

then attached to the derivatized microbeads via metal-chelate complex formation with the carboxyl groups on the microbeads. The developed sorbent was used for the isolation of histidine-rich proteins in batch affinity system. For this purpose, the isolation of bovin hemoglobin (BHb) as a histidine-rich protein and bovine serum albumin (BSA) as a reference protein were comparatively investigated using Ni^{2+} attached-monodisperse-porous titania microbeads as the sorbent in batch fashion. The maximum equilibrium BHb adsorption was determined as 140 mg BHb per g sorbent. BHb could be isolated with quantitative desorption yield in the aqueous buffer medium. Although the selected reference, BSA exhibited a limited equilibrium adsorption, it could not be eluted from the sorbent with high yield. The developed sorbent was also used for isolation of hemoglobin from human blood in micro-immobilized metal affinity chromatography (MIMAC) systems in batch and continuous system, and Hb was isolated with ≥ 95 and 85% purity, respectively, in batch and MIMAC systems. The results show that the developed sorbent allows isolation with high selectivity and high efficiency for histidine-rich protein BHb.

Keywords: Monodisperse-porous titania, immobilized metal affinity chromatography, sorbent, histidine-rich protein, hemoglobin, albumin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgisi ve tecrübesiyle bana sürekli yol gösteren, anlayışını ve desteğini esirgemeyen, çalışma azmini örnek aldığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneylerimin tamamlanmasında sağladığı laboratuvar olanaklarından dolayı çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR'a teşekkürü borç bilirim.

Önerileriyle tezimin her aşamasında bana destek olan, büyük özveri ve ilgiyle emeğini, zamanını esirgemeyen değerli hocam Araştırma Görevlisi Dr. Çiğdem KİP'e, çalışmamda sunduğum bazı özel analizlerin tamamlanması için yardımcı olan değerli hocam İlkey KOÇER'e teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen, en zor anlarımda yanımda olup, beni yüreklendiren, umutlarımı tazeleyen ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan, benim için bir arkadaştan çok daha fazla anlam ifade eden doktora öğrencisi Rukiye BABACAN TOSUN'a şükran borçlu olduğumu belirtirken, aynı laboratuvarı paylaşmaktan büyük keyif aldığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında bana en büyük desteği veren, emeğini, sabrını, şefkatini hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan en değerli varlığım canım annem, babam ve tüm aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sezgi ALPASLAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Proteinlerin Saflaştırma Yöntemleri	5
2.2. Afinite Kromatografisi	7
2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)	9
2.3.1. Katı Destek Olarak Kullanılan Matriksler	12
2.3.2. Ligandlar	13
2.3.3. Ligandlar Üzerine İmmobilize Olan Metal İyonları	16
2.3.4. Kromatografik Sorbentler ile Adsorpsiyon-Desorpsiyon Mekanizması	17
2.3.5. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinin Avantajları ve Dezavantajları	19
2.4. Titanyum dioksit	20
2.4.1. TiO ₂ Sentez Yöntemleri	21
2.4.2. Sol-Jel Yöntemi	22
2.4.2.1 Düşük-Sıcaklık Sol-Jel Prosesi.....	23
2.4.2.2. Sol-Jel Kalıplama Yöntemi	24
2.5. Polimerizasyon Yöntemleri	24
2.5.1. Dispersiyon Polimerizasyonu	24
2.5.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu	27
2.6. Adsorpsiyon İzotermi	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
3.1. Materyal.....	29

3.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografi (IMAC) Uygulamaları İçin Monodispers-Gözenekli TiO ₂ Mikroküre Bazlı Sorbent Sentezi.....	30
3.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Çıkış Lateksinin (poli(GMA)) Sentezi.....	30
3.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Kalıp Materyalinin (poli(HPMA-Cl-co-EDMA)) Sentezi	31
3.2.3. Sol-Jel Kalıplama Yöntemi İle TiO ₂ Mikrokürelerin Sentezi	32
3.2.4. TiO ₂ Mikroküreler üzerine IDA-GLYMO Bağlanması	33
3.2.5. IDA-GLYMO Bağlı TiO ₂ Mikroküreler Üzerine Ni ²⁺ İyonlarının İmmobilize Edilmesi.....	34
3.3. Monodispers-Gözenekli TiO ₂ Mikroküre Bazlı Sorbentlerin Karakterizasyonu ...	35
3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	35
3.3.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET).....	36
3.3.3. X-ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	36
3.4. Kesikli Sistemde Protein İzolasyonu.....	36
3.4.1. Materyal.....	37
3.4.2. Kesikli Sistemde Sorbent Miktarı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi.....	37
3.4.3. Kesikli Sistemde Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi.....	39
3.4.4. Tekrar Kullanılabilirlik	39
3.5. Kesikli ve Sürekli Mikroakış Sisteminde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu.....	39
3.5.1 Kesikli Sistemde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu.....	39
3.5.2 Sürekli Sistemde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu	40
3.5.2.1. Sürekli Mikroakış Sistemi Özellikleri ve TiO ₂ Bazlı Mikrokürelerle Dolgulanması.	40
3.5.2.2. Sürekli Mikroakış Sisteminde Hb İzolasyonu	41
3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Monodispers-Gözenekli TiO ₂ Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	44

4.2. Monodispers-Gözenekli TiO ₂ Mikroküreler Yardımıyla Kesikli Sistemde Protein İzolasyonu	48
4.2.1. Sorbent Miktarı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi	48
4.2.2. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi ..	50
4.2.3. Mikroküre Türünün Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişimi İle Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi	52
4.2.4. Ni ²⁺ -IDA-GLYMO@TiO ₂ Mikrokürelerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	56
4.3. Monodispers-Gözenekli TiO ₂ Bazlı Mikroküreler Yardımıyla Kesikli Sistem ve Sürekli Mikroakış Sisteminde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu	57
5. SONUÇLAR	61
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	71

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Yıllar itibariyle protein saflaştırmada kullanılan yöntemler.....	6
Çizelge 2.2. Fizikokimyasal Özelliklere Göre Uygulanan Kromatografik Yöntemler.....	9
Çizelge 2.3. IMAC’de proteinlerin adsorpsiyonunda aminoasitlerin yakalanma eğilimi.....	11
Çizelge 4.1. Sentezlenen TiO ₂ bazlı mikrokürelere ait morfolojik özellikler.....	46
Çizelge 4.2. Sentezlenen TiO ₂ , IDA-GLYMO@TiO ₂ ve Ni ²⁺ -IDA-GLYMO@TiO ₂ mikrokürelere ait XPS sonuçları.....	47
Çizelge 4.3. Kesikli sistem ve sürekli mikroakış sisteminde jel elektroforez tekniğine dayanarak hesaplanan Hb saflık ve Hb adsorpsiyon ve Hb desorpsiyon verimi değerleri.....	59

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Aminoasitin yapısal formülü.....	1
Şekil 1.2. Peptit bağı oluşumu	1
Şekil 2.1. Afinite Kromatografisinin Genel Prensibi.....	7
Şekil 2.2. Çeşitli Ligandların Yapısal Gösterimi.....	14
Şekil 2.3. Ni ²⁺ iyonu immobilize edilmiş IDA, NTA ve TED ligandlarının histidin grupları ile etkileşimi.....	16
Şekil 2.4. Dispersiyon Polimerizasyonu Şematik Gösterimi	26
Şekil 2.5. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu.....	27
Şekil 3.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle poli(HPMA-Cl-co EDMA) mikrokürelerin sentezi	32
Şekil 3.2. Sol-Jel kalıplama yöntemiyle TiO ₂ mikrokürelerin sentezi.....	33
Şekil 3.3. Titanyum mikroküreler üzerine IDA-GLYMO bağlanması.....	34
Şekil 3.4. Protein adsorpsiyonu için IDA-GLYMO Bağlı TiO ₂ Mikroküreler Üzerine Ni ²⁺ İyonlarının İmmobilizasyonu.....	35
Şekil 3.5. İnsan tam kan örneğinden Hb izolasyonu yapılan sürekli mikroakış sistemi.....	41
Şekil 4.1. TiO ₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (A) 2000 X, (B) 22300 X.....	44
Şekil 4.2. IDA-GLYMO@TiO ₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (C) 2000 X, (D) 25750 X.....	45
Şekil 4.3. Ni ²⁺ -IDA-GLYMO@TiO ₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (E) 2000 X, (F) 25750 X.....	45
Şekil 4.4. TiO ₂ , IDA-GLYMO@TiO ₂ ve Ni ²⁺ -IDA-GLYMO@TiO ₂ mikrokürelerin azot adsorpsiyon/ desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.....	47
Şekil 4.5. Kesikli sistemde Ni ²⁺ -IDA-GLYMO@TiO ₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda sorbent miktarının protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon	

ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Protein konsantrasyonu: 1 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat).....48

Şekil 4.6. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda sorbent miktarının desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Protein konsantrasyonu: 1 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat).....49

Şekil 4.7. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat).....50

Şekil 4.8. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikropartiküllerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat)...51

Şekil 4.9. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç Bhb protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat).....53

Şekil 4.10. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç Bsa protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat).....54

Şekil 4.11. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç Bhb protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat).....55

Şekil 4.12. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç Bsa protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon

ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat).....56

Şekil 4.13. Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküresinin tekrar kullanımının adsorbsiyon verimine etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Bhb protein konsantrasyonu: 2 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat) (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat).....57

Şekil 4.14. SDS-PAGE tekniği kullanılarak kesikli sistemde insan tam kan örneğinden Hb izolasyonu görüntüsü. Mikroküre: Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂, mikroküre miktarı: 10 mg, desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol. (L: Basamak (ladder); B: İnsan tam kan örneği; Af1: Adsorbsiyon sonucunda toplanan örnek; Df 1, 2: Desorpsiyon sonucunda toplanan örnekler).....58

Şekil 4.15. SDS-PAGE tekniği kullanılarak sürekli mikroakış sisteminde insan tam kan örneğinden Hb izolasyonu görüntüsü. Mikroküre: Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂, kolon: 300 µm id x 50 mm, desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazol. (L: Basamak (ladder); B: İnsan tam kan örneği; Af 1, 2, 3, 4, 5, 6 : Adsorbsiyon sonucunda toplanan örnekler; Df 1, 2: Desorpsiyon sonucunda toplanan örnekler)...59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
л	Pi
α	Alfa
A ₀	Protein çözeltisinin ilk (adsorpsiyon öncesi) absorbans değeri
A ₁	Protein çözeltisinin sonraki (adsorpsiyon sonrası) absorbans değeri
Ag	Gümüş
Al	Aluminyum
β	Beta
C _e	Adsorbatın Denge Konsantrasyonu (mg/L)
C ₀	Adsorbatın Başlangıç Konsantrasyonu (mg/L)
Ca	Kalsiyum
Co	Kobalt
Cu	Bakır
CV	Değişim Katsayısı
D _n	Ortalama Gözenek Çapı Değeri (µm)
D ₁	İlk Desorpsiyon İşlemi Sonrası Desorbe Edilen Protein Miktarı
D ₂	İkinci Desorpsiyon İşlemi Sonrası Desorbe Edilen Protein Miktarı
Fe	Demir
Ga	Galyum
Hg	Cıva
m	Sorbent miktarı (mg)
m ²	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol

mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
Ni	Nikel
N _i	D _i (µm) ap değerine sahip mikrokürelerin sayısı
N _T	Toplam mikroküre sayısı
Q	Denge adsorpsiyon kapasitesi (mg protein/g partikül)
q _e	Birim Adsorbanın Adsorpladığı Miktar (mg/g)
T	Sıcaklık (K)
V	Protein zeltisi hacmi (ml)
Zn	inko
Zr	Zirkonyum

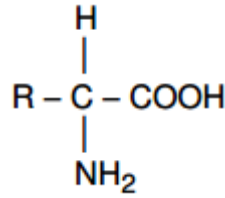
Kısaltmalar

AIBN	2,2'- Azobisizobtronitril
BET	Gözenek Boyutu Analizörü
BHb	Bovin Hemoglobin
BPO	Benzoil Peroksit
BSA	Bovin Serum Albumin
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
CM-Asp	Karboksimetil Aspartik Asit
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EB	Etilbenzen
EDMA	Etilendimetakrilat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtOH	Etanol
GLYMO	(3-glisidoksipropil)trimetoksisilan
GMA	Glisidil Metakrilat
HB	Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit

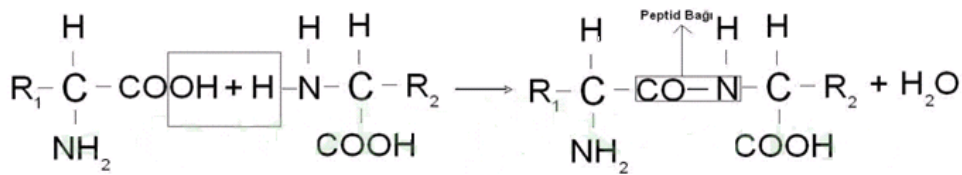
HPMA-Cl	3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat
HQ	Hidroksiquinolin
IMAC	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
IDA	İminodiasetik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
NiCl ₂	Nikel (II) Klorür
NTA	Nitrilotriasetik Asit
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
PVA	Polivinil Alkol
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
PVP	Polivinil Prolidon
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Devir / Dakika
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SSA	Özgöl Yüzey Alanı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TED	N,N,N'-Tris-Karboksimetil Etilen Dimin
THF	Tetrahidrofuran
TIP	Titanyum izopropoksit
TiCl ₄	Titanyum tetraklorür
TiO ₂	Titanyum
Ti(SO ₄) ₂	Titanyum disülfat
XPS	X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi

1.GİRİŞ

Proteinler, hücrede yüzlerce amino asitin dehidrasyon reaksiyonu yoluyla meydana getirdiği makromoleküllerdir. Amino asitler, proteinlerin yapıtaşı olup, hücre tarafından sentezlenen ve dışarıdan alınan 20 farklı türü bulunmaktadır. Bunlar, alanin, asparajin, aspartik asit, glutamik asit, glisin, histidin, izolösin, arjinin, lösin, lizin, glutamin, methionin, fenilalanin, prolin, serin, sistein, threonin, triptofan, tirozin ve valin'dir. Amino asitler, kondenzasyon polimerasyonu sonucu peptid bağları ile çeşitli formlarda birleşerek enzimsel, hormonal, yapısal ve savunma görevleri olan farklı proteinlerin oluşmasını sağlamaktadır. Amino asitler Şekil 1.1'de görüldüğü gibi yapılarında amino (-NH₂) ve karboksil (-COOH) grupları bulundurmaktadır [1]. Şekil 1.2.'ye bakıldığında ise, bir amino asidin amino grubu ile diğer amino asidin karboksil grubu arasından su çıkmasıyla peptid bağının oluştuğu, dehidrasyon sentez tepkimesi yolu ile peptitlerin meydana geldiği görülmektedir [2].



Şekil 1.1. Aminoasitin yapısal formülü [1]



Şekil 1.2. Peptid Bağı Oluşumu [1]

Amino asit izi, peptidin yapısında bulunmakla birlikte, amino grubundan bir hidrojen atomunu ve karboksil grubundan ise bir hidroksil molekülünü kaybetmiş olan kısımdır. Bunlardan, uçta serbest bir α-amino grubu taşıyan amino asit izine amino terminali veya

N-terminali, serbest bir α -karboksil grubu taşıyan amino asit izine ise karboksil terminali veya C-terminali denmektedir [3].

Proteinler; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarter) yapıları meydana getirdikten sonra, kararlı yapıya ulaşmaktadır. Birincil yapı, polipeptid seridir. Bu seri, amino asitlerin dizilimiyle oluşmaktadır. Amino asitler gelişigüzel bağlanmayıp, genetik bilgiye göre bağlanmaktadır. Tüm proteinler için karakteristik bir dizi bulunmaktadır. Aminoasitlerin R gruplarının etkisi dikkate alınmadan, polipeptid yapının farklı kısımlarında yer alan -H ve -O atomları arasındaki ana zincir atomlarının hidrojen bağı etkileşimleriyle oluşan yapı ise ikincil yapıyı meydana getirmektedir. Bunların arasında, α -heliks ve β -katman modelleri, en sık görülenlerdir. Diğer bir yapı olan üçüncül yapıda ise, R grupları arasındaki etkileşimler üç boyutlu şekilde rol oynamaktadır ve genel itibariyle proteinin yapısını yansıtmaktadır. Hidrofobik R gruplarına sahip amino asitler, proteinin katlanması esnasında, hidrofobik olduklarından dolayı sulu ortamdan kaçır ve merkezde toplanırlar. Mevcut zincirler birbirlerine yaklaştıklarında, Van Der Waals etkileşimi ile bir arada tutulurlar. Üçüncül yapının kararlılığını etkileyen bir durum olarak, hidrofilik R grupları arasındaki hidrojen bağları ve yüklü R grupları arasındaki iyonik bağlar gösterilebilir. Ayrıca, aminoasitlerin birbirine yaklaşmasıyla oluşan disülfid kovalent bağları da aynı şekilde mevcut yapıyı güçlü hale getirmektedir. Dördüncül yapı ise, bütün proteinlerde bulunması zorunlu olmamakla birlikte, fonksiyonel tek bir makromolekül meydana getirebilmek adına birden çok polipeptit zinciri içeren proteinlerin yapısında bulunan bu zincirlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin, daha etkili bir şekilde çalışmaya imkan sağlamasıyla oluşmaktadır [4,5].

Pek çok hastalığın teşhisi ve tedavisi için kullanılmakta olan proteinler, aynı zamanda yeni ilaçların hazırlanması için de oldukça önem arz etmektedir. Proteinlerin bu amaçlarla kullanılabilmesi için de yapısında bulunan aminoasit miktarı ve dizilişinin, molekül ağırlığı ve diğer fiziksel özelliklerinin bilinmesi, başka bir deyişle yapısının aydınlatılması gerekmektedir. Bu şekildeki yapı aydınlatılması için ise, proteinlerin saflaştırılması gerekmektedir. Bir proteinin, bir hücre ve dokudan saf bir şekilde izolasyonu oldukça zordur. Proteinin derişimi az ise, binlerce değişik protein arasından istenilen proteinin ayrılarak saf halde elde edilmesi için, bahse konu proteine uygun

saflaştırma tekniklerinin çok iyi bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir [6]. Bu tekniklere karar vermek için proteinlerin denatürasyonuna yol açan pH, sıcaklık, inhibitörler, organik solventler, kaotropik tuzlar ve protein yapısındaki hidrojen bağlarını inaktive ederek birincil yapıya dönmesine neden olan diğer faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Protein moleküllerinin sahip oldukları elektrik yükleri, afinite özellikleri, molekül boyutları, çözünürlükleri, polar özellikleri gibi fiziksel ve kimyasal özellikler bulundukları ortamdaki izolasyonları sırasında büyük önem taşımaktadır. Her protein için bahsedilen parametrelerde inaktif olunan aralık farklıdır ve bu farklılık doğrultusunda saflaştırma yöntemleri değişmektedir [7,8].

Proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılan İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) ile rekombinant proteinlerin saflaştırılması, serum proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılması, birçok proteinin ve peptidin karakterizasyonu, fosfopeptidlerin ayrılması, çeşitli enzimlerin biyosıvılardan tecrit edilmesi, vücutta gerçekleşen pek çok biyolojik olayın anlaşılması için yarar sağlayan ve protein barındırmayan nükleotid, oligonükleotid, RNA, DNA gibi makromoleküllerin izolasyonu gerçekleştirilmektedir [9,10].

Bununla birlikte, geleneksel IMAC sistemi uzun ayırma süresi, çözücü tüketimi ve yüksek maliyet gibi bazı sınırlamalara sahiptir [11]. Bu problemlerin üstesinden gelmek ve histidin etiketli proteinlerin etkili saflaştırması için daha hızlı ve uygun yöntemler geliştirmek için birkaç alternatif materyal vardır. Wang ve arkadaşları, bovin hemoglobin (BHb) ve diğer proteinlerin [serum albümin (BSA), miyogloblin, lizozim ve peroksidazı] seçici olarak yakalanması için bir adsorban olarak Cu^{2+} ile dekore edilmiş, fonksiyonel mezo-gözenekli materyali (PPOSS-IDA- Cu^{2+}) sentezlemiştir [12]. Salimi ve arkadaşları, IMAC yöntemini kullanarak, histidin etiketli protein saflaştırması için 6 μm büyüklüğünde manyetik, monodispers ve gözenekli silika mikroküreleri sentezlemiştir [13]. Rashid ve arkadaşları, 6xhis-etiketli rekombinant proteinin saflaştırılması için $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{Ni}$ -Salen kompleksinin manganer ferit manyetik nanopartiküllerini sentezlemiştir [14].

Bu tezde amaç, monodispers, gözenekli TiO_2 mikroküre bazlı immobilize metal afinite kromatografisi sorbentlerinin geliştirilmesi ve kromatografik performanslarının

incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, sol-jel yöntemi (hidroliz ve kondenzasyon basamakları) ile TiO_2 mikrokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir. TiO_2 üzerine uygun aktivasyon yöntemleri ile organik ligand ve metal iyonu bağlanması ile sorbent sentezi gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında metal iyonu olarak bir geçiş metali olan Ni^{2+} kullanımı hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen metal iyonu bağlı TiO_2 bazlı mikrokürelerin, Bovin Hemogloblin (BHb) izolasyonunda kullanılabilirliği incelenmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Proteinlerin Saflaştırma Yöntemleri

Biyoteknoloji alanında büyük atılımlar gözlemlendiği günümüzde, gereken protein miktarı kullanım amacı itibariyle belirli aralıklarda değişkenlik göstermektedir. Bu değerler genelde klonlama çalışmalarında mikrogram birimiyle, endüstriyel ve farmasötik uygulamalarda kilogram birimi ölçütlerinde olduğu görülmektedir. Maliyet değerinin ve zamanın proteinlerin üretiminde oldukça büyük bir öneme sahip olduğu unutulmamalıdır. Ne şekilde kullanılacağına bağlı olarak ihtiyaç duyulan protein miktarı ve saflık seviyesi değişebilmektedir. Az miktarda protein bulunması bilimsel araştırmaların yapılabilmesi için yeterli düzeyi sağlamakla birlikte, preparatın kesinlikle zararlı yabancı aktiviteleri barındırmaması şarttır. Endüstride ise bu durum biraz daha farklı olmakla birlikte, büyük ölçeklerde üretim olmakta, saflık ikinci planda önem arz etmektedir. Protein preparatları, tedavi amaçlı uygulamalarda kullanılacaksa bu preparatların yüksek saflık değerlerinde olması gerekmektedir [15].

Klinik tanı ve tıbbi araştırmalarda, kan indekslerindeki değişiklikler fizyolojik durumu yansıtan veya patolojiyi gösteren kritik parametrelerdir. Bununla birlikte, DNA, RNA ve birçok protein de dahil olmak üzere, kandaki bazı biyobelirteçler, genellikle çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve hemoglobin gibi yüksek oranda bulunan proteinlerin ciddi girişimlerinden dolayı tespit edilmeleri zordur. Sonuç olarak, bu tür yüksek oranda bulunan proteinlerin azaltılması önemli bir önkoşuldur. Şu anda mevcut olan birçok metot arasında afinite bazlı teknikler en etkili olanlardan bazılarıdır ve rutin hale gelmiştir [16].

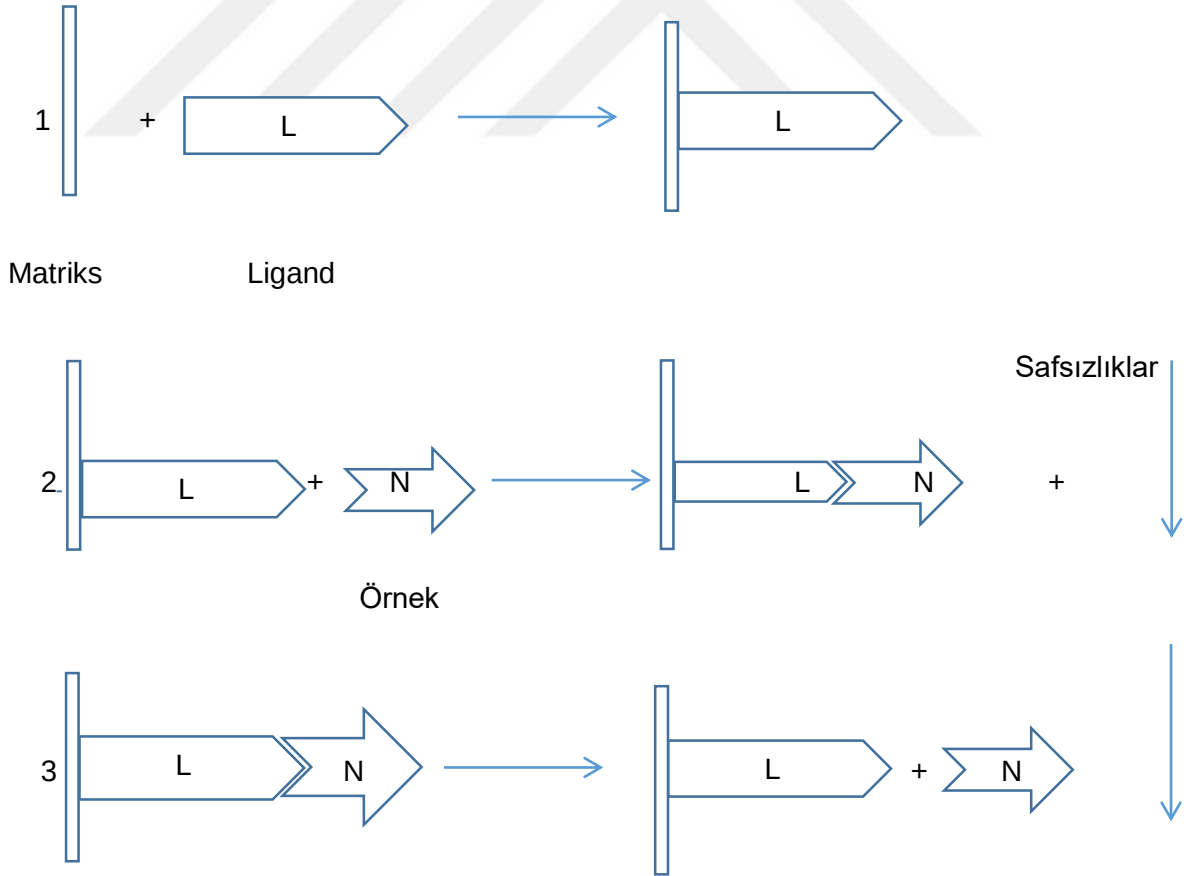
İlk olarak 1789 yılında, çöktürme metodu ile albumine benzeyen bir maddenin bitkilerden elde edilmesi ile protein saflaştırılması çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. 20. yüzyıla kadar çöktürme yöntemine ek olarak kullanılan diğer teknikler ise filtrasyon ve kristalizasyondur. İlk kromatografik yöntemler, 1906 yılında Michail Tswett'in kromatografi terimini tanımlanması ile ortaya çıkmıştır. Protein saflaştırmasında santrifüjleme ve elektroforez gibi teknikler de kullanılmıştır. Yıllar itibariyle protein saflaştırmada kullanılan yöntemler Çizelge 2.1' de yer almaktadır [17].

Çizelge 2.1. Yıllar itibariyle protein saflaştırmada kullanılan yöntemler [17]

KULLANILAN YÖNTEM	YIL
Çöktürme	1789
Yumurta Albumin Kristalizasyonu	1889
Kromatografi	1903
Ultrasantrifüjleme	1924
Serbest Çözelti Elektroforezi	1937
İyon Değişim Kromatografisi	1940'lar
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	1941
Büyükölçek Ayırma Kromatografisi	1955
Hidroksiapatit Kromatografisi	1956
Sefadeks (jel filtrasyon ortamı)	1959
Poliakrilamid Jel Elektroforez	1959
İzoelektrik Odaklama	1959
Sefaroz	1967
Afinite Kromatografisi	1968
Ters-Faz Kromatografisi	1970'ler
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1973
İki-Boyutlu Kromatografi	1975
İmmobilize Metal İyon Afinite K.	1975
Kapiler Elektroforez	1981
Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi	1982
Histidin Afinite Tag	1988

2.2. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi yönteminin bir çeşidi olarak tanımlanmaktadır. Fiziksel bir yöntem olmakla birlikte, saflaştırma işleminin yapılacağı molekülün, matriks olarak adlandırılan bir kolon maddesine bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemde molekül, kovalent olarak immobilize edilen liganda seçici ve tersinir olarak bağlanmaktadır. Diğer yöntemler ile birçok biyolojik materyalin saflaştırılması çok güçtür. Afinite kromatografisi dışındaki yöntemlerde saflaştırma işlemi çok fazla sayıda aşama gerektirmekte olup, yine bu süreç daha uzun sürmektedir. Ancak, ayrılması mümkün görülmeyen birçok biyolojik materyal afinite kromatografisi yöntemi ile tek bir aşamada ve çok daha yüksek bir saflaştırma katsayısıyla saflaştırılabilmektedir. Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir [17].



Şekil 2.1. Afinite Kromatografisinin Genel Prensibi [17]

Şekil 2.1 incelendiğinde; 1. durumda ligand (L), matrikse (M) kovalent olarak bağlanmakta, 2. durumda saflaştırılacak olan örnek (N) yani biyomolekül, kolona adsorbe olmakta ve safsızlıklar kolondan uzaklaşmaktadır, 3. durumda ise örnek desorpsiyon yoluyla izole edilmektedir.

Bu yöntemde verimli bir ayırım yapabilmenin yolu ilk olarak biyospesifik özelliklere sahip ve matrikse kovalent bağlanabilen bir liganddan geçmektedir. Ayrıca bu işlem için en başta gelen gerekliliklerden biri, immobilize edilmiş olan ligandın örnek açısından spesifik bağlama afinitesini haiz olması ve safsızlıkların uzaklaşmasının ardından bağlanmış olan örneğin seçimli desorpsiyonu için kullanılabilecek bir yöntem bulunmasıdır. Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlıdır ve bu sebeple kullanılan jel (matriks) çok yüksek spesifik adsorpsiyon göstermelidir. Bu jel, değişik şartlara da dayanır özellikte olmalıdır. Bahsedilen yöntemde, seçilen ligand saflaştırılacak olan madde için tersinir ve spesifik bağlama afinitesi göstermeliyken, aynı zamanda ligandın bağlama afinitesini bozmayıp, matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal açıdan modifiye edilebilen grupları bulundurması da gerekmektedir. Bu özellikler, ligandta olması gereken ve önem arz eden iki özelliktir. Aynı zamanda bu yöntemde kullanılacak olan ligand, değişik fonksiyonel gruplara sahipse, kullanılan bu ligand açısından matrikse bağlanmış olduğu bölge de önem arz etmektedir. Dolayısıyla bu bağlanma, saflaştırılacak olan molekül ile özel bir etkileşme vermesi olasılığı en az olan ligand grubu ile matriks arasında olmalıdır. [18].

Afinite kromatografisinde çoğu zaman fazlardan bir tanesi sabit faz iken, diğer faz hareketli faz olarak isimlendirilmektedir [8, 19]. Ayırıştırılacak olan homojen karışımdaki asıl bileşik ile sabit faz arasında yüzeye tutunma etkileşimi olan kromatografi, adsorpsiyon kromatografisidir [20]. Bu tutunma sonrasında ortamda yer alan tutunamayan hedef bileşik molekülleri ile safsızlıkların ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Daha sonra desorpsiyon işlemi ile elde edilmeye çalışılan bileşik, sabit faz üzerinden geri kazanılmaktadır [8, 19]. Kromatografik yöntemlere bakıldığında, adsorpsiyon ve desorpsiyon mekanizmalarındaki farklılıklar neticesinde alt grupların bulunduğu görülmektedir. Bu çeşitliliği ortaya çıkaran durum, ayırıştırılacak olan biyomoleküllerin boyut, yük, polarite gibi biyofiziksel özelliklerindeki farklılıktır [6]. Bu

bağlamda, ayrıştırılacak olan örneğin özelliklerine göre seçilebilecek kromatografik metotlar Çizelge 2.2'de sıralanmıştır [21].

Çizelge 2.2. Fizikokimyasal Özelliklere Göre Uygulanan Kromatografik Yöntemler [21]

FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLER	KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER
Elektriksel Yük	İyon Değişim Kromatografisi
Hidrofobisite	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
	Ters Faz Kromatografisi
Spesifik Bağlanma	Afinite Kromatografisi
Moleküler Boyut	Jel Filtrasyon Kromatografisi
Elektriksel Mobilite	Elektroforez Kromatografisi
Sedimentasyon Hızı	Santrifüj Kromatografisi

Birçok alanda (Enzim, protein, hormon, vitamin, reseptör, antijen, antikor, karbonhidrat, bakteri, virüs ve hücre) etkili bir şekilde kullanılabilir olmasına rağmen, ligand olarak kullanılan moleküllerin çalışma koşullarında kararsız olmaları, afinite kromatografisinin endüstriyel anlamda kullanımını engellemektedir. Afinite kromatografisinin endüstriyel amaçlı kullanımı, son zamanlarda üretilen yapay ligandlar sayesinde daha kararlı yapılar elde edilmesiyle giderek yaygınlaştırılmıştır [22].

2.3. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) ilk olarak Porath ve arkadaşları tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir [23]. 1975 yılının başlangıcından bu yana, yüksek histidin içeriğine sahip ya da histidin yönünden zengin kısımlar ile etiketlenen proteinleri yakalaması ve saflaştırması yeteneği sebebiyle, protein saflaştırması alanında çok önemli bir teknik haline gelmiştir [24]. Bir ayırma tekniği olarak IMAC, immobilize metal

iyonları ile hedef protein yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki koordine bağların oluşumuna dayanmaktadır [25].

IMAC tekniği, hızlı ve güvenilirdir [23]. Yapılan bir çalışmada, agaroz matriksinin üzerine iminodiasetik asit (IDA) ligandı kaplanmış olup, çinko, bakır, nikel, kobalt gibi geçiş metallerinin mevcut ligand üzerine immobilizasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan kromatografik sorbent ile birlikte; immobilize metallerin, insan serumu içerisindeki sistein, histidin ve triptofan amino asitlerine gösterdikleri afinite incelenmiştir [22].

Bu teknik, Hellferich tarafından 'Ligand Değişim Kromatografisi' adı altında 1961 yılında ortaya atılmış olup, yapılan çalışmada yalnızca küçük moleküller için ayrıştırma gerçekleştirilmiştir. Yani, ilk kez Porath ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ligand değişim kromatografisi türevlendirilerek, oluşturulan sistem ile proteinlerin ayrıştırıldığı ve aynı zamanda saflaştırıldığı gözlenmiş olup, bu teknik 'İmmobilize Metal İyon Afinitesi' şeklinde isimlendirilmiştir. Bu yöntem, daha sonraki yıllarda gerek laboratuvar ölçekli gerekse endüstriyel ölçekli çok sayıda proteinin karmaşık biyolojik sistemlerden, yüksek seçicilik ile saflaştırılmasında ve izolasyonunda önemli bir teknik haline gelmiştir [26].

Protein saflaştırmasının ana yöntemlerinden biri olan immobilize metal afinite kromatografisi, histidin etiketli rekombinant proteinleri seçici olarak ayırabilmektedir. Analiz öncesinde, örneklerin karmaşıklığını azaltmak ve düşük miktardaki biyobelirteçlerin tanımlanmasını kolaylaştırmak için gerçek biyolojik örneklerden yüksek derişimdeki histidin içeriği yüksek proteinleri uzaklaştırmakta kullanılmaktadır. Örneğin, histidin bakımından zengin bir protein olan hemoglobin (Hb) insan ve hayvanlardaki kırmızı kan hücrelerinde bulunan yüksek derişimdeki proteinlerden biri olarak bilinmektedir ve orak hücre hastalığı gibi bazı hastalıklarda, plazmada serbest hemoglobin 0.9 mg/ml kadar yüksek bulunur. Serbest hemoglobinin baskınlığı, düşük derişimdeki proteinler üzerindeki bilgilerin baskılanması nedeniyle proteom araştırması için dezavantaj oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu düşük derişimdeki proteinler hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olabilir. IMAC yöntemi, bazı hastalıklarda hayati rol oynayan düşük derişimdeki histidin yönünden zengin proteinlerin zenginleştirilmesinde de kullanılabilir. Örneğin, prion proteini, nöronlarda histidin

yönünden zengin bir proteindir ve prion patojenezi için çok önemlidir. Plasmodium falciparum His-rich protein 2'nin ise sıtma ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [12].

IMAC yönteminde, proteinlerin kromatografik sorbent üzerinde adsorplanması için, protein yüzeylerinde histidin, sistein, triptofan gibi spesifik aminoasit kalıntılarının bulunması gerekmektedir [26]. Başka bir deyişle IMAC, histidin kalıntısı içeren proteinlerdeki elektron verici gruplar ile immobilize metal iyonları arasındaki seçici etkileşime dayanarak, histidin açısından zengin proteinleri ayırmaktadır [27]. Bundan dolayı, histidin işaretli kullanılan proteinlerde, IMAC performansı artmakta ve saflaştırma çok daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Çizelge 2.3.'te IMAC'de proteinlerin adsorpsiyonunda aminoasitlerin yakalanmasında histidinin etkin olduğu görülmektedir [28].

Bununla birlikte, proteinlerin yapısal konfigürasyonları da (ikincil, üçüncül, dördüncül yapıları) bulundukları ortamdan ayrıştırılmalarında büyük önem taşımaktadır. Örneğin, elektriksel yükleri, moleküler boyutları, aminoasit içerikleri birbiri ile aynı olan iki protein yapısal konfigürasyonlarındaki farklılıklardan dolayı basit bir şekilde ayrıştırılabilmektedir [26].

Çizelge 2.3. IMAC'de proteinlerin adsorpsiyonunda aminoasitlerin yakalanma eğilimi [28]

Fonksiyonel Grup	Yakalanma eğilimi
Histidin	++++
Sistein*	++++
Aspartik asit, glutamik asit	-
Lisin, arginine	+
Triptofan, tirozin, fenilalanin	+
N-terminali	++

Bir IMAC reçinesi, destek (örn:Agaroz), bağlayıcı, şelatlama (kenetleme) bileşiği (iminodiasetik asit, nitrilotriasetik asit, tris'karboksimetil 'etilendiamin gibi) ve iki

değerlikli geçiş metali iyonundan (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} gibi) oluşmaktadır. Bir bağlayıcı ile agarozla bağlanan şelatlama bileşikler, metal iyonlarını hareketsiz kılar ve koordine eder. Bu metal iyonları, peptidlere ve protein yüzeylerine yerleşmiş olan histidin (His) amino asitlerinin imidazol halkaları üzerindeki azot ile etkileşir [23].

2.3.1. Katı Destek Olarak Kullanılan Matrisler

Farklı organik ve inorganik matrisler, immobilize metal afinite kromatografisinde katı destek olarak kullanılmaktadır. Proteinlere afinite gösteren metalin immobilize olduğu son yapının verimli olabilmesi için, matrisin belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bütün koşullarda fiziksel, kimyasal, ve mekanik olarak kararlı olan, ayrıca solvent ortamında kesinlikle çözünmeyen bir katı destek kullanılmalıdır. Kolon kromatografilerinde hareketli fazın akış hızının yüksek olduğu durumlarda ve kullanımından sonraki rejenerasyon işlemlerinde deforme olmaması gerekmektedir. Matris, spesifik ligand dışındaki maddelerle etkileşime girmemelidir. Kromatografik proses esnasında şişme veya büzölmeye maruz kalmamalıdır. Hidrofilik yapıda ve basit bir şekilde türevlendirilebilir olmalıdır. Immobilize olacak ligandın yüksek verimlilikte bağlanabilmesi için matris yüksek yüzey alanına sahip gözenekli yapıya ve bu liganda uygun karboksil, amid, hidroksil gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır [26, 28].

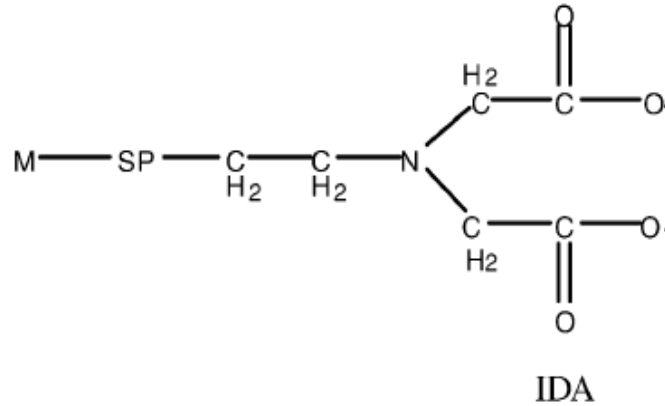
IMAC uygulamalarında katı destek malzemesi olarak kullanılan ilk yapı, bir karbonhidrat olan, belli sıcaklıklarda suda çözünebilen, agarozdur. Agaroz aynı zamanda, hidrofilik karakterde, çeşitli ortam koşullarına dayanım gösteren ve etrafındaki diğer malzemeler ile tepkimeye girmeyen bir maddedir [10]. Ayrıca, dekstran ve selüloz gibi yapılar yaygın kullanılan organik matrislerden bazılarıdır. Polimerik matrisler arasında polistiren, poliakrilamid, poli(hidroksietil metakrilat), gözenekli cam, demir oksit ve silika sayılabilir [29]. Silika temelli ve sentetik formdaki matrisler sayesinde organik polimerlerin yapısal zayıflıkları giderilebilmektedir. Bu matrisler az deforme olurlar, çünkü mekanik dayanımları yüksektir ve buna bağlı olarak da yapısal olarak daha güçlüdürler. Silanol açığa çıkmasını engellemek ve matriste olumsuz sonuçlarla karşılaşmamak için silika kullanılan IMAC uygulamalarında düşük veya yüksek pH değerleri ile çalışılmaması gerekmektedir [10].

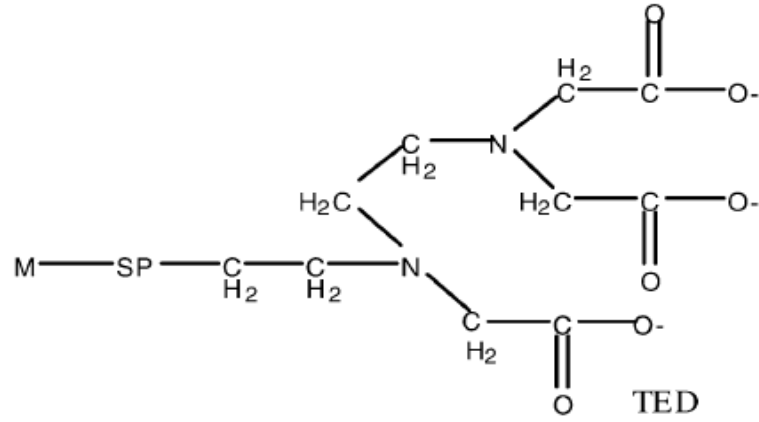
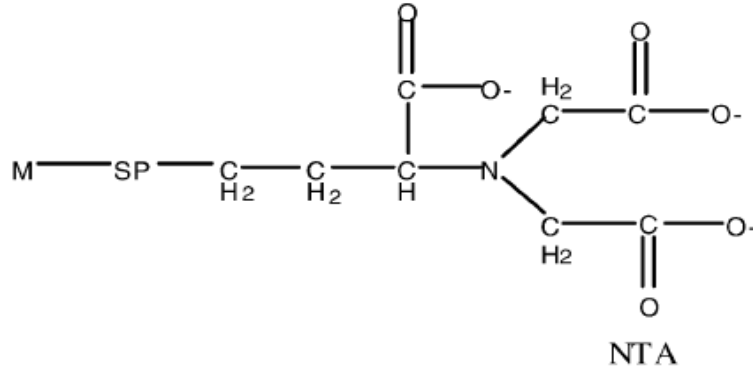
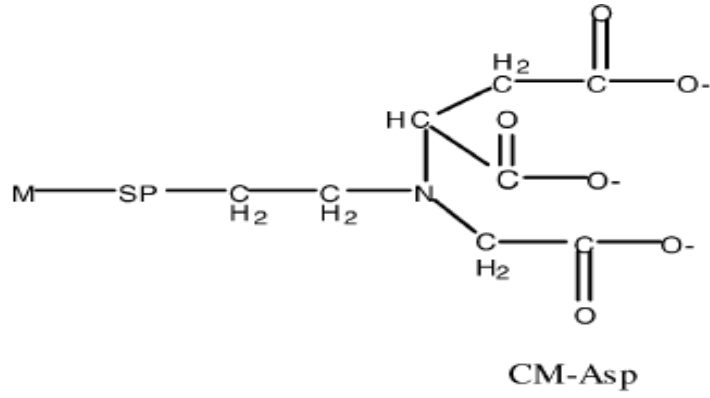
2.3.2. Ligandlar

Ligandlar, katı matris üzerine immobilize edilir ve katı matris yüzeyinin kaplanmasını, ayrıca metal iyonlarının immobilizasyonu için sahip olduğu oksijen, azot ve kükürt gibi elektron vericiler ile koordinasyon komplekslerinin oluşumunu sağlar [9]. IMAC ligandları, uygulamada istenilen seçiciliği elde etmek ve metal iyon kaçağını azaltmak için geliştirilmiştir. Geliştirilen bu ligandlar dört türe ayrılabilir:

- (1) İki uçlu ligandlar (salisilaldehit, aminohidroksamik asit veya 8-hidroksikinolin (8-HQ));
- (2) Üç uçlu ligandlar, (iminodiasetik asit (IDA), ortofosfoserin, dipikolilamin, karboksimetilprolin ve N-(2-piridilmetil) aminoasetat);
- (3) Dört uçlu ligandlar (nitrilotriasetik asit (NTA) ve karboksimetillenmiş aspartik asit (CM-Asp)),
- (4) Beş uçlu ligandlar (N',N',N'-tris(carboksimetil)etilendiamin (TED) ve tetraetilen pentamin gibi) [30].

Şekil 2.2.'de üç uçlu IDA, dört uçlu nitrilotriasetik asit (NTA) ve karboksimetil aspartik asit (CM-Asp), ve beş uçlu N,N,N'-tris-karboksimetil etilen diamin (TED) ligandların yapısı gösterilmektedir [10].



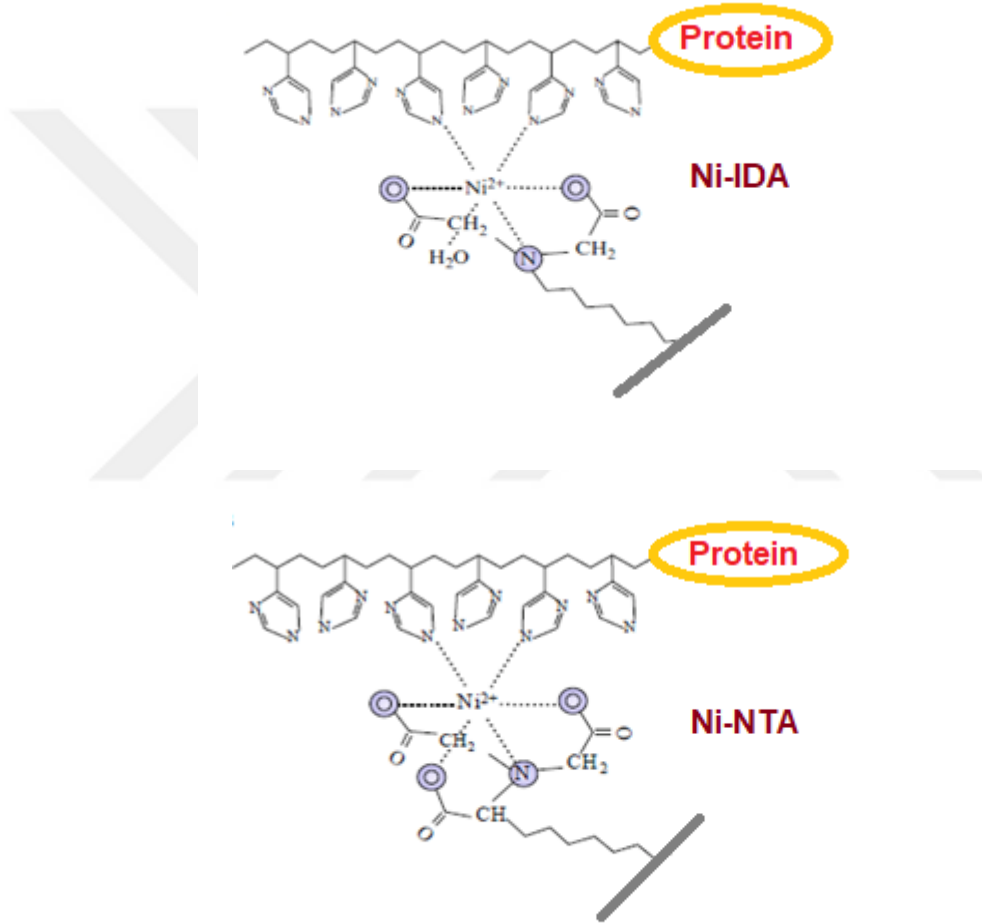


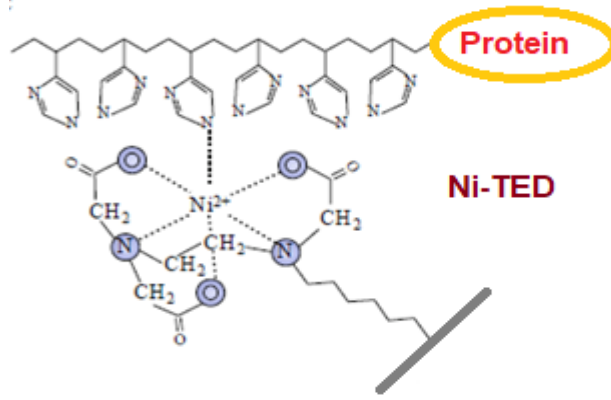
M-Matris, SP:Uzatma kolu

Şekil 2.2. Çeşitli Ligandların Yapısal Gösterimi [9]

İçerdiği aktif grup sayısı beş olan, beş uçlu bir şelatın (TED gibi) bir geçiş metali olan nikeli bağlama kapasitesinin, düşük aktif grup içeren şelatlarla göre daha yüksek olduğu, fakat bu durumun avantajlı olmadığı görülmektedir. Şekil 2.3.'te de görüleceği

üzere, altı adet koordinasyon noktası bulunan Ni^{2+} iyonunun bu noktalarından beşi TED ile bağlandığı için bir ucu protein adsorpsiyonuna açık kalabilmektedir. Bundan dolayı ise, kromatografik sorbentin protein adsorplama veriminin azaldığı görülmektedir. Aynı doğrultuda dört uçlu olan NTA, protein adsorpsiyonu için uygun iki koordinasyon içermektedir [31]. Üç uçlu şelatörlerinin bir temsilcisi olan IDA, IMAC'te standart, kapsamlı olarak araştırılan bir metal-şelat ligandıdır [30].





Şekil 2.3. Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş IDA, NTA ve TED ligandlarının histidin grupları ile etkileşimi [31]

Proteinlere bağlanma kapasitesi, ligandın koordinasyon sayısı ile azalırken, metal iyon afinitesi genellikle artar [30]. Başka bir deyişle, koordinasyon noktası (uç sayısı) ile ligandların metallerle oluşturdukları bağ kuvveti doğru orantılıdır. Dolayısıyla metal iyonu, beş uçlu bir ligandta iki uçlu bir liganda kıyasla daha iyi immobilize edilmektedir. Ancak çok uçlu ligand kullanılan protein adsorpsiyonunda, metal iyonu ile protein arasındaki tutunma kapasitesi, ligand ile metal arasındaki bağın güçlenmesiyle azalır. IMAC proseslerinde en sık kullanılan ligand, üç uçlu yapıya sahip olan IDA'dır [10].

2.3.3. Ligandlar Üzerine İmmobilize Olan Metal İyonları

Bir ayırma ve saflaştırma metodu olan IMAC, proteinlerin immobilize metal iyonlarına karşı gösterdikleri afinite farkıyla ve proteinlerin üzerlerindeki elektron verici grupları ile metal iyonları arasında oluşan etkileşime dayanmaktadır. Bundan dolayı immobilize olan miktar ve kullanılan metal iyonunun çeşidi önem arz etmektedir. Kromatografik sorbentin kapasitesi ve seçiciliğinde, immobilize metal iyonlarının yoğunluğu etkili bir rol üstlenmiştir [9].

Pearson tarafından, IMAC proseslerinde kullanılan metaller 3 gruba ayrılmaktadır. Bu ayırım, metallerin nükleofillere karşı gösterdikleri ilgiye göre yapılmaktadır. Birinci gruplandırma, metallerin ligandta bulunan oksijen iyonlarına ilgisi baz alınarak yapılmış olup, bunlar Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+} gibi sert metal iyonlarıdır. İkinci gruplandırmada ise, metallerin kükürt iyonlarına ilgisi baz alınmış olup, bu metal iyonları Hg^{2+} ve Ag^+ gibi yumuşak metal iyonlarıdır. Üçüncü gruplandırmada geçiş metalleri olarak belirtilen ve

elektron çifti afinitesi olan Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Fe^{2+} iyonları bulunmaktadır. Bu metal iyonları, farklı ligandlardan birinin veya birkaç tanesinin birlikte yer aldığı azot, kükürt ve oksijen iyonlarının hepsine ilgi gösterme yetisine sahip oldukları için immobilize metal iyonu anlamında en sık kullanılan metallerdir [9]. Ayrıca, IMAC yöntemi uygulama alanının ne olduğu veya saflaştırılacak olan protein çeşidine göre immobilize metal iyonu olarak seçilecek olan metal değişebilir. Fosfoprotein saflaştırılma proseslerinde üç değerlikli Al^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} ve dört değerlikli Zr^{4+} gibi iyonlar tercih edilmekte, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} gibi iki değerlikli iyonlar genel olarak histidin-işaretli proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır [32]. Bir çalışmada, IDA ligandı ile şelat oluşturan metal iyonlarının, proteinlere karşı gösterdiği afinite ve alıkonma süreleri açısından sıralaması $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+}$ şeklinde gösterilmektedir [10].

2.3.4. Kromatografik Sorbentler ile Adsorpsiyon-Desorpsiyon Mekanizması

Matris ile kovalent bağlı ligand üzerinde immobilize olmuş metal iyonu ile proteinlerin yüzeylerine ulaşan aminoasitlerdeki özel tanımlanmış kısımların aralarındaki afinite IMAC için temel prensiptir. Spesifik kısımlar elektron verici (imidazol, tiyol ve indol grupları gibi) kısımlardır. Bunlar aspartik asit, glutamik asit, tirozin, histidin, triptofan, sistein, arjinin, lizin, metionin gibi aminoasit segmentlerinin yüzeylerinde yer alırlar [10, 33, 34].

Proteinlerde bulunan histidin grupları, metal iyonlarına karşı en yüksek afiniteyi gösteren ve protein adsorpsiyonlarında bulunması gerekli olan ana aminoasit grubudur. Bunun yanı sıra imidazol, tiyol ve indol grupları içeren amino asitlerin birçoğu da yine IMAC proseslerine uygundur, ancak hiçbiri histidin kadar metal iyonlarına karşı yüksek afinite göstermemektedir. Aromatik zincirleri bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin aminoasitleri ise ancak çevrelerinde histidin varsa adsorpsiyona yardımcı olurlar. Sisteinler, yüksek kararsız yapıdadırlar ve bundan ötürü immobilize metal iyonlarıyla bağ oluşturma işlemini ender olarak gerçekleştirirler [33].

Histidin etiketi, rekombinant bir proteinin saflaştırılması için seçicilik ve afinite bakımından en iyi olarak kabul edilmektedir. Bir *Escherichia coli* lizatından, bir rekombinant etiketli protein % 80-90'a kadar izole edilebilmektedir. Adsorpsiyon

aşamasında, şelat ve/veya katyondan elektrostatik etkileşimlerin payını ortadan kaldırmak için genellikle yüksek iyonik güce sahip tamponlar kullanılır [35].

Histidin zincirlerindeki imidazol nitrojenlerinin protonlanmamış formda olduğu nötr veya hafif bazik pH değerlerinde, proteinler kromatografik destek üzerine adsorbe olurlar. İyonik güçleri yüksek olan tamponlar, asetat veya fosfat tamponları gibi, adsorpsiyon tamponu olarak, protein ve metal iyonu arasındaki spesifik etkileşim dışındaki spesifik olmayan etkileşimleri engellemek veya azaltmak için kullanılırlar [34]. Ortama eklenen elektrolitler, metal iyonlarına ait koordinasyon noktalarındaki su molekülleriyle iyonlar arasındaki çekim kuvvetinin düşmesini sağlayarak bu noktalara proteinlerin adsorpsiyonunu gerçekleştirirler [10].

Adsorpsiyonun arkasından desorpsiyonun yapılabilmesi, aminoasit yan zincirleri ile metal iyonlarının arasındaki etkileşimin tersinir olması ve aralarındaki afiniteyi azaltan koşulların oluşmasına bağlıdır. Bu koşullardan biri pH değerinin, hidrojen derişiminin yükselmesi ile düşürülmesidir. Hidrojen iyonlarının, immobilize metal iyonları ile proteinler üzerindeki bağlantı bölgeleri için rekabet etmesiyle birlikte protonasyonun gerçekleştiği histidin üzerinde bulunan nitrojenlerde protein ile immobilize metal iyonu arasında oluşan bağ zayıflamaktadır. Bu durum ise, proteinin desorpsiyonuna neden olmaktadır [9, 33]. Protein elüsyonu için protein ile metal iyonları arasındaki bağ yüksek tuz derişimi zayıflatılmalıdır [10]. Bunun dışında, desorpsiyon işleminde uygulanan başka bir yöntem ise ortama bazı ajanların eklenmesidir. Bu ajanlar düşük pH değerinde denatüre olabilecek proteinin bağlanmasında görev alan aminoasit gruplarının benzeri olan yarışmacı ajanlardır. Bir başka deyimle, düşük konsantrasyon veya nötr pH değerinde histidin veya imidazol bulunduran yapılardır. Bu şekildeki ortamda oluşan rekabet, immobilize metal iyonlarını hedefler. Metal iyonuna bağlanabilmek için ortama eklenen histidin veya imidazol grupları ile proteinlerin üzerindeki imidazol grupları yarışmaktadır. Meydana gelen bu yarış neticesinde protein ve immobilize metal iyonu arasındaki bağ zayıflamaktadır [10, 33]. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) güçlü bir şelat bileşigidir. Bu bileşik, düşük pH değerlerine karşı duyarlı olan ve immobilize metal iyonları ile bağı kuvvetli olan proteinler için kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem ile her ne kadar proteinler sorbent üzerinden alınsa da, bunun yanında metal iyonlarının ligand üzerindeki bağlantısı da zarar görmekte ve

bir sonraki kullanımda metal immobilizasyonunun tekrarlanarak ligandın immobilize metal iyonu ile doyurulmasına ihtiyaç duyulmaktadır [33, 34].

2.3.5. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinin Avantajları ve Dezavantajları

Rekombinant proteinlerin etkili bir şekilde saflaştırılabilmesi için gelişen tekniklere paralel olarak, proteinlerin hücre lizatından doğrudan izolasyonuna izin veren basit, hızlı ve uygun protein saflaştırma yöntemleri için giderek artan bir ihtiyaç söz konusudur. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması, proteinlerin yapısını ve işlevini incelemek, iyileştirici ve tanısal uygulamalar için önemli bir adımdır. İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), rekombinant proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için en etkili yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir [14].

IMAC, diğer protein saflaştırma metotlarına kıyasla çok sayıda avantaja sahiptir. En büyük avantajlarından bir tanesi, histidin-işaretli proteinleri yüksek verimlilikte ayrıştırması olarak sayılabilir [34]. Aynı zamanda, imidazol ile yıkama kolaylığı ve tek adımda önemli ölçüde saflaştırma tekniğinin yaygınlaşmasını sağlayan avantajları arasında yer almaktadır [36].

IMAC metodu ile pH 5.0 - 8.5 aralığında çalışılabilmekte olup, ligand üzerine immobilize olan metal iyonlarının bağlantısının sonlandırılmasıyla, aynı şelatın üzerinde farklı metal iyonları, pek çok kez denenebilmektedir. Kromatografik sorbentler kullanılarak, yüksek spesifiklikte adsorpsiyon gerçekleştirilmektedir. IMAC sayesinde çok küçük boyutlu proteinler dahi saflaştırılabilmektedir. Bazı proteinler orjinal haliyle ayrıştırılamazken, üzerlerine yapılan histidin takviyesi ile saflaştırılabilirler. Bunun sebebi ise, histidin-işaretli proteinlerin hepsinin IMAC yöntemi ile saflaştırılabiliyor olmasıdır [32, 34].

IMAC yönteminin sahip olduğu avantajlara ilaveten, bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlara örnek olarak, immobilize metal iyonlarının sebep olduğu toksiklik örnek verilebilir. İnsan vücudunda kanserojen etkiye sebep olduğu bilinen metallerden Ni^{2+} ve Co^{2+} iyonları ile yapılan bazı araştırmalarda, Ni^{2+} iyonunun hücre çekirdeği üzerinde bulunan histidin yapılarıyla bağlanarak DNA molekülüne zarar verdiği görülmüştür. Bu sebeplerden ötürü, tedavi amaçlı kullanılması düşünülen proteinlerin saflaştırılmasında, IMAC uygulaması sırasında Ni^{2+} iyonlarının ayrıştırılan

protein ile birlikte bulunmamasına özen gösterilmelidir. Bunun için protein desorpsiyonu esnasında uygulanan elüsyon yöntemleri, immobilize durumdaki metal iyonlarını şelat üzerinden koparmayacak şekilde tasarlanmalıdır [32, 34].

Katalizörü metal olan oksidasyon tepkimelerine sistein, histidin, lizin, arginin, prolin ve methionin gibi aminoasitler girebilmektedir. Bunun neticesinde, protein iskeletini parçalayan ve proteine zararı olan reaktif radikal ara ürünler oluşmaktadır. IMAC proseslerinde kullanıldığında, aminoasitlerin ve proteinlerin yapısının bozulmasına yol açan, yüksek redoks aktivitesine sahip geçiş metallerinden biri olan Cu^{2+} iyonunun getirdiği bu dezavantajı önlemek veya en aza indirmek için, daha az aktif olan Zn^{2+} gibi bir iyon kullanmak faydalı olacaktır [34].

Proteinlerin tedavi amaçlı uygulamalarda kullanıma uygun saflıkta elde edilebilmesi için, IMAC prosesi için sonradan takviye edilen histidin-işaretleli kısımlarının uzaklaştırılması ve böylelikle proteinin kendi orjinal haline gelmesi sağlanmalıdır. Bu sebeple proteinlerin kromatografi işlemiyle saflaştırılmasından sonra, histidin uzantılarının da kırılması gerçekleştirilmektedir. Bu işlem kimyasal yöntemler ve enzimatik yollarla uygulanabilmektedir. Gerek toksisitesi gerekse protein yapısına zarar verme riskinden dolayı kimyasal ajan kullanımından ziyade, enzimatik işlemler tercih edilmelidir. Ancak enzimlerin kullanıldığı işlemlerde de ürün kirliliğinin önüne geçebilmek maksadıyla ara madde olarak kullanılan enzimin o ortamdan uzaklaştırılması gerekir [32, 34].

2.4. Titanyum dioksit

Titanyum dioksit, toksik olmayan yarı iletken bir metal oksittir ve boya, plastik, ilaç ve gıda gibi birçok endüstriyel alanda pigment veya dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Zehirli bir etkiye sahip olmayışı nedeniyle, özellikle ilaç salımında çok kullanışlıdır. Aynı zamanda, UV emici olarak kozmetik ve cilt uygulamalarında kullanılmaktadır. Bu alanlara ilaveten, son yıllarda titanyum dioksit sudaki organik ve inorganik kirleticilerin giderilmesinde, endokrin bozucular, tekstil boyaları, N_2 veya CO_2 'nin fotokimyasal indirgenmesi, bakterilerin öldürülmesi, güneş enerjisinin toplanması ve pestisitler gibi zararlı organik kirleticilerin degradasyonunda gerekli olan eşsiz fotokatalitik özellikleri nedeniyle önemli ilgi çekmiştir [37, 38].

1790'lerde TiO_2 , İngiltere'nin Cornwall sahilinde siyah kum şeklinde keşfedilmiştir. William Gregor, siyah tanelerin silika kumundan bir mıknatısla ayrıldığını öğrenmiş ve bu siyah taneleri hidroklorik asitle işlediğinde beyaz bir kalıntı oluştuğunu görmüştür. Bu tortuyu sülfürik asit ve soda ile işlemiden geçirdikten sonra ise kalsinasyon uygulamış ve sonunda beyaz bir toz elde etmiştir. Bu meydana gelen toz, TiO_2 'dir [39].

Günümüzde, TiO_2 sülfat veya klor prosesleri ile üretilmektedir. Sülfat işleminde, metamorfik kayalarda bulunan ilmenit, sülfürik asit ile işlenerek demir ve titanyum sülfat haline getirilmektedir. Daha sonra, titanyum hidroksit hidroliz ile çökteltmekte ve yüksek sıcaklıkta kalsine edilmektedir. Klor işleminde, tohum kristalleri alkali hidroliziyle üretilmekte ve titanyum tetraklorür üretmek için klor ile reaksiyona sokulmaktadır. Daha sonra titanyum tetraklorür saflaştırılmakta ve çok saf TiO_2 elde etmek için yeniden oksitlenmektedir [39].

2.4.1. TiO_2 Sentez Yöntemleri

TiO_2 ; toz, kristal veya ince filmler şeklinde olmak üzere farklı formlarda üretilebilmekte olup, her bir form, birkaç nanometre ile birkaç mikrometre gibi geniş bir aralıkta sentezlenebilmektedir. Burada önemli olan özellik, TiO_2 'nin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin hazırlık yöntemine bağlı olmasıdır. Genel olarak hazırlık yöntemleri gaz faz yöntemleri ve çözelti yöntemleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

İnce TiO_2 filmlerinin hazırlanması için genellikle gaz faz yöntemleri tercih edilmektedir. Gaz faz yöntemlerinin başlıca türleri ise, kimyasal buhar biriktirme (CVD) ve fiziksel buhar biriktirmedir (PVD) [40, 41]. Son zamanlarda, gaz faz yöntemlerine dayanan bazı karmaşık teknikler kullanılmış olmakla birlikte bunlar, iyon implantasyonu, moleküler demet epitaksi ve dinamik iyon demeti oluşturulması şeklinde sayılabilir [42]. Bu teknikler, yüksek saflıkta ve kontrol edilebilir film büyümesi olan malzemelerin üretimini sağlamıştır. Ancak, yüksek enerji tüketimi diğer teknikler ile karşılaştırıldığında bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır.

Çözelti yöntemleri, çoğunlukla tozların sentezi için kullanılmaktadır. Bu yöntemin birkaç avantajı bulunmakta olup, bunlar, stokiyometrinin kontrol edilebilmesi, homojen materyal üretimi, karmaşık şekillerin oluşma olasılığı ve kompozit materyallerin hazırlanması şeklinde sıralanabilir. Ancak, bu yöntemlerin dezavantajları ise uzun

işlem süreleri ve pahalı öncülerin kullanımıdır. Çözelti yöntemlerinin içerisinde; çökeltme ve birlikte çöktürme [43, 44], solvotermal ve hidrotermal yöntemler [45, 46], mikroemülsiyon [47], yanma ve elektrokimyasal sentez [48, 49] ile sol-jel yöntemi [50] yer almaktadır. Sol-jel yöntemi, diğer tekniklere nispeten sahip olduğu avantajları nedeniyle farklı formlarda titanyum sentezi için en popüler yöntemdir. Bu proses ile birlikte, TiO_2 kompozit ve TiO_2 katkılı malzemelere giriş yapılması sağlanmıştır [51].

2.4.2. Sol-Jel Yöntemi

Sol-Jel yönteminde; katı ürün, kristalizasyon veya çöktirmeden farklı olarak jel oluşumu ile elde edilmektedir. Sol yoluyla materyallerin oluşumu, daha sonra sol'un jelleşmesi ve son olarak ise çözücünün uzaklaştırılması şeklindeki proses olarak tanımlanmaktadır. "Sol", bir sıvı içindeki kolloidal katı parçacıkların sabit bir süspansiyonu olup, "jel" ise, kolloidal katı parçacıkların yığını ile oluşturulan bir katı ağ olarak tanımlanmaktadır [52, 53].

Sol-jel metodunun seçilmesinin sebepleri arasında; çok gözenekli malzemeler ve kristal malzemelerin sentezlenebilmesi, son malzemenin parçacık boyutunun gözenek boyutu ve gözenekliliğinin, hidroliz ve yoğunlaşma oranlarının kontrol edilmesiyle ayarlanabilmesi ile kurutma ve kalsinasyon koşullarının kontrol edilerek gözenek boyutu, gözeneklilik ve mekanik özelliklerin kontrol edilebilmesi sayılabilir.

TiO_2 , kullanılan başlatıcıya bağlı olarak alkoksit (organik) veya alkoksit olmayan (inorganik) sol-jel yöntemleri ile üretilebilir. Alkoksit olmayan (inorganik) sol-jel metodunda; nitratlar, klorürler, asetatlar gibi inorganik tuzlar başlatıcı olarak kullanılır ve ek bir inorganik anyonun uzaklaştırılmasını gerektirir. Alkoksit (organik) sol-jel yolunda, kullanılan başlatıcılar titanyum etoksit, titanyum izopropoksit (TIP) ve titanyum n-bütoksit gibi metal alkoksitlerdir. Titanyum dioksit için öncü olarak TiCl_4 , $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ gibi inorganik bileşikler kolayca elde edilebilir ve alkoksitlerden daha ekonomiktir. Sol-jel işlemi, sıcaklığa göre yüksek sıcaklıkta hazırlama (kalsinasyon muamelesi kullanılarak) ve düşük sıcaklıkta hazırlama (kristalleşme, kalsinasyon muamelesi olmadan yapılır) olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılabilir [54].

2.4.2.1 Düşük-Sıcaklık Sol-Jel Prosesi

Çözücü karışımlarında, normal sol-jel kimyası ile sadece amorf titanyum sentezlenebilir. Çalışmaların birçoğunda anataz formunda titanyum dioksit elde etmek için, amorf titanyum dioksit kalsinasyonu 300-400 °C civarında gerçekleştirilmiştir. Kalsinasyonu daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirerek, yüksek kristal yapıları elde edilebilir, ancak daha yüksek termal enerji, mezo gözenekli çerçevelerin çökmesine yol açar ki bu da daha düşük yüzey alanlarının oluşmasına sebep olur. Düşük sıcaklıklarda (<100 °C) TiO₂ partiküllerinin hazırlanmasının, (1) tekdüze parçacık boyutu dağılımına sahip TiO₂ partikülleri (2) yüksek arayüzey adsorpsiyon yeteneği, (3) çeşitli destekleyici malzemeler üzerinde kolay kaplama gibi çeşitli avantajlara sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, TiO₂ partiküllerinin fotokatalitik aktivitesinin kristal yapı, parçacık boyutu ve yüzey alanı gibi bazı parametrelere bağlı olduğu da bildirilmiştir. Lee ve Liu, yüksek sıcaklıklarda kalsinasyonu önlemek için, düşük sıcaklıklarda TiO₂ Sol'unun sentezi için bir asit - hidroliz yöntemini rapor etmiştir. TiCl₄ başlatıcı olarak ve hidroklorik asit (HCl) ise peptitleyici ajan olarak kullanılmış olup, pH, HCl konsantrasyonu ve depolama sıcaklığı gibi bazı parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Addamo ve diğerleri tarafından, kalsinasyon olmadan TiCl₄'ün hidrolizi kontrol edilerek nanometre boyutunda TiO₂ partikülleri hazırlanmıştır. Çalışmada, TiCl₄ konsantrasyonunun, hazırlık prosedürü ve kaynama süresinin TiO₂ özelliklerine etkisi araştırılmıştır. TiO₂ örneklerinin fotokatalitik aktivitesinin kristalinite ve partikül büyüklüğüne bağlı olduğu gösterilmiştir [55, 56]. Hidratlanmış titanyum dioksit, Randorn ve diğerleri tarafından, kalsinasyon olmadan TiCl₄ ve konsantre NH₄OH çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tozların kristal yapısı, az miktarda anataz fazı ile amorf fazdan oluşmuştur. Metilen mavisi boyasının fotokatalitik bozunması hazırlanan tozlarla araştırılmıştır [57]. Ancak düşük sıcaklıktaki sol-jel sentezinin (<100 °C) kalsinasyon adımını ortadan kaldırmasına rağmen, düşük kristalinite'ye neden olduğu ve dolayısıyla titanyum partiküllerinin düşük fotokatalitik aktivite ile elde edilmesine neden olduğu gösterilmiştir [58].

2.4.2.2. Sol-Jel Kalıplama Yöntemi

Sol-jel templasyon yöntemi, titanyum parçacıklarının morfolojisini kontrol etmek için kalıp kullanan alternatif bir yaklaşımdır. Genel olarak, kalıplar yumuşak ve sert olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Yumuşak kalıplar esnektir ve genellikle bu amaçla mikroemülsiyonlar, miseller veya proteinler gibi organik veya biyolojik moleküller kullanılır. Yumuşak kalıplardan farklı olarak, sert kalıplar inorganik kolloidler veya polimerik tanecikler gibi sert yapılara sahiptir. Gözenek boyutu, dış şekil ve boyut gibi morfolojik özellikleri kontrol eden polimerik kalıpların kullanılması, monodispers gözenekli titanyum partiküllerinin sentezi için büyük önem taşımaktadır. Sol-jel kalıplama, kontrollü morfoloji ve yapıya sahip titanyum dioksit partiküllerinin hazırlanması için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem, gözenekli polimerik kalıp içinde, saf metal alkoksitlerin sol-jel kimyasını içerir. Kalıp, kompozit yapıdan kalsinasyon veya ekstraksiyon yoluyla çıkarılır [58, 59]. Bu yöntem kullanılarak, Caruso ve arkadaşları, titanyum dioksit mikrokürelerin üretiminde kalıp olarak gözenekli poli (S-co-DVB) mikrokürelerin ve öncül olarak ise $TiCl_4$ 'ün kullanımını göstermiş olup, kalıp materyalin uzaklaştırılmasının sonucu olarak gözenekli yapıda, homojen metal oksit partiküllerin elde edilmesi sağlanmıştır [60].

2.5. Polimerizasyon Yöntemleri

Kromatografik yöntemlerde kullanılan polimerik partiküller, farklı polimerleşme teknikleriyle elde edilmektedir. Bu polimerik partiküller, biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarında tanımlama, dolgu malzemesi, izleme, hücre analizi, mikroskoplarda kalibrasyon gibi pek çok farklı amaç doğrultusunda kullanılırlar. Kullanılan polimerleşme teknikleri emülsiyon, dispersiyon, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu gibi farklı yöntemlerdir. Monodispers yapıda olan, 10 nm ve 10000 nm boy aralığına sahip küresel partiküllerin istenen boyut ve yapısal özellikte üretilebilirliği, kuvvetli asidik veya bazik ortamlarda ve geniş sıcaklık aralıklarında stabil olması bu partiküllerin birçok alanda kullanımını mümkün hale getirmektedir [61, 62].

2.5.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyon işlemi, polimerizasyonun temel bileşenleri olan monomer, başlatıcı ve stabilizörün homojen bir faz haline geldiği ve dağıtma fazı içerisine eklenen,

genelde 1-10 µm boyutundaki eş-boyutlu partiküllerin olduğu polimerizasyon işlemi olup, bir serbest radikal polimerizasyon tekniğidir. Dispersiyon polimerizasyonunu diğer tekniklerden ayıran en önemli özellik, monodispers partiküllerin sentezidir. Dispersiyon polimerizasyonu; endüstride, sağlık alanında ve çeşitli araştırma alanlarında kullanılan monodispers polimerik partiküllerin sentezi açısından büyük ilgi toplamıştır [61]. Literatürde, dispersiyon polimerizasyonu önce Osmond ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [63]. Polimerik partiküllerin su bazlı olmayan dispersiyonlarının üretimi için, akrilik ve vinil monomerler, polimerik stabilizörlerle hidrokarbonlar içinde polimerize edilmiştir. Almog ve diğerleri, kolloidal stabilizör olarak hidrolize edilmiş polivinil alkol (PVA) ve elektrostatik stabilizatör olarak bir kuaterner amonyum tuzu kullanılarak, polar çözücü ortamında polimerik mikroküreler sentezlemişlerdir. Bu çalışmalar dispersiyon polimerizasyonun farklı özelliklere sahip polimerik partiküllerin sentezinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur [64, 65].

Dispersiyon polimerizasyonunda, monomer reaksiyon ortamı olan alkol (metanol, etanol, iso-propanol, n-propanol, n-butanol) veya alkol-su karışımı içinde çözünebilir haldedir ve uygun bir stabilizör varlığında polimerize edilir. Poliakrilik asit, polivinilpirolidon, polietilenimin, polivinil alkol gibi polar yapıdaki maddeler de stabilize edici kimyasallardır [60]. Çözücünün seçimi, çözücünün hem monomeri hem de stabilizörü çözmesi gerektiğinden dolayı önem taşımaktadır, fakat oluşan polimeri çözmemelidir. Bu nedenle, dispersiyon polimerizasyonunun erken aşamalarında polimerizasyon çözeltisi homojendir. Polimerizasyon devam ettikçe ve monomer dönüşümü arttıkça, stabilize edilmiş polimerik parçacıklar çöktürme ile oluşturulur.

Dispersiyon polimerizasyonunun mekanizması karmaşıktır, sistem polimerizasyonun başlangıcında çözelti polimerizasyonu gibiyken, kısa bir sürede heterojen polimerizasyona dönüşür. Dispersiyon polimerizasyonu ile oluşturulan polimerik parçacıkların boyutu ve molekül ağırlığı; polimerizasyon kinetiğine, parçacık büyüme prosesine ve diğer reaksiyon parametrelerine bağlıdır [66, 67].

Literatürde verilen çalışmalara göre, dispersiyon polimerizasyonu mekanizması dört adımda özetlenebilir [68, 69, 70].

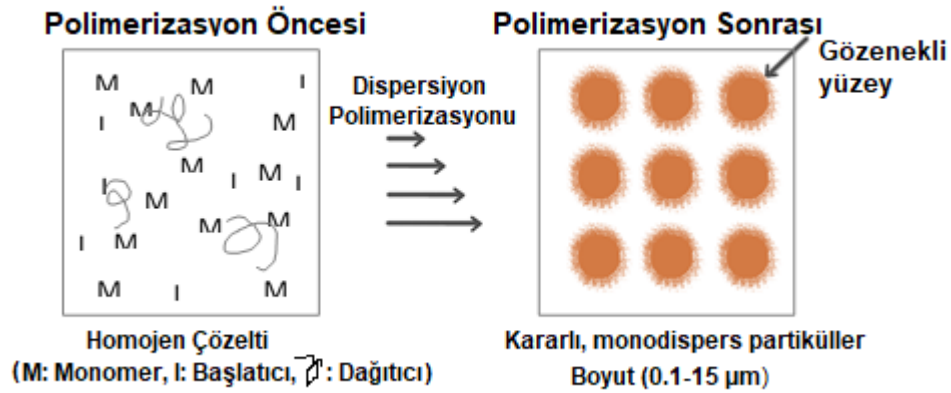
1) Başlangıçta, monomer, başlatıcı ve polimerik stabilizör çözücü içinde çözülür ve çözelti homojendir.

2) Çözelti ısıtıldıktan sonra, başlatıcı serbest radikaller oluşturmak üzere ayrışır ve bu serbest radikaller, hala çözücü içinde çözünür olan oligomerleri oluşturmak için monomer ile reaksiyona girer.

3) Kritik zincir uzunluğuna ulaşarak, polimer zincirleri, polimerik stabilizör tarafından stabilize edilen çekirdeklerin oluşmasını ve çökmesini sağlar. Daha sonra çekirdek, stabil parçacıklar oluşana kadar, stabilizör ve ko-stabilizörün ortamdan adsorpsiyonu yoluyla daha büyük parçacıklar halinde toplanır.

4) Polimerizasyon, monomer ile şişmiş parçacıklar içinde gerçekleşir. Bu işlem, reaksiyon ortamındaki tüm oligomerler tüketilene kadar devam eder.

Farklı çalışmalarda gösterildiği üzere, çekirdekler, dispersiyon polimerizasyonu süresince oluşur ve böylece partikül sayısı, ilk aşamada belirlenir. Parçacık oluşumu aşaması tamamlandıktan sonra, polimerizasyon ilerledikçe sadece parçacık boyutu artar [67, 69]. Ayrıca, reaksiyonun sonraki aşamalarında oluşan çekirdekler, reaksiyonda mevcut olan daha büyük parçacıklara dahil olur. Stabilizör, polimerizasyon sırasında partikül oluşumunda önemli bir role sahiptir ve stabilizör yokluğunda kararlı partiküller oluşamaz [67]. Bu nedenle, stabilizör parçacık büyüklüğünü ve boyut dağılımını kontrol eder. Aynı zamanda eklenen başlatıcının yoğunluğu ve çeşidi, dağıtma fazının çeşidi ile polimerleşmede kullanılan sıcaklık ve karıştırma da parçacık büyüklüğünü ve boyut dağılımını etkileyen faktörler arasındadır [61].



Şekil 2.4. Dispersiyon Polimerizasyonu Şematik Gösterimi [62]

2.5.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

Çok basamaklı polimerizasyon protokolleri, fonksiyonel polimerik parçacıklar elde etme imkanı tanımaktadır. Fonksiyonel grupların hidrofobik polimerik parçacıkların yapısına girmesi için hidrofilik akrilat veya metakrilat bazlı monomerler daha çok tercih edilmektedir [71].



Şekil 2.5. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu [62]

İlk aşama, emülsiyon veya dispersiyon polimerizasyonu ile monomerlerden çıkış lateksi hazırlanmasıdır. İkinci aşamada, çıkış lateksi bir aktivatör (etilbenzen gibi) tarafından şişirilir. Şişmiş olan bu çıkış lateksi; fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı içeren organik bir karışım ile yeniden şişirilir ve son aşamada ise, şişmiş çıkış lateksi parçacıkları içindeki monomer fazının polimerizasyonu gerçekleştirilir. Yani, ısıyla aktiveleşen bir başlatıcının varlığında, karışım sıcaklığının yeterli miktarda yükseltilmesinden sonra şişmiş lateks partiküller içerisinde polimerizasyon gerçekleşir. Çok adımlı mikrosüspansiyon polimerizasyonu büyük, gözenekli ve tek parça polimerik parçacıklarla sonuçlanır [71].

Frechet ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma, çok adımlı mikrosüspansiyon polimerizasyonu için tipik bir örnektir [72]. Bu çalışmada, polistiren çıkış lateksi ilk olarak emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır, propargil akrilat ve EDMA

monomerleri ile şişirme aşamasından önce çıkış lateksi aktive etmek için dibutilftalat ile şişirilmiştir. Polimerizasyonun sonunda, 5 µm boyutunda monodispers fonksiyonel mikroküreler elde edilmiştir. Benzer bir polimerizasyon prosedürü ile, farklı işlevlere sahip polistiren parçacıkları da (karboksil, amin, amid, hidroksil, aldehit) elde edilmiştir [73].

Çok adımlı mikro-süspansiyonlu polimerizasyon bantları, farklı boyutlarda fonksiyonel monodispers gözenekli polimerik partiküller oluşturmak için emülsiyon/dispersiyon polimerizasyonlarının ve süspansiyon polimerizasyonunun avantajlarını bir araya getirmektedir [74].

2.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon sayesinde biyomoleküllerin yakalanması IMAC sorbentleri ile yapılmaktadır. Adsorpsiyon, katı veya sıvı formda kullanılabilen adsorplayan maddenin (adsorban, sorbent veya adsorbent), sınır yüzeyinde gerçekleşen derişim değişimi olarak tanımlanır [75].

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon mekanizmasının optimizasyonu ve adsorbent maddenin yüzey özellikleri ile farklı adsorbatlara karşı adsorplama kapasitesinin açıklanmasını sağlar [76, 77]. Adsorpsiyon izotermi, sabit sıcaklık altında, adsorplanan madde konsantrasyonu dengeye ulaştığında, birim adsorbanın adsorpladığı miktar (q_e) ile adsorbat maddenin denge konsantrasyonu (C_e) (ya da basıncı) arasındaki ilişkiyi belirtmektedir [76]. Q_e değerini hesaplamak için 2.1 denklemi kullanılır [77].

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (2.1)$$

Bu denklikte; q_e , denge konsantrasyonunda birim adsorbanın adsorpladığı miktar (mg/g); C_0 , adsorbatın başlangıç konsantrasyonu (mg/L); C_e , adsorbatın denge konsantrasyonu (mg/L); V , adsorbat çözeltisinin hacmi (L) ve m ise adsorbent miktarını belirtmektedir (g).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) uygulamalarında kullanılmak üzere monodispers-gözenekli TiO_2 mikroküre bazlı sorbent üretimi gerçekleştirilmiş ve protein adsorbsiyonu için kullanılabilirliği deneysel çalışmalarla incelenmiştir. İlk basamakta monodispers-gözenekli TiO_2 mikrokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle kalıp materyal olarak kullanılacak poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler sentezlenmiştir. Sol-jel kalıplama yöntemiyle de (öncül olarak TiCl_4 kullanılmış) TiO_2 mikroküreler elde edilmiştir. Daha sonra TiO_2 mikroküreler üzerine (3-glisidoksipropil)trimetoksisilan (GLYMO) ve iminodiasetikasit (IDA) bağlanmıştır. Son basamakta ise IDA-GLYMO bağlı TiO_2 mikroküreler üzerine Ni^{2+} iyonları immobilize edilmiştir. Elde edilen partiküllerin (Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2) karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM); ortalama boyut dağılımını ve yüzey morfolojisini belirlemede, Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı; özgül yüzey alanının belirlenmesinde, X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ise yapıdaki elementlerin tayininde kullanılmıştır. Sonraki aşamada ise geliştirilen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküre bazlı sorbentin protein izolasyonunda performansı, başlangıç protein konsantrasyonu ve sorbent miktarı değiştirilerek incelenmiştir. Çalışmanın son kısmında ise uygun koşullar belirlenerek insan tam kanından histidin içeriği yüksek protein izolasyonu sürekli mikroakış sisteminde yapılmıştır. İzole edilen proteinin görüntülenmesi amacıyla da Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Çıkış lateksinin (poli(glisidil metakrilat(GMA)) sentezi için monomer olarak kullanılan glisidil metakrilat ve stabilizör olarak kullanılan poli(vinil piroldon) (PVP K-30) Sigma-Aldrich Co., A.B.D. firmasından, metanolden kristalize edilen ve başlatıcı olarak kullanılan 2,2-azobisisobütironitril (AIBN) Across Organics, A.B.D. firmasından, dağıtma ortamı olarak kullanılan etanol ise Merck A.G. Darmstadt, Almanya firmasından temin edilmiştir. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen monodispers-gözenekli yapıdaki poli(3-kloro-2-hidroksi propil

metakrilat-ko-etilen glikol dimetakrilat) (poli(HPMA-Cl-co-EDMA)) mikrokürelerin sentezinde monomer olarak kullanılan 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl), çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EDMA), şişirme işleminde organik ajan olarak kullanılan etil benzen (EB), başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO), stabilizör olarak kullanılan polivinil alkol (PVA), yüzey aktif madde olarak kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) Sigma-Aldrich Co., A.B.D. firmasından temin edilmiştir. Partiküllerin yıkaması esnasında etanol (Et-OH) ve tetrahidrofuran (THF) (Merck A.G. Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. TiO_2 mikrokürelerin sentezi için titanyum tetraklorür ($TiCl_4$), setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ve amonyum hidroksit çözeltisi (NH_4OH) (Sigma-Aldrich Co., A.B.D.) kullanılmıştır. TiO_2 mikroküreleri türevlendirmek için kullanılan iminodiasetik asit (IDA), (3-glisidoksipropil)trimetoksisilan (GLYMO) Sigma-Aldrich Co.,USA firmasından, nikel(II) klorür ($NiCl_2$) ise Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, A.B.D. firmasından temin edilmiştir. Sentez ve yıkama aşamalarında kullanılan deiyonize su Direct-Q®3 UV System (Millipore S.A.S, Molsheim, Fransa) cihazından alınmıştır.

3.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografi (IMAC) Uygulamaları İçin Monodispers-Gözenekli TiO_2 Mikroküre Bazlı Sorbent Sentezi

3.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Çıkış Lateksinin (poli(GMA)) Sentezi

Monomer olarak GMA kullanılmış ve dispersiyon polimerizasyonu ile poli(GMA) lateks elde edilmiştir. İlk olarak cam pyrex T reaktör içerisine 30 ml saf etanol eklenmiş ve 0.45 g PVP K-30'un sonikasyon yardımıyla etanol içerisinde çözündürülmesiyle dağıtma ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra sırasıyla ortama 3 ml GMA ve 0.24 g AIBN eklenmiştir. Homojenizasyonu sağlamak için her adımda sonikasyon yapılmıştır. Ağzı sızdırmayacak şekilde kapatılan reaktör sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda (NÜVE ST 402) 120 cpm çalkalama hızında, 70 °C'de 24 saat süre ile karıştırılmıştır.

Polimerizasyon sonunda reaktör sıcaklığının oda koşullarına gelmesi beklenmiş ve ardından ürün santrifüj işlemiyle (Hettich Universal 320 R, Germany) çöktürülerek (2000 rpm, 3 dk) ortamdan dağıtıcı ortam ve diğer girdiler uzaklaştırılmıştır. Sonuç polimer lateks 2 kez etanol, 2 kez de distile suyla yıkanmış ve santrifüjlenmiştir (2000

rpm 3 dk). Yıkanan polimerik lateks saf su içerisinde dağıtılmış ve partiküllerin katı içeriği (g partikül/ ml su) gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Elde edilen çıkış lateksi gözeneksiz, eş boyutlu ve ortalama 2 µm boyutundadır.

3.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Kalıp Materyalinin (poli(HPMA-Cl-co-EDMA)) Sentezi

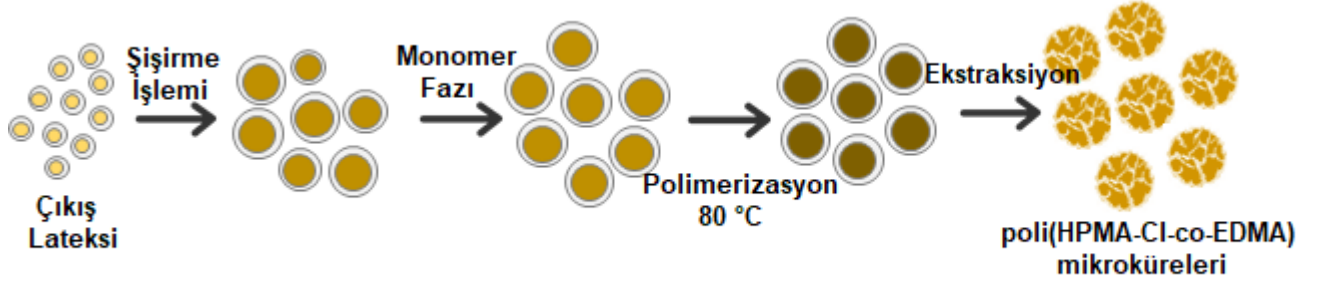
Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada poli(GMA) lateksinin şişirilme işlemi yapılmıştır. Bunun için öncelikle 0.125 g SDS 50 ml saf su içerisinde sonikasyon yardımıyla çözülmüştür. Sonrasında 2.5 ml EB (şişirme işlemi için) eklenmiş ve buz banyosunda 8 dk boyunca prob sonikatörde soniklenmiştir. Ortama 0.3 g poli(GMA) lateksi ilave edilmiş ve 4 dk daha prob sonikatörde tutulmuştur. Hazırlanan çözelti 350 rpm’de 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır.

İkinci aşamada ilk olarak 0.125 g SDS 50 ml saf su içerisinde sonikasyon yardımıyla çözülmüştür. Aynı bir şişede ise monomer faz hazırlamak için 0.3 g BPO 3.5 ml HPMA-Cl içinde sonikasyon yardımıyla çözülmüştür. Daha sonra ise 1.5 ml EDMA eklenmiş ve yine soniklenmiştir. Hazırlanan monomer faz SDS’li su ortamına eklenmiş ve yine buz banyosunda prob sonikatörde 12 dk boyunca soniklenmiştir. Elde edilen homojen çözelti ilk basamakta şişirilen poli(GMA) çözeltisine eklenmiş ve 24 saat boyunca manyetik karışmaya devam edilmiştir.

Üçüncü aşamada ise 48 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışan 0.8 g PVA 10 ml su çözeltisi 1. ve 2. basamakların karışımı olan dispersiyon fazına eklenmiş ve sonrasında 80 °C’de 24 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda 120 rpm karışma hızında karıştırılmıştır.

Polimerizasyon sonunda reaktör sıcaklığının oda koşullarına gelmesi beklenmiş ve safzılıklardan arındırılması için polimer 2 defa etanol, 2 defa THF, 2 kez etanol, 2 defa da distile su ile yıkanmış ve sentifüj yardımıyla (4000 rpm, 4 dk) çöktürülmüştür. Monodispersitenin sağlanması için ise ortamda istenmeyen çok büyük ve çok küçük partiküllerin ayrımı SDS-distile su kullanılarak farklı süre ve rpm değerlerinde (küçük partiküllerin ayrımı için 1000 rpm 3 dk, büyük partiküllerin ayrımı için ise 750 rpm 10

sn) santrifüj yardımıyla yapılmıştır. Ayrım işleminden sonra elde edilen partiküller 3-4 kez distile su ile yıkanır ve kuruması için etüve kaldırılır. Elde edilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri ortalama 5 µm boyutundadır. Polimerizasyon basamakları Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.

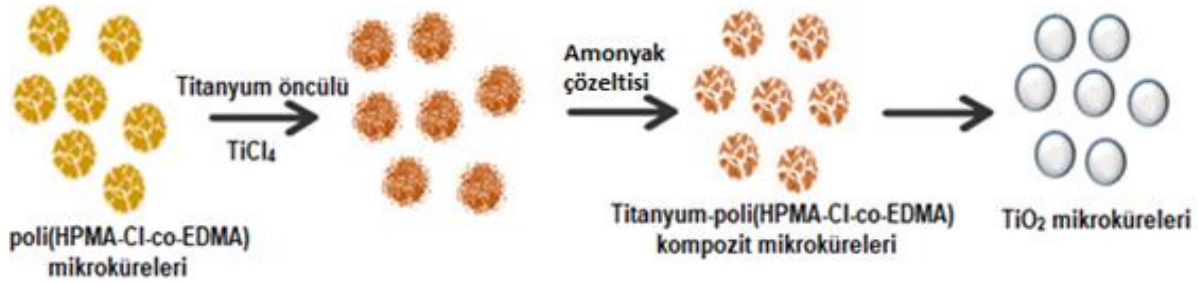


Şekil 3.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle poli(HPMA-Cl-co EDMA) mikrokürelerin sentezi [43].

3.2.3. Sol-Jel Kalıplama Yöntemi İle TiO₂ Mikrokürelerin Sentezi

Elde edilen monodispers poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler TiO₂ mikroküre sentezinde kalıp materyali olarak kullanılmıştır. İlk olarak hidroliz basamağı gerçekleştirilmiştir. Bunun için 60 ml, 0.1 M TiCl₄ 59.34 l distile su içerisinde sonikasyon yardımıyla dağıtılmış ve TiO₂.nH₂O nanopartiküllerin oluşumu sağlanmıştır. Ardından 0.4 g poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül ortama eklenerek nanopartiküllerin polimerik mikrokürelere adsorbe olabilmesi için ortam oda sıcaklığında 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. İkinci aşamaya geçmeden önce partiküller 2 kez distile su ile yıkanıp santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Kondenzasyon basamağında ise 0.3 g CTAB 55.65 ml distile su içerisinde sonikasyon yardımıyla çözündürülmüş, ve ortama 4,35 ml NH₃ çözeltisi eklenmiştir. İlk aşamadan alınan partiküller kondenzasyon basamağına eklenerek 6 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 6 saatlik süre sonunda partiküller 2-3 kez distile su ile yıkanıp santrifüj yardımıyla çöktürülür. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikrokürelerin TiO₂.nH₂O'u tam olarak adsorplayabilmesi için hidroliz ve kondenzasyon basamakları tekrarlanmıştır. İkinci kondenzasyon basamağı sonrası yıkanan partiküller kroze alınıp 70 °C'de etüve

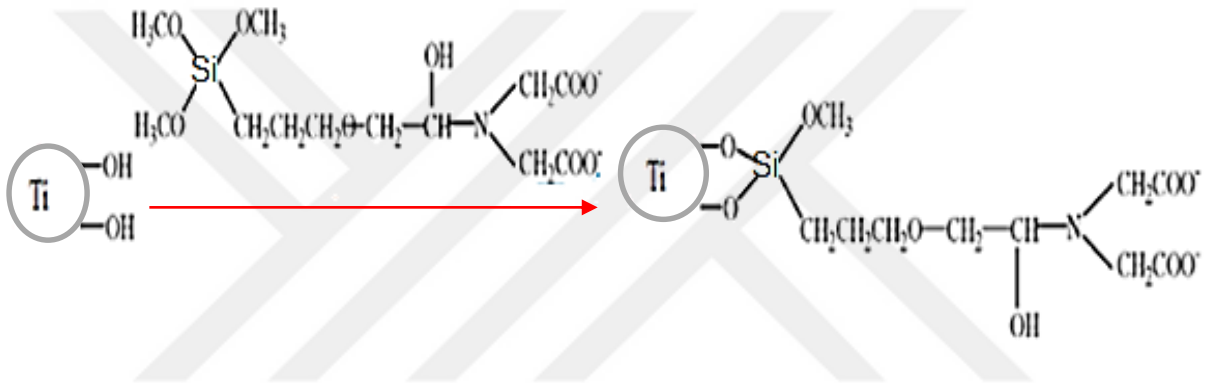
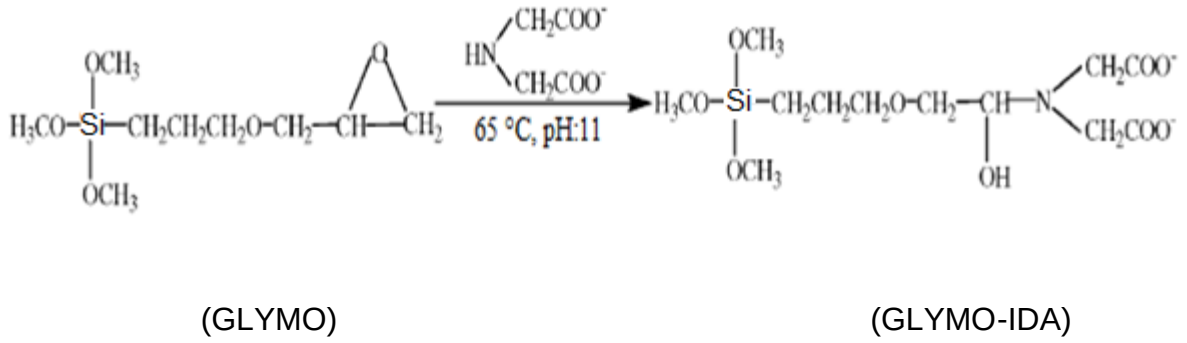
alınmıştır. Ortamdaki suyun tam olarak uzaklaştırılmasından sonra partiküller 450 °C'de 4.5 saat boyunca kalsinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Buradaki amaç polimerik zinciri kırarak ortamda sadece elde edilmek istenen TiO₂ mikrokürelerin kalmasını sağlamaktır. Elde edilen TiO₂ mikroküreler ortalama 3-5 µm boyut dağılımına sahiptirler. Sentez aşamaları Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Sol-Jel kalıplama yöntemiyle TiO₂ mikrokürelerin sentezi [43]

3.2.4. TiO₂ Mikroküreler üzerine IDA-GLYMO Bağlanması

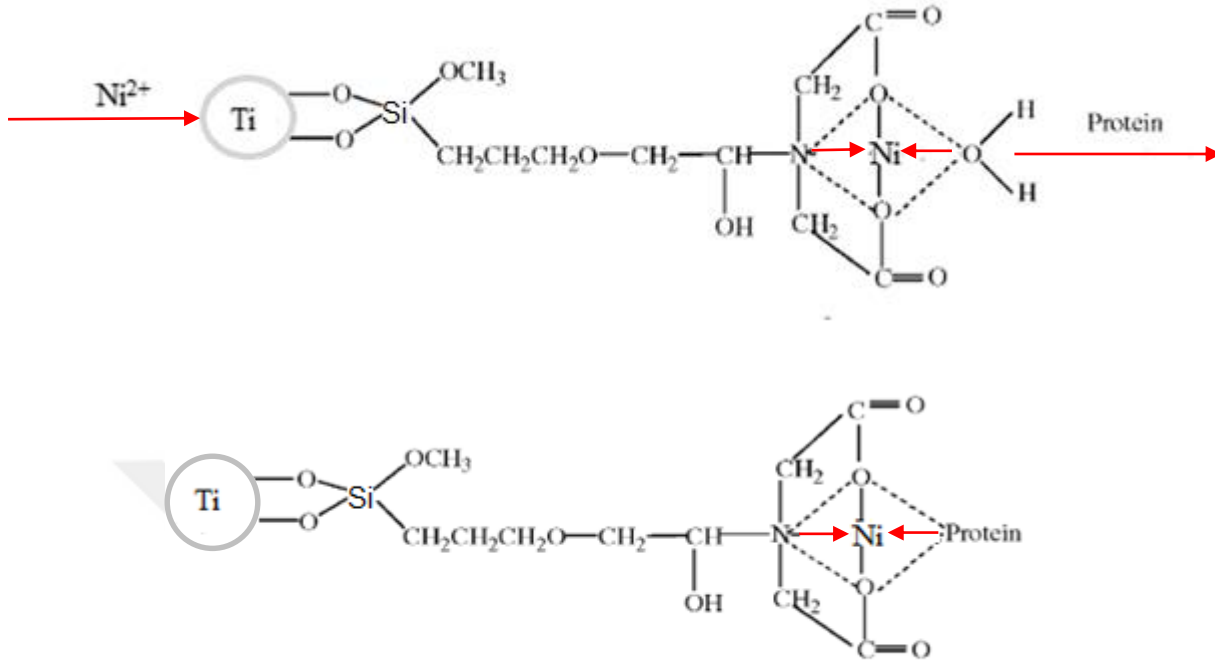
Kalsinasyondan çıkan TiO₂ mikroküreler üzerine IDA-GLYMO ligandı aşağıdaki yöntemle bağlanmıştır. Öncelikle 0.53 g IDA 10 ml distile su içerisinde çözündürülmüş ve 10 M'lık NaOH çözeltisi yardımıyla pH'ı 11 olacak şekilde ayarlanmıştır. Pyrex® reaktör içerisindeki çözelti buz banyosuna alınarak sıcaklığının 0°C'ye gelmesi beklenmiş ve ardından damla damla 0.4 ml GLYMO eklenerek, ortam manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözelti yağ banyosuna alınarak 65 °C'de 6 saat manyetik olarak karışması sağlanmıştır. Reaktörün oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve ardından tekrar buz banyosuna oturtularak sıcaklığın 0°C'ye düşmesi sağlanmıştır. Tekrar 0.4 ml GLYMO eklenmiş ve yine 65°C'de 6 saat manyetik karıştırılmıştır. Soğuması sağlanan çözelti safsızlıklarından arındırılması için süzgeç kağıdından geçirilmiştir. Ardından derişik HCl ile pH 3'e düşürülmüştür. Ortama 0.2 g TiO₂ mikroküreler eklenip dispers edilmiş ve dispersiyon 95 °C'de 2 saat manyetik karıştırılmıştır. Elde edilen IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküreler santrifüj yardımıyla çöktürölüp 3-4 kez distile su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.3. Titanyum mikroküreler üzerine IDA-GLYMO bağlanması [78]

3.2.5. IDA-GLYMO Bağlı TiO₂ Mikroküreler Üzerine Ni²⁺ İyonlarının İmmobilize Edilmesi

IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküreler üzerine Ni²⁺ immobilizasyonu yapılmıştır. Bunun için 100 mL 0.25 M NiCl₂ çözeltisi hazırlanmıştır ve çözelti içine 200 mg IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküre eklenmiştir. Karışım 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküreler santrifüj yardımıyla çöktürülmüş ve 3-4 kez distile su ile yıkanarak ortamdan serbest haldeki Ni²⁺ iyonlarının uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 3.4. Protein adsorpsiyonu için IDA-GLYMO Bağlı TiO₂ Mikroküreler Üzerine Ni²⁺ İyonlarının İmmobilizasyonu [78]

3.3. Monodispers-Gözenekli TiO₂ Mikroküre Bazlı Sorbentlerin Karakterizasyonu

3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Monodispers-gözenekli TiO₂ mikroküre bazlı sorbentlerin ortalama boyut dağılımını ve yüzey morfolojisini belirlemede Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, FEI, Quanta 200 FEG, ABD) kullanılmıştır. Analiz için su içerisinde dağıtılan mikroküreler örnek disk üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Görüntü alma esnasında iletkenliğin sağlanması için, görüntüleme işleminden önce kuruyan örnekler üzerine vakum ortamında ince bir tabaka halinde altın kaplaması yapılmıştır. Partiküller, 22300-25700X büyütme oranı ile Sem cihazında fotoğraflanmıştır. SEM cihazından görüntü alımı, Bilkent Üniversitesi UNAM'da Thermo Fisher Scientific, FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D. cihazında gerçekleştirilmiştir. Görüntüsü alınan mikrokürelerin ortalama boyut dağılımları 3.1 ve 3.2'de gösterilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (3.1)$$

$$CV = [(\sum N_i (D_i - D_n)^2 / [N_T - 1])^{1/2} / D_n] \times 100 \quad (3.2)$$

D_n : Sayıca ortalama çap değeri (μm),

N_i : D_i (μm) ap değerine sahip mikrokürelerin sayısı

N_T :Toplam mikroküre sayısı

3.3.2. Yüzey Alanı lm (BET)

Monodispers-gözenekli TiO_2 mikroküre bazlı sorbentlerin zgl yüzey alanının belirlenmesindeki yöntem, gözenekli mikroküreler üzerinden azot (N_2) gazı geçirilerek adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gaz basıncı kullanılarak hesaplanmasına dayanmaktadır. Bunun için öncelikle 0.1 g mikroküre örnek hücrelere yerleştirilmiştir ve sonrasında $90^\circ C$ 'de 6 saat vakumlandıktan sonra azot gazı geçirilmiştir. Yüzey alanı lm, Brunauer-Emmet-Teller, BET, Quantochrome, Nova 2200e cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. X-ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

XPS ölçümlerinde, malzemenin yüzeyi X-ışınlarının etkisi altında kalarak, bu malzeme yüzeyindeki atomlardan elektron sökülmesi sonucunda fotoelektronlar oluşturulmaktadır. Bu fotoelektronların elektron bağlanma enerjilerinin belirlenmesi için, elektron analizöründe ölçüm yapılır. Yapılan bu ölçüm sonucu ortaya çıkan bağlanma enerjileri; element türü, elektronun söküldüğü orbital, elementin kimyasal durumu gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik arz etmektedir. Bahsedilen bu sistem sayesinde; metallere ait olan oksidasyon düzeyleri belirlenebilmekte, ayrıca polimerlere ait organik, inorganik özellikler ile malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliği tayin edilebilmektedir. XPS yöntemi ile aynı zamanda ince filmlerin gerek nitelik gerekse nicelik açısından tayininin gerçekleşmesi sağlanabilmektedir [79]. XPS lmleri, Bilkent Üniversitesi UNAM'da Thermo Scientific™ K-Alpha™ XPS spectrometer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kesikli Sistemde Protein İzolasyonu

Bovin hemoglobin (BHb) ve bovin serum albumin (BSA) proteinlerinin izolasyonu, elde edilen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürenin adsorpsiyon ve desorpsiyon deneylerinde

kullanılmasıyla yapılmıştır. Geliştirilen sorbent, aynı zamanda kesikli ve sürekli formdaki mikro-immobilize metal afinite kromatografisi sistemlerinde insan tam kanından hemoglobin izolasyonu için kullanılmıştır.

3.4.1. Materyal

Adsorpsiyon ve desorpsiyon deneylerinde kullanılan bovin hemoglobin (BHb) ve bovin serum albumin (BSA) proteinleri, adsorpsiyon tampon çözeltisi (25mM) hazırlanırken kullanılan fosfat tampon tuzu (PBS, pH 7.4), tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.5) için kullanılan hidroklorik asit (HCl) ve tris(hidroksimetil)aminometan Sigma-Aldrich Co., A.B.D. firmasından temin edilmiştir. Desorpsiyon tampon çözeltisi (100 mM, pH 7) hazırlanırken kullanılan disodyum fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) Merck, Darmstadt, *Almanya firmasından*, monosodyum fosfat (NaH_2PO_4) ve sodyum klorür (NaCl) Riedel-de Haen, Almanya firmasından, imidazol (1,3-diaza-2,4-siklopentadien) ise Sigma-Aldrich Co., A.B.D. firmasından temin edilmiştir. İnsan tam kanı örneği ise European Commision Community Bureau of Reference'den BCR Reference Material No.634 olarak temin edilmiştir. SDS-PAGE Elektroforezi için ise Image Lab. 5.1 Biorad cihazı kullanılmıştır.

3.4.2. Kesikli Sistemde Sorbent Miktarı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

Sentezi yapılan Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürenin protein izolasyon kapasitesini belirlemek amacıyla ilk olarak sorbent miktarı değişiminin etkisi incelenmiştir. Adsorpsiyon tampon çözeltisi olarak pH 7.4 değerinde 25 mM'lık PBS kullanılmıştır. Öncelikle 5 farklı sorbent miktarı (1, 2, 5, 10 ve 20 mg) seçilerek, sorbent ependorf tüplere alınmış ve safsızlıklardan arındırmak amacıyla 5 kez adsorbsiyon tampon çözeltisiyle yıkanıp santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür (14000 rpm, 8 dk). 2 mg/ml'lik başlangıç protein konsantrasyonunda (A_0) 8 ml'lik mobil faz hazırlanmıştır. Bunun için 16 mg BHb/BSA tartılmış ve 8 ml adsorpsiyon tampon çözeltisi içerisinde sonikasyon yardımıyla çözülmüştür. Adsorpsiyon hacmi 1 ml olarak belirlenmiştir ve adsorpsiyon tamponundan 1'er ml sorbentlerin üzerine pipet yardımıyla eklenmiştir. Dispersiyonlar vorteks cihazı yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra rotatorda 2 saat boyunca 40 rpm'de döndürülmeye bırakılmış ve BHb/BSA'nın sorbent üzerine adsorpsiyonu sağlanmıştır. 2 saatlik süre sonunda partiküller çöktürülmüş ve süpernatantlar (A_1

değerleri) ultraviyole/görünür spektrofotometre cihazında (Biodrop Duo, İngiltere) ölçüm yapılmak üzere ayrı ependorflara alınmıştır. BHb için Biodrop cihazında absorbans ölçümleri 406 nm'de, BSA için ise 280 nm'de yapılmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi değeri Q (mg adsorplanan protein/g partikül) hesaplanmış ve Q değerlerine karşı sorbent miktarı değerleri grafiği çizilmiştir. Q değerleri 3.3'de gösterilen formülasyona göre hesaplanmıştır.

$$Q = \frac{\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times C \times V}{m} \quad (3.3)$$

Q : Denge adsorpsiyon kapasitesi (mg protein g⁻¹ partikül)

A₀ : Protein çözeltisinin ilk (adsorpsiyon öncesi) absorbans değeri

A₁ : Protein çözeltisinin sonraki (adsorpsiyon sonrası) absorbans değeri

C : Protein başlangıç konsantrasyonu (mg/ml)

V : Protein çözeltisi hacmi (ml)

m : Sorbent miktarı (mg)

Desorpsiyon işlemi için ise pH 7 değerinde 100 mM'lık tampon çözeltisi disodyum fosfat (Na₂HPO₄.12H₂O), monosodyum fosfat (NaH₂PO₄), sodyum klorür (NaCl) ve imidazol kullanılarak hazırlanmıştır. Adsorpsiyon işleminden sonra alınan 5 farklı miktardaki sorbentin üzerlerine yine 1'er ml desorpsiyon tampon çözeltisinden eklenmiş ve rotator'da 1 saat süreyle dönmeye bırakılmıştır. 1 saatlik süre sonunda partiküller çöktürülmüş ve süpernatant ölçüm yapılmak üzere ayrı ependorfa alınmıştır. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanmış ve yine süpernatant ölçüm yapılmak üzere ayrı ependorfa alınmıştır. Ardından iki desorpsiyon çözeltisi için biodrop cihazında gerekli absorbans ölçümü yapılmıştır. Okunan absorbans değerleri kullanılarak desorbe olan protein miktarı kalibrasyon eğrisi yardımıyla belirlenmiştir. Desorpsiyon verimini bulmak için ise 3.4.'teki formülasyon kullanılmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorplanan protein kapasitesi (Q}_{des.})}{\text{Adsorplanan protein kapasitesi (Q}_{ads.})} \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.3. Kesikli Sistemde Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

İkinci aşamada ise protein konsantrasyonu değişiminin sentezlenen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürenin protein izolasyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Kullanılan adsorpsiyon ve desorpsiyon tampon çözeltileri ilk aşamadakiyle aynıdır. Burada ise 10 mg sabit sorbent miktarı belirlenmiş ve 6 farklı protein konsantrasyon değeri (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/ml) kullanılmıştır. Ependorf tüplere 10'ar mg sorbent ve farklı protein konsantrasyonlarda adsorpsiyon ortamı pipet yardımıyla 1'er ml eklenmiştir. Yine 2 saatlik adsorbsiyon aşamasından sonra partiküller çöktürölüp süpernatantlar ayrı ependorf tüplere alınmıştır. Sonrasında 2 kez desorpsiyon işlemi yapılmıştır. Biodrop cihazında gerekli ölçümler yapılarak denge protein adsorpsiyon değerlerine karşılık protein konsantrasyon değerleri grafiği çizilmiş ve yüzde desorpsiyon verimleri hesaplanmıştır.

3.4.4. Tekrar Kullanılabilirlik

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen sorbentin tekrar tekrar kullanılabilirliğinin ölçümü açısından, arka arkaya 5 kez adsorpsiyon ve 5 kez desorpsiyon deneyi yapılmıştır. Geliştirilen sorbentin rejenerasyonu için, sorbent ilk olarak 50 mM EDTA çözeltisi ile 30 dakika boyunca yıkanarak yapıdan Ni^{2+} 'nin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından sorbent su ile yıkanmış ve daha sonra yapıya tekrar Ni^{2+} 'nin immobilize edilmesi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada sorbent, adsorpsiyon ortamı ile 5 kez yıkanmış ve adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Deneyler neticesinde yine Biodrop cihazında ölçüm yapılmış olup, bu ölçüme göre denge protein adsorpsiyonu (mg hemoglobin/g sorbent) değerleri hesaplanmıştır.

3.5. Kesikli ve Sürekli Mikroakış Sisteminde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu

3.5.1 Kesikli Sistemde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu

10 mg Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküre ependorf tüpe konulmuş olup, 5 kez pH 8.5 10 mM Tris-HCl tampon çözeltisiyle safsızlıklarından arınması için yıkanmış ve santrifüjde çöktürülmüştür (14000 rpm 8 dk). Aynı zamanda, 100 µl insan tam kan

örneğine karşılık 9900 ml Tris HCl tampon çözelti eklenerek insan tam kan örneği 1:100 oranında seyreltilmiştir. Hazırlanmış olan bu çözeltiden 1 ml alınarak, mikroküre üzerine eklenmiş ve 2 saat rotatorda adsorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. 2 saatlik adsorpsiyon işleminden sonra yine santrifüjde çöktürölüp, üst sıvı faz kısmı ayrı bir ependorf tüpe alınmıştır. Mikroküre üzerine, hazırlanmış olan 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol desorpsiyon tampon çözeltisi eklenmiş ve benzer şekilde 1 saat boyunca desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, yine santrifüjle çöktürölümüş ve üst faz ayrı bir ependorfa alınmıştır. Adsorpsiyon ve desorpsiyon üst fazları biodrop cihazında okunmuştur.

3.5.2 Sürekli Sistemde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu

Bu aşamada ise sentezlenen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürenin kapiler silika kolona doldurulması (300 µm id x 50 mm) ve insan tam kan örneğinden hemoglobin izolasyonu amaçlanmıştır.

3.5.2.1. Sürekli Mikroakış Sistemi Özellikleri ve TiO₂ Bazlı Mikrokürelerle Dolgulanması

Sentezlenen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ partikülünün silika kapiler kolona doldurulması işlemi silika kapiler kolonun (500 mm uzunluk, 300 µm iç çap, 460 µm dış çap) HPLC pompasına monte edilmesi ile yapılmıştır. Silika kapilere distile su içerisinde dağıtılmış partiküller şırınga yardımıyla doldurulmuş ve kapiler kolon mikro-HPLC pompasına (DioneUltimate3000, ABD) bağlanmıştır. Mikro-HPLC pompası yardımıyla 1 gün boyunca partiküllerin silika kapiler içerisinde iyice sıkışması sağlanmıştır. Dolum işleminden sonra kapiler kolondan 50'er mm'lik kesitler alınarak sürekli mikroakış sisteminde (Şekil 3.3) adsorpsiyon ve desorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır.



Şekil 3.5. İnsan tam kan örneğinden Hb izolasyonu yapılan sürekli mikroakış sistemi

Sistem, enjeksiyon pompası, adsorpsiyon ve desorpsiyon çözeltilerini kolona göndermek amacıyla kullanılan insülin enjektörü ve enjektör ucuna bağlı mikrokolondan oluşmaktadır. Ayrıca adsorpsiyon ve desorpsiyon çözeltilerinin kolon içerisinde geçerken sistemin sabit kalabilmesi amacıyla ortalama 0.5 mm çapında paslanmaz çelik frit uçlar kullanılmıştır.

3.5.2.2. Sürekli Mikroakış Sisteminde Hb İzolasyonu

Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 partiküler ile doldurulan kapiler kolon, protein izolasyonu işlemi öncesinde pH 8.5 değerindeki Tris-HCl tampon çözeltisi ile 3 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızıyla 2 saat süreyle yıkanmıştır. Bu esnada 100 μl insan tam kan örneği 100 kat Tris-HCl tampon çözeltisi ile seyreltilmiş ve bir stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden belirli bir hacimde insülin enjektörü yardımıyla alınarak, enjeksiyon pompası ile kolona akışı (3 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızıyla) sağlanmış ve böylelikle insan tam kan örneğinden Hb adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Akış süresince frit ucunda damlalar halinde akmaya başlayan çözelti ependorf tüplere pipet yardımıyla toplanmıştır. Adsorbsiyon işleminden sonra desorpsiyon aşamasına geçilmiştir. Bu kez insülin enjektörü ile desorpsiyon tampon çözeltisi alınmış ve yine kolona akışı enjeksiyon pompası ile sağlanmıştır. Benzer şekilde frit ucunda biriken damlalar halindeki çözelti ependorf tüplere toplanmış ve Biodrop cihazında gerekli absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez tekniği, yüklü olan moleküllerin, elektriksel alandaki ayrılmasına dayanmaktadır. Bu teknik, gerek proteinlerin analizi gerekse proteinlerin ayrılmasında sıkça kullanılmaktadır. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sayesinde, protein büyüklüğü ve proteine ait alt birimlerin nitelikleri teşhis edilebilmektedir. Bir protein, içeriğindeki amino asitler baz alındığında genel olarak net bir artı veya net bir eksi yüke haizdir. Dolayısıyla, elektriksel alan protein molekülünü ihtiva eden bir çözeltiye uygulandığında, bu proteinin hareket etmesi sağlanmış olur. Bu hareket, o proteine ait olan net yüke, büyüklüğe ve biçime göre değişmekte olup, sayılan bu parametrelere bağlı olarak protein belli bir hız ile hareket etmiş olmaktadır. Bu açıdan, SDS-PAGE tekniğinin geliştirilmesi rutin protein analizinde oldukça önem arz etmektedir [80].

Bu teknikte, proteinler güçlü eksi yük taşıyan SDS ihtiva eden bir çözelti içerisinde bulunmaktadır. Çözelti içerisinde bulunan SDS, proteinlere ait hidrofobik olan kısımlara bağlanır. Bu durum; proteine ait yapının açılması, bağlı olan proteinlerin birbirlerinden veya lipid moleküllerinden ayrılması ve çözelti içerisinde serbest halde yüzer halde kalması gibi durumlara sebep olmaktadır. Aynı zamanda, proteinlerde bulunan S-S bağlarını kırmak amacı ile beta-merkaptetanol şeklinde bir indirgeyici ajan kullanıldığında, polipeptitlerin ayrı ayrı şekilde analizi de mümkün olmaktadır. Bu durum, her bir protein molekülünün çok fazla sayıda eksi yüklü SDS molekülünü bağlaması ile olmaktadır. Bu şekildeki bağlanma ile, SDS'in gerçek yükü örtülmüş olmakta ve voltaj uygulandığında ise artı elektroda doğru ilerlemesi sağlanmaktadır. Büyüklüğü aynı olan protein molekülleri, mevcut jel içerisinde eşit hızla hareket eder. Bu durumun sebepleri, doğal yapıları SDS yüzünden bozulup açıldığından hepsinin aynı şekilde olması ve SDS bağlamalarının eşit olmasından dolayı, hepsinin aynı eksi yüke sahip olmasıdır. Daha fazla yük bulunduran büyük proteinler, elektriksel kuvvet açısından da daha büyük etkide kalırlar ve böylelikle bu proteinlerin daha hızlı ilerlemeleri gerekir. Yukarıda bahsedilen çözeltideki bu etki birbirini dengelemektedir. Poliakrilamit jel içerisinde büyük proteinler ilerlerken, küçük proteinlere göre çok daha fazla zorlanmakta olup, bu durum proteinlerin molekül ağırlıklarına göre protein bantlarına ayrılmasını sağlamakta ya da başka bir deyişle proteinlerin kompleks bir

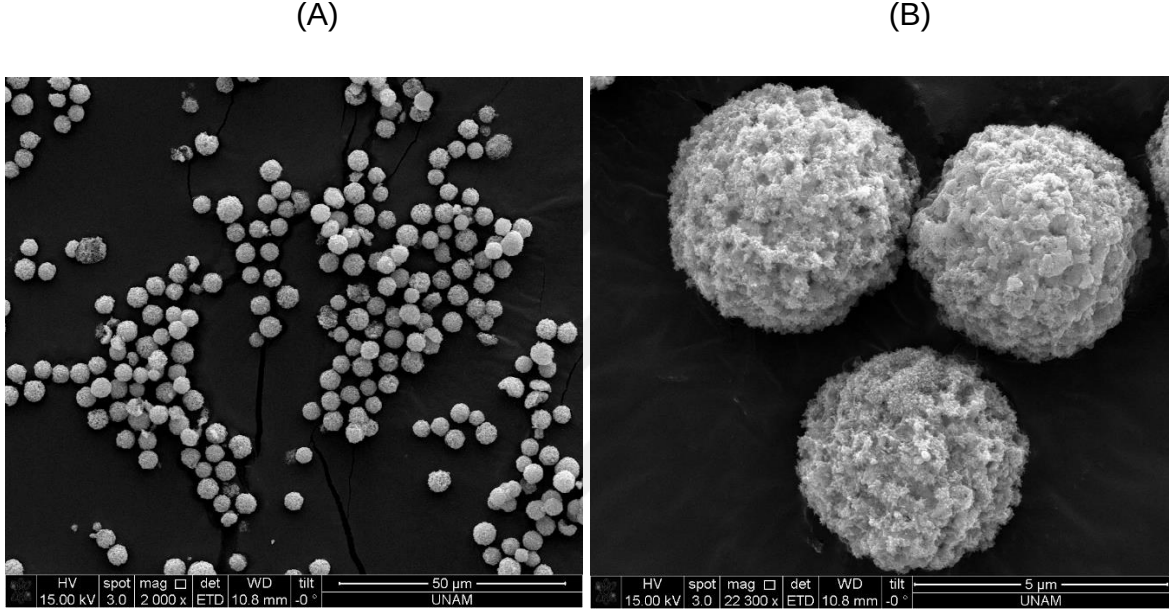
protein karışımından molekül ağırlıklarındaki farklılıklara göre ayrılmasına yardımcı olmaktadır [80].

Yapılan çalışmada, jel elektroforezi, insan tam kanındaki proteinin tanınması ve ayrılması için kullanılmıştır. Proteinlerin, çok sayıda çapraz bağ içeren poliakrilamid jel içerisinde hareket etmesi sağlanmıştır. Bu jel, monomerin polimerleşmesi ile hazırlanmış olup, istenen proteinin ilerlemesini geciktirecek ölçüde küçük gözenek boyutu şeklinde ayarlaması yapılmıştır. Yükleme kuyularının oluşması için uygun tarak yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Katılaştıran jel, tarak çıkarıldıktan sonra, elektroforez haznesine yerleştirilmiştir (Bio-Rad Mini Protean 3 System). Hazırlanan örnekler ise, 95°C'de kaynatılmış olup, 10 µg'ı geçmeyecek şekilde kuyulara yüklenmiştir. Jel üzerinde, 100 Volt'da 100 dk yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemini takiben, jel aparattan ayrılarak, Coomassie Blue boyası ile boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, protein bantları net bir şekilde görünür hale kadar su ile yıkamaya devam edilmiştir. Bu işlemden sonra görüntüleme cihazı (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager) ile jel görüntüsü elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Monodispers-Gözenekli TiO₂ Mikrokürelerin Karakterizasyonu

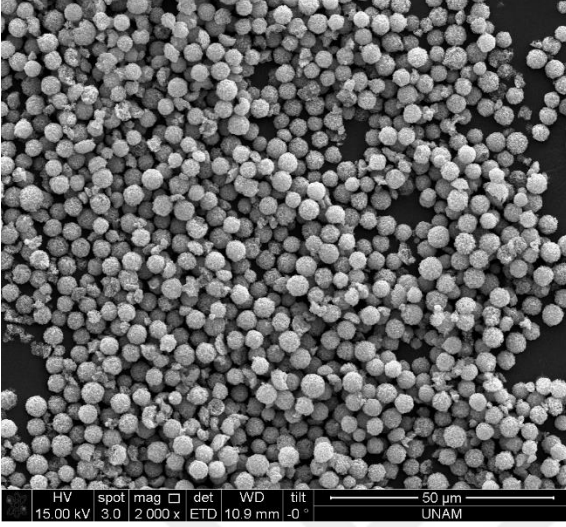
Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler kullanılarak sol-jel kalıplama yöntemiyle sentezlenen monodispers-gözenekli TiO₂ mikrokürelerin ortalama boyut dağılımını ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.1’de verilmiştir.



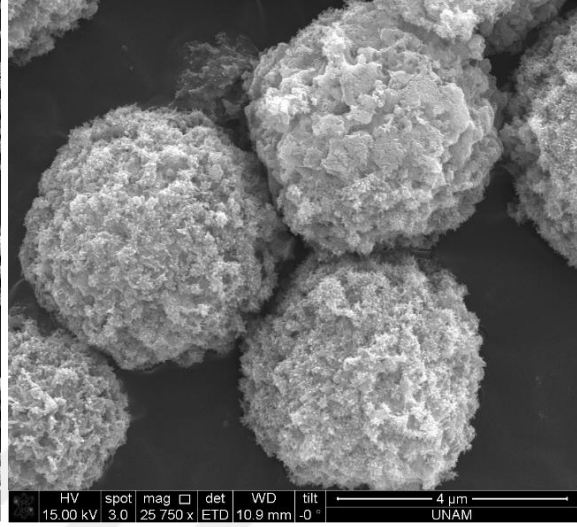
Şekil 4.1. TiO₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (A) 2000 X, (B) 22300 X

Monodispers-gözenekli TiO₂ mikrokürelerin üzerine IDA-GLYMO ligandının bağlanması ile elde edilen IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin ortalama boyut dağılımını ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.2.’de verilmiştir.

(C)



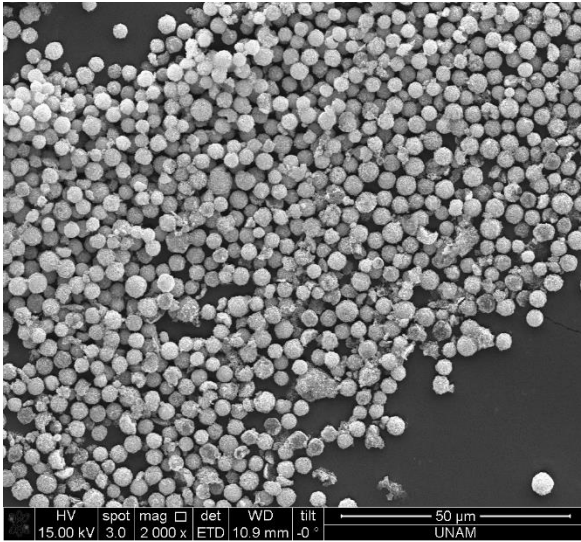
(D)



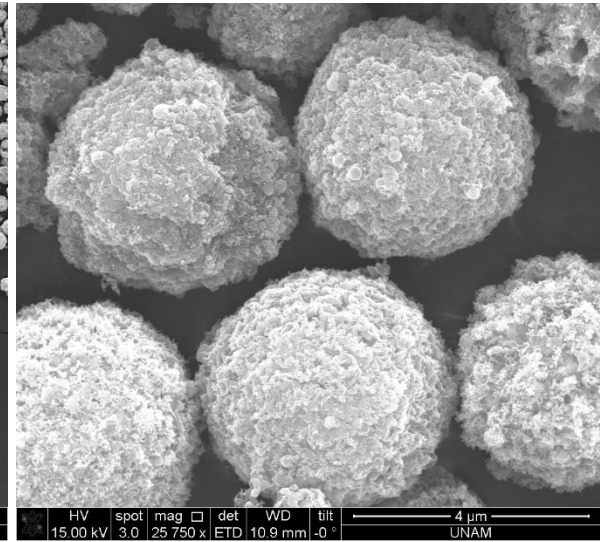
Şekil 4.2. IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (C) 2000 X, (D) 25750 X

IDA-GLYMO bağlanmış TiO₂ mikropartiküllerinin üzerine Ni²⁺ iyonlarının immobilize edilmesiyle elde edilen Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin ortalama boyut dağılımını ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları ise Şekil 4.3.'te verilmiştir.

(E)



(F)



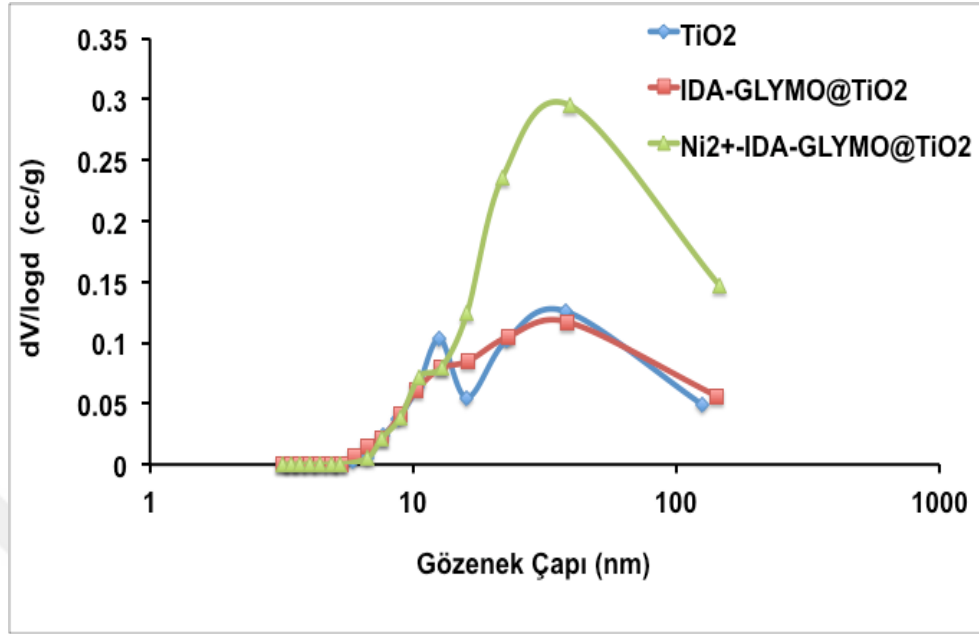
Şekil 4.3. Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerinin SEM fotoğrafları. Büyütme Oranı: (E) 2000 X, (F) 25750 X

Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te SEM fotoğrafları verilen TiO_2 bazlı mikrokürelerin yüzey morfolojileri benzerdir. Partiküllere ait ortalama çap (D_p), değişim katsayısı (C_v) ve özgül yüzey alanı (SSA) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Buna göre sırasıyla IDA-GLYMO ligandı ve Ni^{2+} iyonları, TiO_2 mikroküreler üzerine bağlandıkça özgül yüzey alanı değerinde azalma gözlenmiştir. Monodispersite için ideal C_v değeri %5'ten küçük olmalıdır [81]. Buna göre sentezlenen mikrokürelerin dar boyut dağılımına sahip, eş boyutlu ve monodispersiteye uygun olduğu görülmüştür. Mikrokürelerin BET analiz sonuçlarından elde edilen ortalama çap değerlerinden ise mezogözenekli yapıda oldukları anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1. Sentezlenen TiO_2 bazlı mikrokürelere ait morfolojik özellikler

Partikül	D_p (μm)	C_v (%)	SSA (m^2/g)
TiO_2	4.14	4.25	31.81
IDA-GLYMO@ TiO_2	4.23	4.20	25.33
Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2	4.18	4.29	24.69

Şekil 4.4' te TiO_2 , IDA-GLYMO@ TiO_2 ve Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerin gözenek boy dağılım eğrisi gösterilmektedir. Şekil 4.4' te sentezlenen mikrokürelerde mezogözenek ve makrogözenek yapılarının varlığı görülmektedir. Bu mikroküreler için elde edilen yüzey alanı değerleri de elde edilen gözenek dağılım eğrileri ile uyumludur.



Şekil 4.4. TiO_2 , IDA-GLYMO@TiO_2 ve $\text{Ni}^{2+}\text{-IDA-GLYMO@TiO}_2$ mikrokürelerin azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri.

TiO_2 , IDA-GLYMO@TiO_2 ve $\text{Ni}^{2+}\text{-IDA-GLYMO@TiO}_2$ mikroküreler ile elde edilen X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) sonuçları, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu sonuçlar, IDA-GLYMO@TiO_2 ve $\text{Ni}^{2+}\text{-IDA-GLYMO@TiO}_2$ mikrokürelerin yüzeyinde sırasıyla azotun ve nikelin varlığını göstermiştir.

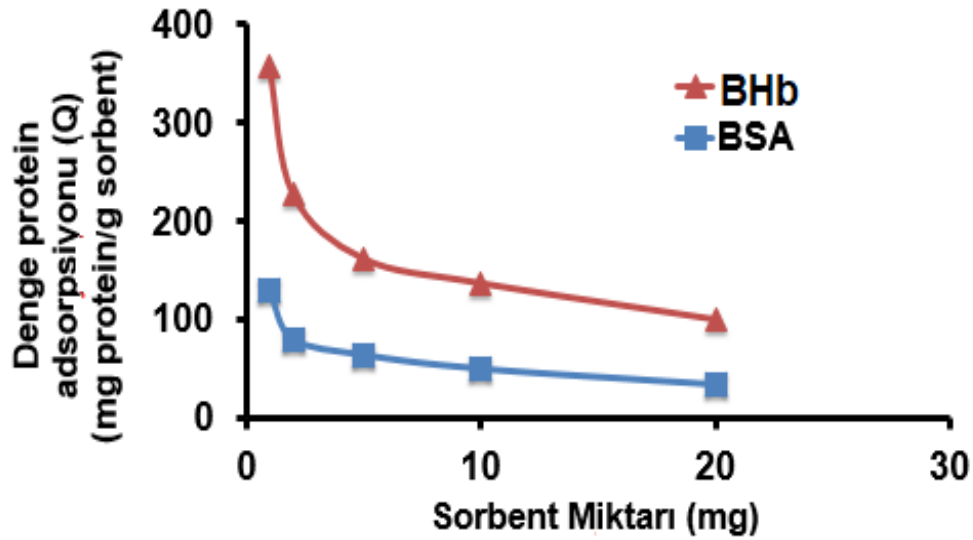
Çizelge 4.2. Sentezlenen TiO_2 , IDA-GLYMO@TiO_2 ve $\text{Ni}^{2+}\text{-IDA-GLYMO@TiO}_2$ mikrokürelere ait XPS sonuçları

Mikroküre	% Atom					
	Si	C	N	Ti	O	Ni
TiO_2	-----	21.24	-----	25.80	52.97	-----
IDA-GLYMO@TiO_2	1.92	27.18	1.85	19.33	49.72	-----
$\text{Ni}^{2+}\text{-IDA-GLYMO@TiO}_2$	1.11	19.92	1.22	18.82	53.63	5.29

4.2. Monodispers-Gözenekli TiO₂ Mikroküreler Yardımıyla Kesikli Sistemde Protein İzolasyonu

4.2.1. Sorbent Miktarı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

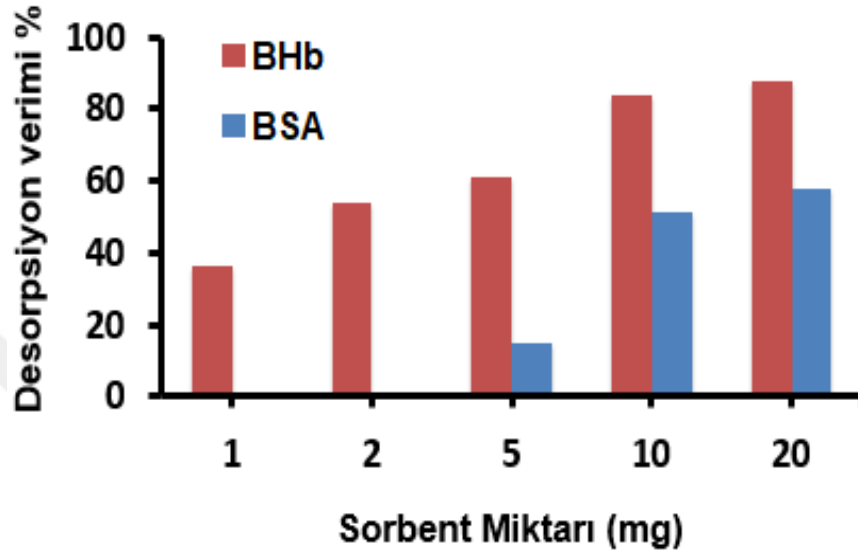
Sorbent olarak sentezlenen Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerden farklı miktarlarda alınarak, başlangıç protein konsantrasyonu sabit tutulmuş ve adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu değerlerin protein izolasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.5.'te sonuçlar verilmiştir. Bu deneylerde BHb ve BSA başlangıç konsantrasyon değerleri 2 mg/ml, adsorpsiyon hacmi 1 ml olarak belirlenmiş ve 1, 2, 5, 10 ve 20 mg sorbent miktarları adsorbsiyon ortamına eklenmiştir.



Şekil 4.5. Kesikli sistemde Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda sorbent miktarının protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Protein konsantrasyonu: 2 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.5.'te sorbent miktarının artması ile azalan bir denge adsorpsiyon davranışı gözlenmektedir. Artan sorbent miktarı ile birim sorbentin dengede adsorpladığı protein miktarı ters orantılı olarak azalmıştır. Maksimum denge adsorpsiyonuna 1 mg sorbent ortamında ulaşılırken, minimum denge adsorpsiyonu 20 mg sorbent ile elde edilmiştir.

Protein izolasyonunun verimli olabilmesi için adsorplanan proteinin ne kadarının desorplandığı önemlidir. Şekil 4.6'da ise farklı miktarlardaki Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerinin desorpsiyon verimine etkisi verilmiştir.

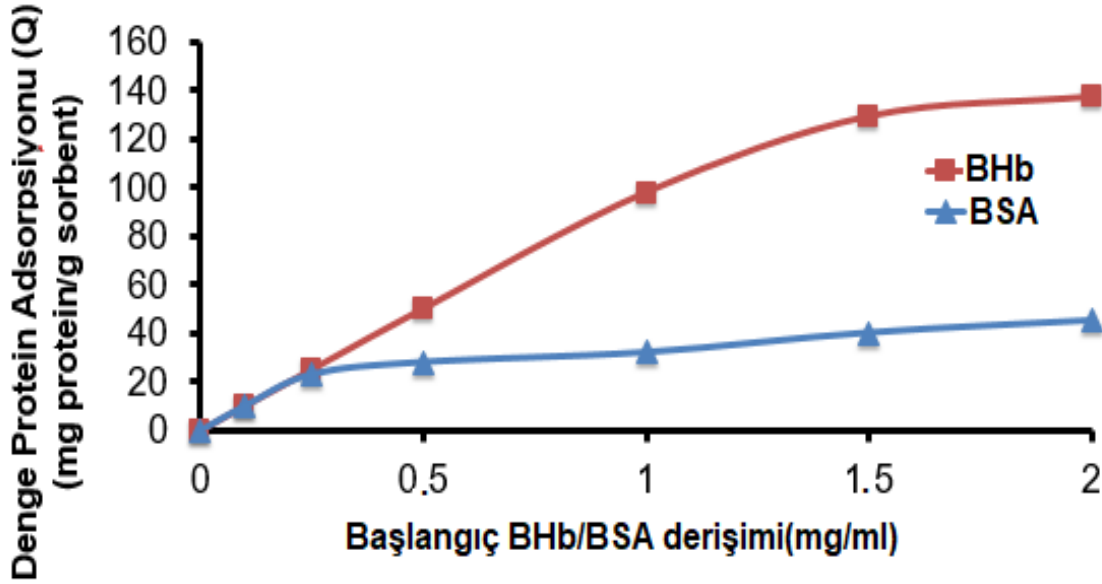


Şekil 4.6. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerinin sorbent olarak kullanıldığı durumda sorbent miktarının desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Protein konsantrasyonu: 2 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat).

Şekil 4.6'da desorpsiyon verimlerinin sorbent miktarı ile arttığı görülmüştür. Sorbent miktarının artışı ile dengede adsorplanan protein miktarı azalmaktadır. Adsorplanan protein miktarındaki azalma, desorpsiyon verimi ile denge protein adsorpsiyonunun ters orantılı olduğunu göstermektedir. Düşük miktarlarda sorbent ile elde edilen düşük desorpsiyon verimleri, protein/sorbent ağırlık oranı arttığında protein ve sorbent arasında tersinir ve spesifik olmayan etkileşimlerin oluşmasına bağlanabilir. Özellikle BSA ile elde edilen bağıl olarak düşük adsorpsiyon verimleri, bu protein için bu tür etkileşimlerin daha baskın olduğunu düşündürmektedir. BHB adsorpsiyonunun ağırlıklı olarak Ni^{2+} -histidin grupları arasındaki tersinir etkileşime dayalı olarak gerçekleşmesi, BHB ile elde edilen daha yüksek desorpsiyon verimlerini açıklayabilen en önemli faktördür.

4.2.2. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

Sorbent olarak sentezlenen Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerinden sabit miktarda alınarak, başlangıç protein konsantrasyonu farklı değerlerde hazırlanmış ve adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu değerlerin protein izolasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.7’de sonuçlar verilmiştir. Sorbent miktarı 10 mg, BHb ve BSA protein konsantrasyon değerleri 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/ml, adsorpsiyon hacmi ise 1 ml olarak belirlenmiştir.

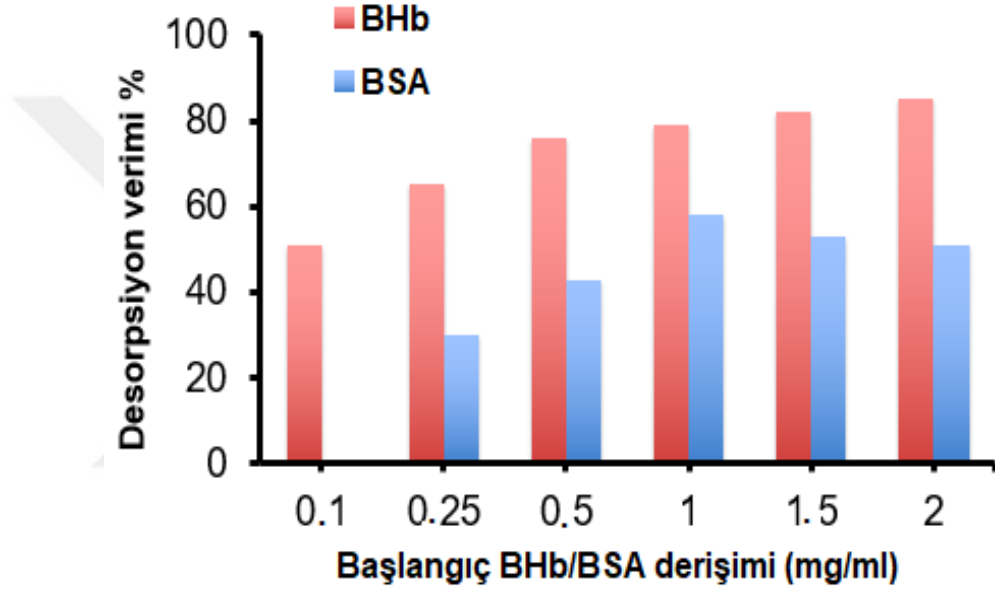


Şekil 4.7. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.7’de de görüldüğü gibi BHb ve BSA başlangıç protein konsantrasyonu arttıkça birim sorbent miktarı başına denge protein adsorpsiyonu artmakta ve belli bir değerden sonra platoya ulaşmaktadır. Şekil 4.7’de her iki protein için elde edilen plato denge adsorpsiyonu değerinin histidin içeriği yüksek olan BHb lehine yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküreler üzerine protein

adsorpsiyonunun ağırlıklı olarak metal iyonları ile histidin arasındaki tersinir etkileşimle gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Şekil 4.8’de sabit sorbent miktarında değişen başlangıç protein konsantrasyonu miktarının desorpsiyon verimine etkisi incelenmiştir.



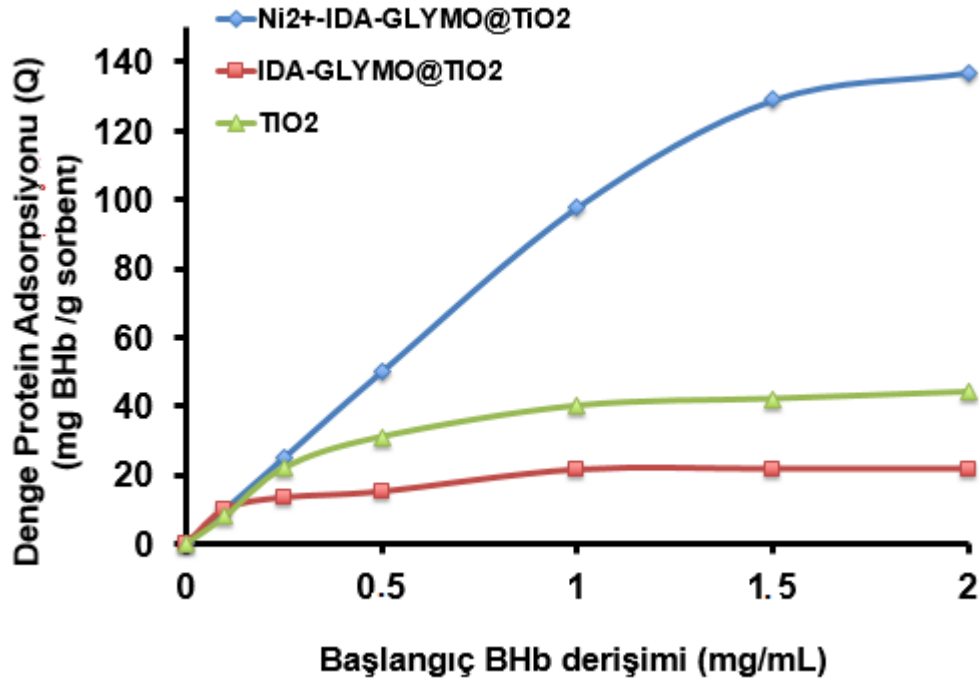
Şekil 4.8. Kesikli sistemde Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikropartiküllerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat)

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi maksimum desorpsiyon verimi 2 mg/mL protein konsantrasyonu ile sağlanmıştır. 2 mg/ml konsantrasyonunda mikroküreler daha fazla protein adsorpladığı için daha fazla da desorplama özelliği göstermişlerdir. Proteinler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 2 mg/ml protein konsantrasyonu için adsorplama ve desorplama kapasitesi BHB > BSA şeklindedir. Bu durum proteinlerin özellikleri açısından beklenen bir durumdur. Adsorplama kapasitesinin BHB’de daha yüksek olması daha önce de belirtildiği gibi bu proteinin histidin içeriği ile ilgilidir. Desorpsiyon veriminin artan başlangıç protein konsantrasyonu ile artması ise

adsorpsiyon başlangıcında ortamdaki protein derişiminin daha fazla olması sebebiyle birim sorbent üzerinde daha fazla proteinin tutunması ve buna bağlı olarak daha fazla proteinin desorbe olması ile açıklanabilir.

4.2.3. Mikroküre Türünün Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişimi İle Protein İzolasyonu Üzerindeki Etkisi

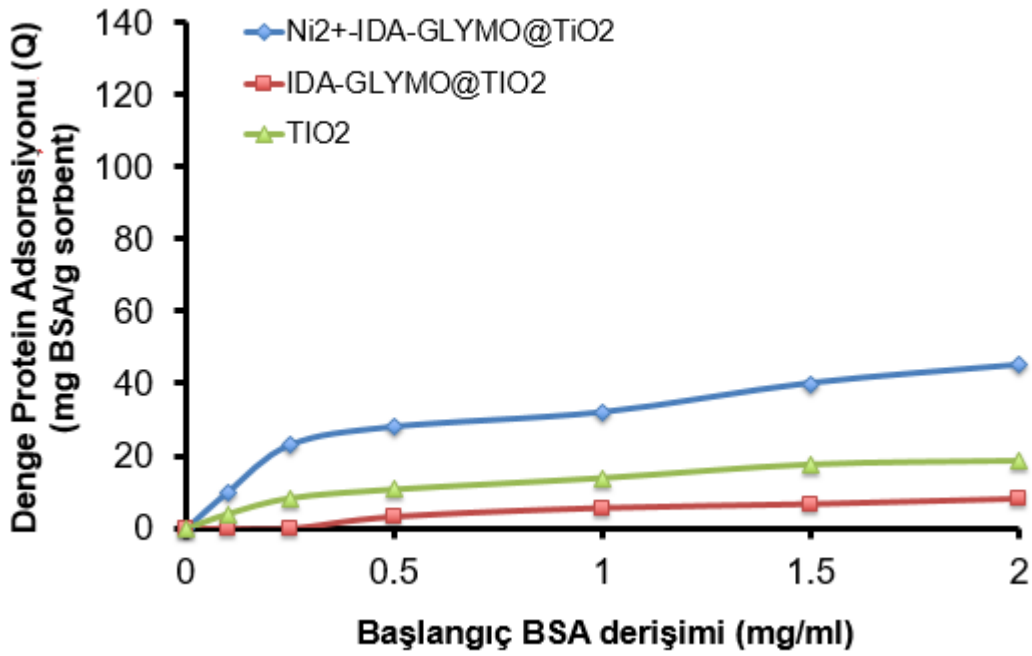
Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerin sentezi önce TiO_2 ve sonrasında IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerin eldesini gerektirmektedir. Bu deney grubunda farklı yüzey kimyasına sahip mikrokürelerin değişen başlangıç protein konsantrasyonunda adsorpsiyon ve desorpsiyon verimleri incelenmiştir. Ni^{2+} iyonu immobilize edilmemiş mikroküreler ile, Ni^{2+} immobilize edilmiş mikroküreler aynı çalışma koşullarında denenmiştir. Burada amaç Ni^{2+} iyonlarının proteinlerin (BHb, BSA) adsorpsiyonundaki rolünü tespit etmektir. Bu deney setinde; sorbent olarak 10 mg TiO_2 , IDA-GLYMO@ TiO_2 ve Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküreler kullanılmıştır. Sabit sorbent miktarı ile farklı başlangıç protein konsantrasyonlarında (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/ml) protein-sorbent etkileşimi incelenmiştir. Sonuçlar, Ni^{2+} immobilize olmuş sorbentlere ait sonuçlar ile karşılaştırılmış ve Ni^{2+} iyonlarının protein izolasyonu üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. şekil 4.9'da her bir aşamada sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BHb protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi verilmiştir.



Şekil 4.9. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BHb protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat).

Bu sonuçlar BHb'nin TiO₂ ve IDA-GLYMO@TiO₂ sorbentlerine sınırlı bir afinite gösterdiğini, ve TiO₂ bazlı sorbent üzerine denge BHb adsorpsiyonun ağırlıklı olarak Ni²⁺ iyonlarının varlığında ve histidin-Ni²⁺ etkileşimi ile gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

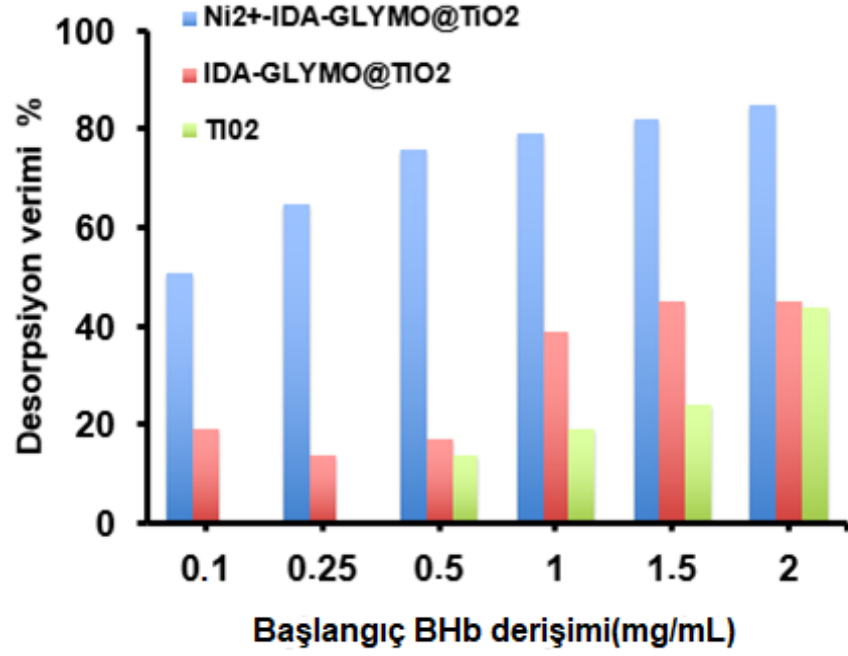
Şekil 4.10'da her bir aşamada sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BSA konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi verilmiştir.



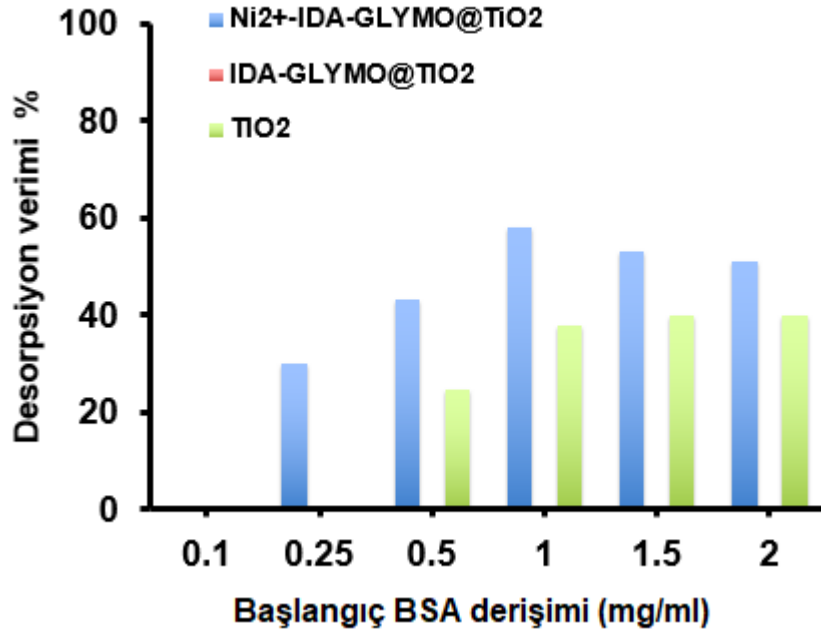
Şekil 4.10. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BSA protein konsantrasyonundaki değişimin protein izolasyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat)

Şekil 4.10'da görüleceği üzere Ni²⁺ immobilize edilmemiş mikroküreler ile immobilize edilmiş mikroküre arasındaki ilişki Şekil 4.9'dakine benzer bir eğilimdedir. Burada BSA'nın BHB'e göre hem IDA-GLYMO hem de Ni²⁺-IDA-GLYMO yapılarına karşı afinitesinin çok daha düşük olduğunu görülmektedir. Özellikle Ni²⁺ içeren sorbent formu ile elde edilen düşük denge adsorpsiyonu, BSA'nın BHB'ne kıyasla çok daha düşük histidin içeriği ile açıklanabilir.

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de ise sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BHB ve BSA konsantrasyonlarındaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi incelenmiştir.



Şekil 4.11. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BHB protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat)

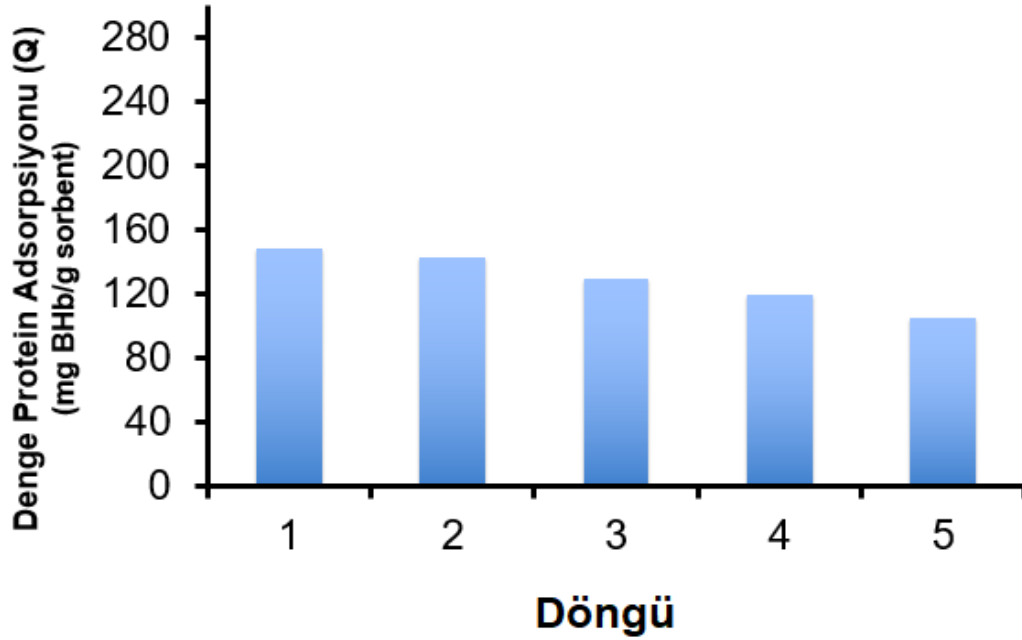


Şekil 4.12. Sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda başlangıç BSA protein konsantrasyonundaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 Mm imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat)

Şekil 4.11. ve Şekil 4.12. ile verilen grafiklerde değişen başlangıç protein (BHb, BSA) konsantrasyonlarına karşı Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş ve Ni^{2+} iyonu immobilize edilmemiş mikrokürelerin desorpsiyon verimleri karşılaştırılmıştır. Desorpsiyon ortamında kullanılan imidazol molekülleri yarışmacı ajan olarak görev yapmakta ve histidin gruplarında yer alan imidazol ile yer değiştirmektedir. Böylelikle Ni^{2+} iyonları ve proteinler arasındaki elektrostatik etkileşim, kullanılan desorpsiyon tamponu ile sonlandırılmakta ve protein sorbent üzerinden desorbe edilmektedir. Ancak Ni^{2+} immobilize edilmemiş mikroküreler ile proteinler arasında spesifik bir bağlanma gerçekleşmediği için kullanılan desorpsiyon tamponu ile proteinlerin desorpsiyonu yüksek verimle yapılamamıştır. İki grafikte de görüldüğü gibi, başlangıç protein konsantrasyonlarının herbiri için immobilize Ni^{2+} iyonu içeren mikrokürelerin desorpsiyon verimleri beklendiği gibi daha yüksektir.

4.2.4. Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ Mikrokürelerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Adsorbsiyon-desorpsiyon deney sonuçlarına göre kesikli sistemde BHb izolasyonu en iyi kromatografik performansın Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküreler ile elde edildiği görülmüştür. Bu mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği yapılan 5 adsorpsiyon ve 5 desorpsiyon deneyi ile ölçülmüştür (Şekil 4.13). Bu deneylerde sorbent miktarı 10 mg, başlangıç BHb konsantrasyonu 2 mg/ml olarak belirlenmiştir.



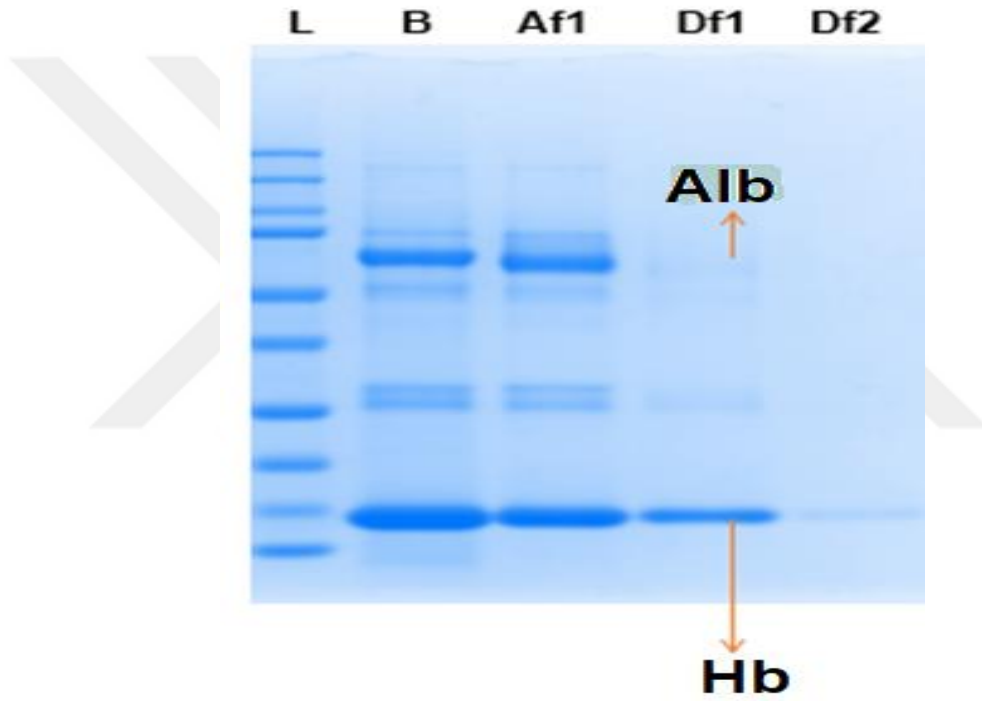
Şekil 4.13. Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküresinin tekrar kullanımının adsorpsiyon verimine etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 25 mM PBS tamponu, pH=7.4; Adsorpsiyon hacmi: 1 ml; Sorbent miktarı: 10 mg; BHb protein konsantrasyonu: 2 mg/ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 2 saat) (Desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH=7; Desorpsiyon hacmi: 1 ml; Sıcaklık: oda sıcaklığı ; Zaman: 1 saat)

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikrokürelerin ilk kullanımdan sonraki denge adsorpsiyonu 150 mg BHb/g sorbent iken beşinci kullanımdan sonra 110 mg BHb/g sorbent değerine ulaşmaktadır. Bu davranış tekrarlı kullanımda söz konusu sorbentin denge protein adsorpsiyonu değerinin sınırlı bir azalma gösterdiğini ortaya koymaktadır.

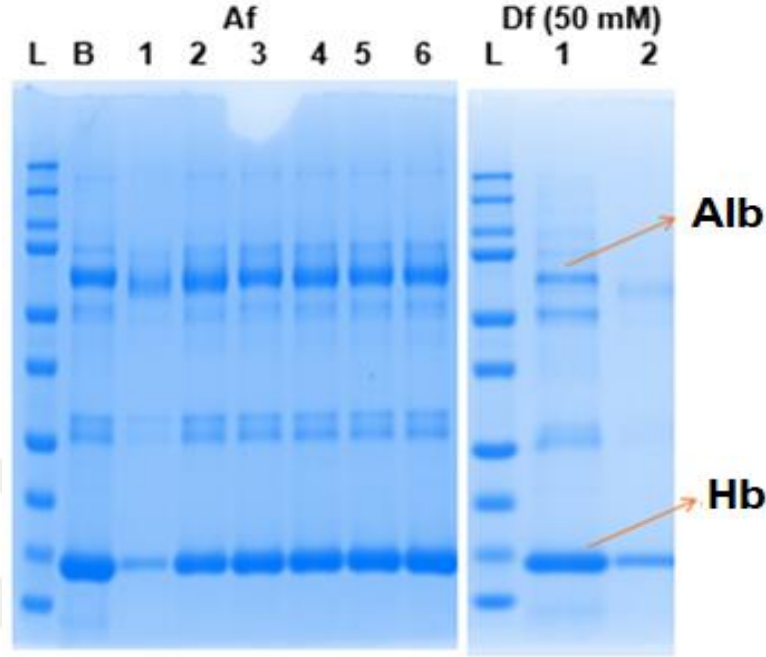
4.3. Monodispers-Gözenekli TiO_2 Bazlı Mikroküreler Yardımıyla Kesikli Sistem ve Sürekli Mikroakış Sisteminde İnsan Tam Kan Örneğinden Hb İzolasyonu

Monodispers-gözenekli Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküreler ile insan tam kan örneğinden Hb izolasyonu kesikli sistem ve sürekli mikroakış sistemi ile gerçekleştirilmiş ve izole edilen Hb’nin bütünlüğü ve saflığının belirlenmesi amacıyla jel

elektroforez (SDS-PAGE) tekniği uygulanmıştır. Kesikli sistem ve sürekli sistemdeki izolasyon için adsorbsiyon ortamı olarak 10 mM pH 8.5 Tris-HCl tamponu, desorpsiyon ortamı olarak ise 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol veya 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazol içeren çözeltiler kullanılmıştır. Kesikli ve sürekli sistemde elde edilen jel elektroforez görüntüleri sırasıyla şekil 4.14. ve şekil 4.15.'te verilmiştir. Hb adsorpsiyon ve desorpsiyon verimleri ve Hb saflık değerleri de izelge 4.3'te verilmiştir.



şekil 4.14. SDS-PAGE tekniği kullanılarak kesikli sistemde insan tam kan örneğinden Hb izolasyonu görüntüsü. Mikroküre: Ni²⁺-IDA-GLYMO@TiO₂, mikroküre miktarı: 10 mg, desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 100 mM imidazol. (L: Basamak (ladder); B: İnsan tam kan rneği; Af1: Adsorbsiyon sonucunda toplanan rnek; Df 1, 2: Desorpsiyon sonucunda toplanan rnekler)



Şekil 4.15. SDS-PAGE tekniği kullanılarak sürekli mikroakış sisteminde insan tam kan örneğinden Hb izolasyonu görüntüsü. Mikroküre: Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂, kolon: 300 μm id x 50 mm, desorpsiyon ortamı: 50 mM fosfat tamponu, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazol. (L: Basamak (ladder); B: İnsan tam kan örneği; Af 1, 2, 3, 4, 5, 6 : Adsorbsiyon sonucunda toplanan örnekler; Df 1, 2: Desorpsiyon sonucunda toplanan örnekler)

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'e bakıldığında kesikli ve sürekli mikroakış sistemlerindeki jel elektroforez görüntülerinin uyumlu olduğu düşünülmektedir. Hem sürekli sistemde hem de kesikli sistemde beklenildiği gibi Hb ortamdan tatminkar şekilde izole edilmiştir.

Çizelge 4.3. Kesikli sistem ve sürekli mikroakış sisteminde jel elektroforez tekniğine dayanarak hesaplanan Hb saflık ve Hb adsorpsiyon ve Hb desorpsiyon verimi değerleri

	% Saflık	% Adsorpsiyon verimi	%Desorpsiyon verimi
Kesikli sistem	≥95	55	29
Sürekli sistem	85	25	36

Kesikli sistem için Hb saflık değeri, SDS PAGE yazılım programından (Image Lab. 5.1 Biorad) tayin edilmiş ve bu değerin % 95'ten yüksek olduğu görülmüştür. Biodrop cihazından adsorpsiyon ve desorpsiyon için okunan değerlere göre yapılan hesaplama sonucunda ise, adsorpsiyon veriminin % 55, desorpsiyon veriminin % 29 olduğu tespit edilmiştir. Sürekli sistem için saflık değeri aynı yöntemle % 85 olarak hesaplanmıştır. Biodrop cihazından adsorpsiyon ve desorpsiyon için okunan değerlere göre yapılan hesaplama sonucunda ise, adsorpsiyon veriminin % 25, desorpsiyon veriminin % 36 olduğu tespit edilmiştir. İkinci desorpsiyon (Df2) değerlerine göre hesaplanan % saflık değerleri her iki sistem için oldukça yüksektir. Adsorpsiyon verimi kesikli sistemde daha yüksek iken, desorpsiyon veriminde ise sürekli sistem daha olumlu sonuç vermiştir. İnsan tam kan örneği gibi karmaşık bir sistemden elde edilen bu sonuçlar sentezlenen monodispers-gözenekli Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin tam-kan'dan Hb izolasyonu için son derece uygun, hem kesikli, hem de sürekli formda çalışan immobilize metal affinite kromatografisi sistemleri için yeni bir alternatif sorbent olduğunu ortaya koymuştur.

5. SONUÇLAR

Yapılan tez çalışmasında;

- Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) küreleri kullanılarak sol-jel yöntemiyle monodispers-gözenekli TiO_2 mikroküreleri sentezlenmiştir. Daha sonra, TiO_2 küreleri üzerine IDA-GLYMO bağlanmış olup, son basamakta ise, immobilize metal afinite kromatografi uygulamalarında kullanılmak üzere Ni^{2+} iyonları immobilize edilmiştir. Monodispers-gözenekli formda Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 olarak adlandırılan mikrokürelerin ortalama boyu 4 μm olarak saptanmıştır.
- SEM görüntüleri çekilen mikrokürelerin dar bir boyut dağılımına ve gözenekli yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir.
- Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküreler, 24.69 m^2/g yüzey alanına sahiptir.
- Mikrokürelerin IMAC sorbent formuna dönüştürülmesi Ni^{2+} iyonu immobilizasyonu ile tamamlanmıştır. IMAC için kromatografik performansın belirlenmesi amacıyla, hedef protein olarak histidin içeriği yüksek Hb ve referans protein olarak da hisitidin içeriği düşük albümin seçilmiştir.
- Kesikli sistemde gerçekleştirilen adsorpsiyon-desorpsiyon uygulamaları ile öncelikli olarak en uygun sorbent miktarı belirlenmiş, artan sorbent miktarı ile birim sorbentin dengede adsorpladığı protein miktarının ters orantılı olarak değiştiği görülmüştür. Gerek izolasyon verimi gerekse desorpsiyon verimi dikkate alındığında, sorbent miktarına ait uygun değer 1 mL adsorpsiyon ortamı için, 10 mg olduğu görülmüştür.
- Ni^{2+} -IDA-GLYMO@ TiO_2 mikroküreler ile başlangıç protein konsantrasyonunun etkisini belirlemek için; değişen protein konsantrasyonlarında pH=7.4'de 25 mM fosfat tamponu ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. BHb ve BSA başlangıç konsantrasyonu arttıkça birim sorbent kütlesi başına dengede adsorplanan protein miktarının da arttığı, belli bir değerden sonra ise sabitlendiği görülmüştür. En yüksek denge protein adsorpsiyonu 2 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonunda BHb ile 140 mg/g olarak elde edilmiştir. BSA için ise bu değer yaklaşık 40 mg/g olarak bulunmuştur.

- Başlangıç protein derişiminin artmasının desorpsiyon verimi üzerine etkisi incelendiğinde, protein derişimi arttığında desorpsiyon verimi BHb için artış göstermiş ve çalışılan koşullarda maksimum desorpsiyon verimi, % 80 olarak bulunmuştur. Ancak BSA aynı değer yaklaşık % 40 olarak tayin edilmiştir.
- Ni^{2+} iyonlarının protein izolasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için, Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂, TiO₂ ve IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin adsorpsiyon ve desorpsiyon verimleri incelenmiştir. Hb konsantrasyonunun artması ile TiO₂ ve IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin adsorplama kapasitelerinin yetersiz kaldığı görülmüştür. Bu durum, TiO₂ ve IDA-GLYMO@TiO₂ sorbentlerinin BHb'ye karşı yüksek afinite göstermediğini ortaya koymaktadır. Ni^{2+} iyonlarının IDA-GLYMO@TiO₂ yapısına bağlandıktan sonra daha etkin bir denge adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. BSA'nın ise, BHb'ye göre hem IDA-GLYMO hem de Ni^{2+} -IDA-GLYMO yapılarına karşı afinitesinin çok daha düşük olduğu görülmüştür.
- TiO₂, IDA-GLYMO@TiO₂ ve Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda, başlangıç BHb ve BSA konsantrasyonlarındaki değişimin desorpsiyon verimine etkisi incelenmiştir. Özellikle BHb için immobilize Ni^{2+} iyonu içeren mikrokürelerin desorpsiyon verimlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.
- Çalışmada, BHb için en iyi izolasyon veriminin Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikroküreler ile elde edildiği görülmüştür. Bu sorbentin tekrar kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla, yapılan deneylerde ilk kullanımdaki denge BHb adsorpsiyon değeri 150 mg BHb/g sorbent iken, beşinci kullanımda aynı değer 110 mg BHb/g sorbent olarak bulunmuştur. Bu da sentezlenen mikrokürelerin tekrarlı kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir.
- Ni^{2+} -IDA-GLYMO@TiO₂ mikrokürelerin izolasyon performansı, insan tam kan örneğinden Hb saflaştırılması yapılarak incelenmiştir. Kesikli IMAC ve sürekli IMAC sistemleri için Hb saflık değeri, SDS-PAGE yazılımı ile sırasıyla ≥ 95 ve % 85 olarak bulunmuştur. Mikrospektrofotometre ile adsorpsiyon ve desorpsiyon basamaklarında yapılan absorbans ölçümlerine göre adsorpsiyon verimi kesikli IMAC sistemi için % 55, sürekli IMAC sistemi için ise % 25 olarak tespit edilmiştir.

Desorpsiyon verimi ise kesikli ve sürekli sistemlerde sırasıyla % 29 ve % 36 olarak hesaplanmıştır.



KAYNAKLAR

- [1] <http://biyolojik.org/genelbilgiler/78-proteinler> (**Mayıs, 2018**).
- [2] http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Aminoasitler.pdf (**Mayıs, 2018**).
- [3] http://eczacilik.anadolu.edu.tr/bolumSayfalari/belgeler/03%20Amino%20asitler,%20Peptitler%20ve%20Proteinler%20II_20140404062844.pdf (**Mayıs, 2018**).
- [4] Jackson R.B., Minorsky P. V., Wasserman S.A., Cain U. M., Urry L., Reece J.B, *Campbell Biyoloji*, (çev: Gündüz E., Türkan İ.), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, **2017**.
- [5] Nelson D., Cox M. M., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, (çev: Elçin M. Y.), 5. Baskı, Palme Yayıncılık, **2007**.
- [6] Prof. Dr. Şule Pekyardımcı, "Protein Saflaştırmasının Genel Özellikleri" https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4434/mod_resource/content/0/1.%20hafta.pdf (**Mayıs, 2018**).
- [7] Tuncer, M., *Protein Saflaştırma-1 Kromatografik Yöntemler*, Can Matbaacılık, Mersin, **2008**.
- [8] Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., *Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması* (Antalya, Türkiye), Akademik Gıda, 12 (2), 79-87, **2014**.
- [9] Chaga, G.S., *Twenty-Five Years of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: Past, Present and Future* (Palo Alto, USA), *Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-334, **2001**.
- [10] Odabaşı, M., *İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 243-267, **2014**.
- [11] X. He, B. Yuan, Y. Feng, *Facial Synthesis of Nickel(II)-immobilized Carboxyl Cotton Chelator for Purification of Histidine-tagged Proteins*, *Journal of Hromatography B*, 1043 122-127, **2017**.
- [12] J. Wang, R. Zhang, X. Yang, X. Liu, H. Zhang, *Facile Snthesis of Copper(II)-Decorated Functional Mesoporous Material for Specific Adsorption of Histidine-rich Proteins*, *Talanta* 176, 308-317, **2018**.
- [13] Salimi K., Usta D., Koçer İ., Çelik E., Tuncel A, *Highly Selective Magnetic Affinity Purification of Histidine-tagged Proteins by Ni²⁺ Carrying Monodisperse Composite Microspheres*, *RSC Adv.*, 7, 8718 **2017**.

- [14] Rashid Z., Ghahremanzadeh R., Nejadmoghaddam M. R. , Nazari M, Shokri M. R., Naeimi H., Zarnani A., *Nickel-Salen Supported Paramagnetic Nanoparticles For 6-His-Targetrecombinant Protein Affinity Purification*, Journal of Chromatography A, 1490, 47–53, **2017**.
- [15] Dalkavriyan S., “*Spirulina platensis*’ten Süperoksit Dismütaz(SOD) Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2011**.
- [16] Liu Y., Yan M, Huang J., *Selective Removal of Hemoglobin from Blood Using Hierarchical Copper Shells Anchored to Magnetic Nanoparticles*, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, **2017**
- [17] GE Healthcare, *Strategies for Protein Purification Handbook*, Sweden, **2010**.
- [18] Cuatrecasas, P., Fuchs S. and Anfinsen C.B., 1968. *The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419, **1968**
- [19] Hedhammar, M., Karlström, A.E., Hober, S., *Chromatographic Methods for Protein Purification*, Stockholm, **2006**.
- [20] Milli Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Kromatografik Analizler, Ankara, **2013**.
- [21] Balcı, O., *Affinity Chromatographic Purification of Recombinant Human Growth Hormone*, Thesis to the Graduate School, Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara, **2008**
- [22] Çelikkaya B., *Protein İzolasyonu için İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Mikroakış Sistemlerinin Geliştirilmesi.*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2017**
- [23] Karakus C., Uslu M., Yazici D., Salih B. A., *Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein*, *Journal of Chromatography B*, 1021, 182-187, **2016**.
- [24] Bauer, W. S., Richardson, K. A., Adams, N. M., Ricks, K. M., Gasperino, D. J., Ghionea, S. J., ... & Wright, D. W., *Rapid concentration and elution of malarial antigen histidine-rich protein II using solid phase Zn (II) resin in a simple flow-through pipette tip format*. *Biomicrofluidics*, 11(3), 034115, **2017**
- [25] Mooney, J. T., Fredericks, D., Christensen, T., & Hearn, M. T., *Removal Of Cleavage Slow Points From Affinity Tags Used In The IMAC Purification Of Recombinant Proteins*. *Biotechnology journal*, 9(8), 1023-1032, **2014**.

- [26] Kagedal, L., *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Third Edition, (ed: Jonson, J.C.), John Wiley & Sons Inc, Sweden, 183-201, **2011**.
- [27] Liu, Y., Wang, Y., Yan, M., & Huang, J., *Selective Removal of Hemoglobin from Blood Using Hierarchical Copper Shells Anchored to Magnetic Nanoparticles*. BioMed research international, **2017**.
- [28] Ueda, E. K. M., Gout, P. W., & Morganti, L., *Current And Prospective Applications Of Metal Ion-Protein Binding*. Journal of chromatography A, 988(1), 1-23, **2003**.
- [29] Uzun, L., Yavuz, H., Denizli A., Protein kromatografisi, genel prensipler. *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 7-25, **2014**.
- [30] Bo, C., Wang, C., & Wei, Y., *Novel bis (5-methyltetrazolium) amine ligand-bonded stationary phase with reduced leakage of metal ions in immobilized metal affinity chromatography of proteins*. Analytical and bioanalytical chemistry, 408(27), 7595-7605., **2016**.
- [31] Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schafer, F., *Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review (Jülich, Germany)*, Methods in Enzymology, 463, 439-473, **2009**.
- [32] Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Ng, T. B., *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: a Review on Its Applications (Heidelberg, Germany)*, Appl Microbiol Biotechnol, 96, 1411-1420, **2012**.
- [33] Jiang, C., *Immobilized Cobalt Affinity Purification for HSV-1 Based Gene Therapy Vectors*, Degree of Doctor of Philosophy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, **2006**.
- [34] Porekar, V. G., Menart, V., *Perspectives of Immobilized-Metal Affinity Chromatography (Ljubljana, Slovenia)*, Biochemical and Biophysical Methods, 49, 335-360, **2001**.
- [35] Kikot, P., Polat, A., Achilli, E., Fernandez Lahore, M., Grasselli, M., *Immobilized Palladium (II) Ion Affinity Chromatography For Recovery Of Recombinant Proteins With Peptide Tags Containing Histidine And Cysteine*. Journal of Molecular Recognition, 27(11), 659-668, **2014**.
- [36] Hoffmann, K. M., Wood, K. M., Labrum, A. D., Lee, D. K., Bolinger, I. M., Konis, M. E., Watson, J. M., *Surface histidine mutations for the metal affinity purification of a β -carbonic anhydrase*. Analytical biochemistry, 458, 66-68, **2014**.

- [37] Köhler, K., Simmendinger, P., Roelle, W., Scholz, W., Valet A., Slongo, M. , *Paints and Coatings, Pigments, Extenders, and Additives, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, **2010**.
- [38] Fu, W., Yang, H., Changa, L., Bala, H., Li, M., Zou, G., *Anatase TiO₂ nanolayer coating on strontium ferrite nanoparticles for magnetic photocatalyst* ,*Colloids and Surfaces A*, 289, 47-52, **2006**.
- [39] Carp, O., Huisman, C.L., Reller, A., *Photoinduced reactivity of titanium dioxide, Progress in Solid State Chemistry*, 32, 33-177, **2004**.
- [40] Sun, H., Wang, C., Pang, S., Li, X., Tao, Y., Tang, H., Liu, M., *Photocatalytic TiO₂ films prepared by chemical vapor deposition at atmosphere pressure, Journal of Non-Crystalline Solids*, 354, 1440-1443, **2008**.
- [41] Giolli, C., Borgioli, F., Credi, A., Fabio, A.D., Fossati, A., Miranda, M.M., Parmeggiani, S., Rizzi, G., Scrivani, A., Troglio, S., Tolstoguzov, A., Zoppi, A., Bardi, U., *Characterization of TiO₂ coatings prepared by a modified electric arc-physical vapour deposition system, Surface and Coatings Technology*, 202, 13-22, **2007**.
- [42] Hamaloğlu, K.Ö., Çelebi, B., Sağ, E.,Tuncel, A., *A New Method For The Synthesis Of Monodisperse-Porus Titania Microbeads By Using Polymethacrylate Microbeads As Template, Microporous And Mesoporous Materials*, 207, 17-26, **2015**.
- [43] Lee, J.H., Yang, Y.S., *Effect Of Hydrolysis Conditions On Morphology And Phase Content In The Crystalline Tio₂ Nanoparticles Synthesized From Aqueous Ticl₄ Solution By Precipitation*, *Materials Chemistry and Physics*, 93, 237-242, **2005**.
- [44] Bellardita, M., Addamo, M., Di Paola, A., Palmisano, L., *Photocatalytic Behaviour Of Metal-Loaded Tio₂ Aqueous Dispersions And Films*, *Chemical Physics*, 339, 94-103, **2007**.
- [45] Hidalgo, M.C., Aguilar, M., Maicu, M., Navío, J.A., Colón, G., *Hydrothermal Preparation Of Highly Photoactive Tio₂ Nanoparticles*, *Catalysis Today*, 129 50-58, **2007**.
- [46] Xie, R.C., Shang, J.K., *Morphological Control In Solvothermal Synthesis Of Titanium Oxide*, *Journal of Materials Science*, 42, 6583-6589, **2007**.
- [47] Andersson, M., Kiselev, A., Osterlund, L., Palmqvist, A.E.C., *Microemulsion Mediated Room-Temperature Synthesis Of High-Surface-Area Rutile And Its*

Photocatalytic Performance, Journal of Physical Chemistry C, 111 6789-6797, **2007**.

- [48] Kitamura, Y., Okinaka, N., Shibayama, T., Mahaney, O.O.P., Kusano, D., Ohtani, B., Akiyama, T., *Combustion Synthesis Of TiO_2 Nanoparticles As Photocatalyst*, Powder Technology, 176, 93-98, **2007**.
- [49] Sankapal, B.R., Sartale, S.D., Lux-Steiner, M.C., Ennaoui, A., *Chemical And Electrochemical Synthesis Of Nanosized TiO_2 Anatase For Large-Area Photon Conversion*, Comptes Rendus Chimie, 9, 702-707, **2006**.
- [50] Kolen'ko, Y.V., Garshev, A.V., Churagulov, B.R., Boujday, S., Portes, P., Colbeau-Justin, C., *Photocatalytic Activity Of Sol-Gel Derived Titania Converted Into Nanocrystalline Powders By Supercritical Drying*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 172, 19-26, **2005**.
- [51] Tong, T., Zhang, J., Tian, B., Chen, F., He, D., *Preparation Of Fe^{3+} -Doped TiO_2 Catalysts By Controlled Hydrolysis of Titanium Alkoxide And Study on Their Photocatalytic Activity For Methyl Orange Degradation*, Journal of Hazardous Materials, 155, 572-579, **2008**.
- [52] Schubert, U., Hüsing, N., *Synthesis of Inorganic Materials*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co, **2005**.
- [53] Brinker, C. J., Scherer, G.W., *Sol-gel science*, Academic Press, **1990**.
- [54] Sivakumar, S., Sibin, C.P., Mukundan, P., Pillai, P.K., Warriar, K.G.K., *Nanoporous titania-alumina mixed oxides - an alkoxide free sol-gel synthesis*, Materials Letters, 58, 2664-2669, **2004**.
- [55] Kanna, M., Wongnawa, S., *Mixed amorphous and nanocrystalline TiO_2 powders prepared by sol-gel method: characterization and photocatalytic study*, Materials Chemistry and Physics, 110: 166-175, **2008**.
- [56] Addamo, M., Augugliaro, V., Di Paola, A., Garcia-Lopez, E., Loddo, V., Marc, G., Palmisano, L., *Preparation and photoactivity of nanostructured TiO_2 particles obtained by hydrolysis of TiCl_4* , Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 265, 23- 31, **2005**.
- [57] Randorn, C., Wongnawa, S., Boonsin, P., *Bleaching of methylene blue by hydrated titanium dioxide*, Science Asia, 30,149-156, **2004**.
- [58] Deshpande, A. S., Niederberger, M., *Synthesis of mesoporous ceria zirconia beads*, Microporous Mesoporous Materials, 101, 413-418, **2007**.

- [59] Naydenov, V., Tosheva, L., Sterte, J., Vanadium modified AlPO-5 spheres through resin macrotemplating, *Microporous Mesoporous Materials*, 66, 321-329, **2003**.
- [60] Shchukin, D.G., Caruso, R.A., Template Synthesis and Photocatalytic Properties of Porous Metal Oxide Spheres Formed by Nanoparticle Infiltration, *Chemistry of Materials*, 16, 2287-2292, 2004.
- [61] Tuncel, A., *Eş-boyutlu partikül üretimi için polimerizasyon yöntemleri, Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 91-102, **2014**.
- [62] Usta, D. D., *Afinite Kromatografisiyle Desteklenmiş Sers Tabanlı Biyosensörler Aracılığıyla Diol Gruplu Biyomolekül Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2016**.
- [63] Barrett, K.E.J., *Dispersion Polymerization in Organic Media*, John Wiley & Sons, London, **1975**.
- [64] Almog, Y., Reich, S., Levy, M., *Monodisperse Polymeric Spheres In The Micron Size Range By A Single Step Process*, *British Polymer Journal*, 14, 131-136, **1982**.
- [65] Bromberg, L., *Polyether-Modified Poly(acrylic acid): Synthesis and Applications*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 37, 4267-4274, **1998**.
- [66] Kawaguchi, H., *Functional polymer microspheres*, *Progress in Polymer Science*, 25, 1171-1210, **2000**.
- [67] Paine, A.J., *Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. 7. A simple mechanistic model to predict particle size*, *Macromolecules*, 23, 3109-3117, **1990**.
- [68] Shen, S., Sudol, E.D., El-Aasser, M.S., *Dispersion polymerization of methyl methacrylate: Mechanism of particle formation*, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 32, 1087-1100, **1994**.
- [69] Tseng, C.M., Lu, Y.Y., El-Aasser, M.S., Vanderhoff, J.W., *Uniform polymer particles by dispersion polymerization in alcohol*, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 24, 2995-3007, **1986**.
- [70] Barrett, K.E.J., Thomas, H.R., *Kinetics of dispersion polymerization of soluble monomers. I. Methyl methacrylate*, *Journal of Polymer Science Part A-1, Polymer Chemistry*, 7, 2621-2650, **1969**.

- [71] Gokmen, M.T., Du Prez, F.E., *Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications*, Progress in Polymer Science, 37, 365– 405, **2012**.
- [72] Slater, M., Snauko, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., “Click chemistry” in the preparation of porous polymer-based particulate stationary phases for μ -HPLC separation of peptides and proteins, *Analytical Chemistry*, 78, 4969–4975, **2006**.
- [73] Wang, Q. C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodisperse Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 32, 2577- 2588, **1994**.
- [74] Caglayan, B., Unsal, E., Çamli, S.T., Tuncel, M., Tuncel, A., *Monodisperse Porous Poly(vinylacetate-co-divinylbenzene) Particles by Single-Stage Seeded Polymerization: A Packing Material for Reversed Phase HPLC*, Separation Science, 29, 936-944, **2006**.
- [75] Ayar, A., *Fonksiyonel Gruplar Bağlanmış Sporopolleninin Ligand Adsorpsiyonunun İncelenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, **1997**.
- [76] Dada, A.O., Olalekan, A.P., Olatunya, A. M., Dada, O., *Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn^{2+} Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk (Kwara State, Nigeria)*, Journal of Applied Chemistry, 3, 38-45, **2012**.
- [77] Kyzas, G. Z., Matis, K. A., *Nanoadsorbents for Pollutants Removal: A Review (Thessaloniki, Greece)*, Journal of Molecular Liquids, 203, 159-168, **2015**.
- [78] Ma, Z., Guan, Y., & Liu, H., Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 301(2), 469-477, **2006**.
- [79] [<http://daytam.atauni.edu.tr/cihaz/>] (**Mayıs, 2018**).
- [80] http://anibal.gyte.edu.tr/hebe/AbIDrive/71167157/w/Storage/217_2011_1_113_71167157/Downloads/sds-lisans-lab.pdf (**Mayıs, 2018**).
- [81] Pohl, L., Marquard, K., Waitl, G., Reeh, U., & Wipfelder, E., *Inorganic fillers and organic matrix materials whose refractive index is adapted*. WO, 93, 025611, **1993**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sezgi Alpaslan
Doğum Yeri : İstanbul
Medeni Hali : Bekar
E-posta : sezgialpaslan@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Kimya
Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarı 12
Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise : Özel Arı Okulları, Tam Burslu, Ankara
Lisans : Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya
Mühendisliği Bölümü
Erasmus : Institute Technology of Carlow, Analytical & Forensic
Science, Carlow, Ireland
Yandal : Ankara Üniversitesi, Siyasal Bilgiler Fakültesi, İşletme
Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri Düzey

İş Deneyimi

09.2016- devam ediyor: Yetkili Müfettiş Yardımcısı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık
Bakanlığı Rehberlik ve Teftiş Başkanlığı

06.2014-09.2016 : Müfettiş Yardımcısı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Rehberlik ve Teftiş Başkanlığı

12.2013-06.2014 : Stajyer Hava Trafik Kontrolörü, Devlet Hava Meydanları
İşletmesi (DHMİ)

05.2013-11.2013 : Kalite Kontrol Sorumlusu, İba.Valresa Boya ve Kimya San. Tic. A.Ş., Ankara
01.2013-05.2013 : Ar-Ge Mühendisi, İba.Valresa Boya ve Kimya San. Tic. A.Ş., Ankara
06.2010-07.2010 : Stajyer, Ankara Şeker Fabrikası
08.2009-09.2009 : Stajyer, İba.Valresa Boya ve Kimya San. Tic. A.Ş., Ankara

Deneyim Alanları

Mikroküre Sentezi

İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Alpaslan S., Tosun B. R., Kip Ç., Tuncel A., Synthesis Of TiO₂ Based Stationary Phases For Immobilized Metal Affinity Chromatography and Their Usage For Isolation Of Biomolecules (Yazım aşamasında)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Tosun B. R., Alpaslan S., Kip Ç., Tuncel A., Titania based immobilized metal affinity sorbent for the purification of histidine-rich proteins, ISC 2018, 32nd International Symposium on Chromatography, Cannes, Mandelieu, Fransa, 23-27 Eylül, **2018**.



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih: 06/07/2018

Tez Başlığı / Konusu: İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN TiO₂ BAZLI SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE BİYOMOLEKÜL İZOLASYONUNDA KULLANIMI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 70 sayfalık kısmına ilişkin, 06/07/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

06.07.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Sezgi ALPASLAN
Öğrenci No: N14128549
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Yüksek Lisans (Tezli)
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

(Unvan, Ad Soyad, İmza)