

***E. coli* HÜCRELERİNDEN POLİMERİK
MİKROKRİYOJELLER İLE RNA SAFLAŞTIRILMASI**

**RNA PURIFICATION BY POLYMERIC
MICROCRYOGELS FROM *E. coli* CELLS**

MELEK ÖZSEVGİÇ

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

***E. coli* HÜCRELERİNDEN POLİMERİK MİKROKRİYOJELLER İLE RNA SAFLAŞTIRILMASI**

MELEK ÖZSEVGİÇ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Haziran 2022, 117 sayfa

RNA saflaştırma, yaşam bilimlerini konu alan birçok çalışmada, özellikle viral, bakteriyel ve parazitik hastalıkların teşhisinde, kalıtsal bozuklukların diagnozunda, bir dizi hazırlayıcı ve analitik yöntemin kritik bir ilk aşamasını oluşturmaktadır. Bu bağlamda moleküler biyoloji teknikleri uygulamalarıyla hassas ve güvenilir sonuçlar elde etmek için saf ve bozulmamış halde saflaştırılmış RNA molekülleri gerekmektedir. Afinite kromatografisi, iyonik/hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı, disülfür köprüsü gibi moleküler etkileşimler kullanılarak bir karışımdaki belirli bir molekülün veya bir grup molekülün ayrılması, uzaklaştırılması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Afinite kromatografisi; antikolar, enzimler, hormonlar, DNA, reseptörler ve vitaminler dahil olmak üzere birçok biyomolekülün ayrılması ve saflaştırılması gibi biyokimyasal ve biyoteknolojik süreçlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Boronat afinite kromatografisi, cis-diol içeren biyomoleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılan yaygın bir saflaştırma yöntemidir. Son dönemlerde spesifik afinite etkileşimlerinden yararlanan kromatografik stratejileri giderek geliştirilmektedir. RNA'nın ayrılması için geliştirilen

etkili tekniklerden yararlanarak boronat afinite kromatografisi, cis-diol grupları içeren çok çeşitli biyomoleküllerin biyoseçici ayrımı ve zenginleştirilmesi için umut verici bir yaklaşımdır. Geleneksel partikül bazlı adsorbanlar farklı ölçeklerde kolonlara eklenebilmeleri sebebiyle kromatografide sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, genellikle nispeten küçük gözenek boyutlarına sahiptirler ve yavaş difüzyonlu kütle transferi, düşük akış hızları ve yüksek basınç düşüşü gibi bazı dezavantajlara neden olurlar. Bu nedenle, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için farklı adsorbanlar geliştirilmiştir. En iyi bilinen alternatiflerden biri kriyojel bazlı adsorbanlardır. Kriyojeller, sıfır altı sıcaklıklarda jelleşme yoluyla üretilen makro gözenekli polimerik malzemelerdir. Ek olarak, kriyojeller, orijinal kalıbı ölçülerinde monolitik formda hazırlanır ve genellikle sadece kendi şekline uygun olan belirli bir kolonda kullanılır. Sunulan tez kapsamında, istenen ölçek ve şekilde sentezlenebilen mikron boyutlu kriyojeller, mikrokriyojeller olarak adlandırılmıştır, boronat afinite adsorbanı olarak imal edilmiştir. İki farklı türde sentezlenen PHEMA ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller, SEM, FT-IR, μ CT gibi çeşitli yöntemlerle karakterize edildikten sonra kesikli sistemde optimum adsorpsiyon koşulları belirlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında, uygun karakterizasyona sahip olması nedeniyle Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller kullanılarak optimum koşullar pH 8.5 etilenamin tamponu 0.1 M CaCl_2 tuz varlığı 37 °C olarak elde edilmiştir. Sulu çözeltiden RNA adsorpsiyonu deneyleri sonucunda 50. dakikadan sonra adsorpsiyon doygunluğuna ulaşıldığı, 0.5 mg/ml RNA derişiminde maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 303 mg/g polimer olduğu bulgusuna erişilmiştir. Adsorpsiyon izotermi inceleme çalışmalarında Langmuir izotermine uygunluk gösterdiği ve ikinci dereceden izoterm kinetiği ile örtüştüğü belirlenmiştir. Mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirlik incelemeleri 8 kez yapılarak sonucunda 223.4 mg/g adsorpsiyon kapasitesi değerine ulaşılmıştır. Tezde, deney ve kontrol kolaylığı sağladığından dolayı biyokimyasal süreçlerde sıklıkla tercih edilen *E. coli* hücreleri kullanılmış ve *E. coli* hücrelerinden inkübasyon ve santrifüj işlemleri sonucunda RNA özütü elde edilmiştir. RNA özütü, desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M borat tamponu 0.5 M CaCl_2 vasıtasıyla yıkanmıştır. Yıkama sonucu agaroz jel elektroforez analizi sonucunda RNA'nın yüksek oranda başarılı şekilde saflaştırıldığı kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: RNA Saflaştırılması, Mikrokriyojeller, Boronat Afinite Kromatografisi

ABSTRACT

RNA PURIFICATION BY POLYMERIC MICROCRYOGELS FROM *E. coli* CELLS

Melek ÖZSEVGİÇ

Master's Degree, Division of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

June 2022, 117 pages

RNA purification is a critical first step in many life science studies, particularly in the diagnosis of viral, bacterial and parasitic diseases, in the diagnosis of hereditary disorders, tumors and in a number of preparatory and analytical methods. In this context, pure and pristine RNA molecules are required in order to obtain sensitive and reliable results with the applications of molecular biology techniques. Affinity chromatography is a method for separation, removal and purification of a particular molecule or group of molecules in a mixture using molecular interactions such as ionic/hydrophobic interactions, hydrogen bonding, disulfide bridge. Affinity chromatography; It is frequently used in biochemical and biotechnological processes such as the separation and purification of many biomolecules, including antibodies, enzymes, hormones, DNA, receptors and vitamins. Boronate affinity chromatography is a common purification method used for the isolation and purification of cis-diol containing biomolecules. Recently, chromatographic

strategies utilizing specific affinity interactions have been increasingly developed. Leveraging effective techniques developed for RNA separation, boronate affinity chromatography is a promising approach for bioselective separation and enrichment of a wide variety of biomolecules containing cis-diol groups. Conventional particle-based adsorbents are frequently used in chromatography because they can be added to columns at different scales. However, they usually have relatively small pore sizes and cause some disadvantages such as slow diffusion mass transfer, low flow rates and high pressure drop. Therefore, different adsorbents have been developed to overcome these limitations. One of the best-known alternatives is cryogel-based adsorbents. Cryogels are macroporous polymeric materials produced by gelation at subzero temperatures. In addition, cryogels are prepared in monolithic form in the original mold dimensions and are usually only used in a particular column that conforms to its shape. Within the scope of the presented thesis, micron-sized cryogels that can be synthesized in the desired scale and shape were named as microcryogels, and were manufactured as boronate affinity adsorbent. PHEMA and poly(HEMA-VPBA) microcryogels synthesized in two different types were characterized by various methods such as SEM, FT-IR, μ CT, and optimum adsorption conditions were determined in the batch system. In the thesis study, optimum conditions were obtained by using poly(HEMA-VPBA) microcryogels due to its suitable characterization, pH 8.5 ethyleneamine buffer 0.1 M CaCl_2 salt presence at 37°C. As a result of RNA adsorption experiments from aqueous solution, it was found that adsorption saturation was reached after 50 minutes, and the maximum adsorption capacity was 303 mg/g polymer at 0.5 mg/ml RNA concentration. In the adsorption isotherm studies, it was determined that it conforms to the Langmuir isotherm and overlaps with the second-order isotherm kinetics. The reusability examinations of the microcryogels were performed 8 times and the adsorption capacity value of 223.4 mg/g was reached. In the thesis, *Escherichia coli* cells (*E. coli*), which are frequently preferred in biochemical processes due to their ease of experimentation and control, were used and RNA extract was obtained from *E. coli* cells as a result of incubation and centrifugation. The RNA extract was washed with 0.1 M borate buffer 0.5 M CaCl_2 as desorption agent. As a result of washing and agarose gel electrophoresis analysis, it was proved that RNA was purified with a high degree of success.

Keywords: RNA purification, Microcryogel, Boronate Affinity Chromatography

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum bu tez çalışmasında;

*Tecrübe ve bilgi birikimiyle akademik hayatımda bana ilham olan, tez çalışmaların inceliklerle sürdürülmesi ve sonuçlandırılmasını sağlayan sevgili hocam **Prof.Dr. Adil Denizli'ye***

*Samimiyeti, iyi niyeti, sevecenliği ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, zorlandığım zamanlarda bana moral veren, tez çalışmalarımda yapmış olduğu katkılar ve kazandırdığı bilgilerin yanı sıra desteğini her zaman hissettiğim biricik hocam **Arş. Gör. Dr. Sevgi Aslyüce Çoban'a***

*Tez sürecinde bana destek olan, bilimsel birikimini benimle paylaşarak bana yol gösteren sevgili hocam **Prof.Dr. Handan Yavuz ALAGÖZ'e***

*Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını benden esirgemeyen bana katkı sağlayan sevgili hocam **Prof. Dr. Nilay Bereli'ye,***

*Yüksek lisans öğrenimim süresince tecrübelerinden yararlandığım, **Doç.Dr. Deniz Türkmen, Doç.Dr. Fatma Yılmaz, Arş. Gör. Dr. Duygu Çimen,** başta olmak üzere, **Dr. Öğr. Üyesi Yeşeren Saylan, Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan Özgür, Arş. Gör. Dr. Ilgım Göktürk Başal, Öğr. Gör. Dr. Semra Akgönüllü, Ar. Gör. Merve Çalışır** ve **Bioreg** ailesinin diğer tüm üyelerine,*

*Yüksek lisans hayatımın en güzel hediyesi olan bana her koşulda moral, güven ve destek veren canım sırdaşım **Muhammed Erkek'e***

*Lisans ve yüksek lisans hayatımda beraber olduğum kol kola her zorluğun üstesinden geldiğim, en kötü zamanlarda bile anın tadını çıkarmamı sağlayan, canım arkadaşım **Egeşen Halıcı'ya***

*Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, her zaman mutluluğumu düşünen canım sevgilim **Bartu Altuğgil'e***

*Hayatım boyunca arkamda olan, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan **canım annem ve babama***

Sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Melek ÖZSEVGİÇ

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. RNA molekülü ve yapısı	3
2.2. RNA Saflaştırma	3
2.3. Kromatografi	4
2.3.1. Afinite Kromatografisi	5
2.3.2. Afinite Kromatografisinin Metodolojisi.....	7
2.3.3. Afinite Kromatografisi ile Biyomoleküllerin Saflaştırılması.....	8
2.4. RNA Saflaştırma Yöntemleri	13
2.4.1. Ters Faz (RP) ve İyon Değişim (IE) Kromatografisi.....	13
2.4.2. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC)	14
2.4.3. Anyon Değişim Kromatografisi (AEC)	14
2.4.4. RNA Afinite Kromatografisi.....	15
2.5. Biyopolimerler	24
2.5.1. Biyopolimerlerin Sentezi ve Fonksiyonları.....	25
2.6. Kriyojeller	26
2.6.1. Kriyojellerin Sentezi	29
2.6.2. Kriyojel Biyometaryelleri	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	33
3.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Sentezi	33
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	33
3.1.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojeller	33

3.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Karakterizasyonu.....	34
3.2.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Optik Görüntüleri.....	34
3.2.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin SEM-EDX Analizi	34
3.2.3. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μ CT) Analizi	34
3.2.4. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	35
3.3. Sulu çözeltilerden RNA Adsorpsiyon Çalışmaları	35
3.3.1. Farklı pH'larda RNA Adsorpsiyon Çalışmaları	37
3.3.3. Farklı Sıcaklıklarda Adsorpsiyon Çalışmaları	37
3.3.4. Farklı Başlangıç Derişimlerinde Adsorpsiyon Çalışmaları	37
3.3.5. Zamana Bağlı Adsorpsiyon Değişiminin İncelenmesi	38
3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	38
3.5. <i>E. coli</i> 'den RNA Özütleme ve Saflaştırılması	38
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	40
4.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	40
4.1.1. Mikrokriyojellerin Optik Mikroskop ile İncelenmesi.....	40
4.1.2. Poli (HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin SEM-EDX Analizi	42
4.1.4. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi	46
4.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin RNA Adsorpsiyon Çalışmaları	48
4.2.1. Sulu Çözeltilerden RNA Adsorpsiyon Çalışmaları	48
4.3. Tekrar Kullanılabilirlik ve Desorpsiyon	60
4.4. <i>E.coli</i> RNA Özütünden RNA Saflaştırılması	61
4.5. Literatür Özeti.....	64
5. YORUM.....	71
6. KAYNAKLAR	73
EKLER.....	92
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	92
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Geleneksel afinite kromatografi saflaştırma grafiği.....	8
Şekil 2. Afinite kromatografisi aracılığıyla ayrıştırılabilen moleküllerin polarite ve uçuculuk özelliklerine ait şema	9
Şekil 3. Ligand ve matrixin (a) aralayıcı kolsuz ve (b) aralayıcı kol varlığında bağlanması	11
Şekil 4. Bir antikorun tipik yapısı	12
Şekil 5. Afinite kromatografisi ve genel kromatogram için açık/kapalı elüsyon formatı	13
Şekil 6. Boronik asit ve cis-diol grupları arasındaki etkileşim	23
Şekil 7. Boronat gruplarının asidik ve bazik koşullar altında değişimi	24
Şekil 8. Kriyotropik jelleşmenin şematik gösterimi	28
Şekil 9. Farklı şekillerde hazırlanmış kriyojeller	29
Şekil 10. Kriyojelasyon işleminin şematik gösterimi.....	30
Şekil 11. Mikrokriyojel sentezinin şematik gösterimi	34
Şekil 12. Adsorpsiyon çalışmaları için kullanılan kesikli sistem düzeneği	36
Şekil 13. UV spektrofotometre cihazının görseli	36
Şekil 14. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optik mikroskop görüntüsü (4x).....	41
Şekil 15. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optik fotoğrafı	41
Şekil 16. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri	42
Şekil 17A. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin energy-dispersive spektroskopisi görüntüsü.....	43
Şekil 17B. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin energy-dispersive spektroskopisi spetrumu	44
Şekil 18. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT) görüntüsü.....	46
Şekil 19. PHEMA ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin FTIR spektrumları.	47
Şekil 20. RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi; RNA derişimi.	49
Şekil 21. RNA adsorpsiyonuna iyon türü ve derişiminin etkisi.	50
Şekil 23. Başlangıç derişimin adsorpsiyon kapasitesine etkisi	52
Şekil 24. RNA Adsorpsiyonunun zamana bağlı derişimi.....	53

Şekil 25. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli.	54
Şekil 26. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.	55
Şekil 27. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonu için birinci derece adsorpsiyon kinetiği grafiği	58
Şekil 28. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonu için ikinci derece adsorpsiyon kinetiği grafiği	59
Şekil 29. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinin tekrar kullanım grafiği.....	61
Şekil 30. <i>E. coli</i> hücre özütünden elde edilen RNA fraksiyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü	62
Şekil 31. Seyreltme katsayısına bağlı olarak RNA adsorpsiyonu	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. RNA Saflaştırma için afinite kromatografi yöntemleri.....	16
Çizelge 2. Boyut aralığına karşılık gözeneklilik yüzdeleri	45
Çizelge 3. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri.....	56
Çizelge 4. İzoterm kinetiği katsayıları.	59
Çizelge 5. Seyreltme oranlarına karşılık A_{260}/A_{280} ve Q değerleri.....	63
Çizelge 6. Literatür özeti	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

W_0	Kuru mikrokriyojelin ağırlığı (g)
W_m	Polimerleşme öncesi kimyasalların ağırlığı (g)
W_s	Su tutmuş mikrokriyojelin ağırlığı (g)
W_1	Denge şişme oranına ulaşmış mikrokriyojellerin ağırlığı (g)
W_2	Denge şişme oranına ulaşmış mikrokriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığı (g)
Q	Adsorplanan RNA miktarı
C_0	Başlangıç RNA derişimi
C	Adsorpsiyon sonrası RNA derişimi
V	Çözelti hacmi

Kısaltmalar

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
FPLC	Hızlı Performanslı Sıvı Kromatografisi
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
APS	Amonyum persülfat
TEMED	Tetrametil diamin
VPBA	Vinil fenil boronik asit
HEMA	Hidroksietil metakrilat
BAC	Boronat Afinite Kromatografisi
RFC	Ters Faz Sıvı Kromatografisi
AEC	Anyon Değişim Kromatografisi

IEC	İyon Değişim Kromatografisi
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit
µCT	Bilgisayarlı Makrokromatografi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
MS	Kütle Spektrometresi
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi

1. GİRİŞ

Ribonükleik asit (RNA) canlı yaşamı için vazgeçilmez bir moleküldür. RNA; gen kodlama, kod çözümü ve gen ekspresyonu görevlerini gerçekleştirerek deoksiribonükleik asit (DNA) ile beraber doğada yaşam formlarını düzenlemektedir. Özellikle günümüzde giderek önemi artan RNA bazlı tedavi süreçleri de göz önüne alındığında; RNA barındıran terapötik ajanların geliştirilmesi önem arz etmektedir. RNA'nın gen düzenleme fonksiyonunun işlevselliği sayesinde kanser gibi ciddi kayıplara sahip olan hastalıkların tanı ve tedavisinde RNA odaklı yeni stratejiler geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu hususta, biyokimyasal ve biyofarmasötik süreçlerin iyileştirilebilmesi adına RNA'nın saf ve denatüre olmayan halde elde edilmesi gerekmektedir. Bu da yüksek oranda RNA'nın kaliteli bir şekilde saflaştırılması demektir [1,2]. Klasik RNA ayırma yöntemlerinin uzun süreli olması, istenilen saflığa ulaşılamaması ve bozunmuş halde RNA eldesine sebep olması saflaştırma işlemi için dezavantaj oluşturmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için afinite etkileşimlerine dayanan kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Afinite kromatografisi; ilgili bileşene yönelik spesifik ayırma sağlayan yüksek seçiciliğe sahip bir tekniktir. Afinite kromatografi yönteminin bir alt sınıfı olan boronat afinite kromatografisi, cis-diol grupları içeren RNA gibi biyomoleküller ile boronat grupları arasında etkileşimlere dayanarak saflaştırma sağlayan güçlü bir yöntemdir. Alkali koşullar altında (genellikle pH: 8.0 ve üzeri) kovalent bağlar üzerinden gerçekleştirilen bağlanmalar ile ilgili RNA adsorbe edilmektedir. Sonrasında gerçekleştirilen desorpsiyon işlemi ile de RNA yüksek kalitede saflaştırılmaktadır [3,4].

Enzim, polisakkarit, antikor gibi protein temelli biyomoleküllerin ayırımı söz konusu olduğunda verimliliği arttırmak için kromatografik yöntemlere ek olarak kriyojel olarak adlandırılan biyopolimerler kullanılmaktadır. Kriyojeller, donma noktası altındaki sıcaklıklarda sentezlenen yüksek gözenek boyutu ve mekanik özelliklere sahip biyopolimerlerdir. Çözücü olarak genellikle su kullanılmasından dolayı maliyeti düşük ve biyoyumluğa sahip alternatif bir ayırma materyalleri olarak göze çarpmaktadır. Çeşitli boyut ve şekillere sahip olan kriyojeller, mikron boyutlarda da sentezlenmektedir [5,6]. Mikrokriyojel olarak adlandırılan mikron boyutlu kriyojeller minyatür boyutları, yüksek oranda esneklikleri, hücre korunuma elverişli yapıları sayesinde doku mühendisliği çalışmalarında ön plana çıkmaktadır [7].

Sunulan tez çalışmasında, *E. coli* hücrelerinden polimerik mikrokriyojeller ile RNA saflaştırılması amacıyla PHEMA ve üç farklı poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojelleri hazırlanmıştır. Hazırlanan mikrokriyojellerin karakterizasyonu incelemeleri yapılmış, RNA adsorpsiyon çalışmaları analiz edilmiştir. Analizler sonucunda optimum koşullar belirlenerek kinetik veriler hesaplanmıştır. Mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ATCC 25922 kodlu *E. coli* hücreleri kullanılarak RNA özütü elde edilmiştir. Bu özüt kullanılarak RNA eldesi gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RNA molekülü ve yapısı

RNA (ribonükleik asit), kodlama, kod çözme, düzenleme ve gen ekspresyonu gibi doğada yaşamın tanımlandığı her kısmında çok büyük bir role sahiptir. DNA (deoksiribo nükleik asit) ile birlikte her bir yaşam formu için gereken nükleik asitleri bünyesinde barındırmaktadır [1]. Ribonükleik asit (RNA), canlı yapıların birçoğunun barındırdığı hayatsal fonksiyonları yerine getiren birbileşendir. RNA molekülünün yapısal olarak riboz şekerlerinin bağlandığı azotlu bazlar ve fosfat gruplarından meydana gelmektedir. Azotlu bazlar arasında adenin, guanin, urasil ve sitozin içermektedir. RNA çoğunlukla tek sarmallı biçimde bulunmaktadır [2]. Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışma sayesinde RNA'nın tek sarmallı yapısına ek olarak tek RNA iplikçiklerinin melezleşebileceği ve bir çift oluşturmak üzere birbirine yapışabileceği keşfedilmiştir [8]. RNA, çeşitli uzunluklara ve yapılara sahip olabilen bir moleküldür. Dolayısıyla, RNA sentezinin araçları ve çalışma şekli ökaryotlar ve prokaryotlar arasında farklılık göstermektedir. Spesifik RNA molekülleri gen ekspresyonu işlemini sağlayarak tedavi süreçlerinde terapötik ajanlar görevini yerine getirecek potansiyele sahiptir [9]. RNA'nın bu denli çoklu yapısı ve hücre içerisinde yer aldığı görevler, üzerinde çalışma yapılan öncelikli moleküllerin başında olmasını sağlarken elde edilen her bir bulgu ile de biyolojik süreçlerde bir gelişme kaydedilmektedir.

2.2. RNA Saflaştırma

RNA saflaştırma, özellikle birçok viral, bakteriyel ve parazitik hastalıkların teşhisinde, kalıtsal bozuklukların diagnozunda, tümörlerde ve ayrıca temel araştırmalarda önemli olan bir dizi hazırlayıcı ve analitik yöntemin kritik bir önceki adımıdır [10]. Yaşam bilimlerini esas alan laboratuvar ölçekli çalışmalar için RNA'nın saflaştırılması ve analiz edilmesi son derece elzemdir; ancak, RNA ile çalışmak için gereken hassasiyet ve tekniklerin yoksunluğu bu alandaki çalışmalarını kısıtlamaktadır [11].

Bununla beraber, RNA'nın donmuş veya taze dokulardan, hücre duvarlarından, PCR ürünlerinden ya da uzun miadlı kimyasalda korunmuş örneklerden efektif olarak ve tekrarlanabilir bir şekilde saflaştırılması gerekmektedir. Prensipte olarak, RNA saflaştırma yöntemleri üç gruba ayrılmaktadır. İlk yöntem grubu, organik fenol:kloroform

özütlemesine dayanmaktadır. İkinci grup, spesifik yüzeyleri bağlama yeteneği aracılığıyla kaotropik tuz varlığında RNA saflaştırma yöntemlerini kapsamaktadır. Üçüncü grup, eş yoğunluklu gradyanlar üzerinde RNA izolasyonunu kullanan yöntemleri içermektedir [12].

Son yıllarda, RNA saflaştırmasında artan zorlukların üstesinden gelmek için kromatografik tekniklerin kullanıldığı çeşitli stratejiler araştırılmıştır. Yapay RNA çalışmalarında yaşanan gelişmeler, çok miktarda RNA üretimi için verimi yüksek ve ucuz yöntemleri gündeme getirmiştir. Bunlara örnek olarak; Ters fazlı (RP) ve iyon değişim (IE) [14-16] ve anyon değişim kromatografisi (AEC), RNA saflaştırması için kapsamlı yöntemler olarak tanımlanmaktadır [40]. Bu kapsamda, sentetik tekniklerin uygulanmasıyla kimyasal modifikasyon olasılığı azaltılarak kararsız ve bozunmuş RNA eldesi oranı azaltılmaktadır [13].

2.3. Kromatografi

Rus botanist M.S.Tswett, yüzyılın başlarında kromatografinin keşfine genel olarak katkılarda bulunmuştur. Yeşil yaprak pigmentlerini ayırtmak için renklendirilmiş bantlara kolon boyunca süzülmesine izin veren toz kalsiyum karbonat kolonlarını kullanmıştır. Tswett'in yapmış olduğu çalışmaları da dahil ederek, literatüre bakacak olursak birçok bilim insanı kromatografi sürecinin gelişmesine adına önemli katkılarda bulunmuştur [17,18]. Bunların arasında, 1952'de bölme kromatografisinin (R.L.K. Syngé ile) icadı için nobel ödülü alan A.J.P. Martin yer almaktadır. A.T. James ile gaz-sıvı kromatografisi literatüre kazandırılmıştır. Bu bilim insanlarının deneysel çalışmalarının sonucu olarak kromatografi, temel araştırmalar ve yaşam bilimlerinde kullanılan önemli bir teknik haline gelmiştir.

Kromatografi esasen, ayrılacak bileşenler bir sabit ve bir hareketli faz olmak üzere belirli bir yönde süzülerek iki faz arasında dağıtıldığı fiziksel bir ayırma yöntemidir. Kromatografik işlem, örnek bileşenlerin sabit bir yüzey doğrultusunda ilerlerken gerçekleşen adsorpsiyon/desorpsiyon işlemlerini kapsamaktadır. Bu ilerleyiş sonucu olarak gerçekleşen ayırma olayı, örnek bileşenlerin dağılım sabitlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Kromatografik yöntemler arasındaki başlıca farklar hareketli faz özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Gaz kromatografisi için hareketli faz gaz, inert durumdaki gazdan

oluşmaktadır. Süperkritik sıvı kromatografisinde hareketli faz kritik sıcaklık ve basıncın üzerinde olan yoğun bir gazdır (sıvı). Sıvı kromatografisinde ise hareketli faz, vizkositesi düşük bir sıvıdan oluşmaktadır. Sabit faz genellikle gözenekli yoğun homojen bir yataklı tüp (kolon) içerisine doldurulmuş işletme basınçlarında çalışabilen, granüler toz formundadır.

Gözenekli katı yapısına sahip olan sorbentler yüksek yüzey alanı içermektedir. Sorbentler, benzer bir katı bir ligandın yüzeyine bağlanmasıyla modifiye edilebilmektedir veya ince bir sıvı filmi için destek olarak kullanılmaktadır. Alternatif olarak, sabit faz, kolonun merkezinden açık bir geçit bırakarak kılcal boyutlarda açık bir borunun çeperi üzerinde ince bir film veya tabaka olarak dağıtılmaktadır.

İnce tabaka kromatografisi için; sorbent, düz bir cam veya benzeri âtil bir arka plaka üzerine ince, homojen bir tabaka halinde yayılmaktadır. Bu durumda hareketli faz, kılcal kuvvetlerin etkisiyle veya özel cihaz kullanılıyorsa, zorlanmış akış işlemiyle katman boyunca hareket etmektedir.

Günümüzde elüsyon işlemindeki gelişimler ile kromatografi tekniğine katkı sağlanmaktadır. Bu yöntem, hareketli faz (elüent) içerisinde analiz edilecek numunenin küçük bir hacminin girişi ve numunenin çeşitli bileşenlerinin kolon yatağını terk ederken zamanla ayrılan derişim bantlarının şeklini içermektedir [3].

Yer değiştirme kromatografisi, güçlü bir şekilde tutulan çözünen maddelere uygulanabilen elüsyon kromatografisinin bir türüdür. Numune bileşenlerinin, durağan faz ile etkileşme yeteneklerine göre kolon üzerinde bölgelere dağıldığı varsayılmaktadır.

Kromatografik bir deneyden elde edilen bulgular, derişimin bir kaydı veya hareketli fazın hareketinin bir fonksiyonu olarak örnek bileşenlerinin kütle profilini oluşturmaktadır. Gözlenen piklerin sayısına dayalı olarak numunenin ne kadar çok bileşene sahip olduğu; pik pozisyonunun doğru tanımlamasına bağlı olarak numune bileşenlerinin kalitatif tanımı, kantitatif değerlendirme ile göreceli derişimi ya da her pikin miktarı ve kolon performansı hakkında bulgular kromatogramdan kolayca elde edilen bilgilerdir [3].

2.3.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, biyomolekülleri içeren biyolojik örneklerin ve farmasötik ajanların dahil olduğu çalışmalarda ayırma işlemi için önemli bir teknik haline gelmiştir.

Belirli bir molekülün çok bileşenli bir karışımdan (hareketsizleştirilmiş) bir ligand ve çözünenin spesifik etkileşimi sayesinde saflaştırılması için en çeşitli ve güçlü kromatografik yöntemdir. Afinite kromatografisi, son derece geniş bir bağlanma afinite uygulamaları tarafından oluşturulan etkileşimi karakterize etmek için bir araç görevi görmektedir. Afinite kromatografisi, çözünen madde hazırlama ve saflaştırma adımlarına ek olarak reaktanların fonksiyonel rollerini araştırmak için önemli bir potansiyel sunmaktadır.

Ek olarak, biyoafinite ve kromatografinin birleşimi, afinite kromatografisinin doğuşunu sağlamıştır [4]. Afinite kromatografisi numune bileşenlerinin ayrılması ve spesifik analizi için biyolojik benzeri etkileşimlerden yararlanan bir tür sıvı kromatografisidir [19,20]. Teknik, yüksek seçicilik, dolayısıyla yüksek çözünürlük ve genellikle ilgili protein için yüksek kapasite olanağı sunmaktadır. Saflaştırma işlemi birkaç bin kat civarında gerçekleşebilmektedir ve geri kazanım genellikle çok yüksektir [21].

Afinite kromatografisi (afinite saflaştırması olarak da adlandırılır), moleküller arasındaki spesifik bağlanma etkileşimlerini kullanmaktadır. Yöntem, hedef moleküle özel bir ligandın kimyasal olarak etkisizleştirilmesini veya katı bir destek vasıtasıyla "tutunmasını" kapsamaktadır. Böylelikle kolona çok bileşenli bir örnek verildiğinde, ligand ile özel etkileşimlere sahip olan moleküller bağ yapmaktadır. Sonrasında örnekteki bağlanmayan bileşenler yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Bağlı haldeki hedef molekülün, destekten ayrılması sağlanarak orijinal örnekten saflaştırılmaktadır. Böylelikle çok çeşitli biyolojik makromoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Afinite saflaştırması, katı polimerik matris üzerinde belirli bir ligandın kovalent immobilizasyonu ile hazırlanan bir afinite adsorban üzerinde biyolojik bir makromolekülün etkileşiminin ve dolayısıyla adsorpsiyonunun seçiciliğine dayanmaktadır [22].

Enzimlerin ve biyolojik olarak önemli diğer makromoleküllerin afinite kromatografisi ile seçici izolasyonu ve saflaştırılmasında, ligandları spesifik ve geri dönüşümlü olarak bağlamak için proteinlerin benzersiz biyolojik özelliklerinden yararlanılmaktadır [23]. Bir ham hücre lizatı veya başka bir numunedeki diğer proteinlerden ve bileşenlerden ilgili bir proteini zenginleştirmek veya saflaştırmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [24].

Günümüzde, pH, iyonik güç veya sıcaklığa dayalı geleneksel saflaştırma tekniklerine kıyasla afinite kromatografisine giderek önem verilmektedir. Bununla beraber, tüm

saflaştırma tekniklerinin %60'dan fazlasının afinite kromatografisi içerdiği belirtilmektedir [25,26]. Afinite kromatografisi moleküler tanıma stratejisini temel alan matris ve ligand arasındaki etkileşimlere bağlı bir yöntemdir. Dolayısıyla da geniş uygulanabilirliğe sahiptir [29].

Afinite kromatografisi aşağıda yer alan aşamaları içermektedir:

A.Örnekteki hedef molekülün sabitleştirilmiş haldeki ligand ile bağ yapması amacıyla örneği afinite desteği ile inkübe etme.

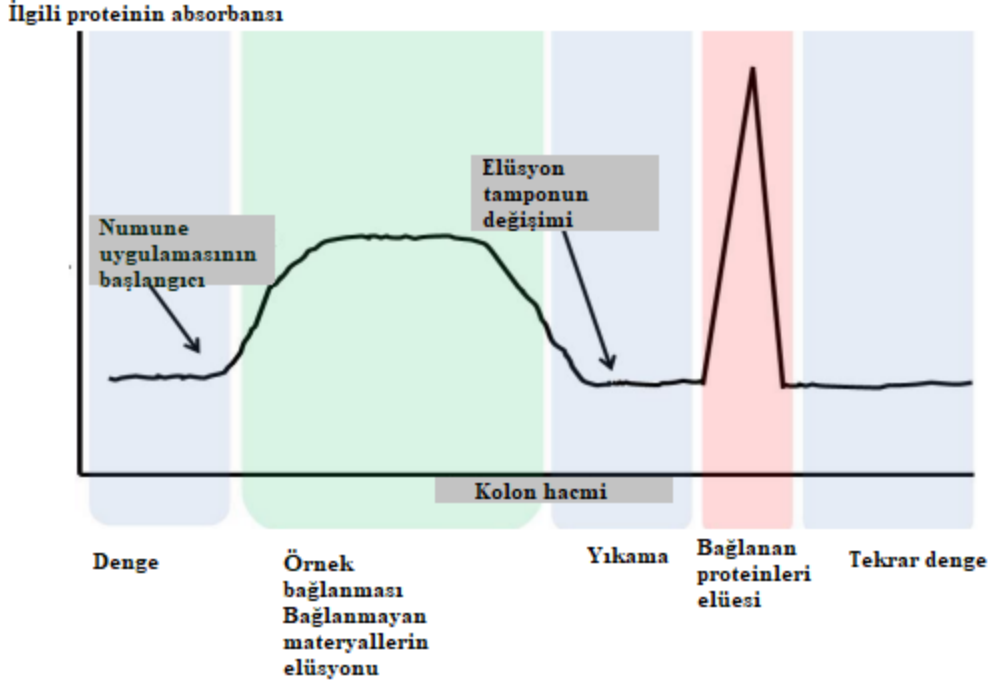
B. Afinite desteğinden bağlı halde bulunmayan örnek bileşenlerinin yıkanarak uzaklaştırılması.

C. Ortam koşullarının değiştirilmesi ile hedef molekülün sabitleştirilmiş haldeki ligand molekülünden elüe edilmesi (saflaştırılması). (Bağlanma etkileşimi artık oluşmamaktadır [27].)

Afinite saflaştırması önemli ölçüde zaman tasarrufu ve birkaç yüz kat veya daha yüksek saflaştırma olanağı sağlamaktadır, ancak başarı kullanılan yönteme göre değişmektedir. Bu nedenle, verimli yakalama ve hedef molekülün geri kazanımında maksimum seviyeye ulaşmak için saflaştırma protokolünü optimize etmek önemlidir [28].

2.3.2. Afinite Kromatografisinin Metodolojisi

Hedef proteinin örnek bileşenleri içerisinde ayrılması amacıyla kullanılan Afinite kromatografisi tekniğinde hedef protein ve ligand arasında tersinir etkileşimler gerçekleşmektedir. Proteinlerde ligand ile spesifik bağlanmayı sağlayan yapısal olarak tanıma bölgeleri bulunmaktadır.



Şekil 1. Geleneksel afinite kromatografi saflaştırma grafiği [29].

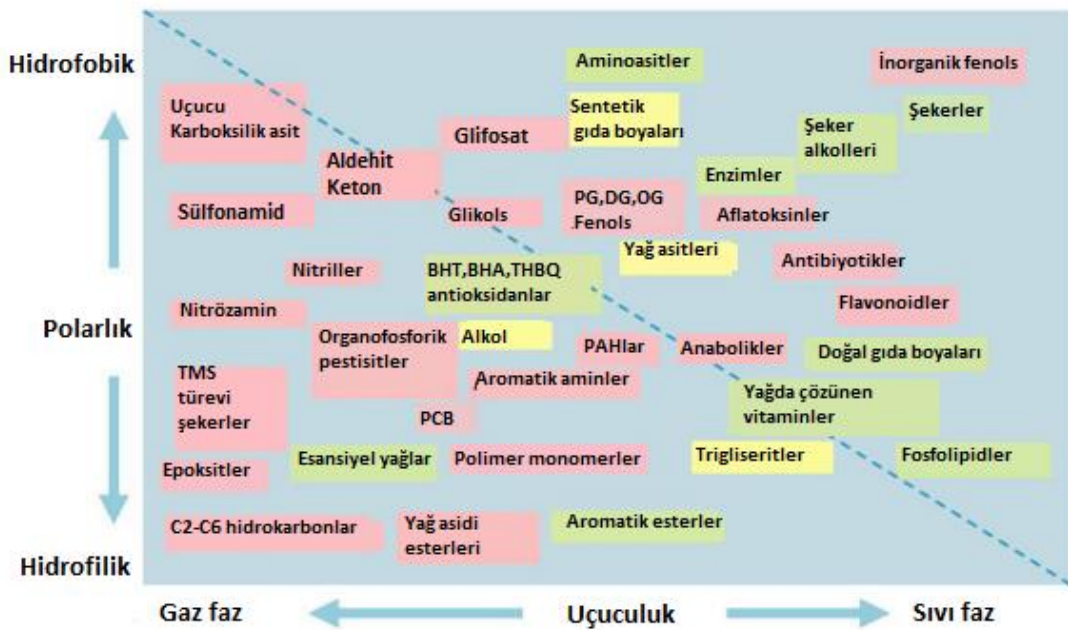
Geleneksel bir afinite saflaştırması tekniği yukarıda Şekil 1’de verilmiştir. İlk olarak, numune afinite ligandı ile maximum bağlamayı destekleyen koşullar altında işlenmektedir. Numune işlenmesinden sonra, bağlanmayan maddeleri uzaklaştırmak için yıkama işlemi gerçekleştirilmektedir, istenen (bağlanmış) molekül afinite desteğine tutunmuş halde bulunmaktadır. Bağlı molekülü serbest bırakmak ve uzaklaştırmak için bir desorpsiyon adımı ya (1) spesifik yarışçı bir ligand veya (2) ortam koşullarını değiştirerek spesifik olmayan bir şekilde uygulanmaktadır. (Örneğin iyonik kuvveti, pH’ı veya polariyeti değiştirerek) [30] Elüsyon adımı gerçekleştirilirken, saflaştırılmış protein derişik şekilde toplanmaktadır.

2.3.3. Afinite Kromatografisi ile Biyomoleküllerin Saflaştırılması

Antikorlar ilk olarak tavşan anti-sığır serum albümin antikorlarını izole etmek amacıyla afinite kromatografisinden yararlanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmaları için sığır serum albümini selüloz desteği üzerine afinite ligand olarak kullanılmıştır. Sonrasında, bu teknik genişletilerek enzimin immobilize edilmiş bir inhibitörünü kullanılmasıyla mantar tirozinaz saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. O zamandan beri, afinite

kromatografisi enzimler, rekombinant proteinler, antikorlar ve diğer biyomoleküller gibi biyomolekülleri saflaştırmak için yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. [29].

Afinite kromatografisi yüksek özgüllüğe sahip, kolay işletilebilen, yüksek verimde biyomolekül saflaştırma imkanı sunmasıyla çalışmalarda çokça yer almaktadır. Ek olarak, afinite kromatografisi saflaştırılacak biyomoleküllerdeki patojenlerin uzaklaştırılması kabiliyetine sahip bir yöntemdir. Genel olarak, biyomolekül saflaştırma için kullanılan afinite ligandlarının ilişki sabitleri $10^3 - 10^8 M^{-1}$ aralığındadır [31]. Bu tür saflaştırmalarda kullanılan yaygın bir afinite ligandı bir antikordur, ancak biyomimetik boya ligandları, DNA, proteinler ve küçük peptitler gibi diğer afinite ligandları da kullanılmaktadır. Şekil 2’de afinite kromatografisi aracılığıyla ayrıştırılabilen moleküllerin polarite ve uçuculuk özelliklerine ait şema yer almaktadır. Makromolekül ve ligand etkileşimlerinin kendi aralarındaki biyospesifikliği, afinite kromatografisinin geliştirilmesinde bir kilit taşı görevi görmektedir. [32].



Şekil 2. Afinite kromatografisi aracılığıyla ayrıştırılabilen moleküllerin polarite ve uçuculuk özelliklerine ait şema [29].

2.3.3.1. Afinite Desteği (Matrix)

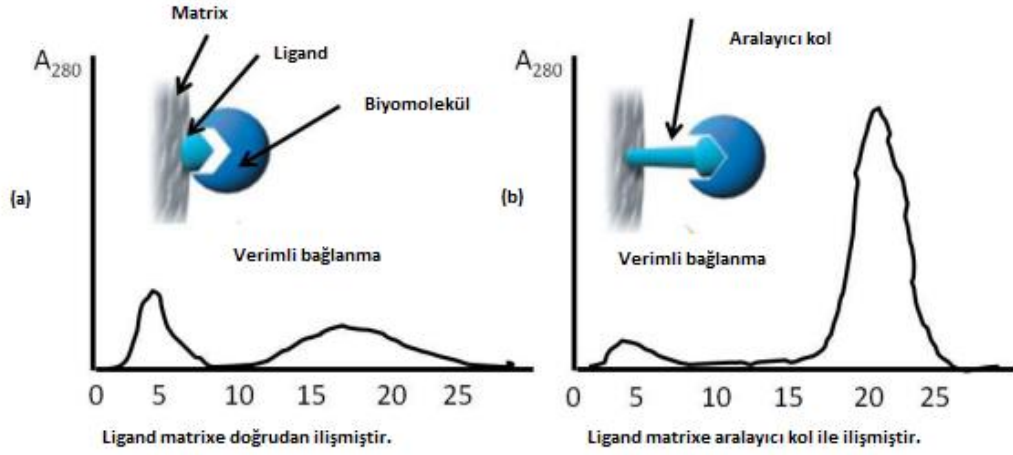
Afinite kromatografisinde kullanılan destek materyalleri, belirli özelliklere sahip olmalıdır. Ligand eklentisi için matrisin kimyasal ve fiziksel olarak inert yapıda olması gerekmektedir. Bir afinite kromatografik yöntemin seçimi ve tasarımı, destek malzemenin seçiminden kaynaklanmaktadır. Bir desteğin ucuz olması ve çözünen maddelerin hareketsizleştirilmiş afinite ligandına hızlı, engelsiz bir şekilde erişime izin vermesi idealdir. Bununla beraber destek, ayrılma sırasında tamamen pasif bir rol oynamalı ve aynı zamanda istenen afinite ligandını bağlayabilmelidir [33].

2.3.3.2. Aralayıcı Kol

Aralayıcı kol, sterik engellemenin herhangi bir olumsuz etkisini engellemek amacıyla ligand ve hedef molekül arasındaki bağlanmayı geliştirmek için kullanılmaktadır [35]. Hedef molekülün bağlanma bölgelerinin bazı durumlarda daha derinde konumlanmakta ve dolayısıyla erişimi zorlaştırmaktadır. Bu gibi durumlarda aralayıcı kol bir köprü görevi görerek bağlanma verimliliğini arttırmakta ve etkileşime dahil olmaktadır. Bu aralayıcı kolların uzunluğu önem arz etmektedir. Çok kısa veya çok uzun kollar, bağlanmanın başarısız olmasına ve hatta spesifik olmayan bağlanmaya neden olmaktadır. Genellikle, aralayıcı kollar 1000 Da'dan küçük molekülleri birleştirirken kullanılmaktadır [27-34].

İdeal ara kol özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Maddeyi uygun bir mesafede tutacak kadar uzun (en az 3 atom) olmalıdır.
2. Spesifik olmayan bir bağlanmaya neden olmamak için inaktif olmalıdır.
3. Hem destek hem de numune ile tepkime için iki fonksiyonel gruba sahip olmalıdır [36].

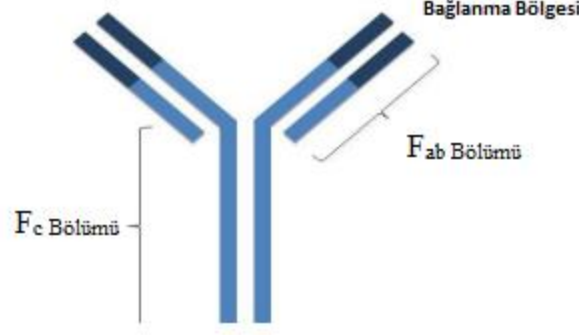


Şekil 3. Ligand ve matrixin (a) aralayıcı kolsuz ve (b) aralayıcı kol varlığında bağlanması [29].

2.3.3.3. Ligand

Ligandlar, belirli bir hedef moleküle veya hedef moleküller grubuna geri dönüşümlü olarak bağlanan moleküllerdir [16]. Afinite ligandı olarak çeşitli sayıda materyaller kullanılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllere ek olarak gelişmiş yapıya sahip olmayan moleküllerin de kullanımı mevcuttur.

Antikorlar, yüksek özgüllükleri ve nispeten büyük bağlanma sabitleri dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajları sayesinde biyoseçici afinite ligandlar olarak çalışmalarda yer almaktadır. Şekil 4'te bir antikorun yapısı görselde sunulmuştur. Afinite kromatografisinde poliklonal antikorlar (Farklı hücre grupları tarafından sentezlenmektedir) monoklonal antikorlara (Bir hücre kültüründe büyütülebilen bir hibridom oluşturmak için bir karsinom hücresi ile birleştirildiğinde sentezlenmektedir.) kıyasla daha az tercih edilmektedir. Çünkü antijen özelliklerinin korunarak daha yüksek oranda adsorpsiyon kapasitesi elde edilmektedir [27-34].

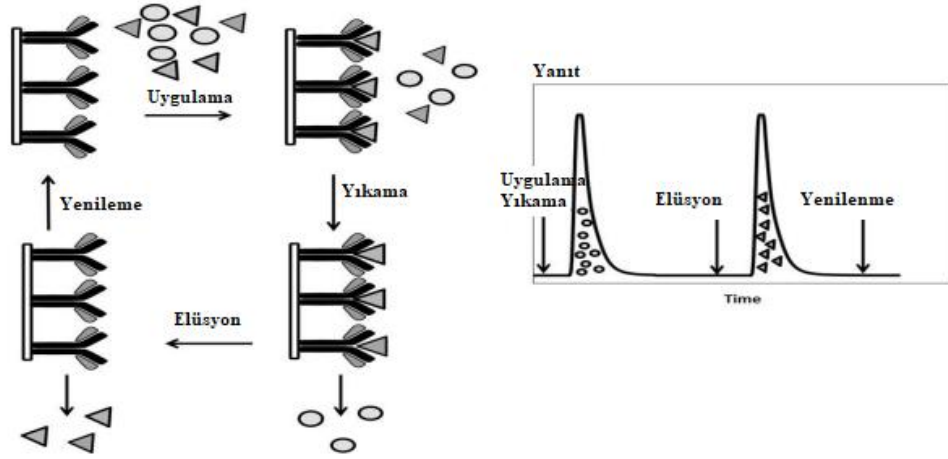


Şekil 4. Bir antikorun tipik yapısı [29].

Çok bileşenli karışımlardan biyomolekülleri saflaştırmak için kullanılacak başka bir afinite ligandı türü, boya ligandıdır. Boya ligand kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi yardımıyla piruvat kinazı saflaştırmak için kullanılmıştır ve Blue Dextran'ın (küçük bir boya molekülü) protein ile elüe olduğunu bulgusuna erişilmiştir [37].

2.3.3.4. Afinite Kromatografisi için Temel Bilgiler

Klasik afinite kromatografisi ve HPLC'de bir saflaştırma yapmak için izlenen süreç Şekil 5'te gösterilmiştir. Öncelikle, ayrıştırılacak molekül veya analit aracılığıyla sabitleştirilmiş ligand ile etkileşimin gerçekleşeceği ortam koşullarında kolona bir örnek ilave edilmektedir. Bu uygulama koşulları, tipik olarak, ligandın ve hedefinin doğal ortamını taklit eden bir pH ve iyonik güce sahip sulu bir tamponun kullanımını içermektedir. Örnekte yer alan ligand ile bağ yapmayan moleküller uzaklaştırılarak tutulmayan bir pik noktası göstermektedir. Sonraki adımda, hedef molekülü afinite ligandından ayırmak için bir elüsyon tamponu kullanılmaktadır. Bu elüsyon adımı, pH'ı değiştirerek veya hedef molekülü kolondan çıkarmak için rakip bir ajan ekleyerek gerçekleştirilebileceği gibi, hedef molekülün elüsyonunu desteklemek için sıklıkla hareketli faz bileşiminin değiştirilmesini gerektirmektedir. Bu elüsyon aşamasında, bağlı halde bulunmayan hedef molekül sonrasında analiz edilmek üzere toplanmaktadır. Hedef molekül ayrıştırıldıktan sonra, kolon bir sonraki örnek uygulamadan önce orijinal uygulama tamponundan geçirilerek yeniden oluşturulmaktadır [41,42].



Şekil 5. Afinite kromatografisi ve genel kromatogram için açık/kapalı elüsyon formatı [29].

2.4.RNA Saflaştırma Yöntemleri

2.4.1. Ters Faz (RP) ve İyon Değişim (IE) Kromatografisi

Ters faz kromatografisi, hidrofobik etkileşimlere dayalı bir ayırma yöntemidir. Buna ek olarak, iyon eşleştirme kromatografisi bir iyon eşleştirme reaktif varlığında işletilen, yüksek çözünürlüklü ters faz kromatografinin geliştirilmiş bir türü olarak tanımlanmaktadır [41]. Aslında, her iki yöntem de yapay oligoribonükleotitler veya biyolojik RNA ile ilgili yapılan çalışmalarda, RNA molekülünün izolasyonu söz konusu olduğunda HPLC'nin çok işlevli yapısına katkıda bulunmaktadır [40].

RNA saflaştırılmasına yönelik olarak kullanılan bu yöntemlerde, reçinelerin belirli bir doldurma limitinin bulunması ve hareketli faz bileşenlerinin ucuz fiyatlara sahip olmaması bu yöntemlerin işlevselliğini sınırlandırmaktadır. Bununla beraber, bir takım organik çözücü ve iyon değişim ajanlarının kullanımı hedef molekülün yüksek saflıkta eldesini zorlaştırmaktadır [42].

Saflaştırılmak istenen RNA'nın kararlılığını ve biyolojik etkinliğini sürdürmek amacıyla HPLC ters faz kolonları 60°C'de bir kolon fırınına yerleştirilmektedir. Böylelikle işlem sırasında oluşabilecek yan ürünler imha edilmektedir [41]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, daha hassas bir ayırım sağlanabilmesi için iyon değişim ve ters faz HPLC yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu terapötik mRNA bu teknik yardımıyla belirli bir oranda saflaştırılmıştır [43,44].

Bu kromatografik teknikler, başarılı sonuçlar elde edilmesine olanak verse de işlem sırasında kullanılan toksik kimyasallar dezavantajdır. Bu durum biyoteknoloji sektörü düşünüldüğünde hem çevre hem de maliyet açısından organik bileşiklerin kullanımı olumsuz etkiler doğurmaktadır. Bunun yanı sıra geri kazanılan RNA ürünlerinin, terapötik amaçlarda kullanılabilmesi için birçok işleme tabi tutulması gerekmektedir [45].

2.4.2. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC)

Boyut dışlama kromatografisi, RNA izolasyonundaki gelişmelere ayak uyduran bir tekniktir. RNA içeren bir numunedeki bileşenleri molekül boyutları farkına bağlı olarak ayırımını gerçekleştirmektedir. Bunun yanı sıra oligonükleotit saflaştırılması işlemi için kullanılan en kolay yöntemdir.

SEC, HPLC ile saflaştırılmış kısa oligoribonükleotitlerden tuzların çıkarılmasında bir cilalama adımı olarak katkıda bulunmuştur. Bu ekstra tuz giderme biçimi, saflaştırmadan taşınabilecek eser sentez yan ürünlerinden veya eser çözücülerden kaynaklanan sitotoksik etkileri önlemektedir [46]. Ek olarak, bu teknik, in vitro transkripsiyon ile elde edilen homojen uzunluktaki RNA'nın saflaştırılmasında hazırlayıcı denatüre edici PAGE'ye alternatif bir yöntem olarak araştırılmıştır [47-49]. Reaksiyona girmemiş nükleotidlerin, enzimlerin, kısa abortif transkriptlerin ve istenen RNA ürününden yüksek moleküler ağırlıklı pDNA şablonunun verimli bir şekilde ortadan kaldırılmasına izin veren hızlı performanslı sıvı kromatografisi (FPLC) sistemleri kullanan SEC tabanlı saflaştırma şemaları geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar, monomerik RNA'nın oligomerize RNA'dan özel olarak ayrılmasına izin veren ve RNA toplanmasına ve bozulmasına neden olabilecek sert çökeltme adımlarından kaçınan denatüre olmayan koşullar altında gerçekleştirilmiştir [46]. Bununla birlikte, SEC bazlı teknikler, proteinlerin uzaklaştırılmasında fenol/kloroform özütlenme, tuzun giderilmesi ve örnek derişimi gibi birkaç süre dezavantajı bulunan hazırlık aşamaları gerektirmektedir [50].

2.4.3. Anyon Değişim Kromatografisi (AEC)

RNA'nın polianyonik yapısı sebebiyle anyon değişim matrislerine dayanan kromatografik çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Anyon değişim kromatografisi tekniğinde, hareketli faz bileşenlerinin elektrostatik etkileşimleri yardımıyla tuz ve tamponların varlığında ayırma gerçekleştirilmektedir. Bu ayırma işlemi baz çiftlerinin

hidrofobik karakterinden yararlanılmaktadır [51]. Ek olarak, AEC’de elüsyon işlemi için su kullanılması ve daha kolay işletilmesi sebebiyle oligonükleotit moleküllerinin ayırımında RP’den daha çok tercih edilmektedir [52].

Bununla birlikte, bazı AEC stratejilerinde, yüksek çözünürlüğe sahip molekül eldesi için yüksek işletim sıcaklıkları ve sert alkali koşullarının gerekliliği molekül bozunmalarına yol açmaktadır. Bu durum, saflaştırma işlemi için hem maliyet hem süreç uzunluğu hem de iş yükü açısından dezavantaj oluşturmaktadır [53-56]. Bununla beraber, endüstriyel alanda yapılan çalışmalarda anyon değişim stratejisinin kullanıldığı monolitik kolonlar yardımıyla gerçekleştirilen saflaştırma işlemleri kısa süreli ve geniş çözünürlüğe sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir [57].

RNA ayırım işlemlerinde yapay RNA’ların kimyasal modifiye işlemine tabi tutulması sebebiyle istenmeyen safsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda, kromatografik fonksiyonelliği arttırmak amacıyla çeşitli anyon değiştirici reçineler araştırılmıştır [58,77,78]. Bu yeni reçineler, laboratuvar koşullarında anyon değişim kromatografisi ile monolitlerin seçicilik ve kütle transferi özellikleri ile kombinlenmektedir. Bunun sonucu olarak hedef molekülün analiz çalışmaları daha kolay hale getirilmektedir [23].

Anyon değişim kromatografisi zayıf ve güçlü anyon değiştiriciler varlığında stabilitesi korunmuş yapıda RNA eldesine olanak vermektedir. Fakat bu aşamada yavaş kütle transferi ve düşük bağlama kapasitesi, büyük biyomoleküllerin endüstriyel saflaştırılmasında engeller oluşturmaktadır. Bu olumsuzlukları giderebilmek adına RNA saflaştırılması için yeni koşulların ve yeni teknolojilerin geliştirilmesi gerekmektedir [59,60].

2.4.4. RNA Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisinin kullanımı, hedef molekülün seçici saflaştırılması için moleküler tanıma gibi doğal biyolojik süreçleri simüle etme ve bunlardan yararlanma benzersiz özelliği nedeniyle terapötik açıdan faydalı ürünlerin geliştirilmesinde yararlı bir platform haline gelmiştir [61]. Genel kapsamda, proteinlerin ayırımı, protein etkileşimlerinin analizi, biyofarmasötik ve teşhislerin iyileştirilmesi süreçleriyle beraber biyoteknolojik uygulamalarda afinite yöntem ve kavramları çalışmalarda çokça yer almaktadır [62].

Afinite kromatografisinin en göze çarpan özelliği, çeşitli fiziksel etkileşimlerle (elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri) hedef biyomolekülün spesifik ligand tarafından biyolojik olarak tanınarak ayırım gerçekleştirilmesidir. Buna bağlı olarak teknik, yüksek bir seçicilik ve çözünürlüğe sahip olmaktadır. Böylece hedef biyomolekül, saflıkta binlerce kat artış ve yüksek geri kazanım ile bir adımda ham bir numuneden ayrılmaktadır [63]. Elüsyon aşaması, özel olarak rekabetçi bir ligand kullanılarak veya özel olmayan şekilde, kullanılan matrise ve biyomoleküllerin kimyasal özelliklerine bağlı olarak pH, iyonik kuvvet veya polarite değiştirilerek gerçekleştirilmektedir [64]. Genel olarak, afinite yöntemleri ek adımları ortadan kaldırma, verimi artırma ve proses ekonomisini iyileştirme avantajlarına sahip bir tekniktir.

Afinite kromatografisinde her zaman mevcut olan bir eğilim, daha seçici, sağlam ve/veya tekrarlanabilir ligandların araştırılması olmuştur. Biyomoleküllerin saflaştırılması için seçici ligandların tasarımı karmaşık, zaman alıcı ve pahalı olmasına rağmen, bunların afinite kromatografi süreçlerine uygulanması, akış adımlarının azaltılması ve ürün kalitesinin iyileştirilmesi gibi önemli ekonomik avantajlar [65] ile sonuçlanmaktadır. Biyomoleküllerin terapi amaçlı imalatında seçicilik, güvenilirlik, uygun maliyet gereksinimleri afinite kromatografi teknikleri aracılığıyla karşılanmaktadır [66,67]. Bununla birlikte RNA'ya özgü kimyasal yapı ve hücredeki birçok molekülle etkileşimi içeren biyolojik işlevdeki çok yönlülüğün yanı sıra, RNA'nın tek iplikli doğası göz önüne alındığında RNA tanıma işlevi sırasında yüksek baz maruziyeti ve etkileşimler için uygunluğu [68], afinite kromatografisini RNA hazırlanmasında yaygın bir uygulama haline getirmektedir. (Çizelge 1)

Çizelge 1. RNA Saflaştırma için afinite kromatografi yöntemleri (cGMP, mevcut iyi üretim uygulamaları; PAGE, poliakrilamid jel elektroforezi; SRP, sinyal tanıma partikülü; ncRNA, kodlamayan RNA; rRNA, ribozomal RNA; SPE, katı faz özütlenmesi) [13].

AFİNİTE TÜRÜ	PRENSİP	AVANTAJLAR	KISITLAMALAR
BAZ EŞLEŞTİRME	MRNA molekülleri üzerinde bulunan poli(A)kuyrukları	Yüksek mRNA verimi	Poliadenil mRNA izole etmez.

	özellikle hareketsizleştirilmiş oligo(dT) ile etkileşime girer.	cGMP kalitesi Toplam RNA'nın ara izolasyonu olmadan kullanılabilir.	
AFİNİTE ETİKETLERİ	İlgili RNA, Sephadex veya streptavidin reçinelerine sıkıca bağlanması için tasarlanmış oligoribonükleotid sekansları (aptamerler) ile etiketlenir. Bir matris üzerinde hareketsizleştirilmiş Tetrahymena termofili M4 veya ticari Ni ²⁺ -afinite sütunu, sırasıyla ilgili RNA'ya dahil edilen SRP RNA veya MS2 kaplama proteini bağlama kök döngülerini spesifik olarak tanır.	RNA'nın hücre lizatlarından izolasyonuna izin verir. Doğal biyolojik etkileşimlere dayalı afinite etiketi kullanan güçlü metodolojiler Afinite etiketlerinin kararlılığı In vitro transkripsiyon ile hazırlanan RNA'nın saflaştırılmasında preparatif PAGE'ye etkili bir alternatif. Doğal biyolojik etkileşimlere dayalı yakınlık etiketleri kullanan sağlam metodolojiler. Yüksek geri kazanımlar.	Yüksek geri kazanımlar için sıralı arıtma İyileştirmede denatüre edici koşulun kullanılması Afinite etiketinin RNA'ya eklenmesiyle ilgili sorunlar Tasarım değerlendirmelerinde zaman alıcı.
AMİNOASİTLER-RNA	Hareketsizleştirilmiş aminoasitler, histidin veya arginin, ve RNA molekülleri arasında	Tek bir RNA tipini izole eder.	Yüksek tuz derişimlerinin gerekliliği (histidin için)

	birden fazla etkileşim oluşur.	<p>Tek bir işlemde eş zamanlı ncRNA ve rRNA izolasyonu</p> <p>Biyolojik toplam RNA'nın fenol / kloroform ve SPE saflaştırmalarına etkili bir alternatif</p> <p>RNA saflaştırmasında çok yönlülük</p> <p>Kararlı ligandlar</p> <p>Yüksek geri kazanım verimi</p>	
--	--------------------------------	---	--

2.4.4.1. Oligo(dT) Kromatografisi

Günümüzde, mRNA saflaştırması için tercih edilen ve efektif şekilde kullanılan afinite kromatografi stratejisi olup, neredeyse tüm ökaryotik mRNA moleküllerinde bir poli(A) kuyruğu bulunması dolayısıyla, A ile T'nin nükleotid baz eşleştirme özgülüğüne dayanmaktadır. Bu stratejiler, doğrudan biyolojik bir numuneden veya önceden izole edilmiş bütün haldeki RNA'dan mRNA saflaştırmasına izin vermektedir. mRNA zenginleştirme tipik olarak oligo(dT)-selüloz içeren kitler kullanılarak elde edilmektedir [69], ancak biyotinlenmiş oligo(dT), streptavidin kaplı lateks veya silika gibi diğer oligo(dT)-türetilmiş ortamlar da kullanılmaktadır [70,71]. Bu yöntemler, yüksek verimlilik ve saflıkta mRNA moleküllerinin saflaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca, kolay işletilebilir ve güvenilir olması nedeniyle diğer izolasyon prosedürleri arasında yaygın olarak tercih edilmektedir [72]. Bununla birlikte, bu afinite tekniklerinde gerçekleşen belirli etkileşimlerin varlığı, bazı ön işleme tabi tutulmayan mRNA'nın saflaştırılmasına olanak vermemektedir [73].

2.4.4.2. RNA Afinite Etiketleri

RNA afinite etiketleri de son yıllarda hücre özütlerinden RNA'ların izolasyonu için etkili ürünler olarak rapor edilmektedir [74,75]. Bu etiketler, ligandların üstel zenginleştirme

(SELEX) yöntemiyle sistematik evrimi kullanılarak belirli bir liganda karşı afinite için seçilen RNA aptamerlerine (hedef moleküle bağlanabilen peptid molekülleri) dayanmaktadır. Bu kapsamda yeni stratejilerin geliştirilmesi ile, hücrel özütlerden RNA'ların saflaştırılması için birçok RNA aptameri kullanılmaktadır. [76,77]. SELEX, spesifik bir moleküle bağlanmak için istenen özelliklere sahip hemen hemen tüm oligoribonükleotid dizilerinin seçilmesine olanak veren bir yöntem olmasının yanı sıra bu aptamerlere spesifik afinite reçinelerinin gerekliliği ve bu reçinelerin maliyeti bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bununla beraber, hedef RNA molekülü eldesi için katlama, sterik blokaj ve RNA tutulumu gibi birçok ön aşama gerektirmektedir. Bu nedenle, daha yüksek RNA zenginleştirmeleri söz konusu olduğunda denatürasyon koşullarının varlığı ve birkaç ön saflaştırma prosedürü uygulamaları bu yöntem için sınırlama oluşturmaktadır [74-78].

Buna paralel olarak, daha sonra yapılan araştırmalarda, afinite süreçlerinin iyileştirilmesi adına hızlı, büyük ölçekli ve doğal RNA saflaştırması sağlanmıştır. Bu yeni süreçler ile, afinite kolonları vasıtasıyla spesifik olarak protein- RNA saflaştırılması başarılmaktadır. Yöntem olarak afinite etiketleri; spesifik bir RNA bağlayıcı protein immobilize edilmesini kapsamaktadır [79,80]. Afinite saflaştırma metodolojileri kristalografik uygulamak için gerekli RNA'nın miktar tayinine ve saflaştırılmasına olanak vermektedir [54]. Hedef RNA'ya geniş alanda uygulanabilir olması bu sistemlerin en büyük avantajı olmakla beraber uzun optimizasyon süreçlerine yol açabilecek birkaç tasarım sorunu ve etiketleri bağlama gerekliliği dezavantajlarını oluşturmaktadır [78]. Afinite etiketleri, makromoleküler hedeflerin incelenmesi için faydalı araçlardır. Polipeptid afinite etiketleri, protein komplekslerinin saflaştırılması ve saptanmasında rutin olarak kullanılmaktadır [74]. Bununla beraber, istenilen proteine bağlı olarak farklı özelliklere sahip, ilgili proteine kaynaşabilen çeşitli popüler protein afinite etiketleri de bulunmaktadır. Bunlardan bazıları glutatyon S-transferaz (GST) [83] ve protein A [84] gibi tam uzunlukta bulunan proteinlerden oluşmaktadır; diğerleri polihistidin [85,86] veya FLAG [87] gibi kısa polipeptitlerden oluşmaktadır.

Bu etiketlerin tümü, bir liganda yüksek afinite ile bağlanmakta ya da saflaştırma amacıyla bir kromatografi reçinesi üzerinde hareketsiz hale getirilebilmektedir [88]. Saflaştırma işlemi sonucunda hedef makromolekül bir yarışçı ajan vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılmaktadır [74].

2.4.4.3. Amino Asit Bazlı Afinite Kromatografisi

Son zamanlarda, afinite kromatografisi için hareketsizleştirilmiş ligandlar olarak amino asitlerin kullanımı, RNA moleküllerinin saflaştırılması için etkili bir metodoloji olarak kullanılmış ve uygulanmıştır [89,90]. Bu uygulamalar, protein ve nükleik asitler arasında histidin, arginin v.b. amino asitlerin bulunduğu farklı spesifik etkileşimlerin gerçekleştiği varsayımını yansıtmaktadır [91]. Ayrıca, RNA-protein arayüzleri üzerinde gerçekleştirilen birkaç atomik ve moleküler tanıma çalışması, belirli amino asitler ve nükleotit bazları arasında meydana gelen seçimli etkileşimleri öngörmektedir [92-94].

Amino asit bazlı afinite kromatografisi yardımıyla, yapay oligoribonükleotitlerin yanı sıra prokaryot veya ökaryot hücrelerden toplanan çeşitli biyolojik RNA moleküllerinden doğal koşullar altında yüksek bütünlük ve saflıkla RNA preparatları hazırlanabileceği bulgusu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Biyolojik RNA'ların kullanımı, oligoribonükleotid sentezindeki gelişmeler nedeniyle birçok uygulamada eskisi kadar popüler olmasa da, doğal RNA'ların çoğu, kimyasal veya enzimatik sentez altında yeniden üretilmeyen post-transkripsiyonel modifikasyonlara sahiptir [95] ve modifikasyonların bazıları oldukça yüksektir. Bu nedenle, hücrel mekanizmaların çalışılmasının yanı sıra, düzenleyici kodlamayan RNA'nın farmakokinetik ve farmakodinamik analizleri ve biyobelirteç değerlendirmelerinde biyolojik matrislerden RNA moleküllerinin çıkarılması ve saflaştırılması için etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır [96].

2.4.4.4. Boronat Afinite Kromatografisi

Yeni yüzyılın başından beri, -omikler'in çeşitliliği artmakta, özellikle proteomik, metabolomik ve glikomik, gibi terimler daha fazla ilgi görmektedir. Glikoproteinler ve glikopeptidler içeren proteomik, nükleositler ve modifiye edilmiş metabolomikte nükleositler ve glikomiklerde sakkaritler dahil- omik çalışmalarında birkaç büyük alan kaplayan biyomoleküller cis-diol barındıran bileşenleri kapsamaktadır.

Karbonhidratlar, glikoproteinler, RNA ve nükleositleri barındıran cis-diol içeren biyomoleküller önemli bileşenlerdir. Bu moleküller, yaşam bilimlerini baz alan uygulamalarda temel analitler olarak yer almaktadır. (Örneğin, proteomik, metabolomik ve glikomik). Biyolojik öneme sahip birçok cis-diol molekülü örneklerde çok düşük miktarda bulunurken girişim yapan maddeler yüksek miktarda bulunur. Böylelikle -omik

analizlerinde zorlu adımlara karşılık spesifik yakalama ve hedef cis-diol biyomoleküllerin efektif zenginleştirilmesi anahtar bir adım haline gelmektedir.

Borolat-afinite kromatografisi (BAC), cis-diol içeren moleküllerin spesifik izolasyonu ve kazanımı için bir araçtır. Bu kapsam dahilinde içerisinde boronik asit fonksiyonel grubu içeren kromatografi işlemleri "Borolat Afinite Kromatografisi" çerçevesi etrafında birleşmektedir. Bu çerçeve, hedef bileşenin diol grupları ile borolat grupları arasındaki etkileşimler sayesinde şekillenmektedir. 1,2 diol; 1,3 diol bileşiklerinin yanısıra 1,2 hidroksi asit ve 1,2 hidroksilamin içeren bileşikler de borolatlarla kompleks oluşturmaya elverişlidir [97]. Karbonhidrat, nükleozid ve nükleik asit grubu birçok sayıda molekül borolat afinite kromatografisi yöntemi adı altında borolat gruplarının hareketsizleştirilerek afinite ligandı olarak işletilmesi sonucu ayrıştırılmaktadır [98]. Bu ayrışmada, hidroksil grupları ve borolat ligandı arasındaki birincil etkileşimler yürütücü kuvvet görevi görmektedir. Oluşacak komplekste hidroksil grupların dizilimi ve borolat ligandının yönelimi önemlidir. Borolat gruplarından gelecek anyonun hidroksil molekülleri aynı düzlemsel dizilimde veya bitişik C atomlarında etkileşmesi gerekmektedir. Bazı monosakkaritler için uyumlu cis-dioller ile kuvvetli bağlanmalar gözlemlenmektedir. Spektrofotometre, NMR, kromatografi, X-ışınları kırınımı v.b. yöntemler ile bu kompleksler analiz edilmektedir [99].

Biyomoleküller pH'ın 7.0'dan yüksek olduğu durumlarda kararsızlık göstermektedir. Bu engeli aşabilmek adına bazik şartlarda iyonlaşan fenil boronik asit türevi yapılara başka elektron bağlayıcı moleküller eklenerek bu engel azaltılmaktadır (Ör: venilfenilboronikasit).

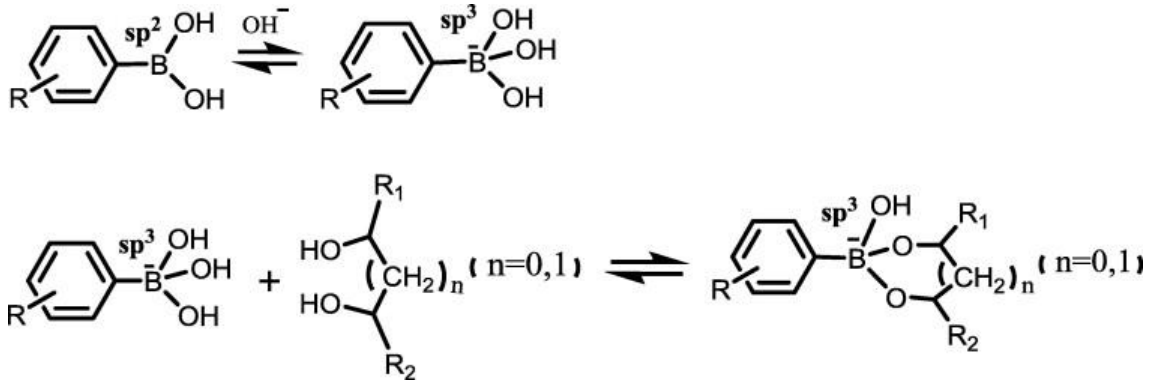
Son yapılan çalışmalarda, monolitik kolon tabanlı BAC yöntemi daha fazla ilgi görmektedir. RNA, nükleotid, nükleosit, glikoenzim, glikopeptitspesifik ayrımı kapsamında çeşitli BAK monolitik kolonları geliştirilmiştir ve etkileyici uygulamalar gösterilmiştir. Poliakrilamid, agaroz ve poliakrilat temalı jeller destek malzemeleri (monomer) olarak işlev görmektedir. Ayrıştırılmak istenen biyomolekülü içeren numune kolondan geçirilerek spesifik olarak destek materyaline adsorblanmakta ve sonrasında etkileşime uyumlu desorpsiyon ajanını barındıran hareketli faz yardımıyla elüsyon gerçekleşmektedir.

Boronik asit içeren polimerik temelli taşıyıcılar biyomoleküllerin ayrılması-saflaştırılması ve immobilizasyonunda büyük öneme sahiptir. Borolat molekülleri ile cis

diol grupları arasındaki özel etkileşimler bu önemi kanıtlamaktadır. Aktif grupların derişimi ve kimyasal tepkimenin verimliliğine bağlı olarak jel matrise boronik asit barındıran ligand bağlanmaktadır. Boronik asit içeren polimelerde en çok rastlanılan monomerlere selüloz, agaroz ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) rnek olarak verilmektedir. Literatürde m-aminofenil boronik asit en çok tercih edilen ligand molekülü olarak çalışmalarda kullanılmıştır. Ayrıyaten, boronik asit içeren polimerin (jelin) boronik asit miktarı ile ayrıştırılmak istenen molekül miktarı arasında orantı bulunmaktadır. Polimerdeki (jel) boronat fonksiyonel grubu kimyasal etkinleştirme ile artırılmaktadır fakat bu kısımda yüksek toksiteye sahip kimyasalların kullanımı, biyolojik uygulamalar için sorun teşkil etmektedir.

Birçok biyolojik süreçte ve hastalık teşhisinde cis-diol içeren biyomoleküller önemli görev üstlenmektedir. Örneğin moleküler tanıma, hücreler arası ve hücre içi sinyalizasyon, bağışıklık tepkisi ve sperm-yumurta etkileşimlerinde glikoproteinler kilit noktalarda yer almaktadır. Klinik kanser araştırmalarında Afetoprotein (AFP) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) gibi glikoproteinler biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [100].

Boronat-afinite kromatografisi (BAC), glikoproteinler [101], [102], nükleositler [103], [104] ve sakkaritler [105] gibi cis-diol içeren moleküllerin seçici izolasyonu ve kazanımı için güçlü bir metottur. Prensipte, alkali koşullar altında (genellikle pH 8.5 veya daha yüksek) boronik asit ligandları ve analitlerin cis-diol kısmı arasında siklik esterlerin oluşumuna ve çevresel koşul asidik olarak değiştirildiğinde siklik esterlerin ayrışmasına dayanmaktadır. Boronik asitler ve cis-diol içeren bileşikler arasındaki tepkimenin genel formülü Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu pH'a bağlı kimya, boronik asitleri moleküler tanıma için mükemmel ligandlar yapar, bu da sakkaritler için boronik asit bazlı kimyasal algılamanın oluşmasına ve 1970'lerde BAK'ın icadına [106] yol açmıştır [107].



Şekil 6. Boronik asit ve cis-diol grupları arasındaki etkileşim [105].

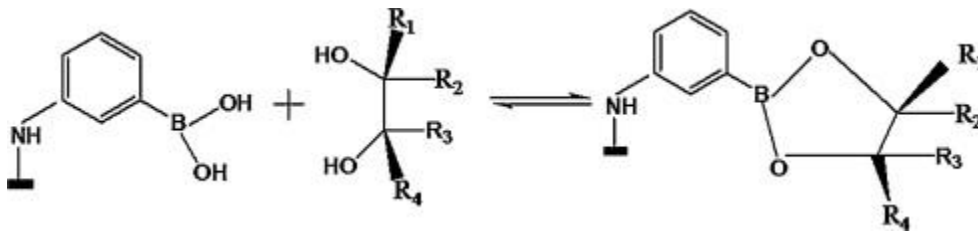
BAC çeşitli özellikler sergilemektedir. Birincisi, geniş spektrumlu afiniteye sahiptir, bu nedenle bir boronik asit ligandı, hepsini olmasa da cis-diol biyomoleküllerinin çoğunu yakalayabilmekte, bu da onu küresel- omik analizler için çok faydalı hale getirmektedir. İkinci olarak kovalent tepkimeler üzerinden yürümektedir. Bu sebeple, spesifik olmayan etkileşimlerle gerçekleşen adsorpsiyon, uygun koşullarda altında etkisizleştirilmektedir. Böylelikle yüksek özgüllük sağlamaktadır. Üçüncüsü, yakalama/bırakma aşaması ortam koşulları değiştirilerek kolaylıkla yönlendirilebilmektedir. Dördüncü olarak, desorpsiyon hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir, dolayısıyla bu da analit taşınmasını sınırlandırmaktadır. Son olarak, elüsyon orta asidik koşullarda gerçekleştirildiğinden, bu yaklaşım kütle spektrometrisi (MS) ile çok uyumludur ve - omik analizlerdeki uygulamaları kolaylaştırmaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında, boronik asit-işlevselleştirilmiş malzemeler, özellikle proteomik [109-112] ve metabolomiklere [113,114] olan ilgi giderek artmaktadır.

Boronat afinite matrisleri daha önce yapılan çalışmalarda şekerlerin ve nükleik asitlerin ayrılması amacıyla geliştirilmiştir [115]. Ayrıca bu matrisler, lektinler [116] ve neoglikorpteinler [111]; katekol sideroforlar [112], timin glikol DNA ve nükleotidler [119]; serin proteazlar [120] gibi çeşitli cis-diol içeren bileşik türlerinin ayrılması için araştırmalarda kullanılmıştır. Boronat afinite kromatografisi de nükleositler, nükleotidler ve 2'3'diol etkileşim grubuna sahip olduğu için riboz nükleik asidin ayrılmasında başarılı bir etkinlik göstermektedir. DNA ve RNA içeren örnekten RNA'nın ayrılması boronat etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Çünkü DNA molekülünde 2'hidroksil grubunun olmaması ve boronat ligandları ile esterleşmeye izin vermemesi onu etkileşime girmekten alıkoymaktadır [121-123]. Bu alanda yapılan çalışmalarda ilk olarak adenozin, sistidin

gibi farklı ribonükleositlerin ayrımı için pH 8.0 noktasında dextran ve selüloz türevlendirilmiş bipolar 2-[(4-boromofenil)-metil]-etilamonyum] etil çözelti polimer sistemi kullanılmıştır [124]. Sonrasında ise ısı yanıtı poly(N-isopropilakrilamit)-ko-(vinilfenilboronik asit) [poly(NiPAAm-coVPBA)] latez partiküller [125], poly(stiren-co-vinilfenilboronik asit-ko-divinilbenzen)terpolimer bazlı mikropartiküller [126] ve aminofenil boronik asit (APBA) modifiyeli hidrojel boncuklar [127] nükleotit adsorpsiyon-desorpsiyon davranışlı çalışmalarda dolgulu kolon sistemi için yeni bir sorbent olarak işletilmiştir.

Geliştirilen bu stratejilerle beraber yapılan çalışmalarda biyomoleküllerin ayrımında monolitik matrislerin birçok avantajının olduğu belirtilmiştir [128,129].

Monolitik sütunlar herhangi bir iç partikül boşluğu içermeyen, sürekli entegre gözenekli ayrıştırma ortamı sağlamaktadırlar [130]. Hareketli faz, dolgulu gözenekli boncuk kolonlarına kıyasla daha hızlı konvektif kütle aktarımını gerçekleştirmek amacıyla basınç altında açık kanal ağlarından kolaylıkla akmaktadır. Bu boronat fonksiyonelleştirilmiş kolonlar cis-diol içeren biyomoleküllerin [131,132] özellikle nükleosit ve flavin adenin dinükleotidlerin ayrımı için sentezlenmektedir [133-135].



Şekil 7. Boronat gruplarının asidik ve bazik koşullar altında değişimi.

Bazik koşullar altında, boronat grupları hidroksillenir ve trigonal eş düzlemlı yapısından bir tetrahedral boronat anyonu oluşmaktadır. Etkileşimler asidik koşullar altında tersine çevrilebilir hale gelir [108].

2.5. Biyopolimerler

Dünyada her yıl yaklaşık 140 milyon ton sentetik polimer üretilmektedir. Polimerler son derece kararlı olduklarından biyosferdeki bozunma döngüleri sınırsızdır. Atık plastiklerin ve sentetik polimerlerin neden olduğu çevre kirliliği sebebiyle biyopolimerler giderek

artan bir popülariteye sahip olmaktadır. Ayrıca plastikler ve polimerler bozulmaya karşı gösterdikleri direnç ve sahip oldukları kararlı yapıları nedeniyle düzenli depolama sahalarının ağırlıkça yaklaşık %8'i ve hacimce %20'si oranında çevrede birikmektedir [136].

Polimerler, uzun zincirler oluşturmak üzere birbirine bağlanan ayrı yapı taşlarından oluşan bir "dev" moleküller sınıfıdır. Basit yapı taşlarına monomer adı verilmektedir. Biyopolimerler, tüm organizmaların büyüme döngüleri sırasında doğal koşullar altında oluşan doğal polimerler olarak tanımlanmaktadır. Bu doğal polimerler, hücreler içinde karmaşık metabolik süreçlerle oluşturulmaktadır. Malzeme uygulamaları için en ilgi çekici olan biyopolimerlere selüloz ve nişasta örnek olarak verilmektedir. Bununla beraber biyopolimer ile yapılan çalışmalarda bakteri ve mantarlar tarafından üretilen daha karmaşık hidrokarbon yapıdaki polimerlere nazaran, özellikle ksantan, curdian, pullulan, kitin, kitosan ve hyaluronik asit gibi polisakkaritler daha çok tercih edilmektedir [137]. Biyobozunur polimerlerin önemi her geçen gün artmaktadır ve mevcut araştırmalar daha yeni biyolojik olarak parçalanabilen polimerler üretme konusuna odaklanmaktadır. Tüm organizmaların büyüme döngüleri sırasında doğada çok sayıda biyobozunur polimer sentezlenmekte veya oluşturulmaktadır. Bunları parçalayabilen bazı mikroorganizmalar ve enzimler literatürde tanımlanmaktadır [138].

2.5.1. Biyopolimerlerin Sentezi ve Fonksiyonları

Canlı madde çok çeşitli ve farklı yapıdaki polimerleri sentezleyebilmektedir ve çoğu organizmada bu biyopolimerler hücre sel kuru maddenin büyük bir kısmına katkıda bulunmaktadır. Bu biyopolimerler, organizmalar için aşağıdakiler gibi oldukça farklı temel işlevleri yerine getirmektedir:

- Genetik bilginin korunumu ve tanımlanması.
- Tepkimelerin katalizi, karbon, enerji veya diğer besinlerin depolanması.
- Diğer hücrelerin saldırılarına, zararlı çevresel faktörlere, biyotik ve abiyotik faktörlerin algılanmasına karşı savunma ve koruma.
- Çevre ve diğer organizmalar ile iletişim.

Tüm biyopolimerler, sitoplazmada, hücrelerin çeşitli kompartımanlarında veya organellerinde, sitoplazmik membranda veya hücre duvarı bileşenlerinde, hücre

yüzeyinde veya hatta hücre dışı olarak enzimatik işlemlerle sentezlenmektedir, bir biyopolimerin sentezi bir kısımda başlatılabilir, bir hücrenin ve meydana geldiği gibi başka bir bölümde devam ettirilebilmektedir [139-141].

2.6. Kriyojeller

Kriyojelasyon (Yunanca don veya buz anlamına gelen krios [kryos], kriyojeller olarak adlandırılan belirli bir hidrojel alt kümesi popülasyonu üretmek için geliştirilen nispeten yeni bir biyosentetik işlemdir. Bu işlem sırasında, yüksek düzeyde birbirine bağlı makro gözenekli ağlara sahip 3D hidrofilik, hidrofobik veya amfipatik yapılu kriyojeller sentezlenmektedir [142-143]. Kriyojelasyonda, çözücünün donma noktasından düşük koşullarda düşük veya yüksek moleküler ağırlıklı öncülerin bekletilmesi sonucu jelleşme ve ardından buz çözme aşamaları gerçekleşmektedir [142]. Genel olarak, toksik organik çözücülerin kullanımına kesin bir ihtiyaç olmaksızın hemen hemen her türlü sulu veya susuz, organik veya inorganik bileşik kullanılabilir [143-146]. Bu teknikte, buz kristalleri porojenler (nidus için gözenek oluşumu) ve döngünün erime aşaması sırasında makro gözenekler oluşturarak gözeneklerin boyutunun kontrol edilmesini sağlamaktadır [147]. Diğer bir deyişle, monomerik ya da polimerik öncülerin, bir çözücü içerisinde çözündürülmesi ve daha sonra kristallenmeye neden olması için dondurulması, donmamış bir sıvı fazda öncülerin dondurularak derişik hale getirilmesi kriyojellerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır [148].

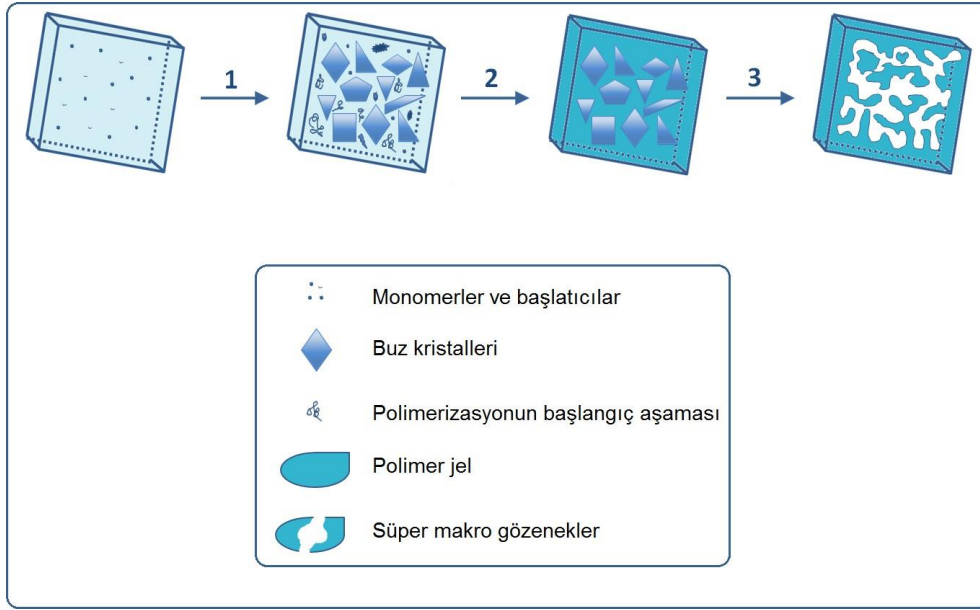
Geleneksel ayırma ortamının daha az verimli olduğu durumlarda, kriyojeller ilginç ayırma materyalleri olarak görev yapmaktadır. Biyoayırma ve saflaştırma alanında literatürde yapılmış çok sayıda kriyojel uygulaması vardır [149-152]. Bu alandaki uygulamalara; enzimler, polisakaritler, proteinler, antikorlar gibi biyomoleküllerin immobilizasyonu; virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografik ayrımı; hedef moleküllerin kompleks medyadan yakalanması ve çevresel süreçler için ayırıştırma örnek olarak verilebilmektedir [153].

Kriyojellerin hazırlanmasında en çok kullanılan çözücü hem çevresel hem de güvenlik açısından cazip bir seçim olan sudur. Bununla birlikte, suyun kullanılması başlangıç maddesinin seçilmesini suda çözünür bileşiklerle sınırlar ve böylece işlem hidrofilik kriyojellerin oluşumu ile sonuçlanır. Dimetilsülfoksit, dioksan, formamid, nitrobenzen, benzen ve sikloheksan gibi organik çözücülerin hidrofobik kriyojellerin hazırlanması için

kullanılabileceği gösterilmiştir [154-156]. Hem sulu hem de organik çözücüler için, öncüllerin yoğunlaştığı dondurulmamış bir sıvı fazın oluşumu, kriyojellerin oluşturulması için bir ön koşuldur. Bu nedenle, belirli sıcaklık gereksinimleri mevcuttur. Bunlar, sistemi dondurmak için yeterince düşük sıcaklıklar ve sistemin ötektik noktasının altında olmayan sıcaklıklardır. Bu şartların her ikisini de yerine getiren ılımlı donma sıcaklıkları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir karışımın dondurulması, başkalarıyla temasa geçinceye kadar büyüyen buz kristallerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu buz kristallerinin birbirine bağlanması daha sonra jel yapısındaki birbirine bağlı gözeneklerin oluşumuna neden olmaktadır [142-144]. Numunelerin çözülmesi, çözücü kristallerinin kopyası olan, birbirine bağlı gözenekli, ince ve yoğun duvarlı bir ağı oluşturmaktadır. Buz kristallerinin sonucu olarak oluşan gözenekler genellikle 1-200 µm aralığındadır. Polimerik ağın yüzey gerilimi ve gözeneklerdeki çözücü sonucunda gözenekleri çevreleyen duvarlar bükülmekte, böylelikle gözeneklerin yuvarlak şekilleri oluşmaktadır. Bununla birlikte, kriyojelin duvarındaki gözenek ağı, numune dondurulduğunda oluşan donmamış fazın kopyasıdır [158,159]. Oluşan çözücü kristalleri kriyojellerin son yapısını düzenlemektedir; böylece donma sıcaklıkları, buz kristalleşmesini kontrol etmede önemli bir rol almaktadır. Düşük donma sıcaklıkları, daha fazla buz çekirdeklenme alanı oluşturmakta, böylece daha küçük gözeneklerle sonuçlanacak çok sayıda buz kristali elde edilmektedir [160].

Geleneksel kovalent jellerin oluşumuna benzer şekilde, kovalent kriyojeller, ya monomerik öncüllerin çapraz bağlama polimerizasyonu veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin çapraz bağlanmasıyla (kimyasal olarak ya da ışıma ile) hazırlanmaktadır. Bu polimerizasyon türlerinin tamamında kriyojelasyon basamakları temelde aynı şekilde gerçekleşmektedir. Kriyojelasyon basamakları aşağıda sıralanmıştır:

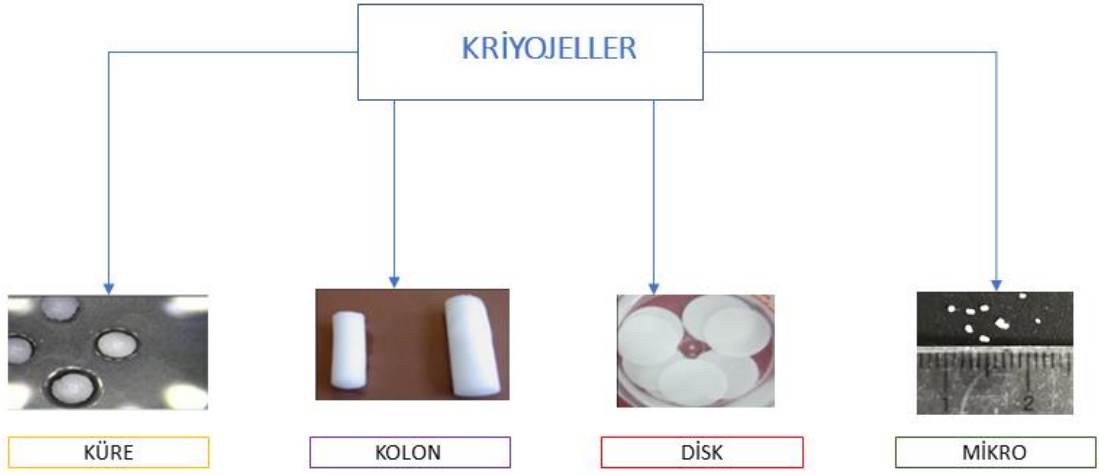
1. Polimer öncüllerinin dondurulması,
2. Donmuş sistemin inkübasyonu,
3. Donmuş sistemin çözünmesidir.



Şekil 8. Kriyotropik jelleşmenin şematik gösterimi [194].

Kriyojeller, makromoleküler çözünenlerin etkin kütle taşınmasına, hücresel tohumlama ve göç için erişim kolaylığına, esnek mekanik özelliklere, yüksek mikro-çevresel biyouyumluluğa izin veren makro gözenekli yapısal ağlara sahip olmaları nedeniyle geleneksel hidrojellere kıyasla daha geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir [146]. Kriyojellerin mekanik özellikleri, polimerlerin veya çapraz bağlayıcıların derişimi, donma süresi, sıcaklık ve soğutma hızı değiştirilerek farklı gereksinimlerine göre farklı kriyojel uygulamaları uyarlanabilmektedir [161,162].

Kriyojeller kolon, disk ve küre gibi çeşitli şekillerde hazırlanabilmektedir [5] (Şekil 9). Kriyojellerin, biyomoleküllerin ayırımında kullanılması için monolitik kolonlar şeklinde üretimi, şırıngaların çıkışı kapatılarak tepkime çözeltilisini şırıngaların içine doldurduktan sonra jelleşme sıcaklığına getirilen kriyostatın içine daldırılmasıyla hazırlanmaktadır [6]. Dondurulmuş desenin aynısını yeniden üretebilmek için her sentezde aynı hacimde tepkime çözeltilisi ve aynı boyutta şırınga kullanılmalıdır [163]. Kriyojelleşme tepkimesi tamamlandıktan sonra, kriyojel kolonlar oda sıcaklığına getirilmekte ve tepkimeye girmeyen maddelerin uzaklaştırılması için iyi bir çözücü ile yıkanmaktadır. Kriyojeller iki cam tabaka arasında çözeltilisinin enjektör ile ilave edilmesiyle disk şeklinde de hazırlanabilmektedir.



Şekil 9. Farklı şekillerde hazırlanmış kriyojeller [194].

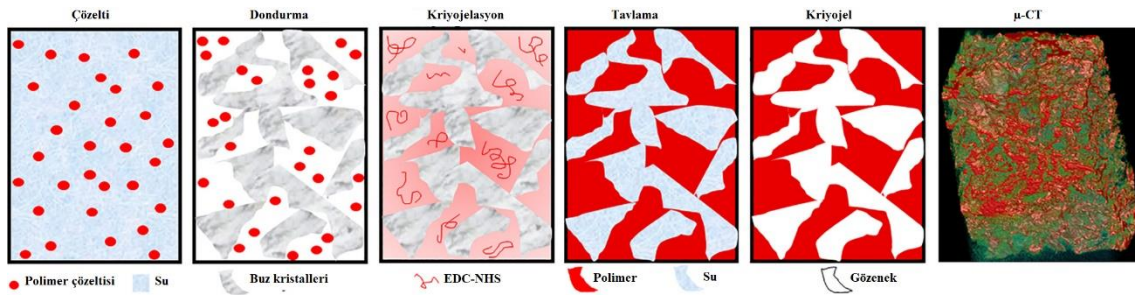
Kriyojellerin sahip olduğu sünger benzeri makro gözenekli sistem, daha hızlı bir şişme kinetik profiline ve fiziksel deformasyonu önleyen önemli ölçüde geliştirilmiş visko-elastik özelliklere izin vermektedir. Ek olarak, makro gözenekli kriyojeller, geleneksel homofaz nano gözenekli hidrojellerin daha sınırlı difüzyon kabiliyetinin aksine, hücresel sızma ve geçişin kolaylaştırılması dahil olmak üzere çözünen maddelerin engellenmemiş konveksiyonel kütle taşınımına izin vermektedir [164]. Bu özellikler ile makro gözenekli yapısı, kriyojelleri doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir biyo-iskele platformu yapmaktadır.

Hidrojellere göre bu önemli faydalar göz önüne alındığında, kriyojeller doku mühendisliği ve hücresel terapilerdeki uygulamalar için teknolojik bir gelişmeye sahiptir [5,142]. Bu nedenle, yeni kriyojellerin tasarımı ve oluşumu artık doku rejenerasyonu için geleneksel biyomühendislik yaklaşımlarına önemli ve umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır [165].

2.6.1. Kriyojellerin Sentezi

Monomerlerden ve/veya polimerlerden kriyojellerin doğrudan sentezi, kriyojel oluşumundan sonra fonksiyonel grupların eklenmesi, sentezlenen kriyojellerin diğer polimerlerle birleştirilmesi sonucu kopolimer ya da nano dolgu maddeleri, kompozitlerinin oluşturulması gibi birçok kriyojel hazırlama tekniği mevcuttur. Kriyojeller biyobozunur, iyonik ya da biyopolimerlerden elde edilebilmektedir. Bu ürünlerin her biri spesifik kavite uygulamaları için benzersiz özelliklere sahip ve uyarılara karşı duyarlı malzemelerdir [146]. Kriyojelasyon işlemi sırasında, polimerler, saf çözücünün kristalleşme noktasından 10°C'den daha düşük olmayan bir sıcaklığa kadar

dondurma işlemine tabi tutulurken, tamamen katı olmayan, aynı zamanda bir miktar donmamış sıvı halde bir çözücü elde edilmektedir. Bu, "donmamış sıvı mikrofaz" olarak isimlendirilmekte ve çözülmüş polimerlerin yoğunlukta olduğu ve çapraz bağlanma tepkimelerine katıldığı alanı oluşturmaktadır [147]. “Donmamış sıvı mikrofaz”daki bu kimyasal tepkimeler, porojenler olarak hareket eden donmuş çözücü kristalleri (yani, gözenek oluşumu için nidus; [147]) ile kriyojel oluşum sürecini kolaylaştırmaktadır. Kriyojelasyonda buz çözme aşaması sırasında, çözücü kristalleri çözülürken, yeni sentezlenen kriyojel örneği içinde birbirine bağlı büyük gözenekli sistem elde edilmektedir.



Şekil 10. Kriyojelasyon işleminin şematik gösterimi (a) bir çapraz bağlayıcının bulunduğu veya bulunmadığı bir monomer ve/veya polimer çözeltisi; (b) dondurma işlemi; (c) kriyojel duvar sentezi, sıfırın altındaki sıcaklıklarda "donmamış sıvı mikrofaz"da gerçekleşir; (d) tavlama işlemi; (e) doğal hidrasyon durumunda makro gözenekli ağ ile olgun kriyojel oluşumu [4].

2.6.2. Kriyojel Biyometaryelleri

2.6.2.1. Jelatin bazlı kriyojeller

Jelatin, hidrolitik bozunmasının ardından kollajenden türetilen bir biyopolimerdir [5]. Hidrojel sentezi sırasında jelatinin metakrilat grupları ile modifiye edilmesi ile çapraz bağlanmaya olanak sağlanarak polimerizasyon gerçekleşmektedir (Gel-MA) [168,169]. Son on yılda yapılan çalışmalarda kriyojel sentez protokolü değiştirilerek, kriyo-GelMA'nın yüksek oranda gözenekli bir yüzey ve iç mikromimariye sahip biyoiskeleler üretiminde kriyo-polimerazyon oluşumu gerçekleştirilmiştir [170].

2.6.2.2. Kolajen bazlı kriyojeller

Kolajen, memeli bağ dokularının hücre dışı matrisinin (ECM) birincil bileşeni olan kolajen, toksik olmayan ve kolaylıkla temin edilebilen bir materyaldir [171]. Yüksek derecedeki biyouyumluluğu, yüksek emilim kapasitesi gibi özellikleri sayesinde doku mühendisliği çalışmalarında ilgi çeken bir biyomateryal olarak kullanılmaktadır [172]. Yapılan çalışmalarda kriyojelasyon yoluyla, farklı kütle oranlarına sahip kollajen-nano-hidroksiapatit kompozit biyo-iskeleler üretilmektedir [173]. Bu kolajen kriyojeller, geniş gözenekliliğe sahip hücre transferi üzerindeki taşınımlara ve kontrole olanak sağlayan sünger karakteristiğinde bir yapı sergilemektedir. Ek olarak, insan osteoblast benzeri hücrelerinin hem homopolimerik kolajen hem de heteropolimerik kompozit biyo-iskelelere bağlanabildiğini ve yayabildiğini gösteren çalışmalarla birlikte, kök hücre tedavisi uygulamaları için kolajen bazlı kriyojeller de sentezlenmektedir [173,174].

2.6.2.3.Kitosan bazlı kriyojeller

Kitosan, kitinden elde edilen doğrusal bir polisakkarittir [175]. Özellikle doku mühendisliği alanında kitosanın inflomasyona maruz kalmış hücreleri uyararak yara iyileşmesini desteklediği belirlenmiştir [176]. Yapılan çalışmalarda makro gözeneklilik, elastik fizikler özellikler hücre ve biyomateryal arasında etkileşimler sayesinde kitosan bazlı kriyojeller kırıldak rejenerasyonu gibi doku mühendisliği teknolojilerinde işlevsel bir köprü görevi görmektedir. Ayrıyaten kitosanın jelatin ile kombinasyonu sonucu elde edilen kriyojeller (kitosan, jelatin kriyojeller) hücre tutunması ve hücre çoğalmasına elverişli bir ortam oluşturduğundan literatürde yer almaktadır [147].

2.6.2.4.Polivinil alkol bazlı kriyojeller

Poli-vinil alkol (PVA), donma ve ardından çözünme aşamaları kapsayan klasik kriyojelasyon süreciyle elde edilmektedir. Non-kovalent fiziksel bağlar yardımıyla karakterize edilmektedir [144]. PVA basit bir kimyasal yapıya sahiptir ve vinil asetatın poli-vinil asetata polimerizasyonunu takiben poli-vinil asetatın hidrolizi yoluyla üretilmektedir. PVA kriyojelleri esnekliliğe sahiptir ve hem su gibi hidrofilik çözücüler hem de dimetilsülfoksit gibi hidrofobik çözücüler kullanılarak sentezlenebilmektedir [144,149,151,177].

2.6.2.5. Poli(hidroksietil metakrilat) bazlı kriyojeller

Hidrofilik polimerler, birçok olumlu fiziksel özelliklerinden dolayı geleneksel ürünlerin yerini alması beklenen doku mühendisliği alanında gelişmekte olan bir biyomalzeme sınıfıdır. Bir örnek olarak, biyouyumlu bir hidrofilik polimer olan poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) verilmektedir ve diğer polimerlerle kombinasyonunda, doku mühendisliği de dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda, yaygın olarak kullanılmaktadır [143,178].

PHEMA kendi başına hücre adezyonu gerçekleşmesine olanak sağlayan bir materyal değildir. Hücre bağlanmasını ve çoğalmasını aktifleştirmek amacıyla, bir PHEMA hidrofilik biyo-iskele, kolajen gibi doğal olarak oluşan polimerlerin yüzey özelliklerine benzer özellikte bir proteinin kaplanması ile geliştirilmektedir. Yapılan araştırmalarda PHEMA-poli(etilen glikol) diakrilat-jelatin makrogözenekli heteropolimerik biyo-iskelelerin kriyojelasyon işlemi yoluyla sentezlenerek hücre etkileşimleri için uygun koşullar oluşturulmuştur. Sentezlenen bu hidrofilik kriyojeller, iyi kontrol edilen gözenekli bir yapıya ve iyi mekanik dayanıklılığa sahip olmaları ile karakterize edilmiştir. Bu matrislerin gözenek boyutları, ortalama 80 µm çapında ve altta birbirine bağlı makro gözenekli bir yapı ile 30 ila 100 µm arasında değişmektedir. Bu optimize edilmiş hidrofilik kriyojeller ayrıca birincil kondrositler (kıkırdak yapısını oluşturan destek dokular) arasındaki hücre etkileşimini ve bunların hücre genişleme potansiyeli üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır [179].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

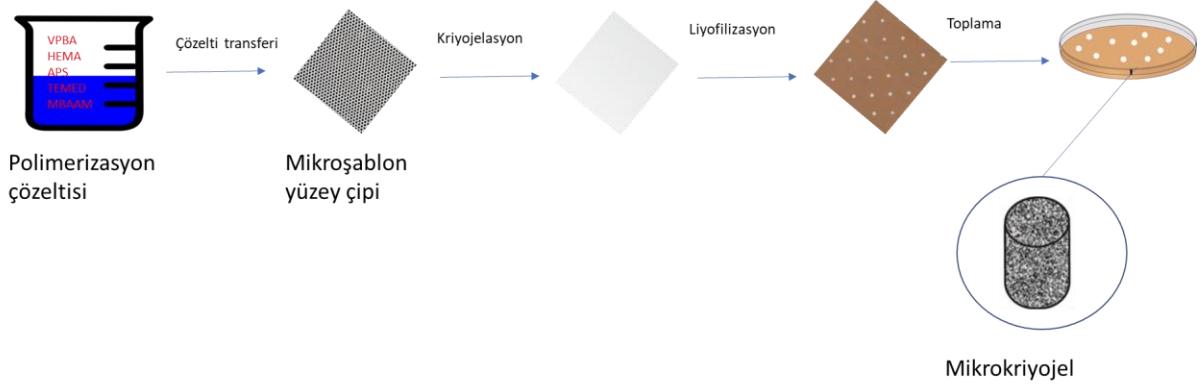
3.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Sentezi

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Vinil fenil boronik asit (VPBA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), amonyum persülfat (APS), N,N,N,N tetrametiletildiamin (TEMED), metilen bisakrilamit (MBAAM), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit acid (HEPES), sodyum dodesil sülfat (SDS), glikoz, Tris HCl, etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), NaOH, etil alkol (%95), NaH₂PO₄ monosodyum fosfat, C₂H₇NO etanol-amin, HCO₃⁻¹-CO₃⁻² karbonat-bikarbonat, RNA-*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich (ABD) firmasından tedarik edilmiştir. Su, Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® ters ozmos birimi ile saflaştırılarak deneylerde kullanılmıştır. Cam malzemelerin tümü kullanımdan önce etil alkol ve saf su ile 3'er kez yıkanmıştır.

3.1.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojeller

Tez kapsamında, mikrokriyojellerin sentezlenmesi bu bölümde kısaca özetlenmiştir: Mikrokriyojel monomer çözeltisi 10 mL toplam hacimde olacak şekilde 1.21 mL hacmindeki HEMA'ya VPBA yüzdesi %2.5 (w/v) olacak şekilde VPBA eklenmiştir. Elde edilen karışım 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak 0.26 g MBAAM 8.8 mL deiyonize suda çözülmüştür. İki karışımın birbirine ilave edilmesiyle toplam 10 mL hacme sahip olan polimer çözeltisi bir süre daha manyetik ortamda karıştırılmıştır. Ardından polimerizasyonu başlatmak için 25 mg APS ve 25 µL TEMED eklenmiştir. Bu çözelti mikron çapta kuyucuklara sahip kalıba hızlı bir şekilde dökülerek bu kalıbın her iki yüzeyi 10 cmx10 cm ebatlarındaki camlar levhalarla kapatılmıştır. Polimerizasyon -12°C'da 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Tepkimeye girmemiş monomerlerin ve diğer safsızlık kaynağı kimyasalların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için polimerik mikrokriyojeller deiyonize su ile yıkanmıştır. Mikrokriyojel sentezinin şematik gösterimi Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. Mikrokriyojel sentezinin şematik gösterimi.

3.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Karakterizasyonu

Karakterize edilen tüm mikrokriyojeller, karakterizasyondan önce liyofilizatörde (Christ Alpha LD1-2 plus, Almanya) 24 saat dondurularak kurutulmuştur.

3.2.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Optik Görüntüleri

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optik mikroskop görüntüleri, Olympos BX51 Optik Mikroskop ile 4X büyütme objektifi kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller büyütme faktörü olmadan da fotoğraflanmıştır.

3.2.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin SEM-EDX Analizi

Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Tescan, GAIA3+ Oxford XMax 150 EDS) kullanarak incelenmiştir. Kurutulmuş mikrokriyojeller, SEM analizi için uygun hale getirilip örnek tutucusu üzerine tutturulduktan sonra ince bir altın tabakası ile vakum altında kaplanmıştır. Daha sonra elde edilen numune cihaza yerleştirilerek 100-5000 X büyütme aralığında farklı büyütmelerde görüntüler alınmıştır.

3.2.3. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μ CT) Analizi

Mikrokriyojellerin içerdiği gözenekleri, bu gözeneklerin dağılımını ve akış kanallarını üç boyutlu görüntülemek amacıyla bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT) (Bruker, Skyscan

1272) cihazı kullanılmıştır. Bunun için numunelere 360° açıyla 0.4° aralıklarla x-ışınları gönderilmiştir. Görüntü kalitesini arttırmak için 0.5 mm alüminyum filtre kullanılmıştır. X-ışınlarının gücü 50 kV olup her 500 ms’de bir, piksel başına 10 µm çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilmiştir

3.2.4. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin karakteristik fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) kullanılmıştır. Numuneler elmas uçlu ATR probu kullanılarak incelenmiştir. Kuru mikrokriyojeller FT-IR spektrumunu 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında elde edilmiştir.

3.3. Sulu çözeltilerden RNA Adsorpsiyon Çalışmaları

Mikrokriyojellerin RNA bağlama kapasitesini belirlemek için deneyler kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Şekil 12’de deneylerde kullanılan kesikli sistemin fotoğrafı yer almaktadır. Kesikli sistem deneylerinde Shcheer MX-RD-Pro (Çin) cihazı kullanılmıştır. İlk basamakta 1.5 mL’lik eppendorflara 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg ağırlığında RNA tartılmıştır. Sonrasında eşit miktarda mikrokriyojeller eppendorflara eklenmiş ve 1:10 oranında seyreltme yapılarak RNA adsorpsiyon kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Daha sonra farklı pH, sıcaklık, tuz türleri ve derişimi, RNA başlangıç derişimi gibi farklı deney koşullarının RNA adsorpsiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deney sonrasında örnekler 1:10 oranında seyreltilerek UV spektrometrede 260 nm’de adsorbans değerleri ölçülmüştür. RNA adsorpsiyon çalışmaları için kullanılan UV spektrofotometre cihazının görseli Şekil 13’de yer almaktadır. Mikrokriyojellere adsorplanan RNA miktarı Eşitlik 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = [(C_0 - C_e) / m] \times V \quad (3.1)$$

Q: adsorplanan RNA miktarı; C₀: başlangıç RNA derişimi; C: adsorpsiyon sonrası RNA derişimi; V: çözelti hacmi’dir.



Şekil 12. Adsorpsiyon çalışmaları için kullanılan kesikli sistem düzeneği.



Şekil 13. UV spektrofotometre cihazının görseli (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometre, Çin).

3.3.1. Farklı pH’larda RNA Adsorpsiyon Çalışmaları

Farklı pH koşullarında organik ve inorganik tamponların RNA adsorpsiyonuna etkisini incelemek amacıyla fosfat tuzu pH 7.0, pH 7.4, pH 8.0 ve pH 8.5; Hepes pH 7.0, pH 7.4, pH 8.0 ve pH 8.5; etanolamin pH 8.5, pH 9.0 ve pH 9.5 karbonat-bikarbonat tamponları 20 mM olacak şekilde 500 mL deiyonize suda çözülerek hazırlanmıştır. Sonrasında 1.5 mL hacmindeki eppendorflara hazırlanan tampon çözeltiler 0.1 mg/ mL RNA olacak şekilde eklenmiştir. 1.0 mL’lik dolu hacme sahip eppendorflar rotatörde 25 rpmde 2 saat karıştırılarak adsorpsiyon işlemi etkinleştirilmiştir.

3.3.2. Farklı Tuz Derişimlerinde RNA Adsorpsiyon Çalışmaları

Sentezlenen poli(HEMA-VPBA) kriyojellerine RNA’nın bağlanma çalışmaları farklı tuzlar kullanılarak incelenmiştir. Yapılan deneylerde NaCl ve CaCl₂ tuzları 0.01 M, 0.05 M ve 0.1 M olacak şekilde hazırlanmıştır. 1.5 mL’lik eppendorflara 0.5 mg/mL derişimde olacak şekilde RNA tartılarak üç farklı derişim ve türdeki tuzlar eklenmiştir. Eppendorflar 2 saat 25 rpm’de 2 saat döndürülerek 37°C’de adsorpsiyonun etkinleştirilmesi sağlanmıştır.

3.3.3. Farklı Sıcaklıklarda Adsorpsiyon Çalışmaları

RNA adsorpsiyonunun sıcaklık ile olan ilişkisini incelemek amacıyla sentezlenen mikrokriyojeller ile 4-37°C derece arası değişen 4 farklı sıcaklıkta deneyler yapılmıştır. Yapılan deneyler; pH 8.5 20 mM etanolamin tamponu, toplam hacim 0.6 mL olacak şekilde 0.5 mg/mL başlangıç RNA derişiminde gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Farklı Başlangıç Derişimlerinde Adsorpsiyon Çalışmaları

1,5 mL eppendorflara 0.1-1.0 mg değerleri arasında değişen miktarda RNA tartılmıştır. VPBA içermeyen PHEMA mikrokriyojeller ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere 0.1-1.0 mg/mL arasında değişen derişimde RNA adsorpsiyonu incelenmiştir. Deneyler pH 8.5 ve 20 mM etanolamin tamponunda, 0.1 M CaCl₂ tuzu varlığında, 37°C’de gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Zamana Bağlı Adsorpsiyon Değişiminin İncelenmesi

Mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonun zamana bağlı etkisini gözlemek için pH 8.5 20 mM etanolamin tamponu, 0.1 M CaCl₂ tuzu varlığında, 37°C’de ve 0.5 mg/mL başlangıç RNA derişiminde deneyler gerçekleştirilmiştir. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller kullanılarak 120 dk boyunca RNA adsorpsiyonu gözlenmiştir. Elde edilen veriler yardımıyla adsorpsiyonun zamana bağlı değişimini gösteren grafik oluşturulmuştur.

3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

RNA’nın poli(HEMA-VPBA) kriyojellerden desorpsiyonu için 0.5 M NaCl içeren 0.1 M pH 8.5 borat tamponu kullanılmıştır. Bu ajan ile desorbe edilen RNA elüsyon yüzdesi Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Tekrar kullanılabilirlik ise aynı mikrokriyojeller kullanılarak 8 adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri gerçekleştirilerek incelenmiştir.

$$\text{Elüsyon (\%)} = \text{Desorbe Edilen RNA} / \text{Bağlanan RNA} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5. *E. coli*’den RNA Özütlenmesi ve Saflaştırılması

ATCC 25922 kodlu *E. coli* hücreleri 200 rpm’de bir gece boyunca sonikatöre konularak 37°C sıcaklıkta Lura Bertani besiyeri içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra hücreler 5 dakika boyunca 1300 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra toplanan hücreler kullanılarak RNA özütlenmesi gerçekleştirilmiştir. RNA özütlenme aşamaları şu şekildedir: Birinci aşamada, bakteri peleti 50 mM glikoz, 25 mM Tris HCl ve 10 mM EDTA’nın bulunduğu soğuk çözelti ile karıştırılarak vortekse tabii tutulmuştur. İkinci aşamada, 0.2 M NaOH ve %1 SDS içeren solüsyon eklenerek karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 10 dakika boyunca buzda bekletilerek üçüncü aşamaya geçilmiştir. Üçüncü aşamada ise, 5 M potasyum asetat, asetik asit ve su ilave edilmiştir. Düzgün bir şekilde karıştırıldıktan sonra 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Sonrasında 13000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantlara %95’lik etil alkol eklenerek tekrardan 15 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Dördüncü aşamada ise süpernatantlar 13000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüj edilmiş ve ardından suda çözülerek RNA özütü elde edilmiştir.

RNA özütü 10, 20, 50 kez seyreltilerek saflaştırılmak için hazırlanmıştır. Saflaştırma işlemi iki saat süre ile 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon sonrası poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerden RNA 0.5 M NaCl içeren 0.1 M borat tamponu (pH 8.5) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Saflaştırılan RNA'nın saflığını ifade edebilmek amacıyla UV spektrometere ile A_{260}/A_{280} oran ölçümü yapılmıştır.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen RNA fraksiyonları agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. İnceleme amacıyla Tris Borat EDTA (TBE) tampon (1X) hazırlamak için 10.8 g Tris ve 5.5 g Borik asit 900 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Aynı yerde 0.5 M EDTA 4 mL distile su içerisine eklenerek bu iki ayrı çözelti birbirine karıştırılmıştır. Toplam çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Jel elektroforezi için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel 1X TBE tampon bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. RNA örnekleri 10 X yükleme tamponu ile kuyucaklara yüklenerek 30 dakika boyunca 100 V'de yürütülmüştür. Elektroforez sırasında örnekler UV ışık altında incelenmiştir ve jel dokümantasyon sisteminde değerlendirilip görüntü alınmıştır. RNA bantlarının UV ışık altında jel görüntüleme yöntemiyle görüntüleri alınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen deneysel verilerin değerlendirilmesi ile ulaşılan sonuçlar dört temel başlık altında özetlenebilir.

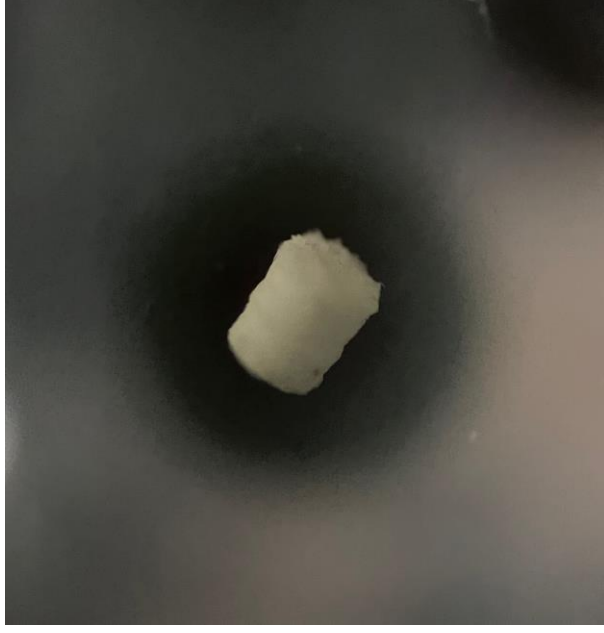
- (i) Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu;
- (ii) Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere farklı deneysel koşullarda RNA adsorpsiyonu ve kinetik analizleri;
- (iii) Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi;
- (iv) *Escherichia coli* hücre özütünden RNA saflaştırılması.

4.1. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

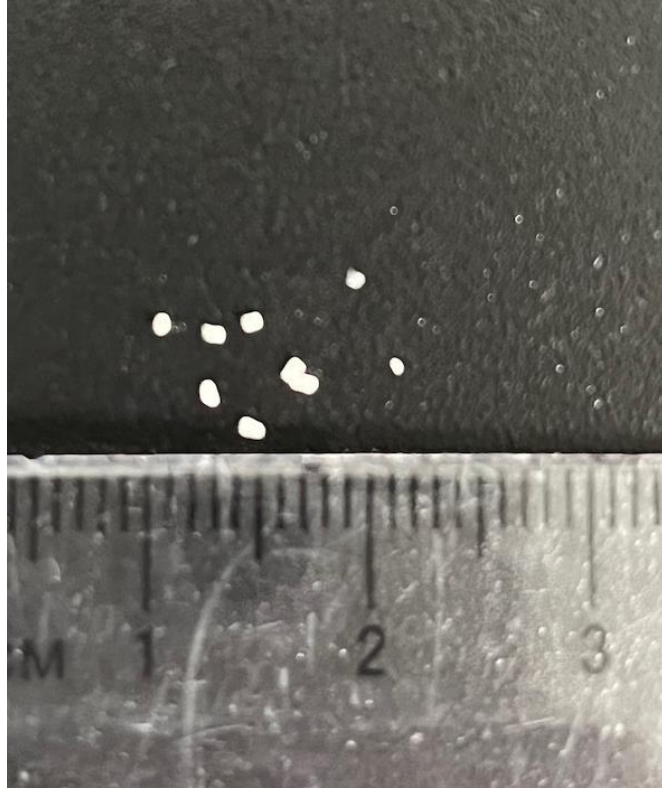
Sunulan tezin ilk basamağında poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller -12°C 'da 24 saatte yığın polimerizasyonu ile sentezlenmişlerdir. Sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin yüzey ve yığın yapıları optik mikroskop, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve bilgisayarlı mikrotomografi (μCT) ile incelenmiştir. Polimerik yapıdaki boronat gruplarının varlığını göstermek için Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi kullanılmıştır.

4.1.1. Mikrokriyojellerin Optik Mikroskop ile İncelenmesi

Şekil 14 ve Şekil 15'de poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optik görüntüleri yer almaktadır. Polimer çözeltilerinin hazırlanmasında JeoTech Multi-Channel Stirrer MS-23M (Güney Kore) cihazı kullanılmıştır. Polimerik mikrokriyojeller oldukça yumuşak, esnek ve opak yapıdadırlar. Şekil 15'den de görüldüğü gibi poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller silindirik geometridedir ve partikül boyutu yaklaşık $0.502 \times 0.463 \mu\text{m}$ civarındadır.



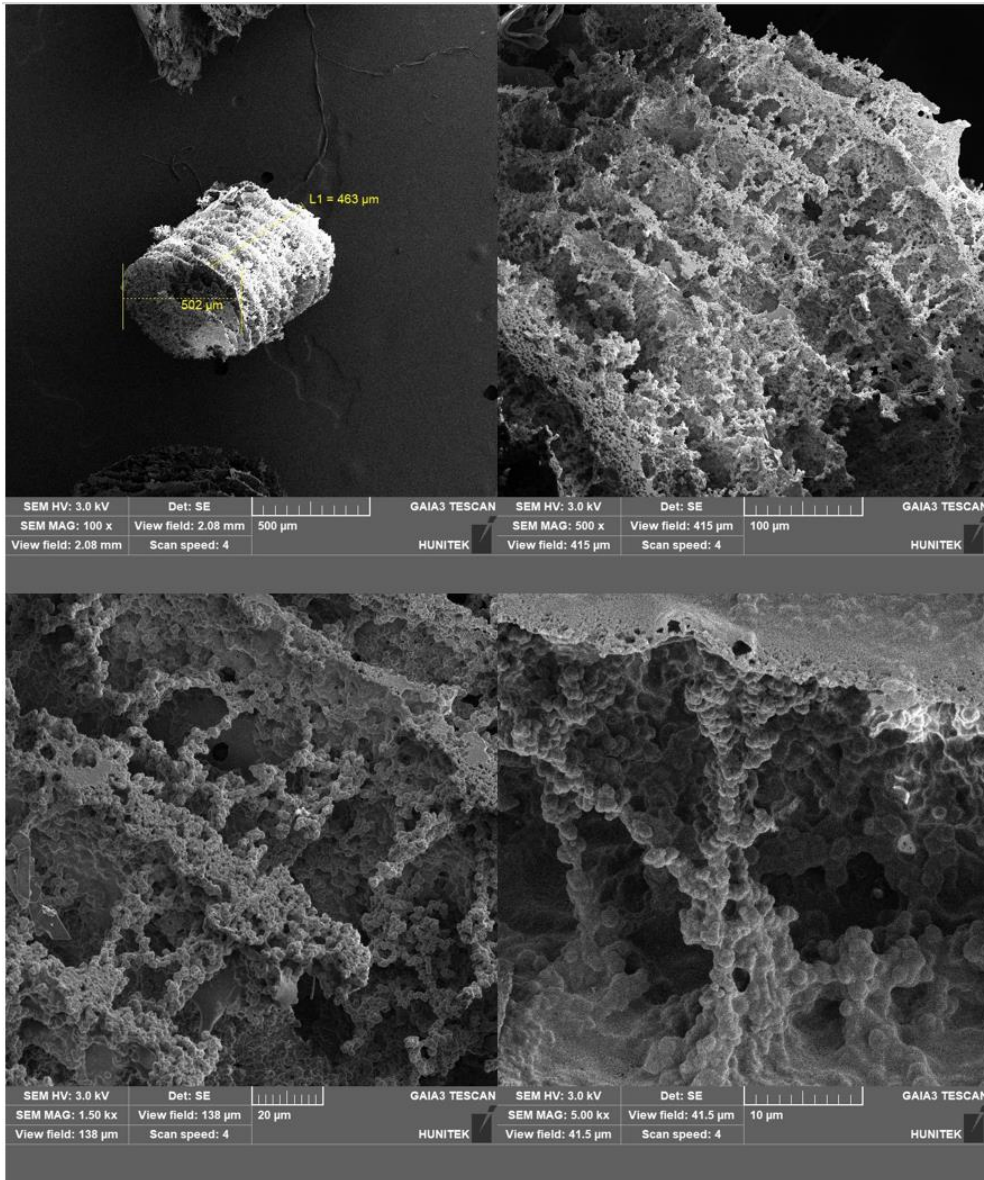
Şekil 14. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojelerin optik mikroskop görüntüsü (4x).



Şekil 15. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optik fotoğrafı.

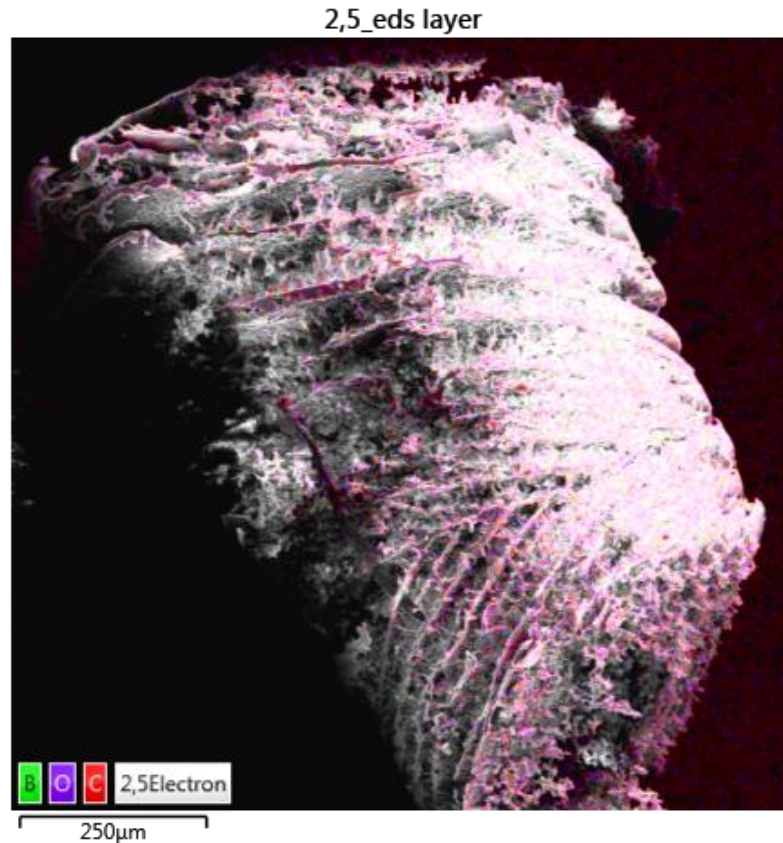
4.1.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin SEM-EDX Analizi

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin hem partikül hem de yığın yapılarının taramalı elektron mikroskop görüntüleri (SEM) Şekil 16'da verilmiştir. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller oldukça gözenekli bir yüzey ve yığın yapısına sahiptir. Birbirleriyle bağlantılı gözeneklerin boyutları oldukça büyüktür. Biyomoleküllerin adsorpsiyonunda kütle aktarımı açısından oldukça önemli olan mikrogözenek çapları 10-25 μm arasında değişmektedir.

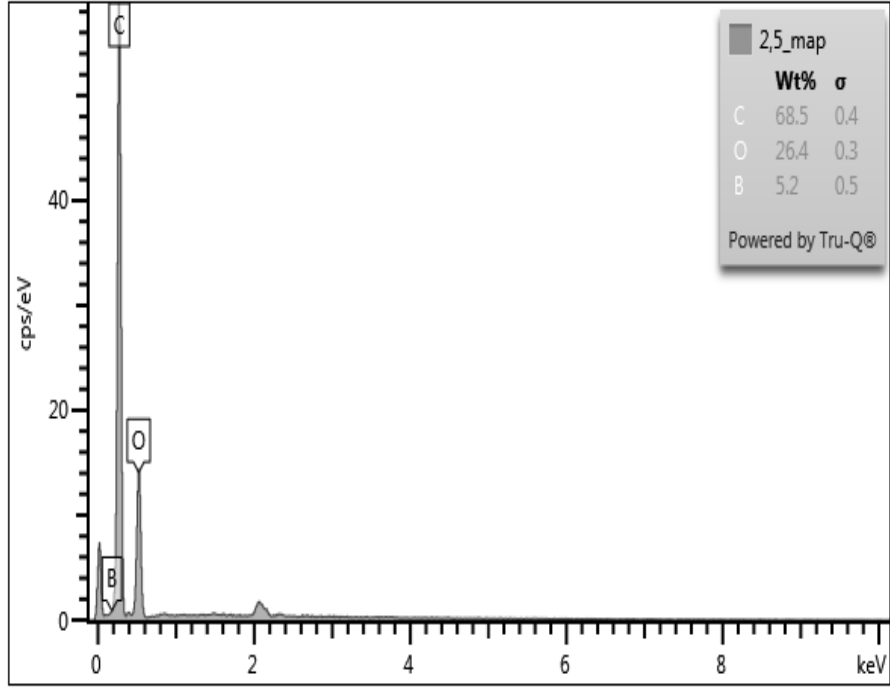


Şekil 16. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri.

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin Energy-Dispersive Spektroskopi analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 17A ve B’de verilmiştir. Şekil 17A’da verilen fotoğraftaki yeşil renkli noktalar polimerik yapıda bulunan boronat gruplarının varlığını göstermektedir. Bu sonuca göre RNA bağlanması için ligand-komonomer olarak kullanılan olan “Boronat” grupları polimerik yapıya başarılı bir şekilde katılmıştır. Boronat gruplarının polimerik yapıda ana zincirde bulunması bu mikrokriyojellerin “Afinite Kromatografisinde” en önemli avantajıdır. Boronat grupları doğrudan polimer hazırlanırken ana yapıya girdiği için “Ligand İmmobilizasyonu” basamağı bu çalışmada ortadan kaldırılmıştır. Buna bağlı olarak ta “Ligand Sızması” problemi bu mikrokriyojel yapılar için söz konusu olmaktan çıkarılmıştır. Dolayısıyla hazırlanan poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA saflaştırılması için doğrudan kullanımı hem ekonomik boyutuyla hem de deneysel zaman açısından oldukça önemli avantajlar sunmaktadır. Ligand sızmasının söz konusu olmaması da “Saflaştırılan Biyomolekülün” kirlenme sorununu ortadan kaldırmıştır.



Şekil 17A. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin energy-dispersive spektroskopisi görüntüsü.



Şekil 17B. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin energy-dispersive spektroskopisi spetrumu.

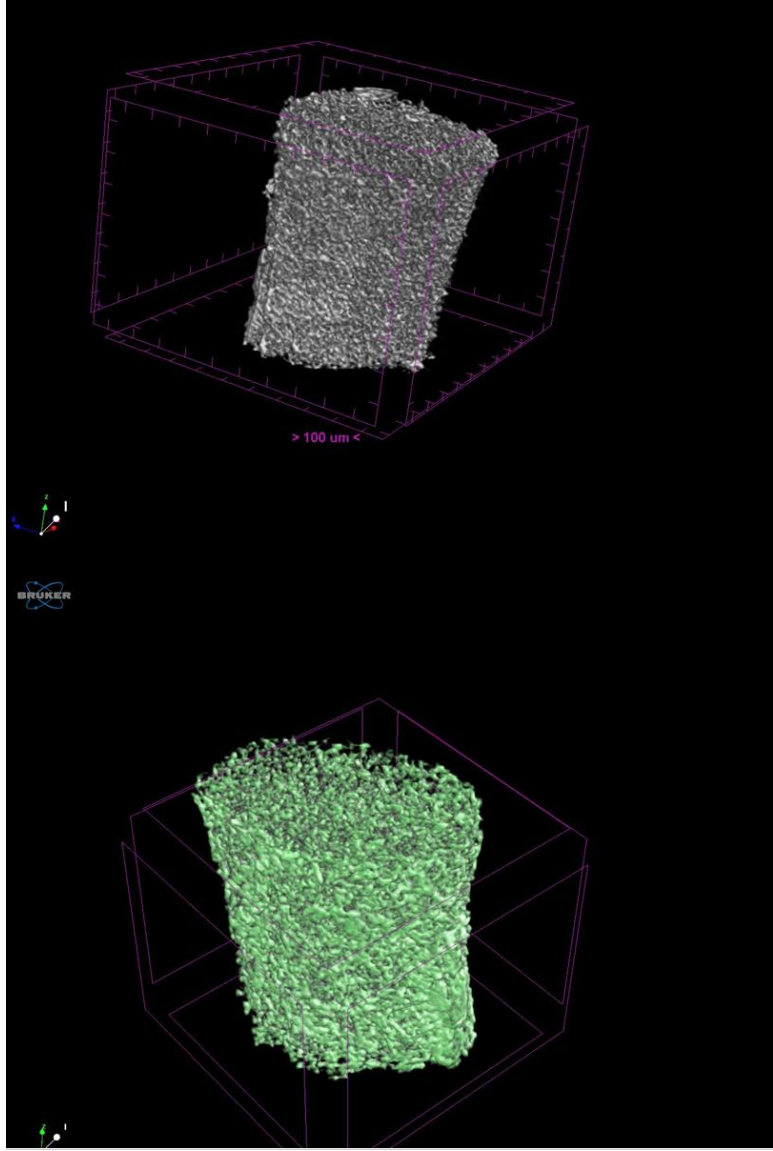
4.1.3. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μ CT) Analizi

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT) analiz görüntüsü Şekil 18’de verilmiştir. Fotoğraf incelendiğinde polimerik mikrokriyojellerin oldukça homojen bir gözenek dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca polimerik yapıdaki bu gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı oldukları da tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Boyut aralığına karşılık gözeneklilik yüzdeleri

Gözenek Boyut Aralığı	Gözeneklilik Yüzdesi (%)
2-6 µm arası	% 3.03
6-10 µm arası	% 10.69
10-14 µm arası	% 19.02
14-18 µm arası	% 36.50
18-22 µm arası	% 23.04
22-26 µm arası	% 6.60
26-30 µm arası	% 1.00

Poli(HEMA-VPBA) ikrokriyojellerin sahip olduğu farklı boyutlardaki gözeneklerin yüzdeleri Çizelge 2’de verilmiştir. Bu çizelge incelendiğinde µCT ölçümleri sonucunda mikrokriyojellerin sahip olduğu gözeneklerin büyük bölümünün (%95) 6-25 µm arasında belirlenmiştir. Bu geniş gözenek çap değerlerinin RNA adsorpsiyon çalışmalarında kütle aktarım dirençlerinin bertaraf edilmesi açısından oldukça önemli bir avantaj olduğu söylenebilir.

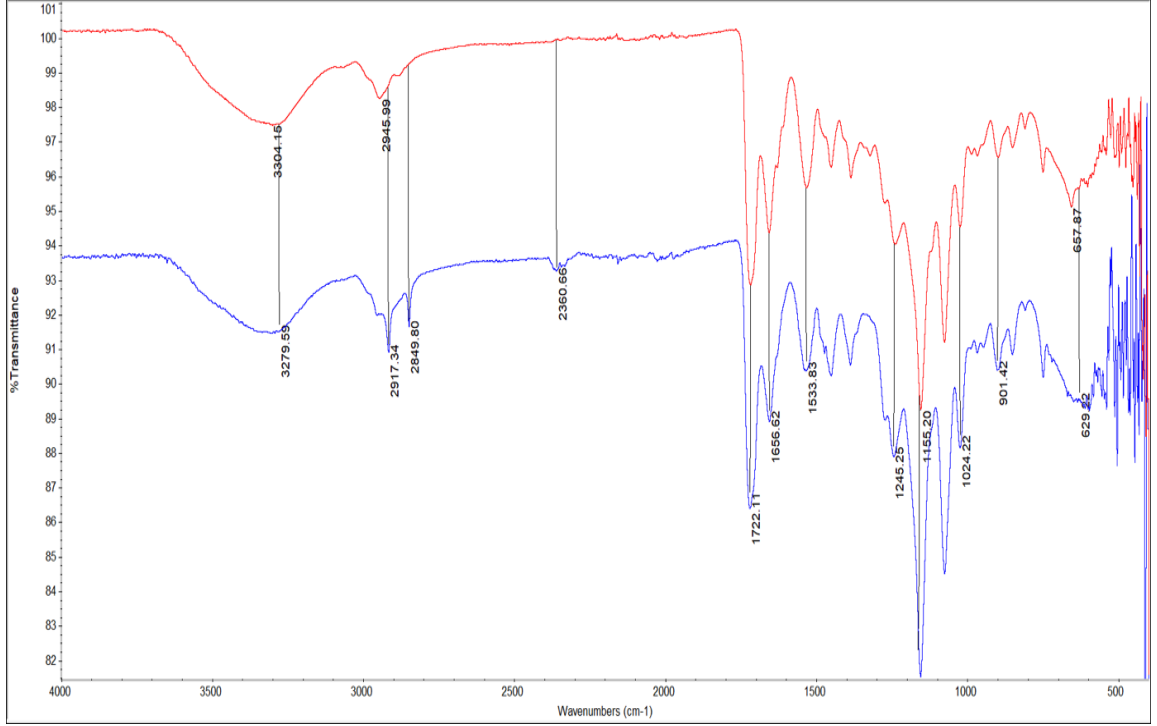


Şekil 18. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT) görüntüsü.

4.1.4. Fourier Dönüştümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Vinilfenil boronik asit (VPBA) fonksiyonel monomerinin polimerik mikrokriyojel yapısına girdiğini göstermek için hem poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojelin hem de PHEMA mikrokriyojelin FTIR analizleri yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen FTIR spektrumları Şekil 19’da birlikte verilmiştir. VPBA monomerinin yapısında bulunan aromatik halka nedeniyle C=C gerilme bantları 1650 cm^{-1} gerilme piki ve 1500 cm^{-1} civarında aromatik C-H bükülme piki olarak gözlenmiştir. Polimerik yapıdaki boronik asit gruplarının varlığı, 1155 cm^{-1} civarındaki B-C gerilme bandı ile belirgindir.

Ayrıca yaklaşık 1000 cm^{-1} 'de ise BO-H deformasyonları net olarak görülmektedir. FTIR analizinden elde edilen sonuçlara göre PHEMA spektrumu ile karşılaştırıldığında poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojelin yapısındaki vinilfenil boronik asitin varlığı doğrulanmaktadır.



Şekil 19. PHEMA ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin FTIR spektrumları.

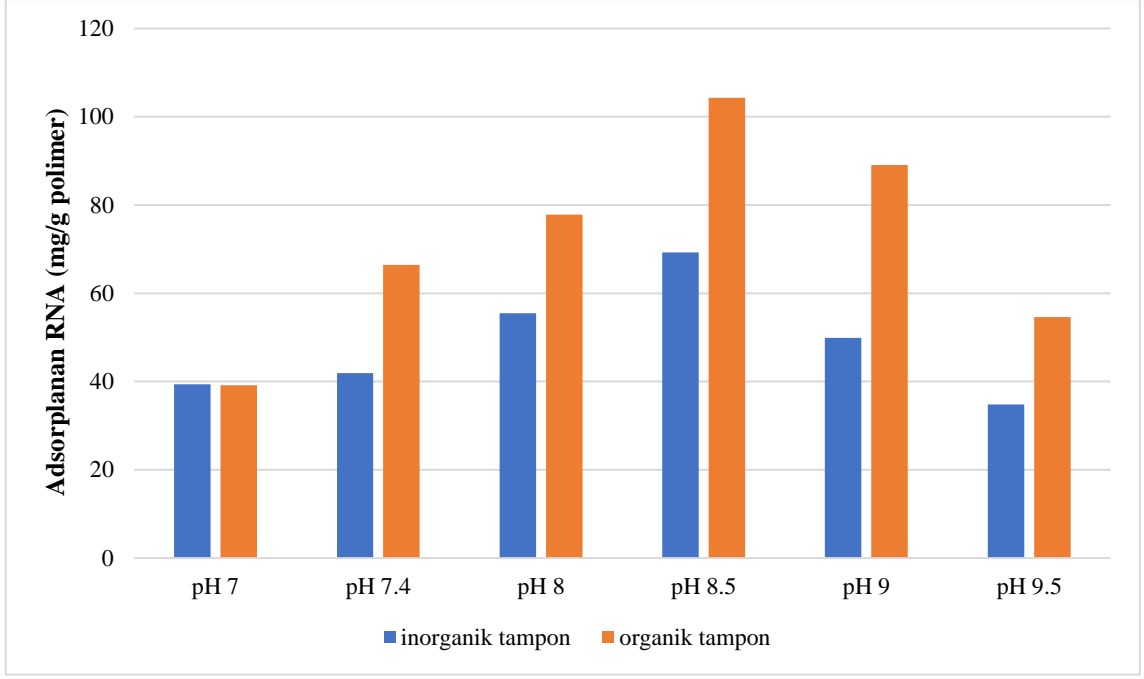
4.2. Poli(HEMA-VPBA) Mikrokriyojellerin RNA Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1. Sulu Çözeltilerden RNA Adsorpsiyon Çalışmaları

Bu bölümde; sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin optimum adsorpsiyon koşulları incelenerek sulu çözeltilerden RNA adsorpsiyonuna ait sonuçlara yer verilmiştir. Bu aşamada; RNA derişiminin, ortam sıcaklığının, ortam pH'ının, tuz derişiminin RNA adsorpsiyonuna etkileri incelenmiştir. Ayrıca mikrokriyojel yapıda RNA adsorpsiyonunu kontrol eden basamağı belirlemek için birincil ve ikincil derece kinetik analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

4.2.1.1. pH'ın RNA Adsorpsiyonuna Etkisi

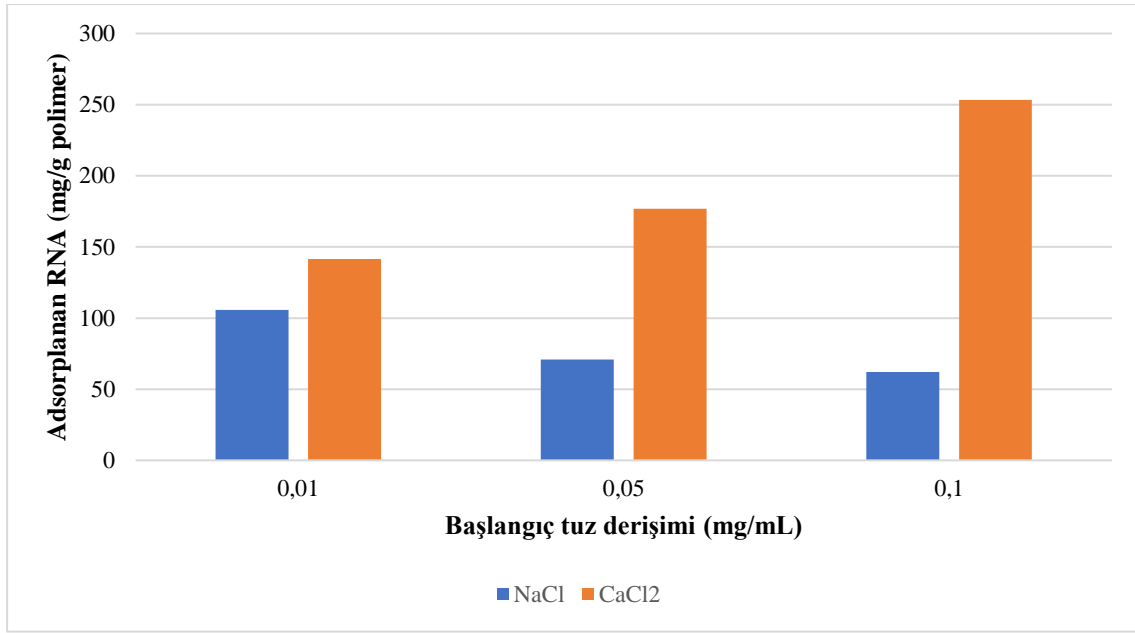
Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerde RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi Şekil 20'de gösterilmiştir. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonu pH 7.0-9.5 arasında değişen farklı değerlerde; inorganik ve organik tamponların varlığında incelenmiştir. Sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere maksimum RNA adsorpsiyon miktarının pH 8.5 20 mM organik etanol-amin tamponunda 104.30 mg/g polimer, inorganik fosfat tamponu varlığında ise 69.25 mg/g polimer değerinde olduğu bulunmuştur. Bu durum şöyle açıklanabilir; HEPES benzeri içerisinde amin grubu barındıran tamponlar kompleks oluşumunu teşvik etmektedirler. Protonlanmamış aminler elektron vererek nötral durumdaki boronat gruplarına elektron tedarik etmekte ve böylelikle moleküller arasında kompleks oluşumunu arttırmaktadırlar. Literatürde boronat için biyomoleküllerle (DNA, RNA gibi) kompleks oluşumunun pH 8.0'in üzerinde olduğu rapor edilmiştir [126]. Ayrıca boronik asitin pKa değeri pH 8.5 civarında olduğundan [126] RNA adsorpsiyonunun bu değerin üzerinde çalışıldığı ortamlarda artması beklenen bir durumdur.



Şekil 20. RNA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi; RNA derişimi: 0.5 mg/mL; Adsorpsiyon süresi: 120 dk, sıcaklık: 25°C.

4.2.1.2. Farklı İyon Derişimlerinin RNA Adsorpsiyonuna Etkisi

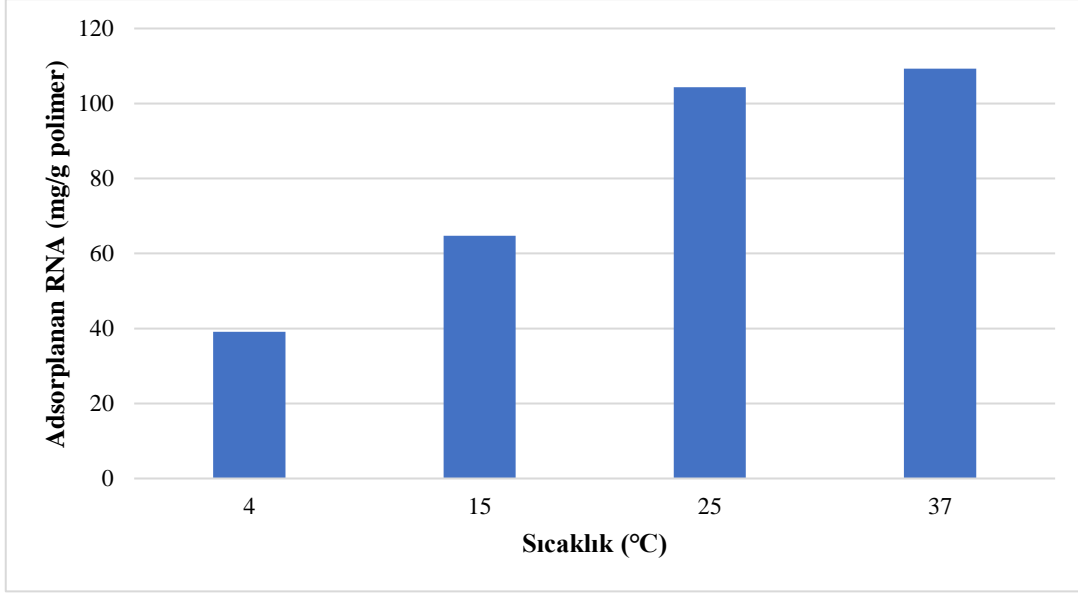
Sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere RNA adsorpsiyona tuz derişiminin etkisini incelemek amacıyla CaCl_2 ve NaCl tuzları kullanılarak iki farklı tuz üzerinden deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler adsorpsiyonun maksimum olduğu 37°C ve pH 8.5 koşullarında 0.0-0.1 mg/mL aralığında değişen tuz derişimlerinde yapılmıştır. Şekil 21'de görüldüğü gibi maksimum RNA adsorpsiyon miktarı CaCl_2 tuzu varlığında 0.1 mg/mL tuz derişiminde 253.33 mg/g olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, Cl^- anyonlarının oluşan kompleksleri daha kararlı hale getirdiğini [192] destekler niteliktedir. Ayrıca grafikten de anlaşılacağı gibi NaCl tuzuna göre CaCl_2 tuzunun RNA adsorpsiyon kapasitesine etkisi daha fazladır. Çünkü CaCl_2 tuzu yığın halde bulunan RNA bazlarının iyonlaşmasını sağlayarak adsorpsiyon kapasitesini arttırmaktadır [189]. Bu durum da RNA molekülünde bulunan bazların boronik asit molekülü ile etkileşimine katkı sağlamaktadır.



Şekil 21. RNA adsorpsiyonuna iyon türü ve derişiminin etkisi; Sıcaklık: 37°C, pH: 8.5; Zaman: 120 dk, RNA derişimi: 0.5 mg/mL.

4.2.1.3. Sıcaklığın RNA Adsorpsiyonuna Etkisi

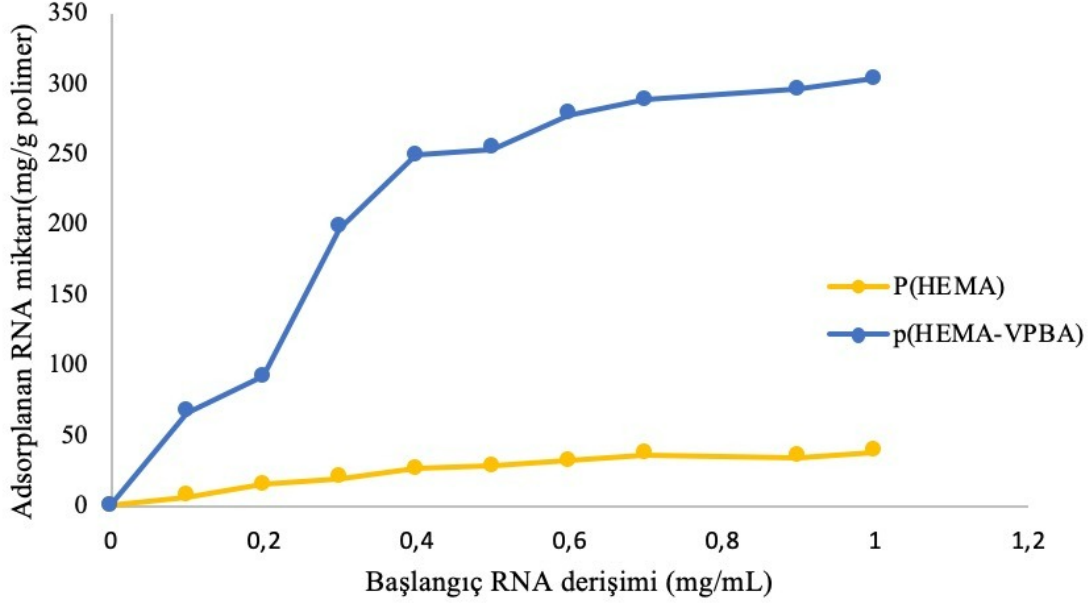
Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonuna sıcaklığa etkisini incelemek amacıyla 4-37°C arasında değişen sıcaklıklarda pH 8.5 etanol-amin tampon çözeltisi içerisinde deneyler yapılmıştır. Şekil 22’de görüldüğü üzere en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 37°C’da 109.25 mg/g polimer olduğu bulgusuna erişilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesinde sıcaklığın artmasına bağlı olarak artış gözlenmektedir. Oda koşulları olan 25°C’den sonra adsorpsiyon değerleri birbirine yakınlık göstermektedir. Adsorplanan RNA miktarı 4°C’da 39.14 mg/g polimer, 15°C’da 64.73 mg/g polimer, 25°C’da 104.30 mg/g polimer olarak tespit edilmiştir. RNA adsorpsiyonun sıcaklıkla ilişkisi, temel etkileşimler hakkında veriler sunmasından dolayı önem arz etmektedir. van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerin daha sık gerçekleştiği durumlarda adsorpsiyon miktarı sıcaklık artışı ile doğru orantı sergilemektedir. Entropi artışı ile hidrofobik etkileşimler sıcaklık artışı ile paralel yönde ilerlemektedir.



Şekil 22. RNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. RNA derişimi: 0.5 mg/mL; adsorpsiyon süresi: 120 dk; pH: 8.5.

4.2.1.4. Başlangıç Derişiminin RNA Adsorpsiyonuna Etkisi

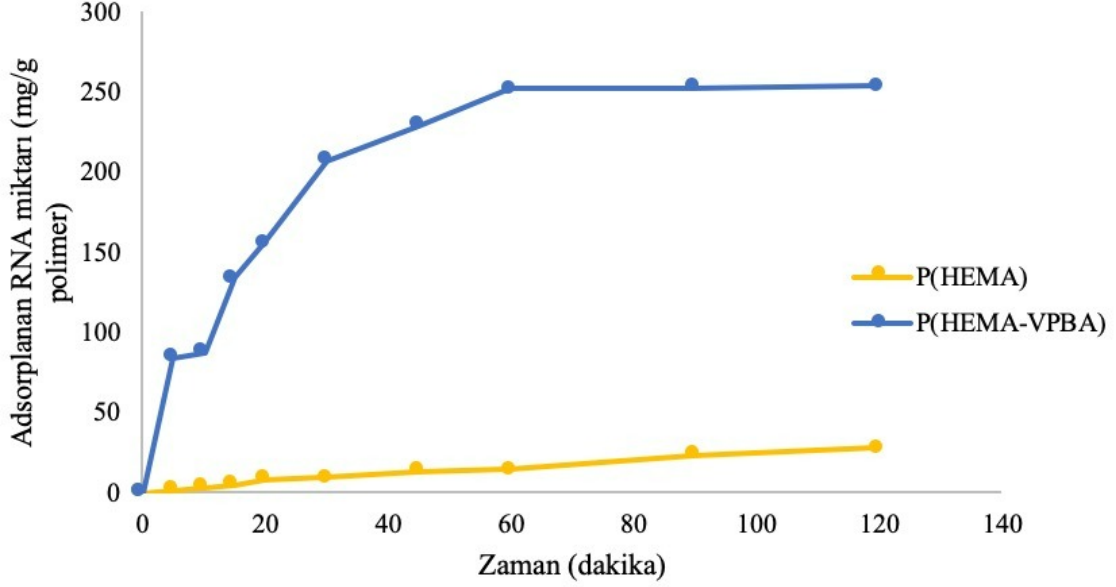
RNA adsorpsiyonu, 0.1 M CaCl₂ varlığında PHEMA ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller ve farklı derişimlerdeki (0.1-1.0 mg/mL) RNA çözeltileri ile incelenmiştir. Başlangıç derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi Şekil 23’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi RNA derişimi arttıkça polimerik mikrokriyojellere adsorplanan RNA miktarı da artmaktadır. Adsorpsiyonun gerçekleşmesi için sürücü kuvvet olan derişim farkının artması adsorpsiyon kapasitesini de arttırmaktadır. Bununla beraber RNA miktarının artmasıyla adsorplanma oranı başlarda hızlı artmakta sonrasında ise yaklaşık olarak 0.5 mg/mL derişimdeki RNA’nın spesifik etkileşim bölgelerinde bağlanma doygunluğuna erişmesi sebebiyle bir dengeye ulaştığı gözlenmektedir. Bu değerden sonra kayda değer bir artış gözlenmemesi adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık olarak 303 mg/g değerindedir. PHEMA mikrokriyojellere non-spesifik RNA adsorpsiyonu oldukça düşük değerde gözlenmiştir. PHEMA mikrokriyojellerde boronat gruplarının mevcut olmaması nedeniyle RNA sadece non-spesifik etkileşimlerle polimere adsorplanmıştır.



Şekil 23. Başlangıç derişimin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; 0.1 M CaCl₂, asorpsiyon süresi: 120 dk; pH: 8.5, Sıcaklık: 37°C.

4.2.1.5. Adsorpsiyon Süresinin RNA Adsorpsiyonuna Etkisi

Sentezlenen PHEMA ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonun zamana bağlı grafiği Şekil 24’te sunulmuştur. Yaklaşık ilk 30 dakika boyunca RNA molekülleri hızlı bir şekilde yüzeye adsorbe olmaktadır. Mikrokriyojeller RNA’nın bağlanabileceği boronat gruplarının sayısının azalması ile adsorpsiyon 30. dakikadan sonra yavaşlamaktadır. RNA’nın bağlanabileceği aktif bölgelerin dolmasından sonra ise (yaklaşık 50. dakika) adsorpsiyon denge konumuna ulaşmaktadır. Yaklaşık 50. dakikadan sonra adsorpsiyon miktarında bir artış görülmemektedir. PHEMA mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonu oldukça düşüktür. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, RNA molekülündeki cis-diol grupları ile boronik asit grupları arasındaki spesifik etkileşimlerin gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. Sentezlenen PHEMA mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonu ikincil etkileşimler neticesinde gerçekleşmektedir, spesifik bağlanma değildir [189]. Elde edilen maksimum RNA adsorpsiyonu 253.3 mg/g değerindedir.



Şekil 24. RNA Adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi; 0.1 M CaCl₂, pH: 8.5, Sıcaklık: 25°C.

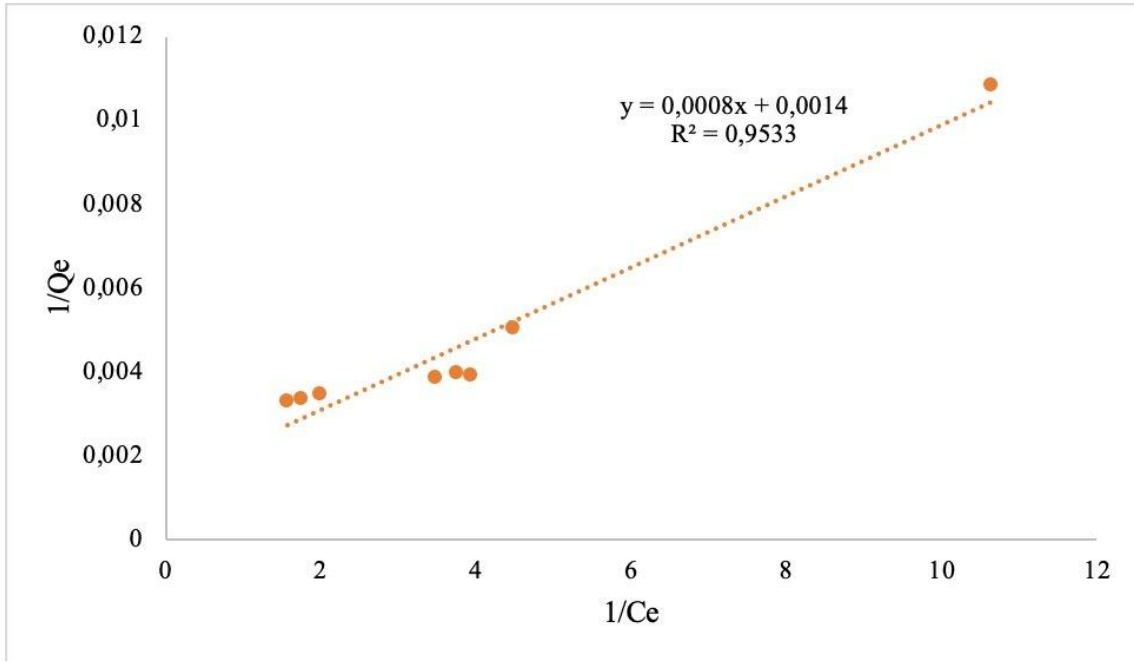
4.2.1.6. Adsorpsiyon İzotermi

Her bir RNA molekülünün polimerik taşıyıcı ile etkileşimini ve bağlanma davranışını inceleyebilmek için literatürde çok sayıda adsorpsiyon izotermi kullanılmaktadır. Bu tezde etkileşimleri karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. İki fazın (katı polimerik faz – polimerik mikrokriyojel ve sıvı faz – RNA çözeltisi) dengede olduğu durumda, çözeltideki RNA derişimi ile polimerik yapıya adsorplanan RNA miktarı arasındaki ilişki ve bağlanma davranışı adsorpsiyon izotermi ile açıklanmaktadır.

Adsorpsiyon izotermine göre etkileşimler sırasında gözlenen adsorpsiyon davranışı değişmektedir. Şöyle ki, Langmuir adsorpsiyon modeli; her biri yalnızca bir molekül bağlayabilecek kapasitede olan belli sayıda tanımlanmış bölgeye adsorpsiyonun gerçekleştiği varsayımını benimsemektedir. Bu bölgelerin eşdeğer enerji düzeyine sahip olduğu ve komşu bağlanma bölgelerinde herhangi bir etkileşimin gerçekleşmediği varsayılır. Aşağıdaki eşitlikte Lagmuir adsorpsiyon izotermi yer verilmiştir.

$$1/Q_e = 1/Q_{max} + 1/Q_{max}.b.C_{eq} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; Q mikrokriyojele bağlanan RNA miktarı, C_{eq} çözeltildeki denge RNA derişimi, b Langmuir sabiti ve Q_{max} teorik maksimum RNA adsorpsiyon kapasitesini simgelemektedir. Langmuir izoterm modelinin uygulanması sonucu elde edilen grafik Şekil 25’de sunulmuştur. Elde edilen doğrusal grafik, bu izoterm modelinin bu sisteme uygulanabilirliğini göstermektedir. Ayrıca korelasyon katsayısında (R^2 : 0.9533) yüksek olduğu not edilmelidir.



Şekil 25. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli.

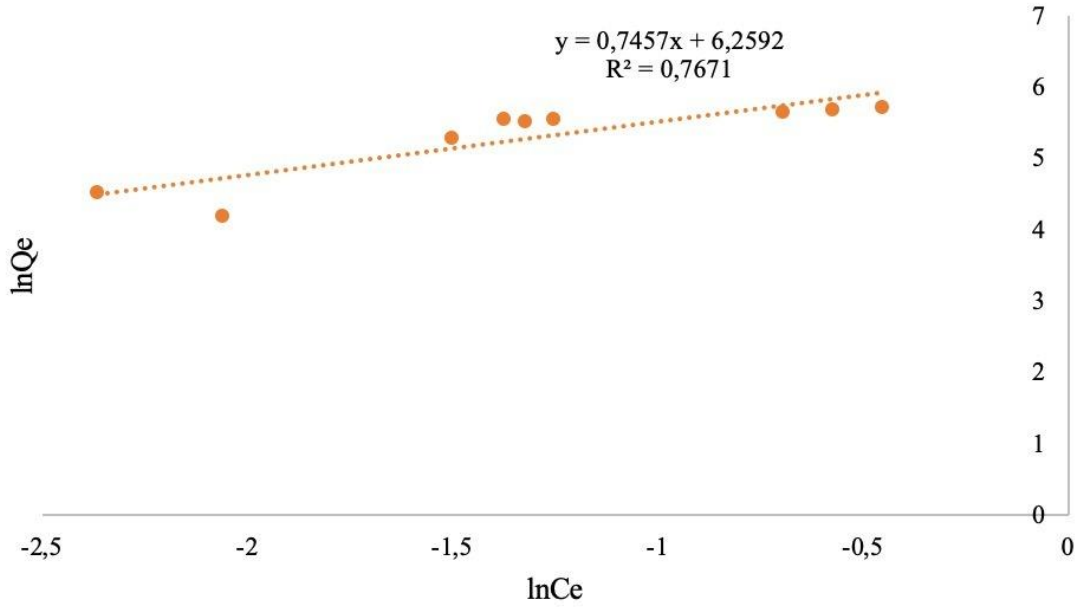
Bir diğer adsorpsiyon izoterm modeli olan Freundlich izoterm modeline ait eşitlik aşağıda yer almaktadır [195]. Bu izoterm modeli, adsorbente biyomolekül adsorpsiyon enerjisinin yakın bağlanma bölgelerinin doluluğuna bağlı olarak değiştiği varsayımına sahiptir [196].

$$Q_e = K_f \cdot C_{eq}^{1/n} \quad (4.2)$$

Eşitlikte; Q_e RNA adsorpsiyon miktarını (mg/g), C_e çözeltildeki RNA derişimi (mg/mL)’dir. K_f ve $1/n$ sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi denklemdaki her iki tarafın logaritması alınarak Şekil 25’de yer alan grafik elde edilmiştir.

$$\ln Q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.3)$$

Çizilen grafikteki doğrusallık Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini göstermektedir. K_f ve $1/n$ çevresel faktörlere bağlı olarak değişen ve grafik üzerinde kesim noktası ile eğimden hesaplanabilen adsorpsiyon sabitleridir. $1/n$ 0-1.0 arasında değişen değerlere sahiptir.



Şekil 26. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.

Yapılan deneyler sonucunda maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri 303.23 mg/g'dır. Langmuir izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi ise 1250 mg/g olarak bulunmuştur.

Freundlich izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasite değeri ise 522 mg/g olarak elde edilmiştir. Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan katsayılar aşağıdaki çizelgede yer almaktadır. Adsorpsiyon kapasite değerlerine bakıldığında teorik değerler deneysel değerlerden daha fazladır. Langmuir izotermi için hesaplanan b katsayısı değeri 0.57'dir. Freundlich izotermi için hesaplanan K_f ve $1/n$ sabit değerleri 522 ve 0.75 olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerden korelasyon katsayıları göz önüne alındığında Langmuir izoterminin daha uygun olduğu izoterm grafiği gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Mikrokriyojellerin RNA ile adsorpsiyon sonucu tek katmanlı bir bağlanma gerçekleştirdiği Langmuir izotermine R^2 değerlerinin daha yüksek olması ile kanıtlanmaktadır. Freundlich denkleminde yer alan K_f sabiti adsorpsiyon kapasitesinin adsorbente bağlı bir ölçüsüdür. Bununla birlikte $1/n$ sabiti

grafik üzerinde eğim alınarak hesaplanır ve adsorpsiyon kapasitesinin derişme bağlılığını ifade eder. Çizelgeden anlaşılabileceği gibi $1/n$ sabiti adsorpsiyon işlemi için büyüktür.

Çizelge 3. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri.

İzoterm	Langmuir
Denklem	$1/Q_e = 1/Q_{max} + 1/Q_{max}.b.C_{eq}$
Q_{max}	1250
b	0,7143
R^2	0,9533
İzoterm	Freundlich
Denklem	$\ln Q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq}$
K_f	522
$1/n$	0,746
R^2	0,7671

4.2.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Birinci ve ikinci dereceden adsorpsiyon kinetikleri adsorpsiyonun gerçekteşmesini sağlayan mekanizmayı incelemek adına deneysel veriler ile birleştirilmiştir. Bu kinetik modeller, adsorpsiyonun kütle aktarımı, kimyasal veya fizikler tepkimeler gibi mekanizmalarla gerçekteştiğini anlamamız için bize ışık tutmaktadır. Deneysel verilerin değerlendirilmesinde derişim ve adsorbent yüzey derişiminin eşit olduğu kabul edilmiştir. Birinci dereceden adsorpsiyon kinetik modeli aşağıdaki eşitlikte yer almaktadır. Bu eşitlik çözeltideki çözünenin adsorpsiyonun ifade etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

$$dQ_t/dt = k_1(Q_{eq} - Q_t) \quad (4.4)$$

Burada, k_1 : adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1}), Q_{eq} : denge zamanında adsorplanan RNA miktarını (mg/g); Q_t : herhangi bir t zamanında adsorplanan RNA miktarını (mg/g) ifade etmektedir.

Sınır koşulları; $t=0$; $Q_t=0$ ve $t=t$; $Q_t=Q_t$ değerleri ile integral alındığında Eşitlik 4.5 elde edilmektedir. Sonrasında düzenlenerek son eşitlik elde edilir. Elde edilen son ifade Eşitlik 4.6'da verilmiştir. Eşitlik yardımıyla çizilen grafikte y ekseninin keşistiği noktadan $\log(Q_{eq})$ ve eğimden $k_1/2.303$ değeri hesaplanmaktadır.

$$\log\left[\frac{Q_{eq}}{Q_{eq}-Q_t}\right]=\frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.5)$$

$$\log(Q_{eq}-Q_t)=\log(Q_{eq})-\frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.6)$$

Adsorpsiyonun denge kapasitesine dayanan ikinci kereden kinetik model aşağıda yer almaktadır.

$$Q_t/d_t=k_2(Q_{eq}-Q_t)^2 \quad (4.7)$$

k_2 : hız sabiti(g/mg.dk) değeridir. $t=0$; $Q_t=0$ ve $t=t$; $Q_t=Q_t$ sınır değerleri altında integral alınıp eşitlik doğrusallaştırılır:

$$(t/Q_t)=(1/k_2 Q_{eq}^2)+(1/Q_{eq})t \quad (4.8)$$

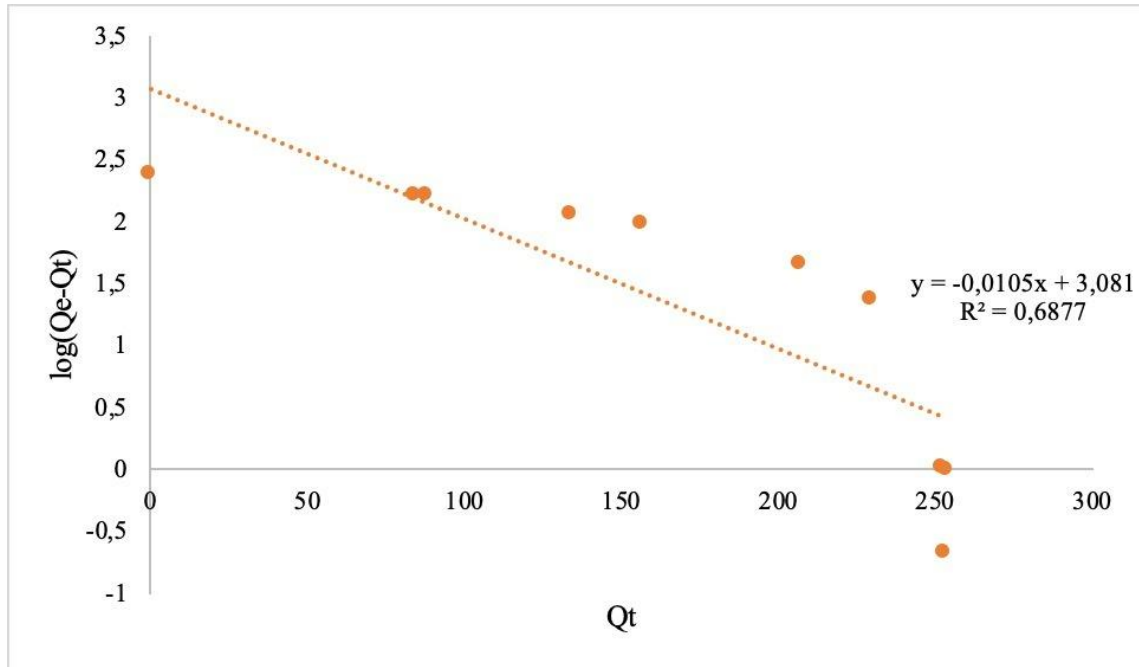
Çizilen grafiğin doğrusal olması bu modelin uygun olduğunu göstermektedir. Grafik üzerinden eğim alınarak Q_{eq} , y eksenini kestiği nokta belirlenerek k_2 değerleri bulunmaktadır. Birinci ve ikinci dereceden kinetik modellerin uygunluğunu incelemek amacıyla elde edilen grafikler Şekil 26 ve Şekil 27'de verilmiştir. Mikrokriyojellere ait analizler sonucu elde edilen izoterm kinetiği parametreleri Çizelge 4'de yer almaktadır. Grafikler ve çizelgede yer alan korelasyon sayıları göz önüne alındığında adsorpsiyonun ikinci dereceden kinetik modele daha uygun olduğu sonucuna erişilmektedir. Hesaplanan Q_{eq} değeri 1050 mg/g olarak bulunmuştur.

Adsorpsiyon gerçekleşirken, adsorpsiyon hızı üç aşamaya göre farklılık göstermektedir:

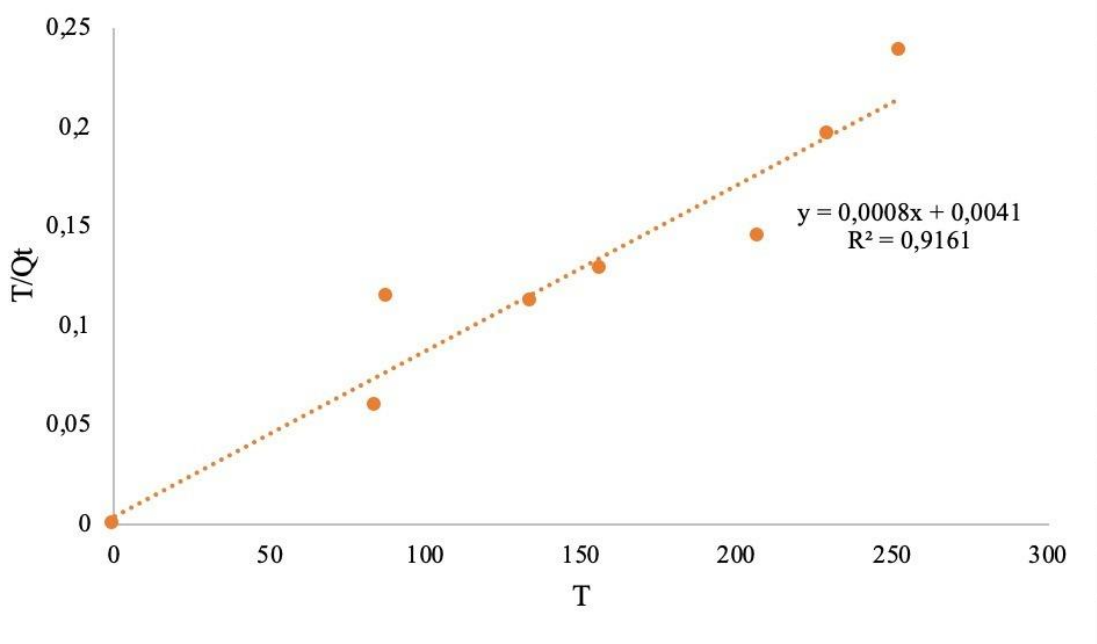
- 1) Dış yüzey kütle geçişi veya film difüzyon basamağı
- 2) Oluşan tepkimeler veya sabit hız basamağı
- 3) Gözenek içi difüzyon basamağı

3. aşamada adsorpsiyon giderek azalmaktadır. Adsorpsiyon hızı yukarıda maddeler halinde sunulan aşamalar gözlenerek belirlenmektedir. Elde edilen gözlemler sonucu ile

birinci derece (difüzyon mekanizması) veya ikinci derece (kimyasal tepkime mekanizması) kinetik modelin uygunluğu tespit edilmektedir. Hızı belirleyen aşamaya göre adsorpsiyon izoterm kinetiği modeli belirlenmektedir. Örneğin, adsorpsiyon hızı, analit ve adsorbent arasındaki etkileşimlerin olduğu basamakta tespit ediliyorsa; adsorpsiyonun ikinci derece kinetik modele uygunluğu bulgusuna erişilmektedir. İlk aşamada adsorpsiyon difüzyon mekanizması, ikinci aşamada kimyasal tepkime mekanizması ile gerçekleşmektedir. Bu bulgular sonucunda, RNA adsorpsiyonu için sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller ile yapılan çalışmalarda adsorpsiyonun difüzyon limiti bulunmadan kimyasal tepkime mekanizması ile gerçekleştiği elde edilmiştir.



Şekil 27. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonu için birinci derece adsorpsiyon kinetiği grafiği.



Şekil 28. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonu için ikinci derece adsorpsiyon kinetiği grafiği

Çizelge 4. İzoterm kinetiği katsayıları.

1. Derece kinetik katsayıları	
k_1	0,024
Q_{eq}	1112
R^2	0.6877
2. Derece kinetik katsayıları	
k^2	0,23
Q_{eq}	1050
R^2	0,9161

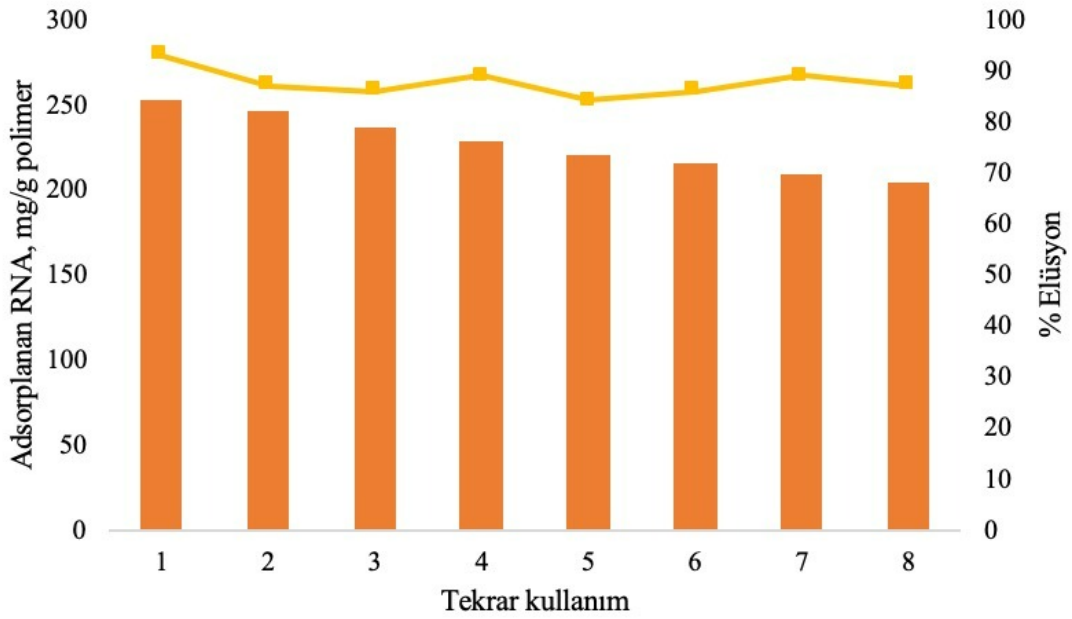
Tüm kinetik veriler göz önüne alındığında; sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere RNA adsorpsiyonunda bir difüzyon engeli bulunmamaktadır. Bu sonuç, mikrokriyojellerin yüksek yüzey alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. RNA molekülünün içerisinde barındırdığı cis diol grupları üzerinden mikrokriyojellere

bağlanması; boronat afinite kromatografi yöntemi adına adsorpsiyonun kinetik karakterini oluşturmaktadır.

4.3. Tekrar Kullanılabilirlik ve Desorpsiyon

Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinin adım adım tekrar kullanılabilirlik ve elüsyon oranlarına ait görsel Şekil 28'de verilmiştir. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin elüsyon yüzdesi yaklaşık olarak %90 değerindedir. Desorpsiyon ajanı olarak 0.5 M CaCl₂ içeren 0.1 M borat tamponu pH 8.5 olarak literatürden faydalanılarak belirlenmiştir. Vinilfenilborat fonksiyonel grubu ile RNA üzerindeki amino grubu arasındaki elektrostatik çekime bağlı olarak, oluşan komplekste nükleotit (riboz) duyarlılığında artma gözlenmesi borat tamponunun uygun bir desorpsiyon ajanı olmasını sağlamaktadır [193]. 8 kez tekrarlanan deneyler sonucunda %81 oranında elüsyon performansı gözlenmiştir. Adsorpsiyon-desorpsiyon işleminden sonra RNA'nın bağlanma kapasitesinde herhangi bir azalma görülmemiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin RNA adsorpsiyonu için tekrar-tekrar kullanılabilirliği söylenebilir. Böylelikle, RNA saflaştırma çalışmaları için halihazırda kullanılan kit v.b. ürünlere nazaran ekonomik avantajlara sahip bir taşıyıcı geliştirildiği söylenebilir.



Şekil 29. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinin tekrar kullanım grafiği; 0.5 mg/mL örnek, 0.5 M CaCl₂, pH:8.5 T: 25°C, 0.1 M borat tamponu.

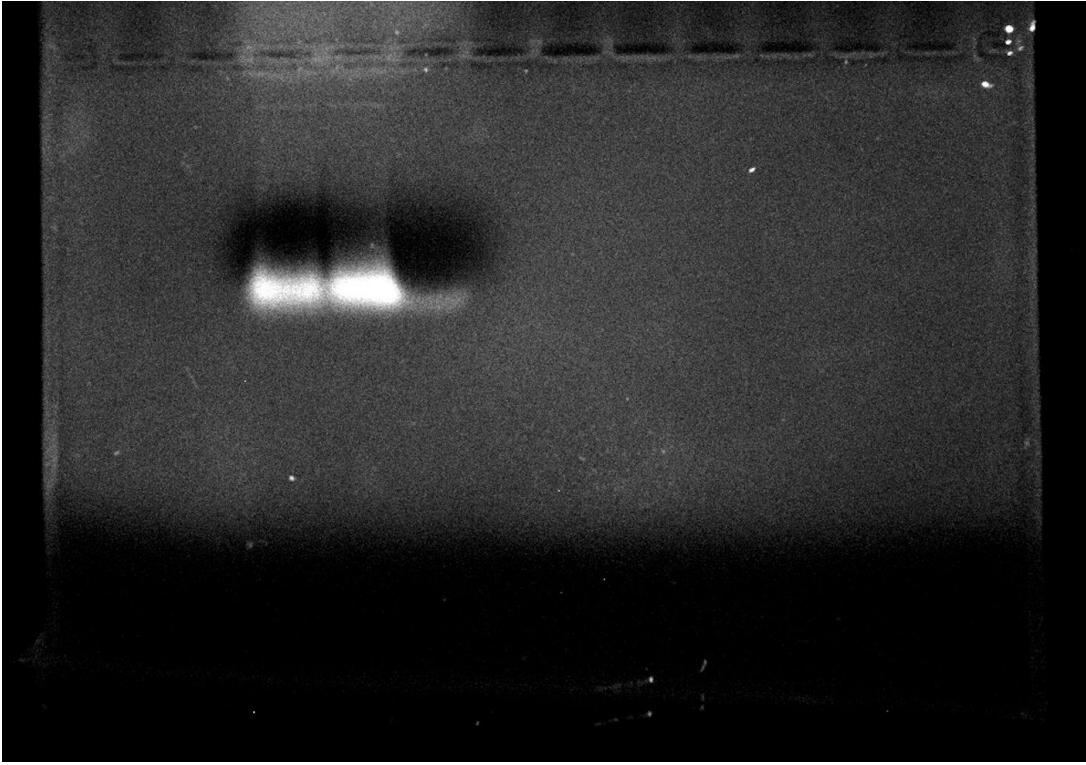
4.4. *E.coli* RNA Özütünden RNA Saflaştırılması

E. coli'den elde edilen RNA özütünden poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellere adsorbe edilen örneklerin 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak RNA fraksiyonları belirlenmiştir. A_{260}/A_{280} nm oranına bakılarak desorpsiyon işlemi sonucu elde edilen RNA molekülünün saflığının bir belirteci olarak 1.81 değerine ulaşılmıştır. Seyreltme oranlarına göre RNA molekülünün bağlanma kapasitesindeki değişkenlik Şekil 30'da yer almaktadır. Aşağıdaki çizelgede her bir oran için A_{260}/A_{280} oranı verilmiştir. Seyreltme oranının artmasına bağlı olarak saflaştırılan RNA miktarında azalma gözlenirken, tüm seyreltme oranları için A_{260}/A_{280} oranı stabil durumdadır. Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinin her bir seyreltme oranı için verimliliği ve özellikleri benzerdir.

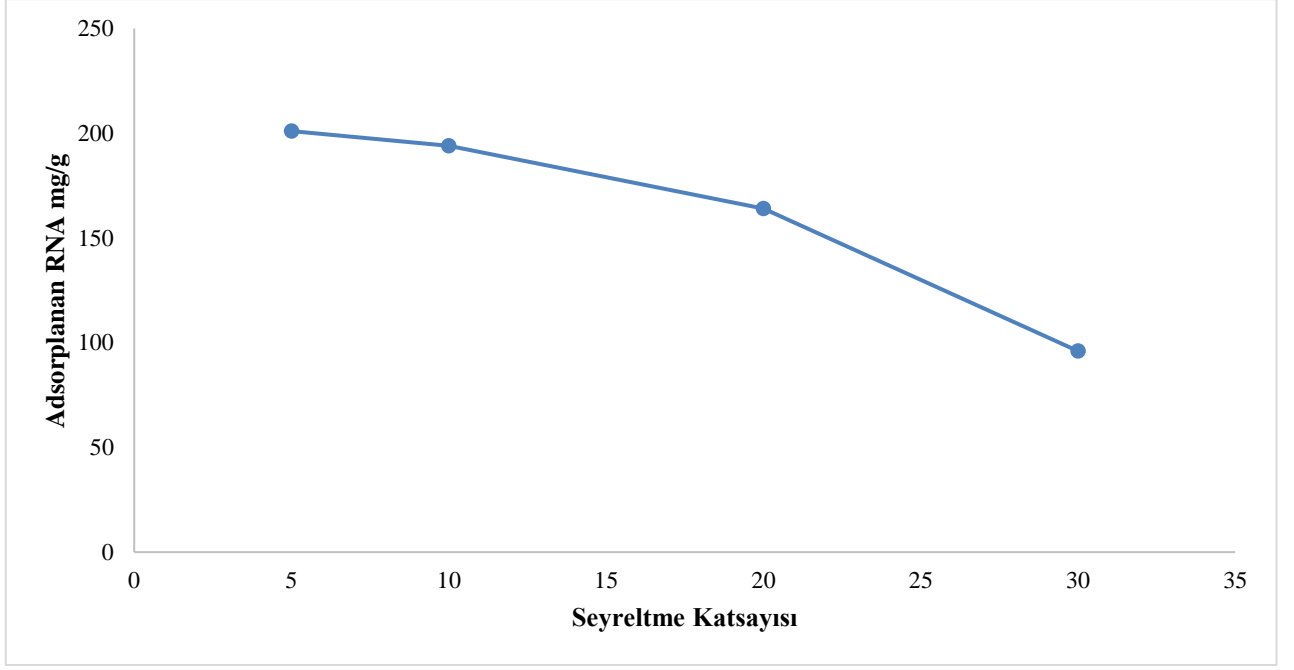
Poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller ile *E. coli* hücre özütünden RNA saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonlar agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Birinci kuyucukta poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller ile 120 dakika adsorpsiyonun sonunda elde edilen numune, ikinci kuyucukta özütlenen RNA'nın deney öncesi numunesi, üçüncü kuyucuka ise desorpsiyon sonunda elde edilen numune yer almaktadır. Şekil 30'dan anlaşılacağı üzere birinci kuyucukta bulunan adsorpsiyon sonrası örnek deney

öncesine göre daha az yoğunlukta RNA göstermektedir. Ayrıca üçüncü kuyucukta RNA tek bant halinde görülmekte ve saf halde elde edildiği söylenebilir.

Buradan yola çıkarak poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller yüzeyinde bulunan boronik asit grupları ile RNA etkileşim açık bir şekilde görülmektedir. Bu da RNA moleküllerinin yüksek düzeyde saflaştırıldığını göstermektedir. Bu da RNA moleküllerinin bağlanma ve elüsyon işlemlerinin başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 30. *E. coli* hücre özütünden elde edilen RNA fraksiyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (Kodak Gel Logic 200 sistem, Rochester NY, ABD cihazı ile görüntü alınmıştır.)



Şekil 31. Seyreltme katsayısına bağlı olarak RNA adsorpsiyonu; Sıcaklık: 37°C

Çizelge 5. Seyreltme oranlarına karşılık A_{260}/A_{280} ve Q değerleri.

Seyreltme Oranı	A_{260}/A_{280}	Q (mg/g)
1/5	1.96	200.00
1/10	1.83	194.01
1/20	1.82	164.00
1/30	1.81	94.00

4.5. Literatür Özeti

RNA saflaştırılmasına yönelik yapılan çalışmaların literatür özeti incelenmiş olup aşağıda yer alan Çizelge 6'da sunulmuştur.

Çizelge 6. Literatür özeti

YAZAR	AMAÇ	YÖNTEM	SONUÇ	REFERANS
Toprak ve ark.	RNA Adsorpsiyonu	PHEMA nanopartiküller	RNA adsorpsiyon miktarının 56.07 mg/g nanopartikül değerinde olduğu bilgisine erişilmiştir.	[180]
Sousa ve ark.	Plazmid DNA saflaştırması	Afinite kromatografi Ligand: Histidin Taşıyıcı: Monolit	plazmik DNA %97 ve %79 oranlarında (sırasıyla %99 ve %92 saflık dereceleri ile) saflaştırılmıştır.	[181]
Shakya ve ark.	RNA izolasyonu	Boronat afinite kromatografisi p(HEMA VPBA) kriyojel		[182]
Farrag ve ark.	RNA izolasyonu	Kitosan bazlı taşıyıcılar	Yüksek pH koşullarında RNA özütleme veriminin arttığı sonucuna ulaşılmıştır.	[183]
Srivastava ve ark.	Hücre ve RNA ayrıştırılması	Boronat afinite kromatografisi Taşıyıcı: Poli(HEMA-VPBA) kriyojel	RNA bağlanma oranı 1.13 mg/ml kolon olarak belirlenmiştir.	[184]
Mourao ve ark.	Protein saflaştırması (insan serumundan IgG saflaştırılması)	Afinite kromatografi Taşıyıcı: PAAM- Alg-Bix-P-Tyr kriyojel	PAAM-Alg-Bix-P-Tyr kriyojel için insan serumu 10 mmol/L NaP pH 6.0 tamponunda seyreltildiğinde %94 IgG saflığına sahip 9.2 mg IgG/mL'lik bir dinamik kapasite elde edilmiştir.	[185]
Santoz ve ark.	Influenza hemagglutinin genini eksprese eden NTC7482-41H-VA2 HA plazmitini saflaştırmak	PHEMA kriyojel	0.1 mg/ml Derişimindeki pDNA'nın 0.36 mg/ml değerinde dinamik bağlanma kapasitesine sahip olduğu ve % 98.1 saflıkta %69.19 geri kazanım verimi gözleendiği belirlenmiştir.	[186]

Armutçu	RNA saflaştırma	Poli(HEMA-UraM) membranlar	Poli(HEMA-UraM) membranın maksimum RNA adsorpsiyonu 25.0°C, pH 7.0, 0.5 mg/mL RNA başlangıç derişiminde 15.5 mg/g olduğu bulunmuştur.	[187]
Köse ve ark.	Yüksek verimde RNA saflaştırma	Poly(HEMA-GuaM)	Poli(HEMA-GuaM) kriyojel ile maksimum RNA adsorpsiyon kapasitesi 11.9 mg RNA/ g polimer olarak bulunmuştur.	[188]
Perçin ve ark.	<i>E. coli</i> 'den RNA saflaştırması	Poli(HEMA-VPBA) nanopartiküller	Maxiumum RNA kapasitesi 1.0 mg/mL başlangıç RNA derişiminde 172 mg/g olarak belirlenmiştir.	[189]
Erol,K	DNA saflaştırılması	Co(II) immobilize poli(HEMA-GMA) kriyojeller	Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi 33.8 mg DNA/g kriyojel olarak ve kriyojellerin DNA adsorpsiyon kapasitesi 10.1 mg DNA/g kriyojel olarak bulunmuştur.	[190]
Zheng ve ark.	Bakteri ayrıştırılması	Boronik asit ligand içeren kompozit kriyojeller	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> için kompozit kriyojelin bağlama kapasiteleri sırasıyla 2.15×10^9 ve 3.36×10^9 cfu/g olarak bulunmuştur.	[191]

Toprak ve ark. yapmış oldukları çalışmada boronik asit varlığında poli(HEMA) bazlı nanopartiküller sayesinde RNA adsorpsiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yüzey emisyon polimerasyonu tekniği ile elde edilen nanopartiküller 3-(2-imidiazol-1-il) priril (trietoksisilan) ile geliştirilmiştir. Farklı pH, sıcaklık ve RNA derişimi ile yapılan deneylerde nanopartiküllerin 5 kez tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ve maksimum RNA adsorpsiyon miktarının 56.1 mg/g nanopartikül değerinde olduğu bilgisine erişilmiştir [180].

Sousa ve ark. plazmid DNA saflaştırılması amacıyla yapmış oldukları çalışmada *Escherria coli* bakterilerinin lizatlarını kullanmışlardır. Deneyler, ligand olarak seçilen histaminin monolit ile modifiye edilmiş hali kullanılarak, hidrofobik elüsyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Farklı saflaştırma stratejilerin uygulandığı çalışmada plazmik DNA %97 ve %79 oranlarında (sırasıyla %99 ve %92 saflık dereceleri ile) saflaştırılmıştır. Ayrıca çalışmada lizat örneğinin ön(hazırlık) yüklemesi aşamasında RNA %89 oranında saflaştırılmıştır [181].

Shakya ve ark. boronat afinite kromatografisi yöntemi ile kriyojel matris kullanarak RNA izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada bakteri özlerinden faydalanan ekip, poli(2-hidroksimetil metakrilat)-vinilfenilboronik asit, poli(HEMA-VPBA) kriyojel matrisini kullanmışlardır. Yaptıkları deneyler sonucunda 35-40 dk'lık zaman diliminde 260 nm'de elüsyon incelemeleri sonucu RNA saflaştırmasını gerçekleştirmeyi başarmışlardır [182].

Farrag ve ark. yaptıkları çalışmada kitosan bazlı biyomateryaller sentezlemişlerdir. Sentezlenen malzemelere hücreleri kapsülleyerek RNA izolasyonu gerçekleştirmeyi hedeflemişlerdir. pH ayarlı RNA izolasyonu yaptıkları deneylerde genel olarak verim düşük olsa da yüksek pH'larda yüksek verim ve iyi kalite ile RNA saflaştırmayı başarmışlardır [183].

Srivastava ve ark. 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada boronat afinitesi bazlı kriyojel kromatografi matrisleri geliştirmiş ve ligandlar iki yöntemle, yani boronat ligandının matris üzerine aşılması ve boronat içeren monomerin diğer komonomerlerle kopolimerizasyonu yoluyla immobilize etmişlerdir. Boronat aşılınmış kriyojel kolonu, yapışık ve yapışmayan hücreleri yakalamak için kullanıldı ve yakalanan hücreler, kromatografi modunda bir yıkama maddesi olarak farklı fruktoz derişimlerinde geri kazanıldı. Yapışkan hücrelerin, düşük fruktoz derişimi (0.1 M) kullanılarak geri kazanılabilen yapışmayan hücrelere göre nispeten daha yüksek fruktoz derişiminde (0.5 M) geri kazanılabileceği bulunmuştur. Başka bir çalışmada, herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan bakteriyel ham özütten RNA'nın ayrılması için kopolimerize bir boronat kriyojel kolonu geliştirmişlerdir. RNA molekülleri, RNA'daki 2,3' diol riboz şekeri grubu ile boronatın hidroksil grubu arasındaki etkileşim nedeniyle kriyojel kolonunda spesifik olarak tutulmuştur. DNA molekülleri, 2'-hidroksil grubunun olmaması nedeniyle etkileşime girmeden kolondan geçirilmiştir. Daha sonra bağlı RNA molekülleri, boronat afinite kriyojel kolonundan geri kazanılmıştır [184].

Mourao ve ark. yapmış oldukları çalışmada, proteinlerin saflaştırılması için afinite kromatografisinde matris olarak kullanılmak üzere, akrilamid ve aljinat monomerlerinin ve metilen-bisakrilamidin çapraz bağlayıcı olarak kriyo-kopolimerizasyonu ile poliakrilamid-aljinat (PAAm-Alg) monolitik kriyojeller hazırlanmıştır. Orto-fosfo-L-tirozin (P-Tyr), bisoksiran aktivasyonu (PAAm-Alg-Bix-P-Tyr) yoluyla PAAm-Alg kriyojellerine kovalent olarak bağlanmış ve G (IgG) insan serumundan immüno-globulinin saflaştırılması için hem türevlendirilmiş hem de türevlendirilmemiş kriyojeller kullanılmıştır. Eğri analizi yoluyla, PAAm-Alg-Bix-P-Tyr kriyojel için insan serumu 10 mmol/L NaP pH 6.0 tamponunda seyreltildiğinde %94 IgG saflığına sahip 9.2mg IgG/mL'lik bir dinamik kapasite elde edilmiştir. (IgG ve albüminin ELISA analizine göre). Adsorpsiyon izoterm verileri, PAAm-Alg-Bix-P-Tyr için 36.12 ± 3.63 mg IgG/g maksimum adsorpsiyon kapasitesi değeriyle Langmuir modeli tarafından iyi tanımlanmıştır. PAAm-Alg-Bix-P-Tyr kriyojel, insan serumundan IgG adsorpsiyonu için çekici bir alternatif sağladığı bulgusuna erişilmiştir [185].

2018 yılında Santoz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, Influenza hemagglutinin genini eksprese eden NTC7482-41H-VA2 HA plazmitini saflaştırmak için poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojel bazlı bir yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, kriyojel, 2-hidroksietil metakrilatın kriyo-polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Plazmit NTC7482-41H-VA2 HA'nın süper sarmal izoformunun berraklaştırılmış bir lizat numunesinden saflaştırılması, NaCl kullanılarak iki aşamalı bir deneyde gerçekleştirilmiş ve pHEMA kriyojelinin dinamik bağlama kapasitesi belirlenmiştir. DNA aşısının değerlendirilmesi, proteinler, genomik DNA, RNA ve endotoksinler gibi kirleticilerin seviyesinin FDA ajansına uygun olduğu sonucuna varılmasına izin verilmiştir [186].

Armutçunun yapmış olduğu çalışmada RNA saflaştırmak için nükleotid bazlı ligand kullanılarak gözenekli membranlar tasarlanmıştır. Bu çalışmada, polimerize edilebilir urasil monomeri urasil metakrilat (UraM) olarak sentezlenmiş, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) bazlı membranlar [poli(HEMA-UraM)] UraM ve HEMA monomerlerinin kopolimerizasyonu ile kısmen dondurulmuş koşullar altında yığın polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Bu membranlar şişme çalışması, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Ayırma koşullarını optimize etmek için, pH, başlangıç RNA derişimi, süre ve sıcaklığın RNA adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Poli(HEMA-UraM)

membranın maksimum RNA adsorpsiyonu 25.0°C, pH 7.0, 0.5 mg/mL RNA başlangıç derişiminde 15.52 mg/g olduğu bulunmuştur. On tekrarlı adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra, RNA adsorpsiyon kapasitesi yalnızca %3.68 oranında azaldığı gözlenmiştir [187].

Köse ve ark. yapmış oldukları çalışmada yüksek oranda saflaştırılmış ribonükleik asit elde etmek için guanin içeren polimerik kriyojeller geliştirilmiştir. Tatmin edici saflaştırma performansı, guanin içeren poli (2-hidroksietil metakrilat-guanin metakrilat) kriyojelleri ile elde edilmiştir. Kriyojellerin karakterizasyonu, sentezin başarısını ve ligand (guanin metakrilat) ile ribonükleik asit moleküllerindeki sitozin arasında gerçekleşecek mükemmel doğal etkileşimi kanıtlamıştır. Kriyojellerin yapısındaki gözenekler küçük olmasına rağmen verimli ve hızlı adsorpsiyon sağlanmıştır. Kromatografik ayırma performansı farklı koşullar (pH, sıcaklık vb.) için incelenmiştir. Desorpsiyon oranı ve yeniden kullanılabilirlik, önemli bir değişiklik olmaksızın beş adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün sonunda da analiz edilmiştir [188].

Perçin ve ark. 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada poli(2-hidroksietil metakrilat-kovinil fenil boronik asit) [poli(HEMA-VPBA)] nanoparçacıkları, RNA saflaştırma yöntemlerinde kullanılmak üzere miniemülsiyon polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Sıcaklık, pH, RNA derişimi ve farklı tuz türlerinin poli(HEMA-VPBA) nanoparçacıkları üzerindeki RNA bağlanmasına etkileri incelenmiştir. pH'ın artmasıyla RNA bağlanmasının arttığı ve pH 9.0'da maksimum RNA bağlanmasının elde edildiği gözlenmiştir. Poli(HEMA-VPBA) nanopartiküllerinin RNA bağlama kapasitesi, bağlama ortamına BaCl₂ eklenmesiyle 167 mg/g'dan 601 mg/g'ye yükselmiştir. Poli(HEMA-VPBA) nanoparçacıklarının maksimum RNA bağlama kapasitesi, 1.0 mg/mL başlangıç RNA derişiminde 172 mg/g idi. RNA ayrıca *Escherichia coli* hücrelerinden özütlenerek ve poli(HEMA-VPBA) nanoparçacıkları kullanılarak başarıyla saflaştırılmıştır [189].

Erol, DNA saflaştırmak amacıyla yapmış olduğu çalışmada adsorpsiyon tekniği, büyük gözenekler ve ilişkili akış kanalları nedeniyle adsorban kriyojeller kullanmıştır. Bu çalışmada, Co(II) immobilize poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) [poli(HEMA-GMA)] kriyojeller çeşitli pH, etkileşim süresi, başlangıç DNA derişimi, sıcaklık, ve iyonik güç koşullarında DNA adsorpsiyonu için işletilmiştir. Kriyojellerin karakterizasyonu için; şişme testi, Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu (SEM), yüzey alanı (BET), elemental ve ICP-OES analizleri yapılmıştır. Co(II)-şelatlayıcı ajan olarak L-lisin amino asit seçilmiş ve

kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi 33.81 mg DNA/g kriyojel olarak belirlenmiştir. Bezelye DNA'sının adsorpsiyonu optimum adsorpsiyon koşulları altında çalışılmış ve kriyojellerin DNA adsorpsiyon kapasitesi 10.14 mg DNA/g kriyojel olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon işlemi Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ile incelenmiş ve Langmuir adsorpsiyon modelinin kriyojellere DNA adsorpsiyonu için daha uygun olduğu belirlenmiştir [190].

Zheng ve arkadaşları boronik asit ligandları içeren kompozit kriyojeller bakterilerin etkin bir şekilde ayrıştırılması ve izolasyonu için sentezlemişlerdir. Kriyojellerdeki büyük ve birbirine bağlı gözenekler, mikrobiyal hücrelerin hızlı bağlanmasını ve salınmasını sağlamaktadır. Bakteriyel bağlanmayı kontrol etmek için, bir alkin-etiketli boronik asit ligandı, Cu(I)-katalizli azid-alkin siklo katılma tepkimesi yoluyla azid-fonksiyonelleştirilmiş kriyojele konjuge edilmiştir. Boronik asit ile işlevselleştirilmiş kriyojel, pH ve basit monosakkaritlerle kontrol edilebilen tersinir boronat ester bağları yoluyla Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri bağlamaktadır. Afinite ayırma kapasitesini arttırmak için, alkin etiketli fenilboronik asidi, çoklu immobilizasyon bölgeleri sağlayan bir ara polimer tabakası yoluyla kriyojele bağlamak için yeni bir yaklaşım kullanılmıştır. Kompozit kriyojelin Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri ayırma kapasitesi araştırılmıştır. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus epidermidis* için kompozit kriyojelin bağlama kapasiteleri sırasıyla 2.15×10^9 ve 3.36×10^9 cfu/g olarak bulunmuştur. Kompozit kriyojelin bakteriyel bağlanması pH ayarlanarak kontrol edilebilmektedir. Sonuçlar, kompozit kriyojelin, karmaşık numunelerden bakterilerin hızlı ayrılması ve izolasyonu için afinite ortamı olarak kullanılabileceğini göstermektedir [191].

5. YORUM

E. coli hücrelerinden polimerik mikrokriyojeller ile RNA saflaştırılması konulu sunulan tez kapsamında RNA saflaştırılması başarılmıştır. RNA saflaştırılması amacıyla biyomoleküller ve boronat grupları arasındaki spesifik etkileşimlere dayanarak boronat afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Bu kapsamda, poli(HEMA) ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller hazırlanmıştır. Mikrokriyojellerin minyatür boyut, geniş gözeneklilik ve biyofaktörler gibi biyomoleküllerin taşınımına olanak veren yapıları sayesinde RNA adsorpsiyonu etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikrokriyojellerin optik görüntüleme, SEM-EDX, μ CT ve FT-IR analizleri ile karakterizasyonu incelenmiştir. RNA adsorpsiyonu kapsamında sulu çözelti adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda optimum pH, tuz, sıcaklık, derişim, zaman koşulları belirlenmiştir. Mikrokriyojellerin desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gözlemlenmiştir. *E. coli* hücrelerinden RNA özütü elde edilerek mikrokriyojeller ile saflaştırma sağlanmıştır. Ardından agaroz jel elektroforez ile saflaştırılan RNA analiz edilmiştir.

Mikrokriyojel sentezinde poli(HEMA) ve poli(HEMA-VPBA) olmak üzere iki farklı materyal elde edilmiştir. Sentezlenen poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerin karakterizasyonu sonucu 0.5x0.5 mm ebatlarda ve 10-25 μ m çapında birbirlerine bağlı gözeneklerden oluştuğu bulgusuna erişilmiştir. Yapılan μ CT analizleri sonucu toplam gözeneklilik % 65.52 oranında bulunmuştur.

Poli(HEMA) ve poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinin karşılaştırılmalı olarak kullanıldığı sulu çözeltilerden adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 1,5 mL hacimli eppendorflara 0.1-1.0 mg arası değişen miktarda RNA ve eşit miktarda mikrokriyojeller eklenerek kesikli sistemde 25 rpm hızda ve 120 dk süre ile çalışılmıştır. 1:10 oranında seyreltme sonucu adsorbans alınarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Optimum koşulları belirlemek adına yapılan çalışmalarda poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojellerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmalar sonucu etilenamin tamponu kullanılarak pH: 8.5, 0.1 M CaCl_2 tuzu varlığında sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Fenilboronik asitin pKa değerinin 8.0 üzeri olması, amin içeren tamponların etkileşimleri güçlendirmesi ve CaCl_2 tuzunun bağlanma kapasitesini arttırması sebebiyle elde edilen optimum koşullar beklenen değerlerdedir.

RNA adsorpsiyonuna başlangıç ve zamanın etkisinin incelenmesi sonucu yapılan deneylerde 0.5 mg/mL derişimindeki RNA miktarı ve yaklaşık 50.dakikadan sonra spesifik etkileşimlerde doygunluğa ulaşıldığı her iki mikrokriyojel için belirlenmiştir. Bununla beraber poli(HEMA-VPBA) mikrokriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasitesi değeri pH 8.5 etilenamin tamponunda 104.30 mg/g, 0.1 M CaCl₂ tuz varlığında 253.33 mg/g, 37°C sıcaklıkta 109.25 mg/g, 0.5 mg/mL RNA derişiminde 303 mg/g, 50. dakikaya kadar 253.30 mg/g olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon izoterm modelleri ve kinetiği analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda RNA adsorpsiyonun ikinci dereceden izoterm kinetiğine ve Langmuir izoterm modeline uygunluğu tespit edilmiştir. Tekrar kullanılabilirlik ve desorpsiyon çalışmalarına bakılarak sentezlenen mikrokriyojellerin birçok defa kullanıma uygun olduğu ve ticari ürünlere nazaran maliyet avantajına sahip olduğu yorumu yapılabilmektedir.

E.coli hücrelerinden RNA özütü eldesinde bir dizi inkübasyon ve santrifüjleme işlemlerinin gerçekleştiği üç aşamalı prosedür izlenmiştir. Bu prosedür sonucunda jel elektroforez deneyleri yapılarak görüntüler incelenmiştir. Elde edilen RNA fraksiyon görüntüler ele alındığında poli(HEMA-VPBA) ile mikrokriyojel bağlanmaları açıkça görülmekte ve RNA molekülünün yüksek oranda saflaştırıldığı açıkça söylenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Bastard, J.P., Chambert, S., Ceppa, F., Coude, M., Grapez, E., Loric, S., Muzeau, F., Spyrtos, F., Poirier, K., Copois V., Tse, C., Bienvenu, C., RNA isolation and purification methods, *Ann. Biol. Clin.*, 60(5) 513-523, 2002.
- [2] Wang, D., Farhana, A., Biochemistry, RNA Structure, StatPearls Publication, 2020.
- [3] Poole, C.F., Poole, S.K., *Chromatography Today*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2012.
- [4] Wilchek, M., Chaiken, I., An overview of affinity chromatography. in: *Affinity Chromatography Methods and Protocols*, Bailon, P., Ehrlich, G.K., Fung, W.J., Berthold, W., eds., pp. 1-6, Humana Press, New York, 2000.
- [5] Tripathi, A., Kumar, A., Multi-featured macroporous agarose–alginate cryogel: synthesis and characterization for bioengineering applications, *Macromolecular Bioscience*, 11, 22-35, 2011.
- [6] Plieva, F.M., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Characterization of polyacrylamide based monolithic columns, *Journal of Separation Science*, 27, 828-836, 2004.
- [7] Rich, A., Davies, D.R., A new two stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 78(14) 3548-3549, 1956.
- [8] Sharp, P.A., The centrality of RNA. *Cell*, 136(4) 577-580, 2009.
- [9] Liu, Wei, Li, Y., Zeng, Y., Zhang, X., Wang, J., Xie, L., Li, X., Du, Y., Microcryogels as injectable 3-D cellular microniches for site-directed and augmented cell delivery. *Acta Biomaterialia*, 10(5) 1864-1875, 2014.
- [10] Bajan, S., Hutvagner, G., RNA-based therapeutics: from antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 9(1) 137, doi: 10.3390/cells9010137, 1-27, 2020.
- [11] Nilsen, T.W., The fundamentals of RNA purification. *Cold Spring Harbor Protocols*, doi: 10.1101/pdb.top075838, 2013.
- [12] Vomelova, I., Vaníčková, Z., Šedo, A., Technical note methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica (Praha)*, 55, 243-251, 2009.

- [13] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*, 1355, 1-14, 2014.
- [14] El-Sagheer, A.H., Brown, T., New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35) 15329-15334, 2010.
- [15] Maina, A., Blackman, B.A., Parronchi, C.J., Morozko, E., Bender, M.E., Blake, A. D., Sabatino, D., Solid-phase synthesis, characterization and RNAi activity of branch and hyperbranch siRNAs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(19) 5270-5274, 2013.
- [16] Maroney, P.A., Chamnongpol, S., Souret, F., Nilsen, T.W., A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation. *RNA*, 13(6) 930-936, 2007.
- [17] Gochman, N., Bowie, L.J., Bailey, D.N., Specialized gas chromatography-mass spectrometry systems for clinical chemistry, *Analytical Chemistry*, 51(4), 525A-528A, 1979.
- [18] McFadden, W.H., *Techniques of Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis*, Wiley, New York, NY, 1973.
- [19] Lowe, C.R., *Affinity chromatography and related techniques: Perspectives and trends. Advances in Molecular and Cell Biology*, 15, 513-522, 1996.
- [20] Hage, D.S., Cazes, J. *Handbook of Affinity Chromatography*. CRC Press., Boca Raton, FL, 2005.
- [21] Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J., *Affinity Chromatography. Methods in Enzymology*, 104, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1984.
- [22] Wilchek, M., Miron, T., Activation of Sepharose with N, N'-disuccinimidyl carbonate. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 11(4) 191-193, 1985.
- [23] Wilchek, M., Knudsen, K.L., Miron, T., Improved method for preparing N-hydroxysuccinimide ester-containing polymers for affinity chromatography. *Bioconjugate Chemistry*, 5(5) 491-492, 1994.

- [24] Dunn, B.M., Chaiken, I. M., Quantitative affinity chromatography. Determination of binding constants by elution with competitive inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(6) 2382-2385, 1974.
- [25] Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B., Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2) 636-643, 1968.
- [26] Bereli, N., Türkmen, D., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Denizli, A., Cryogels for affinity chromatography, in: *Advanced Separations by Specialized Sorbents*, E.S. Dragan, ed., Chromatographic Science Series, pp. 39-67, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2015.
- [27] Swaisgood H.E., Chaiken I.M., *Analytical Affinity Chromatography*, Chaiken, I.M., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 65-115, 1985.
- [28] Fassina, G., Chaiken, I.M., Analytical high-performance affinity chromatography. *Advances in Chromatography*, 27, 247-297, 1987.
- [29] Vijayalakshmi Ayyar, B., Arora, S., eds., *Affinity Chromatography Methods and Protocols*, vol. 2466, Humana Press, New York, 2022.
- [30] Zachariou, M., ed., *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, vol. 421, New York, Humana Press, New York, 2008.
- [31] Janson, J.C., Large-scale affinity purification-state of the art and future prospects. *Trends in Biotechnology*, 2(2) 31-38, 1984.
- [32] Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry*, 198(2) 268-277, 1991.
- [33] Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J. The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(7-8) 347-354, 1993.
- [34] Buckle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D., Lowe, C.R. The resonant mirror: a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions part II: applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(7-8) 355-363, 1993.

- [35] Johnsson, U., Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques*, 11, 620-627, 1991.
- [36] Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Zheng, X., Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69, 93-105, 2012.
- [37] Haeckel, R., Hess, B., Lauterborn, W., Wüster, K.H., Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase., *Biological Chemistry*, doi.org/10.1515/ bchm2. 1968.349.1.699, 1968.
- [38] Salvatore, F., Paul R.H., Colin, F.P., Peter, J.S., *Liquid Chromatography, Applications*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2013.
- [39] Turkova, J., *Affinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1978.
- [40] McGinnis, A.C., Chen, B., Bartlett, M.G., Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Chromatography B*, 883, 76-94, 2012.
- [41] Mayr, B., Hölzl, G., Eder, K., Buchmeiser, M.R., Huber, C.G., Hydrophobic, pellicular, monolithic capillary columns based on cross-linked polynorbornene for biopolymer separations. *Analytical Chemistry*, 74(23) 6080-6087, 2002.
- [42] Arora, V., Devi, G.R., Iversen, P.L., Neutrally charged phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers: uptake, efficacy and pharmacokinetics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5(5) 431-439, 2004.
- [43] Easter, R.N., Kröning, K.K., Caruso, J.A., Limbach, P.A., Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS). *Analyst*, 135(10) 2560-2565, 2010.
- [44] Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., Weissman, D., Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(21) 142, 2011.

- [45] Kreiter, S., Diken, M., Selmi, A., Türeci, Ö., Sahin, U., Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. *Current Opinion in Immunology*, 23(3) 399-406, 2011.
- [46] Conn, G.L., ed., *Recombinant and In Vitro RNA Synthesis: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, 2012.
- [47] Lukavsky, P.J., Puglisi, J.D., Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides. *RNA*, 10(5) 889-893, 2004.
- [48] Kim, I., McKenna, S.A., Puglisi, E.V., Puglisi, J.D., Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC). *RNA*, 13(2) 289-294, 2007.
- [49] McKenna, S.A., Kim, I., Puglisi, E.V., Lindhout, D.A., Aitken, C.E., Marshall, R.A., Puglisi, J.D., Purification and characterization of transcribed RNAs using gel filtration chromatography. *Nature Protocols*, 2(12) 3270-3277, 2007.
- [50] Easton, L.E., Shibata, Y., Lukavsky, P.J. Rapid, nondenaturing RNA purification using weak anion-exchange fast performance liquid chromatography. *RNA*, 16(3), 647-653., 2010.
- [51] Gjerde, D.T., Hoang, L., Hornby, D., *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*. John Wiley & Sons, 2009.
- [52] Shanagar, J. Purification of a synthetic oligonucleotide by anion exchange chromatography: method optimisation and scale-up. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 64(3) 216-225, 2005.
- [53] Dickman, M.J., Effects of sequence and structure in the separation of nucleic acids using ion pair reverse phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1076(1-2) 83-89, 2005.
- [54] Thayer, J., Murugaiah, V., Wu, Y., Bonilla, J.V., Srivatsa, G.S., in: *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
- [55] Ge, Q., McManus, M.T., Nguyen, T., Shen, C.H., Sharp, P.A., Eisen, H.N., Chen, J., RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5) 2718-2723, 2003.

- [56] Bonilla, J.V., Srivatsa, G.S., in: *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
- [57] Romanovskaya, A., Sarin, L.P., Bamford, D.H., Poranen, M.M., High-throughput purification of double-stranded RNA molecules using convective interaction media monolithic anion exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 1278, 54-60, 2013.
- [58] Martins, A.R.N. *Biorecognition by amino acid-based affinity chromatography for RNA purification*, Doctoral Dissertation, Universidade da Beira Interior, Portugal, 2013.
- [59] Diego, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F., Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069(1) 3-22, 2005.
- [60] Sousa, Â., Sousa, F., Queiroz, J.A., Advances in chromatographic supports for pharmaceutical grade plasmid DNA purification. *Journal of Separation Science*, 35(22) 3046-3058, 2012.
- [61] Lowe, C.R., Lowe, A.R., Gupta, G., New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1-3) 561-574, 2001.
- [62] Uhlén, M., Affinity as a tool in life science. *Biotechniques*, 44(5) 649-654, 2008.
- [63] Roque, A.C.A., Lowe, C.R., History, perspectives, limitations and prospects, in: *Affinity Chromatography Methods and Protocols*, Zachariou, M., ed., pp. 1-23, Humana Press, New York, 2008.
- [64] Magdeldin, S., *Affinity Chromatography*, InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- [65] Labrou, N.E., Design and selection of ligands for affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790(1-2) 67-78, 2003.
- [66] Sousa, F., Prazeres, D.M., Queiroz, J.A., Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in biotechnology*, 26(9) 518-525, 2008.
- [67] Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy, C., O’Kennedy, R., Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56(2) 116-129, 2012.
- [68] Moore, P.B., Structural motifs in RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1) 287-300, 1999.

- [69] Aviv, H., Leder, P., Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6) 1408-1412, 1972.
- [70] Ruby, S.W., Goelz, S.E., Hostomsky, Z., Abelson, J.N. Affinity chromatography with biotinylated RNAs. in: *Methods in Enzymology*, Vol. 181, pp. 97-121. Academic Press, New York, 1990.
- [71] Kyte, J.A., Kvalheim, G., Aamdal, S., Sæbøe-Larsen, S., Gaudernack, G., Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. *Cancer Gene Therapy*, 12(6) 579-591, 2005.
- [72] Medzhitov, R., Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2) 135-145, 2001.
- [73] Wendisch, V.F., Zimmer, D.P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N., Kustu, S. Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, 290(2) 205-213, 2001.
- [74] Srisawat, C., Engelke, D.R., RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. *Methods*, 26(2) 156-161, 2002.
- [75] Ponchon, L., Dardel, F., Large scale expression and purification of recombinant RNA in *Escherichia coli*. *Methods*, 54(2) 267-273, 2011.
- [76] Srisawat, C., Goldstein, I.J., Engelke, D.R., Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures. *Nucleic Acids Research*, 29(2), e4-e4, 2001.
- [77] Srisawat, C., Engelke, D.R., Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA*, 7(4) 632-641, 2001.
- [78] Walker, S.C., Scott, F.H., Srisawat, C., Engelke, D.R., RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. in: *RNA-Protein Interactions Protocols*, pp. 23-40, Humana Press, New York, 2008.
- [79] Kieft, J.S., Batey, R.T., A general method for rapid and nondenaturing purification of RNAs. *RNA*, 10(6) 988-995, 2004.
- [80] Batey, R.T., Kieft, J.S., Improved native affinity purification of RNA. *RNA*, 13(8) 1384-1389, 2007

- [81] Sherlin, L.D., Bullock, T.L., Nissan, T.A., Perona, J.J., Lariviere, F.J., Uhlenbeck, O.C., Scaringe, S.A. Chemical and enzymatic synthesis of tRNAs for high-throughput crystallization. *RNA*, 7(11) 1671-1678, 2001.
- [82] Srisawat, C., Engelke, D.R., RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. *Methods*, 26(2) 156-161, 2002.
- [83] Simons, P.C., Vander Jagt, D.L. Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography. in: *Methods in Enzymology*, Vol. 77, pp. 235-237, Academic Press, 1981.
- [84] Ståhl, S., Nygren, P.A., The use of gene fusions to protein A and protein G in immunology and biotechnology. *Pathologie-Biologie*, 45(1) 66-76, 1997.
- [85] Porath, J., Carlsson, J.A.N., Olsson, I., Belfrage, G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599, 1975.
- [86] Porath, J., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification*, 3(4) 263-281, 1992.
- [87] Prickett, K.S., Amberg, D.C., Hopp, T.P., A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques*, 7(6) 580-589, 1989.
- [88] Rodgers, N.D., Jiao, X., Kiledjian, M., Identifying mRNAs bound by RNA-binding proteins using affinity purification and differential display. *Methods*, 26(2) 115-122, 2002.
- [89] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., A new affinity approach to isolate *Escherichia coli* 6S RNA with histidine-chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, 23(6) 519-524, 2010.
- [90] Martins, R., Queiroz, J.A., Sousa, F., Histidine affinity chromatography-based methodology for the simultaneous isolation of *Escherichia coli* small and ribosomal RNA. *Biomedical Chromatography*, 26(7) 781-788, 2012.
- [91] Sousa, F., Cruz, C., Queiroz, J.A., Amino acids–nucleotides biomolecular recognition: from biological occurrence to affinity chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, 23(6) 505-518, 2010).

- [92] Treger, M., Westhof, E., Statistical analysis of atomic contacts at RNA-protein interfaces. *Journal of Molecular Recognition*, 14(4) 199-214, 2001.
- [93] Yarus, M., Widmann, J.J., Knight, R., RNA–amino acid binding: a stereochemical era for the genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 69(5) 406-429, 2009.
- [94] Jeong, E., Kim, H., Lee, S.W., Han, K., Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes. *Molecules and Cells*, 16(2) 161-167, 2003.
- [95] Czerwoniec, A., Dunin-Horkawicz, S., Purta, E., Kaminska, K.H., Kasprzak, J.M., Bujnicki, J.M., Rother, K., Modomics: a database of RNA modification pathways. 2008 update. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl-1), D118-D121, 2009.
- [96] Wang, W.X., Wilfred, B.R., Baldwin, D.A., Isett, R.B., Ren, N., Stromberg, A., Nelson, P.T., Focus on RNA isolation: obtaining RNA for microRNA (miRNA) expression profiling analyses of neural tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11) 749-757, 2008.
- [97] Turkova, J., Bioaffinity Chromatography, Elsevier, The Netherlands, 1993.
- [98] Adamek, V., Liu, X.C., Zhang, Y.A., Adamkova, K., Scouten, W.H., New aliphatic boronate ligands for affinity chromatography, *J. Chromatography A*, 625(2) 91-99, 1992.
- [99] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö., *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2010.
- [100] Gabius, H.J., Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emergence of functionality, *Biochemical Society Transactions*, 39(1) 399-405, 2011.
- [101] Williams, G.T., Johnstone, A.P., Bouriotis, V., Dean, P.D., Affinity chromatography of membrane proteins on dihydroxyboryl–matrix gel, *Biochemical Society Transactions*, 9, 137-139, 1981.
- [102] Middle, F.A., Bannister, A., Bellingham, A.J., Dean, P.D., Separation of glycosylated haemoglobins using immobilized phenylboronic acid. Effect of ligand concentration, column operating conditions, and comparison with ion-exchange and isoelectric-focusing. *Biochemical Journal*, 209(3) 771-779, 1983.

- [103] Tuytten, R., Lemiere, F., Van Dongen, W., Witters, E., Esmans, E.L., Newton, R.P., Dudley, E., Development of an on-line SPE-LC–ESI-MS method for urinary nucleosides: hyphenation of aprotic boronic acid chromatography with hydrophilic interaction LC–ESI-MS. *Analytical Chemistry*, 80(4) 1263-1271, 2008.
- [104] Li, F., Zhao, X., Wang, W., Xu, G., Synthesis of silica-based benzeneboronic acid affinity materials and application as pre-column in coupled-column high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 580(2) 181-187, 2006.
- [105] Böeseken, J., The use of boric acid for the determination of the configuration of carbohydrates. in: *Advances in Carbohydrate Chemistry*, vol. 4, pp. 189-210, Academic Press, 1949.
- [106] Weith, H.L., Wiebers, J.L., Gilham, P.T., Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components. *Biochemistry*, 9(22) 4396-4401, 1970.
- [107] James, T.D., Sandanayake, K.S., Shinkai, S., Saccharide sensing with molecular receptors based on boronic acid. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(17) 1910-1922, 1996.
- [108] Li, H., Liu, Z., Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 148-161, 2012.
- [109] Lee, J.H., Kim, Y., Ha, M.Y., Lee, E.K., Choo, J., Immobilization of aminophenylboronic acid on magnetic beads for the direct determination of glycoproteins by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(9) 1456-1460, 2005.
- [110] Xu, Y., Wu, Z., Zhang, L., Lu, H., Yang, P., Webley, P.A., Zhao, D., Highly specific enrichment of glycopeptides using boronic acid-functionalized mesoporous silica. *Analytical Chemistry*, 81(1) 503-508, 2009.
- [111] Tang, J., Liu, Y., Qi, D., Yao, G., Deng, C., Zhang, X., On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis. *Proteomics*, 9(22) 5046-5055, 2009.
- [112] Zhang, L., Xu, Y., Yao, H., Xie, L., Yao, J., Lu, H., Yang, P., Boronic acid functionalized core–satellite composite nanoparticles for advanced enrichment of

glycopeptides and glycoproteins. *Chemistry—A European Journal*, 15(39) 10158-10166, 2009.

[113] Jiang, Y., Ma, Y., A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples. *Analytical Chemistry*, 81(15) 6474-6480, 2009.

[114] Wang, W., Feng, B., Li, X., Yin, P., Gao, P., Zhao, X., Xu, G., Urinary metabolic profiling of colorectal carcinoma based on online affinity solid phase extraction-high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecular BioSystems*, 6(10) 1947-1955, 2010.

[115] Weith, H.L., Wiebers, J.L., Gilham, P.T., Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components. *Biochemistry*, 9(22) 4396-4401, 1970.

[116] Li, Y., Pfüller, U., Larsson, E.L., Jungvid, H., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Separation of mistletoe lectins based on the degree of glycosylation using boronate affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 925(1-2) 115-121, 2001.

[117] Li, Y.C., Larsson, E., Jungvid, H., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Separation of neoglycoproteins with different degrees of glycosylation by boronate chromatography. *Chromatographia*, 54(3) 213-217, 2001.

[118] Barnes, H.H., Ishimaru, C.A., Purification of catechol siderophores by boronate affinity chromatography: identification of chrysobactin from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *BioMetals*, 12(1) 83-87, 1999.

[119] Jerkovic, B., Kung, H.C., Bolton, P.H., Purification of thymine glycol DNA and nucleosides by use of boronate chromatography. *Analytical Biochemistry*, 255(1) 90-94, 1998).

[120] Zembower, D.E., Neudauer, C.L., Wick, M.J., Ames, M.M., Peptide boronic acids Versatile synthetic ligands for affinity chromatography of serine proteinases. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 47(5) 405-413, 1996.

[121] Schott, H., Rudloff, E., Schmidt, P., Roychoudhury, R., Koessel, H., Dihydroxyboryl-substituted methacrylic polymer for the column chromatographic separation of

mononucleotides, oligonucleotides, and transfer ribonucleic acid. *Biochemistry*, 12(5) 932-938, 1973.

[122] Ackerman, S., Cool, B., Furth, J.J., Removal of DNA from RNA by chromatography on acetylated N-[N'-(m-dihydroxyborylphenyl) succinamyl] aminoethyl cellulose. *Analytical Biochemistry*, 100(1) 174-178, 1979.

[123] Rosenberg, M., Gilham, P.T., The isolation of 3'-terminal polynucleotides from RNA molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 246(2) 337-340, 1971.

[124] Yurkevich, A.M., Kolodkina, I.I., Ivanova, E.A., Pichuzhkina, E.I., Study of the interaction of polyols with polymers containing n-substituted [(4-boronophenyl) methyl]-ammonio groups. *Carbohydrate Research*, 43(2) 215-224, 1975.

[125] Elmas, B., Onur, M.A., Şenel, S., Tuncel, A., Thermosensitive N-isopropyl-acrylamide-vinylphenyl boronic acid copolymer latex particles for nucleotide isolation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232(2-3) 253-259, 2004.

[126] Senel, S., Camli, S.T., Tuncel, M., Tuncel, A., Nucleotide adsorption-desorption behaviour of boronic acid functionalized uniform-porous particles. *Journal of Chromatography B*, 769(2) 283-295, 2002.

[127] Çiçek, H., Nucleotide isolation by boronic acid functionalized hydrogel beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20(3) 245-257, 2005.

[128] Tanaka, N., Kobayashi, H., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hosoya, K., Ikegami, T., Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*, 965(1-2) 35-49, 2002.

[129] Guiochon, G., Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1-2) 101-168, 2007.

[130] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Octadecyl-silylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 68(19) 3498-3501, 1996.

[131] Ren, L., Liu, Z., Liu, Y., Dou, P., Chen, H.Y., Ring-opening polymerization with synergistic co-monomers: access to a boronate functionalized polymeric monolith for the

specific capture of cis-diol containing biomolecules under neutral conditions. *Angewandte Chemie*, 121(36) 6832-6835, 2009.

[132] Yang, F., Lin, Z., He, X., Chen, L., Zhang, Y., Synthesis and application of a macroporous boronate affinity monolithic column using a metal-organic gel as a porogenic template for the specific capture of glycoproteins. *Journal of Chromatography A*, 1218(51) 9194-9201, 2011.

[133] Potter, O.G., Breadmore, M.C., Hilder, E., Boronate functionalised polymer monoliths for microscale affinity chromatography. *Analyst*, 131(10) 1094-1096, 2006.

[134] Chen, M., Lu, Y., Ma, Q., Guo, L., Feng, Y.Q., Boronate affinity monolith for highly selective enrichment of glycopeptides and glycoproteins. *Analyst*, 134(10) 2158-2164, 2009.

[135] Ren, L., Liu, Z., Dong, M., Ye, M., Zou, H., Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds. *Journal of Chromatography A*, 1216(23) 4768-4774, 2009.

[136] Premraj, R., Doble, M., Biodegradation of polymers, *Indian J. Biotechnol.*, 4, 186-193, 2005.

[137] Thermoplastic Starch, P.B. Leon, M. Janssen and L. Moscicki, eds., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa A, Weinheim, ISBN: 978-3-527-32528-3, 2009.

[138] Davis, L., Clements, U.S. Department of Agriculture, Cooperative State Research Service, Office of Agricultural Materials, Personal Communication, July 27, 1993.

[139] Madigan, M.T. Martinko, J.M., Parker, J., *Biology of Microorganisms*, Ninth Edition, PrenticeHall, Upper Saddle River, 2001.

[140] Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R., Tokiwa, Y., Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria-the metabolism and potential for CO₂ recycling, *Int. J. Biol. Macromol.*, 25(1-3) 37-42, 1999.

[141] Rao, M.G., Bharathi, P., Akila, R.M., A comprehensive review on biopolymers. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 4(2) 61-68, 2014.

[142] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10) 445-451, 2003.

- [143] Lozinsky, V.I., A brief history of polymeric cryogels. in: *Polymeric Cryogels*, Okay, O., ed., pp.1-48, Springer, 2014.
- [144] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russian Chemical Reviews*, 71(6) 489-511, 2002.
- [145] Van Vlierberghe, S., Cnudde, V., Dubruel, P., Masschaele, B., Cosijns, A., De Paepe, I., Schacht, E., Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules*, 8(2) 331-337, 2007.
- [146] Gun'ko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S.V., Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 187, 1-46, 2013.
- [147] Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K.K., Kumar, A., Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(1) 406-418, 2009.
- [148] Yavuz, H., Denizli, A., A New Affinity separation medium: supermacroporous cryogels, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.10733-4, 1-12, 2015.
- [149] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and microbial technology*, 23(3) 227-242, 1998.
- [150] Surry, K.J.M., Austin, H.J.B., Fenster, A., Peters, T.M., Poly(vinyl alcohol) cryogel phantoms for use in ultrasound and MR imaging, *Physics in Medicine and Biology*, 49(24) 5529, 2004.
- [151] Plieva, F.M., Kochetkov, K.A., Singh, I., Parmar, V.S., Belokon, Y.N., Lozinsky, V.I., Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous poly(vinyl alcohol)-cryogel carrier for the biocatalysis in water-poor media. *Biotechnology Letters*, 22(7) 551-554, 2000.
- [152] Hedström, M., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3) 907-912, 2008.
- [153] Çetin, K., Denizli, A., 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 401-406, 2015.

- [154] Çetin, K., Perçin, I., Denizli, F., Denizli, A., Tentacle-type immobilized metal affinity cryogel for invertase purification from *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7) 1431-1439, 2016.
- [155] Ceylen, D., Okay O., Macroporous polyisobutylene gels: A novel tough organogel with superfast responsivity. *Macromolecules*, 40(24) 8742–8749, 2007.
- [156] Tuncaboylu, D.C., Okay, O., Hierarchically macroporous cryogels of polyisobutylene and silica nanoparticles. *Langmuir*, 26(10) 7574-7581, 2010.
- [157] Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V., Study of cryostructurization of polymer systems. *Colloid and Polymer Science*, 262(10) 769-774, 1984.
- [158] Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenståhl, B., Mattiasson, B., Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. *Journal of Materials Chemistry*, 16(41) 4065-4073, 2006.
- [159] Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Ivanova, S.A., Titova, E.F., Shtil'man, M.I., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V., Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. *Acta Polymerica*, 37(3) 142-146, 1986.
- [160] Ivanov, R.V., Lozinsky, V.I., Noh, S.K., Han, S.S., Lyoo, W.S., Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high molecular weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(3) 1470-1475, 2007.
- [161] Dainiak, M.B., Allan, I.U., Savina, I.N., Cornelio, L., James, E.S., James, S.L., Galaev, I.Y., Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials*, 31(1) 67-76, 2010.
- [162] Sharma, A., Bhat, S., Vishnoi, T., Nayak, V., Kumar, A. Three-dimensional supermacroporous carrageenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications. *BioMed Research International*, ID 478279, 1-15, 2013.
- [163] Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography B*, 807, 129-137, 2004.

- [164] Bencherif, S.A., Sands, R.W., Bhatta, D., Arany, P., Verbeke, C.S., Edwards, D.A., Mooney, D.J. Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48) 19590-19595, 2012.
- [165] Jain, E., Karande, A.A., Kumar, A., Supermacroporous polymer based cryogel bioreactor for monoclonal antibody production in continuous culture using hybridoma cells. *Biotechnology progress*, 27(1) 170-180, 2011.
- [166] Razavi, M., Qiao, Y., Thakor, A.S. Three dimensional cryogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(12) 2736-2755, 2019.
- [167] Tosh, S.M., Marangoni, A.G., Hallett, F.R., Britt, I.J. Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids*, 17, 503–513, 2003.
- [168] Nichol, J.W., Koshy, S.T., Bae, H., Hwang, C.M., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 31, 5536-5544, 2010.
- [169] Chen, Y.C., Lin, R.Z., Qi, H., Yang, Y., Bae, H., Melero-Martin, J.M., Khademhosseini, A., Functional human vascular network generated in photocross-linkable gelatin methacrylate hydrogels. *Advanced Functional Materials*, 22, 2027–2039, 2012.
- [170] Koshy, S.T., Ferrante, T.C., Lewin, S.A., Mooney, D.J. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels. *Biomaterials*, 35, 2477–2487, 2014.
- [171] Sionkowska, A., Kozłowska, J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 483-487, 2010.
- [172] Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 1-22, 2001.
- [173] Rodrigues, S.C., Salgado, C.L., Sahu, A., Garcia, M.P., Fernandes, M.H., Monteiro, F.J., Preparation and characterization of collagen nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(A) 1080-1094, 2013.

- [174] Razavi, M., Hu, S., Thakor, A.S., A collagen based cryogel bioscaffold coated with nanostructured polydopamine as a platform for mesenchymal stem cell therapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106, 2213-2228, 2018.
- [175] Di Martino, A., Sittinger, M., Risbud, M. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-5990, 2005.
- [176] Ueno, H., Mori, T., Fujinaga, T., Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 105–115, 2001.
- [177] Damshkaln, L.G., Simenel, I.A., Lozinsky, V.I., Study of cryostructuration of polymer systems. XV. Freeze-thaw-induced formation of cryoprecipitate matter from low-concentrated aqueous solutions of poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science*, 74, 1978-1986, 1999.
- [178] Dainiak, M.B., Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography. A*, 1045, 93-98, 2004).
- [179] Singh, D., Tripathi, A., Nayak, V., Kumar, A., Proliferation of chondrocytes on a 3-D Modelled macroporous poly(Hydroxyethyl methacrylate)-gelatin Cryogel. *Journal of Biomaterials Science*, 22, 1733-1751, 2011.
- [180] Toprak, A., Gorgun, C., Kuru, C.İ., Turkcan, C., Uygun, M., Akgöl, S., Borronate affinity based nanoparticles for RNA isolation, *Materials Science and Engineering C*, 50, 251-256, 2015.
- [181] Sousa, A., Almeida, A.M., Cernigoj, U., Sousa, F., Queiroz, J.A. Histamine monolith versatility to purify supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid from *Escherichia coli* lysate *Journal of Chromatography A*, 1355, 125-133, 2014.
- [182] Shakya, A.K., Srivastava, A., Kumar, A., Polymeric cryogel-based boronate affinity chromatography for separation of ribonucleic acid from bacterial extracts, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 63,10.16.1-10, 2015.
- [183] Farrag, M., Abri, S., Leipzig, N.D., pH-dependent RNA isolation from cells encapsulated in chitosan-based biomaterials, *International journal of biological macromolecules*, 146, 422-430, 2020.

- [184] Srivastava, A., Shakya, A.K., Kumar, A., Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(6-7) 373-381, 2012.
- [185] Mourão, C.A., Marcuz, C., Haupt, K., Bueno, S.M.A., Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolithic cryogels: Purification of IgG from human serum. *Journal of Chromatography B*, 1129, 121783, 2019).
- [186] Santos, T., Brito, A., Boto, R., Sousa, P., Almeida, P., Cruz, C., Tomaz, C., Influenza DNA vaccine purification using pHEMA cryogel support. *Separation and Purification Technology*, 206, 192-198, 2018.
- [187] Armutcu, C., Poliurasil membranlar ile hızlı ve spesifik RNA Saflaştırılması, Adıyaman University Journal of Science, 10(2) 466-482, 2020.
- [188] Köse, K., Uzun, L., PolyGuanine methacrylate cryogels for ribonucleic acid purification. *Journal of Separation Science*, 39(10) 1998-2005, 2016.
- [189] Perçin, I., İdil, N., Denizli, A., RNA purification from *Escherichia coli* cells using boronated nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 146-153, 2018.
- [190] Erol, K. DNA adsorption via Co(II) immobilized cryogels. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 53(10) 629-635, 2016.
- [191] Zheng, H., Hajizadeh, S., Gong, H., Lin, H., Ye, L. Preparation of boronic acid-functionalized cryogels using modular and clickable building blocks for bacterial separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(1) 135-145, 2020.
- [192] Lui, X.C., Boronic acids as ligands for affinity chromatography, *Chinese J. Chromatography*, 24(1) 73-80, 2006.
- [193] Maestas, R.R., Prieto, J.R., Kuehn, G.D., Hageman, J.H., Polyacrylamide-boronate beads saturated with biomolecules: a new general support for affinity chromatography of enzymes, *Journal of Chromatography A*, 189(2) 225-231, 1980.
- [194] Çoban, S.A., Protein A baskılanmış süpermakrogözenekli poli(hidroksietilmetakrilat) kriyojeller. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.

- [195] Kerrigan, L.A., Tunel-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 115(8) 1031-1035, 1997.
- [196] Dönmez, G. Çetinkaya, A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, 34(9) 885-892, 1999.