

**TİYOL-METAKRİLAT POLİMERİZASYONU İLE
AFFİNİTE MONOLİTLERİNİN SENTEZİ VE HİSTİDİN
İŞARETLİ PROTEİN İZOLASYONUNDA KULLANIMI**

**THE SYNTHESIS OF AFFINITY MONOLITSHS BY
THIOL-METHACRYLATE POLYMERIZATION AND
THEIR USAGE IN HISTIDINE TAGGED PROTEIN
SEPARATION**

FATMA ÇAMBAY

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

FATMA ÇAMBAY'ın hazırladığı "Tiyol-Metakrilat Polimerizasyonu ile Affinite Monolitlerinin Sentezi ve Histidin İşaretli Protein İzolasyonunda Kullanımı" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülay DURUSOY

Başkan



Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Danışman




Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN

Üye



Doç. Dr. Selis ÖNEL

Üye



Doç. Dr. Hakan KAYI

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım aileme,

ETİK

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

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

beyan ederim.

19/06/2019

FATMA ÇAMBAY



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

19/06/2019

FATMA ÇAMBAY

ÖZET

TİYOL-METAKRİLAT POLİMERİZASYONU İLE AFFİNİTE MONOLİTLERİNİN SENTEZİ VE HİSTİDİN İŞARETLİ PROTEİN İZOLASYONUNDA KULLANIMI

Fatma ÇAMBAY

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Eş Danışman: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Haziran 2019, 62 sayfa

Proteinlerin saflaştırılması için günümüzde birçok yöntem kullanılmaktadır. Saflaştırma işleminin mümkün olduğu kadar az kademedede, yüksek verimlilikle ve kısa sürede gerçekleştirilmesi önemlidir. Bu yüzden izolasyon işlemi ile saflaştırılacak olan proteinin özellikleri (amino asit kalıntısı - histidin, triptofan veya sistein gibi) göz önünde bulundurularak en verimli ve etkili ayırma yöntemini seçmek gerekmektedir.

Tez kapsamında immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) kullanılarak, histidin-işaretleli proteinlerin seçici ve güvenilir bir şekilde ayrılması için histidin ve geçiş metali iyonları arasındaki metal koordinasyon etkileşimi kullanılmıştır. Histidin grupları iki değerlikli metal iyonu olan Ni^{2+} ile koordinasyon kompleksi oluşturmaktadır. İç çapı 300 μm olan kapiler kolonda hidrofilik ligand olarak MSA, ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak POSS-MA ve termal başlatıcı olarak AIBN kullanılarak tek basamakta tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile monolitik dolgu materyali sentezlenmiştir. $NiCl_2$ çözeltisi kolon içerisinden geçirilerek Ni^{2+} iyonlarının monolit yüzeyine immobilize olması sağlanmıştır. Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolon

(IMAC sorbenti) histidin işaretli protein olan yeşil floresan proteinin (green fluorescent protein, GFP), *E. coli* bakterisi lizatından seçici bir şekilde ayrımı için kullanılmıştır.

SEM görüntüleri, monolit yüzeyinin kolon iç çeperine başarılı bir şekilde tutunduğunu ve gözenekli yapıda olduğunu göstermiştir. Mikro ve makro gözenek yapıcı ajanların (n-bütanol ve etilen glikol) kullanılması nedeniyle monolit dolgu materyali önemli bir yüzey alanına sahiptir. BET analizi sonucuna göre MSA-(POSS-MA) monolitinin yüzey alanı $143 \text{ m}^2/\text{g}$, Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) monolitinin yüzey alanı ise $116 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Sentezlenen Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonda $4 \text{ } \mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında, $3.5 \text{ mg}/\text{mL}$ başlangıç protein konsantrasyonunda farklı desorpsiyon koşullarında çalışılarak imidazol konsantrasyondaki değişimin protein izolasyonu üzerinde etkisi incelenmiştir. SDS-PAGE analiz sonuçlarına, göre uygun çalışma koşullarında monolitik kolona $25.55 \text{ } \mu\text{g}$ GFP adsorplanmış ve $18.74 \text{ } \mu\text{g}$ GFP desorplanmıştır. Monolitik sistemde aynı protein konsantrasyonuna ($2.1 \text{ mg}/\text{mL}$) sahip lizat ile akış hızı taraması yapılarak akış hızının protein izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Akış hızı $2 \text{ } \mu\text{L}/\text{dk}$ iken adsorpsiyon verimi %61.9, desorpsiyon verimi %100 olarak tayin edilmiştir. Başlangıç protein konsantrasyonu değişiminin protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek için sentezlenen standart monolitik kapiler kolonlarda $0.4 \text{ } \mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında, farklı protein konsantrasyonu içeren lizatlar ile çalışılmıştır. Başlangıç protein konsantrasyonu $1.2 \text{ mg}/\text{mL}$ iken adsorpsiyon verimi %87.6, desorpsiyon verimi %100, izolasyon verimi ise %89.3'tür. Başlangıç protein konsantrasyonu $2.1 \text{ mg}/\text{mL}$ iken adsorpsiyon verimi %77.6, desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3 olarak tayin edilmiştir. Ni^{2+} iyonunun protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek için Ni^{2+} içermeyen ve Ni^{2+} ve MSA içermeyen kolonlar sentezlenmiştir. Adsorpsiyon verimleri Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolon için %9, Ni^{2+} içermeyen kolon için % 45.8 ve Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolon için ise %77.6 olarak bulunmuştur. Ni^{2+} iyonu içermeyen kolonun desorpsiyon verimi %19.8, izolasyon verimi ise %9'dur. Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonun da desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3 olarak tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmobilize metal afinite kromatografisi, His-işaretli protein, GFP, protein izolasyonu, IMAC sorbentleri.

ABSTRACT

THE SYNTHESIS OF AFFINITY MONOLITSHS BY THIOL-METHACRYLATE POLYMERIZATION AND THEIR USAGE IN HISTIDINE TAGGED PROTEIN SEPARATION

Fatma ÇAMBAY

Graduate Degree, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

June 2019, 62 pages

There are many methods currently available for the purification of proteins. It is important that the purification process is carried out in as little steps as possible, with high purity and in a short time. Therefore, it is necessary to choose the most efficient and effective separation method by taking into consideration the properties of the protein to be purified by isolations (such as amino acid residue - histidine, tryptophan or cysteine).

Within the scope of this thesis, metal coordination interaction between histidine and transition metal ions is used to selectively and reliably separate histidine-labeled proteins using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Histidine groups form coordination complex with divalent metal ion Ni^{2+} . Column packing material was synthesized in a capillary column with internal diameter of 300 μm with thiol-methacrylate polymerization using MSA as hydrophilic ligand, POSS-MA as main monomer and crosslinker and AIBN as thermal initiator. $NiCl_2$ solution was passed through the column

so that Ni^{2+} ions were immobilized on the monolith surface. Ni^{2+} ion-immobilized MSA-(POSS-MA) capillary monolithic column (IMAC sorbent) was used for the selective separation of green fluorescent protein (GFP), a histidine-labeled protein, from *E. coli* bacteria lysate.

SEM images showed that the monolithic surface was porous and it successfully adhered to the inner wall of the column. Due to the use of micro and macro porosity agent (n-butanol and ethylene glycol), the monolith packing material has a very large surface area. According to the results of BET analysis, the surface area of MSA-(POSS-MA) monolith was $143 \text{ m}^2/\text{g}$ and the surface area of Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) monolith was $116 \text{ m}^2/\text{g}$. Effect of change in imidazole concentration on protein isolation was investigated in the synthesized Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) capillary column at $4 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate and $3.52 \text{ mg}/\text{mL}$ initial protein concentration at different desorption conditions. According to SDS-PAGE analysis, $25.55 \text{ }\mu\text{g}$ GFP was adsorbed and $18.74 \text{ }\mu\text{g}$ GFP was desorbed under suitable experiment conditions.

Adsorption efficiency was determined as 61.9% and desorption efficiency as 100%, while the flow rate was $2 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$. In order to determine the effect of the initial protein concentration change on protein isolation, lysates containing different protein concentrations were studied in synthesized standard monolithic capillary columns at $0.4 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. When the initial protein concentration was $1.2 \text{ mg}/\text{mL}$; adsorption efficiency was found 87.6%, desorption efficiency was found 100% and isolation efficiency was found 89.3%. When the initial protein concentration was $2.1 \text{ mg}/\text{mL}$; adsorption efficiency was found 77.6%, desorption efficiency was found 73.9% and isolation efficiency was found 57.3%. In order to determine the effect of Ni^{2+} ion on protein isolation, both nickel-free and nickel-MSA-free columns were synthesized. Adsorption efficiency was found 9% for nickel-MSA-free column, 45.8% for nickel-free column and 77.6% for Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) column. For nickel-free column, desorption efficiency was found 19.8% and the isolation efficiency was found 9%. For standard Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) column, desorption efficiency was found 73.9% and the isolation efficiency was found 57.3%.

Keywords: Immobilized metal affinity chromatography (IMAC), His-tagged protein, GFP, Protein isolation, IMAC sorbent.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimde ve yüksek lisans tez çalışmam süresince bana bilgisi ve tecrübeleriyle yol gösteren, her alanda öğrencilerinin başarısı için elinden geleni yapan, transport dersini kitaba bakmadan anlatan saygıdeğer hocam **Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**'e, ve lisans eğitimim süresince verdiği derslerde dersleri interaktif işlemeyle beni etkileyen, yüksek lisans tez çalışmamda bana laboratuvarının kapılarını açarak tez çalışmamda beni destekleyen eş danışmanım **Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR**'a,

Yüksek lisans çalışmamda sürekli ama gerçek anlamda sürekli yanımda olan, benim yetişemediğim zamanlarda kendisi özel zamanından ayırıp veren, yaptığımız tüm çalışmalara birlikte kafa yordüğümüz değerli hocam **Arş. Gör. Dr. Çiğdem KİP**'e ve tez çalışmamın sonuçlarını onun bilgisi ve becerisi ile tamamladığım, enerjisiyle bıkmadan jel döken değerli hocam **Arş. Gör. İlkay KOÇER**'e, kısa bir süre kendisiyle çalışma imkânı bulsam da her anını keyifle geçirdiğim değerli hocam **Arş. Gör. Dr. Özlem HAMALOĞLU**'na,

4 yıl süresince çalıştığım Araştırma Laboratuvarı 12'de ekip kavramını ilk onlarla öğrendiğim ve birbirimizden yardımlarımızı esirgemediğimiz çalışma arkadaşlarım **Ebru SAĞ**'a, **M. Cihan DEMİR**'e, **Gjulten NEDJIP**'e, **Merve DURMAZ**'a ve geriye kalan tüm SAT-LAB ekibine,

Benim kadar enerjik bir insanın daha olduğunu ispatlayan, her zaman yanımda olup beni destekleyen, bir gün ülkeyi sel bassa en çok onun sevineceğini bildiğim en cici arkadaşım **Neslişah CİHAN**'a ve benim en sarışın arkadaşım olan, 'kızım tezi bitirirsin bir otursan başına' diyerek beni sürekli yazmaya teşvik eden, yüksek lisansın bana kazandırdığı en değerli civcivi olan dönem arkadaşım **Bensu ALAN**'a,

Tarzını sevmediğim çocuk olarak lisans eğitimimin ilk hatırasını oluşturan ve ondan sonraki tüm üniversite yaşamım boyunca tüm zorluklarda ve başarılarımda yanımda olan, kariyerimle ilgili kararlar almam gerektiğinde beni sürekli destekleyen ve düşünceleriyle yanımda olan, hayatımın sonuna kadar tüm anılarımda da var olacağını bildiğim ve kendimize ait bir dilin olduğuna inandığım en güzel şansım olan **Anıl KUBAN**'a,

Sırf Ankara'da üniversite okuduları için benim de onların yanına gitmem gerek diye düşündüğüm, her zaman hayatımda en büyük destekçilerimin onlar olduğunu bilerek büyüdüğüm ve buna inandığım, dünyaya iyi ki en küçük kardeş olarak gelmişim dedirttikleri için, dünyanın en mükemmel iki abisi **Volkan ÇAMBAY**'a ve **Esat ÇAMBAY**'a, hayatımın her anında, kararında onları da düşündüğüm, bana bu güzel yaşantıyı sağlayan ve beni sevgiyle büyüten annem **Songül ÇAMBAY**'a ve babam **Vahit ÇAMBAY**'a,

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Monolitler	3
2.1.1. Sentez Yöntemleri	4
2.1.1.1. Termal Olarak Başlatılan Polimerizasyon	6
2.1.1.2. UV Işık ile Başlatılan Polimerizasyon	7
2.1.1.3. Radyasyon ile Başlatılan Polimerizasyon	8
2.1.2. Monolit Türleri	8
2.1.2.1. Silika Bazlı Monolitler	9
2.1.2.2. Polimer Bazlı Monolitler	10
2.1.3. Monolitlerin Kullanım Alanları	14
2.1.3.1. Ters Faz Kromatografisi	14
2.2. Polihedral Oligomerik Siloksan (POSS)	16
2.2.1. Yapısı ve Özellikleri.....	16
2.2.2. Kullanım Alanları.....	17
2.2.3. POSS Kullanımıyla Sentezlenen Monolitler ve Kromatografik Kullanımı ..	19
2.3. Immobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC).....	20
2.3.1. Genel Prensipler	20
2.3.2. IMAC Sorbentleri.....	22
2.3.3. IMAC Metal İyonları	23

2.3.4.	IMAC Yöntemi ile Histidin İşaretli Proteinlerin İzolasyonu	23
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	25
3.1.	Materyal	26
3.2.	Kapiler Kolonda Silanlama İşlemi.....	26
3.3.	Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Kapiler Monolit Kolonun Sentezi	28
3.3.1.	Hidrofilik Ligand (MSA) Bağlı POSS-MA Bazlı Kapiler Monolit Kolonun Sentezlenmesi	28
3.3.2.	Ni ²⁺ 'nin MSA-POSS Yapısına Bağlanması	30
3.4.	Ni ²⁺ İmmobilize Edilmiş MSA&POSS-MA Kapiler Monolit Kolonun Karakterizasyonu	31
3.4.1.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	31
3.4.2.	Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Yüzey Alanı Ölçümü	31
3.4.3.	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ile Monolit Analizi.....	32
3.5.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	32
3.6.	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Histidin İşaretli Protein İzolasyonu	34
3.6.1.	Ni ²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Fonksiyonu	34
3.6.2.	Akış Hızı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi.....	35
3.6.3.	Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi	35
3.6.4.	İmidazol Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi	36
3.6.5.	Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Analitik Tekrarlanabilirlik Çalışması	36
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	38
4.1.	Termal Polimerizasyon ile Kapiler Monolit Sentezi ve Karakterizasyonu	39
4.1.1.	Tiyol-metakrilat Yöntemi ile Sentezlenen MSA Bağlı poli(POSS-MA) Monolitlerin SEM, BET, Geri-Basınç ve EDX Sonuçları	39

4.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Histidin İşaretli Protein İzolasyonu Sonuçları.....	43
4.2.1. İmidazol Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi.....	43
4.2.2. Akış Hızı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi	45
4.2.3. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi 48	
4.2.4. Ni ²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Fonksiyonu	51
4.2.5. Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Monolitik Kolonda Tekrarlanabilirlik Çalışması	54
5. YORUM	55
6. KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	63
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Monolitik kapiler kolonların hazırlanış şeması.....	6
Şekil 2.2. Sol-jel yöntemi ile karışık monomer kullanılarak monolit hazırlanışı [33].....	9
Şekil 2.3. Farklı karbon zincir uzunluklarına sahip ters fazlı kromatografik malzemelerin karşılaştırılması Üç kolonda silika yüzeyine bağlanmış bir 18 (oktadesil), 8 (oktil) veya 1 (metil) karbon zincirine sahip olması haricinde aynıdır. Pik tanımlama: (1) urasil; (2) fenol; (3) asetofenon; (4) nitrobenzen; (5) metil benzoat; (6) toluen. Deney şartları - Kolonlar: IBM sütunları 4.5x250 mm. Mobil faz: 50/50 metanol/su (V/V) isokratik elüsyon, Akış hızı: 1.0 ml/dk. Dalgaboyu: 254 nm [51].	15
Şekil 2.4. POSS'un üç boyutlu organik-inorganik hibrit yapısı [56].....	17
Şekil 2.5. IMAC uygulamalarında yer alan protein adsorpsiyon ve desorpsiyonunu içeren mekanizmaların diyagramı [77].....	21
Şekil 3.1. Kapiler kolon iç çeperindeki hidroksil grupları (-OH) ile TMSPM'nin metoksisilil grupları (Si-OCH ₃) arasındaki bağlanma.....	27
Şekil 3.2. (A) Silanlama işlemi için kurulan düzenek (B) MSA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler monolitlerin hazırlanması.....	29
Şekil 3.3. (A) Ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan POSS-MA'nın moleküler yapısı (B) kromatografik hidrofilik ligand olarak MSA'nın yapısı (C) MSA bağlı organosilikon ağı [84].....	30
Şekil 3.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sistemi [85]	33
Şekil 4.1. Tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezlenen (A) MSA-(POSS-MA) monoliti ve (B) Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) monolitinin SEM fotoğrafları	40
Şekil 4.2. MSA-(POSS-MA) ve Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) monolitlerinin BET analizleri sonucu elde edilen gözenek boy dağılım grafiği (MSA: 40 mg, n-ButOH: 889 µL, EG:361 µL).....	41
Şekil 4.3. Farklı miktarlarda hidrofilik ligand ve farklı oranlarda mikro/makro gözenek yapıcı ajan içeren termal polimerizasyon ile sentezlenen MSA bağlı poli(POSS-MSA) kapiler monolit kolonlarının geri basınç değerleri (polimerizasyon sıcaklığı: 60°C, polimerizasyon süresi: 24 saat)	42

Şekil 4.4. Farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak <i>E. coli</i> lizatından saflaştırılmış His-işaretili proteinin SDS-PAGE analizi: (A) 10 mM + 100 mM imidazol, (B) 25 mM + 100 mM imidazol, (C) 50 mM + 100 mM imidazol, (D) 10 mM + 25 mM + 100 mM imidazol, (E) 10 mM + 50 mM + 100 mM imidazol.	44
Şekil 4.5. Sentezlenen standart Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, Adsorpsiyon süresi sırasıyla: 54 dk, 27dk, 18dk).	45
Şekil 4.6. Sentezlenen standart Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda desorpsiyon ve izolasyon kapasitesine akış hızının etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) akış hızı: 2 µL/dk (B) akış hızı: 4 µL/dk (C) akış hızı: 6 µL/dk SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği.....	47
Şekil 4.7. Sentezlenen standart Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda başlangıç protein konsantrasyonunun protein adsorpsiyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl). (Akış hızı: 4 µL/dk, Adsorpsiyon süresi: 30 dk)	48
Şekil 4.8. Sentezlenen standart Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda başlangıç protein konsantrasyonunun protein desorpsiyonuna ve izolasyonuna etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) protein konsantrasyonu: 1.2 mg/mL (B) protein konsantrasyonu: 2.1 mg/mL (C) protein konsantrasyonu: 3.5 mg/mL SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği.....	50
Şekil 4.9. Ni ²⁺ iyonu ve MSA'nın adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl). (Akış hızı: 4 µL/dk, Adsorpsiyon süresi: 30 dk) 51	
Şekil 4.10. Ni ²⁺ iyonu ve MSA'nın desorpsiyon ve izolasyon kapasitesi üzerindeki etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) Nikel ve MSA içermeyen kolon (B) Nikel içermeyen kolon (C) Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) standart kolon SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği	53

Şekil 4.11. İlk kullanımda elde edilen denge adsorpsiyonuna (g sorbent başına mg GFP) göre verilen Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kolonu için denge GFP adsorpsiyonunun değişimi (Desorpsiyon ortamı: 500 mM imidazol içeren 50 mM PB pH 7 ve 50 mM EDTA çözeltisi pH 4.53) **(A)** Adsorplanan GFP miktarı döngü grafiği **(B)** Adsorplanan verimindeki değişim yüzdesi. 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda ligand ve farklı oranlarda mikro/makro gözenek yapıcı ajanlar kullanılarak termal polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen kapiler monolitlerin sentez koşulları (polimerizasyon sıcaklığı: 60 °C, polimerizasyon süresi: 24 saat)	29
Çizelge 3.2. Standart kapiler monolit kolonda imidazol konsantrasyonunun protein izolasyonuna etkisini gözlemek amacıyla oluşturulan deney parametreleri	36
Çizelge 4.1. MSA bağlı POSS-MA monoliti ile Ni ²⁺ iyonları immobilize edilmiş MSA bağlı POSS-MA monolitin BET sonuçları.....	41
Çizelge 4.2. MSA bağlı POSS-MA monoliti ile Ni ²⁺ iyonları immobilize edilmiş MSA bağlı POSS-MA monolitin EDX sonuçları	43
Çizelge 4.3. Sentezlenen standart Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak <i>E. coli</i> lizatından saflaştırılmış His-işaretli proteininin SDS-PAGE analizi.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
m^2	Metrekare
mg	Miligram
μg	Mikrogram
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
K	Kelvin
kDa	Kilodalton

Kısaltmalar

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
BET	Brunauer-Emmett-Teller
RPC	Ters Faz Kromatografisi
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
IMAC	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
HSAB	Sert-Yumuşak Asit Baz
MSA	Merkaptosüksinik asit
GFP	Green Fluorescent Protein
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
LC	Sıvı Kromatografisi

GC	Gaz Kromatografisi
FRP	Serbest Radikal Polimerizasyonu
AIBN	2,2-azo-bis-izobütironitril
PEG	Polietilenglikol
TMOS	Tetrametoksisilan
TEOS	Tetraetoksisilan
MTSM	metiltrimetoksisilan
TMSPM	3-trimetoksisililpropil metakrilat
POSS	Polihebral Oligomerik Siloksan
POSS-MA	POSS-metakrilat
CEC	Kapiler Elektrokromatografi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
NaCl	Sodyum klorür
HEPES	(4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit)
MES	2- (N-morfolino) etansülfonik asit
IDA	İminodiasetik asit
MetOH	Metanol
HCl	Hidroklorik asit
EtOH	Etanol
NiCl ₂	Nikel (II) klorür
PB	Fosfat Tampon
ACN	Asetonitril
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat

1. GİRİŞ

Kompleks biyolojik karışımlardan özgül bir biyomolekülün saflaştırılması her zaman tek bir kromatografik yöntem kullanılarak istenilen saflıkta başarılamamaktadır. İstenilen saflıktaki proteinlerin elde edilmesi için genellikle kromatografik yöntemler birbiri ardına kullanılır. Kullanılan kromatografik sistemler biyomoleküllerin farklı özelliklerinden yararlanılarak seçilmelidir. Örneğin, biyomoleküllerin saflaştırılmasında molekül büyüklüğünden yararlanılacaksa jel filtrasyon yöntemi, hidrofobisitelerinden yararlanılacaksa ters faz kromatografisi veya hidrofobik etkileşim kromatografisi, moleküllerin net elektriksel yüklerinden yararlanılacaksa iyon değişim kromatografisi veya biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinden yararlanılacaksa afinite kromatografisi kullanılabilir [1].

Kromatografik tekniklerinin çoğunun temeli ayrıştırılacak olan moleküllerin fiziksel özelliklerine dayanmaktadır ancak afinite kromatografisinde, saflaştırılacak olan biyomoleküllerin kendilerine özgü kimyasal yapılarından veya biyolojik fonksiyonlarından yararlanılmaktadır. Bu farklılığından dolayı kompleks biyolojik karışımlardan tek bir kromatografik yöntem kullanılarak yüksek saflıkta biyomoleküllerin elde edilmesi için afinite kromatografisi eşsiz bir konuma sahiptir. İmmobilize metal afinite kromatografisi (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC), rekombinant proteinlerin saflaştırılması için en popüler yöntemlerden biridir [2]. IMAC proteinlerin, katı bir sorbent üzerine immobilize edilmiş metal iyonlarına gösterdikleri afinite farklılıkları prensibine dayanır. Proteinlerin gösterdikleri bu afinite farklılığı, metal iyonları ve protein moleküllerinin yüzeyinde açığa çıkan bazı aminoasit yan zincirleri arasında oluşan koordinasyon bağlarından kaynaklanmaktadır [3, 4]. Proteinler ve metal iyonları arasındaki etkileşim tersinirdir, böylelikle kolayca adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi yapılarak sonuç alınabilir.

Metal iyonları için proteinlerin afinitesindeki farklılıklar, sert ve yumuşak asit-baz çiftleri (HSAB) ile açıklanabilir. Pearson teorisinde iki atom bir bağ oluşturduğunda atomlardan biri Lewis asiti, diğerrinin ise Lewis bazı gibi davrandığını belirtmektedir. Atomlar arasında oluşan bağın gücü, bağ yapısına katılan atomların öz “sertlik” veya “yumuşaklık” derecesine göre etkilenmektedir. HSAB teorisine göre benzer derecedeki atomlar arasındaki bağların (sert bir asit ile birleşen sert bir baz gibi) en güçlü olduğunu belirtir. Bu teoriye göre tek

değerli metal iyonları (Ag^+ , Cu^+ vb.) yumuşak Lewis asitleri olarak kategorize edilirken, K^+ , Fe^{3+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi metal iyonları sert Lewis asitleri olarak sınıflandırılmaktadır. Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} geçiş metal iyonları ise “sınırdaki asitler” olarak tanımlanmaktadır [5]. IMAC yönteminde genellikle Ni^{2+} iyonu kullanılır, çünkü nikelin 6 sayılı koordinasyon bağı, kromatografik ayırmda elektrokimyasal sabitlik, redoks sabitliği ve sınırdaki kutuplanabilirlik sağlamaktadır.

Proteinlerde üç temel ligand türünün olduğu kabul edilmektedir. Bunlar; oksijen (karboksilat), fosfor (fosforlanmış amino asitler) ve alifatik nitrojen (glutamin ve aspargin) içeren ligandlar sert Lewis bazları olarak, sülfür içeren ligandlar (sistein) yumuşak bazlar, aromatik nitrojen (triptofan ve histidin) içeren ligandlar ise sınırdaki bazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} geçiş metal iyonları (sınırdaki asitler) sülfür (yumuşak bazlar) ve aromatik nitrojen atomları (sınırdaki bazlar) içeren ligandlar ile uygun olarak koordine olmaktadır [5].

Yapılan tez çalışmasında; ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak POSS-MA ve hidrofilik ligand olarak MSA kullanılarak tek basamakta tiyol-metakrilat polimerizasyonu yöntemi ile kapiler monolit sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bu kapiler monolit yüzeyine Ni^{2+} iyonu immobilize edilerek histidin işaretli olan GFP'nin protein matriksinden izolasyonu amaçlanmıştır. Geliştirilen bu IMAC sorbenti ile kapiler monolitin adsorpsiyon kapasitesi, desorpsiyon ve izolasyon verimleri ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Monolitler

50 yıldan uzun süredir bilimsel literatürde tek bir malzeme parçasından oluşan ayırma medyası girişimlerine ait çalışmalar ön plandadır. İlk olarak Syngge, Martin ve Tiselius'un Nobel ödüllü çalışmasından sonra 1950'lerin başında teorik olarak ortaya atılan fikir doğrultusunda monolit çalışmaları başlamıştır [6]. Ancak jel benzeri malzemeler uygun akışa ulaşmak için gereken hidrostatik basınca dayanamadığı için kısa bir süre içerisinde literatürden kalkmıştır. Daha sonra sentetik hidrojellerle daha az başarılı deneyler yapılmıştır [7]. Daha sert açık gözenekli poliüretan köpükler, hem LC (liquid chromatography) hem de GC (gas chromatography) ayırmalarında başarılı potansiyel sergilemiştir [8-10]. Ancak bu çalışmalar kromatografik topluluk içinde herhangi etkili bir yankı bulmamıştır. Böylece, “monolitik çağ” 1990'ların eşiğinde başlamıştır.

Hjertén, sulu bir ortamda, amonyum sülfat tuzu varlığında, N,N-metilenbisakrilamid ve akrilik asidin sulu çözeltilerinin polimerizasyonu ile yüksek oranda şişmiş çapraz bağlı bir jel hazırlamıştır. Bir sonraki aşama bu polimerin orijinal hacminin küçük bir kısmı kullanılarak, kolon kesitini tamamen doldurabilmek için kolon içerisine sıkıştırılmasıdır. Şaşırtıcı bir şekilde bu kolon akış için çok iyi bir geçirgenlik sergilemiştir [11]. Hazırladığı bu ayırma ortamını sürekli yatak (continuous bed) olarak adlandırmasına rağmen aslında, test tübünde tek parça olarak sentezlenen bu polimer, kolon içinde sentezlenmediği için monolit olarak adlandırılmamaktadır. Hjertén sentezlediği bu polimeri su ile şişirdikten sonra kolon içine sıkıştırarak doldurmuştur [12]. Bu jel yapı sürekli bir sıvı içinde dağıtılamayacağından partikül bazlı bir yapı sadece sıkıştırma işlemi ile istenen monolit benzeri yapıyı oluşturabilmiştir.

Aynı zaman zarfında, porojenik çözücülerle karıştırılmış glisidil metakrilat ve etilen dimetakrilat bir kalıp içerisinde kopolimerize edilmiş ve gözenekli yapıya sahip yüksek çapraz bağlanmış polimerlerin monolitik blokları elde edilmiştir. Bu monolitik bloklardan kesilen ve dietilamin ile modifiye edilmiş geçirden diskler, proteinlerin çok hızlı ayrılmasına olanak sağlamıştır [13]. Bu teknoloji daha sonra, paslanmaz çelik kolonlarda monolit sentezine uygulanmıştır [14].

Farklı monolitik teknolojilerin gelişmesine yapılan son katkı, 1990'ların ortalarında Tanaka tarafından yapılmıştır [15]. Sıvı kromatografide yaygın olarak kullanılan en popüler inorganik malzeme olan silika bazlı monolitler bu proses ile elde edilmiştir. Tipik analitik büyüklükteki kolonların hazırlanması, silikanın polikondensasyon reaksiyonu, yaşlanma ve ısı işlem sırasında meydana gelen büzülmesinden ötürü zordur. Bu nedenle kromatografik kolon elde etmek için, önceden sentezlenen monolit bir plastik tutucuya yerleştirilmiştir. Fields, potasyum silikatın formamid çözeltisinin hidroliz-kondenzasyonu yoluyla silika bazlı bir kapiler kolon hazırlayan ilk kişi olmuştur [16].

Anlatılan üç yaklaşımın tümü daha sonra endüstri tarafından benimsenmiştir ve monolitik kolonlar artık ticari olarak temin edilebilmektedir. Daha da önemlisi, bu çabalar aynı zamanda dünya çapında çok sayıda gruba yenilikçi araştırmalar için ilham vermiş, böylece kromatografi alanını hızla ileriye taşımıştır. Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon teknolojisi önemli ölçüde gelişmiştir ve HPLC çok çeşitli bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizi için en popüler teknik haline gelmiştir. Monolitik kolonların, HPLC'deki yüksek verimli ayırmalar için parçacık dolgulu kolonlara iyi bir alternatif olduğu kanıtlanmıştır. Parçacık dolgulu kolonlar ile karşılaştırıldığında benzer bir basınç düşüşü ile; küçük boyutlu iskeletleri, geniş gözenekleri ve iyi geçirgenlik özellikleri nedeniyle daha yüksek ayırma verimliliği elde edilebilir [17]. Bu kombinasyon, daha küçük çaplı monolitik kolonların daha yüksek akış hızlarında çalıştırılmasına ve aynı anda hem saflığın hem de verimi artırılmasına izin verir [18]. Bu nedenlerden dolayı monolitler proteinler, peptitler ve nükleik asitler gibi büyük moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için kolon içi durağan fazlar olarak yüksek potansiyel sunmaktadır [19].

2.1.1. Sentez Yöntemleri

Monolitik polimerler, 1990'ların başlarında, biyomoleküllerin hızlı bir şekilde ayrılması için uygulanan yeni bir kolon teknolojisi olarak tanıtılmıştır [14, 20]. Bu malzemelerin ana özelliği, düşük geri basınçlarda yüksek akış hızlarının kullanılmasına izin veren büyük gözeneklerin varlığıdır. Bu desteklerin üretimi nispeten basittir. Monomerleri (fonksiyonel ve çapraz bağlayıcı monomerler), radikal başlatıcıyı ve gözenek yapıcı çözücülerini içeren homojen bir polimerizasyon karışımından hazırlanırlar. Polimerizasyon karışımında monomer olarak, çapraz bağlayıcıların kullanılması, hem mekanik hem de gözenekli

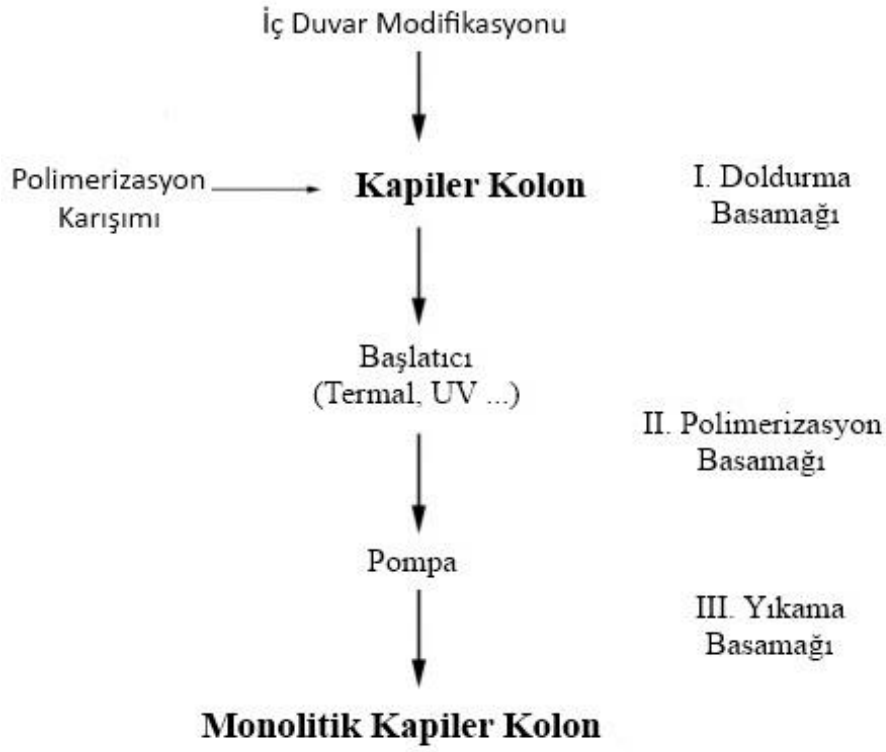
özelliklerin kontrol edilmesini sağlayan iyi bir yöntemdir [21]. Polimerizasyon reaksiyonu, desteğin şeklini belirleyen bir kalıp içinde (*in situ* olarak) gerçekleşir ve monolitik kolonlar, farklı polimerizasyon yöntemleri kullanılarak üretilebilir; termal ve foto başlatmalı radikal polimerizasyonları en yaygın kullanılan yaklaşımlardır.

Serbest radikal polimerizasyonu (FRP – free radical polymerization); çözücü, safsızlıklar ve atmosferik koşullara daha az duyarlı olduğu için en yaygın kullanılan radikal polimerizasyon yöntemidir. Radikal polimerizasyon bir zincir reaksiyonudur ve üç temel adımı içerir: başlatma (initiation), çoğaltma (propagation) ve sonlandırma (termination). Polimerizasyon reaksiyonları, ısı veya ışık etkisiyle meydana gelebilir, ancak reaksiyon için genellikle ortama bir başlatıcı eklenir. Başlatıcı, termal olarak veya ışığa yoluyla ayrışabilen ve bu ayrışma sonucu serbest radikaller üreten (eşlenmemiş elektronları bulunan molekül atomları) zayıf bir organik bileşiktir. Bu serbest radikalın bir çift oluşturmak için ek bir elektron kazanma eğilimi, bir elektronun çalınmasıyla bir başka molekül üzerindeki bağı kırmaya ve bu molekülü eşlenmemiş bir elektronla (başka bir serbest radikal olan) koparacak kadar reaktif hale getirir. Serbest radikaller genellikle bir molekülün (bir başlatıcı olarak bilinir) tek bir bağ boyunca iki parçaya bölünmesiyle oluşur [22].

Bir radikalın stabilitesi, molekülün diğer bileşiklerle reaksiyona girme eğilimini ifade eder. Kararsız bir radikal birçok farklı molekülle kolayca birleşebilir. Ancak kararlı bir radikal, diğer kimyasal maddelerle kolayca etkileşime girmeyecektir. Serbest radikallerin stabilitesi, molekülün özelliklerine bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Aktif merkez, eşleşmemiş elektronun radikal üzerindeki yeridir, reaksiyon burada gerçekleşir. Serbest radikal polimerizasyonunda, radikal bir monomere saldırır ve elektron molekülün başka bir bölümüne göç eder. Bu yeni oluşan radikal başka bir monomere saldırır ve süreç tekrarlanır. Böylece aktif merkez polimerizasyon gerçekleştikçe zincirin aşağısına doğru hareket eder [23].

Polimer yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar kullanılan monomere veya monomerlere bağlı olacaktır. Alternatif olarak, monolit yüzeyi farklı şekilde fonksiyonlandırılabilir. Bu polimerler bir kalıp içinde hazırlandıklarından standart HPLC kolonları, kılcal kolonlar, monolitik diskler, silindirler ve mikroakışkan kanallar gibi farklı formatlarda

sentezlenebilirler [19]. Şekil 2.1’de monolitik kapiler kolonların hazırlanış şeması verilmektedir.



Şekil 2.1. Monolitik kapiler kolonların hazırlanış şeması

2.1.1.1. Termal Olarak Başlatılan Polimerizasyon

Termal olarak başlatılan serbest radikal polimerizasyonu sert, polimer bazlı monolitin hazırlanmasında kullanılan ilk yöntem olmuştur. Bu tip polimerizasyon monomeri içeren fazın yığın polimerizasyonu olarak düşünülebilir. Polimerizasyon sıcaklığı, polimerizasyon kinetiği üzerindeki etkisi sayesinde, tek bir polimerizasyon karışımından farklı gözenek dağılımlarına sahip makrogözenekli polimerlerin hazırlanmasına izin veren etkili bir kontrol aracıdır. 2,2-azobisisobütironitril (AIBN) gibi dinitril ya da azo başlatıcıları, serbest radikallerin oluşumu ile 60-80°C'lik sıcaklıklarda polimerizasyonu sağlar. AIBN'nin yarı ömrü 55°C'de 37 saat, ancak 70°C'de sadece 6 saattir [24]. Svec yaptığı çalışmada 70°C'de hazırlanan monolit için maksimum 1000 nm'ye yakın gözenek boyutu elde ederken 130°C'de aynı karışımdan hazırlanan monolit için 10 ila 1000 nm arasında çok geniş bir gözenek boyutu dağılımına sahip bir yapı elde etmiştir [25]. Gözenek büyüklüğü dağılımındaki değişim, polimerizasyon sıcaklığındaki değişimin yol açtığı çekirdeklenme

(nükleasyon) hızındaki değişim ile açıklanabilir [26]. Sıcaklık, çoğunlukla küçük gözeneklerle ilgili olan spesifik yüzey alanını etkiler. Monomerler gözenek yapıcı çözücülere göre, polimerler için termodinamik olarak daha iyi çözücü maddelerdir. Polimerizasyon sırasında çöken çözünmez jel benzeri çekirdekler, çevredeki sıvıda hala mevcut olan monomer ile şişerler. Nükleasyon adımı takiben, polimerizasyon, hem monomer şişmiş çekirdeklerin ayrılmış fazında hem de kalan sıvı polimerizasyon karışımında devam eder.

Polimerizasyon düşük sıcaklıkta gerçekleşir ise, reaksiyon hızı yavaş olacaktır ve bu sebeple polimerizasyon basamağı nükleasyon adımı sırasında oluşmuş şişmiş çekirdekler üzerinden gerçekleşecektir. Çekirdek içindeki polimerizasyon kinetik olarak tercih edilir, çünkü monomerlerin çekirdek içerisindeki konsantrasyonu, çekirdeği çevreleyen çözücüden daha yüksektir. Bu, polimerizasyon sonucunda oluşan monolit yapısının daha düzenli olmasını sağlar. Sıcaklık arttıkça, orijinal nükleasyondan sonra solüsyonda oluşan polimer moleküllerin sayısı artar. Bunlar büyüyen çekirdekler tarafından yakalanır ve daha az bireyselleştirilmiş yapı ile daha büyük kümeler oluştururlar. Oluşan bu kümelerin yüzey alanı küçüktür [25].

2.1.1.2. UV Işık ile Başlatılan Polimerizasyon

Fotopolimerizasyon 1997 yılında monolit sentezi için ilk kez kullanılmıştır [27]. Termal olarak başlatılan polimerizasyon işlemi için diğer polimerizasyon yöntemlerinde kullanılan benzer bir karışım, kalıp içine doldurulur ve polimerizasyonu başlatmak için UV ışığı kullanılır. Termal olarak başlatılan polimerizasyona kıyasla, fotopolimerizasyon oda sıcaklığında bile çok daha hızlıdır ve saatler yerine dakikalar içinde tamamlanabilir. Oda sıcaklığında çalıştığı için, düşük kaynama noktalı, örneğin; metanol, etanol, kloroform, etil asetat ve heksan içerenler de dahil olmak üzere daha az yaygın olan gözenek yapıcılar polimerizasyonda kullanılabilir. Bu tekniğin tek kısıtlılığı, küçük boyutlu UV geçirgen kalıpların ve UV geçirgen monomerlerin kullanımınıdır.

Birinci kısıtlama; Teflon kaplı kılcallar ve cam çipleri kullanılarak kolayca üstesinden gelinebilir. İkinci kısıtlama için ise; stiren ve divinilbenzen gibi aromatik monomerler yerine,

farklı monomer ve çapraz bağlayıcılar kullanımı ile aşılabılır. Bunlar arasında çeşitli akrilatlar ve glisidil metakrilat, bütül akrilat/ metakrilat gibi monomerler bulunur.

Fotopolimerizasyonu etkileyen ana faktörler ışık yoğunluğu ve başlatıcının doğası ve konsantrasyonudur [28]. Polimerizasyon karışımının önemli bir bileşeni foto başlatıcıdır. AIBN oldukça popüler bir foto başlatıcıdır. Bu başlatıcı, termal olarak başlatılan polimerizasyon için de kullanılabilirdiğinden, bu iki yaklaşımın literatürde karşılaştırmalı çalışmaları gerçekleştirilmiştir [25]. Bernabé-Zafón yaptığı çalışmada iki monolitik kılcal kolon tipinin kromatografik performansında sadece küçük farklılıklar bulmuştur. Bununla birlikte, foto-başlatmalı olarak polimerize edilmiş monolitler, iki kat yüksek geri basınç sergilemiş ve böylece bu basınç farklılığı iki polimerizasyondaki gözenekli yapıdaki farkı göstermiştir [29].

2.1.1.3. Radyasyon ile Başlatılan Polimerizasyon

γ -ışını veya elektron ışını gibi yüksek enerjili radyasyon kullanılarak başlatılan polimerizasyonlar, monolitler için “alışılmışın dışında” yaklaşımlar olup, kullanımı diğer polimerizasyon işlemlerine göre daha az yaygındır. Bu yöntemin başlıca avantajları, bir başlatıcıya ve dolayısıyla zincir uçlarında herhangi bir fonksiyonel grubun bulunmasına gerek olmaması ve polimerizasyon işleminin herhangi bir sıcaklıkta, ve paslanmaz çelik bir kaptaki gerçekleştirilebilmesidir. γ -ışınlarına erişimin sınırlı olması ve bu ışınlar ile çalışırken yüksek derecede güvenlik önlemlerine ihtiyaç duyulması bu yöntemin dezavantajlarıdır. Bu polimerizasyon tekniğinde de reaksiyon mekanizması serbest radikal polimerizasyonudur. Polimerizasyonun ekzotermik bir reaksiyon oluşu ve radyasyonun bir kısmının emilip ısıya dönüşmesi sebebiyle polimerizasyon sırasında sıcaklığın sabit tutulması büyük bir sorun oluşturmaktadır [25].

2.1.2. Monolit Türleri

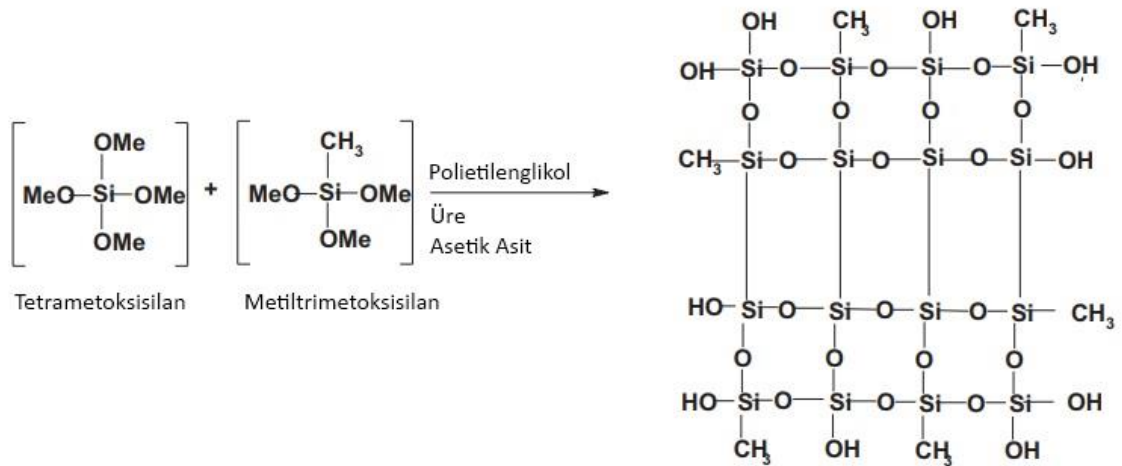
Monolitler iki genel kategoriye ayrılabilir: (i) İlki, genellikle sol-gel teknolojisi kullanılarak hazırlanan silika bazlı monolitik kolonlardır. Bu teknoloji, kapiler kolon içindeki bir sol çözeltisinin jelleşmesi ile oluşturulan kolon boyunca kesintisiz bir sol-jel ağı oluşturmak için uygulanmaktadır. Alternatif olarak, kapiler kolon geleneksel biçimde doldurulduktan sonra,

silika bazlı parçacıklar birbirine bağlanabilir. (ii) İkinci kategori sert organik polimer bazlı monolitik kolonlardır ve bunlar akrilamid bazlı, akrilat veya metakrilat bazlı ve stiren bazlı polimerleri içerir [30].

2.1.2.1. Silika Bazlı Monolitler

Silika monolitler, katalizör ve katkı maddelerinin varlığında, hidroliz ve alkoksisisilanların polikondensasyonunu içeren bir sol-jel prosesi ile hazırlanır. Böylece oluşturulan monolitlin kompozisyonu ve morfolojisi kontrol edilebilir [31]. Silika esaslı monolitlerin hazırlanması için faz ayrımı ile ilk sol-jel reaksiyonu, 1990'ların başlarında Nakanishi ve Soga tarafından rapor edilmiştir [32]. Çalışmada, bir polimer bileşeni olarak poliakrilik asit seçilmiş ve bileşim özelliklerinin jel morfolojisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Temel sol-jel prosesi, siloksan ağının (Si-O-Si) sıralı hidroliz ve bir silan bileşiğinin polikondensasyonu ile hazırlanması işlemidir. Polikondensasyon, polietilenglikol (PEG) gibi bir gözenek yapıcı ajanın varlığında asidik (asetik asit) veya bazik (üre) koşullar altında tetrametoksisilan (TMOS), tetraetoksisilan (TEOS) veya metiltrimetoksisilan (MTSM) gibi bileşiklerin bir karışımını içerir [31]. Şekil 2.2, karışık alkoksisisilanlar (TMOS ve MTSM) kullanılarak bir sol-jel işlemi yoluyla elde edilen bir sol-jel silika ağının kimyasal yapısını göstermektedir.



Şekil 2.2. Sol-jel yöntemi ile karışık monomer kullanılarak monolit hazırlanışı [33]

Polikondensasyon işlemi sırasında reaksiyon ürünü ortamda çözünmez. Porojen ve katkı maddelerinin yer aldığı makro gözeneklere sahip bir monolitik kütle halinde çöker. Faz

ayrılmasından sonra, elde edilen jel mezo gözenekli yapının oluşturulması için amonyakla işlemden geçirilir. Kurutma işleminin ardından öngörülen uygulamalara göre, kimyasal modifikasyon veya yüzey başlatmalı polimerizasyon yoluyla fonksiyonel gruplarla gözenek yüzeyinin türevlendirilmesi işlemi yapılır [34]. Geleneksel silan kimyası kullanılarak siloksan bağ bağlantısının oluşumu yoluyla alkil-, amino-, siyano- veya hidroksil fonksiyonel grupları içeren seçicilerin aşılmasını kolaylıkla yapılabilir [35]. Ters faz kromatografisinde kullanılmak üzere hidrofobik sabit faz elde etmek için literatürde en yaygın olarak kullanılan fonksiyonelleştirmelerden biri oktadesildimetil- (N, N-dietilamino) silanın yüzey aşılmasıdır [36].

2.1.2.2. Polimer Bazlı Monolitler

Polimer bazlı monolitler; monomer, gözenek yapıcı ajanlar ve bir başlatıcı içeren karışımı kullanılarak, kapiler içinde in situ (yerinde) polimerizasyon ile hazırlanır. Kapiler daha sonra termal veya UV ile başlatılan polimerizasyona tabi tutulur. Radikaller, monomerlerin polimerizasyonunu başlatan başlatıcıdan oluşturulur. Büyüyen polimerler monomerlerin dağıldığı çözelti içerisinde çöken çekirdekler oluştururlar. Devam eden polimerizasyon çekirdek boyutunu artırır, bu da birleşmeye ve kümelenmeye sebep olur. Böylelikle homojen bütünleşik bir yapı oluşur. Homojen jellerden oluşan bütünleşik yapı monoliti meydana getirir. Genel olarak polimer bazlı monolitler iç çapı 8 mm olan HPLC kolonları veya 20 ila 500 µm iç çaplı kapiler kolonlarda çoğunlukla proteinlerin ayrılması için kullanılır. Ancak, genomik ve proteomik gibi alanların hızlı bir şekilde gelişmesi ile daha da küçük örneklerle çalışılması gerektiği için, çok daha dar gözenek yapısı ve monolitlerle dolu kapiler kolonlar geliştirilmesi çalışmaları literatürde daha yaygındır. Polimer bazlı monolitik kolonlarda çeşitli monomerler kullanılmaktadır [37].

Polimer ağı genellikle kapiler kolon içerisinde, kademeli bir zincir polimerizasyon reaksiyonu ile oluşturulur. Polimerizasyon reaksiyon karışımları genellikle monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların, başlatıcının ve bir gözenek yapıcının kombinasyonundan oluşur. Monolitin üretilmesi için çeşitli monomerler kullanılabilir; elektro-osmotik akış için hem yüklü hem de hidrofilik veya ters faz etkileşimlerine izin vermek için yüksüz ve hidrofobik monomerler kullanılabilir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, genel gözenekliliği etkileyen çapraz bağlama derecesini değiştirmek üzere mikro veya makrogözenek yapıcı ajanlar

vasıtası ile ayarlanabilir. Kademeli zincir reaksiyonu başlatmak için bir başlatıcıya ihtiyaç vardır ve genellikle UV ışığı veya ısı işlem kullanılarak başlatılabilen AIBN'dir. Polimerin oluşumu, çapraz bağlanma ve çoğunlukla alkollerin bir karışımı olan gözenek yapıcı seçiminin bir sonucu olarak reaksiyon ortamında çözünmez hale gelmesiyle meydana gelir. Kapiler kolonun ön işlemleri genellikle, monolitin yüksek basınçlara dayanması gereken HPLC uygulaması için, monolitin kolon çeperine kovalent bağlanmasına izin veren ve çift-bağ içeren bir fonksiyonel grubun bağlanmasını içerir. Polimerik monolitler ile üretilen kapiler kolonlar son yıllarda kapsamlı bir araştırma alanı olmuştur. Katı faz ekstraksiyonu [38, 39], örnek ön saflaştırılması [39, 40], farmasötik [41], çevre [42] ve biyomoleküllerin ayrılması [43-45] gibi farklı uygulamalarda kullanılmıştır.

2.1.2.2.1. Akrilat, Metakrilat Esaslı Monolitler

Metakrilat bazlı monomerlerden üretilen monolitik kolonlar, aslen 1990'ların başında Svec ve Fréchet tarafından HPLC analizi için sentezlenip kullanılmasına rağmen, metakrilik asidin glisidil esterlerinden elde edilen polimerlerin kromatografik özellikleri, 1978'de Svecet tarafından değerlendirilmiştir [46]. Bu çalışmada, polimerizasyon karışımındaki çapraz bağlayıcı etilendimetakrilat'ın (EDMA) yüzdesinin artırılmasının, ayrıca polimerin spesifik yüzey alanını arttırdığı, dolayısıyla adsorpsiyon özelliklerini geliştirdiği gösterilmiştir. Metakrilat bazlı polimerler, tipik silika bazlı dolgu malzemeleri tarafından tolere edilemeyen aşırı pH koşulları altında (pH 2-12) bile kararlıdır. Reaktif epoksi grubuna sahip oldukları için glisidil metakrilat kullanılırken kolayca fonksiyonelleştirilebilir. Ayrıca bu monomer ile makrogözenekli monolitik kapiler kolonların hazırlanması da oldukça basittir.

Metakrilat esaslı monolitik kolonların ve polimerizasyon karışımının üretimi, ön işleme tabi tutulmamış silika kapiler kolonlarda yapılabileceği gibi ön işleme tabi tutulmuş kapiler kolonlarda da yapılabilir. Polimerizasyon karışımı genellikle, glisidil metakrilat (GMA), 2-hidroksietil metakrilat, çapraz bağlayıcı olarak işlev gören EDMA ve diğer metakrilat esterleri içerebilen bir monomer karışımından oluşur. Gözenekleştirici genellikle sikloheksanol, dodekanol, propanol, metanol veya asetonitril karışımı ile elde edilir. Ayrıca karışımda ısı veya UV ışık ile aktive edilen bir radikal başlatıcı, genellikle AIBN, bulunmalıdır. Glisidil metakrilat genellikle, polimerizasyon karışımında ana monomer

olarak kullanılır, çünkü kolonun kolayca fonksiyonelleştirilmesini sağlayan reaktif bir epoksi grubu içerir. Polimerizasyon karışımı kapiler kolon içerisine basılarak genellikle polimerizasyon termal olarak başlatılır. Reaksiyon daha sonra serbest radikal polimerizasyonu ile ilerleyerek makrogözenekli sert monolitik bir polimer oluşturur. Reaksiyona girmemiş bileşenler daha sonra yıkanır [30].

2.1.2.2.2. Polistiren Bazlı Monolitler

Polistiren bazlı kapiler kolonların kullanıldığı kromatografik ayırmaların çoğu poli(stiren-co-divinil-benzen) monolitleri ile gerçekleştirilmektedir. Makrogözenekli stiren-divinilbenzen kopolimer ağları, polimer destekli katalizörler, iyon değiştirici reçinelerin sentezi için başlangıç maddesi ve büyüklükçe ayırma kromatografisi için sabit faz olarak, bir dizi farklı uygulamada kullanılmaktadır. 1990'ların başında, Svec ve Fréchet gözenekli polimerleri, proteinlerin ters faz kromatografisi ile ayrılması için monolitik ayırma ortamı olarak kullanmıştır [14, 20, 24]. Gözenek yapıcı olarak toluen, monomer olarak stiren ve divinilbenzen ve başlatıcı olarak ise AIBN kullanılmıştır. Polimerizasyon karışımı, kalıp içinde 70°C'de 24 saat ısıtılmıştır. Poli(stiren-co-divinilbenzen) polimerleri, geleneksel sıvı kromatografisinde kullanılan dolgu malzemelerinin dayanamadığı geniş bir pH aralığında (1-14) kararlıdır. Yüksek hidrofobik doğası nedeniyle, bazı durumlarda bu sentetik polimer, daha fazla türevlendirme gerekmeden doğrudan bir ters faz sabit faz olarak kullanılabilir. Küçük molekülleri analiz etmek için, yüzey ayrıca kromatografik etkileşimleri arttırmak için kolayca türevlendirilebilir. Polimer yüzeyine alkil gruplarını eklemenin iki yöntemi vardır. İlk olarak, bir alkilstiren gibi bir monomer polimerizasyon karışımına dahil edilebilir. Bununla birlikte, gözenek yapıcı çözelti içinde çözünür olması ve polimer oluştuğunda çökertilmesi gerekir. İkincisi, polimerin yüzeyi, örneğin güçlü bir Friedel-Crafts katalizörü (organik çözücü içinde alkil halojenür) kullanılarak sentez sonrası alkilenebilir. Polimerizasyon karışımı kapiler kolon içerisine basılarak başlatıcı vasıtası ile polimerizasyon başlatılır ve polimerizasyon sonrasında, monolit reaksiyona girmemiş bileşenlerin uzaklaştırılması için yıkanır.

Monolitler genellikle sabit faza bağlı iyonlaşabilir fonksiyonel gruplarla sentezlenir. Böylece fonksiyonel protein ve peptid gruplarının, monolitik malzemenin yüklü yüzeyi ile

etkileşime girebilmesi ve bu etkileşimlerin, proteinlerin/peptitlerin sabit faza adsorpsiyonu ile sonuçlanması sağlanır [46].

2.1.2.2.3. Poliakrilamid Bazlı Monolitler

Poliakrilamid jeller, elektroforez için bir ayırma ortamı olarak uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır ancak suyun içinden geçmesine izin vermediklerinden, sıvı kromatografi teknikleri için uzun zaman boyunca kullanılamamışlardır. Günümüzde gözenekli poliakrilamid monolitlerin gelişimi, sıvı kromatografisi için kullanılabilmelerini sağlamıştır.

Akrilamid bazlı monolitik kolonlar, ilk olarak Hjertén'in araştırma grubu tarafından 30 yıl öncesinde poliakrilamid jelin doğrudan bir cam tüpte üretilmesi sonucu 1980'lerin sonlarında geliştirildi [47]. Ancak bu kolonların başarı oranı düşüktü, monolit birkaç yerde kırılmış ve monolitin kırılan parçaları arasındaki boşluklar ayırma verimini düşürmüştür. 1996'da Hjertén ve arkadaşları, CEC için monolitik bir kolon üretmişlerdir [47]. Bu akrilamid bazlı monolit, sulu akrilamid çözeltisi, piperazin diakrilamid (PDA) ve vinil sülfonik asit çözeltisi kullanılarak üretilmiştir. Ayrıca sentezde 16 karbonlu bir hidrofobik ligand da kullanılmıştır. Persülfat radikalleri oluşturmak üzere amonyum sülfat -N,N,N,N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) katalizator başlatıcı sistemi ile kullanılmıştır. Kapiler kolon içine doldurulduktan sonra, polimerizasyon gece boyunca oda sıcaklığında yapılmıştır.

Poliakrilamid bazlı monolitik kolonlar, çeşitli yüzey fonksiyonel grupları içerecek şekilde yüksek bir başarı oranıyla kolayca üretilebilirler. İyon değişimi, hidrofobik etkileşim, ters faz, normal faz ve geniş bir pH aralığında kararlı olan kiral kromatografi için uygun fazlar eldesi için kullanılabilirler. Akrilamid esaslı monolitik kapiler kolonlar özellikleri gereği aşırı polar olduklarından, bu kolonları son dönemde normal faz kromatografi uygulamalarında da kullanılmaya başlanmıştır [48].

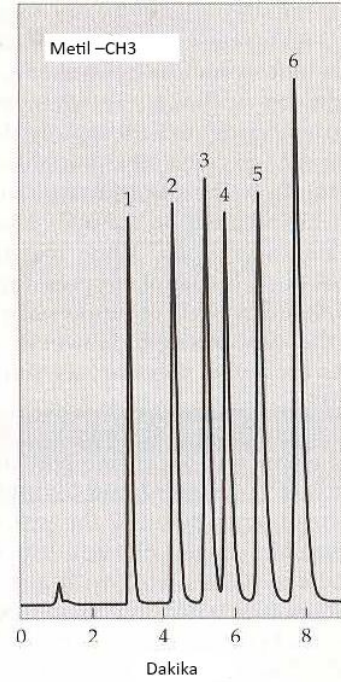
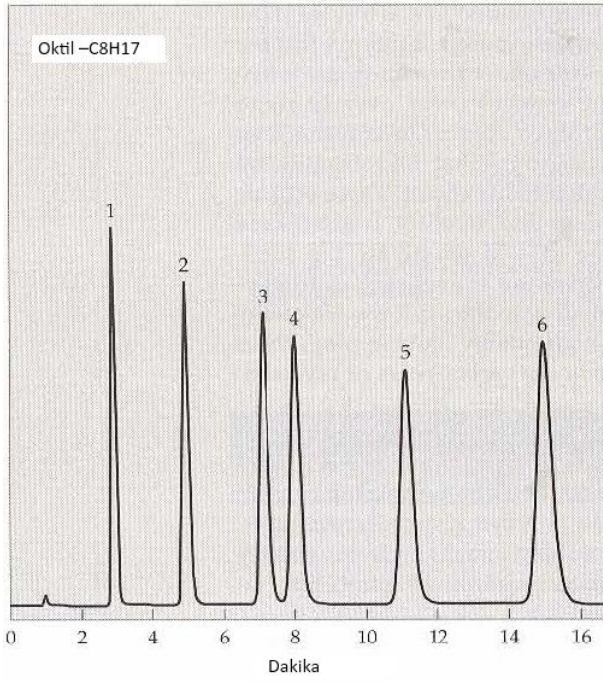
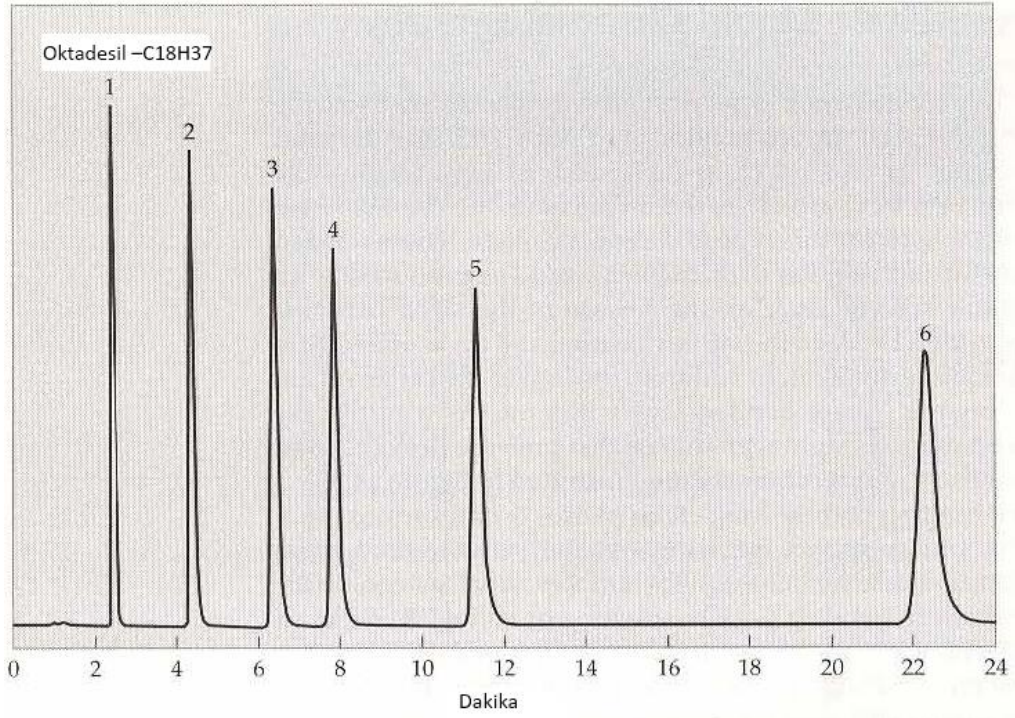
Makrogözenekli poliakrilamid/ PEG matrisleri, alkil gruplu bileşenlerin etkili bir şekilde ayrılması için kullanılmaktadır. Peptitlerin ve karbonhidratların bu matrisler ile ayrılması da mümkündür [49]. Bunun için, hidrofobik ligandlar (C4, C6 veya C12) ve PEG dahil

monomerler (akrilamid, bisakrilamid ve akrilik veya vinilsülfonik asit), kapiler kolon içindeki sulu formamid çözeltisi içinde polimerize edilmektedir. Katyonik C17 monolitleri (stearil-akrilat), proteinler dahil olmak üzere çeşitli yüksüz ve yüklü çözünenlerin ayırımı için uygundur [50].

2.1.3. Monolitlerin Kullanım Alanları

2.1.3.1. Ters Faz Kromatografisi

Ters faz kromatografisinde sabit faz, mobil fazdan daha az polardır. İki temel tipte sabit faz kullanılır, en yaygın olanları silika üzerine bağlanmış polar olmayan gruplardır. Bunlardan en sık kullanılan organik gruplar $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, ve $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ 'dir. Bunlardan 18 karbon zinciri (oktadesil grubu) en yaygın olanıdır. Bu tip sabit faz için ODS ve C18 kısaltmaları kullanılır. Karbon zinciri uzunluğu ne kadar uzun olursa, sabit faz o kadar organik olur. Daha iyi ayırma özelliğine sahip bir ters faz yüzeyi yapmak için, silika yüzeyinde spesifik olmayan etkileşim üretebilecek bölgeler sonlandırılır. Sonlandırma (end-capped), ikinci bir reaksiyon işlemi ile uzun zincirli grupların bağlanmadığı yüzeye kısa bir organik grubun (genellikle $-\text{CH}_3$) bağlı olmasıdır. Şekil 2.3'te farklı organik gruplar içeren kolonların aynı deneysel şartlar altında ayırma güçlerinin farklı olduğu gözlenmektedir [51].



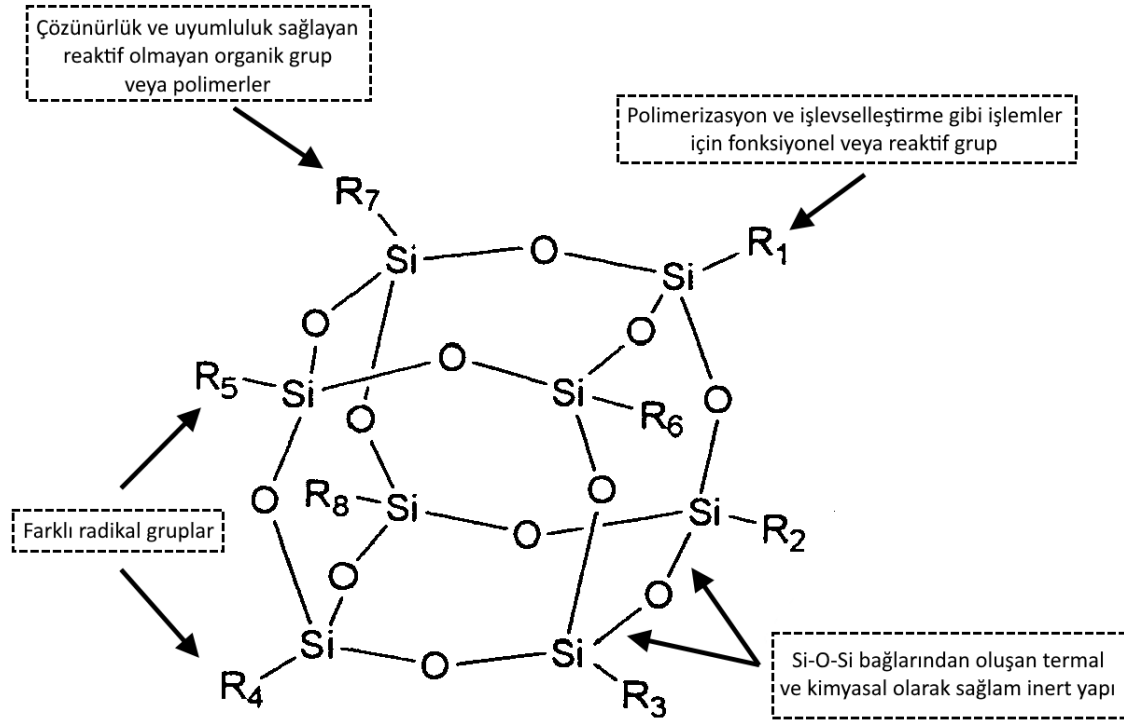
Şekil 2.3. Farklı karbon zincir uzunluklarına sahip ters fazlı kromatografik malzemelerin karşılaştırılması Üç kolonda silika yüzeyine bağlanmış bir 18 (oktadesil), 8 (oktil) veya 1 (metil) karbon zincirine sahip olması haricinde aynıdır. Pik tanımlama: (1) urasil; (2) fenol; (3) asetofenon; (4) nitrobenzen; (5) metil benzoat; (6) toluen. Deney şartları - Kolonlar: IBM sütunları 4.5x250 mm. Mobil faz: 50/50 metanol/su (V/V) isokratik elüsyon, Akış hızı: 1.0 ml/dk. Dalgaboyu: 254 nm [51].

Ters faz kromatografisi için kullanılan ikinci tip durağan faz, organik polimer bazlı monolitlerdir. Tipik bir polimer, polistiren ve divinilbenzenden oluşan bir reçinedir. Divinilbenzen bileşeni, polistiren polimer zincirleri çapraz bağları arasındaki bağları oluşturur. Çapraz bağlar, polimerin fiziksel olarak sertleşmesini sağlar. Daha büyük bir çapraz bağ yoğunluğu daha sert bir malzeme anlamına gelmektedir. Yüksek basınç altında deforme olmaya karşı, monolitte sert ve sağlam yapı istenilen bir unsurdur. Monolitler; proteinler, virüsler ve DNA gibi büyük biyo moleküllerin etkili bir şekilde arıtılması için özel olarak tasarlanmış kromatografik durağan fazlardır. Ters faz kromatografisi oldukça popülerdir çünkü ters faz ile yapılan kromatografik ayrımlarda pikler dar ve simetrik olma eğilimindedir. Ayrıca adsorpsiyon/desorpsiyon denge reaksiyonlarının hızlı olma eğiliminde olması kolon içi denge süresinin kısa olmasını sağlamaktadır [51]. Barut ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, küçük ölçekli monolitik bütül (C4) ve stiren-divinil benzen (SDVB) kolonları çeşitli grip virüslerinin ters faz analizleri için uygulamıştır [52].

2.2. Polihedral Oligomerik Siloksan (POSS)

2.2.1. Yapısı ve Özellikleri

Ampirik formülü $(RSiO_{1.5})_{2n}$ olan POSS, silikon ve oksijenden oluşan inorganik bir iç kafes yapısı içeren ve tamamen inorganik-organik hibrid yapıdaki silseskuioksan türüdür [31, 53]. $(RSiO_{1.5})_{2n}$ formülü her bir silikon atomunun bir R grubuna [$n=4$ ve $R=H$, alkil, aril, halojen vb., sırasıyla hidridosilseskioksanlar, alkilsilseskioksanlar, arilsilseskioksanlar ve haloilsilskitosanlar] ve üç oksijen atomuna bağlı olduğunu temsil eder. Literatüre ilk kez silseskuioksan terimi 1946 yılında Scott tarafından kazandırılmıştır [54, 55]. POSS moleküllerinin hem inorganik-organik hibrid yapıda olması hem de yaklaşık 3-5 nm aralığında olması POSS'un en önemli iki özelliğidir. Bu büyüklükteki POSS, polimer yapılarının zincirlerine katılarak polimer matrisini güçlendirir. POSS molekülleri, POSS monomerlerini polimer zincirlerine polimerize etmek veya aşılama için uygun kovalent olarak bağlanmış reaktif işlevsellikler içerir. Bunun yanı sıra POSS yapısı, çeşitli polimer sistemleri ile çözünürlüğü ve uyumluluğu için reaktif olmayan organik fonksiyonellikler de içerir. Şekil 2.4'te POSS molekülüne ait kafes yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.4. POSS'un üç boyutlu organik-inorganik hibrit yapısı [56]

2.2.2. Kullanım Alanları

Mekanik ve termal stabiliteyi geliştirmek için organik polimerlere dahil edilebilecek silikon ve oksijenden oluşan bir inorganik çerçeve içeren POSS, gerçek bir inorganik-organik hibrid mimariyi temsil etmektedir [57]. Yüksek mekanik ve termal stabilite sağlaması, geniş pH aralığında çalışma imkanı sunması, kolay ulaşılabilir ve ucuz olması, kullanımını en yaygın olan çözücülerde çözünürlüğünün yüksek olması, bağlı gruplarının kolaylıkla modifiye edilebilmesi, kolay polimerize olması ve iyi bir geçirgenliğe sahip olması açısından POSS'un kullanım alanları geniştir [54, 56, 58].

POSS'un polimer ve kopolimer yapılarında kullanılması, son yıllarda muazzam bir popülerlik kazanmış bir araştırma alanıdır. Blanski ve ark. polistiren içinde POSS'un dağılmasını araştırdı [59]. POSS moleküllerinin yüksek molekül ağırlıklı polistiren içerisinde tamamen dağılabildiğini ve stirenil POSS/polistiren filmin yüzey sertliğinin %30 yüksek olduğunu buldular. Moleküler olarak dağılmış POSS, polimer erimelerinde zayıf bir çapraz bağlayıcı olarak davrandığını ve konakçı polimerin kristalleşme hızını hızlandırdığını

gözlemediler [60]. Başka bir çalışmada ise poliüretanlı POSS kopolimerlerinin mekanik [61], termal [62] ve biyouyumluluk özellikleri [63, 64] araştırılmıştır. POSS, yaygın mühendislik termosetleri olan epoksi reçineleri için nano ölçekte dayanıklılığı arttırıcı ajan olarak çalışılmıştır [65-67]. Çeşitli mono ve poliepoksi POSS monomerleri araştırılmıştır.

POSS molekülünün kontrollü türevlendirilebilirliğinin kolay olması nedeni ile literatürde yüzlerce farklı POSS molekülü türü bildirilmiştir ve bu türlerinin her birinin kendine özgü özellikleri vardır. POSS hammaddeleri hemen hemen tüm polimer tiplerine (camsı, elastomerik, kauçuklu, yarı kristalli ve kristalli) ve kompozisyonlara eklenebilir. POSS moleküllerinin plastik alanında kullanılması, bileşimlerin fiziksel özelliklerinin arttırılmasına neden olur. Plastiklerde kullanılan katkı maddeleri polimerde kolayca çözünebilme avantajına sahip olan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Düşük moleküler ağırlıkta olmaları; yüksek sıcaklıkta polimer işleme sırasında katkı maddesinin uçmasına, katkı maddelerinin yiyecek veya su kaynaklarına ekstrakte olmasına ve malzemede istenmeyen modül kaybına gibi dezavantajlara neden olabilmektedir. POSS kullanımı ile mekanik özellikler olan gerilme ve stres özelliklerini korunurken malzemenin modülü ve sertliği arttırılır [54].

POSS'un zincir hareketini kontrol etme yeteneği, diğer polimerler ile birlikte kullanıldığında hemen hemen tüm termoplastik ve termoset polimer türlerinin kullanım sıcaklığının artmasına neden olur. Yaygın olarak kullanılan yangına dayanıklı plastiklerle karşılaştırıldığında POSS içeren polimerler, sert ve hacimli POSS kafeslerinin zincir hareketliliğini kısıtladığından malzemenin ısıl bozunmalarının önüne geçerek camsı geçiş sıcaklığı yükseltir [54].

POSS havacılık ve medikal sektöründe de oldukça yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır [68, 69]. POSS bileşikleri katıldıkları polimer yapısında yüksek derecede uyumluluğa sahip olabilmektedirler ve kolayca bir polimer yapısına kovalent olarak bağlanabilirler [70]. POSS'un polimerlere katılması sonucunda genellikle daha yüksek cam geçiş sıcaklığı, mekanik mukavemet, termal ve kimyasal direnç ve işleme kolaylığı gibi daha fazla istenen özelliklere sahip nanokompozitler üretilir. POSS çeşitli elektronik, optik ve enerji ile ilgili uygulamalarda performansı arttırmak için kullanılır. POSS; elektronik ve optik cihazların

imalatı, farklı sensör sistemleri, yakıt hücresi membranları, akü elektrolitleri ve kayganlaştırıcılar gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca uzay fotovoltaik güneş pillerinde kaplama ve yapıştırıcı olarak da başarıyla kullanılmıştır [54].

2.2.3. POSS Kullanımıyla Sentezlenen Monolitler ve Kromatografik Kullanımı

Literatür incelendiğinde monolitik malzemelerin sentezi son zamanlarda oldukça dikkat çeken bir araştırma alanı olmuştur. Hibrid monolitik malzemeler, son yapı içinde hem vinil hem de silan grupları içeren inorganik/organik hibrid monomerlerden hazırlanır. Hibrid monolitik kolonlar; kolay hazırlanabilmesi, iyi mekanik özelliklere sahip olması, yüksek pH toleransının olması ve yüksek yüzey alanına sahip olabilmesi için silika bazlı ve polimer bazlı materyallerde bulunan avantajların birleştirilmesiyle oluşturulmalıdır [19]. POSS reaktifleri, çeşitli hibrid malzemeler için polimerde rijit yapı taşları olarak kullanılabilmesi ve malzemede moleküler olarak dağılmış nanokompozitler hazırlamak için eşsiz bir fırsat sunar [71]. Bu sebep ile POSS'un bir monomer/çapraz bağlayıcı olarak kullanımı kromatografik ayırmada kullanılması oldukça yaygındır. Literatüre POSS'un bu amaçla nano-sıvı kromatografisinde kullanılması ilk defa 2010 yılında Zou ve ark. tarafından girmiştir. Zou ve ark. çapraz bağlayıcı olarak POSS-metakril ikameli (POSS-MA) bir POSS reaktifi kullanarak toluen-dodekanol pirojen sisteminde fonksiyonel bir monomer ile kopolimerizasyon yoluyla bir inorganik-organik hibrid monolitik kolon sentezlemişlerdir. Elde edilen inorganik-organik hibrid monolitik kılcal kolon yüksek mekanik kararlılığa sahip ve iyi bir pH stabilitesi göstermiştir. Bu hibrid kolon CEC ve μ -HPLC'de değerlendirilmiş; sonuç olarak peptitlerin ve proteinlerin başarılı bir şekilde CEC ve μ -HPLC ile ayrıldığını göstermişlerdir [57].

Literatürde POSS'un kromatografik alanında kullanımı ile ilgili farklı birçok çalışma mevcuttur. POSS-MA çapraz bağlayıcı olarak hidrofilik bir ajan varlığında yerinde polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmış ve çok yönlü hibrid monolit geliştirilmiştir. Elde edilen monolit karakterizasyonu detaylı bir şekilde incelenmiş ve monolitik kolon hidrofilik etkileşim kromatografisi modu kullanılarak analiz edilmiştir [58]. Başka bir çalışmada ise hidrofobik organik-inorganik hibrid monolitik kolonlar çapraz bağlayıcı olarak sekiz veya daha fazla metakrilat grubu içeren POSS reaktifi kullanılarak termal olarak

başlatılmış serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Elde edilen kolonlarının CEC ile polar bileşikleri ayırmada iyi seçicilik gösterdiği gösterilmiştir [72].

Tez kapsamında ise oligomerik siloksan bazlı, kapiler formda affinite monolitinin tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezi ve elde edilen monolitlerin histidin işaretli protein izolasyonu için kullanılabilirliğinin belirlenmesidir. Tiyol-metakrilat polimerizasyon yönteminde polihedral oligomerik silseskuioksan POSS bazlı, 10 metakrilat birimi içeren POSS-metakrilat ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak merkaptosüksinik asit (MSA) ise hidrofilik tiyol ligandı olarak kullanılarak, immobilize metal affinite kromatografisinde sabit faz olarak kullanılacak kapiler monolitler, tek basamaklı bir üretim yöntemi ile sentezlenecektir.

2.3. Immobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

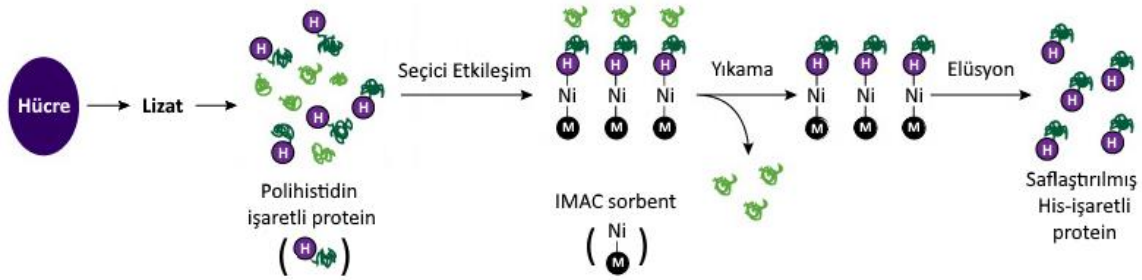
2.3.1. Genel Prensipler

Rekombinant protein teknolojisi, proteinlerin yapısını ve fonksiyonlarını iyice anlamak için moleküler biyoloji alanında önemli bir rol oynar. Protein mühendisliğinde hekza-histidin etiketi (6xHis-etiketi), rekombinant protein saflaştırması için kullanılan en yaygın affinite etiketidir [73]. IMAC terimi literatüre ilk kez 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından kazandırılmıştır [5]. Çeşitli saflaştırma teknikleri arasında immobilize metal affinite kromatografisi (IMAC) ham özütlerden rekombinant proteinleri saflaştırmak ve tanımlamak için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bir ayırma teknolojisi olan IMAC, hedef protein yüzeyindeki fonksiyonel gruplar (genellikle 6xHis-etiketli) ile bir katı destek üzerine immobilize edilmiş metal iyonları arasındaki bağ etkileşiminin oluşumuna dayanmaktadır [74].

IMAC His-işaretli proteinlerin seçici ve güvenilir bir şekilde ayrılması için, histidin ve geçiş metali iyonları arasındaki metal koordinasyon etkileşimi sayesinde yaygın olarak kullanılmıştır [73, 75, 76]. IMAC sorbentleri, iki değerli metal iyonları, biyospesifik affinite ligandlarına kıyasla daha yüksek ligand kararlılığına sahiptir. Bu nedenle çalışmalarda daha çok Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} veya Zn^{2+} katyonları kullanılmaktadır [5]. IMAC'de metal iyonları, katı desteğe kovalent olarak bağlanan metal şelatlayıcı (kenetleme) bileşiklerle

kompleksleştirilerek immobilize edilir. Histidin grupları iki değerlikli metal iyonlarına (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} veya Zn^{2+}) yönelen bir ligand gibi davranarak proteinlerin ve metal iyonlarının kovalent bağlanmasını sağlar. Bu mekanizmada etkili bir ayırımın temel prensibi, protein ve metal iyonu arasındaki bağın kuvvetine dayanmaktadır.

Protein karışımı içeren lizat çözeltisi IMAC kolonundan geçerken dış yüzeyinde elektron verici (His-işaretli grup) spesifik aminoasit kalıntıları (histidin, triptofan, sistein) içeren proteinler, şelatlanmış geçiş metalleri ile koordinasyon bağlarıyla bağlanarak tutulurlar. Tutulmayan proteinler ise kolondan dışarı çıkar. Protein ve metal iyonların etkileşiminin ardından kolon içerisinde bağlı olan proteinler bir yer değiştirici (imidazol, EDTA vb.) ile elüsyon yoluyla kolayca serbest bırakılabilir. Şekil 2.5'te IMAC'de protein adsorpsiyonunu ve desorpsiyonunu gösteren mekanizma diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 2.5. IMAC uygulamalarında yer alan protein adsorpsiyon ve desorpsiyonunu içeren mekanizmaların diyagramı [77].

IMAC'de hareketli fazın seçimi de protein saflaştırılmasında önemlidir. Hedef proteinin üzerinde bulunan elektron verici gruplar ile metal iyonları arasındaki bağın sağlanabilmesi için uygun pH değerine sahip bir hareketli faz kullanılmalıdır. Proteinlerin kendine özgü pH değerlerinde (Histidin pH:6, sistein pH:9, triptofan pH:15 vb.) adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinin yapılması seçici bir ayırımın sağlanabilmesi için oldukça önemlidir [78]. Histidin pH:6'da katı destek üzerine immobilize edilmiş metal iyonları ile koordinasyon bağı kurabilmektedir. Hareketli faz için başka bir gereksinim de fazın tuz (genellikle >0.5M NaCl) içermesidir. Kolon dolgu materyali ile örnek bileşen arasındaki elektrostatik etkileşimi azaltmaya yönelik tuz kullanılarak, seçiciliğin artırılması sağlanır [79]. IMAC'de adsorpsiyon için kullanılan en yaygın hareketli fazlara; fosfat tuzlarını içeren fosfat

tamponlar, asetat tamponlar, HEPES, MES vb. içeren sulu tamponlar örnek verilebilir. Adsorplanan proteinlerin desorpsiyonu, hareketli fazın pH'ının düşürülmesi ya da yer değiştirici bir ajan (imidazol, EDTA vb.) kullanılarak kolayca sağlanabilir. Hareketli fazın pH'ının düşürülmesi kolon içerisinde çok kuvvetli bağlanma sağlamadığı için genellikle tercih edilen bir yöntem değildir. Bunun yerine daha yaygın kullanılan yöntem, daha iyi bir ayırımın sağlanabilmesi için desorpsiyon tamponunda imidazol gibi (elektron verici) daha güçlü yer değiştirici bir ajanın derişiminin arttırılmasıdır [80].

2.3.2. IMAC Sorbentleri

Kromatografik teknolojide IMAC proteinlerin tanımlanması, saflaştırılması, izolasyonu gibi birçok alanda önemli bir yöntem haline gelmiştir. Son yıllarda bu yöntemin uygulama alanları yapılan araştırma çalışmaları ile birlikte oldukça genişlemiştir. IMAC kolonlarının en önemli dezavantajları; proses süresince önemli ölçüde dolgu materyalinin zayıflaması, kısa kolon ömrüne sahip olması, düşük tekrarlanabilirlik verimlerine sahip olmasıdır. Uygun destek materyalleri seçilerek bu dezavantajların üstesinden gelinebilir. IMAC destek materyalleri [81, 82];

- İyi bir fiziksel, mekanik ve kimyasal dayanıklılık sağlaması,
- Sorbent yüzeyinin kolay türevlendirilebilir olması (karboksil, hidroksil, amid vb.)
- Yüksek gözenek miktarına sahip olması,
- Kromatografik ayırım sırasında monolit yapısının bozulmaması (sabit hacimli yatak),
- Yüksek oranda ligand yüklemesinin yapılabilmesi,
- Yüksek akış hızlarında çalışabilme imkânı sağlar.

Bunun yanı sıra metal iyonları EDTA ya da EGTA gibi güçlü bir şelatlı madde ile katı destek üzerinden kolaylıkla alınabilir. Bu nedenle, hedef proteinin ayrılması için farklı metal iyonları aynı katı destek üzerinde test edilerek uygun olan en iyi metal iyonuna göre çalışmalar sürdürülebilir.

IMAC'de kullanılan ilk katı destek materyali bir karbonhidrat olan agarozdur. Hidrofilik özelliğe sahip olan agaroz, yüksek mekanik dayanıklılık gösterir ve farklı çözücülerle tepkimeye girmeden çalışma imkanı sağlar [81]. Porath ve grubunun yaptığı çalışmada agaroz destek materyaline iminodiasetik asit (IDA) ligand olarak bağlanmış ve ligand

üzerine geçiş materyalleri olan nikel, çinko, bakır ve kobaltın immobilizasyonunu sağlamıştır. Hazırlanan sorbent ile insan serumu içerisindeki histidin, triptofan ve sistein aminoasitlerine geçiş materyallerinin affiniteleri incelenmiştir [5]. Yaygın olarak kullanılan destek materyallerine dekstran ve selüloz örnek olarak verilebilir. Poliakrilamid, polistiren ve silika ise yaygın olarak kullanılan polimerik matrislerdir. Silika bazlı polimerik destek materyalleri yüksek mekanik dayanıklılığı sebebi ile diğer polimerik matrislere göre daha az deforme olurlar.

2.3.3. IMAC Metal İyonları

IMAC'de daha seçici bir ayırım sağlanabilmesi için proteinlerin, immobilize edilmiş metal iyonlarına karşı göstermiş oldukları afinite eğilimine göre metal iyonlarının tercihi yapılmaktadır. IMAC teknolojisinde metaller nükleofillere karşı gösterdikleri ilgiye göre 3 gruba ayrılmıştır.

- Birinci grupta Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} gibi sert metal iyonları (oksijen iyonlarına ilgisine göre)
- İkinci grupta Hg^{2+} ve Ag^{+} gibi yumuşak metal iyonları (kükürt iyonlarına ilgisine göre)
- Üçüncü grupta Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} gibi geçiş metalleri (azot, oksijen ve kükürt iyonlarına ilgisine göre)

Üçüncü grupta bulunan geçiş metalleri azot, oksijen ve kükürt iyonlarının hepsine afinite gösterir [2].

2.3.4. IMAC Yöntemi ile Histidin İşaretli Proteinlerin İzolasyonu

Kromatografik sorbent üzerinde proteinlerin adsorplanabilmesi için protein yüzeylerinde histidin, triptofan veya sistein gibi spesifik aminoasit kalıntısının bulunması gerekmektedir. Çok sayıda protein, aminoasit dizilerinde histidin kalıntıları içerir. Histidin işaretli rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında ve seçici olarak ayrılmasında, IMAC kullanılan en yaygın yöntemdir ve histidin içeren proteinleri düşük miktardaki numunelerden tanımlanmasını kolaylaştırabilmek için kullanılmaktadır. Proteinlerin yapısal fonksiyonlarındaki farklılıklar da (ikincil, üçüncül, dördüncül yapıları) etkin bir ayırımın sağlanabilmesi için büyük bir önem teşkil etmektedir. Yapısal konfigürasyonundaki

farklılıklardan dolayı; moleküler boyutları, aminoasit kompozisyonları ve elektriksel yükleri birbiri ile aynı iki protein kolay bir şekilde ayrıştırılabilmektedir [83].

Karboksi terminal uçlu veya histidin kalıntıları içeren proteinlerin saflaştırılmasında protein yüzeyindeki histidin etiketine kolay ulaşılabilirlik ve histidin metal iyonuna şelatlanması kromatografik ayırımın temel prensibidir. İmmobilize Ni^{2+} ve Co^{2+} , histidin gruplarına sahip kuyruklar içeren rekombinant proteinlerin tek aşamalı saflaştırılmasında kullanılan en yaygın geçiş metalleridir. Sınırdaki baz olarak kabul edilen ve aromatik nitrojen içeren histidin, sınırdaki asitler olan Co^{+2} ve Ni^{+2} ile uygun olarak koordine olmaktadır [5, 83]. Kromatografik sorbent üzerine immobilize edilmiş metal iyonları ile, histidin işaretli proteinleri spesifik olarak bağlayan afinite yüzeyi elde edilir.

Metal iyonlarının (örn: Ni^{2+} iyonu), ligand yapılarındaki elektron donor grupları (azot, oksijen, kükürt) üzerinden immobilizasyonu sonrasında bağ yapmamış olan koordinasyon noktaları normalde su molekülleriyle bağ yapmaktadır. IMAC sorbentlerinin bulunduğu ortama histidin kalıntıları içeren bir protein karışımı dahil edildiğinde, metal iyonlarının açıkta kalan koordinasyon noktalarına bağlanan su molekülleri histidin etiketli protein üzerindeki elektron donor gruplar ile yer değiştirir. Saflaştırılacak olan histidin etiketli protein kolon içerisinde tutunur ve karışımdaki diğer proteinler sorbent yüzeyine bağlanmadan kolondan dışarı çıkar. Kolon içerisindeki tutunan histidin etiketli proteinin yıkama işlemi (elüsyon) ile kolondan çıkması sağlanır. Histidin etiketli proteinin elüsyonu için imidazol kullanılır. İmidazol proteinlerin denatürasyonundan kaçınmak için iyi bir seçenektir. Ayrıca imidazolun halka yapısı histidine benzer ve ortam pH'ını yaklaşık olarak 4.5'e düşürür. Azalan pH ile histidin etiketin metal iyonuna olan afinitesi azalır ve imidazol Ni^{2+} iyonlarına bağlamak için yarışmacı ajan gibi davranarak histidin etiketli protein ile yer değiştirir [83].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında, mikroakışkan tabanlı sistemlerde histidin işaretli proteinlerinin ayrımı için affinite monoliti kullanılarak histidin işaretli protein izolasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Silanlama işlemi ile 300 µm çapında kapiler kolonların yüzeyi modifiye edilmiştir. Silanlama, monolitin yüzeye tutunma davranışını etkileyen bir ön işlemdir. Histidin işaretli proteinlerin ayrımı için kullanılacak olan monolitte; fonksiyonel grup içeren ligand olarak merkaptosüksinik asit (MSA), monomer ve çapraz bağlayıcı olarak POSS-MA, mikro ve makro gözenek yapıcı olarak sırasıyla n-bütanol ve etilen glikol, termal başlatıcı olarak ise 2,2'-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN) kullanılmıştır. Hidrofilik ligand olan MSA, çapraz bağlayıcı ve ana monomer olan POSS-MA yapısına tiyol grubu üzerinden tek basamakta bağlanmıştır. Polimerizasyon sonrası yıkama işlemi ile tüm safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Kolon için farklı akış hızlarında mikroenjeksiyon pompası kullanılarak basınç testleri yapılmıştır. Uygun geri basınç değerlerine ve yüzey alanına sahip monolit yapısına ulaşabilmek için, monolit kompozisyonundaki toplam porojen miktarı sabit kalacak şekilde mikro/makro gözenek yapıcı kimyasalların oranları değiştirilmiştir. Daha sonrasında kapiler kolonların içerisindeki monolit yapısı Ni^{2+} çözeltisi ile etkileştirilerek nikelin monolit yapı üzerine bağlanması gerçekleştirilmiştir. Monolit yüzeyine bağlanamayan Ni^{2+} iyonlarını uzaklaştırmak için kolon fosfat tampon çözeltisi (pH=7) ile yıkanmıştır.

Uygun akış hızında histidin işaretli protein olan GFP içeren bakteri lizatı mikroenjeksiyon pompası kullanılarak Ni^{2+} bağlı monolitik kolondan geçirilerek GFP'nin nikel üzerine adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında uygun desorpsiyon ortamı belirlenerek adsorbe olan GFP'nin desorpsiyonu sağlanmıştır. Ni^{2+} iyonları içeren kapiler monolitler ile IMAC yöntemiyle histidin işaretli proteinlerin, bakteri lizatından izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kapiler kolonda protein adsorpsiyon/desorpsiyon verimini tayin etmek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Bradford yöntemleri kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Monolit sentezinden önce yapılan ve monolitin kapiler kolon iç yüzeyine daha iyi tutunmasını sağlayan silanlama işleminde kullanılan; sodyum hidroksit (NaOH) Riedel de Haen, Almanya, 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM), metanol (MetOH), toluen ve hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich, ABD firmasından temin edilmiştir. İç çapı 300 µm olan ve termal polimerizasyonda kullanılan kapiler kolonlar ise Polymicro-Technologies-Molex, ABD firmasından temin edilmiştir.

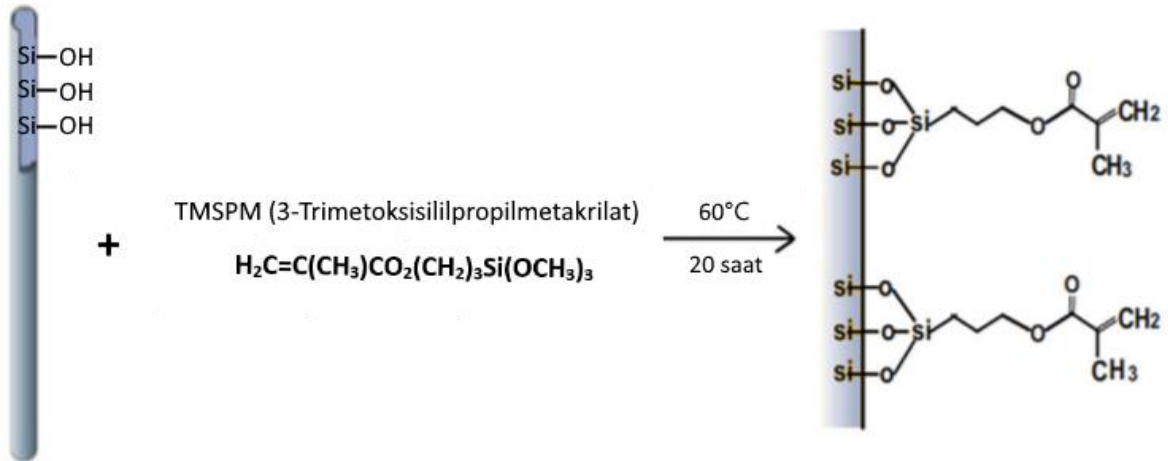
Histidin işaretli proteinlerin ayrımı için kapiler kolonda sentezlenen affinite monolitinin bir bileşeni olan POSS-MA hem ana monomer hem de çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır ve Hybrid Plastics, ABD firmasından tarafından temin edilmiştir. Hidrofilik fonksiyonel grup içeren ligand olan MSA ve monolitte gözenek yapısını sağlayan mikro-gözenek yapıcı ajan olarak kullanılan n-bütanol ve makro-gözenek yapıcı ajan olarak kullanılan etilen glikol Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Polimerizasyonda termal başlatıcı olarak görev alan AIBN ise Glenthams LSL, İngiltere firmasından temin edilmiştir. Polimerizasyon sonrası kapiler kolon içerisindeki safsızlıkları uzaklaştırmak için kullanılan saf etanol (EtOH) Merck A.G. Darmstadt, Almanya'dan temin edilmiştir. Monolitik yapı üzerine immobilizasyonu sağlanan nikel(II) klorür (NiCl_2) ise Sigma Chemical Co., ABD firmasından temin edilmiştir.

Adsorpsiyon ve desorpsiyon tampon çözeltisinde kullanılan disodyum fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) Merck, Almanya firmasından, monosodyum fosfat (NaH_2PO_4) ve sodyum klorür (NaCl) Riedel-de Haen, Almanya firmasından, imidazol (1,3-diaza-2,4-siklopentadien) ise Sigma-Aldrich, ABD firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kapiler Kolonda Silanlama İşlemi

Kapiler monolitik kolonlar, sentezlenen polimerik monolit yapısının kolon iç yüzeyine daha iyi tutunması ve kolon geri basıncı için oldukça önemli bir ön adımdır. Yüksek akış hızlarında çalışırken monolit yapısının zarar görmemesi ve kolon iç yüzeyinden ayrılmaması için silanlama işlemi gereklidir. İlk olarak istenilen uzunlukta kapiler kolon kesilir ve kolon bağlantı ara parçaları ile mikroenjeksiyon pompasına bağlanır. 1M NaOH çözeltisi bir

şırıngaya alınarak 25 µL/dk akış hızında 120 dk süresince kolon içerisinde geçirilir. Kolon içerisinde NaOH çözeltisi kalacak şekilde kolonun iki ucu septum ile kapatılır ve 1 saat kolon bekletilir. Kolon içerisindeki NaOH'ın giderilmesi için kolon aynı akış hızında distiledeyionize su ile 30 dk yıkanır. Ardından 30 dk boyunca içerisinde azot gazı geçirilerek kolonun kurması sağlanır. Bu işlemler aynı sıra ile tekrarlanır. Sonrasında kolon içerisinde sırasıyla 1M HCl çözeltisi 30 dk, azot gazı ise 20 dk süresince geçirilir. Bu işlemlerin amacı, kolon iç yüzeyinde hidroksil (-OH) gruplarının oluşmasını sağlamaktır. Son olarak aynı akış hızında hacimce %40 TMSPM ve %60 toluen karışımı içeren homojen çözelti şırıngaya alınarak kolon içerisinde 10 dk boyunca geçirilir. Bu karışım kolon içerisinde kalacak şekilde kolonun iki ucu septum ile kapatılır ve 20 ila 24 saat boyunca 60°C sıcaklıkta kolon su banyosunda bekletilir. Bu süre boyunca kolon iç yüzeyindeki -OH grupları ile TMSPM'nin 3-trimetoksisil grupları reaksiyona girerek kolon iç yüzeyinde metakrilat gruplarının oluşması sağlanır. Şekil 3.1'de hidroksil grupları (-OH) ile trimetoksisil grupları arasında olan reaksiyon gösterilmektedir. Kolon iç yüzeyinde kovalent bağlı olan metakrilat grupları, polimerizasyona katılarak monolitin kolon duvarına bağlanmasını sağlayacaktır. Sıcak su banyosundan alınan kolon oda sıcaklığına geldikten sonra safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla 25 µL/dk akış hızında toluen ile 10 dk yıkanır. Daha sonrasında azot gazı kolon içerisinde 5 dk geçirilerek kolon kurutulur. Kapiler kolon tüm bu işlemlerden sonra bir sonraki adım olan monolit sentezi için hazır duruma gelmiş olur.



Şekil 3.1. Kapiler kolon iç çeperindeki hidroksil grupları (-OH) ile TMSPM'nin metoksisil grupları (Si-OCH₃) arasındaki bağlanma

3.3. Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Kapiler Monolit Kolonun Sentezi

3.3.1. Hidrofilik Ligand (MSA) Bağlı POSS-MA Bazlı Kapiler Monolit Kolonun Sentezlenmesi

Tiyol-metakrilat polimerizasyon yönteminde polihedral oligomerik silseskuioksan (POSS) bazlı 10 metakrilat birimi içeren POSS-MA, ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Merkaptosüksinik asit (MSA) ise bir tiyol fonksiyonel grubu içeren ligand olarak kullanılmıştır. İmmobilize metal affinite kromatografisinde sabit faz olarak kullanılacak kapiler monolitler, tek basamaklı tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Monolit karışımının hazırlanması işlemi ilk olarak cam deney tüpü içerisine mikro gözenek yapıcı ajan olan n-ButOH ve makro gözenek yapıcı ajan olan etilen glikol alınarak homojen hale gelinceye kadar karışım vortekslenir. Karışım üzerine hem ana monomer hem de çapraz bağlayıcı olan POSS-MA eklenir ve tüpün ağız kısmı sıkıca kapatılarak karışım tekrar vortekslenir. Daha sonrasında termal başlatıcı olan AIBN karışıma eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanır. Son olarak fonksiyonel grup içeren hidrofilik ligand MSA eklenerek vortekslenir. Elde edilen karışım insülin şırıngasına alınır. Silanlama işlemi sonrasında monolit sentezine hazır olan kolon, Şekil 3.2’de gösterildiği şekilde ara bağlantı parçaları ile insülin şırıngasına bağlanarak polimerizasyon karışımı kolon içerisinden geçirilir. Kolonun içerisi karışım ile doldurulup kolonun iki ucu septum ile kapatılır. Hazırlanan kolon 60°C, 24 saat süresince su banyosunda polimerizasyon için tutulur.



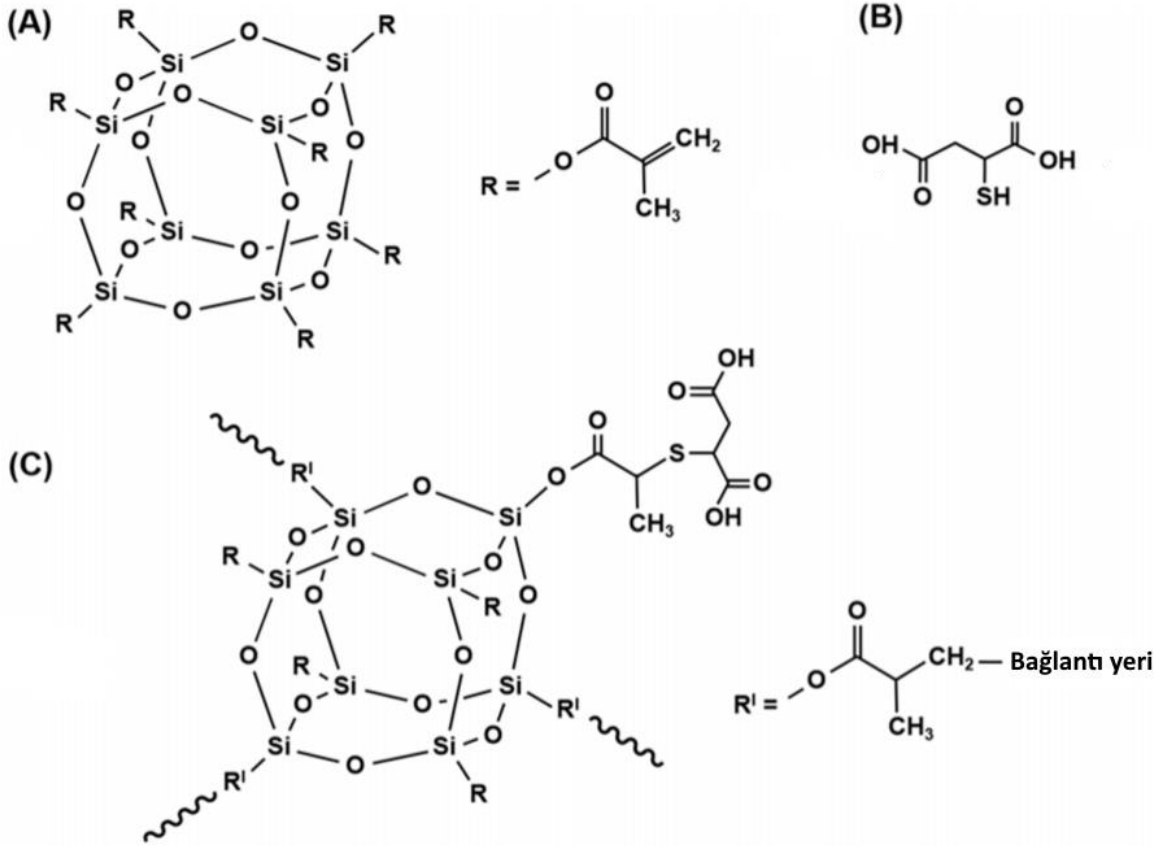
Şekil 3.2. (A) Silanlama işlemi için kurulan düzenek (B) MSA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler monolitlerin hazırlanması

Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda ligand ve farklı oranlarda mikro/makro gözenek yapıcı ajanlar kullanılarak termal polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen kapiler monolitlerin sentez koşulları (polimerizasyon sıcaklığı: 60 °C, polimerizasyon süresi: 24 saat)

Kolon Kodu	MSA (mg)	POSS-MA (mg)	n-ButOH (µL)	Etilen Glikol (µL)	Toplam Porojen (µL)	AIBN (mg)
MSA40	40	150	889	361	1250	10
MSA50-1	50	150	1111	451	1562	10
MSA75-1	75	150	1111	451	1562	10
MSA50-2	50	150	934	625	1559	10
MSA75-2	75	150	934	625	1559	10

Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere hacimce toplam porojen miktarı aynı kalacak şekilde farklı oranlarda mikro ve makro gözenek yapıcı ajanların ve farklı miktarlarda hidrofilik ligand olan MSA kullanılarak bu değişimlerin kolona etkisi incelenmiştir.

Sentezlenen kolonlar 24 saat sonra su banyosundan çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmesi için bekletilir. Kolon içerisinde polimerleşmenin her yerde homojen olduğundan emin olmak için ışık mikroskobu ile kolon incelenir. MSA'nın POSS-MA yapısına katılması Şekil 3.3'de gösterilmektedir. Uygun polimerleşmeye sahip kolon içerisindeki kirlilikleri uzaklaştırmak için kolon saf etanol ile 5 µL/dk akış hızında 6 saat yıkanır.



Şekil 3.3. (A) Ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan POSS-MA'nın moleküler yapısı (B) kromatografik hidrofilik ligand olarak MSA'nın yapısı (C) MSA bağlı organosilikon ağı [84].

3.3.2. Ni²⁺'nin MSA-POSS Yapısına Bağlanması

Sentezlenen ve safsızlıklardan uzaklaştırılmış olan kapiler monolit kolon NiCl₂ çözeltisi ile etkileştirilerek, Ni²⁺ iyonlarının MSA birimlerinin karboksil grupları ile etkileşimi sonucu monolitik yapı üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 mL 0.1 M NiCl₂

çözeltisi hazırlanır ve kolon içerisinden 5 µL/dk akış hızında 2 saat NiCl₂ çözeltisi geçirilir. Kolonun içerisi NiCl₂ çözeltisi ile dolu iken kolonun iki ucu septumla kapatılır ve 1 gece bekletilir. 2 saat adsorpsiyon tamponu (0.5 M NaCl içeren 20 mM pH 7 fosfat tampon çözeltisi) ile yıkanarak kolon içerisinden serbest haldeki Ni²⁺ iyonları uzaklaştırılır. Azot gazı kolon içerisinden geçirilerek adsorpsiyon tampon çözeltisi kolondan çıkartılır ve kolon içerisinin kurması sağlanır. Elde edilen kromatografik sistem (Ni²⁺ immobilize edilmiş kapiler monolit kolon) ile sürekli sistemde protein adsorpsiyon-desorpsiyonu için kullanılır. Monolitik kolonun histidin işaretli protein olan GFP'ye karşı afinitesini inceleyebilmek için kolonların adsorpsiyon kapasiteleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri, tekrar kullanılabilirliği ölçülmüştür. Başlangıç protein derişimi ve desorpsiyon ajanı derişiminin protein izolasyonuna etkisi de incelenmiştir. Ayrıca Ni²⁺ iyonu immobilize edilmemiş kapiler monolit kolon ile çalışma tekrarlanarak Ni²⁺ iyonunun protein izolasyonu üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

3.4. Ni²⁺ İmmobilize Edilmiş MSA&POSS-MA Kapiler Monolit Kolonun Karakterizasyonu

3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, SEM (scanning electron microscope), odaklanmış elektron demetinin örnek yüzeyini tarayarak, yüzeyin morfolojisi ve kompozisyonu hakkında bilgi veren bir elektron mikroskopi türüdür. Sentezlenen monolitik kapiler kolon 2 cm kesilerek bir desteğe dik konumda yerleştirilmiştir. Alınan görüntünün kalitesini arttırmak için hazırlanan örnekler vakumda 150 Å kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. Örnek üzerinde farklı büyütme oranları kullanılarak istenilen kesit görüntü SEM cihazından (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) alınmıştır.

3.4.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Yüzey Alanı Ölçümü

Katı veya toz numunelerde BET metoduyla azot gazı (N₂) adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak yüzey alanı ölçümü ve gözenek boyut dağılımı düşük basınçlarda (yüksek vakumda) ve yüksek çözünürlükte tespit edilebilmektedir. Monolit sentezi sırasında, kolon içerisinden geçirilen çözeltinin fazlası cam deney tüpü içerisinde 60°C, 24 saat süresince su banyosunda polimerleşme için bırakılmaktadır. Polimerleşme sonrası katı bir yapıya sahip olan monolit

dikkatlice kırılarak petri kabına alınır ve toz haline getirilir. Saf etanol ile birkaç kez yıkanır ve daha sonrasında kuruması için 24 saat süreyle 60°C’de etüve alınır. Kuruma sonrası toz halindeki monolitten yaklaşık 0.1 g alınarak örnek kabına konulur ve örnek bölmesine yerleştirilir. Vakum altında 80°C’de 6 saat boyunca gaz uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilir, sonrasında uygun analiz protokolü seçilerek 77 K’deki sıvı azot ortamında yüzey alanı ve gözenek dağılımı ölçümü BET cihazında (Quantachrome Nova 2200, ABD) gerçekleştirilir.

3.4.3. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ile Monolit Analizi

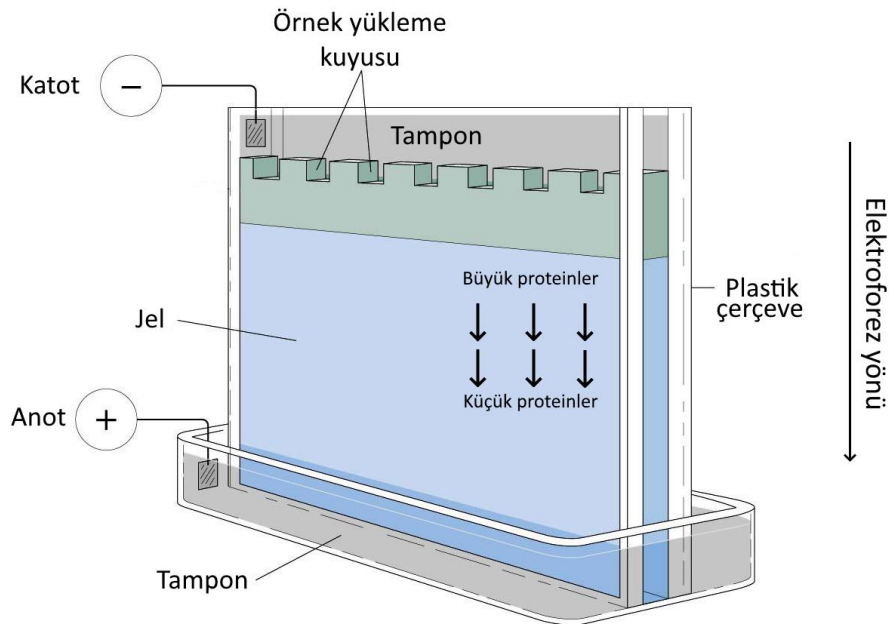
Enerji Dağılım X-Işını Analizi (EDX), malzemelerin temel bileşimini tanımlamak için kullanılan bir X-ışını tekniğidir. EDX sistemleri elektron mikroskopi enstrümanlarına (SEM ve TEM) bağlıdır. EDX analizi ile üretilen veriler, analiz edilen numunenin gerçek kompozisyonunu oluşturan elementlere karşılık gelen pikleri gösteren spektrumlardan oluşur. EDX, bir numunenin elementel analizi veya kimyasal karakterizasyonu için kullanılan analitik bir tekniktir. Tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile termal etki kullanılarak sentezlenen hidrofilik özellikteki tiyol fonksiyonel grubuna sahip ligandın yapıya bağlanmasını tespit edebilmek ve monolit yapısındaki atomik bileşim hakkında bilgi edinebilmek için EDX (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) ölçümleri yapılmıştır.

3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Karışımlardaki yüklü moleküllerin elektrik alanı içerisinde yürütülerek onları moleküler kütlelerine göre ayrıştırılmasını sağlayan tekniğe elektroforez denir. Elektrofrezin çalışma prensibi; moleküldeki elektrik enerjisinin jel içerisinden anottan katoda doğru giderken yol aldığı mesafe farklılığına dayanmaktadır ve bu ilerleme moleküllerin büyüklüğü ile değişmektedir. Elektrofrezde katedilen yol, molekül net yükü ile doğru orantılı olup molekül kütlesi ve jel ortamının viskozitesi ile ters orantılıdır. Bu teknik, molekül kütlesi 5 ila 250 kDa arasındaki proteinlerin hassas ayırımına olanak sağlamaktadır. GFP, 27 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip ve 238 amino asitten oluşan bir proteindir. SDS-PAGE tekniği ile toplanan numunelerdeki GFP analizi yapılmıştır.

SDS, oligomerik proteinleri alt birimlerine ayıran bir yüzey aktif maddedir. Bu yüzey aktif madde polipeptid yapısına bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu kompleks yapının negatif yüklü kalmasını sağlar. PAGE, proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan

elektriksel çekim kuvvetinin olduğu ortama denir. Hareket ortamı olarak kullanılan çok sayıda çapraz bağ içeren poliakrilamid jel kullanılır. Akrilamid ve bir akrilamid türevi olan N-N'-metilenbisakrilamid'in polimerleşmesiyle gözenekli yapıda bir jel oluşturulur. Polimerleşme işlemi gerçekleşmeden hemen önce uygun bir tarak seçilerek örnek yükleme kuyularının oluşması sağlanır. Bu tarak polimerleşme sonrasında katılaştıktan jelden dikkatlice çıkartılır. Elde edilen jel elektroforez haznesine (Bio-Rad Mini Protean 3 System) yerleştirilir. Adsorpsiyon/desorpsiyon işlemi sonrasında kapiler monolit kolon içerisinden çıkan ve ependorflara alınan numuneler jeldeki yükleme kuyularına konur. Elektroforez haznesinde bulunan jelde 100 volt uygulanarak, 100 dk boyunca protein karışımının jel içerisinde katottan anota hareketi sağlanır. Böylelikle bir protein karışımı molekül ağırlıklarına göre belirli protein bantlarına ayrılır. Yürütme işlemi sonrasında jel desteklerden dikkatlice ayrılır ve protein bantlarının saptanabilmesi için Coomassie mavisi ile boyanır. Protein bantlarının net bir şekilde görülmesi için distile saf su ile jel birkaç kez yıkanır. Daha sonrasında Bio-Rad Gel Doc EZ Imager cihazı kullanılarak jel görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.4'te poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sistemi gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sistemi [85]

3.6. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Histidin İşaretli Protein İzolasyonu

E. coli kültür ortamında rekombinant olarak histidin işaretli protein (green fluorescent protein, GFP) üretimi yapılmıştır ve elde edilen bakteri lizatı uygun saflaştırma basamakları sonrası mikroenjeksiyon pompası aracılığı ile monolitik sabit faz üzerine yüklenerek GFP'nin Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş kapiler monolit üzerine adsorpsiyonu ve desorpsiyonu sağlanmıştır. Eşitlik (3.1), (3.2), (3.3) ve (3.4) kullanılarak kolonun adsorpsiyon-desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

$$Q_a = Q_y - Q_v \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Adsorpsiyon} = \frac{\text{Adsorplanan Analit Miktarı (} Q_a \text{)}}{\text{Kolona Yüklenen Analit Miktarı (} Q_y \text{)}} * 100 \quad (3.2)$$

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorplanan Protein Kapasitesi (} Q_{des} \text{)}}{\text{Adsorplanan Protein Kapasitesi (} Q_{ads} \text{)}} * 100 \quad (3.3)$$

$$\% \text{ İzolasyon} = \frac{\text{Desorplanan Protein Kapasitesi}}{\text{Kolona Yüklenen Analit Miktarı}} * 100 \quad (3.4)$$

Q_a: adsorplanan analit miktarı (µg), Q_y: kolona yüklenen analit miktarı (µg), Q_v: adsorplanmayan analit miktarı (µg), Q_{des}: desorplanan analit miktarı (µg)/adsorplanamayan analit miktarı (µg) olarak verilmektedir.

3.6.1. Ni²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Fonksiyonu

Proteinlerdeki histidin grupları (e⁻ verici grup), geçiş metallerine karşı en yüksek afiniteyi gösteren aminoasit grubudur. Ni²⁺ iyonu ve MSA'nın protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek amacıyla analitik kolonla yapılan deney aynı akış hızında, aynı başlangıç protein konsantrasyonu derişimi ve aynı desorpsiyon tampon çözeltisi derişimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analitik kolon sentezi tezin daha önceki kısımlarında anlatılmıştır. Bunun yanında hem nikelsiz hem de nikel ve MSA içermeyen kolonlar da sentezlenmiştir. Kolonlarda başlangıç protein konsantrasyonu 2.1 mg/mL olan protein karışımı

kullanılmıştır. İnsülin şırıngası ile kolon içerisinden protein karışımı geçirilerek, 4 µL/dk akış hızında her bir ependorfta 12 µL numune olacak şekilde 9 adet adsorpsiyon örneği alınır. Daha sonrasında kolonlar adsorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkanır. Ardından 3 kademeli desorpsiyon işlemi, sırası ile 10 mM, 25 mM ve 100 mM imidazol içeren desorpsiyon tampon çözeltisi (0.5 M NaCl içeren 50 mM pH 7 fosfat tampon çözeltisi) ile yapılmıştır. Her bir kademede 12 µL örneği olacak şekilde 3 adetten toplam 9 adet desorpsiyon örneği alınmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile kolonların adsorpsiyon, desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.6.2. Akış Hızı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

Monolitik kapiler sistemde akış hızı taraması yapılarak akış hızının protein izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Sentezlenen standart kolon ile aynı protein konsantrasyonuna (2.1 mg/mL) sahip lizat 2 µL/dk, 4 µL/dk ve 6 µL/dk akış hızında kolon içerisinden geçirilmiştir. Çalışılan her akış hızında, her ependorfta 12 µL numune olacak şekilde 9 adet adsorpsiyon numunesi alınır. Adsorpsiyon işlemi sonrası kolonlar adsorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkanır. Sırası ile 10 mM, 25 mM ve 100 mM imidazol içeren desorpsiyon tampon çözeltisi kolon içerisinden geçirilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilir. Her ependorfta 12 µL numune olacak şekilde toplam 9 adet desorpsiyon numunesi alınmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile kolonların adsorpsiyon, desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.6.3. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

Monolitik sistemde başlangıç protein konsantrasyonu değişiminin protein izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Sentezlenen analitik kolonlarda 0.4 µL/dk akış hızında, 1.2, 2.1 ve 3.5 mg/mL protein konsantrasyonu içeren lizat ile çalışılmıştır. Çalışılan her protein konsantrasyonunda, her ependorfta 12 µL örnek olacak şekilde 9 adet adsorpsiyon örneği alınır. Adsorpsiyon işlemi sonrası kolonlar adsorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkanır. Sırası ile 10, 25 ve 100 mM imidazol içeren desorpsiyon tampon çözeltisi ile desorpsiyon işlemi gerçekleştirilir. Her ependorfta 12 µL örnek olacak şekilde toplam 9 adet desorpsiyon örneği alınır. SDS-PAGE yöntemi ile kolonların adsorpsiyon, desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.6.4. İmidazol Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

Desorpsiyon işleminde protein ile Ni²⁺ iyonları arasındaki etkileşimin zayıflatılması gerekmektedir. Bu ekileşim, nötr veya düşük pH değerinde proteinler üzerindeki imidazol halkalarından daha etkin olan başka bir imidazol yapısı bulunduran ajanlar ile gerçekleştirilir. Protein üzerindeki imidazol yapısı ile metal iyonu arasındaki afiniteyi azaltan koşulların oluşması sağlanır. Böylelikle ortama sonradan eklenen imidazol ile histidin bağlı protein üzerindeki imidazol grupları arasında bir yarış olur. Sentezlenen analitik kolonlarda aynı akış hızında, aynı başlangıç protein konsantrasyonunda farklı desorpsiyon koşullarında çalışılmıştır. Çizelge 3.2’de deney parametreleri verilmektedir.

Çizelge 3.2. Standart kapiler monolit kolonda imidazol konsantrasyonunun protein izolasyonuna etkisini gözlemek amacıyla oluşturulan deney parametreleri

Deney Numarası	Lizat Konsantrasyonu (mg/mL)	Çalışılan Akış Hızı (µL/dk)	I. Kademe Desorpsiyon Tampon (mM imidazol)	II. Kademe Desorpsiyon Tampon (mM imidazol)	III. Kademe Desorpsiyon Tampon (mM imidazol)
1	3.5	4	10	100	-
2	3.5	4	25	100	-
3	3.5	4	50	100	-
4	3.5	4	10	25	100
5	3.5	4	10	50	100

Desorpsiyon tampon çözeltisi ile hazırlanan imidazol çözeltisi, Ni²⁺ iyonlarına bağlanarak GFP’nin kolonu terk etmesi sağlanmıştır. Farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak *E. coli* lizatından saflaştırılmış histidin işaretli proteinin SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. Kolonların adsorpsiyon, desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.6.5. Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Analitik Tekrarlanabilirlik Çalışması

Kolonun tekrarlı kullanımı kromatografik çalışmalarda aranan bir özelliktir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları aynı sabit faz ile aynı koşullar altında aynı gün veya günden güne tekrarlanabilirliği kapsamaktadır. Deneylerde başlangıç protein konsantrasyonu 1.44 mg/mL olan protein karışımı kullanılmıştır. İnsülin şırıngası ile kolon içerisinden protein

karışımı geçirilir. 4 µL/dk akış hızında her bir ependorfta 12 µL örneği olacak şekilde 9 adet adsorpsiyon örneği alınır. Ardından kolonlar adsorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkanır. Desorpsiyon işlemi tek kademede yüksek imidazol içeren (500 mM imidazol içeren 50 mM pH 7 fosfat tampon) tampon çözeltisi ile gerçekleştirilir. Her ependorfta 12 µL numune olacak şekilde 5 adet desorpsiyon örneği alınmıştır. Daha sonrasında 30 dk EDTA çözeltisi (50 mM pH 4.5) ile kolon içerisindeki histidin işaretli proteinlerin bağlı olduğu Ni²⁺ iyonlarının monolitik yapıdan ayrılması sağlanır. İmmobilize metal iyonları ile kuvvetli etkileşim yapan proteinler için güçlü şelat bileşiği olan EDTA, histidin işaretli proteinlerin monolitik yapıdan uzaklaştırılmasını sağlar. EDTA, metal iyonları ile ligand üzerindeki bağlantıya da zarar vermektedir bu yüzden kolonun immobilize metal afinite kromatografisinde tekrar kullanılabilmesi için monolit yapısının tekrardan Ni²⁺ iyonlarına doyurulması gerekmektedir. EDTA çözeltisi geçen kolon 15 dk distile saf su ile yıkanır. 10 mL 0.1M NiCl₂ çözeltisi hazırlanır ve kolon içerisinden 5 µL/dk akış hızında 1.5 saat NiCl₂ çözeltisi geçirilir. Daha sonrasında kolon 1 saat adsorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkanarak kolon içerisinden serbest haldeki Ni²⁺ iyonları uzaklaştırılır. Kolon içerisinden azot gazı geçirilerek adsorpsiyon tampon çözeltisi kolondan çıkartılır ve kolon içerisinin kurması sağlanır. Monolitlerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsü, standart monolitik kapiler kolon kullanılarak beş kez tekrar edilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesindeki değişimler SDS-PAGE yöntemi ile gözlemlenmiştir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tez kapsamında kapiler monolit formunda oligomerik silseskuioksan bazlı affinite dolgu materyali geliştirilmiştir. Monolitler polihedral oligomerik silseskuioksan makromonomer ve tiyol gruplu bir ajanın termal başlatıcılı tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile tek basamakta elde edilmiştir. Yöntemde, tiyol gruplu ajan olarak MSA kullanılmıştır; böylelikle, çift karboksil grubunun polimerizasyon sırasında monolite kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Karboksil grupları kullanılarak Ni^{2+} iyonları şelat oluşumu yoluyla monolit üzerinde immobilize edilmiştir. Ni^{2+} iyonları içeren kapiler monolit kolon, mikroakış tabanlı sistemler ile immobilize metal affinite kromatografisi yöntemiyle histidin işaretli protein olan GFP'nin, *E. coli* bakterisi lizatından izole edilmesi için kullanılmıştır. Sentezlenen kapiler monolitik kolonların adsorpsiyon kapasiteleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri hesaplanmıştır.

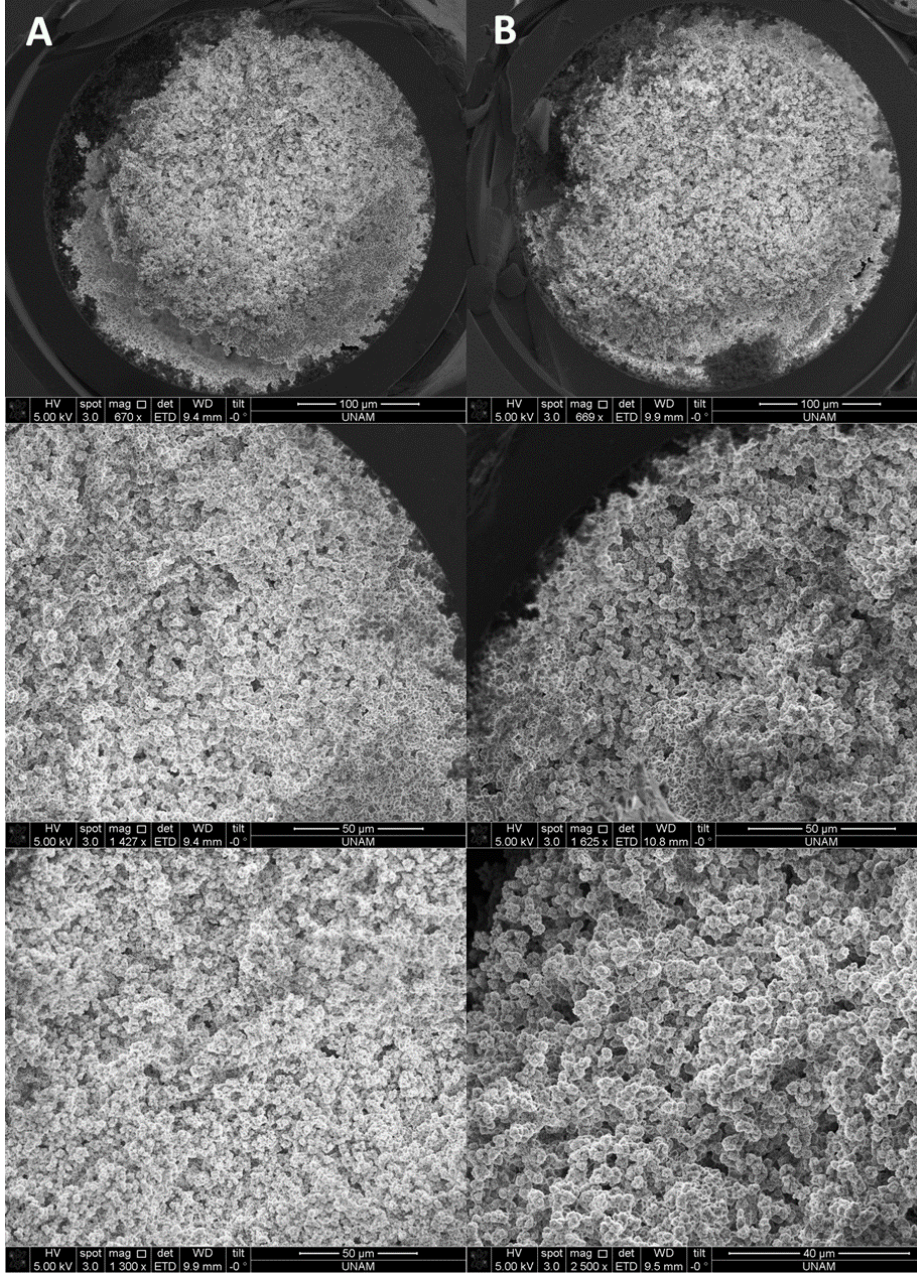
Oligomerik siloksan bazlı, kapiler formda affinite monolitinin tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezi ve elde edilen monolitlerin histidin işaretli protein izolasyonu için kullanılabilirliğinin belirlenmesi iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Termal polimerizasyon ile sentezlenen kapiler monolit yapısı karakterizasyonu için;
 - ❖ Mikro/nano sıvı kromatografisi sisteminde geri basınç deneyleri
 - ❖ Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile monolit yüzey morfolojisi incelemesi
 - ❖ Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile sentezlenen kapiler monolitinin yüzey alanı ve gözenek boyut dağılımı tayini
 - ❖ Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ile monolit yapısındaki atomik bileşimin saptanması
2. Sentezlenen kapiler monolit kolonda SDS-PAGE ile histidin işaretli protein olan GFP'nin adsorpsiyon, desorpsiyon ve izolasyon verimi tayini ile aşağıdaki etkiler incelenmiştir.
 - ❖ Ni^{2+} iyonunun protein izolasyonu üzerindeki etkisi
 - ❖ Akış hızı değişiminin etkisi
 - ❖ Başlangıç protein konsantrasyonu değişiminin etkisi
 - ❖ İmidazol konsantrasyonu değişiminin etkisi
 - ❖ Tekrarlı kullanım etkisi

4.1. Termal Polimerizasyon ile Kapiler Monolit Sentezi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Tiyol-metakrilat Yöntemi ile Sentezlenen MSA Bağlı poli(POSS-MA) Monolitlerin SEM, BET, Geri-Basınç ve EDX Sonuçları

İmmobilize metal affinite kromatografisinde sabit faz olarak kullanılacak kapiler monolitler, tek basamaklı bir tiyol-metakrilat üretim yöntemi ile basit bir şekilde sentezlenmiştir. Şekil 4.1'te verilen SEM görüntülerinde iç çapı 300 µm olan kapiler kolon içerisinde tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezlenen MSA bağlı poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonun ve Ni²⁺ iyonları immobilize edilmiş; Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) monolitinin monolitik yapısının homojen olduğu ve kolon çeperine tutunduğu görülmektedir. Kapiler yüzeyine tutunma başarılı bir silanlama işleminin sonucudur. Taramalı elektron mikroskop görüntüleri, monolit yüzeyinin gözenekli yapıda olduğunu göstermiştir. Mikro ve makro gözenek yapıcı ajanların (etilen glikol ve n-bütanol) kullanılması nedeniyle monolit dolgu materyali önemli bir yüzey alanına sahiptir.



Şekil 4.1. Tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezlenen (A) MSA-(POSS-MA) monoliti ve (B) Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) monolitinin SEM fotoğrafları

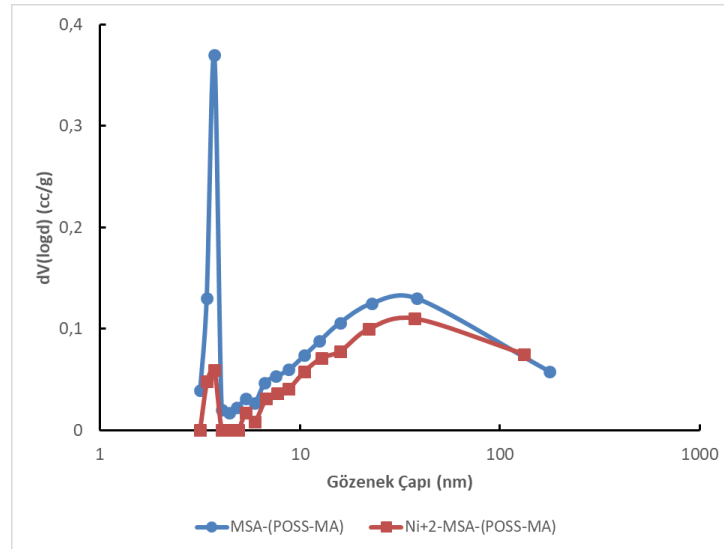
40 mg MSA kullanımıyla sentezlenen MSA40 kodlu MSA-(POSS-MA) monolitinin yüzey alanı Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi 143 m²/g, Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) monolitinin yüzey alanı ise 116 m²/g’dir. Ni²⁺ iyonları, MSA-(POSS-MA) monolit yapısına bağlandıkça, monolit özgül yüzey alanında azalma gözlenmiştir. Bu da Ni²⁺ iyonlarının MSA-(POSS-MA) yapısına immobilize olduğunu göstermektedir. MSA miktarı 75 mg değerinde tutularak sentezlenen MSA75-2 kodlu monolit için yüzey alanı 16.80 m²/g, MSA miktarı 50 mg olan

MSA50-2 kodlu monolit için ise 194 m²/g olarak bulunmuştur. Yüzey alanı monolitik kolon teknolojisinde iyi bir kromatografik ayırım eldesi için önem teşkil etmektedir. MSA50-2 deney kodlu kolonun yüzey alanının MSA40 kodlu kolondan yüksek olmasına rağmen, geri basınç değerinin düşük olması farklı akış hızlarında çalışıldığında kromatografik ayırımın verimini önemli ölçüde etkileyeceği için MSA miktarı 40 mg olan formülasyon ile tüm çalışmalar yürütülmüştür.

Çizelge 4.1. MSA bağlı POSS-MA monoliti ile Ni²⁺ iyonları immobilize edilmiş MSA bağlı POSS-MA monolitin BET sonuçları

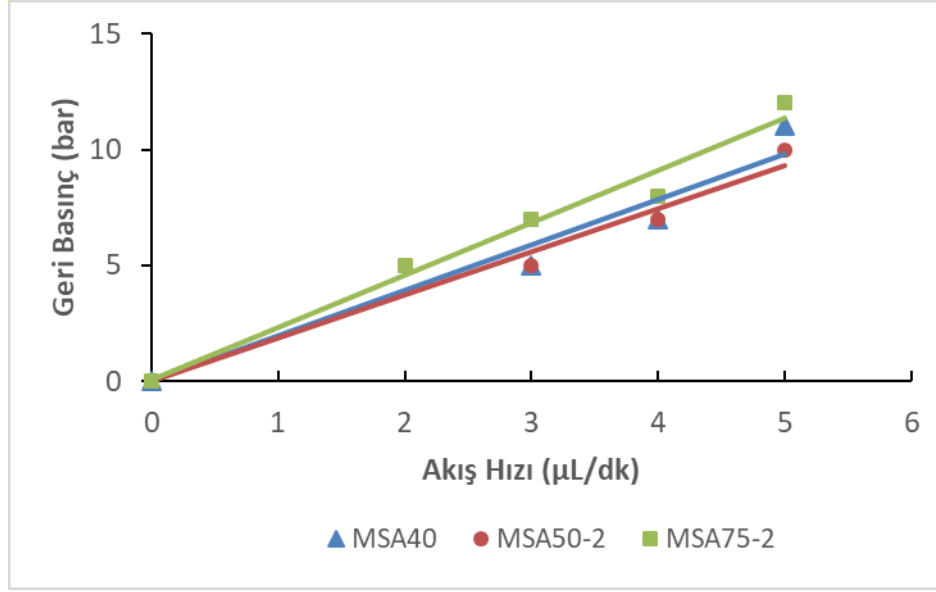
Monolit	SSA (m ² /g)
MSA-(POSS-MA)	143
Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA)	116

Şekil 4.2’de de görüldüğü üzere elde edilen yüzey alanı değerleri ile gözenek dağılım eğrileri uyumludur. Gözenek dağılım eğrisi sentezlenen monolitteki makro- ve mezo-gözenek yapılarının varlığını göstermektedir. Uygun görülen monolitler, mikro/nano sıvı kromatografisi sistemine bağlanarak geri basınç ve akış hızı davranışları incelenmiştir. Farklı akış hızlarına karşılık geri basınç değerleri grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.2. MSA-(POSS-MA) ve Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) monolitlerinin BET analizleri sonucu elde edilen gözenek boy dağılım grafiği (MSA: 40 mg, n-ButOH: 889 µL, EG:361 µL)

Ligand miktarı ve mikro/makro gözenek yapıcı ajanların oranlarının değiştirilmesi sonucunda sentezlenen monolitlerin akış davranışlarının incelenmesi sonucunda; azalan gözenek boyutu ile özgül yüzey alanının artması sonucunda Şekil 4.3'te de görüldüğü üzere geri basınç değerlerinin artması beklenen bir durumdur. Bu durum yüksek verimde kromatografik ayırımın yapılabileceğini gösterir.



Şekil 4.3. Farklı miktarlarda hidrofilik ligand ve farklı oranlarda mikro/makro gözenek yapıcı ajan içeren termal polimerizasyon ile sentezlenen MSA bağli poli(POSS-MSA) kapiler monolit kolonlarının geri basınç değerleri (polimerizasyon sıcaklığı: 60°C, polimerizasyon süresi: 24 saat)

EDX analizi ile MSA-(POSS-MA) ve Ni²⁺ iyonu immobilize edilmiş MSA-(POSS-MA) monolitik yapısındaki monomer ve ligandın yüzde atom içeriği saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Monolitik yapı içerisindeki POSS-MA için silisyum (Si) tayini, MSA için kükürt tayini yapılmıştır. Monolitik yapıdaki immobilize edilmiş Ni²⁺ iyonları için ise nikel tayini yapılmıştır. POSS-MA ve MSA'nın moleküler yapıları incelendiğinde EDX sonuçlarının monolitik yapı bileşenleriyle örtüştüğü görülmektedir. Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) monolitinde ise nikelin monolitik yapıya bağlandığı saptanmıştır.

Çizelge 4.2. MSA bağlı POSS-MA monoliti ile Ni²⁺ iyonları immobilize edilmiş MSA bağlı POSS-MA monolitin EDX sonuçları

Monolit	% Atom İçeriği				
	C	O	Si	S	Ni
MSA-(POSS-MA)	54.31	34.98	9.83	0.88	-
Ni ²⁺ -MSA-(POSS-MA)	36.66	38.25	13.11	0.44	11.55

4.2. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi ile Histidin İşaretli Protein İzolasyonu Sonuçları

4.2.1. İmidazol Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

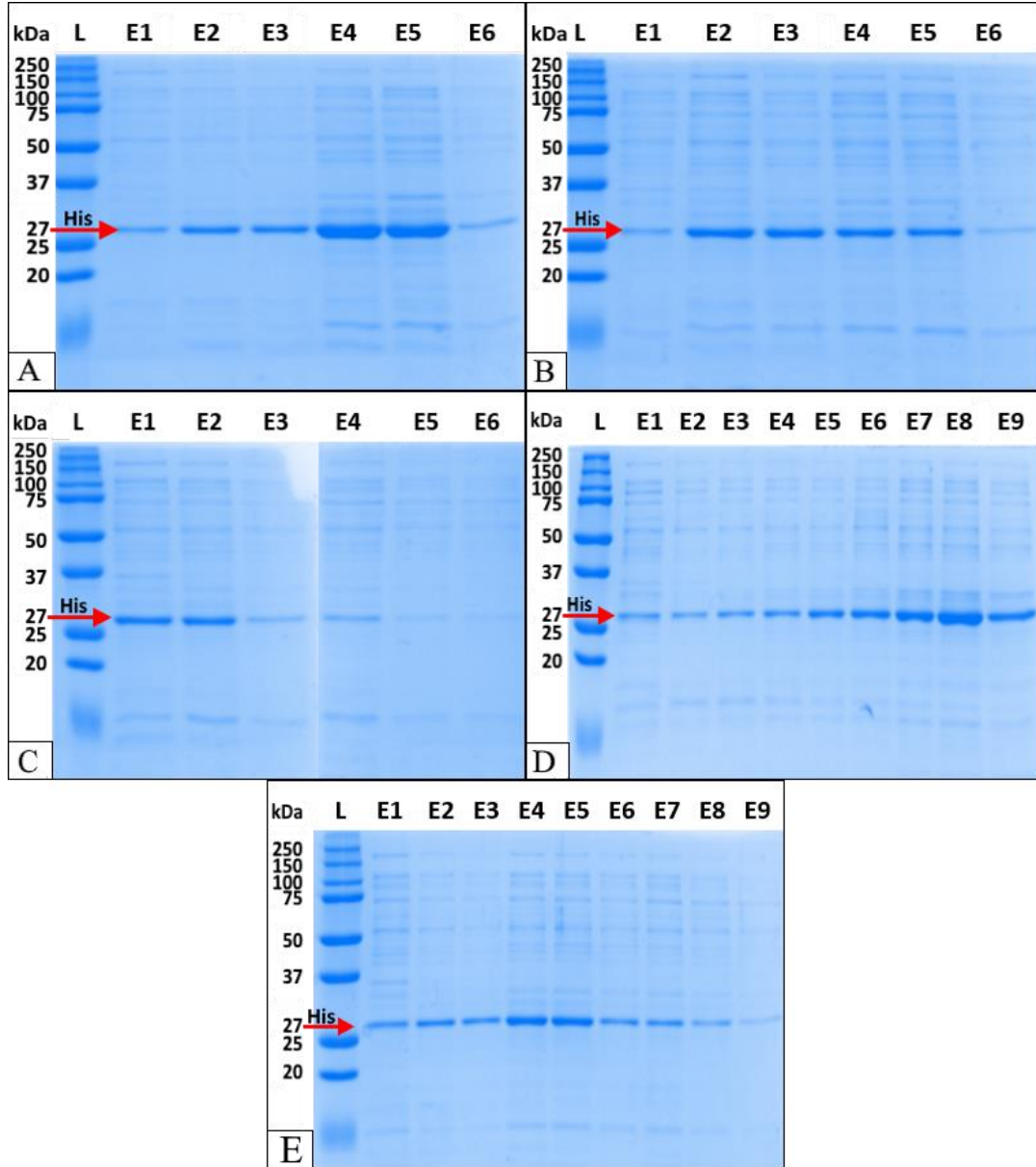
Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonda 4 µL/dk akış hızında, 3.5 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonunda farklı desorpsiyon koşullarında çalışılmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak *E. coli* lizatından saflaştırılmış His-işaretli proteininin SDS-PAGE analizi

Deney Numarası	İmidazol Konsantrasyonu	Desorpsiyon (µg)	% Desorpsiyon verimi	% İzolasyon verimi	% Saflık	Kuyu No
1	10 mM + 100 mM	20.58	83.86	45.16	92	3
2	25 mM + 100 mM	14.67	59.75	32.18	80	3
3	50 mM + 100 mM	7.59	30.92	16.65	76	2
4	10 mM + 25 mM + 100 mM	18.74	76.34	41.11	85	5
5	10 mM + 50 mM + 100 mM	10.61	43.24	23.29	85	2
Toplam Adsorplanan (µg)		25.55				
Toplam Yüklenen GFP (µg)		45.58				

E. coli lizatından saflaştırılmış His-işaretli proteinin, farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak SDS-PAGE analiz sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir. SDS-PAGE görüntüleri incelendiğinde elüsyon bantlarındaki hedef proteinin saflığı, imidazol konsantrasyonunun azalması ile artmıştır. Çizelge 4.3'te elüsyon kuyularından elde edilen GFP bantlarının saflıkları incelendiğinde, en yüksek saflıkta olan deney kodları 1, 4 ve 5'tir. Öncelikli olarak bu kısıtlamanın yapılmasının nedeni, asıl önemli olanın bir protein karışımı olan lizattan His-

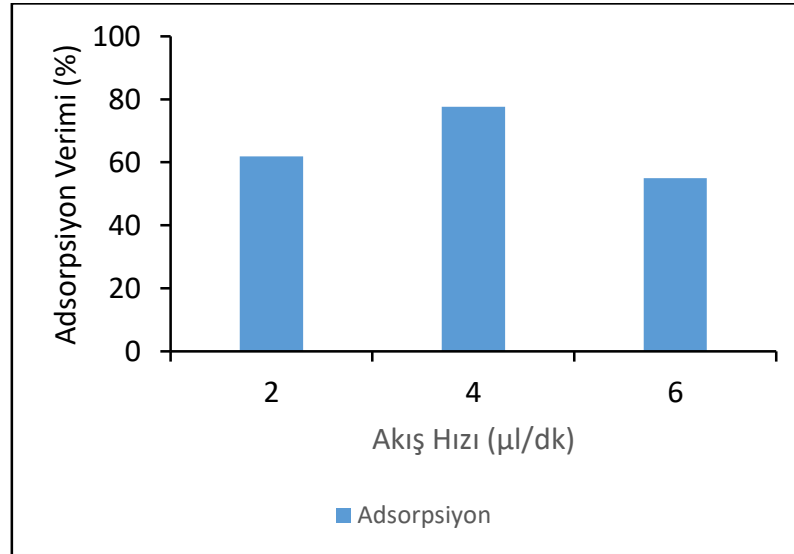
işaretili protein olan GFP'nin saf olarak izole edilmesidir. Bu deney kodlarına sahip parametreler incelendiğinde en yüksek desorpsiyon verimi, izolasyon verimi ve desorplanan GFP miktarı kodları 1 ve 4 olan deneylere aittir. Sonuç olarak 10 mM + 100 mM imidazol ya da 10 mM + 25 mM + 100 mM imidazol ile yapılan kademeli desorpsiyon işlemi GFP'yi seçici olarak ayırmada başarılı olmuştur. Böylece GFP'nin kolonda izolasyonu imidazol ile sağlanmıştır [73, 83].



Şekil 4.4. Farklı imidazol konsantrasyonları kullanılarak *E. coli* lizatından saflaştırılmış His-işaretili proteinin SDS-PAGE analizi: (A) 10 mM + 100 mM imidazol, (B) 25 mM + 100 mM imidazol, (C) 50 mM + 100 mM imidazol, (D) 10 mM + 25 mM + 100 mM imidazol, (E) 10 mM + 50 mM + 100 mM imidazol.

4.2.2. Akış Hızı Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

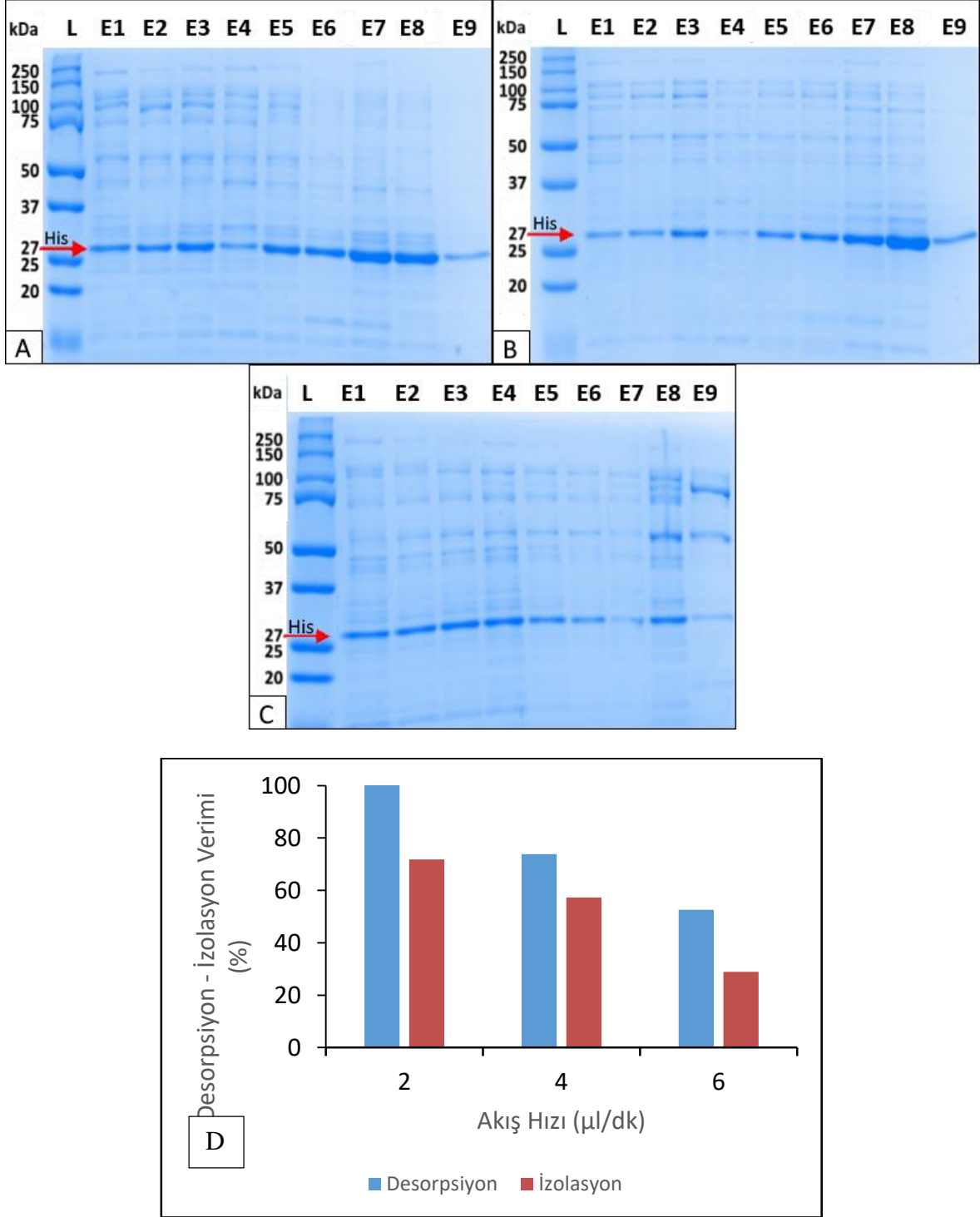
Monolitik kapiler sistemde aynı protein konsantrasyonuna (2.1 mg/mL) sahip lizat ile akış hızı taraması yapılarak akış hızının (2, 4 ve 6 $\mu\text{L}/\text{dk}$) protein izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Akış hızının artması ile birlikte adsorplanan GFP miktarı Şekil 4.5'te de görüldüğü üzere önemli ölçüde azalmaktadır. Akış hızı 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$ iken adsorpsiyon verimi %61.9, akış hızı 4 $\mu\text{L}/\text{dk}$ iken adsorpsiyon verimi %77.6, akış hızı 6 $\mu\text{L}/\text{dk}$ iken adsorpsiyon verimi %54.9'tir. Kolon içerisindeki Ni^{2+} iyonlarının, protein yüzeyinde bulunan His-işaretli amino asitlerin imidazol halkaları üzerindeki azot ile etkileşimi sonucu kolon doygunluğu akış hızı azaldıkça maksimuma ulaşır. Akış hızı azaldıkça IMAC sorbenti ile GFP'nin etkileşim süresi artar ve GFP'nin sorbent yüzeyine tutunma olasılığı artar. Ancak 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında çalışılması, kolonun doygunluğa ulaşma süresini çok uzamasına neden olmaktadır; bu nedenle ilgili akış hızında kolonun doygunluğa ulaşmadığının beklenmediği de not edilmelidir. Akış hızının artışı ile beklenildiği gibi kolondaki adsorpsiyon verimi düşmektedir.



Şekil 4.5. Sentezlenen standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, Adsorpsiyon süresi sırasıyla: 54 dk, 27dk, 18dk).

Akış hızı arttıkça desorpsiyon ve izolasyon veriminin düştüğü Şekil 4.6'te görülmektedir. Akış hızı 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$ iken desorpsiyon verimi %100, izolasyon verimi %71.8, akış hızı 4 $\mu\text{L}/\text{dk}$

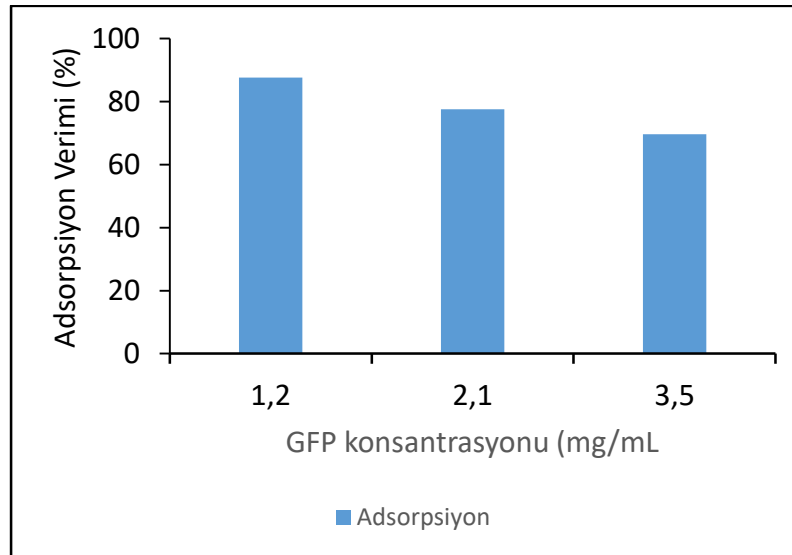
iken desorpsiyon verimi %73.8, izolasyon verimi %57.3, akış hızı 6 µL/dk iken desorpsiyon verimi %52.5, izolasyon verimi %28.9'dir. Akış hızı arttıkça desorpsiyon ve izolasyon veriminin düşmesi beklenen bir durumdur. Akış hızı düştükçe etkileşim süresi arttığı için Ni²⁺ iyonlarına bağlı olan His-işaretleli protein GFP, yarışmacı ajan olan imidazol ile yer değiştirerek kolonu terk eder. Böylece GFP'nin izolasyonu sağlanır.



Şekil 4.6. Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda desorpsiyon ve izolasyon kapasitesine akış hızının etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) akış hızı: 2 µL/dk (B) akış hızı: 4 µL/dk (C) akış hızı: 6 µL/dk SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği

4.2.3. Başlangıç Protein Konsantrasyonu Değişiminin Protein İzolasyonuna Etkisi

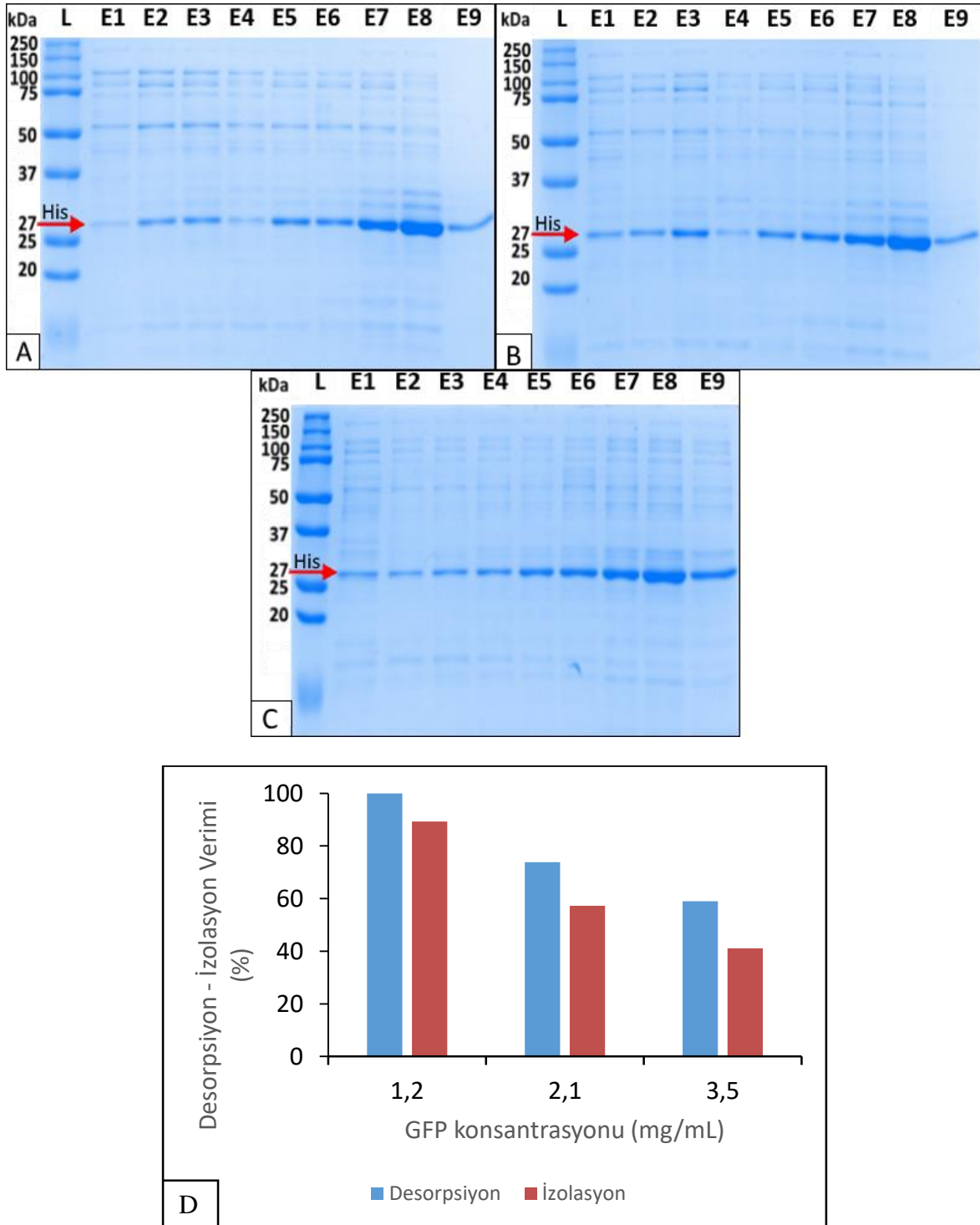
Monolitik kapiler sistemde başlangıç protein konsantrasyonu değişiminin (0.4 µL/dk akış hızında, 1.2, 2.1 ve 3.5 mg/mL) GFP adsorpsiyon ve izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Şekil 4.7’te başlangıç protein konsantrasyonu arttıkça kolonda adsorpsiyon veriminin hafifçe düştüğü görülmektedir. Protein konsantrasyonu sırasıyla 1.2, 2.1 ve 3.5 mg/mL iken adsorpsiyon verimleri sırasıyla %87.6, %77.6 ve %69.6’dır. Başlangıç protein konsantrasyonu arttıkça lizatın viskozitesi de artmaktadır, bu da kolon içerisinde kütle transferini zorlaştırmakta ve kolonun doygunluğa ulaşmasını zorlaştırmaktadır. Düşük protein konsantrasyonunda ise çözelti viskozitesi düştüğü için kolon içerisinde sorbent-protein etkileşiminin daha güçlü olmakta ve böylece kolonda yüksek adsorpsiyon verimi elde edilmektedir.



Şekil 4.7. Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda başlangıç protein konsantrasyonunun protein adsorpsiyonuna etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl). (Akış hızı: 4 µL/dk, Adsorpsiyon süresi: 30 dk)

Başlangıç protein konsantrasyonunun GFP desorpsiyon ve izolasyonuna etkisi Şekil 4.8’te verilmektedir. Kademeli desorpsiyon tekniği ile kolon içerisinde zayıf etkileşimlerle tutunan safsızlıklar kolondan uzaklaştırılmıştır. Böylece SDS-PAGE ile GFP bandı daha saf edilebilmiştir. Başlangıç protein konsantrasyonu 1.2 mg/mL iken desorpsiyon verimi %100, izolasyon verimi ise %89.3’tür. Başlangıç protein konsantrasyonu 2.1 mg/mL iken

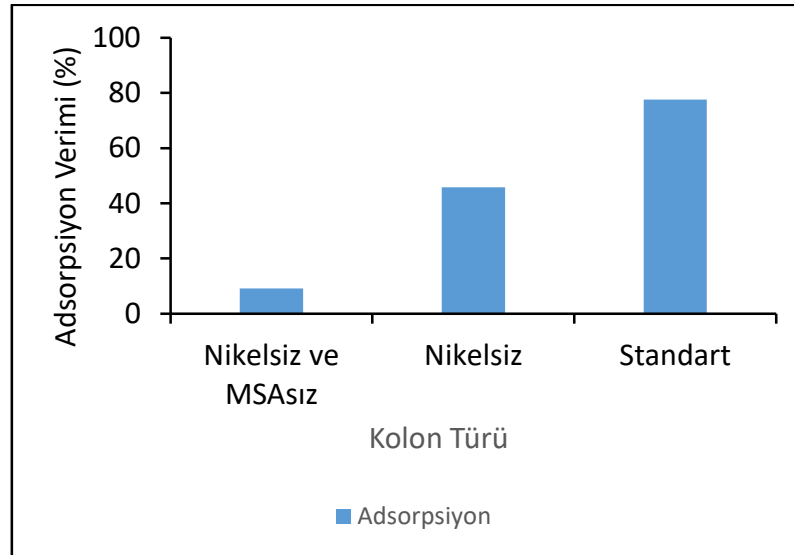
desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3'tür. Başlangıç protein konsantrasyonu 3.5 mg/mL iken desorpsiyon verimi %59, izolasyon verimi ise %41.1'tür. Başlangıç protein konsantrasyonu arttıkça, kolonda adsorpsiyon veriminin düşmesiyle birlikte GFP desorpsiyon ve izolasyon veriminin de düşmesi de beklenen bir durumdur. Adsorpsiyon düşüşüne temel etken olan viskozite artışı desorpsiyon ve izolasyon verimini de aynı şekilde etkilemiştir.



Şekil 4.8. Sentezlenen standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kapiler kolonda başlangıç protein konsantrasyonunun protein desorpsiyonuna ve izolasyonuna etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) protein konsantrasyonu: 1.2 mg/mL (B) protein konsantrasyonu: 2.1 mg/mL (C) protein konsantrasyonu: 3.5 mg/mL SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği.

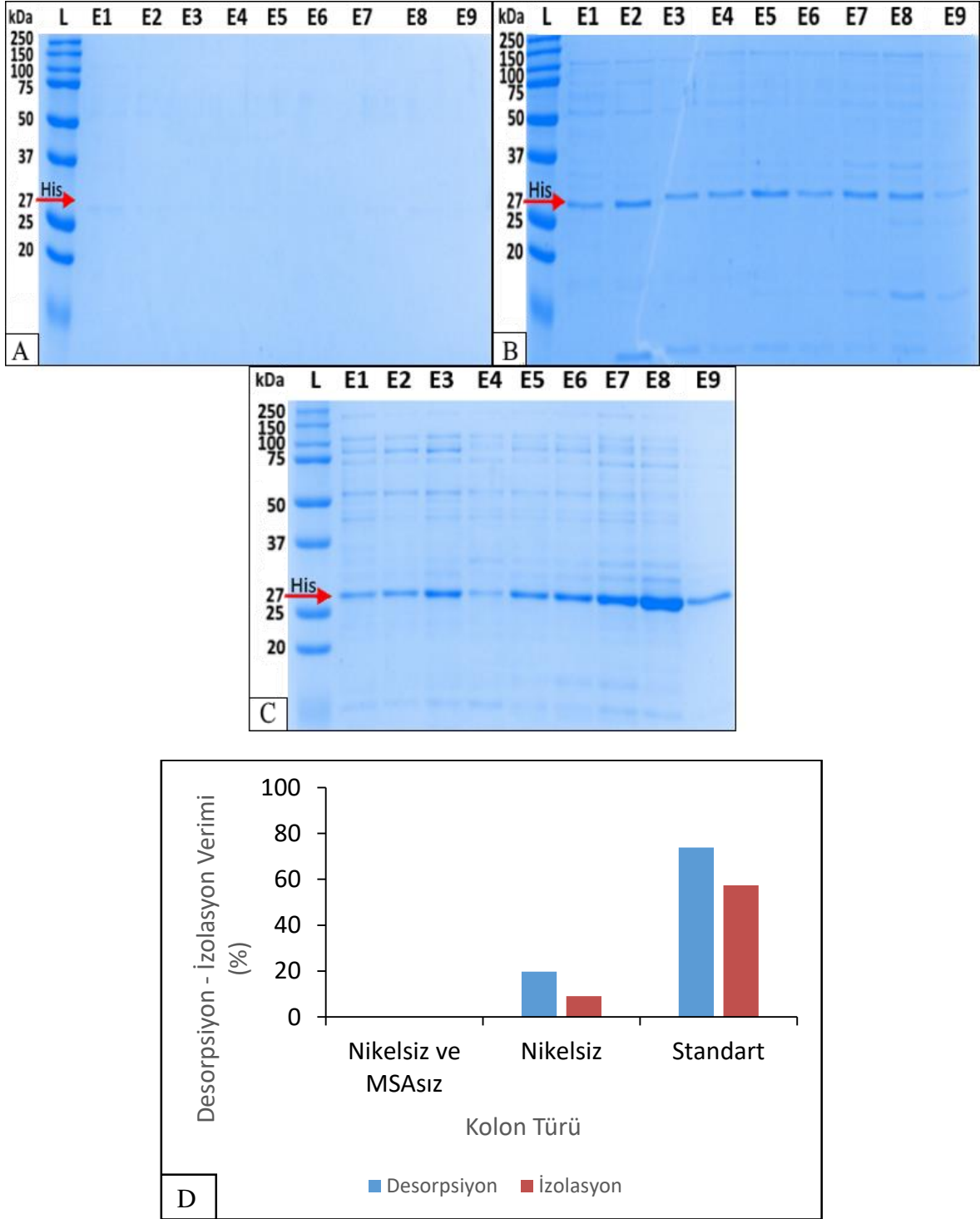
4.2.4. Ni²⁺ İyonunun Protein İzolasyonu Üzerindeki Fonksiyonu

Ni²⁺ iyonu ve MSA'nın protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek amacıyla standart kolon ile yapılan deney, aynı akış hızında, aynı başlangıç protein konsantrasyonu derişimi ve aynı desorpsiyon tampon çözeltisi derişimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ni²⁺ iyonu ve MSA içermeyen kolon, Ni²⁺ iyonu içermeyen kolon ve standart analitik Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kolonlar sentezlenerek Ni²⁺ iyonu ve MSA'nın adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Bu etki Şekil 4.9'de gösterilmektedir. Adsorpsiyon verimi, Ni²⁺ iyonu ve MSA içermeyen kolon için %9, Ni²⁺ iyonu içermeyen kolon için %45.8 ve standart analitik Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kolon için ise %77.6'dır. His-işaretli protein olan GFP, immobilize edilmiş Ni²⁺ iyonu ile seçici etkileşime girerek nikel iyonları üzerinden sorbente adsorbe olmaktadır. Ni²⁺ iyonu ve MSA içermeyen kolonda fonksiyonel gruba sahip bir ligand olmadığı için kolon içerisinde sadece yüksek çapraz bağ oranına sahip bir hidrofobik monolitin varlığı söz konusudur. Ni²⁺ iyonu içermeyen kolonda adsorpsiyonun gerçekleşmesinin nedeni, MSA ile bakteri lizati içerisindeki proteinlerin spesifik olmayan etkileşimin sonucudur. Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kolonunda Ni²⁺ iyonunun His-işaretli protein olan GFP'ye seçici bir şekilde bağlandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.9. Ni²⁺ iyonu ve MSA'nın adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (Adsorpsiyon ortamı: 20 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl). (Akış hızı: 4 µL/dk, Adsorpsiyon süresi: 30 dk)

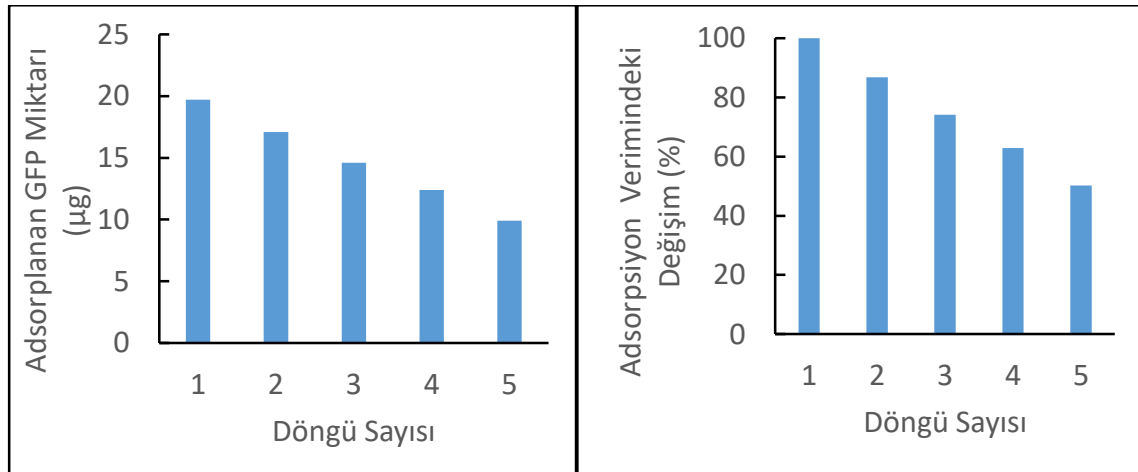
Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolon Şekil 4.10'dan da görüldüğü üzere herhangi bir desorpsiyon sonucu vermemiştir; bu nedenle izolasyon sonucu da hesaplanamamıştır. Adsorpsiyon kapasitesi sonucu %9 iken desorpsiyon verisi olmaması, desorpsiyon tampon çözeltisi olarak imidazolun tercih edilmesi ile açıklanabilir. Kolon içerisinden imidazol geçirildiğinde histidin işaretli protein olan GFP'nin Ni^{2+} iyonuna afinitesi azalır ve imidazol yarışmacı ajan gibi davranır, GFP ile yer değiştirerek Ni^{2+} iyonlarına bağlanır. Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolonda herhangi bir his-ışaretili protein sorbente adsorbe olmadığı için desorpsiyon verisi ve buna bağlı olarak da izolasyon verisi bulunmamaktadır. Ni^{2+} iyonu içermeyen kolonun desorpsiyon verimi %19.8, izolasyon verimi ise %9'dur. Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolon için yapılan yorum Ni^{2+} iyonu içermeyen kolon için de yapılabilir; burada da kolon içerisinde herhangi bir seçici kromatografik ayırımın yapılmadığı SDS-PAGE analizlerinden de anlaşıldığı üzere söylenebilir. Sentezlenen standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonunda desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3'tür. Yapılan çalışma ile SDS-PAGE analizi sonucunda da görüldüğü üzere Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonunda GFP bandı saf bir şekilde elde edilmiştir. Bu da Ni^{2+} iyonunun His-ışaretili protein olan GFP'ye seçici bir etkileşim ile tersinir bir şekilde bağlanmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Ni^{2+} iyonu ve MSA'nın desorpsiyon ve izolasyon kapasitesi üzerindeki etkisi (Desorpsiyon ortamı: 50 mM PB pH: 7, 0.5 M NaCl, I.Kademe Desorpsiyon Tampon: 10 mM imidazol, II.Kademe Desorpsiyon Tampon: 25 mM imidazol, III.Kademe Desorpsiyon Tampon: 100 mM imidazol) (A) Nikel ve MSA içermeyen kolon (B) Nikel içermeyen kolon (C) Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) standart kolon SDS-PAGE analiz sonuçları (D) desorpsiyon/izolasyon yüzde verim grafiği

4.2.5. Histidin İşaretli Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Monolitik Kolonda Tekrarlanabilirlik Çalışması

Yapılan adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları sonucunda standart kolon Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) ve başlangıç protein konsantrasyonu 1.44 mg/mL olan lizat ile tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Kolonun tekrarlanabilirlik döngü sonucu 5 adsorpsiyon ve 5 desorpsiyon deneyi yapılarak belirlenmiştir. Şekil 4.11'den de görüldüğü üzere, standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolununun ilk kullanımından sonra elde edilen denge adsorpsiyon GFP miktarı 19.7 μg iken ikinci kullanımdan sonra 17.1 μg , beşinci kullanımından sonra ise adsorplanan GFP miktarı 9.9 μg 'dır. Bu durum 5 döngü sonunda His-işaretli GFP adsorpsiyonunda %49.8'lik bir azalma demektir. Adsorpsiyon kapasitesindeki bu azalma, immobilize metal iyonları ile kuvvetli etkileşim yapan proteinler için güçlü şelat bileşiği olan EDTA'nın metal iyonları ile ligand üzerindeki bağlantıya zarar vermesi ile açıklanabilir. EDTA'nın kolon içerisinden geçirilmesi sonucunda kolonun immobilize metal afinite kromatografisinde tekrar kullanılabilmesi için monolit yapısının tekrardan Ni^{2+} iyonlarına doyurulması gerekmektedir. Deneyin aynı koşullarda yapılabilmesi için tüm tekrarlanabilirlik çalışması aynı gün içerisinde yapılmıştır ve kolondan her döngü sonrasında sadece 1.5 saat NiCl_2 çözeltisinden geçirilmiştir. Kolonun her döngüden sonra Ni^{2+} iyonları ile aynı oranda doyurulmaması sonucu %49.8'lik bir azalma ile tekrarlanabilirlik çalışması sonuçlandırmıştır.



Şekil 4.11. İlk kullanımda elde edilen denge adsorpsiyonuna (g sorbent başına mg GFP) göre verilen Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonu için denge GFP adsorpsiyonunun değişimi (Desorpsiyon ortamı: 500 mM imidazol içeren 50 mM PB pH 7 ve 50 mM EDTA çözeltisi pH 4.53) (A) Adsorplanan GFP miktarı döngü grafiği (B) Adsorplanan verimindeki değişim yüzdesi.

5. YORUM

Yapılan tez çalışmasında,

- Tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile tek basamakta MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolon sentezlenmiştir. Farklı ligand miktarı ve mikro-makro gözenek yapıcı ajan miktarı kullanılarak farklı sorbentler sentezlenmiştir. Uygun yüzey alanına ve geri basınç değerine sahip monolitik yapı seçilerek daha sonrasında his-işaretli protein olan GFP'nin seçici ayrımı için monolitik yapıya Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiştir. Böylelikle monolitik yapıya özgünlük kazandırılmıştır.
- Sentezlenen MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonun SEM analizi ile yüzey morfolojisi, BET analizi ile özgül yüzey alanı ve gözenek boy dağılımı analizi, EDX analizi ile monolit yapısındaki atomik bileşimin % dağılımı yapılmıştır. SEM görüntüleri monolit yüzeyinin gözenekli yapıda olduğunu, monolitik yapının kapiler kolon iç çeperine tutunduğunu ve yapının kendi içerisinde homojen dağılım gösterdiğini ispatlamaktadır. BET analizi sonucunda MSA-(POSS-MA) monolitik yapının özgül yüzey alanının $143 \text{ m}^2/\text{g}$, Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) monolitik yapısının ise $116 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dir. Mikro ve makro gözenek yapıcı ajanların (n-bütanol ve etilen glikol) kullanılması nedeniyle monolit dolgu materyali oldukça büyük bir yüzey alanına sahiptir.
- Ni^{2+} iyonu immobilize edilmiş MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonun, histidin işaretli protein olan GFP'nin *E. coli* bakteri lizatından seçici bir şekilde ayrımını sağlayabilmesi için farklı deney prosedürleri uygulanmıştır.
- Ni^{2+} iyonunun protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek için hem nikel içermeyen hem de nikel ve MSA içermeyen kolonlar sentezlenmiştir. Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolonun adsorpsiyon kapasitesi %9, Ni^{2+} iyonu içermeyen kolonun %45.8 ve standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonun ise %77.6'dır. Ni^{2+} iyonu ve MSA içermeyen kolonda herhangi bir His-işaretli protein sorbente adsorbe olmadığı için desorpsiyon verisi ve buna bağlı olarak da izolasyon verisi bulunmamaktadır. Ni^{2+} iyonu içermeyen kolonun desorpsiyon verimi %19.8, izolasyon verimi ise %9'dur. Sentezlenen standart Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonunda desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3'tür. SDS-PAGE görüntüleri de Ni^{2+} -MSA-(POSS-MA) kolonunda GFP bandının saf bir şekilde lizattan ayrıldığını göstermektedir.

- Akış hızı değişiminin protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek için aynı protein konsantrasyonuna (2.1 mg/mL) sahip lizat 2 µL/dk, 4 µL/dk ve 6 µL/dk akış hızında kolon içerisinden geçirilmiştir. Akış hızı 2 µL/dk iken adsorpsiyon verimi %61.9, akış hızı 4 µL/dk iken adsorpsiyon verimi %77.6, akış hızı 6 µL/dk iken adsorpsiyon verimi %54.9'tir. Akış hızı 2 µL/dk iken desorpsiyon verimi %100, izolasyon verimi %71.8, akış hızı 4 µL/dk iken desorpsiyon verimi %73.8, izolasyon verimi %57.3, akış hızı 6 µL/dk iken desorpsiyon verimi %52.5, izolasyon verimi %28.9'dir. Akış hızı arttıkça kolon içerisindeki etkileşim süresini azaldığı için desorpsiyon ve izolasyon veriminin düşmesi beklenen bir durumdur.
- Başlangıç protein konsantrasyonu değişiminin protein izolasyonuna etkisini belirleyebilmek için sentezlenen standart monolitik kapiler kolonlarda 4 µL/dk akış hızında, 1.2 mg/mL, 2.1 mg/mL ve 3.5 mg/mL protein konsantrasyonu içeren lizat ile çalışılmıştır. Başlangıç protein konsantrasyonu 1.2 mg/mL iken adsorpsiyon verimi %87.6, desorpsiyon verimi %100, izolasyon verimi ise %89.3'tür. Başlangıç protein konsantrasyonu 2.1 mg/mL iken adsorpsiyon verimi %77.6, desorpsiyon verimi %73.9, izolasyon verimi ise %57.3'tür. Başlangıç protein konsantrasyonu 3.5 mg/mL iken adsorpsiyon verimi %69.6, desorpsiyon verimi %59, izolasyon verimi ise %41.1'tür.
- Sentezlenen standart Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonda 4 µL/dk akış hızında, 3.5 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonunda farklı desorpsiyon koşullarında çalışılmıştır. SDS-PAGE görüntüleri incelendiğinde, elüsyon bantlarındaki hedef proteinin saflığı, imidazol konsantrasyonunun azalması ile artmıştır. Sonuç olarak 10 mM + 25 mM + 100 mM imidazol ile yapılan kademeli desorpsiyon işlemi GFP'yi seçici olarak ayırmada daha başarılı olmuştur.
- Histidin-işaretli protein olan GFP'nin saflaştırılmasında kullanılan Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kapiler monolitik kolonda tekrarlanabilirlik çalışması, başlangıç protein konsantrasyonu 1.44 mg/mL olan lizat ile 4 µL/dk akış hızında 5 adsorpsiyon ve 5 desorpsiyon deneyi yapılmıştır. Ni²⁺-MSA-(POSS-MA) kolununun ilk kullanımından sonra elde edilen denge adsorpsiyon GFP miktarı 19.7 µg iken ikinci kullanımından sonra 17.1 µg, beşinci kullanımından sonra ise adsorplanan GFP miktarı 9.9 µg'dır. 5 döngü sonunda denge His-işaretli GFP adsorpsiyonunda %49.8'lik bir azalma görülmüştür.

Geliştirilen sorbent ile;

- Katı destek materyali (baz malzeme, MSA-(POSS-MA) monoliti), çeşitli sorbentlerin ve durağan fazların sentezi için farklı afinite kromatografisi modlarında başlangıç materyali olarak kullanılabilir.
- Sorbentin yüzey alanı büyüklüğü, gözeneklilik özelliği özellikle mikroakışkan sistemlerde sürekli afinite kromatografisi uygulamaları için de uygundur.
- Hem geleneksel hem de mikro-sıvı kromatografi uygulamalarında, diğer His-etiketli proteinlerin çeşitli biyolojik kaynaklardan saflaştırılmasına da uygulanabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M.J.M.Ü.Y. Tuncer, Protein Saflaştırma 1: Kromatografik Teknikler, 268 (2008).
- [2] G.S.J.J.B.B.M. Chaga, Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future, 49 (2001) 313-334.
- [3] C.F. Poole, M. Cooke, I.D. Wilson, Encyclopedia of Separation science, (2000).
- [4] Ü.İ. Konak, İ. Turhan, M.J.A.F.J.A.G. Certel, Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması, 12 (2014) 79-87.
- [5] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G.J.N. Belfrage, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, 258 (1975) 598.
- [6] D. Mould, R.J.A. Syngé, Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules, 77 (1952) 964-969.
- [7] M. Kubin, P. Špaček, R.J.C.o.C.C.C. Chromeček, Gel permeation chromatography on porous poly (ethylene glycol methacrylate), 32 (1967) 3881-3887.
- [8] W.D. Ross, R.T.J.J.o.C.S. Jefferson, In Situ—Formed Open-Pore Polyurethane as Chromatography Supports, 8 (1970) 386-389.
- [9] F.D. Hileman, R.E. Sievers, G.G. Hess, W.D.J.A.C. Ross, In situ preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns, 45 (1973) 1126-1130.
- [10] H. Schnecko, O.J.C. Bieber, Foam filled columns in gas chromatography, 4 (1971) 109-112.
- [11] S. Hjerten, J.-L. Liao, R.J.J.o.C.A. Zhang, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, 473 (1989) 273-275.
- [12] S. Hjertén, J. Mohammad, K.i.J.J.o.C.A. Nakazato, Improvement in flow properties and pH stability of compressed, continuous polymer beds for high-performance liquid chromatography, 646 (1993) 121-128.
- [13] T. Tennikova, F. Svec, B.J.J.o.l.c. Belenkii, High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation, 13 (1990) 63-70.
- [14] F. Svec, J.M.J.A.C. Fréchet, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, 64 (1992) 820-822.
- [15] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N.J.A.c. Tanaka, Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography, 68 (1996) 3498-3501.
- [16] S.M.J.A.c. Fields, Silica xerogel as a continuous column support for high-performance liquid chromatography, 68 (1996) 2709-2712.
- [17] O. Núñez, K. Nakanishi, N.J.J.o.C.A. Tanaka, Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography, 1191 (2008) 231-252.
- [18] R. Bakry, C.W. Huck, G.K.J.J.o.c.s. Bonn, Recent applications of organic monoliths in capillary liquid chromatographic separation of biomolecules, 47 (2009) 418-431.
- [19] R.D. Arrua, M. Talebi, T.J. Causon, E.F.J.A.c.a. Hilder, Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules, 738 (2012) 1-12.
- [20] F. Svec, J.M.J.S. Fréchet, New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis, 273 (1996) 205-211.
- [21] F. Svec, Y.J.A.c. Lv, Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography, 87 (2014) 250-273.
- [22] F.A. Zulkurnain, Effect of Temperature on Kinetics of Bulk Polymerization of Methyl Acrylate, UMP, 2014.
- [23] R.J. Young, P.A. Lovell, Introduction to polymers, CRC press 2011.
- [24] F. Svec, J.M.J.M. Fréchet, Temperature, a simple and efficient tool for the control of pore size distribution in macroporous polymers, 28 (1995) 7580-7582.

- [25] F.J.J.o.C.A. Svec, Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, 1217 (2010) 902-924.
- [26] C. Viklund, F. Svec, J.M. Fréchet, K.J.C.o.m. Irgum, Monolithic, “molded”, porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: control of porous properties during polymerization, 8 (1996) 744-750.
- [27] C. Viklund, E. Pontén, B. Glad, K. Irgum, P. Hörstedt, F.J.C.o.M. Svec, “Molded” macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) materials with fine controlled porous properties: preparation of monoliths using photoinitiated polymerization, 9 (1997) 463-471.
- [28] E.G. Vlakh, T.B.J.J.o.s.s. Tennikova, Preparation of methacrylate monoliths, 30 (2007) 2801-2813.
- [29] V. Bernabé-Zafón, A. Cantó-Mirapeix, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.M.J.E. Herrero-Martínez, Comparison of thermal and photo-polymerization of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC, 30 (2009) 1929-1936.
- [30] C. Legido-Quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W.J.E. Smith, Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science, 24 (2003) 917-944.
- [31] Y. Liang, L. Zhang, Y.J.A. Zhang, b. chemistry, Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography, 405 (2013) 2095-2106.
- [32] K. Nakanishi, N.J.J.o.n.-c.s. Soga, Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition, 139 (1992) 1-13.
- [33] T. Nema, E.C. Chan, P.C.J.J.o.p. Ho, b. analysis, Applications of monolithic materials for sample preparation, 87 (2014) 130-141.
- [34] S. Dziomba, M. Araya-Farias, C. Smadja, M. Taverna, B. Carbonnier, N.T.J.A.c.a. Tran, Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review, 955 (2017) 1-26.
- [35] P.K. Jal, S. Patel, B.K.J.T. Mishra, Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions, 62 (2004) 1005-1028.
- [36] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N.J.J.o.C.A. Tanaka, Designing monolithic double-pore silica for high-speed liquid chromatography, 797 (1998) 133-137.
- [37] F.J.J.o.s.s. Svec, Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC, 27 (2004) 1419-1430.
- [38] M.R. Buchmeiser, F. Sinner, M. Mupa, Tailor-made polymer supports via metathesis polymerization: concepts and applications, *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, 2001, pp. 25-34.
- [39] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J.A.C. Fréchet, Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device, 73 (2001) 5088-5096.
- [40] J.P. Quirino, M.T. Dulay, R.N.J.A.c. Zare, On-line preconcentration in capillary electrochromatography using a porous monolith together with solvent gradient and sample stacking, 73 (2001) 5557-5563.
- [41] M. Schulte, J.J.J.o.C.A. Dingenen, Monolithic silica sorbents for the separation of diastereomers by means of simulated moving bed chromatography, 923 (2001) 17-25.
- [42] Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, S.M. Ngola, T.J.J.F.j.o.a.c. Shepodd, Chip electrochromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons on an acrylate-based UV-initiated porous polymer monolith, 371 (2001) 174-181.

- [43] D. Josic, A. Buchacher, A.J.J.o.C.B.B.S. Jungbauer, Applications, Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion, 752 (2001) 191-205.
- [44] D.J. Throckmorton, T.J. Shepodd, A.K.J.A.C. Singh, Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths, 74 (2002) 784-789.
- [45] S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, C.J.J.o.C.A. Horváth, Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith, 887 (2000) 465-477.
- [46] F. Svec, J.M.J.B. Fréchet, bioengineering, "Molded" rods of macroporous polymer for preparative separations of biological products, 48 (1995) 476-480.
- [47] J.-L. Liao, N. Chen, C. Ericson, S.J.A.c. Hjertén, Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography, 68 (1996) 3468-3472.
- [48] A. Maruška, C. Ericson, Á. Végvári, S.J.J.o.C.A. Hjertén, (Normal-phase) capillary chromatography using acrylic polymer-based continuous beds, 837 (1999) 25-33.
- [49] A. Palm, M.V.J.A.C. Novotny, Macroporous polyacrylamide/poly (ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography, 69 (1997) 4499-4507.
- [50] M. Bedair, Z.J.J.o.C.A. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: II. Preparation of cationic stearyl-acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization, 1013 (2003) 35-45.
- [51] K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, Contemporary instrumental analysis, Prentice Hall 2000.
- [52] L. Urbas, B. Košir, M. Peterka, B. Pihlar, A. Štrancar, M.J.J.o.C.A. Barut, Reversed phase monolithic analytical columns for the determination of HA1 subunit of influenza virus haemagglutinin, 1218 (2011) 2432-2437.
- [53] T. Hong, X. Yang, Y. Xu, Y.J.A.c.a. Ji, Recent advances in the preparation and application of monolithic capillary columns in separation science, 931 (2016) 1-24.
- [54] C. Hartmann-Thompson, Applications of polyhedral oligomeric silsesquioxanes, Springer Science & Business Media 2011.
- [55] D.W.J.J.o.t.A.C.S. Scott, Thermal rearrangement of branched-chain methylpolysiloxanes I, 68 (1946) 356-358.
- [56] J. BOČEK, L. MATĚJKA, V.J.N. MENTLÍK, Novel nanocomposite materials for power engineering, (2010) 10-15.
- [57] M. Wu, R.a. Wu, R. Li, H. Qin, J. Dong, Z. Zhang, H.J.A.c. Zou, Polyhedral oligomeric silsesquioxane as a cross-linker for preparation of inorganic-organic hybrid monolithic columns, 82 (2010) 5447-5454.
- [58] X. Lin, N. Zheng, J. Wang, X. Wang, Y. Zheng, Z.J.A. Xie, Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS)-based multifunctional organic-silica hybrid monoliths, 138 (2013) 5555-5558.
- [59] G. Pan, Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS), Physical properties of polymers handbook, Springer 2007, pp. 577-584.
- [60] B.X. Fu, L. Yang, R.H. Somani, S.X. Zong, B.S. Hsiao, S. Phillips, R. Blanski, P.J.J.o.P.S.P.B.P.P. Ruth, Crystallization studies of isotactic polypropylene containing nanostructured polyhedral oligomeric silsesquioxane molecules under quiescent and shear conditions, 39 (2001) 2727-2739.
- [61] B.X. Fu, B. Hsiao, S. Pagola, P. Stephens, H. White, M. Rafailovich, J. Sokolov, P. Mather, H. Jeon, S.J.P. Phillips, Structural development during deformation of polyurethane containing polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) molecules, 42 (2001) 599-611.

- [62] D. Chattopadhyay, D.C.J.P.i.P.S. Webster, Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes, 34 (2009) 1068-1133.
- [63] J. Raghunath, G. Georgiou, D. Armitage, S.N. Nazhat, K.M. Sales, P.E. Butler, A.M.J.J.o.B.M.R.P.A.A.O.J.o.T.S.f.B. Seifalian, The Japanese Society for Biomaterials,, T.A.S.f. Biomaterials, t.K.S.f. Biomaterials, Degradation studies on biodegradable nanocomposite based on polycaprolactone/polycarbonate (80: 20%) polyhedral oligomeric silsesquioxane, 91 (2009) 834-844.
- [64] W. Wang, Y.-l. Guo, J.U.J.P. Otaigbe, The synthesis, characterization and biocompatibility of poly (ester urethane)/polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites, 50 (2009) 5749-5757.
- [65] A. Lee, J.D.J.M. Lichtenhan, Viscoelastic responses of polyhedral oligosilsesquioxane reinforced epoxy systems, 31 (1998) 4970-4974.
- [66] L. Matějka, A. Strachota, J. Pleštil, P. Whelan, M. Steinhart, M.J.M. Šlouf, Epoxy networks reinforced with polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS). Structure and morphology, 37 (2004) 9449-9456.
- [67] A. Strachota, I. Kroutilová, J. Kovářová, L.J.M. Matějka, Epoxy networks reinforced with polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS). Thermomechanical properties, 37 (2004) 9457-9464.
- [68] R.I. Gonzalez, S.H. Phillips, G.B.J.J.o.S. Hoflund, Rockets, In situ oxygen-atom erosion study of polyhedral oligomeric silsesquioxane-siloxane copolymer, 37 (2000) 463-467.
- [69] S.H. Phillips, T.S. Haddad, S.J.J.C.O.i.S.S. Tomczak, M. Science, Developments in nanoscience: polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS)-polymers, 8 (2004) 21-29.
- [70] G. Li, L. Wang, H. Ni, C.U.J.J.o.I. Pittman, O. Polymers, Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) polymers and copolymers: a review, 11 (2001) 123-154.
- [71] M. Wu, R.a. Wu, Z. Zhang, H.J.E. Zou, Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns, 32 (2011) 105-115.
- [72] J. Ou, Z. Zhang, H. Lin, J. Dong, M. Wu, H.J.E. Zou*, Preparation and application of hydrophobic hybrid monolithic columns containing polyhedral oligomeric silsesquioxanes for capillary electrochromatography, 33 (2012) 1660-1668.
- [73] K. Salimi, D.D. Usta, İ. Koçer, E. Çelik, A.J.R.A. Tuncel, Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres, 7 (2017) 8718-8726.
- [74] S.T. Loughran, D. Walls, Purification of poly-histidine-tagged proteins, Protein Chromatography, Springer 2011, pp. 311-335.
- [75] S. Li, K. Yang, B. Zhao, X. Li, L. Liu, Y. Chen, L. Zhang, Y.J.J.o.M.C.B. Zhang, Epitope imprinting enhanced IMAC (EI-IMAC) for highly selective purification of His-tagged protein, 4 (2016) 1960-1967.
- [76] C. Zhang, D. Fredericks, D. Longford, E. Campi, T. Sawford, M.T.J.B.j. Hearn, Changed loading conditions and lysate composition improve the purity of tagged recombinant proteins with tacn-based IMAC adsorbents, 10 (2015) 480-489.
- [77] Promega Global, Protein Purification and Analysis, <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/protein-purification-and-analysis/> (Erişim Tarihi: 07.06.2019).
- [78] N.T.J.B. Mrabet, One-step purification of *Actinoplanes missouriensis* D-xylose isomerase by high-performance immobilized copper-affinity chromatography: functional analysis of surface histidine residues by site-directed mutagenesis, 31 (1992) 2690-2702.
- [79] E.J.T.i.B. Sulkowski, Purification of proteins by IMAC, 3 (1985) 1-7.
- [80] V. Gaberc-Porekar, V.J.J.o.b. Menart, b. methods, Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, 49 (2001) 335-360.

- [81] B. Çelikkaya, Protein İzolasyonu için İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi Bazlı Kesikli Sistemlerin Geliştirilmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.
- [82] E. Ueda, P. Gout, L.J.J.o.c.A. Morganti, Current and prospective applications of metal ion–protein binding, 988 (**2003**) 1-23.
- [83] J.J.P.e. Porath, purification, Immobilized metal ion affinity chromatography, 3 (**1992**) 263-281.
- [84] Ç. Kip, C. Demir, A.J.J.o.C.A. Tuncel, One pot synthesis of carboxyl functionalized-polyhedral oligomeric siloxane based monolith via photoinitiated thiol-methacrylate polymerization for nano-hydrophilic interaction chromatography, 1502 (**2017**) 14-23.
- [85] Georgia Tech Chemistry & Biochemistry, SDS Page Gel Electrophoresis, https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/course_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html (Erişim Tarihi: **10.05.2019**).



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: Tiyoil-Metakrilat Polimerizasyonu ile Affinite Monolitlerinin Sentezi ve Histidin İşaretli Protein İzolasyonunda Kullanımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 88 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %5 'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Fatma ÇAMBAY
Öğrenci No: N16128718
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza
19.06.2019

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : FATMA ÇAMBAY
Doğum yeri : ELAZIĞ
Doğum tarihi : 12.11.1992
Medeni hali : Bekâr
Yazışma adresi : Şehit Osman Avcı Mh. 64 Sk. 1004 Blok Umut Apt. Kat:1/7
Telefon : 0506 768 30 93
Elektronik posta adresi : fatmacambay@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2015)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı (2019)
Doktora : -

İş Tecrübesi

05.2019-Günümüz : HENKEL
Uzun Dönem Stajyer Mühendis
11.2017-12.2018 : TURKTIPSAN A.Ş.
AR-GE Uzman Yardımcısı
05.2017-09.2017 : EKODENGE A.Ş.
Risk Değerlendirme Mühendisi

