



Protein adsorpsiyon çalışmaları için metal şelat grupları içeren pHEMA-GMA kolon dolgu malzemelerinin hazırlanması

Metal chelate for protein adsorption studies pHEMA-GMA column filling materials including groups preparation

Bahar Yılmaz Altınok^{1,*}, Mukaddes Keskinates², Mevlüt Bayrakçı³

^{1,3} Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 70200, Karaman, Türkiye

² Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kazım Karabekir Meslek Yüksekokulu, Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, 70100, Karaman, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, protein saflaştırılmasına yardımcı olacak yeni poly(HEMA-co-GMA) veya pHEMA-GMA destek katı yapıları hazırlandı. Hazırlanan pHEMA-GMA yapı malzemelerin yüzeyi IDA ve NTA gibi farklı fonksiyonel grupların bağlanması ile modifiye edildi. Modifiye edilen kriyojel yapılarından nikel (Ni II) metal iyonu geçirildi. Ni metali ile şelatlanan monolitik kriyojel yapısı SEM ve FT-IR ile karakterize edildi. Metal şelatlı kriyojel yapıların GFP floresan protein bağlama çalışmaları UV-vis ve floresan spektrofotometresi ile yapıldı. Bu kriyojellerin UV-vis ve floresan spektrofotometresi ile %45 ve %75 oranında protein bağladıkları tespit edildi. Ve bu sonuçlar SDS PAGE yöntemi ile görselleştirilerek desteklendi.

Anahtar kelimeler: p(HEMA-GMA), SDS page, Nikel, IDA, NTA

1 Giriş

Adsorpsiyon protein molekülünün kalitesini önemli derece etkileyen bir faktördür. Bu nedenle protein moleküllerinin adsorpsiyonu son yıllarda biyoloji, biyoteknoloji, biyokimya, biyomühendislik ve çevre bilimi gibi birçok alanda önemli rol oynamaktadır [1]. Protein adsorpsiyonunda kullanılacak malzemelerin yeniden kullanılması hem maddi hem de zaman bakımından oldukça kolaylık sağlayacaktır. Adsorpsiyon işlemlerinde kolon dolgu malzemeleri oldukça ilgi görmektedir. Başta proteinler olmak üzere biyolojik moleküllerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılan kolon dolgu malzemeleri, tekrar tekrar kullanılabilirliği başta olmak üzere birçok avantaj sağlamaktadır [2,3]. Protein saflaştırma genel olarak tüm organizmadan, dokulardan, genellikle hücrelerden veya birkaç proteinden müteşekkil kompleks çözeltilerden istenilen polipeptidin izole edilerek elde edilmesi işlemlerine verilen isimdir.

Proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında bugün birçok farklı gelişmiş teknik tercih edilmektedir. Bu tekniklerin tek başına veya birbiri ile bağlantılı olarak birkaçının birlikte kombine bir şekilde kullanılması ile hedeflenen proteini saf halde elde etmek mümkündür [4]. Kromatografinin proteinlerin saflaştırılması için kullanımı 1960'larda

Abstract

In this study, new poly(HEMA-co-GMA) or pHEMA-GMA support solid structures were prepared to help protein purification. The surface of the prepared pHEMA-GMA building materials was modified by binding different functional groups such as IDA and NTA. Nickel (Ni II) metal ion was passed through the modified cryogel structures. The monolithic cryogel structure chelated with Ni metal was characterized by SEM and FT-IR. GFP fluorescent protein binding studies of metal chelated cryogel structures were performed using UV-vis and fluorescence spectrophotometry. These cryogels were determined to bind 45% and 75% protein by UV-vis and fluorescence spectrophotometry. And these results were supported by visualization with the SDS PAGE method.

Keywords: p(HEMA-GMA), SDS page, Nickel, IDA, NTA

başlamıştır. Daha öncesinde proteinleri buldukları ortamdan ayırabilmek için küçük partiküllü sistemler kullanılmıştır [5]. Bu alanda en çok tercih edilen ayırma ve saflaştırma yöntemi afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, lektin afinitesi, boronat afinitesi, biyomimetik afinite ve metal iyonu afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmaktadır [6,7]. Afinite kromatografisi için yapısında hem metal şelatlaştırıcı ajan hem de kriyojel yapımında kullanılacak yeni monomerler ilgi görmektedir [8, 9].

Kriyojel yapımında kullanılacak monomerler ile protein yapıları üzerinde bulunan imidazol halkaları arasında güçlü bir koordinasyon oluşturulabilmesi hedeflenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır [10, 11, 12]. Bu çalışmalar ışığında etkili bir ayırma yapması için kolon malzemeleri Pb²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ ve Ni²⁺ gibi farklı geçiş metali ile uygun şartlarda şelatlandırılıp yeni immobilize metal afinite kolonlar hazırlanmaktadır [13]. Ardından hedef protein kolonlara yüklenmekte ve farklı tamponların hareketli faz olarak kullanılması ile saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmektedir [14]. Kriyojel esaslı malzemeler sahip oldukları büyük gözenek çaplarından (genelde 10-200 µm) dolayı düşük geri basınç ve direnç (kütle transferine karşı) gösterme gibi avantajları olmasına rağmen, bu durum proteinlere karşı

* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: bahar.kmu@gmail.com (B. Yılmaz Altınok)

Geliş / Received: 27.10.2023 Kabul / Accepted: 18.01.2024 Yayınlanma / Published: 15.04.2021

doi: 10.28948/ngumuh.1382364

düşük kapasite sergileme gibi bir dezavantaja yol açmaktadır [15, 16]. Kolonların ayırma yetenekleri, son zamanlarda en popüler proteinlerden biri olan yeşil floresan proteine (GFP) karşı araştırılmaktadır.

Yeşil floresan protein (GFP), mavi ila ultraviyole aralığında ışığa maruz kaldığında parlak yeşil floresan sergileyen 238 amino asitten (26,9 kDa) oluşan bir proteindir. Yeşil renkte parlayan benzer proteinler birçok deniz organizmasında bulunur [14]. GFP, hayvanlara veya diğer türlere transgenik tekniklerle aktarılabilir ve aktarıldığı genomlarda ve yavrularının genomunda tutulabilir. Bugüne kadar GFP, insan hücreleri dahil olmak üzere bakteriler, mayalar, mantarlar, balıklar ve memeliler dahil olmak üzere birçok türde ifade edilmiştir [11].

Bu çalışmada, poli(HEMA-GMA) monomerler yüzeyleri aktifleştirilmek için IDA ve NTA ile modifiye edildi. Modifiye edilen kriyojel yapılardan Ni metali geçirilerek şelatlanma işlemi gerçekleştirildi. GFP'nin adsorpsiyonu ve saflaştırılması için bu metal şelatlı yapılar ilk kez kullanıldı. İlk kez kullanılan bu yapılar için adsorpsiyon koşulları sağlanarak metal grupları üzerindeki bağlanma mekanizmaları değerlendirildi. GFP'nin başlangıç konsantrasyonundaki adsorpsiyon dengesi, bir dizi toplu deneyde elde edildi. Deneysel veriler, farklı adsorpsiyon modelleri açısından analiz edilerek değerlendirildi. Son olarak, GFP'nin saflaştırılması UV, floresan spektrofotometresi ve SDS PAGE ile belirlendi.

2 Materyal ve metot

2.1 Materyal

2-hidroksietil metakrilat (HEMA), Glisidil metakrilat (GMA), Nikel metali, İmmino diasetik asit (IDA) ve Nitroliotriasetik asit (NTA) Merck ve Sigma'dan temin edildi.

2.2 Yöntem

2.2.1 Metal immobilize monolitik kriyojellerin hazırlanması

1,3 ml HEMA ve 100 µl GMA ile 0,283 g MBAAm 10 ml suda birbirine karıştırılarak çözündürüldü. Üzerine 20 mg APS ve ardından 25 µl TEMED eklendi. Reaksiyon 1 dk karıştırıldı. Elde edilen karışım hemen plastik bir şırıngaya alındı (Havasız şekilde). Karışım -12 0 C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda -12 0 C den alınan kriyojeller 2 saat oda sıcaklığında bekletildi [17]. Reaksiyona girmeyen monomerleri ve başlatıcıları uzaklaştırılmak için elde edilen kriyojeller 200 ml su ile 3 kez yıkandı. Şelatlama maddesi IDA'nın kovalent immobilizasyonu 6 saat boyunca 75 0 C'de peristaltik bir pompa yardımıyla kriyojelden 50 ml IDA solüsyonu geçirilerek gerçekleştirildi. Reaksiyona girmemiş IDA %5'lik asetik asit solüsyonu ve su ile ard arda yıkandı. Elde edilen IDA ve NTA immobilize kriyojellerine Ni metali ile şelatlanma işlemi uygulandı. Sırasıyla IDA- ve NTA-kriyojele Ni²⁺ iyonları yüklendi. Ni şelatasyonu 2 saat boyunca 25 oC de peristaltik pompa kullanılarak kriyojelden 100 ml Ni(II) solüsyonu geçirilerek gerçekleştirildi [8].

2.2.2 Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyonu

2.2.2.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

IDA ve NTA ile modifiye edilmiş pHEMA-GMA kriyojellerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. SEM görüntüleri alınacak kriyojel numuneleri öncelikle 5 nm Au ile kaplandı. Kaplanan kriyojeller yaklaşık 1 mikron mesafeden SEM ile görüntülenerek rapor edildi [17].

2.2.2.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Kolon dolgu maddesi olarak hazırlanan dört farklı kriyojel yapısı ve bu kriyojel yapılarından protein geçirilen yapıların FT-IR sonuçları, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopik (FT-IR) teknikler ile analiz edildi. FT-IR spektroskopisi, protein molekülünü ve farklı kriyojel yapıları arasındaki olası etkileşimlerini kanıtlamak için 4000-400 cm⁻¹ arasında taramalar gözden geçirildi ve elde edilen spektrumlar rapor edildi [16].

2.2.3 Adsorpsiyon ve floresan çalışmaları

Çalışma kapsamında hazırlanan kriyojel kolonların kromatografik uygulamaları proteinlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılan adsorpsiyon tekniklerinden yararlanılarak yapıldı [18]. Seçilen kolon dolgu malzemesinin protein bağlama verimliliği incelendi. Öncelikle immobilize metal kriyojel kolonu; uygun çaplarda kesilerek 20 mM fosfat, 50 mM NaCl pH:8 tamponu ile yıkanarak denge haline getirildikten sonra derişik 20 mL GFP (25 µL) içeren çözeltiye ilave edilerek oda sıcaklığında ve bir saat süreyle 175 rpm etkileştirildi. UV-Vis spektrofotometresinde (Shimadzu UV 1800) adsorpsiyon öncesinde ve sonrasında 476 nm dalga boyunda ölçülen GFP'ye ait absorbans değerleri kullanılarak tutunan protein miktarı tespit edildi. Ayrıca kolondan geçirilen GFP proteini UV ve gün ışığında görüntülenerek kaydedildi [4, 19, 20].

Ayrıca; IDA, NTA ve bunların metal şelatlı kriyojellerini içeren kolonlardan geçirilen GFP floresan proteinin floresan yoğunluğu floresan spektrofotometresi (Hitachi F-7100) kullanılarak ölçüldü.

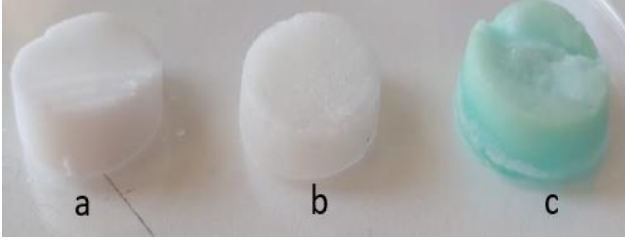
2.2.4 Sodium dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel Elektroforez), proteinlerin moleküler kütlelerine göre ayırımına izin veren bir yöntemdir. Aynı zamanda matriks olarak bilinen medyum poliakrilamid temelli devamsız bir jeldir. Buna ek olarak, SDS kullanılır. Yaklaşık 1.4 gram SDS 1 gram proteine bağlanır, yani her bir aminoasite 2 SDS molekülü bağlanmış olur. SDS yüzey aktif madde olarak davranır, proteinlerin kendi taşıdıkları yüklerin üzerini kaplar ve böylece proteinlerin kendi yükleri kaybolmuş ve ayırım yük temelinde gerçekleşmemiş olur. Ayrıca pozitif yükler de ayırma jelinin bazik pH'ı ile yüksek oranda indirgenir. Belli bir elektrik alanının varlığında proteinler anottan katoda doğru ilerler bu ilerlemenin hızı moleküler kütlelerin büyüklüğü ile değişir. Bu basit prosedür proteinlerin moleküler kütle temelinde hassas ayırımına olanak sağlar.

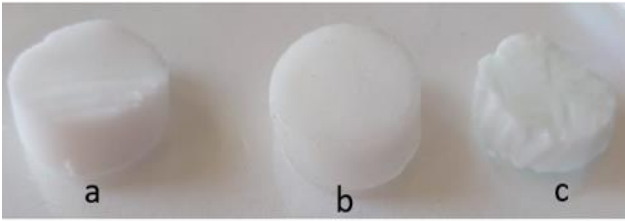
SDS PAGE yöntemi ile kolondan geçirilen protein yürütüldü ve kaydedildi [8].

3 Bulgular ve tartışma

Bu çalışmada da GFP proteini için Ni şelatlı IDA ve NTA kriyojelleri hazırlandı. Elde edilen kriyojel yapıları Şekil 1'de saf pHEMA, IDA bağlı pHEMA ve Ni metali ile şelatlanmış IDA bağlı pHEMA ve Şekil 2'de saf pHEMA, NTA bağlı pHEMA ve Ni metali ile şelatlanmış NTA bağlı pHEMA olarak görselleştirilmiştir.



Şekil 1. Kriyojel yapısı (a. pHEMA kriyojel b. IDA-pHEMA Kriyojel c. IDA-Ni-pHEMA Kriyojel)

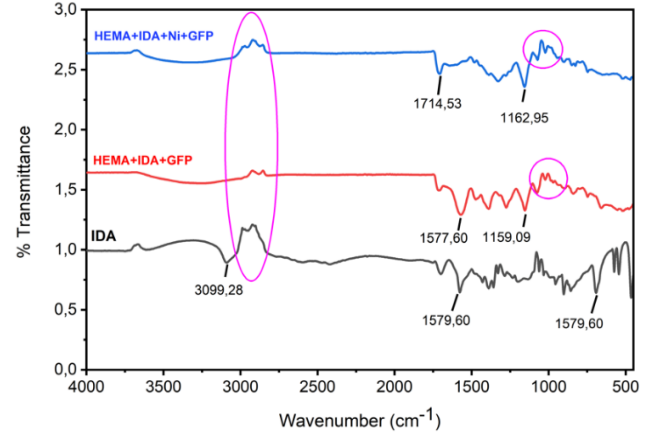


Şekil 2. Kriyojel yapısı (a. pHEMA kriyojel b. NTA-pHEMA Kriyojel c. NTA-Ni-pHEMA Kriyojel)

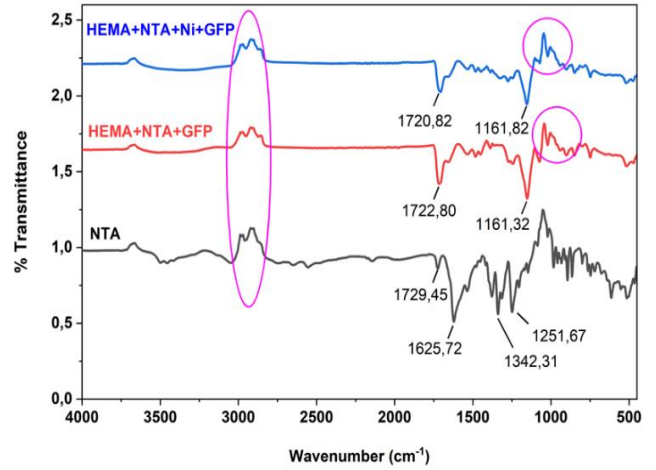
Hazırlanan IDA ve NTA modifiyeli pHEMA kriyojelleri FT-IR ve SEM ile incelendi. FT-IR çalışması, farklı yapılardaki kriyojellerin yapısal özelliklerindeki değişiklikleri ve/veya bu kriyojellere protein bağlanması üzerine yapı karakterizasyonu açıklamak için yapıldı. Protein-kriyojel etkileşimlerinin oluşturduğu yeni spektrumlar, proteinin kriyojelle bağlandığını gösteren bir kanıt olarak rapor edildi. Serbest IDA, HEMA+IDA, Ni-IDA+HEMA, NTA, HEMA+NTA ve Ni-NTA+HEMA etkileşiminin FT-IR spektrumları Şekil 3 ve Şekil 4'de gösterilmiştir. Şekillere bakıldığında, serbest IDA ve NTA kriyojellerinde 3099 cm^{-1} civarında meydana gelen piklerin GFP proteinin bağlanması ile pik şiddetinde ciddi bir azalma olduğu açıkça görülmektedir. Serbest GFP proteininin 3000 cm^{-1} civarındaki amino bandının, kriyojel ile bağlanması sonucu kaybolduğunu da göstermektedir [10]. Serbest IDA ve NTA kriyojellerinin 1700 ve 500 cm^{-1} dalga boyu arasında verdiği farklı pik değerlerinin, protein bağlandığında kaydığı ve pik değerinin oldukça azaldığı gözlemlendi [10, 15]. Bu durum açıkça, GFP floresan proteininin kriyojel yapıları ile etkileşim içinde olduğunu göstermektedir.

Kriyojellerin yüzey morfolojisi, FT-IR ölçümlerindeki değişimleri desteklemek amacıyla SEM ile de ölçüldü. FT-IR araştırmasının sonuçlarının SEM analiz sonuçları ile yakından bağlantılı olduğu bilinmektedir. Kriyojel yapıları SEM görüntüsünde genellikle boşluklu, pürüzlü ve dağınık

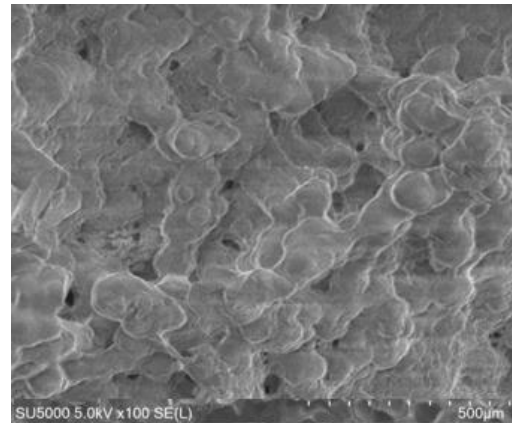
yapılar göstermektedir. Şekil 5'de ve Şekil 6'da görüldüğü üzere IDA kriyojel yapısı NTA kriyojel yapısına oranla daha dalgalı ve pürüzlü bir yapıya sahiptir. NTA yapısı ise daha az yoğunlukta dalgalı bir morfolojik yapı yani daha az pürüzlü yapı içermektedir. Bu morfolojik yapı farklılıkları kriyojellerin protein bağlama kapasitesiyle birebir doğru orantılı olabilir.



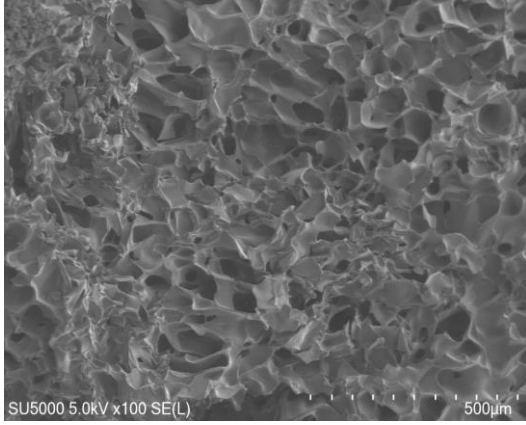
Şekil 3. IDA ve IDA+Ni kolonundan geçen GFP'nin FTIR grafiği



Şekil 4. NTA ve NTA+Ni kolonundan geçen GFP'nin FTIR grafiği

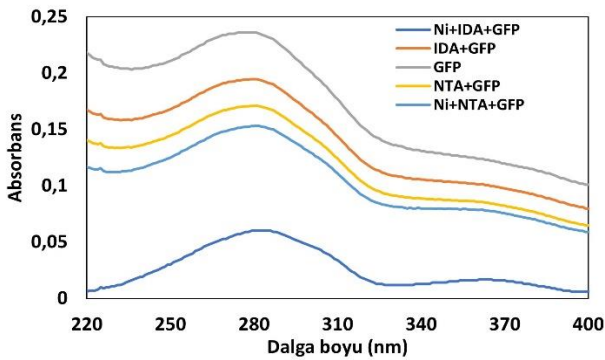


Şekil 5. IDA Kriyojelin SEM görüntüsü



Şekil 6. NTA Kriyojelin SEM görüntüsü

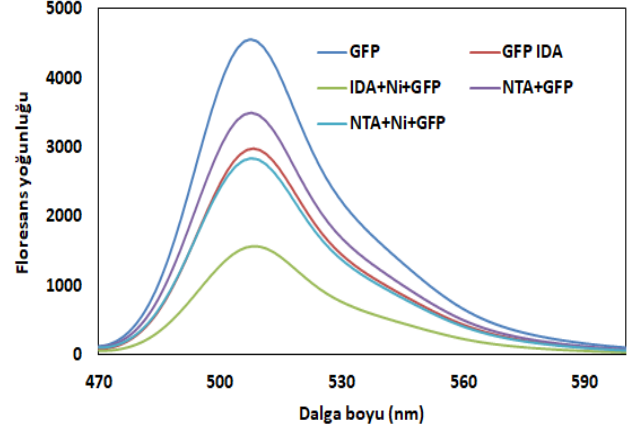
Karakterizasyonu tamamlanan IDA ve NTA kriyojellerin metal şelatlı yapılarından GFP proteini geçirilerek adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. GFP proteinin farklı modifiyeli kolonlardan geçirilerek 280 nm’de protein bağlama oranları adsorpsiyon değerleri ölçülerek hesaplandı. Bunun için, 280 nm’de absorbans değerleri UV-vis spektrofotometresi ile ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında protein yoğunluğu dikkate alınarak kolon dolgu malzemelerinin GFP proteini bağlama kapasitesi karşılaştırıldı [14, 15]. Şekil 7’deki grafiğe bakıldığında Ni şelatlı kolon dolgu maddelerinin daha fazla protein bağladığı 280 nm’de meydana gelen absorbans değerindeki azalma ile tespit edildi. Ayrıca, Ni metali şelatlı NTA ve IDA kriyojelinin 280 nm’deki absorbans değeri NTA ve IDA kriyojeline nazaran daha düşük kaydedildi. Bu sonuç nikel şelatlı kriyojelin GFP protein bağlama kapasitesinin metal şelat içermeyen kriyojellere oranla daha yüksek olduğunu açıkça göstermektedir. Ni şelatlı NTA kriyojelinin yaklaşık %45 oranında protein bağladığı, Ni şelatlı IDA kriyojelinin ise %75 oranında protein bağladığı 280 nm’deki absorbans değerlerinden belirlendi.



Şekil 7. Ni şelatlı IDA ve NTA p(HEMA) kriyojellerinden geçirilen GFP floresan proteinin UV-vis spektrofotometre grafiği

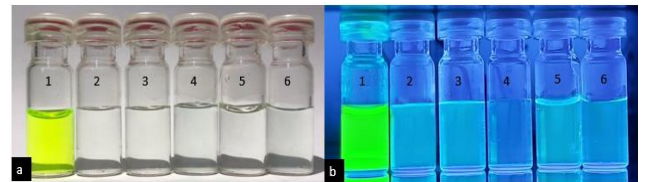
Floresan spektrofotometresi kullanılarak alınan protein konsantrasyonundaki ölçümde meydana gelen azalma UV sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 8). Floresan ölçüm sonuçlarına bakıldığında metal şelatlı kriyojellerden geçirilen GFP proteininin floresan değerleri metal şelat içermeyen

kriyojellere oranla daha düşüktür. Kolondan geçirilmeyen GFP proteininin emisyon değeri yaklaşık 4500 cm^{-1} civarında alınırken, Ni şelatlı kriyojellerden geçirilen GFP proteininin floresan yoğunluğunda yaklaşık %50 ve %75 oranında azalma meydana geldiği gözlemlendi. Bu azalma, Ni şelatlı kriyojellerin GFP floresan proteini bağlama kapasitesinin daha fazla olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 8).



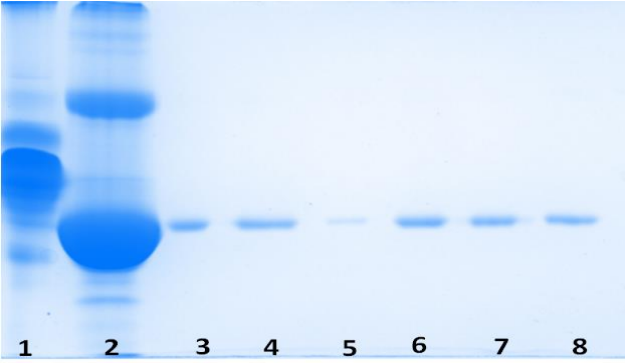
Şekil 8. Ni şelatlı IDA ve NTA p(HEMA) kriyojellerinden geçirilen GFP floresan proteinin floresan spektrofotometre grafiği

IDA+Ni ve NTA+Ni kriyojel kolonlardan geçirilen GFP floresan proteininin hem UV hem de gün ışığında görüntüleri alındı (Şekil 9). Şekil 9’a bakıldığında kolondan geçirilmeyen protein (1) geçirilen proteinlere kıyasla hem UV hemde gün ışığında belirgin olarak farklılık göstermektedir. 4 numaralı şişede Ni-IDA kriyojeli içeren kolondan geçirilen protein bulunmaktadır. Nikel şelatlı IDA kriyojeli diğer kriyojellere oranla daha fazla protein yakalamıştır. Bu durum metal şelatların protein bağlama kapasitesini arttırdığını açıkça göstermektedir. İlk kez bu çalışma kapsamında yapılan Ni şelatlı NTA kriyojeli (6) ise metal şelatlı olmayan NTA (5) kriyojeline oranla daha fazla GFP proteini bağladığı gözle görülecek derecede fark edilmektedir. Bu sonuçlar, ilk kez yapılan Ni şelatlı kolon dolgu malzemelerinin protein saflaştırmada oldukça önem kazanacağını desteklemiştir.



Şekil 9. GFP proteininin kolondan geçirilmeden önce ve sonra; gün ışığı (a) ve UV ışığı (b) altındaki görüntüsü (a.1. Derişik GFP a.2. Seyreltilmiş GFP a.3. IDA yüklü kolondan geçirilen GFP miktarı a.4. IDA+Nikel yüklü kolondan geçirilen GFP miktarı a.5. NTA yüklü kolondan geçirilen GFP miktarı a.6. NTA+Nikel yüklü kolondan geçirilen GFP miktarı, b fotoğrafı da aynı miktarların UV ışık altındaki görüntüsüdür.)

Hazırlanan kolon dolgu maddesinin GFP floresan proteinini bağlaması için yapılan adsorpsiyon ve floresan çalışmaları kaydedildi. Bu çalışmaları desteklemek amacıyla SDS PAGE yapıldı. GFP floresan proteini ve kolondan geçirilen GFP proteini SDS PAGE’de yürütüldü ve sonuçları Şekil 10’da sunuldu. Sonuçlara bakıldığında serbest ve Ni şelatlı IDA ve NTA kriyojel içeren kolonlardan geçirilen GFP floresan protein derişimine bağlı olarak bant kalınlığı ile açıklanmaktadır. 3. sırada kolondan geçirilmek üzere hazırlanan GFP proteini bulunurken, 4 ve 5’de IDA ve Ni-IDA kriyojelleri içeren kolonlardan geçirilen GFP proteini bulunmaktadır. Ni metali şelatlı IDA kriyojeli GFP proteini bağlama kapasitesi daha yüksek olduğu meydana gelen bandın yoğunluğundan açıkça belli olmaktadır. Bandın daha az yoğun olması protein miktarının azaldığını açıkça göstermektedir. Ayrıca 6. sırada kolondan geçirilmek üzere hazırlanan GFP proteini bulunurken 7 ve 8 numaralı kuyucukta NTA ve Ni-NTA kriyojel içeren kolonlardan geçirilen GFP proteini yürütülmüştür. 6 numaralı bandın 7 ve 8 numaralı banda nazaran daha yoğun olduğu görülmektedir. Ni şelatlı kriyojellerin serbest IDA ve NTA içeren kriyojelleri kıyasla daha fazla protein bağladığı tekrar belirlenmiştir.



Şekil 10. GFP proteininin kolondan geçirildikten önce ve sonra SDS page görüntüsü (1. GFP, 2. Boyalı GFP, 3. Seyreltilmiş GFP, 4. IDA’lı kolondan geçirilen GFP, 5. Ni-IDA’lı kolondan geçirilen GFP, 6. Seyreltilmiş GFP, 7. NTA’lı kolondan geçirilen GFP, 8. Ni-NTA’lı kolondan geçirilen GFP)

4 Sonuçlar

Protein saflaştırma işlemlerinde elde edilmek istenilen proteininin diğerlerinden ayrılması yoğunlukla kromatografik metotlarla yapılmaktadır. Saflaştırma işlemlerinde benzer özellik gösteren moleküllerin birbirinden ayrılması araştırmacıların karşılaştıkları en büyük zorluklardan biridir. Genellikle protein saflaştırma işlemlerinde proteinin saf bir şekilde elde edilebilmesi için iki veya daha fazla kromatografik sürecin ard arda yürütülmesi gerekmektedir, bu da verim ve aktivite kayıplarına yol açmaktadır. Rekombinant olarak elde edilen proteinlerde bu sorun genellikle bir afinite Tag’ının polipeptid zincirine ilave edilmesi sayesinde tek basamakta ve yüksek verimde saflaştırma yapılabilen afinite kromatografisiyle aşılmaktadır [11]. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan afinite kromatografi rezinleri arasında Ni-NTA Agaroz,

Talon, GST gibi rezinler bulunmaktadır. Bu rezinler arasında metal afinite temelli kolon dolgu malzemeleri çoğunlukla tercih edilmektedir. Protein saflaştırma kolonlarında güçlü metal bağlayıcı şelatların reçine yüzeyinde bulunması, reçinelerin afinite temelli protein saflaştırılmasında yüksek verim ve seçicilik sağlamaktadır [5, 14]. Dolayısı ile önerilen bu çalışma kapsamında; yapısında Nikel (Ni²⁺), Bakır (Cu²⁺) ve/veya Kobalt (Co²⁺) gibi geçiş elementleri ile güçlü metal şelat kompleks yapıları oluşturabilen NTA ve IDA ile modifiye edilmiş ve Ni metali ile şelatlanmış yeni kriyojeller hazırlandı. Bu işlem için, düşük sıcaklık ile jelleşme yöntemi uygulanarak 4 farklı metal afinite temelli monolitik kolon hazırlandı ve karakterize edildi. Saflaştırma işlemleri için rekombinant His- Tagged yeşil floresan protein (6xHis-GFP) araştırıldı.

Elde edilen farklı kriyojeller ile GFP proteini bağlama sonuçları karşılaştırıldığında metal şelatlı kriyojellerin, saf kriyojellere oranla daha fazla olduğu açıkça görülmüştür. Ni şelatlı NTA ve IDA modifiyeli kriyojeller sırayla %45 ve %75 oranla GFP proteini bağlamıştır. Sonuç olarak, bu başarı kriyojellerin ticari olarak kullanılmasını hedeflemektedir.

Teşekkür

“Bu araştırma Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 06-M-21 nolu proje kapsamında desteklenmiştir” 06-M-21 numaralı bu projeye destek veren Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu’na teşekkür ederiz.

Saflaştırma işleminde kullanılan yeşil floresan proteininin (GFP) temininden dolayı Yakup ULUSU’ya teşekkür ederiz.

Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Benzerlik oranı (iThenticate): %11

Kaynaklar

- [1] H. Alkan, N. Bereli, Z. Baysal, A. Denizli, Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 201-208, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.03.013>
- [2] A. Baimenov, D. A. Berillo, S. G. Pouloupoulos, V. J. Inglezakis, A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Advances in colloid and interface science*, 276, 102088, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102088>
- [3] M. Bakhshpour, A. Derazshamshir, N. Bereli, A. Elkak, A. Denizli. [PHEMA/PEI]-Cu (II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: application on the separation of IgG from human plasma. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 824-831, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.005>
- [4] M. Bayrakçı, B. Yılmaz, Biyoaktif giemsa boyama ajanı ile suda çözünen sulfonato kaliksaren moleküllerinin etkileşiminin spektrofotometrik olarak

- incelenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(2), 985-992, 2019. <https://doi.org/10.21597/jist.439066>
- [5] N. S. Bibi, N. K. Singh, R. N. Dsouza, M. Aasim, M. Fernández-Lahore, Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. *Journal of Chromatography A*, 1272, 145– 149, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.036>
- [6] B. M. A. Carvalho, L. H. M. Da Silva, L. M. Carvalho, A. M. Soares, L. A. Minim, S. L. Da Silva, Microcalorimetric study of the adsorption of lactoferrin insupermacroporous continuous cryogel with immobilized Cu²⁺ ions. *Journal of Chromatography A*, 1312, 1– 9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.042>
- [7] M. B. Dainiak, F. M. Plieva, I. Y. Galaev, R. H. Kaul, B. Mattiasson, Cell Chromatography: Separation of Different Microbial Cells Using IMAC Supermacroporous Monolithic Columns. *Biotechnology Progress*, 21, 644-649, 2005. <https://doi.org/10.1021/bp049615g>
- [8] N. Eczacioglu, B. Yılmaz, Y. Ulusu, M. Bayrakci, Recovery and reusability of apounag fluorescence protein from the unconjugated bilirubin complex structure. *Journal of Fluorescence*, 30(3), 497-503, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10895-020-02519-w>
- [9] K. Erol, B. K. Cebeci, K. Köse, D. A. Köse, Effect of immobilization on the activity of catalase carried by poly (HEMA-GMA) cryogels. *International journal of biological macromolecules*, 123, 738-743, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.121>
- [10] I. Guven, O. Gezici, M. Bayrakci, M. Morbidelli, Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1558, 59–68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.026>
- [11] A. Hanora, F. Bernaudat, F. M. Plieva, M. B. Dainiak, L. Bülow, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, Screening of peptide affinity tags using immobilised metal affinity chromatography in 96-well plate format. *Journal of Chromatography A*, 1087, 38–44, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.029>
- [12] S. A. A. Noma, Ö. Acet, A. Ulu, B. Önal, M. Odabaşı, B. Ateş, l-asparaginase immobilized p (HEMA-GMA) cryogels: A recent study for biochemical, thermodynamic and kinetic parameters. *Polymer Testing*, 93, 106980, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.polymeresting.2020.106980>
- [13] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598- 599, 1975.
- [14] J. Sarkar, A. Kumar, Immobilized metal affinity cryogel-based high-throughput platform for screening bioprocess and chromatographic parameters of His6-GTPase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2951–2965, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0242-9>
- [15] B. Wan, J. Li, F. Ma, N. Yu, W. Zhang, L. Jiang, H. Wei, Preparation and properties of cryogel based on poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate). *Langmuir*, 35(9), 3284-3294, 2019.: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04021>
- [16] B. Yılmaz, Spektroskopik Teknikler Kullanılarak Furosemid ile DNA Etkileşimlerinin İncelenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(2), 325-331, 2021. doi: <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.856526>
- [17] B. Yılmaz, Release of nifedipine, furosemide, and niclosamide drugs from the biocompatible poly (HEMA) hydrogel structures. *Turkish Journal of Chemistry*, 46(5), 1710-1722, 2022. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3474>
- [18] Y. Şimşek, Sulu çözülden bakır (II) adsorpsiyon sürecinin optimizasyonunda yüzey yanıt metodolojisinin uygulanması. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 6(3), 182-191, 2018. <https://doi.org/10.21541/apjes.393848>
- [19] M. Bayrakci, B. Yılmaz, DNA ile Bağlanabilen Suda Çözünür Sülfonato Kaliks [8] Aren Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 615-620, 2019. <https://doi.org/10.28948/ngumuh.517209>
- [20] M. Keskinates, B. Yılmaz, Y. Ulusu, M. Bayrakci, Electrospinning of novel calixarene-functionalized PAN and PMMA nanofibers: Comparison of fluorescent protein adsorption performance. *Materials Chemistry and Physics*, 205, 522-529, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.11.055>

