

Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması

Ülgen İknur Konak, İrfan Turhan [✉], Muharrem Certel

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 07059, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2013, Kabul Tarihi (Accepted): 22.11.2013

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): iturhan@akdeniz.edu.tr (İ. Turhan)

☎ 0 242 310 65 73 📠 0 242 310 63 06

ÖZET

Kromatografi; kimya, biyoteknoloji, gıda ve tıp alanlarında analizde, izolasyonda ve saflaştırmada en yaygın kullanılan ayırma tekniğidir. Buna ilaveten, genellikle sanayide küçük ve büyük ölçekli üretimlerde prosesin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Protein saflaştırma işlemi için yöntemlerin geliştirilmesi kimya, biyoloji, gıda ve tıp alanlarında yapılan birçok gelişme için önemli bir ön koşuldur. Protein saflaştırma, basit tek bir aşamada çöktürme işlemiyle veya büyük ölçekli onaylanmış proseslerle yapılmaktadır. Genel olarak, birden fazla aşamada yapılan saflaştırma işlemi istenilen saflığa ulaşmak için önemlidir. Saflaştırma işleminde kullanılacak olan yöntemler proteinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri dikkate alınarak seçilmektedir. Bu çalışmada, proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bazı kromatografik yöntemlerin temellerine ilişkin bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Protein, Saflaştırma, Kromatografi

Chromatographic Methods in Protein Purification

ABSTRACT

Chromatography is the most widely used separation technique in chemistry, biotechnology, food and medicine in analysis, isolation and purification. Additionally, it is commonly used in the industry as a component in the process of small and large-scale production. The development of methods for protein purification has been an essential pre-requisite for many of the advancements in chemistry, biology, food and medicine. Protein purification varies from a simple one-step precipitation procedure to large scale validated processes. Generally, more than one purification step is necessary to reach the desired purity. Methods used in purification are selected based on the physical, chemical and biological properties of proteins. In this study, the fundamentals of some chromatographic methods used in purification of proteins are reviewed.

Keywords: Protein, Purification, Chromatography

GİRİŞ

Kromatografi esasen bir karışımdaki bileşiklerin birbiriyle karışmayan farklı iki faz arasındaki dağılımlarıyla ayrılmalarını sağlayan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Bu fazlardan bir tanesi gözenekli bir yatak, tabaka veya film şeklinde ve genellikle hareketsiz olan sabit faz iken; diğeri sabit faz boyunca bu fazın üzerinden akan hareketli fazdır [1].

Kromatografinin proteinlerin saflaştırılması için kullanımı 1960'larda başlamıştır. Daha öncesinde proteinleri buldukları ortamdan ayırabilmek için küçük partiküllü sistemler kullanılmıştır. Ancak sistemdeki geçirgenliğin az olmasından kaynaklanan düşük verimden dolayı daha gelişmiş yöntemlerin üzerinde çalışılmış ve günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak adlandırılan, ilk kez 1967 yılında proteinlerin

saflaştırılmasında kullanılan özel cihazlar geliştirilmiştir. Bu sistemlerde proteinleri özelliklerine göre uygun bir şekilde ayırmak amacıyla çeşitli reçineler üretilmiştir. Kolon kromatografisinde kullanmak amacıyla 1935 yılında iyon değişim reçineleri geliştirilmiştir; fakat proteinleri ayırmak için ilk kez 1951 yılında kullanılmıştır. Bu reçinelere ilaveten moleküler elek jelleri ve afinite reçineleri 1960'larda ve hidrofobik reçineler de 1970'lerde geliştirilmiştir [2].

Genellikle tek bir proteinin istenilen saflıkta elde edilebilmesi için birden fazla saflaştırma basamağına ihtiyaç vardır. Spesifik bir proteinin bir karışımdan izole edilebilmesi için bu proteinin kendine özgü fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerinin bilinmesi ve bu bilgiler doğrultusunda uygun saflaştırma yönteminin seçilmesi gereklidir. Her tür proteini saflaştırmak için tek ya da basit bir yöntem yoktur. Bir proteinin saflaştırma işleminde yararlanılan prosedürler ve koşullar, başka bir proteinin inaktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir [3]. Proteinlerin çözünürlük, yük, boyut ve spesifik bağlanma gibi özelliklerindeki farklılıklar onların başarılı ve verimli bir şekilde buldukları ortamdaki diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır. Proteinlerin yüzeyinde yer alan polar ve hidrofobik amino asitler proteinlerin çözünürlüğünü etkilerken; yapısında bulunan aspartik asit, glutamik asit, lizin, arginin ve histidin amino asitleri proteinlerin yük özelliklerini etkilemektedir. Farklı yüke sahip proteinler iyon değişim kromatografisi, polar ve polar olmayan proteinler hidrofobik kromatografi, belirli bir bileşik ile birleşme eğilimi gösteren proteinler afinite kromatografisi ve farklı boyuttaki proteinler de jel filtrasyon kromatografisi ile etkili bir şekilde ayrılabilir [2, 4].

Proteinler stabil yapıda değildir ve yüksek sıcaklık ve ekstrem pH koşullarında, organik çözücüler ve oksidatif atmosfer varlığında kolayca denatüre olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı herhangi bir kromatografik ayırma işlemi sırasında bu faktörlerin önemli düzeyde dikkate alınması gerekmektedir [2].

Kromatografi, gıda, kimya, biyoloji, tıp ve çevre alanlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Temel olarak iyon değişim, hidrofobik etkileşim, afinite ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere dört çeşit standart kromatografik ayırma tekniği vardır. Bu derlemede, bu kromatografik ayırma yöntemleri ile ilgili bilgiler verilmiştir.

İYON DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİ

Bütün proteinler yapılarında yer alan amino asitlerin yan zincirlerinden dolayı yüzeylerinde onların çözücüler (solvent) ile etkileşimini arttıran ve böylece çözünürlüğünü de etkileyen yüklü gruplara sahiptir. Fizyolojik pH değerlerinde bazı gruplar katyonik (pozitif yüklü, örneğin lizin) iken diğerleri anyoniktir (negatif yüklü, örneğin aspartat). Belirli bir proteinin net yükü onun yapısından kaynaklanan bu gruplar arasındaki dengeye ve pH'sına bağlı olarak oluşmaktadır ki bu durum proteinlerin sahip olduğu farklı izoelektrik nokta (pI) değerlerinin de temelini teşkil etmektedir. Dolayısıyla belirli bir pH değerinde farklı proteinler farklı net yüke

sahiptir. Proteinlerin ayırma işlemlerinde de bu yük farklılığından yararlanılmaktadır [5,6]. İyonik yük ayırma iyon değişim kromatografisi ile gerçekleşmektedir. Bu yöntem kolon kromatografisinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir ve proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır. İyon değişim kromatografisi; yüksek kapasitesi, nispeten düşük maliyeti ve titiz temizleme sisteminden dolayı proteinlerin saflaştırılmasında başlangıç aşaması olarak bu bileşiklerin kolonda tutunması için ideal bir yöntemdir [7]. Bu yöntem ile küçük ve orta boyuttaki proteinler (70 kDa kadar) etkili bir şekilde ayrılmaktadır. Ayrıca bu yöntem immünoglobulin, plasmid DNAsı ve virus gibi oldukça büyük biyomoleküllerin ayrılmasında da kullanılmaktadır [8].

İyon değişim kromatografisinde ayırma işlemi, yüklü moleküller ile bu moleküllere zıt yüke sahip immobilize iyon değiştirici gruplar arasındaki tersinir adsorpsiyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ayırma işleminin ilk aşamasında reçinenin pH ve iyonik gücü açısından dengelenmesi için kolon, tampon çözelti ile yıkanmaktadır. Daha sonra protein ile matris arasındaki etkileşimi maksimum seviyede gerçekleştirmek için örnek, kolona düşük iyonik güçte (genelde $I < 0.05$ M) verilmektedir. Bu işlemin ardından kolon sabit pH ve düşük iyonik güce sahip başlangıçta uygulanan tampon çözelti ile yıkanarak reçineye spesifik ilgisi olmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmaktadır. Ancak örnek içerisinde reçine ile farklı düzeyde etkileşim gösteren birçok protein bulunabilmektedir. Yıkama çözeltisinin iyonik gücünün yavaş yavaş artırıldığı kademeli yıkama aşaması ile reçineye zayıf düzeyde bağlanan proteinler kolondan ilk olarak ayrılmaktadır. Ayırma işleminin sonuna doğru artan iyonik güce sahip çözelti ile de reçineye sıkı bir şekilde bağlanan proteinler kolondan ayrılmaktadır. Düzenli aralıklarla toplanan protein fraksiyonlarının absorbans veya floresans değerleri kaydedilerek bir elüsyon profili oluşturulmakta ve ilgili proteinin yerinin tespiti sağlanmaktadır [9, 10].

İyon değişim kromatografisinde yüklü bileşikler ile reçineler arasındaki etkileşim ve buna bağlı olarak bu yöntemin bileşikler ayırma kapasitesi, bileşiğin, reçinenin ve mobil fazın birçok özelliğine bağlıdır. Bu özellikler; iyonik bileşiğin boyutunu, polarizasyon derecesini ve yüzeyindeki yükü, reçinenin çapraz bağlanma derecesini, iyon değişim kapasitesini ve yapısındaki fonksiyonel grubu ve mobil fazın yapısını ve konsantrasyonunu içermektedir [11, 12].

İyon değişim kromatografisi proteinleri öncelikle yük türünü (katyonik veya anyonik) daha sonra ise yük gücünü (güçlü veya zayıf anyonik-katyonik) temel olarak ayırmaktadır [6]. Ancak bir protein ile iyon değiştirici arasındaki etkileşim sadece net yüke veya iyonik güce bağlı olarak değişmemekte ayrıca proteinin yüzeyindeki yük dağılımından da etkilenmektedir [13]. Yükü pH'ya bağlı olarak değişen amfoterik bileşiklerin saflaştırılmasında kullanılan mobil fazın pH'sı büyük öneme sahiptir. Bileşiklerin tamamen iyonizasyonunun sağlanması için mobil fazın pH değerinin, yüklü grupların pKa değerinden en az bir birim farklı olması

gerekmektedir. pH değeri bileşiğin karakteristik yüküne etki ederek onun alınma faktörü (retention factor) ve çözünürlüğü (resolution) üzerine etki etmektedir. pH değerinin artması anyon değişim kromatografisinde ayrılan bazik proteinlerin tutulma kapasitesini artırırken,

kation değişim kromatografisinde ayrılan asidik proteinlerin tutulma kapasitesini düşürmektedir [14]. İyon değişim kromatografisinde yaygın olarak kullanılan bazı tampon tuzları ve bunların kullanılabilir olduğu pH aralıkları Tablo 1'de belirtilmiştir [15].

Tablo 1. İyon değişim kromatografisinde kullanılan bazı tamponlar

Tampon Tuzu	pH Aralığı	Tampon Tuzu	pH Aralığı
Amonyak	8.2–10.2	Sodyum asetat	4.2–5.4
Amonyum asetat	8.6–9.8	Sodyum borat	8.0–9.8
Amonyum fosfat	2.2–6.5	Sodyum dihidrojen fosfat	2.0–6.0/8.0–12
Sitrik asit	2.0–6.0	Sodyum format	3.0–4.4
Disodyum hidrojen sitrat	2.6–6.5	Sodyum perklorat	8.0–9.8
Potasyum dihidrojen fosfat	2.0–8.0/9.0–13	Sodyum nitrat	8.0–10.0
Potasyum hidrojen fitalat	2.2–6.5	Trietanolamin	6.7–8.7

Basit veya karmaşık yapıdaki birçok analit veya karışımların saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesinde mobil fazın pH değerinin yanı sıra tuz konsantrasyonunun ve bileşiminin de önemli etkisi vardır. Genellikle 0 M'dan 1 M'a artan konsantrasyondaki gradient tampon çözeltiler uygun pH değerinde bileşikler etkili bir şekilde ayırmaktadır. Bahsedilen bu faktörlere ek olarak bileşiklerin ayrılması üzerine kolon akış hızının ve sıcaklığın da etkisi bulunmaktadır. Akış hızının olması gereken değerden daha fazla olması durumunda ayrılması istenen molekülün kolon dolgu materyalindeki yük ile etkileşime girme şansı azaldığı için elde edilen bileşiğin hacmi de az olacaktır. Sıcaklık ise kullanılan iyon değişim materyalinin çeşidine bağlı olarak değişen bir etkiye sahiptir. Artan sıcaklık değeri, bileşiğin iyon değişim matrisindeki sabit iyonlar ile etkileşimini artırarak bileşiğin matrikse difüzyon hızını arttırmakta ve böylece ayrılan hacmin fazla olmasını sağlamaktadır [12, 16].

Birçok kolon kromatografisinde olduğu gibi iyon değişim kromatografisinde de durağan faza gereksinim vardır. Bu faz genellikle selüloz, dekstran ve reçine gibi polimerlerden oluşmaktadır [6]. İyon değişim kromatografisinde mobil fazda (tampon+örnek) bulunan yüklü moleküller durağan fazda (kolon dolgu maddesi) yer alan zıt yüklü moleküller ile etkileşime girerek bu fazda tutunmaktadır. Bu yöntemde kullanılan matrisler iki temel gruba ayrılmaktadır: kation değişim ve anyon değişim. Kation değişim reçinelerinin yüzeylerinde negatif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin altındaki pH değerinde pozitif yüke sahip olduğu için kation değişim kromatografisinde pozitif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Anyon

değişim reçinelerinin yüzeylerinde ise pozitif yüklü gruplar bulunmaktadır. Proteinler pI değerinin üzerindeki pH değerinde negatif yüke sahip olduğu için anyon değişim kromatografisinde de negatif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu iyon değişim matrisleri ayrıca güçlü veya zayıf iyon değiştiricileri olarak da iki gruba ayrılmaktadır. Güçlü iyon değişim ligandları geniş pH aralığında yük özelliklerini ve buna bağlı olarak iyon değişim kapasitelerini koruyabilirken; zayıf iyon değişim ligandları değişen pH'ya bağlı olarak kapasitelerinde belirgin bir değişim göstermektedir [7, 17, 18, 19].

Matriksin özelliği onun verim, kapasite ve geri kazanım gibi kromatografik özelliklerinin yanı sıra kimyasal stabilitesini, mekaniksel kuvvetini ve akış özelliklerini belirlemektedir. Matriksin doğal yapısı onun biyolojik materyallere karşı davranışını ve saflaştırılacak materyalin biyolojik aktivitesini korumasını etkileyebilmektedir [18]. Biyolojik materyaller ile kullanılmak üzere geliştirilen ilk iyon değiştirici matris selüloz kaynaklıdır. Ancak selülozun matrikste bağlanan az sayıda fonksiyonel grubunun olmasından, biyodegradasyona uğramasından ve zayıf akışkanlık özelliği göstermesinden kaynaklanan düşük bağlanma kapasitesinden dolayı proteinlerin ayrıştırılmasında daha sağlam materyallere gereksinim duyulmuştur. Yeni nesil matrisler olarak küçük, boncuk gibi, parçacık şeklinde çapraz bağlı dekstranlar, çapraz bağlı agarozlar ve çapraz bağlı akrilamidler geliştirilmiştir. Bu materyaller pH stabilitesi, akış hızı ve bağlama kapasitesi açısından önemli gelişmeler sunmuştur [9]. Bahsedilen iyon değişim matrisleri Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. İyon değişim reçineleri ve fonksiyonel grupları

İyon Değiştirici	Türü	Fonksiyonel Grubu
Kation		
Sülfopropil (SP)	Güçlü	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ SO ₃ ⁻
Metil sülfonat (S)	Güçlü	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ SO ₃ ⁻
Karboksimetil (CM)	Zayıf	-O-CH ₂ -COO ⁻
Anyon		
Dördüncül amonyum (Q)	Güçlü	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃
Dördüncül aminoetil (QAE)	Güçlü	-O-CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃
Dietilaminoetil (DEAE)	Zayıf	-O-CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ H(CH ₂ CH ₃) ₂

HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ

Hidrofobisite, polar olmayan bileşiklerin su gibi polar özellikteki ortam ile arasındaki itme kuvvetidir. Protein ve peptitlerin hidrofobik yapıdaki alifatik ve aromatik yan zincirleri ile sağlanan yüzey hidrofobisitesi, proteinlerin konformasyonunun (üçüncül ve dördüncül yapılarının) stabilitesini sağlamasının yanı sıra proteinlerin biyolojik fonksiyonları ile bağlantılı olan antijen-antikor, hormon-reseptör ve enzim-substrat etkileşimleri gibi spesifik etkileşimlerin oluşmasına da yardımcı olmaktadır [20, 21].

Sulu çözeltilerde proteinlerin yüzeyindeki hidrofobik bölgeler, hidrofobik grupları etkili bir şekilde maskeleyen sıralı su moleküllerinden oluşan bir tabaka tarafından kaplanmaktadır. Su moleküllerinin düzenindeki bu artış sistemin entropisinde düşüşe yol açmaktadır ($\Delta S < 0$). Böylece hidrofobik bileşikler, çözücüye maruz kalan hidrofobik alanları en aza indirmek için sulu ortamda kendiliğinden birleşmektedir. Bu olgu sistemin enerjisi açısından bir avantaj sağlamaktadır, çünkü birleşmeyen hidrofobik grupların etrafındaki düzenli su molekülleri bağlanmadıkları için serbest kalmaktadır. Bu da sistemdeki serbest enerjide düşüşe neden olarak sistemin entropisinde artışa yol açmaktadır ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Bu yüzden proteinlerin hidrofobik adsorpsiyonu termodinamik temellere dayalı entropi odaklı bir işlemdir [3].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, üç boyutlu yapının korunmasının öncelikli olduğu durumlarda proteinleri, nükleik asitleri ve diğer biyolojik makromolekülleri hidrofobik mekanizma ile analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [22]. Bu teknik genellikle iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile birlikte kullanılmaktadır. Bu yöntemden, araştırma laboratuvarlarında ve endüstrideki laboratuvarlarda serum proteinleri, membran proteinleri, hücre çekirdeğindeki proteinler, reseptörler, hücreler ve rekombinant proteinler gibi çeşitli biyomoleküllerin saflaştırılması işleminde yararlanılmaktadır [23]. Bu saflaştırma tekniği, proteinin yüzeyinde bulunan polar olmayan uçlar ile hidrofobik ligandlar arasındaki etkileşime bağlı olarak gerçekleşmektedir [9]. Hidrofobik ligandlar, hidrofobik destek matriksinin yüzeyine kimyasal olarak tutturulmakta veya alternatif olarak makroretiküler

(macroreticular) polimerik reçinenin omurgasını oluşturmaktadır [24].

Hidrofobik özellik büyük bir protein molekülünün tüm yüzeyinde eşit değildir. Bu yüzden, yüzeydeki hidrofobik dağılım saflaştırma işlemi sırasında önemli olabilmektedir. En fazla hidrofobik özellik gösteren protein, kolonda daha uzun süre tutunmaktadır [25]. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ayırma işleminin optimizasyonuna etki eden faktörler; ligand çeşidi ve tutunma (substitution) derecesi, matriks çeşidi, tuz çeşidi ve konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve katkı maddeleridir [26].

Bu kromatografi tekniğinde yaygın olarak kullanılan hidrofobik özellikteki destek materyalleri, hidrofobik etkileşim kuvvetindeki artışa göre sırasıyla bütül, oktil veya fenil fonksiyonel gruplarını içeren çapraz bağlı agaroz veya sentetik kopolimer materyalleridir. Bir proteinin saflaştırılmasında hangi matriks materyalinin uygun olabileceği ilk önce küçük çaplı deneylerle belirlenmelidir. Karakterize edilmemiş bir proteinin saflaştırılmasında öncelikle fenil grubu içeren zayıf hidrofobik ligandların kullanılması tercih edilmektedir; çünkü yüksek hidrofobik özellik gösteren proteinlerin, hidrofobisitesi yüksek olan bir reçineden geçirilmesinde zorluk yaşanabilmektedir [26, 27]. Buna ilaveten, proteinlerin hidrofobik etkileşim ile kolondan geçerken ayrılmasına, hidrokarbon kaplı agaroz moleküllerinin yapısında yer alan alkil zincirinin uzunluğunun da etkisi vardır. Yapılan bir çalışmada, $-CH_2-$ grupları ile zincir uzunluğu arttırıldıkça proteinlerin bağlanma kuvvetinin arttığı tespit edilmiştir [28].

Proteinlerin ligandlara adsorpsiyonu, mobil fazın iyonik gücünün veya tuz konsantrasyonunun arttırılması ile artmaktadır. Amonyum sülfat gibi iyonik şiddeti arttırarak çöktürme işlemi yapan (salting-out) tuzlar; mobil fazın özelliklerine etki etmekte, yüzey gerilimini arttırmakta ve böylece mobil faz ile protein arasında hidrofobik etkileşimin artmasına yol açmaktadır. Potasyum tiyosiyanat gibi katotropik (chaotropes) veya çözünlülüğü arttıran (salting-in) tuzlar ise hidrofobik etkileşimde ters bir etkiye sahiptir [21]. Farklı tuzların hidrofobik etkileşim üzerine olan etkisi Hofmeister serisi ile Şekil 1'de belirtilmiştir. Serinin başında yer alan tuzlar, hidrofobik etkileşimi ve proteinlerin çökmesini teşvik ederken; serinin sonundaki tuzlar ise hidrofobik etkileşimin gücünü azaltmaktadır [29].

Çöktürme (salting-out) Etkisindeki Artış

Anyonlar: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-

Katyonlar: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Ba_2^+

Çözünürlüğü Arttırma (salting-in) Etkisindeki Artış

Şekil 1. Tuzların, proteinlerin çözünürlüğü üzerine etkisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde bağlanmayan proteinler kolondan yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra bağlanan proteinlerin seçici elüsyonu, mobil fazın iyonik

gücünün veya konsantrasyonunun azaltılması ile yapılmaktadır [27, 30]. Bu işlemin dışında, proteinlerin elüsyonu çeşitli uygulamalar ile

gerçekleştirilebilmektedir: (1) pH'nın artırılmasıyla birçok proteinin negatif yük kazanması sağlanmakta ve proteinler daha hidrofilik olmaktadır. Böylece proteinler ile hidrofobik ligandlar arasındaki etkileşim azalmaktadır. (2) Genellikle elüsyon üzerine etkisi çok az olmakla birlikte sıcaklığın düşürülmesi bu işlemin gerçekleşmesini desteklemektedir. (3) Liganda karşı güçlü bir çekime sahip olan veya proteini daha hidrofilik yapan alifatik alkol, alifatik aminler ve deterjanlar gibi bileşiklerin ilavesi ile de elüsyon işlemi kolaylaşmaktadır [20].

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ

Biyomoleküllerin pH, iyonik kuvvet, sıcaklık, tuz, çözücü veya polimerler ile çöktürülerek ayrılmasına dayanan geleneksel yöntemler zamanla yerini biyolojik özelliklere dayalı ayırma yöntemlerine bırakmıştır. Moleküler tanıma dayalı afinite kromatografisi, proteinlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin yerine biyolojik fonksiyonlarına göre ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir [31, 32]. Afinite kromatografisi biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, lektin afinitesi, boronat afinitesi, biyomimetik afinite ve metal iyonu afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmaktadır. Bu yöntemler protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikör saflaştırılmasında kullanılabilmektedir [33].

Afinite kromatografisinin, yüksek seçicilik özelliğine sahip olması, hızlı ve kullanımının kolay olması açısından diğer yöntemlere göre bazı ayrıcalıkları vardır [32]. Bu yöntemin en büyük avantajı, ideal koşullar altında hedef proteinin tek bir adımda saflaştırılabilmesidir. Ancak yöntemde kullanılan

materyaller pahalı olduğu için büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde kullanımı sınırlıdır [4]. Afinite kromatografisi, hedef biyomolekülün, çözünmeyen bir destek materyali (matriks) üzerine immobilize edilen ve hedef molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayalı bir yöntemdir [2, 32]. Ligand ile hedef molekül arasındaki biyolojik etkileşimler, elektrostatik veya hidrofobik interaksyonlar, van der Waals ve/veya hidrojen bağları ile gerçekleşebilmektedir. Hedef molekülün ortamdaki elüsyonu ya yarışmacı bir ligandın kullanılması ya da ortamın (mobil faz) pH, iyonik kuvvet veya polaritesinde değişimler yapılması ile sağlanmaktadır [34]. Bileşiğin kolondaki elüsyonu sırasında kullanılan mobil faz, bileşiği denatüre etmemeli ve bileşiğin spesifik aktivitesinde veya fonksiyonunda herhangi bir değişime de neden olmamalıdır [35].

Afinite kromatografisi matriksine bağlanan ligandın afiniteye uygun bir şekilde seçilmesi, kolon içerisinde ayrımın başarılı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan en önemli faktörlerden biridir. Bu kromatografi yönteminde yaygın olarak kullanılan ligandlar Tablo 3'de belirtilmiştir [36]. Bu ligandların çoğu biyolojik kökenli olmasına rağmen, ayırma için biyolojik kökenli olmayan doğal veya sentetik moleküller de kullanılmaktadır. Kökeni dikkate alınmaksızın bu moleküller yüksek spesifik özellikli ve genel amaçlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek spesifiklikteki ligandlar (monospesifik) sadece bir veya birkaç yakın özellikteki bileşiklere bağlanarak spesifik bir bileşiğin ayrımını sağlarken; genel amaçlı kullanılan ligandlar (grup spesifik) ise birbiriyle ilişkili bir sınıftaki moleküllere bağlanarak yapısal olarak birbirine benzer moleküllerin bulunduğu gruptaki bileşiklerin ayrımını sağlamaktadır [36,37].

Tablo 3. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar

Ligand Çeşidi	Tutulan Bileşik
Yüksek spesifiklikteki ligandlar	
Antikorlar	İlaçlar, hormonlar, peptitler, proteinler, virüsler
Enzim inhibitörleri ve kofaktörler	Enzimler
Nükleik asitler	Tamamlayıcı nükleik asit zincirleri, DNA/RNA'ya bağlanan proteinler
Genel ligandlar	
Lektinler	Şekerler, polisakkaritler, glikoproteinler, glikolipidler
A proteini ve G proteini	Bozulmamış antikorlar ve Fc parçaları
Boronatlar	Kateşoller, polisakkaritler, glikoproteinler
Sentetik boyalar	Dehidrojenazlar, kinazlar
Metal şelatlar	Metal bağlayıcı aminoasitler, peptitler, proteinler

Kolonda bileşiklerin ayrılmasına etki eden diğer önemli bir faktör de seçilen kolon matriksidir. Afinite kromatografisinde iyi bir kolon matriksinin şu özelliklere sahip olması istenmektedir: (1) hidrofilik (2) büyük gözenekli (3) sert (rigid) (4) inert (5) ayırma işleminde kullanılan kimyasallara karşı stabil [36]. Düşük performanslı afinite kromatografisinde destek materyali olarak genellikle agaroz, dekstran veya selüloz gibi büyük boyutlara sahip olan ve sert yapıda olmayan jeller kullanılırken; yüksek performanslı afinite kromatografisinde ise sistemdeki akış hızına ve/veya basınca dayanıklı silika veya sentetik polimer esaslı küçük ve sert partiküllerden oluşan destek materyalleri

kullanılmaktadır [37]. Boncuk şeklindeki agaroz jeller, iyi düzeyde mekanik dayanıma ve akış özelliklerine sahip makromoleküllerin rahatça geçişini sağlayacak yüksek poroziteye sahip oldukları ve daha da önemlisi bu materyaller bilenen kimyasal işlemlerden geçirilerek kolayca türevlendirilebildikleri için en sık kullanılan immobilize matrikslerdir [38].

Afinite kromatografisinde uygun ligandların katı matrikse bağlanmaları veya tutuklanmaları (immobilize edilmesi) kolonda ayrımın iyi bir şekilde yapılabilmesi için önemlidir. Ligandların immobilizasyonu amacıyla kullanılan yaygın uygulamalar; spesifik olmayan ve

biyospesifik adsorpsiyon gibi kovalent olmayan teknikler, kovalent bağlanma yöntemleri, hapsetme ve moleküler baskılama yöntemleridir. Uygun immobilizasyon tekniğinin seçimi, ligandın aktivitesini belirlediği için önemlidir [33]. Genel olarak immobilizasyon yöntemi en az iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama, destek materyalinin liganda kimyasal olarak bağlanabileceği bir forma dönüştürüldüğü aktivasyon aşamasıdır. İkinci aşama ise, uygun ligandın aktive edilen destek materyaline tutundurulduğu bağlanma aşamasıdır [36]. Ligandın immobilizasyonunu kolaylaştırmak için uygun fonksiyonel gruplardan yararlanılmaktadır. Bağlanmayı sağlayan başlıca fonksiyonel gruplar; primer (birincil) aminleri, sülfhidrilleri, aldehitleri, karboksilik asitleri ve hidroksilleri içermektedir [36, 38].

Ayrılması istenilen bileşiğin bulunduğu örnek, afinite kolonundan bileşik ile ligandın bağlanmasını sağlayacak doğru pH, iyonik kuvvet ve bileşime sahip uygulama tamponu (application buffer) olarak adlandırılan mobil fazın eşliğinde geçirilmektedir. Bu koşullar altında, örnek kolondan geçerken affinite ligandlarını uygun bağlanma uçlarından tamamlayan bileşikler, ligandlara bu bölgelerden bağlanmaktadır. Bağlanmayan diğer bileşikler de kolondan yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Bağlanmayan bileşikler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra kolonda tutulan bileşiklerin elüsyonu, kolondan bileşik ile ligand arasındaki bağlantının kesilmesini teşvik eden elüsyon tamponu (elution buffer) olarak adlandırılan mobil fazın geçirilmesiyle yapılmaktadır [33]. Elüsyon tamponunun da uygun pH, iyonik kuvvet ve bileşime sahip olması gerekmektedir. Mobil fazın pH değerindeki herhangi bir değişim hedef molekülün veya ligandın konformasyonunda bir değişime yol açabilmektedir. Bu yüzden bu değişiklikler yapılırken hedef molekülün, ligandın veya destek materyalinin yapısında geri dönüşümü olmayan denatürasyonların olmamasına dikkat edilmelidir. Diğer taraftan, mobil fazın iyonik kuvvetindeki ve tuz konsantrasyonundaki artış iyonik etkileşimleri bozarken, hidrofobik etkileşimlerin oluşmasını teşvik edebilmektedir. Katotrofik tuzlar bu durumu önlemek amacıyla kullanılabilir [39].

JEL FİLTASYON KROMATOGRAFİSİ

Boyut dışlama veya moleküler eleme kromatografisi olarak da bilinen jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin ve diğer biyolojik makromoleküllerin boyutlarındaki farklılığa dayalı bir ayırma tekniğidir. Bu teknik; bir veya daha fazla bileşenin izole edilmesinde, bir bileşiğin molekül ağırlığının belirlenmesinde, tamponun tuzdan arındırılmasında (desalting), protein yapısında olmayan kontaminantların (DNA, virüs) ve protein agregatlarının ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır [40, 41].

Jel filtrasyon kromatografisinin matrisi genellikle agaroz veya dekstran gibi doğal polimerlerden oluşabileceği gibi poliakrilamid gibi sentetik polimerlerden de oluşabilmektedir. Jeller bu moleküllerin çapraz bağlanarak üç boyutlu ağlar kurulmasıyla oluşmaktadır. Farklı gözenek boyutuna sahip jeller çapraz bağlanma

miktarında yapılan değişikliklerle elde edilebilmektedir. Bu kromatografide kullanılan ticari ilk matris, epiklorhidrin bileşiği ile çapraz bağlanan dekstran moleküllerinden oluşan dolgu materyalidir (Sephadex). Günümüzde geniş bir aralıkta gözenekliliğe sahip ticari birçok jel bulunmaktadır [3]. Bu yöntemde çapraz bağlı üç boyutlu moleküler ağdan oluşan boncuk şeklinde olan jellerdeki gözeneklerden, boyutları gözenek çapından daha küçük olan moleküller jelle nüfuz ederek geçebilirken, büyük moleküllerin geçişi engellenmektedir. Dolayısıyla jelle geçiş yapamayan büyük moleküller jelle geçiş yaparak ilerleyen küçük moleküllerden daha önce kolondan ayrılmaktadır [2, 35, 42].

Moleküllerin boyut ve şeklindeki farklılığa bağlı olarak gözeneklerden geçişi değişmektedir. Buna bağlı olarak, matris içindeki gözeneklerin boyutları moleküllerin matristen geçiş hızını belirlemektedir. Jel filtrasyon kromatografisinde başarılı bir şekilde ayırım yapabilmek boncukların gözenek çapına, kolon dolgu materyaline ve kolon uzunluğuna bağlıdır [2, 42]. Ayrıca örnek hacmi, örnek hacminin kolon hacmine oranı, partikül boyutu, akış hızı, örneğin ve tampon çözeltinin viskozitesi de ayırma etki etmektedir. En iyi ayırım uzun bir kolonda düşük akış hızında yapılan saflaştırma işlemiyle elde edilmektedir [40, 42]. Kolonun saflaştırma işlemine hazırlanmasında, kolon içerisinde dolgu materyalinin iyi bir şekilde dağılımını sağlamak amacıyla, dolgu materyali parçacıkları tampon içinde süspanse edilecek şekilde kolona paketlenir.

Günümüzde Sephadex'in yanı sıra çapraz bağlı poliakrilamid boncuklar da (Biogel) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çok büyük moleküller ve agregatlar için ise agaroz jellerin kullanılması daha başarılı sonuçlar vermektedir. Sefadex ve poliakrilamid jellerin kullanılmasında karşılaşılan en temel sorun yumuşak yapılı olmalarından kaynaklanmaktadır. Rutin bir saflaştırma işlemi sırasında karşılaşılan basınç değerleri, materyallerde sebep oldukları bozulmalardan dolayı akış özelliklerinde sorunlara yol açabilmekte ve akış hızı yavaşlayabilmektedir. Üreticilerin bu konu üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda, dekstranın akrilamid ile daha fazla çapraz bağlanması ile daha sert boncuklar üretilmiştir ve böylece yüksek basınçta ve akış hızında çalışmak mümkün olmuştur [42, 43]. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan jeller ve özellikleri Tablo 4'te belirtilmiştir [42].

Bu kromatografide moleküllerin iyi bir şekilde ayrılmasını, ayrılacak olan proteinlerin boyutunda ve stabilitesinde herhangi bir değişime neden olmadığı sürece tampon çözeltinin pH, iyonik kuvvet ve içeriği önemli ölçüde etkilemez [40]. Tampon çözeltinin seçiminde en önemli unsurlardan bir tanesi hedef molekül ile uyumlu olmasıdır. Bu yüzden konformasyonel değişikliklere, biyolojik olarak aktif bir bileşiğin inaktive edilmesine veya proteinlerin alt birimlere ayrıştırılmasına sebep olmayan, uygun tamponun seçimine dikkat edilmesi gerekmektedir [42].

Tablo 4. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan jeller

Jel	Materyal	Kullanılan kütle aralığı (Da)
Sephadex G-10	Dekstran	700'e kadar
G-15		1500'e kadar
G-25		100-5000
G-50		1500-30000
G-75		3000-70000
G-100		4000-150000
G-150		5000-300000
G-200		10000-600000
Bio-Gel P-2	Poliakrilamid	100-1800
P-4		800-4000
P-6		1000-6000
P-10		1500-20000
P-30		2500-40000
P-60		3000-60000
P-100		5000-100000
P-150		15000-150000
LKB Ultrogel AcA202	Agaroz	1000-22000
AcA54	Agaroz/poliakrilamid	3000-90000
AcA44		10000-200000
AcA34		20000-350000
Pharmacia CL-2B	Çapraz bağlı agaroz	70000-4x10 ⁷
Superdex 75		3000-70000
200		10000-600000
Sepharose CL-4B		60000-2x10 ⁷
CL-6B		10000-4x10 ⁶
Sephacryl S-100 HR	Çapraz bağlı dekstran/bisakrilamid	1000-1x10 ⁵
S-200 HR		5000-2.5x10 ⁵
S-300 HR		10000-1.5x10 ⁵
S-400 HR		20000-8x10 ⁶
S-500 HR		40000-2x10 ⁷
S-1000 SF		5x10 ⁵ -10 ⁶
Bio-Rad A-0.5m	Agaroz	10000-5x10 ⁵
Bio-Gel A-1.5m		10000-1.5x10 ⁵
A-5m		10000-5x10 ⁶
A-15m		40000-1.5x10 ⁷
LKB Ultrogel A2	Agaroz	4x10 ⁶ 'ya kadar
A4		2x10 ⁷ 'ye kadar
A6		5x10 ⁷ 'ye kadar

SONUÇ

Proteinlerin saflaştırılması işleminde bir seri ayırma metodu yer almaktadır. Saflaştırma işleminin mümkün olduğu kadar az aşamada ve kısa sürede gerçekleştirilmesi, işlemin maliyeti açısından önemlidir. Ayrıca işlem sırasında gerçekleşen ürün kayıplarını da en aza indirecektir. Bu yüzden, saflaştırma işleminde ürün özelliklerini göz önünde bulundurarak etkili ve verimli ayırma yöntemini seçmek gerekmektedir. Bu çalışmada, saflaştırma işlemi için kullanılan 4 farklı temel kromatografik yöntemin çalışma prensiplerine yer verilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Poole, C.F., 2000. Chromatography. <http://www.kau.edu.sa/GetFile.aspx?id=108121&Ln g=AR&fn=CHROMATOGRAPHY.pdf>
- [2] Kumpalume, P., Ghose, S., 2003. Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. In: Isolation and Purification of Proteins,

R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, pp. 29-56, New York.

- [3] Hedhammar, M., Karlström, A.E., Hober, S., 2013. Chromatographic methods for protein purification. http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2040_ENG/ChromMethods.pdf
- [4] Doonan, S., Cutler, P., 2004. General Strategies. In: Protein Purification Protocols, P. Cutler (Editor), Humana Press, pp. 1-13, New Jersey.
- [5] Scopes, R.K., 2000. Protein Separation. In: Encyclopedia of Separation Science, M. Cooke and C.F. Poole (Editors), Academic Press, pp. 405-410, USA.
- [6] Sheehan, D., Fitzgerald, R., 2008. Ion-Exchange Chromatography. In: Molecular Biomethods Handbook, R. Rapley and J.M. Walker (Editors), Humana Press, pp. 445-449, New Jersey.
- [7] Selkirk, C., 2004. Ion-exchange chromatography. *Methods in Molecular Biology* 244: 125-131.
- [8] Yamamoto, S., Miyagawa, E., 2000. Dynamic binding performance of large biomolecules such as γ -globulin, viruses and virus-like particles on various chromatographic supports. In:

- Bioseparation Engineering, I. Endo, T. Nagamune, S. Katoh and T. Yonemoto (Editors), Elsevier, pp. 81-86, New York.
- [9] Whitford, D., 2005. Protein expression, purification and characterization. In: *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, pp. 313-346, England.
- [10] Kenney, A.C., 1992. Ion-Exchange Chromatography of Proteins. In: *Methods in Molecular Biology*, A. Kenney and S. Fowell (Editors), Humana Press, pp. 249-258, New Jersey.
- [11] Pohl, C.A., Stillian, J.R., Jackson, P.E., 1997. Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 789(1-2): 29-41.
- [12] Haddad, P.R., Jackson, P.E., 1990. Ion Chromatography: principles and applications. In: *Journal of Chromatography Library-Volume 46*, Elsevier, pp. 1-28, Amsterdam.
- [13] Yamamoto, S., Ishihara, T., 1999. Ion-exchange chromatography of proteins near the isoelectric points. *Journal of Chromatography A* 852(1): 31-36.
- [14] Hagel, L., Jagschies, G., Sofer, G., 2008. Separation Technologies. In: *Handbook of Process Chromatography*, Elsevier, pp. 81-122, London.
- [15] Haky, J.E., 2004. Ion-Exchange Buffers. In: *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, pp. 794-795, New York.
- [16] Gooding, K.M., 2004. Ion Exchange: Mechanism and Factors Affecting Separation. In: *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, pp. 790-793, New York.
- [17] McCue, P.P., Shetty, K., 2006. Principles of Biochemistry and Molecular Biology. In: *Food Biotechnology*, K. Shetty, A. Pometto and R. E. Levin (Editors), CRC Press, pp. 19-32, Boca Raton.
- [18] Anonymous, 2002. Ion Exchange Chromatography. In: *Protein Separation (Handbook Collection Amersham)*, pp. 498-654.
- [19] Sadana, A., 1998. Protein Inactivations during Chromatographic Methods of Separation. In: *Bioseparation of Proteins*, S. Ahuja (Editor), Academic Press, pp. 135-176, New York.
- [20] Roe, S., 1989. Separation Based on Structure. In: *Protein Purification Methods (a practical approach)*, E.L.V. Harris and S. Angal (Editors), Oxford University Press, pp. 175-242, New York.
- [21] Grund, E., 1998. Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. In: *Bioseparation and Bioprocessing*, G. Subramanian (Editor), Wiley-VCH, pp. 65-87, New York.
- [22] Gooding, K.M., 2004. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, pp. 751-754, New York.
- [23] Lienqueo, M.E., Mahn, A., Vásquez, L., Asenjo, J.A., 2003. Methodology for predicting the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography and its application to a cell extract. *Journal of Chromatography A* 1009: 189-196.
- [24] Hearn, M.T.W., 2002. Reversed-Phase and Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins and Peptides. In: *HPLC of Biological Macromolecules*, K.M. Gooding and F.E. Regnier (Editors), Marcel Dekker, pp. 99-245, New York.
- [25] Mahn, A., Asenjo, J.A., 2005. Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology Advances* 23: 359-368.
- [26] Anonymous, 2002. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: *Protein Separation (Handbook Collection Amersham)*, pp. 2-104.
- [27] O'Farrell, P.A., 2008. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: *Molecular Biomethods Handbook*, R. Rapley and J.M. Walker (Editors), Humana Press, pp. 461-467, New Jersey.
- [28] Jennissen, H.P., 2000. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: *Encyclopedia of Separation Science*, M. Cooke and C.F. Poole (Editors), Academic Press, pp. 265-272, USA.
- [29] Queiroz, J.A., Tomaz, C.T., Cabral, J.M.S., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* 87: 143-159.
- [30] Cartwright, T., 2001. Protein purifications from mammalian cell culture. In: *Protein Purification Applications*, S. Roe (Editor), Oxford University Press, pp. 49-71, New York.
- [31] Zou, H., Luo, Q., Zhou, D., 2001. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49: 199-240.
- [32] Wilchek, M., Chaiken, I., 2000. An Overview of Affinity Chromatography. In: *Affinity Chromatography-Methods and Protocols*, P. Bailon, G.K. Ehrlich, Wen-Jian Fung and W. Berthold (Editors), Humana Press, pp. 1-6, New Jersey.
- [33] Hage, D.S., 2006. Handbook of Affinity Chromatography, D.S. Hage and J. Cazes (Editors), CRC Press, p 856, Boca Raton.
- [34] Anonymous, 2002. Affinity Chromatography. In: *Protein Separation (Handbook Collection Amersham)*, pp. 230-389.
- [35] Ostrove, S., 1990. Affinity Chromatography: General Methods. In: *Methods in Enzymology*, J.N. Abelson and M.I. Simon (Editors), Academic Press, pp. 357-371, New York.
- [36] Hage, D.S., Clarke, W., 2004. Affinity Chromatography: An Overview. In: *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, pp. 40-43, New York.
- [37] Hage, D.S., 1999. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clinical Chemistry*, 45, 593-615.
- [38] Rosenberg, I.M. 2005. Affinity Chromatography. In: *Protein Analysis and Purification (Benchtop Techniques)*, Birkhäuser, pp. 363-381, Basel.
- [39] Firer, M.A., 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49: 433-442.
- [40] Anonymous, 2002. Gel Filtration. In: *Protein Separation (Handbook Collection Amersham)*, pp. 106-227.
- [41] Cutler, P., 2004. Size-Exclusion Chromatography. In: *Protein Purification Protocols*, P. Cutler (Editor), Humana Press, pp. 239-252, New Jersey.
- [42] Rosenberg, I.M., 2005. Gel Filtration Chromatography. In: *Protein Analysis and*

Purification (Benchtop Techniques), Birkhäuser, pp. 326-338, Basel.

[43] Winzor, D.J., 2003. Analytical exclusion chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 56: 15-52.