



Alerjen Proteinlerin Saflaştırılmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Serkan SUGEÇTİ¹, Adem İMALI², Ferudun KOÇER^{3*}

¹Altınbaş Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Elektronörofizyoloji Programı, İstanbul

²Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Yusuf Şerefoğlu Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kilis

³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Üniversite-Sanayi - Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÜSKİM), Kahramanmaraş

**kocerferudun@gmail.com*

Özet

İnsanların % 10 unda rastlanan alerjenite yurtdışında birçok araştırmacı tarafından farklı yöntemler ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, alerjen proteinlerinin saflaştırılması için kullanılan yöntemler incelenmiştir.

Alerjenlerin belirlenmesinde kullanılan tamponlar ve işlemler birçok farklılıklar içermektedir. İncelenen kromatografik yöntemler; jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, ters faz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, membran kromatografisi, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektroforetik yöntemler ise; izoelektrik odaklama, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve 2 boyutlu elektroforezdir.

Kullanılacak olan yöntemler saflaştırılması arzu edilen proteinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri göz önüne alınarak seçilmektedir. Proteini, en saf halde elde edebilmek için bu yöntemlerin çoğu ardışık olarak uygulanmaktadır. En fazla miktarda protein, membran kromatografisiyle, en az miktarda protein, affinite kromatografisi ile elde edilmektedir. Bu sebeple birçok yöntemin kendine özgü özellikleri ve avantajları mevcuttur.

Güncel bilgiler ile kullanılan kimyasal ve cihazların belirlenmesi ve uygun yöntemler ile ortak bir kullanım tespiti birçok avantajlar sağlayacaktır. Son yıllarda, elde edilen saf proteinler, birçok alanda kullanıma sunulmakta ve bu alan hızla gelişen bir sektör olarak diğer sektörler arasında yerini almaktadır. Saflaştırmada izlenecek kriterler incelenerek alerjenlerin saflaştırılmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alerjen, saflaştırma, elektroforetik yöntemler, kromatografik yöntemler



Molecular Methods Used in the Purification of Allergen Proteins

Abstract

Allergenicity of 10% of people is determined by different methods by many researchers abroad. In this study, the methods used to purify the protein allergen is examined.

Buffers and procedures used to identify allergens include many variations Examination of chromatographic methods; gel filtration chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, reversed phase chromatography, hydrophobic interaction chromatography, membrane chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and electrophoretic methods; isoelectric focusing, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and 2-D electrophoresis.

The methods to be used are selected by considering the physical, chemical and biological properties of the desired protein. Most of these methods are applied sequentially to obtain the protein in its purest form. The maximum amount of protein is obtained by membrane chromatography, with minimal amount of protein, affinity chromatography. For this reason, many methods have their own characteristics and advantages.

Identification of the current information, the chemicals and devices used, and the determination of a common usage by appropriate methods will provide many advantages. In recent years, the obtained pure proteins have been used in many fields and this area is among the other sectors as a rapidly developing sector. It is thought that the purifying criteria will be useful for the purification of allergens.

Keywords: Alergen, purification, electrophoretic methods, chromatographic methods



GİRİŞ

Medeniyetin gelişmesi, doğal çevrenin kirletilmesi gibi çevresel sorunlar yeni sağlık problemlerini de beraberinde getirmektedir. Dünyada alerjiden muzdarip olan insanların oranı % 15 ile % 30, mevsimsel rinitli insanların oranı ise % 10 ile % 15 civarındadır. Semptomların türü ne olursa olsun alerji, fiziksel durumu ve konsantrasyonu zayıflatan kronik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (1-3).

Alerjenin kaynağı farklılık göstermekle birlikte gıda ve aeroalerjenler ön plana çıkmaktadır. Aeroalerjenler, iç ve dış ortam alerjenleri olarak iki grupta incelenmektedir. İç ortam alerjenleri ev, ofis ve okul gibi kapalı alanlarda rastlanmaktadır. Dış ortam alerjenleri ise atmosferde yer alan ve rüzgâr akımları etkisi ile uzak mesafelere taşınabilen polen ve mantar sporlarını kapsamaktadır (4).

Polenler, mantar sporları, ev tozu akarları, hayvan kılı, epiteli, tüyleri ve salgısı, hamamböceği, besinler, ilaçlar lateks ve arı venomu(zehiri) en sık karşılaşılan alerjenlerdir (4,5).

1980'lerin sonu ile 1990'ların başlarında alerjenleri tanımlamak için moleküler tekniklerin gelişmesi ile belirlenen alerjenlerin sayısında artış olmuştur. Birçok alerjenin nükleotid sekansları, cDNA klonlama ve PCR tabanlı dizileme gibi moleküler yöntemler ile tanımlanması yapılmaya başlanmıştır (5-8).

Alerjenlerin Biyolojik Yapısı

Alerjenlerin moleküler yapısı, biyolojik fonksiyonu, homolog protein dizileri ve bunların fonksiyonlarına yönelik çalışmaların verilerine GENBANK, EMBL ve diğer birçok veritabanından sağlanabilmektedir.

500'den fazla protein dizisi protein veritabanlarında (Gen Bank,PDB) depolanmış ve yaklaşık 50 tanesinin üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır.



Alerjenlerin çeşitli biyolojik fonksiyonları vardır. Alerjenler enzim, enzim inhibitör, lipit bağlayıcı protein, lipokalin, düzenleyici veya yapısal protein olabilirler. Alerjenler 10-70 kDa molekül ağırlığında olup çözünür proteinler veya glikoprotein yapısındadırlar. Birçok alerjen protein geniş pH değişim aralıklarına ve 100 °C sıcaklıklara kadar dayanma özelliğine sahiptir.

Alerjenler T hücrelerini desteklemek için Th₂ yolu boyunca IL-4, IL-13 üretir ve IgE izotip geçişini başlatırlar. Proteolitik enzim aktivitesi gibi alerjenlerin biyolojik fonksiyonları veya diğer yabancı madde etkileri IgE yanıtlarını arttırarak, akciğer epitelinde tahribata uğratabilir ve alerjik iltihaba neden olabilir (9).

Polen Alerjenleri

Polenler atmosfere çok fazla miktarda dağıldıklarından ve hemen her mevsim havada gözlemlendiklerinden dolayı, polen alerjisi alerjiden kaçınma bakımından tedavisi güç alerjilerden bir tanesidir. Büyük şehirlerde devamlı değişen ve artan peyzajın yanı sıra, küresel ısınma gibi çevresel faktörlerin de etkisiyle atmosferde yer alan polenlerin çeşit ve sıklığında artış meydana gelmektedir (10-12)

Polende yer alan antijenler aynı zamanda bitkinin kök, gövde, yaprak, tohum ve meyve gibi diğer kısımlarında da yer alabilmektedir. Bu nedenle solunum yolu ile alınan alerjenler ile gıda alerjenleri arasında birçok çapraz reaktivite saptanmıştır.

Pfam (protein aileleri) veritabanı (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) içerisinde 157 polen alerjeninin karşılaştırılması yapılmaktadır. Polen alerjenleri içerisinde 29 protein ailesinde toplam 2615 bitki türü yer almaktadır (13).

Mantar Alerjenleri

Mantar alerjisi yılın birkaç ayı meydana gelen tipik mevsimsel bir alerji olarak kabul edilmez. Ilıman bölgelerde genellikle yaz ve sonbahar boyunca yüksek sayıda sporlar gözlenirken, soğuk havalarda azalır ve kar varlığında yok olurlar. Mantar sporlarının asıl



kaynağını halılar, duvar kağıtları, ısıtma sistemleri ve klimalar oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar ile türlerin (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum* ve *Epicoccum nigrum* vs.) biyokimyasal kompozisyonlarında önemli farklılıklar olduğu gösterilmektedir (14-15) (Çizelge 1).

Alerjen kaynağı ve diğer hastalıklara neden olan *Aspergillus* sp. sporları ilk olarak tespit edilmiştir. *A. alternata* major alerjenleri arasında Alt a 1 (50 kDa), glikoprotein ile en az 5 izoformu ve Alt a 2'nin %80'den fazlasının alerjenik hastalıklara neden olduğu belirtilmiştir (16,17).

Diğer Alerjen Grupları

En önemli hayvansal besin alerjenleri süt, yumurta ve deniz ürünlerinde mevcuttur. Besin alerjenlerinin en büyük kısmını Prolamin oluşturur. Memeliler de süt alerjenleri dominant olarak 3 protein ailesinde bulunur; a-Laktalbumin, b-Laktoglobulin, Kazal tip serin proteaz proteinleridir. Ayrıca gıda alerjenleri içerisinde kuruyemişlerde (fındık, fıstık, ceviz vs.) önemli bir kaynak durumundadır. İç ve dış ortamda bulunan kedi, köpek, akarlar ve bazı böcek türleri de alerjen kaynağı olarak belirlenmiştir (9,13,18) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Ülkemizde yaygın olarak bulunan aeroalerjenler

Polenler	Funguslar	Diğerleri
<i>Poaceae</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Dermatophagoides spp.</i>
<i>Oleaceae,</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Canis spp.</i>
<i>Betulaceae</i>	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Felis spp.</i>
<i>Pinaceae</i>	<i>Cladosporium spp.</i>	<i>Blatella spp.</i>

Ülkemizde yapılan çalışmalarda yaygın olarak bulunan aeroalerjenlerin Çizelge 1'de bulunan polen, fungus ve diğerlerine ait gruplar olduğu belirlenmiştir (12,14,15).



Alerjen proteinlerin önemli bir parçası olarak sistematik adlandırmada moleküler yapısının tanımlanması, biyokimyasal ve immünolojik kriterlerin belirlenmesi önemlidir. Başlangıçta biyokimyasal kriterler olarak SDS-PAGE, IEF, HPLC, ELISA ve ayrıca fizikokimyasal özellikleri molekül ağırlığı, izoelektrik noktası protein saflığını ve türünü belirlemek için kullanılmaktadır. Günümüzde ise tanımlamada nükleotit ve aminoasit dizilimi gerekli görülmektedir (5,19-21).

Elektroforetik Yöntemler

Elektroforetik yöntemler içerisinde proteinlerin izlenmesi ve saflaştırılmasında SDS-PAGE yöntemi kullanılmaktadır. SDS-PAGE yönteminde proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımına olanak sağlamaktadır. Bu yönteme ilave olarak geliştirilen diğer bir metot ise farklı pH gradientinde proteinlerin ayrılması metodu, yine farklı izoelektrik noktalarına göre ayırım sağlayan 2D-PAGE metodu saflaştırmada sıklıkla tercih edilmektedir. SDS-PAGE ile elde edilen saf ürün sınırlı olmakla birlikte 2D-PAGE ile saflaştırma yüzdesi daha da artmaktadır (22).

Western Blotlama elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Proteinler, membran, sitoplazmik ve nükleus kaynaklı olabilmektedirler (22, 23).

Çizelge 2. Alerjenlerin saflaştırılmasında kullanılan elektroforetik yöntemler

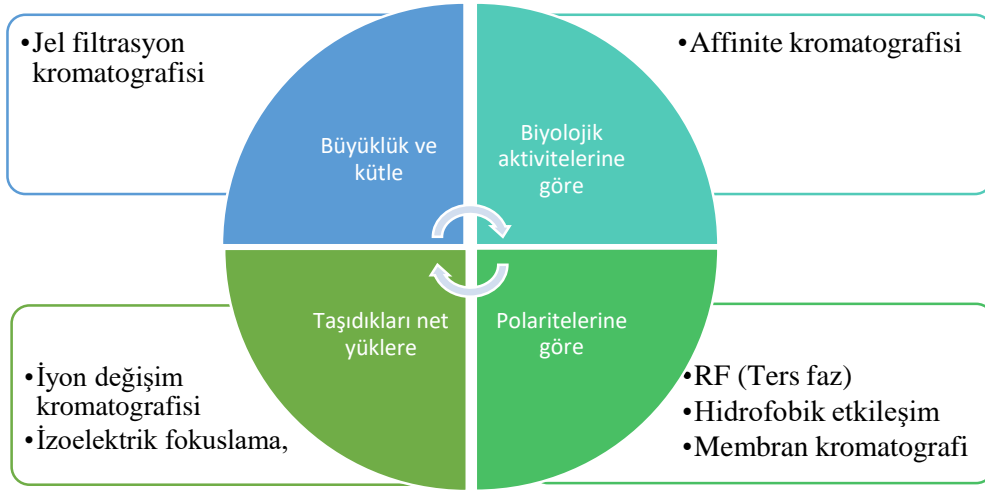
Alerjen Kaynağı	Protein Adı	Saflaştırma Yöntemi	Literatür
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 1	2 D PAGE Kapiler likit	Raftery ve ark. (2003) [24]
<i>Cynodon dactylon</i>	Enolase 12 alerjenik protein	2D PAGE	Kao ve ark. (2005) [25]
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 3	2D-PAGE Hidrofobik etkileşim Katyon değişim	Petersen, (2006) [26]
<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 1	2 D PAGE	Erlar ve ark. (2011)[27]
Süt	serum albumin α -casein lactoferrin	İmmünoaffinite Kapiler elektroforez	Gasilova ve Girault, (2014)[18]
<i>Alnus orientalis</i>	PR-10 Aln o 1	SDS-PAGE Western Blot Hidrofobik etkileşim Moleküler boyutlama	Koçer, (2015) [28]
<i>Helianthus annuus</i>	Pectate lyase Cysteine protease	SDS-PAGE Western Blot 2D PAGE	Ghosh ve ark. (2015) [29]
<i>Ailanthus altissima</i>	Amb a 11	2D PAGE SDS-PAGE HPLC	Bouley ve ark. (2015) [30]

Kromatografik Yöntemler

HPLC, kompleks karışımları yüksek bir duyarlılıkla bileşenlerine ayıran her bir bileşimin kalitatif ve kantitatif analizini sağlayan bir tekniktir. Elde edilen sonuçların kesin ve tekrarlanabilir olması bu yöntemi üstün kılmaktadır. Kromatografik teknikler içerisinde HPLC, bütün ayırma teknikleri arasında günümüzde sıklıkla kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya çevre şartlarından etkilenen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi, birçok bilimsel araştırmalarda ve sanayi alanında kullanılan maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Makro ve mikro moleküler yapılar başta olmak üzere proteinler, aminoasitler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, çeşitli organik ve inorganik bileşikler, antibiyotikler,

steroidler ve diğ er ilaçlar örnek verilebilir. Sıvı kromatografi çalışmalarının % 90 kadarı ters faz sıvı kromatografi modunda gerçekleştirilir (28,31,34).

Alerjen proteinlerin özelliklerine göre birçok kromatografik yöntem tek başına veya kombine bir şekilde kullanılabilme kedir. Proteinlerin moleküler yüklerine göre iyon de ğ iş im ve izoelektrik odaklama yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (5,35) (Ş ekil 1).



Ş ekil 1. Proteinlerin özelliklerine göre kromatografik yöntemler

Hidrofobik etkileş im kromatografisi (HIC) protein moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik etkileş ime dayanır. Durgun faz hidrofilik bir polimere (dekstran veya agaroz) ba ğ lı küçük non-polar grupları (butil, oktil veya fenil) iç ermektedir. Hidrofobik etkileş im kromatografisinde ilgili proteinin bulundu ğ u fraksiyon yüksek tuz deriş imi iç eren tampon iç erisinde (genellikle amonyum sülfat) kolona yük lenir. Ba ğ lı proteinlerin kolondan uzaklaşt ırılması ise tampondaki tuz deriş imi azaltılarak yapılır. Yani negatif tuz gradienti oluşturularak yıkama yapılır. Bu yöntem özellikle amonyum sülfat gibi tuzlarla yapılan ç öktürmeden sonra proteinlerin daha ileri saflaşt ırılması için idealdir [36, 37]. *Moleküler dış lama kromatografisi (size exclusion chromatography; SEC)*, polimerleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan bir HPLC yöntemidir. Moleküler dış lama



kromatografisiyle ayrılmış molekülleri genelde kırılma indisi detektörü, spektrofotometrik detektörler ya da diğer derişim ölçen detektörlerce saptanmaktadır. Molekül kütlesi detektörlerine sahip SEC sistemi kullanılarak protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri, protein-polisakkarit kompleksleri, polimer-protein konjugatları ve derecesinin belirlenmesine olanak sunmaktadır (28, 38) (Çizelge 3).

Kromatografik yöntemler içerisinde jel filtrasyon, iyon değişim, ters faz, membran ve affinite kromatografisi saflaştırma metodunun yolağının belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlerdir. Elde edilecek ürünün özelliklerine göre tercih edilmektedirler.

Çizelge 3. Alerjenlerin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik yöntemler

Alerjen Kaynağı	Proteinin Adı	Saflaştırma Yöntemi	Literatür
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Cha o 1	İyon Değişim Kromatografisi SDS-PAGE	Suzuki ve ark., (1996) [39]
<i>Olea europaea</i>	Ole e 7	Jel filtrasyon Kromatografisi Ters Faz HPLC	Tejera ve ark., (1999) [40]
<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 7	Ters Faz HPLC	Cadot ve ark., (2000) [41]
<i>Olea europaea</i>	Ole e 9	Hidrofobik Etkileşim Ters Faz Kromatografisi	Huecas ve ark., (2001) [42]
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 1	Affinite Kromografisi 2D PAGE	Wu ve ark., (2001) [43]
<i>Plantago lanceolata</i>	Pla l 1	Ters Faz Kromatografisi Boyut Dışlama	Calabozo ve ark., (2001) [44]
<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 2	İyon Değişim Kromatografisi Jel Permayon Kromatografi	Ibarrola ve ark., (2004) [45]
<i>Chenopodium album</i>	Che a 2 Che a 3	Ters Faz Kromatografisi	Barderas ve ark., (2004) [46]
<i>Quercus alba</i>	Que a 1	Afinite Kromatografisi	Movérare ve ark., (2008) [47]
Soya Fasülyesi	Glycinin	UHPLC	Planque ve ark. (2016) [48]
Süt	Casein		
Yumurta	Ovalbumin		
Fıstık	Cupin		

SONUÇLAR

Alerjen proteinlerin saflaştırılmasında elektroforetik ve kromatografik teknikler kullanıldığı belirlenmiştir. Bu iki tekniğinde kullanım amacına uygun olması gereklidir.



Çalışmada elde edilecek ürünün özelliklerinin belirlenmesi için ileri düzey moleküler yöntemler (Kristallografi, DNA ve RNA tabanlı tanımlamalar, MALDİ-TOF vs.) ile devam edilmesi gerekmektedir.

Güncel bilgiler ile kullanılan kimyasal ve cihazların belirlenmesi ve uygun yöntemler ile ortak bir kullanım tespiti birçok avantajlar sağlayacaktır. Son yıllarda, elde edilen saf proteinler, birçok alanda kullanıma sunulmakta ve bu alan hızla gelişen bir sektör olarak diğer sektörler arasında yerini almaktadır. Safılaştırmada izlenecek kriterler incelenerek alerjenlerin safılaştırılmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Moleküler yöntemlerin ülkemizde farklı alanlarda kullanımını giderek yaygınlaşmakta olup ancak alerjenler üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Alerjen proteinlerin safılaştırılmasında ülkemiz bilim insanlarına önemli görevler düşmektedir.



KAYNAKLAR

- (1) Aas K, Bachert C, Bergmann K, Bergmann R, Bonini S, Bousquet J, De Weck A, Farkas I, Hejdenberg K.. European White Paper: Allergic Diseases as a Health Problem. The UCB Institute of Allergy. Brussels, Belgium. 1997
- (2) Huynen M, Menne BC. Phenology and Human Health: Allergic Disorders, Report of a WHO meeting in Rome, Italy. 16–17 Jan 2003. Health and Global Environmental Series EUR/03/5036791. World Health Organization, 2003; 64.
- (3) Puc M. Characterization of Pollen Allergens. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2003; 10: 143-149.
- (4) Sin A B, Pınar NM, Mısırlıgil Z, Çeter T, Yıldız A, Alan Ş. Polen Allerjisi; Türkiye Allerjik Bitkilerine Genel Bir Bakış. 1.Baskı, Engin Yayınevi, Ankara. 2007.
- (5) Pastorello EA, Trambaioli C. Isolation of food allergens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756(1–2):71–84
- (6) Scheiner O, Kraft D. Basic and Practical Aspects of Recombinant Allergens. *Allergy*, 1995; 50(5):384–391.
- (7) Thomas WR. Mite Allergens Groups I-VII. A Catalogue of Enzymes. *Clinical & Experimental Allergy*, 1993; 23(5): 350–353.
- (8) Chapman MD.. Allergen Nomenclature. In: Lockey RF, Bukantz SC, Bousquet J, editors. *Allergens and Allergen Immunotherapy*. New York: Marcel Decker, 2003;51-64.
- (9) Chapman MD.. Indoor Allergens, Diagnosis and Treatment of Allergic Disease, Chapter 25, 2010; 266-273.
- (10) Cacciola RR, Sarva M, Polosa R.. Adverse Respiratory Effects and Allergic Susceptibility in Relation to Particulate Air Pollution: Flirting With Disaster. *Allergy*, 2002;



57: 281-6.

(11) D'amato G. Environmental Urban Factors (Air Pollution and Allergens) and The Rising Trends in Allergic Respiratory Diseases. *Allergy*, 2002; 57: 30-3.

(12) Pınar NM, Akgül G, Tuğ G N. *Palinoloji Laboratuar Kılavuzu*, Ankara Üniversitesi Yayınları, No: 66 Ankara, 2003; 71.

(13) Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and Structural Biology of Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007; 119: 414-420.

(14) Çeter T, Pınar NM. Türkiye'de Yapılan Atmosferik Fungus Spor Çalışmaları ve Kullanılan Yöntemler. *Asthma Allergy Immunology/Astim Allerji Immunoloji*, 2009; 7(1).

(15) İmalı A, Koçer F, Yalçinkaya B. Microfungus Flora of Indoor and Outdoor Air in Primary Schools, Çorum, Turkey. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences (AJBAS)*, 2011; 2274-2278.

(16) Unger A, Stöger P, Simon-Nobbe B, Susani M, Cramer R, Ebner C, Hintner H, Breitenbach M. Clinical Testing of Recombinant Allergens of The Mold *Alternaria alternata*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1999; 118: 220-221.

(17) Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 113(2), 227-234.

(18) Gasilova N, Girault HH. Component-Resolved Diagnostic of Cow's Milk Allergy by Immunoaffinity Capillary Electrophoresis–Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2014; 6:6337-6345.

(19) King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen Nomenclature. *Bulletin of the World Health Organization*, 1994; 72:797–806

(20) Esch ER. Allergen Source Materials and Quality Control of Allergenic Extracts, *A Companion to Methods in Enzymology* 1997; 13, 2–13.

(21) Aalberse RC. Structural Biology of Allergens. *Journal of Allergy and Clinical*



Immunology, 2000; 106(2):228–238.

(22) Burgess RR, Deutscher MP. (Eds.). Guide to Protein Purification (Vol. 463). Academic Press. 2009; 854

(23) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979; 76: 4350-4.

(24) Raftery MJ, Saldanha RG, Geczy CL, Kumar RK. Mass Spectrometric Analysis of Electrophoretically Separated Allergens and Proteases in Grass Pollen Diffusates. Respiratory Research, 2003; 4(1), 10.

(25) Kao SH, Su SN, Huang SW, Tsai JJ, Chow LP. Sub-Proteome Analysis of novel IgE-binding proteins from Bermuda Grass Pollen. Proteomics, 2005; 5(14):3805-3813.

(26) Petersen A, Suck R, Lindner B, Georgieva D, Ernst M, Notbohm H, Wicklein D, Cromwell, O, Becker WM. *Phl p 3*: Structural and Immunological Characterization of A Major Allergen of Timothy Grass Pollen. Clinical & Experimental Allergy, 2006;36(6): 840-849.

(27) Erler A, Hawranek T, Krückemeier L, Asam C, Egger M, Ferreira F, Briza P. Proteomic Profiling of Birch (*Betula verrucosa*) Pollen Extracts From Different Origins. Proteomics, 2011; 11(8):1486-1498.

(28) Koçer F. Betulaceae Familyası Duyarlı Hastalarda *Alnus orientalis* (Doğu Kızılağacı) Decne. Polenine Karşı Gösterilen IgE Reaktivite Profilinin Belirlenmesi ve Majör Alerjenlerinin Saflaştırılması, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015; s.93.

(29) Ghosh N, Sircar G, Saha B, Pandey N, Bhattacharya SG. Search for Allergens From The Pollen Proteome of Sunflower (*Helianthus annuus* L.): a Major Sensitizer for Respiratory Allergy Patients. PloS one, 2015; 10(9), e0138992.

(30) Bouley J, Groeme R, Le Mignon M, Jain K, Chabre H, Bordas-Le Floch V,



Baron-Bodo V, Lombardi V, Mascarell L, Batard T, Nony E, Moingeon P. Identification of The Cysteine Protease *Amb a 11* as a Novel Major Allergen From Short Ragweed. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015; 136(4), 1055-1064.

(31) Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. Enstrümental Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, ISBN: 975-55-041-6, 1997; 849

(32) Tuncer M. Protein Saflaştırma 1: Kromatografik Teknikler, Mersin Üniversitesi Yayınları, ISBN: 978-9756-900215, 2008; 268.

(33) Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons. 2010; 912.

(34) Riley CM, Rosanske TW, Riley SRR. Specification of Drug Substances and Products: Development and Validation of Analytical Methods 2013; Vol. 3. Newnes

(35) Toker NY. Protein Saflaştırılması İle İlgili Bazı Metodlar, *Vetfakdergi*, 2000;2:12.

(36) Vijayalakshmi MA. Biochromatography Theory and Practice, Taylor and Francis London & NY. 2002

(37) Metin K. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Ankara, 2007; 555-598,

(38) Mourey TH. SEC Molecular-Weight-Sensitive Detection. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2004; 9: 97-135.

(39) Suzuki M, Komiyama N, Itoh M, Itoh H, Sone T, Kino K, Takagi I, Ohta N. Purification, Characterization and Molecular Cloning of *Cha o 1*, a Major Allergen of *Chamaecyparis obtusa* (*Japanese cypress*) Pollen. *Molecular Immunology*, 1996; 33(4):451-460.

(40) Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Identification, Isolation, and



Characterization of *Ole e 7*, a New Allergen of Olive Tree Pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999; 104(4), 797-802.

(41) Cadot P, Diaz JF, Proost PJVD, Van Damme J, Engelborghs Y, Stevens EAM, Ceuppens JL. Purification and Characterization of an 18-kDa Allergen of Birch (*Betula verrucosa*) Pollen: Identification as a Cyclophilin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000; 105(2), 286-291.

(42) Huecas S, Villalba M, Rodríguez R.. *Ole e 9*, a Major Olive Pollen Allergen is a 1, 3- β -glucanase Isolation, Characterization, Amino Acid Sequence, and Tissue Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276(30):27959-27966.

(43) Wu WC, Tam MF, Peng HJ, Tsai LC, Chi CW, Chang ZN. Isolation and Partial Characterization of a 46-kd Allergen of Bermuda Grass Pollen. *Journal of Biomedical Science*, 2001; 8(4): 342-348.

(44) Calabozo B, Barber D, Polo F. Purification and Characterization of The Main Allergen of *Plantago lanceolata* Pollen, *Pla l 1*. *Clinical & Experimental Allergy*, 2001; 31(2): 322-330.

(45) Ibarrola I, Arilla MC, Martínez A, Asturias JA. Identification of a Polygalacturonase as a Major Allergen (*Pla a 2*) from *Platanus acerifolia* pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 113(6):1185-1191.

(46) Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (*Che a 2*) and Polcalcin (*Che a 3*) are Relevant Allergens of *Chenopodium album* Pollen: Isolation, Amino Acid Sequences, and Immunologic Properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 113(6):1192-1198.

(47) Movérare R, Everberg H, Carlsson R, Holtz A, Thunberg R, Olsson P, Brostedt P, Högbom E. Purification and Characterization of The Major Oak Pollen Allergen *Que a 1* for Component-Resolved Diagnostics Using ImmunoCAP®. *International Archives of Allergy*



and Immunology, 2008; 146(3):203-211.

(48) Planque M, Arnould T, Dieu M, Delahaut P, Renard P, Gillard N. Advances in Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry For Sensitive Detection of Several Food Allergens in Complex and Processed Foodstuffs. Journal of Chromatography A, 2016; 1464:115-123.