

KOLON KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE GAMMA GLOBULİN ELDE EDİLMESİ

*Aziz HACİBEKTAŞOĞLU (**)* *Tuncer HAZNEDAROĞLU (***)*
Fikri KOCABALKAN ()* *Alaaddin PAHSA (**)*

Anahtar Terimler: Kolon kromatografi, İmmünoglobulinler.

Key words: Column chromatography, Immunoglobulins.

ÖZET

Günümüzde kromatografik yöntemler plazma fraksiyasyonu ve purifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda LKB-2137 Klasik kolon kromatografi sisteminin plazma fraksiyasyonuna uygunluğu, iyon değişimi kromatografisi yöntemi ile IgG purifikasyonu yapılarak araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda klasik kolon kromatografi sisteminin analitik amaçlı plazma purifikasyonunun yanısıra, yüksek işlevli kolon sistemlerine adapte edildiği takdirde, küçük çaplı kan bankalarının ihtiyacı olan plazma ürünlerinin üretiminde kullanılabilceği saptanmıştır.

SUMMARY

Seperation of Gamma Globulins by Column Chromatography
Technic

Today chromatographic methods are widely used for plasma purification and fractionization.

This study shows that if a classical column chromatography system is adopted to the high performance column systems it can also be used to produce some plasma products for small bloodbanks as well as other plasma purification for other analytic purposes.

GİRİŞ

Plazma fraksiyasyonu, plazmanın bileşiminde bulunan farklı işlevlere sahip komponentleri, biyolojik özelliklerini koruyarak, doğal şekilleriyle homojen olarak elde et-

* GATA İnf. Hast. ve Kl. Bakt. ABD, Doç.Dr.

** GATA İnf. Hast. ve Kl. Bakt. ABD, Yrd. Doç. Dr.

*** GATA İnf. Hast. ve Kl. Bakt. ABD, Yrd. Doç. Dr.

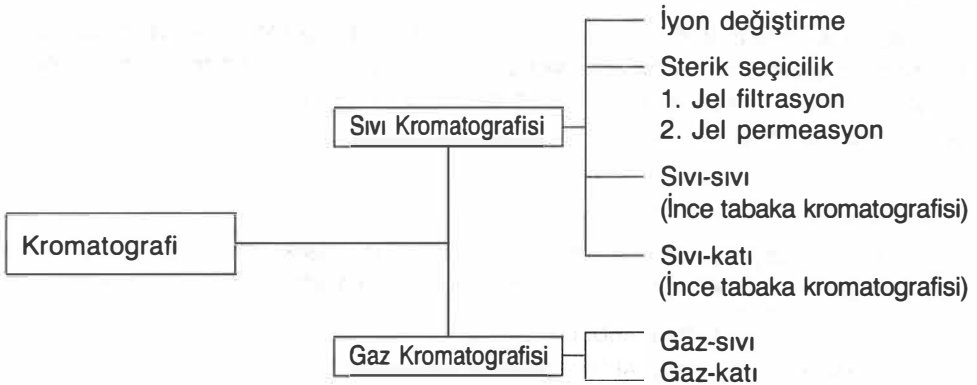
mek için yapılan fiziksel ve kimyasal ayırma işlemleridir (1,20). Bu işlemlerin esas amacı; kıymetli bir materyal olan kan plazmasından, tedaviye daha elverişli, komplikasyonu olmayan, spesifik etkisi belli, inisial plazmadan daha yoğun ve dayanıklı ürünler elde etmektir.

Plazma proteinlerini fraksiyonlarına ayırma işlemi ilk kez Cohn tarafından gerçekleştirilmiştir (2,10,31). Cohn, Soğuk Etanol Fraksiyasyonu olarak bilinen yöntemi ile plazma proteinlerini birbirinden ayırmayı başarmıştır.

İmmunolojideki gelişmelere paralel olarak, immunglobulinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin daha iyi belirlenmesi plazma fraksiyasyonu konusuna büyük bir ilgi uyandırmıştır (15). Bu amaçla birbirinin modifikasyonu olan birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi de Kromatografik yöntemdir.

Kromatografi, kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine ya da seçici etkileşimlerine dayanarak ayrılmalarını sağlayan, aynı zamanda bu maddelerin, nitelik ve nicelik açısından analizlerini gerçekleştiren temel bir ayırma yöntemidir (19, 24, 28, 31, 35, 35, 37, 39, 41). Daha genel bir deyimle kromatografi, fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılardan yararlanarak, bir karışımı oluşturan bileşiklerin birbirinden ayrılmasıdır (11). Kromatografik yöntemler yardımıyla başka yöntemlerle birbirlerinden ayrılması çok güç, hatta imkansız olan, biyolojik bir karışımda bulunan, hormon, pigment, amino asid, lipid gibi maddelerin kısa sürede saf olarak ayrıştırılması ve tespiti mümkün olmaktadır. Örneğin; kromatografik yöntemler sayesinde, eskiden, proteinlerin günümüz düşüncesine göre yeterli kabul edilemeyecek kalite analiz 6 ay sürerken, bugün aynı analiz 24 saatte % 2 den az bir hata ile yapılabilmektedir (11,13,19). Kromatografik yöntemlerin diğer bir özelliği de herhangi bir ısıtma işlemine gerek göstermeden uygulanabilmeleri ve bu şekilde kimyasal bozunumları kolay olan birçok biyolojik maddenin bozunmaya uğramadan saflaştırılmalarını sağlamasıdır.

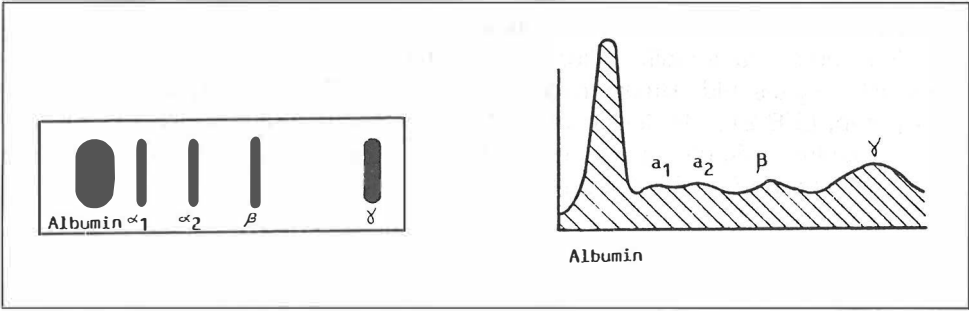
Kromatografik yöntemler, faz tiplerine, uygulama biçimine ya da ayrılmanın dayandığı ilkelere göre sınıflandırılırlar (11,34,39,41). Kromatografik yöntemlerin faz tiplerine göre sınıflandırılması Tablo-1 de görülmektedir.



Son yıllarda kromatografik yöntemlerle İgG pürifikasyonunda, yüksek işlevli sıvı kromatografisi sistemleri ve yeni geliştirilen basınca dayanıklı (Sefadeks, Sefaroz vs.) iyon değiştiriciler kullanılmaktadır (2,9,33). Bu yöntemlerle intravenöz yolla kullanıma uygun İgG preparatları hazırlanmaktadır. Kromatografik yöntemlerle elde edilemeyen tek plazma proteininin faktör VIII olduğu bildirilmektedir (31).

İmmunglobulinler, vücutta antijenle uyarılan B lenfositlerin başkalaşımı ile ortaya çıkan plazma hücreleri tarafından sentezlenirler ve total plazma proteinlerinin % 20 sini oluştururlar. (4,8,12,17,18,27,30).

Serum protein elektroforezinde anot'a doğru en hızlı göç eden protein molekülü albümindir. Daha sonra sırası ile alfa, beta ve gamma globulinler göç ederler. Elektroforez şeridi üzerindeki bu bantlar Tablo-2 de görüldüğü gibi bir dansitometre yardımıyla grafik olarak çizilebilir.



Tablo-2: Serum protein elektroforezi ve dansitometrik grafik

Bağışık serumlar ve özgül antijeni ile karşılaştırılarak absorbe edilmiş serumlar kullanılarak yapılan protein elektroforezinde immunglobulinlerin büyük bir bölümünün gamma globulin, az bir bölümünün ise alfa ve beta globulin zonunda yer aldığı gösterilmiştir (3,6,8,27,36).

Biz, GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD bünyesinde bulunan Kolon Kromatografisi sistemini kullanarak, mevcut; sistemin plazma fraksinasyonu alanında kullanılabilirlik düzeyini araştırdık. Çalışma literatürlerinde tavsiye edildiği şekilde, önce plazmadan presipitasyon yöntemi ile gamma globulin izole ettik ve daha sonra elde ettiğimiz bu gamma globulinden anyon değişimi kromatografisi yöntemi ile İgG pürifikasyonunu sağladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD İmmunoloji Laboratuvarı Kolon Kromatografisi bölümü ve Biyokimya ABD soğuk oda laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışma 3 aşamada gerçekleştirildi.

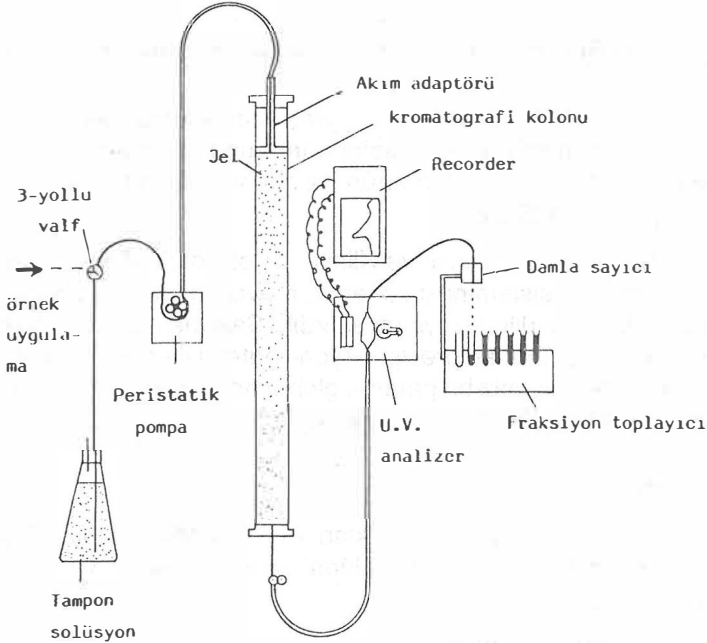
1. Normal insan serumundan Amonyum Sulfat presipitasyon yöntemi ile gamma globulin elde edilmesi.

2. Elde edilen gamma globulin fraksiyonundan anyon değişimi kromatografisi yöntemi ile İgG purifikasyonu.
3. Ayrılan protein örneklerinin kalitatif ve kantitatif olarak Agar jel İmmunoelektroforez (AİE) ve Radial jel İmmunodiffüzyon (RID) yöntemi ile değerlendirilmesi.

Yaptığımız alışmalarda ölçüm standartını sağlamak amacıyla tek bir donörden alınan kan kullanılmıştır. Bu amaçla sağlıklı bir donörden usulüne uygun olarak alınan 200 ml. venöz kan, 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 15 dakika 3000 devirde santrifüj edilerek serumu ayırdı. Serum kaba bir filtreden geçirilerek süzıldı ve 15 ml. lik fraksiyonlar halinde ağız kapalı gode'lerde -20 C de dondurularak saklandı. Kullanım zamanında oda ısısında özıldı.

Kan serumu içindeki bütün globulinlerin öktürölmesi için % 50 oranında doymuş Amonyum Sulfat, sadece gamma globulinlerin öktürölmesi için ise % 33 lük Amonyum Sulfat kullanılması tavsiye edilmektedir (29).

Normal serumdan amonyum sulfat presipitasyon yöntemi ile gamma globulin elde edildikten sonra, spesifik İg'lerin elde edilmesi için anyon değişimi kromatografisi sistemi alıştırıldı. Bu işlem için LKB 2137-316-Column, LKB 2132 MicroPepex pump, LKB 2111 MultiRac ve LKB 2210 Potentiometric Recorder cihazlarının birleştirilmesi ile oluşan kromatografi sistemi, anyon değişimi kromatografisi için Őekil-3 de görüldüğü gibi dizayn edildi.



Őekil-3: Anyon değişimi kromatografi sistemi

İmmunglobulin fraksiyonunda ideal şartların sağlanabilmesi için çalışmalar özel soğuk odada yapıldı. Fraksinasyon sonucunda (İgG olması muhtemel olan) 150 tüp içinde toplanan şüpheli örneklerden kayıt cihazında (recorder'da) elde edilen piklere karşılık gelenler alınarak RID ve AİE yöntemleri ile kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılarak serumdaki değeri % mg olarak ölçüldü.

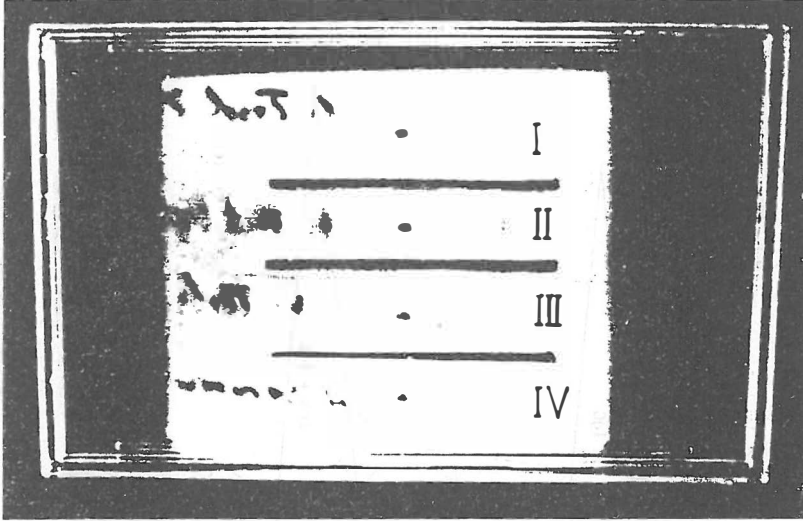
BULGULAR

% 33.3 amonyum sulfat kullanılarak elde edilen presipitasyon kademelerinde, inişiyel serum, son ürün ve supernatantlara ait serum albumin, serum globulin değerleri Biuret yöntemi ile, İmmunoglobulinlerin değerleri RID yöntemi ile ölçülerek aşağıdaki tabloda gösterilen değerler elde edildi.

ÖLÇÜM	S.Alb (gr/1)	S.Glob (Gr/1)	IgG (% mg)	IgA (%mg)	IgM (%mg)
İ. Serum	4.6	3.3	1250	210	280
Supern-1	4.2	1.1	250	85	103
Supern-2	0.1	0.3	250	42	32
Gamma Global Presipitatu	—	1.8	848	100	142
% Protein Kaybı	100	45.46	32.16	47.01	49.20

Amonyum sulfat presipitasyon yöntemi safhalarında ölçülen serum proteini ve İg değerleri
Amonyum sulfat presipitasyon yönteminde elde edilen gamma globulin presipitatında spesifik İg'leri karakterize etmek amacıyla, İgM, İgA, İgG ağır zincir antiserumları ve spesifik plazma protein anti-serumu kullanılarak AİE yöntemi uygulandı.

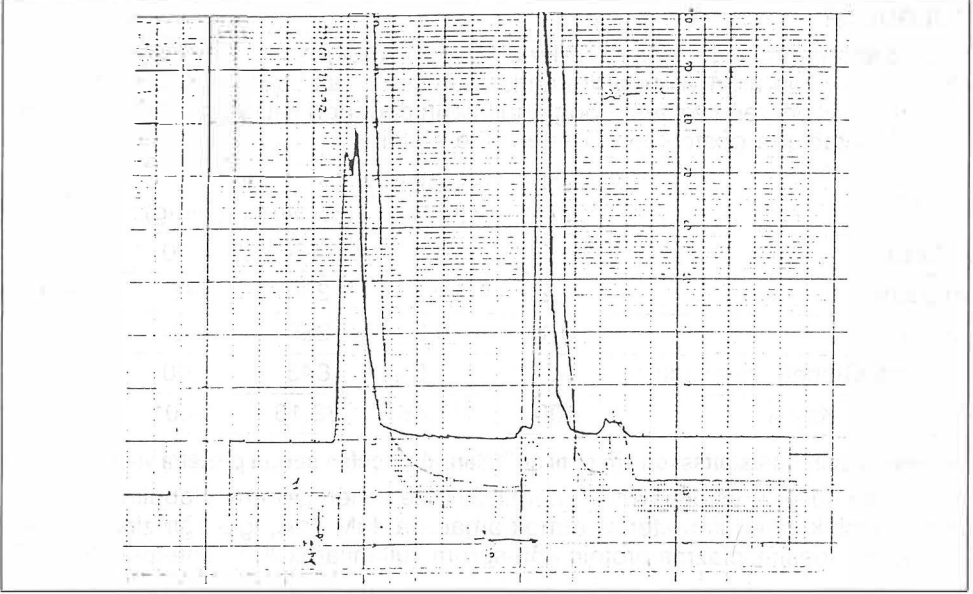
Gamma globulin presipitatındaki spesifik immunglobulinlerin AİE (Agar jel immuno-elektroforez) yöntemi ile gösterilmesi aşağıdaki şekilde görüldüğü gibidir.



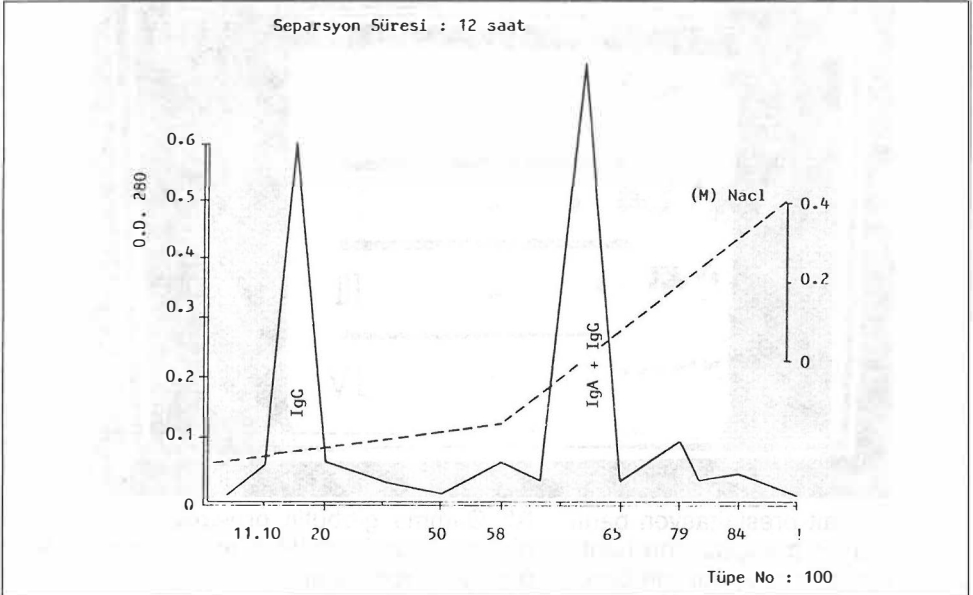
I: İgM'ye ait presipitasyon bantı
II: İgA'ya ait presipitasyon bantı
III: İgG'ye ait presipitasyon bantı

IV: Gamma globulin presipitatının, spesifik plazma protein anti-serumu ile elde edilen presipitasyon bantı

2 ml. gamma globulin presipitatu kromatografi kolonuna uygulandı. Elüsyon sonucunda, elde edilen nünuneler, fraksiyon toplayısı yardımı ile 1.5 ml.lik fraksiyonlar halinde tüplere toplandı. Çalışma sonunda aşağıdaki şekilde görülen orjinal kromatogram elde edildi.



Kromatogramdaki verilerin değerlendirilmesi amacıyla çıkarılan emülsiyon profili aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi çıkarıldı.



Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi separasyon sonunda 3 temel pik oluştu. Birinci pik 11-20 no'lu fraksiyonlar arasında tespit edildi. Fraksiyon toplayıcısı aletten tespit edilen tüpler alınarak kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı.

Separasyon sonunda oluşan 3 temel pik'ten sırasıyla; birinci pik'te IgG, ikinci pik'te IgG + IgA, üçüncü pikte IgM'in ayrılması beklenir. Belirtilen 3 pikteki örnekler RİD yöntemi ile araştırıldı. Birinci pikteki sonuçlar Tablo-8 de, ikinci pikteki sonuçlar Tablo-9 da, üçüncü pikteki sonuçlar Tablo-10 da gösterilmektedir.

Ig	IgG			IgA			IgM			
	T.N*	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg
11	3.8	14.45	250	0	0	0	0	0	0	0
12	4.3	18.50	375	0	0	0	0	0	0	0
13	4.4	19.35	418	0	0	0	0	0	0	0
14	3.8	14.45	250	0	0	0	0	0	0	0
15	3.5	12.25	250	0	0	0	0	0	0	0
16	3.2	10.25	250	0	0	0	0	0	0	0
17	3.1	9.6	250	0	0	0	0	0	0	0
18	3.0	9.0	250	0	0	0	0	0	0	0
19	3.1	9.6	250	0	0	0	0	0	0	0
20	3.0	9.0	250	0	0	0	0	0	0	0

* T.N.: Tüp Numarası

Tablo-9:
İkinci pik'teki fraksiyonların RİD yöntemi ile değerlendirilmesi

Ig	IgG			IgA			IgM			
	T.N*	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg
58	3.1	9.6	42	3.4	11.55	250	0	0	0	0
59	3.4	11.55	42	3.6	12.95	250	0	0	0	0
60	3.2	10.25	42	3.2	10.25	250	0	0	0	0
61	4.1	16.88	48.8	0	0	0	0	0	0	0
62	4.1	16.88	48.8	0	0	0	0	0	0	0
63	3.8	14.45	42	0	0	0	0	0	0	0
64	3.5	12.25	42	0	0	0	0	0	0	0
65	3.1	9.6	42	0	0	0	0	0	0	0

Tablo-10:
Üçüncü pik'teki fraksiyonların RID yöntemi ile değerlendirilmesi

Ig		IgG		IgA			IgM		
T.N*	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg	R	R ²	% mg
79	3.8	14.45	32	0	0	0	0	0	0
80	3.9	15.20	32	0	0	0	0	0	0
81	4.2	17.69	49.2	0	0	0	0	0	0
82	4.0	16.08	32.0	0	0	0	0	0	0
83	3.8	14.45	32	0	0	0	0	0	0
84	3.5	12.25	32	0	0	0	0	0	0

TARTIŞMA VE SONUÇ

Serum proteinlerinin purifikasyonunda, iyon değişimi, jel filtrasyonu ve afinite kromatografisi yöntemleri en çok kullanılan yöntemlerdir (10).

Mc Pherson, Fahey ve Hudson, deneysel amaçlı küçük hacimli kolonlarda yapılan purifikasyon çalışmalarında, presipitasyon yöntemleri ile kromatografik yöntemleri kombine sistemler halinde kullanarak iyi sonuç aldıklarını bildirmişlerdir (14, 23, 26).

Biz de çalışmamızda, kolon sistemlerinin özelliklerine uygun olarak, immunglobulin purifikasyonunda, amonyum sulfat presipitasyon yöntemi ve anyon değişimi kromatografisi yöntemini entegre sistemler olarak kullandık.

Elde ettiğimiz bulguların ışığında; yöntemin deneysel amaçlı fraksiyasyon işlemlerinde özellikle serumdan IgG purifikasyonunda yararlı bir yöntem olduğu söylenebilir. Ancak, son ürün oranının çok düşük miktarda olması, ayrıca presipitattaki tuzun dializle uzaklaştırılmasının uzun süre alması, bakteriyel kontaminasyon yönünden risk oluşturması yöntemin başlıca dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bazı otörler, tuzdan arınma işleminde jel filtrasyon yönteminin kullanılmasını önermektedir (21). Yapılan bazı çalışmalarda ise amonyum sulfatın, rivanol ile kombine edilerek kullanılmasının verimi artırdığı gibi, dializ süresini de kısalttığı gösterilmiştir (22,32).

Fraksiyasyon işleminin ikinci kademesinde, seperasyon işlemi sonucunda kayıt cihazında elde edilen kromatogram Goodman ve Tombs tarafından, elde edilen iki boyutlu analiz bulguları ile uyumlu olarak bulundu (38).

Fraksiyone edilen numunelerin RID yöntemi ile yapılan kantitatif analizlerinde pür IgG izole edilmesine karşın (birinci pik'te), ikinci pik'te IgA + IgG karışımı ve son pik'te minimal düzeyde IgM saptanmıştır. Bu kromatografik analiz verileri iyon değişimi kromatografisi yönteminin serumdan saf IgG izolasyonunda başarı ile kullanılabileceğini göstermesi bakımından anlamlıdır. Ancak, analitik ya da tanısal amaçla diğer immunglobulinlerin purifikasyonu gerekirse yöntemin değişik fraksi-

nasyon yöntemleri ile kombine edilmesi gereklidir. Curling ve Fahey serumdan IgG dışındaki Ig fraksiyonlarının ayırımı için, iyon değişimi kromatografisi yönteminin izoelektrik foküslleme veya jel filtrasyonu yöntemi ile kombine edilerek kullanılmasını önermektedirler (9, 14).

Elde edilen IgG fraksiyonlarında, literatürde belirtildiği gibi IgG'nin minimal düzeyde Transferin ile kontamine olması beklenebilir. Ancak bunu saptamak mümkün olmamıştır. Hasko ve arkadaşları IgG'nin transferin ile kontaminasyonunun, ikinci basamak olarak uygulanacak katyon değişimi kromatografisi yöntemi ile gidebileceğini bildirmişlerdir (21).

Yöntemin uygulanması ile aldığımız olumlu sonuçlar, gelecekte yapmayı düşündüğümüz çalışmalara rehber olacak niteliktedir.

Bu sistemin ileri ülkeler transfüzyon merkezlerinde olduğu gibi, yüksek işlevli kolon sistemlerine adapte edilerek kullanılması ile ülkemizde plazma fraksiyonu konusunda önemli bir adım atılacağı kanısındayız. Burada, kromatografik yöntemlerin çok hassas ve ideal oranlarda separasyon sağlamasına karşın, uygulanması için çok geniş bilgi ve tecrübe gerektirdiğini ve vurgulamak isteriz.

KAYNAKLAR

1. Acar, N.: Plasma Fraksiyonasyonu ve Liyofilizasyonu. Refik Saydam Merkez Hıfzıssıha Enstitüsü Yayını, Ankara, 1976, 3-8.
2. Gürsel, T.: Kanın Tanımı ve Bileşimi. Kan Transfüzyonu Paneli (ed), Kurtar, K., Kızılay Genel Başkanlığı, Ankara, 1987, 5-9.
3. Anter, U. Kan ve Kan Ürünleri üretimi. Kan Transfüzyonu Endikasyonları ve Kan Bankaları Sorunları, Panel, (Eds), Pamir, P., Gedikoğlu, G., Yenen, O.Ş., Türkiye Kızılay Derneği Kan Programı Yayınları, İstanbul, 1988, 17-34.
4. Curling, J.M.: Separation of Plasma Proteins, Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Sweden, 1983, 9-12.
5. Baumstark, J.S., Laffin, R.J., Bardwil, W.A.: A Preparative Method for the Separation of 7S Gammaglobulin from Human Serum. Arch. Biochem Biophys., 108; 1964, 514-522.
6. Scopes, R.K.: Separation by Adsorption Protein, Purification, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1982, 75-105.
7. Fahey, J.L., Terry, E.W.: Ion Exchange Chromatography and Gel Filtration. Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1, Immuno-chemistry (Ed), Weir, D.M., Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1978, 8.1-8.16.
8. Gündüz, T.: Kromatografi, Instrümental Analiz. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları, Ankara, 1988, 555-560.
9. Johnstone, A., Thorpe, P.: Basic Techniques Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publication, Oxford, London Edinburgh, Boston, Melbourne, 1982, 1-26.
10. Bernard, H.B.: Differing Methodology and Equations Used in Quantitating Immunoglobulins by Radial Immunodiffusion-A Comparative Evaluation of Reported and Commercial Techniques. Clin. Chem 20/1, 1974, 61,69.
11. Obalı, M., Erdik, E., Öktemer, A., Peker, T.: Organik Kimya Laboratuvarı Tekniği. Genel Organik Kimya, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayını, Ankara, 1987, 133-149.
12. Falksveden, L.G., Longblad, G.: Ion Exchange and PEG Precipitation of Gamma Globulin. Met-

- hods of Plasma Protein Fractionation (ed) Curling, J.M., Academic Press, London, U.K., 1981, 76-84.
13. Jaustra, M., Lundgren, H.: Preparat on Freeze-Drien Monomeric and Immunochemically Pure IgG by a Rapid and Reproducible Chromatographyc Technique Protides of Biological Fluids 17, 1969, 511-515.
 14. Şenelt, S.: Gıda Kalite Kontrolunda Uygulanan Başlıca Kromatografik Yöntemler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 44:2. 1987, 191-201.
 15. TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Yayını Sıvı Kromatografisi, Gaz Sıvı ve İnce Tabaka Kromatografisi, Bilgi Dizin: 12, Ankara, 185, 1-16.
 16. Whitaker, J.R.: Determination of molecular Weights of Proteins by Gel Filtration. Sephadel, Anal. Chem. 35; 1983, 1950-1953.
 17. Zweig, G., Sherma, J.: Handbook of Chromatography, Vol. 2, CRS Press, Ohio, 1972, 54-74.
 18. Duygu, E.: Analitik Kimya ve Biyokimya. Utku Kitabevi, Ankara, 1981, 93-101.
 19. Erlaçın, S.: Temel İlkeleri ile Biyokimya. E.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, No. 115, E.Ü. Basımevi, Bornova, İzmir, 1985, 90-97.
 20. Şener, B., Orbey, M.T., Temizer, A.: Modern Analiz Yöntemleri. Seldom Ofset Matbaası, Ankara, 1986, 23-58.
 21. Curling, J.M.: Albumin Purification by Ion Exchange Chromatography. Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press, London, U.K., 1980, 77-90.
 22. Stites, P.D., Strober, S. Grumert, G.: Immunologic Disorders, Current Medical Diagnosis and Treatment. (eds) Schinedee, S.A., Krupp, M.A., Tieiner, L.M., A. Lange Medical Book USA, 1988, 1076-1079.
 23. Barret, J.T.: The Immunoglobulins. Textbook of Immunology, Fifth Edition, The C.V. Mosby Company, St. Luis, Washington, D.C., Toronto, 1988, 47-51.
 24. Bilgehan, H.: Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilim. Barış Yayınları, İzmir, 1987, 344-354.
 25. Edelman, G.M.: The Structure and Function of Antibodies. Sci. Am. 223; 1970, 34-40.
 26. Goodman, J.W.: Immunoglobulins I: Structure and Function. Basic and Clinical Immunology, Sixth Edition (eds), Stites, D.P., Stobo, J.D., Wells, J.V., Lange Medical Publication.
 27. Gülmezoğlu, E.: İmmunoglobulinler Bağışıklığın Temelleri. Üçüncü Baskı, Sevinç Matbaası, Ankara, 1983, 91,107.
 28. Murray, R.K.: Blood Plasma and Clotting. Harper's Biochemistry, Twentyfirst edition (eds). Granner, B.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.V., Lange Medical Publication, Norwalk, Connecticut, San Matco, California, 1988, 607-612.
 29. Roitt, I.M.: The Immunoglobulins Essential Immunology, Sixth Edition, Blackwell Scientific Publication, Hong-Kong, 1988, 31-34.
 30. Aras K., Erşen, G.: İmmunoglobulinler. Klinik Biyokimya, Taş Kitapçılık, Ankara, 1984, 1126-1238.
 31. Bennich, H.: İmmunoglobulins. Plasma Proteins (Eds.) Blomback, B., Hanson, L.A., John Wiley and Sons Ltd., Chichestee, New York, Brisbane, Toronto 1979, 119, 127.
 32. Tizard, I.A.: An Introduction Holy-Sounders, Japan, Saunders College Publishing, 1984, 80-104.
 33. Özcal M.A.: Globulinlerin Serumdan Elde Edilmesi, İmmunofluoresans ve Parazitolojide Uygulanması, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 1978, 52-77.
 34. Fahey, J.L., Horbert, A.P.: Human Gamma Globulin Fractination ofn Anion Exchange Celluloze Column. J. Biol. Chem., 234, 1959, 2645-2651.
 35. Hudson, L., Hay, F.C.: Isolation and Structure of İmmunoglobulins. Practical Immunology, Blackwell Scientific Publication, Oxford, London,
 36. McPherson, R.R.: Spesific Proteins. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (eds) Henry, J.B., W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto, 1984, 205-207.

37. Hasko, F., Kristof, K., Salomon, P.: Large Scale Chromatographic Methods, Experiments for Plasma Fractionation. Plasma Fractionation and Blood Transfusion. Martinus Nighoff Publishers, Boston, Dordrecht, Lancaster, 1985, 105-115.
38. Horejsi, J., Smetana, R.: The Isolation of Gamma Globulins from Blood Serum by Rivanol, Acta. *Med. Scand.* 155; 1976, 65-76.
39. Steinbach, M.: Protein Fractionation by Amonium Sulphate, Rivanol and Caprylic Acid Presipitation Methods of Plasma Fractionation, Academic Press, London, 1980, 33-56.
40. Tombs, M.P., Cooke, K.B.: The Chromatography of Normal Serum Proteins *Biochem. J.* 80; 1981, 284-288.
41. Whitaker, J.R., Granum, P.E.: An absolute Method for Protein Determination Based on Difference In Absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical Bioc. Chemistry*, 109; 1980, 156-199.