

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DNA İZOLASYONU İÇİN PSEUDOSPEŞİFİK  
NANOYAPILAR**

**Ceren TÜRKCAN**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sinan AKGÖL**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 405.05.01**

**Sunuş Tarihi: 03.01.2012**

**Bornova-İZMİR**

**2012**



Sayın Ceren TÜRKCAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan ‘DNA İzolasyonu İçin Pseudospesifik Nanoyapılar’ başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.01.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

<b>Jüri Başkanı</b>	: .....	.....
<b>Raportör Üye</b>	: .....	.....
<b>Üye</b>	: .....	.....



**ÖZET****DNA İZOLASYONU İÇİN PSEUDOSPESİFİK  
NANOYAPILAR**

TÜRKCAN, Ceren

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sinan AKGÖL

Ocak 2012, 110 sayfa

DNA izolasyonu için pseudospesifik p(HEMA) küresel nanopartikülleri surfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak 85,7 nm boyutunda elde edildi. Sentezlenen pseudospesifik nanopolimerin karakterizasyonu için SEM görüntüleme tekniği, FTIR spektrumu, Zeta-Boyut analizi ve yüzey alanı hesaplamaları kullanıldı. Nanopolimerin karakterizasyonundan sonra, ligand olarak kullanılan fenil boronik asit (PBA) ile türevlendirilen DNA-spesifik yapılar oluşturuldu. Bu çalışmada, polimerik nanopartiküllere bağlı PBA'nın 1,2 ve 1,3 diollerle bağ yapabilmesiyle, DNA'nın şeker grupları ile spesifik bir bağlanma gerçekleştirilmesi amaçlandı. DNA izolasyonu için öncelikle polimerik nanopartiküllere ligand bağlanma koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla; pH, sıcaklık ve konsantrasyon denemeleri yapıldı. DNA adsorpsiyonunun optimizasyonu için; pH, konsantrasyon, sıcaklık ve iyonik şiddet denemeleri yapıldı. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında aynı nanopolimerler DNA adsorpsiyon denemelerinde kullanıldı. Desorpsiyon çalışmasında bağlanan DNA %95 desorbe edildi. Tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngülerinde DNA adsorpsiyon kapasitesinde dikkate değer bir azalmanın olmadığı gözlemlendi.

**Anahtar sözcükler:** DNA izolasyonu, Fenil Boronik Asit, Nanoteknoloji, poli(HEMA).



**ABSTRACT****PSEUDOSPECIFIC NANOSTRUCTURES FOR DNA ISOLATION**

TÜRKCAN, Ceren

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sinan AKGÖL

January 2012, 110 pages

Pseudospecific p(HEMA) spherical nanoparticles, around 85.7 nm diameter, was obtained using surfactant free emulsion polymerization technique for DNA isolation. For characterization of synthesized pseudospecific nanopolymer, SEM imaging technique, FTIR spectrum, Zeta-size analysis and surface area calculations were used. After characterization of nanopolymer, DNA specific structure, that derived with phenylboronic acid used as ligand, was formed. In this study, polymeric nanoparticles bonding PBA which could bond 1,2 and 1,3 diols, it was aimed to specific bond with DNA's sugar group. First of all, for DNA isolation optimization condition of polymeric nanoparticulate bonding ligand was realized. In this aim; pH, temperature and concentration studies were performed. For DNA adsorption optimization, pH, concentration, temperature and ionic strength studies were realized. In desorption and repeat utility studies, same nanopolymers were used in DNA adsorption studies. In desorption study, %95 of bonding DNA was desorbed. In repetitive adsorption-desorption circles, it was observed not being important decrease in DNA adsorption capacities.

**Keywords:** DNA isolation, Nanotechnology, Phenyl Boronic Acid, poly(HEMA).



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca beni sürekli destekleyen, yeri gelince birlikte gülüp eğlendiğimiz, yeri gelince çalışmalarını tartıştığımız ve söz verdiği gibi elini sırtımdan hiç eksik etmeyen sevgili danışmanım Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e şükranlarımı sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca fikir alışverişinde bulunduğum Doç. Dr. Burcu OKUTUCU'ya, ekip ruhunu çok güzel yaşadığım, düşeceğimi hissettiğim an birinin her zaman elimden tutacağını bildiğim sevgili ekip arkadaşlarım Emir ÖZÇALIŞKAN, Yeşim ÖZCAN, R. Hilal ŞENAY ve bütün BioRegE'deki arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Beni maddi ve manevi olarak destekleyen, her koşulda yanımda olan anneme, babama, kardeşime ve desteğini sürekli hissettiğim Cenk KAYHAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2011 FEN 038 no'lu proje olarak desteklenmiştir.



**İÇİNDEKİLER**

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ix</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xx</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.Nanoteknoloji</b> .....	<b>1</b>
1.1.1.Nanoteknolojinin başlıca uygulama alanları.....	3
1.1.2.Nanoölçümleme ve nanoişleme .....	4
1.1.3.Nanobiyoteknoloji.....	5
1.1.4.Nano boyutların eldesi için kullanılan yöntemler .....	6
1.1.5.Nanopartiküller .....	7
1.1.6.Çözelti ortamında nanopartiküllerin oluşumu .....	7
<b>1.2.Polimerler</b> .....	<b>8</b>
1.2.1.Polimer sentezleme teknikleri.....	9

## İÇİNDEKİLER ( devam)

1.2.2. HEMA .....	16
<b>1.3.Afinite Kromatografisi.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Afinite kromatografisi türleri .....	20
1.3.2.Biyoafinite kromatografisinin uygulama alanları .....	22
<b>1.4.Boronat Affinite Kromatografisi .....</b>	<b>23</b>
1.4.1.Fenilboronik asit (PBA) .....	26
1.4.2.Boronat afinite kromatografisi uygulama alanları .....	28
1.4.3.Boronik asitlerin oluşturdukları komplekslerin incelenmesi .....	31
1.4.4.Çalışma koşulları.....	32
<b>1.5.Nükleik Asitler .....</b>	<b>33</b>
1.5.1.DNA ( Deoksiribonükleik Asit) .....	35
1.5.2.Nükleik asitlerin saflaştırılması.....	38
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1. Materyal .....</b>	<b>43</b>
2.1.1. Kimyasal maddeler.....	43
2.1.2. Cihaz ve sistemler .....	44
<b>2.2. Metot.....</b>	<b>44</b>

## İÇİNDEKİLER ( devam)

2.2.1. Nanopolimerin sentezi .....	44
2.2.2. Nanopolimerin karakterizasyonu .....	46
2.2.3. PBA ve DNA'nın bağlanan miktarının belirlenmesi .....	49
2.2.4. Nanopolimer yüzeyine PBA bağlanmasının optimizasyonu .....	50
2.2.5. DNA adsorpsiyonu için optimizasyon çalışmaları .....	51
2.2.6. Pseudospesifik nanopolimerden DNA desorpsiyonu .....	53
2.2.7. Pseudospesifik nanopolimerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	53
2.2.8. Agaroz jel elektroforezi .....	53
<b>3. SONUÇLAR .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1. p(HEMA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....</b>	<b>54</b>
3.1.1. Yüzey alanı hesabı .....	55
3.1.2. p(HEMA) Nanopolimerinin Fourier Dönüştürümlü Kırmızı Ötesi Spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizi .....	55
3.1.3. p(HEMA) Polimerinin partikül boyutunun belirlenmesi.....	56
3.1.4. p(HEMA) Nanopolimerinin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile görüntülenmesi.....	57
3.1.5. Kuru Nanopartikül ağırlığının belirlenmesi.....	58

## İÇİNDEKİLER ( devam)

<b>3.2.PBA ve DNA'nın Belirlenmesi .....</b>	<b>59</b>
3.2.1.PBA'nın belirlenmesi.....	59
3.2.2.DNA'nın belirlenmesi.....	60
<b>3.3.Sentezlenen p(HEMA) Nanopolimerine PBA'nın Bağlanması Optimizasyon Sonuçları .....</b>	<b>61</b>
3.3.1.PBA bağlanmasına pH'nın etkisi .....	61
3.3.2.PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisi.....	62
3.3.3.PBA bağlanmasına başlangıç konsantrasyonunun etkisi .....	62
3.3.4.PBA bağlanmasına zamanın etkisi.....	63
3.3.4.Nanopolimere bağlanmayan PBA'nın yıkanması.....	64
<b>3.5.Pseudospesifik Nanopolimere DNA Adsorpsiyonunun Optimizasyon Sonuçları.....</b>	<b>65</b>
3.5.1.DNA adsorpsiyonuna pH etkisi .....	65
3.5.2.DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	66
3.5.3.DNA adsorpsiyonuna başlangıç DNA konsantrasyonunun etkisi .....	67
3.5.4.DNA adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi .....	68
<b>3.6.DNA Desorpsiyonu .....</b>	<b>69</b>
<b>3.7.Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi..</b>	<b>70</b>

**İÇİNDEKİLER ( devam)**

<b>3.8. Agaroz Jel Elektroforezi .....</b>	<b>71</b>
<b>4.GENEL DEĞERLENDİRME .....</b>	<b>72</b>
<b>5. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>77</b>
<b>6.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>87</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 1.1. Bilim ve teknolojideki gelişmeler .....	1
Şekil 1.2. Nanometre boyutunu anlatan örnekler .....	2
Şekil 1.3. Soldan sağa doğru nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları .....	3
Şekil 1.4. Nanoteknolojinin kullanım alanları .....	3
Şekil 1.5. Partikül oluşum aşamaları .....	8
Şekil 1.6. Polimer sentezleme teknikleri .....	10
Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi. ....	17
Şekil 1.8. Fenilboronik asitle diol arasındaki bağlanma .....	26
Şekil 1.9. Boronik asitin bağlanması .....	27
Şekil 1.10. Fenilboronik asit türevleri .....	28
Şekil 1.11. DNA ve RNA'nın içeriği .....	34
Şekil 1.12. 5' ve 3' düzeni ve bağ yapıları .....	35
Şekil 1.13. Pürin ve pirimidinlerin kimyasal yapısı .....	36
Şekil 1.14. Şeker yapılarının ve moleküler yapının gösterimi. ....	37
Şekil 1.15. DNA'nın erimesinin ve 260 nm dalga boyunda verdiği absorbanların gösterimi .....	37
Şekil 1.16. DNA'nın $T_m$ değerinin gösterilmesi .....	38

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

Şekil 2. 1. Nanopolimer sentez basamakları.....	45
Şekil 2. 2. FTIR çalışma prensibi şematik gösterimi.....	47
Şekil 2. 3. Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin görüntüsü.....	54
Şekil 2. 4. p(HEMA) nanopolimerinin olası kimyasal yapısı.....	55
Şekil 2. 5. p(HEMA) Nanopolimerinin FTIR spektrum görüntüsü.....	56
Şekil 2. 6. Zeta boyut analizi. ....	57
Şekil 2. 7. Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin elektron mikroskop görüntüleri.....	58
Şekil 2. 8. Kuru partikül ağırlığının hesaplanması. ....	59
Şekil 2. 9. PBA kalibrasyon grafiği. ....	60
Şekil 2. 10. DNA kalibrasyon grafiği. ....	60
Şekil 2. 11. PBA bağlanmasına pH etkisi.....	61
Şekil 2. 12. PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisi .....	62
Şekil 2. 13. PBA bağlanmasına başlangıç konsantrasyonunun etkisi .....	63
Şekil 2. 14. PBA bağlanmasına zamanın etkisi .....	64
Şekil 2. 15. PBA yıkama döngüsü .....	65

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

Şekil 2. 16. DNA adsorpsiyonuna pH etkisi. ....	66
Şekil 2. 17. DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi .....	67
Şekil 2. 18. DNA adsorpsiyonuna başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	68
Şekil 2. 19. DNA adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi .....	69
Şekil 2. 20. DNA desorpsiyonu .....	70
Şekil 2. 21. DNA adsorpsiyonu ve desorpsiyonu .....	71
Şekil 2. 22. Agaroz jelde yürütülen DNA görüntüleri .....	72

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 1.1.Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler..... 18

Çizelge 1.2.Boronik asit türevleri.....24

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
PBA	Fenil Boronik Asit
p(HEMA)	Hidroksietil Metakrilat Polimeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MEMS	Mikro Elektrik Mekanik Sistemler
UV	Ultraviöle
PMMA	Polimetil Metakrilat
CTE	Doğrusal Genişleme Katsayısı
HEMA	Hidroksietil Metakrilat
EGDMA	Etilenglikol Dimetakrilat
DVB	Divinil Benzen
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
cAMP	Siklik Adenin Mono Fosfat
FTIR	Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektroskopi
HEPES	(4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etanosülfonik asit
RNA	Ribonükleik Asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi

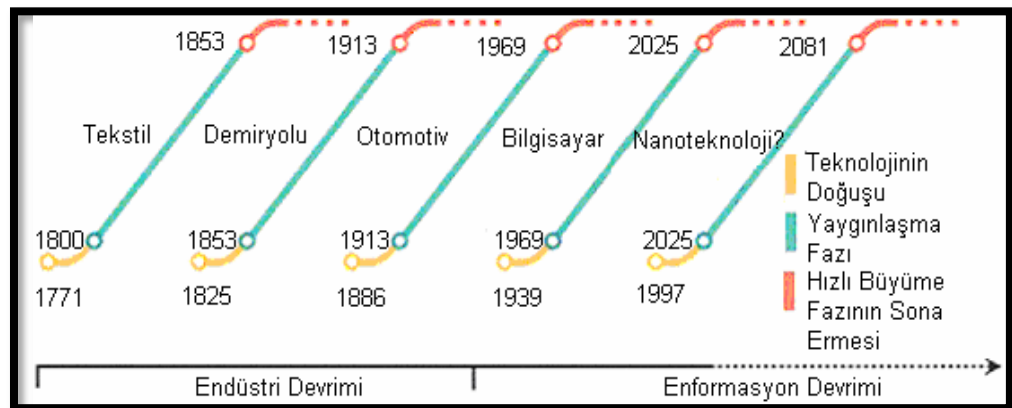
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
KPS	Potasyum Persulfat
PVA	Polivinil Alkol
EtBr	Etidyum Bromür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
KBr	Potasyum Bromür
Borat	Sodyum-Borat Tamponu
Tris	Trizma Bazı
MES	2-(N-morfolino)etane sülfonik asit



## 1. GİRİŞ

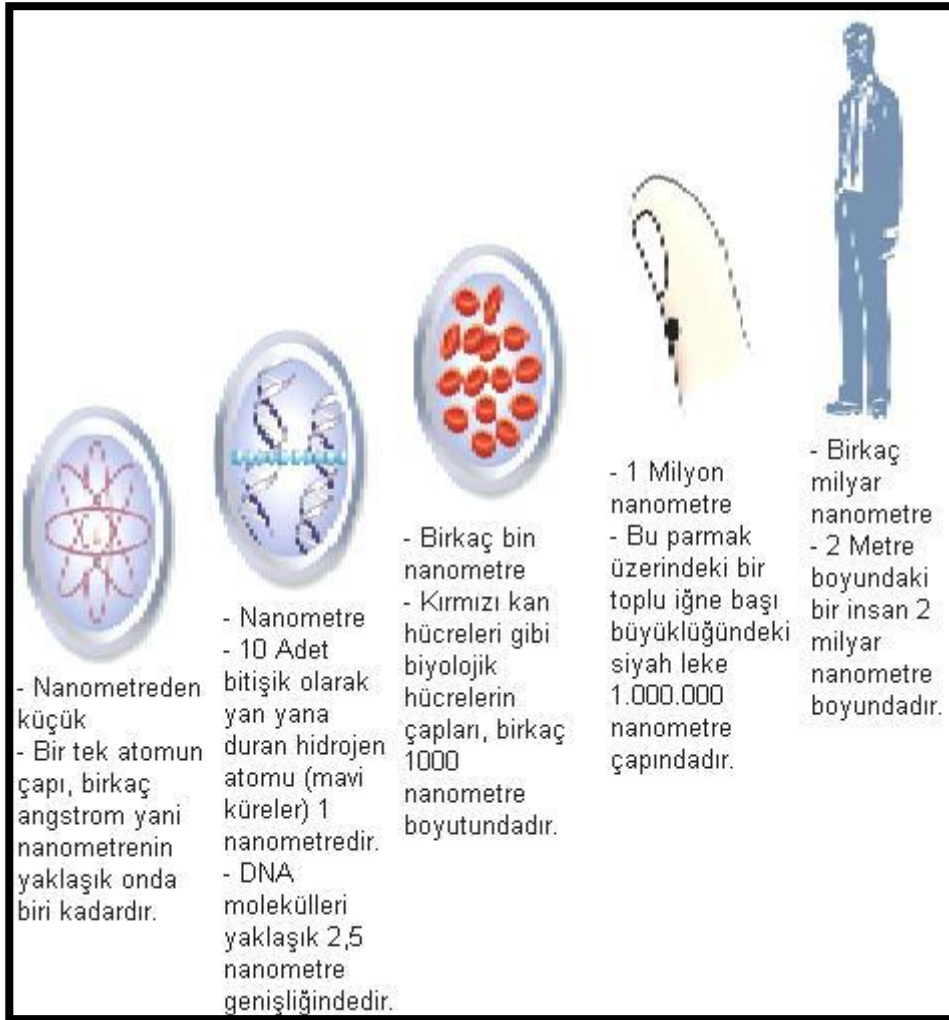
### 1.1.Nanoteknoloji

Richard Feynman 1959'daki bir konferansında atomik blokların moleküler düzeyde düzenlenmesini tartışarak ilk kez maddenin nano düzeyde kullanılma olasılığını ortaya attı. Feynman meşhur söyleminde "Görebildiğim kadarıyla, fizik prensipleri nesnelerin atom düzeyinde manupüle edilmesine karşı değildir. Bu, herhangi bir yasayı ihlal girişimi olmayıp, prensipte yapılabilir olan fakat biz çok büyük olduğumuz için pratikte şimdiye kadar yapılmamış olan bir şeydir" demiştir (Feynman, 1959; <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>). Feynman'ın bu önerisinden sonraki yıllarda nanoteknoloji alanı Eric Drexler ve Richard Smalley ile biyonanoteknoloji alanı da Chad Mirkin'in çalışmalarıyla başlamış kabul edilebilir. Rice Üniversitesinde bir kimya profesörü olan Richard Smalley nanoteknoloji alanının öncülüğünü yapmış ve 1996 yılında Nobel ile ödüllendirilmiştir. Eric Drexler 1991'de MIT'de Moleküler Nanoteknoloji alanındaki ilk doktora tezini yapmıştır. Bir araştırmacı ve yazar olarak gelişen teknolojiler ve bunların gelecekteki etkileri üzerine odaklanan öncülerden birisi olmuştur. Chad A. Mirkin ise nanosistemlerde kimyasal modifikasyon üzerine yaptığı çalışmalar ile biyonanoteknoloji alanına yeni açılımlar getiren öncü kimyacılarından birisidir (Feynman, 1959).



Şekil 1.1. Bilim ve teknolojiye gelişmeler (Çıracı, 2008).

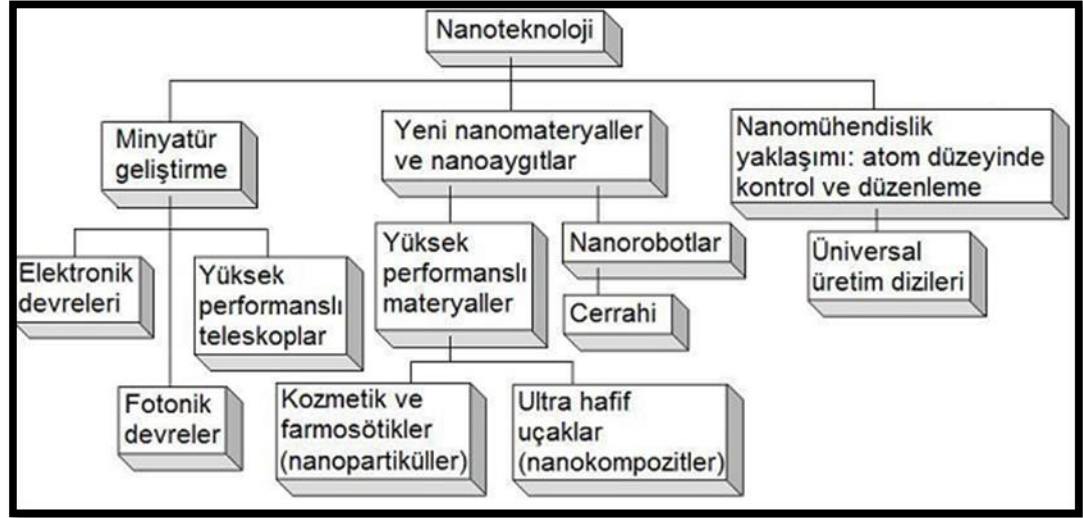
Günümüzde nanoteknoloji “benzersiz olağanüstülüğün çok özel uygulamalara izin verdiği 1-100 nanometre arasındaki boyutlara sahip maddenin anlaşılması ve kontrolü” olarak tanımlanabildiği gibi atomik veya moleküler boyut hassasiyetindeki aygıtların olduğu kadar 100 nm’den küçük tüm aygıtların üretilmesini içeren bir alan olarak da tanımlanmaktadır(Mamalis, 2006). Şekil 1.1’de mikro ve nano bileşenlerin örnekleri ve büyüklük skalaları görülmektedir (Cireli ve ark., 2006). Nanoteknoloji, maddenin atom veya molekülleri üzerinde yapılan uygulamalarla makinalaşmada hassasiyetin teorik sınırlarına ulaşması nedeniyle günümüzün en ileri üretim teknolojisi olarak kabul edilmektedir. Şekil 1.2’de ise nanometre boyutunun diğer örneklerle boyut olarak farkı gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Nanometre boyutunu anlatan örnekler (Cireli ve ark, 2006; Bozkaya, 2006).

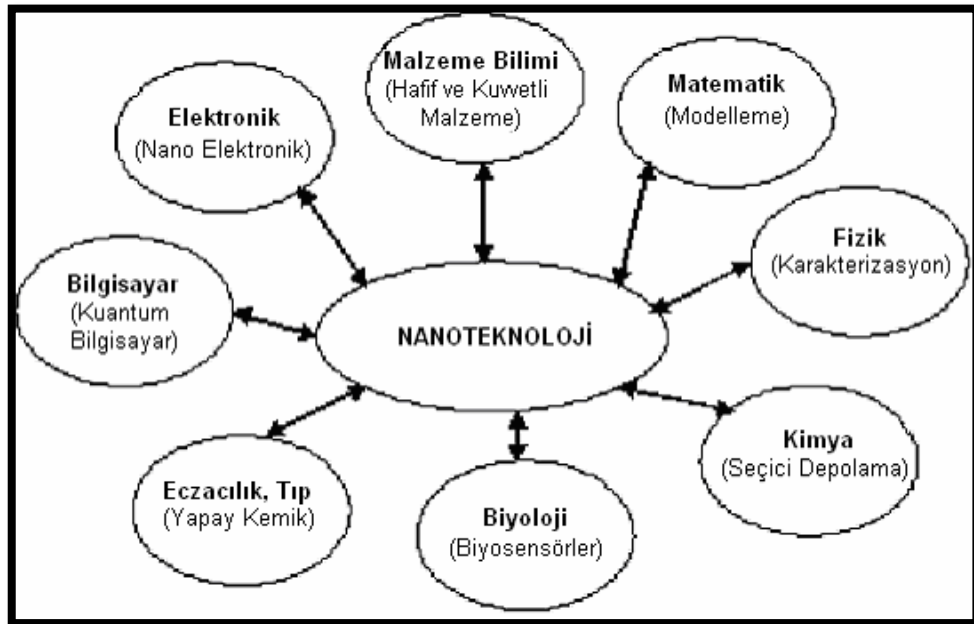
### 1.1.1. Nanoteknolojinin başlıca uygulama alanları

Aşağıda bulunan Şekil 1.3'te nanoteknolojinin uygulama alanları şematik olarak verilmektedir.



Şekil 1.3. Soldan sağa doğru nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları (Ramsden, 1999).

Şekil 1.4'te ise nanoteknolojinin diğer bilim dalları ile ilişkisi ve ortak uygulama alanları gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Nanoteknolojinin kullanım alanları (Özdoğan ve ark, 2006).

### 1.1.2.Nanoölçümleme ve nanoişleme

Nanoişleme de atomik olarak ürünlerin işlenmesi belirtilmektedir. 100-1000 atomluk çalışma alanında yapılan araştırmalarda MEMS(mikro elektrik mekanik sistemler) kullanılmaktadır. 100 nm altında yapılan bu çalışmalarda ürünler kuantum mekanik güçlere bağlı benzersiz özellikler kazanmaktadır. İletkenlikleri değişmekte, dayanıklılık, esneklik kazanmaktadır. Boyutların küçülmesiyle; partiküllerin büyüklüklerine bağlı olarak yeni özelliklerin ortaya çıktığı ispat edilmiştir(Evcin., 2010):

- Manyetik özellikler
- Optik özellikler
- Erime noktası
- Yüzey aktiviteleri gibi.

Farklı büyüklükteki bu partiküller 2, 3 ya da daha fazla elementin kombinasyonları olarak düşünülebilir ve bu kompozisyonda herhangi bir değişiklik, farklı bir fiziksel ve kimyasal özelliğe liderlik edebilir.

#### Niçin daha küçük daha iyidir?

- Daha hafif
- Daha kuvvetli
- Daha hızlı
- Daha dayanıklı
- Daha ucuz
- Daha fazla enerji verimi
- Çok küçük aralıklarda değişik özellikler (Klabunde., 2000).

### 1.1.3.Nanobiyoteknoloji

Nanoteknolojinin biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarını içeren alt dalına nanobiyoteknoloji adı verilir. Nanoteknoloji ile hücre biyolojisi arasındaki ilişki önemli olup iki yönlü bir ilişkidir. Nanoteknoloji, biyolojinin sağladığı muazzam nanomakina ve aygıtların oluşturulması için yaşayan sistemlerde bulunan nanoboyuttaki bileşenlerin biyologlar tarafından anlaşılabilmesi ve açıklanabilmesi için yeni araçlar sunar. Bunun tersine hücre biyolojisi mekanizmaları üzerindeki çalışmalar yeni sentetik nanoaygıtların yapılmasında yol gösterici olur. Evrim süreci, doğanın nanoboyuttaki mühendislik problemlerine etkili çözümler bulunmasını sağlamıştır. Nanoteknolojistler, biyolojik sistemleri nanoaygıtlara doğrudan inkorpore ederek ya da biyolojik analoglarının prensiplerini taklit eden sentetik sistemler oluşturarak bu çözümleri üretmektedirler. Nanoteknolojinin biyoloji için sunduğu en önemli olanak biyomoleküler yapı, fonksiyon ve özelliklerin araştırılması için yeni araçlar oluşturmasıdır. Bu yeni araçlar kullanıldığında hücrenin yapısal elemanlarının ve moleküler ilişkilerin doğrudan ölçümü mümkün olabilmektedir (Uygun, 2008).

Biyonanoteknolojinin gelişiminde biyolojik mekanizmaları taklit ederek nanoboyutlu aygıtların yapımı önemli rol oynamaktadır. Bu, çok büyük potansiyele olan bir alan olup gelecek yıllarda daha da gelişmesi beklenmektedir. Bu çalışmalara örnek olabilecek bazı biyolojik olaylara aşağıda değinilmiştir. DNA nanoteknoloji yapı taşı olarak kullanılabilir bir moleküldür. DNA'nın kendiliğinden düzenlenebilme ve doğada daima komplementer bir çift zincir olarak bulunma özelliği vardır. Bununla birlikte gelişigüzel baz sekansından oluşan DNA'nın yapılmasına izin veren sentetik metodolojiler de vardır. Böyle sentetik DNA sarmalları uygun düzenlemelerle üç boyutlu ağ oluşturacak hale getirilirse; öncelikle nanopartiküllerin büyümesi ve interaksyonu, ikinci olarak moleküler elektronik için bir kalıp olarak, üçüncüsü de nanomakina ve motorların üretilmesinde kullanılabilir (Uygun, 2008).

Biyonanoteknoloji doğanın kullandığı moleküler cihazları ve makineleri anlamaya, uyarlamaya ve uygulamaya odaklanmış durumdadır. Protein katlanması (folding) gibi biyolojik işlevler; cihazlar ve sistemler moleküler düzeyde nasıl bir araya getirilebilir amacıyla ipuçları aramaktadırlar. Nanobiyoteknoloji alanındaki diğer bir çalışma, yüzey özelliklerini işleyerek ve böylece onları biyoygun

yapa rak vücudun reddetme ihtimalini azaltmak için doku mühendisliği ile tıp ürünlerindeki gelişmeleri içermektedir (Başaran, 2004).

Biyolojide bulunan en çarpıcı nanoboyutlu makineler kimyasal enerjiyi dikkat çekici bir verimlilikle mekanik enerjiye dönüştüren, nanoboyutlu protein topluluklarından oluşan moleküler motorlardır. Bu moleküler motorların moleküler biyoloji ve biyofizik açısından önemi büyüktür. Nanoteknoloji açısından ise önemi iki kat daha fazladır: Birinci olarak taklit edilecek olağanüstü modeller oluştururlar. İkinci olarak, bize sentetik ve biyolojik nanoteknolojiyi birleştirerek hibrid yapıların ortaya çıkmasını sağlayacak çalışan, hazır hücre bileşenlerini sunarlar. Bir başka örnek de yapay fotosentezin gerçekleştirilmesidir. Fotosentezin verimi ışık toplayan kompleksler kullanılması durumunda çok artar. Bu kompleksler pek çok boya moleküllerinin (10-100) hassas bir ilişki içinde proteinlerle bağlanması ile oluşurlar. Farklı boya molekülleri farklı dalga boyunda ışığı absorblar ve fotosentezin verimliliği böylece çok artmış olur. Fotosentez, güneş enerjisini elektrik ve kimyasal enerjiye dönüştürmek için çok önemli bir model oluşturur. Bu nedenle sentetikmoleküllerle fotosentezi taklit etme çalışmaları devam etmektedir (Jones, 2009).

#### **1.1.4.Nano boyutların eldesi için kullanılan yöntemler**

Nanoteknolojide temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar;

1- Yukarıdan aşağıya (top down) yöntemi: Mikro elektroniğin var olan metodlarının nanoteknolojiye uyarlanmış hali biçiminde ifade edilebilecek bu yöntemde küçük özelliklere ulaşmak için daha büyük malzemelerden başlanır (örneğin yarı iletkenler). Ağırlıklı olarak litografik yöntemler kullanılır. Oyma ve işleme yöntemi ile nano yapılar ve şekiller elde edilir.

2- Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yöntemi: Bu yöntemin özü biyolojiden alınmıştır. Nanobilim, fiziksel bir bilim olarak düşünülür ancak hücre biyolojisi de nano ölçekte çalışmaktadır. Nano ölçekteki aletler yaşayan hücrelerin fonksiyonlarını taşımaktadırlar. Yöntemin esası atomlar veya moleküller ile organik veya inorganik yapı inşa etmeye dayanır. Nano yapıları birleştirmek için doğadaki kuvvetlerden yararlanır. Örneğin DNA gibi biyolojik sistemlerin kendi kendine birleşme özelliğinden yararlanılarak karbon nanotüplerin kontrolü sağlanabilir.

Kolloid ve sol-jel yöntemleri de bu yöneme dahildir. Nanoteknoloji, aşağıdan-yukarıya yaklaşımına (bottom-up approach) göre; moleküler boyutta sistemler üreterek daha büyük sistemleri kontrol etmek olarak tanımlanmaktadır. Yukarıdan-aşağıya yaklaşımına (top-down approach) göre ise; moleküler boyutta çalışan çok yüksek oranda küçültülmüş makineler yaratma bilimi olarak tanımlanabilmektedir (Üreyen, 2006).

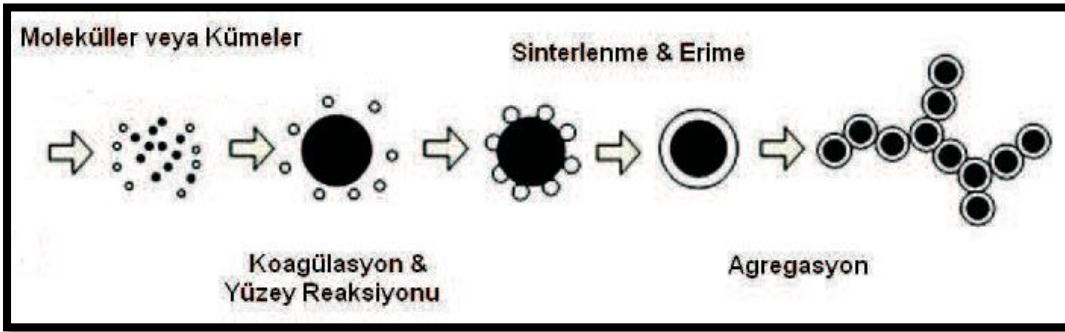
### **1.1.5.Nanopartiküller**

Nanopartiküller; metal, yarı iletken, seramik, organik moleküler topluluk, polimerik ya da kompozit malzemeler olabilir. Nanopartiküller yalnızca minyatürizasyonda yeni bir aşama olarak düşünülmemelidir; tümüyle yeni bir alandır. Geleceğin teknolojilerinin atom, molekül ve nanoküme boyutlarında, nanoyapıların organize edilmesi, aygıtlara dönüştürülmesi, malzemenin ve yüzeylerin tasarlanması ve işlenmesi üzerine inşa edileceği öngörülmektedir. Nanopartiküller boyutlarından dolayı, elektronik, optik, manyetik, yapısal ve mekanik özelliklerinde farklılık gösterirler. Bu farklılığın nedenleri ise; yüksek yüzey-hacim oranları ve nano boyutlu yapılarda ortaya çıkan kuantum alan etkileridir. Bir maddenin, nanopartiküllerin sahip oldukları bu özellikleri gösterebilmesi için genellikle 100 nm ya da daha küçük boyutta olması gerekmektedir (Mosbach, K., 2000). Nanomateryallerin sahip olduğu bir diğer özellik ise yüzey / hacim oranlarının boyut olarak kendinden büyük olan materyallere göre daha büyük olmasıdır. Bu özelliği sayesinde katalizör olarak kullanılmaları halinde daha az miktardaki nanomateryallerle daha yüksek verimde ya da hızda kimyasal reaksiyonların katalizlenmesi gerçekleştirilebilir.

### **1.1.6.Çözelti ortamında nanopartiküllerin oluşumu**

Nanopartikül, bir çözelti ortamında çekirdekleşmeye başlayan ve daha sonra da çekirdekleşen partiküllerin büyümesiyle oluşan bir kimyasal reaksiyonla meydana gelmektedir. Çekirdekleşme ve büyüme olayları sentezlenen yapılarda iki önemli prosestir. Çekirdekleşme, atomların agregasyonunu sağlayan bir prosestir ve faz dönüşümlerinin ilk adımıdır. Çekirdekleşme hem homojen hem de heterojen olabilir. Homojen çekirdekleşme, reaksiyonun gerçekleştiği ortamdaki türlerin

aynı olması halinde gerçekleşen bir çekirdekleşme türüdür. Heterojen çekirdekleşme de ise yabancı türler içeren bir ortamda çekirdekleşme gerçekleşir. Büyüme sürecinde sistemin termodinamiği kadar kinetik faktörler de ön plana çıkmaktadır. Partikül büyümesinde reaktiflerin geçiş hızı, reaksiyon hızı, maddenin çözeltiden uygun şekilde uzaklaşması ve maddenin tekrar dağılımı gibi kinetik faktörler termodinamik faktörlerle yarışmaktadır. Reaksiyon ve geçiş hızı reaktiflerin konsantrasyonundan, sıcaklıktan, pH'dan, çözeltiye eklenen reaktiflerin düzenlenmesinden ve karıştırmadan etkilenmektedir. Partiküllerin yapısı ve kristalizasyonu reaksiyon hızı ve safsızlıklardan etkilenebilir. Doygunluk, çekirdekleşme ve büyüme hızı, koloidal kararlılık, tekrar kristallenme ve bekleme süreci gibi faktörler partiküllerin morfolojisini etkilemektedir. Genelde aşırı doyumluk oluşan ürünlerin (çökeltilerin) morfolojisi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Düşük doyumlukta partiküller küçük, sık, iyi biçimlenmiştir ve partikül şekli kristal yapısına ve yüzey enerjisine bağlıdır. Yüksek doyumluk seviyelerinde büyük ve dallanmış partiküller oluşur. Daha fazla doyumlukta ise daha küçük fakat sıkıştırılmış, toplanmış (aglomera) partiküller oluşur. Partikül küçükken çözeltideki büyüme ara yüzey kontrollüdür. Kritik boyuta ulaşıldıktan sonra difüzyon kontrollü hale gelir (Murphy and Jana, 2002).



Şekil 1.5. Partikül oluşum aşamaları (Hu, 2007).

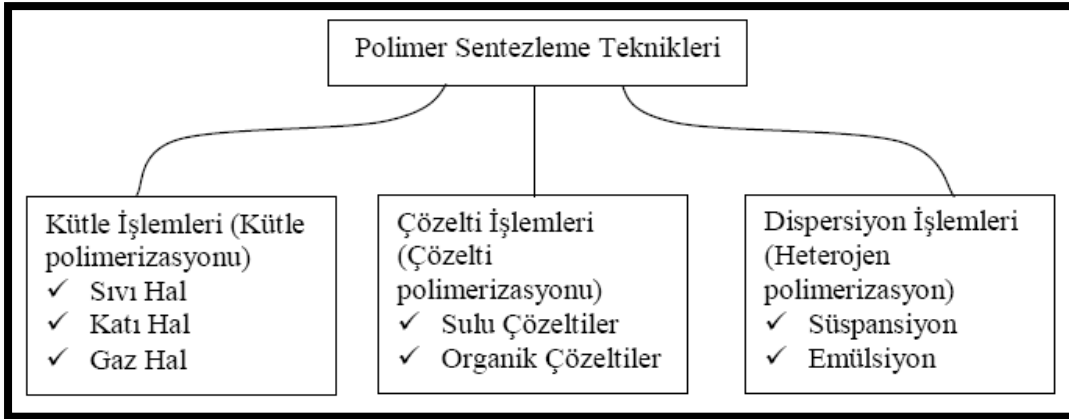
## 1.2. Polimerler

Polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanımına uygun, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir. Bu üstün özelliklerinden dolayı yalnız kimyacıların değil; makine, kimya, tekstil, endüstri, fizik mühendisliği gibi alanlarda çalışanların da ilgisini çeken materyallerdir. Tıp, biyokimya, biyofizik ve moleküler biyoloji açısından da polimerlerin önemi büyüktür. Birbirlerine

kovalent bağlarla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen küçük mol kütleli kimyasal maddelere monomer denir. Polimer ise, çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu iri molekülün adıdır. Monomer molekülleri polimerizasyon tepkimeleri üzerinden polimer molekülüne dönüşürler. Bir polimer molekülünde binlerce monomer bulunabilir. Uzun polimer molekülleri bir zincire, monomer molekülleri de zinciri oluşturan halkalara benzetilebilir. Bu nedenle, polimer molekülü yerine polimer zinciri ya da makromolekül adlandırılmaları da kullanılır. Zincir boyunca birbirine bağlanarak polimer molekülünün iskeletini oluşturan atomlar dizisine ana zincir adı verilir. Polimer ana zincirindeki atomlara ayrıca yan grup denilen bazı kimyasal birimler bağlanmıştır. Polimerler, kaynaklarına göre doğal ve sentetik polimerler, ana zinciri oluşturan atomların türüne göre organik ve anorganik polimerler, sentez tepkimelerinin mekanizmasına göre basamaklı ve katılma polimerleri, ısı karşısındaki davranışlarına göre termoplastikler ve termosetler, zincirlerinin fiziksel biçimlerine göre doğrusal, dallanmış, çapraz bağlı polimerler şeklinde kendi içlerinde değişik açılardan gruplandırılabilirler. Kesin bir sınır olmamakla birlikte mol kütlesi 10000-20000'den küçük olan polimerlere düşük polimer, daha büyük mol kütleliyle yüksek polimer denir. Polimerlerin sentezi sırasında polimerizasyon ortamında oluşacak zincirlerin uzunluğu kontrol edilemez. Polimerizasyonun her aşamasında farklı büyüklüklerde polimer molekülleri bulunur ve polimerizasyon sonunda elde edilecek polimer için de aynı durum geçerlidir. Bu nedenle polimerler için verilen mol kütlesi değerleri kesin değil ortalama sayılardır (Kumar et al, 2003).

### **1.2.1. Polimer sentezleme teknikleri**

Radikalik polimerizasyonlar gerçekleştiği koşullar altında hem homojen hem de heterojen tiplerde olabilir. Bu sınıflandırma genellikle başlangıç reaksiyon karışımının homojen veya heterojen olup olmamasına dayanır. Bazı homojen sistemler, reaksiyon ortamında polimerin çözünmezliğinin bir sonucu olarak polimerizasyon ilerledikçe heterojen olabilir. Kütle ve çözelti polimerizasyonları homojen işlemlerken, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları heterojen işlemlerdir (O dian, 2008). Şekil 1.6'da polimer sentezleme yöntemleri şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.6. Polimer sentezleme teknikleri (Braun, 2003).

### Kütle (Bulk) Polimerizasyonu

Saf bir monomerin bulk veya kütle polimerizasyonu, en basit işlem ile minimum kirlenmiş ürün oluşturur. Bununla birlikte, radikal zincir polimerizasyonunun özelliği nedeni ile bulk polimerizasyonunun kontrolü zordur. Yüksek derecede ekzotermik oluşları, yüksek aktivasyon enerjisine sahip olmaları ve jel oluşturmaya yatkınlık özellikleri birlikte ısı dağılımını zorlaştırır. Bulk polimerizasyonu, dikkatli sıcaklık kontrolü gerektirir. Dahası, bir çok sistemin viskozitesi yavaş karıştırmada hızlı bir şekilde yükseldiğinden güçlü ve özenli bir karıştırma ekipmanına da gereksinim vardır. Viskozite ve ekzoterm etkileri, sıcaklık kontrolünü zorlaştırır. Bölgesel sıcak noktalar oluşur ve bu durum polimer ürünün bozunmasına ve renksizleşmesine neden olduğu gibi polimere zincir transferleri nedeni ile molekül ağırlığı dağılımı genişler. Polimerizasyon hızının kontrolsüz arttığı ekstrem durumlarda yıkıcı, kontrolsüz reaksiyonlar oluşabilir. Kütle polimerizasyonu problem çıkarmasından dolayı zincir polimerizasyonu için adım polimerizasyonundaki kadar ticari olarak kullanılmaz. Bununla birlikte etilen, stiren ve metil metakrilatın polimerizasyonlarında kullanılır. Isı dağılımı ve viskozite problemlerinin, reaksiyona girmeyen monomerin geri dönüşümü ve ayrılması ile düşük dönüşümle polimerizasyonu gerçekleştirerek üstesinden gelinir. Bir alternatif, polimerizasyonu geniş bir reaktörde düşük dönüşümle ve ince tabakalar-daki final dönüşümüyle gerçekleştirmektir (Oğian, 2008).

### **Çözelti Polimerizasyonu**

Monomerin bir çözügen içinde polimerleşmesi, kütle polimerizasyonu işleminin birçok dezavantajının üstesinden gelir. Çözügen bir seyreltici gibi davranır ve polimerizasyon ısısının transferine yardım eder. Çözügen, reaksiyon karışımının viskozitesini azaltarak, karıştırmayı kolaylaştırır. Termal kontrol, kütle polimerizasyonu ile karşılaştırıldığında çözelti polimerizasyonunda daha kolaydır. Diğer taraftan çözügenin varlığı yeni zorluklara neden olabilir. Çözügen uygun bir şekilde seçilmezse çözügene zincir transferi bir problem olabilir. Dahası, çözügenin uzaklaştırılmasında zorluklar olursa polimerin saflığı etkilenebilir. Vinil asetat, akrilonitril ve akrilik asidin esterleri çözültide polimerleşir (O'dian, 2008).

### **Heterojen Polimerizasyon**

Birçok polireaksiyon, özellikle zincir polimerizasyonları, heterojen koşullar altında da gerçekleşebilir. Bu durumda sıvı monomer, çözünmediği bir sıvıda karıştırılarak küçük damlacıklara dağılır ve bu durumda polimerleşir. Reaksiyon süresince oluşan makromoleküller katı halde olduğundan dağılan fazın yığılma durumunda bir değişiklik olur. Bu sebeple orijinal sıvı/sıvı dağılımı (emülsiyon), bir sıvı/katı dağılımı (süspansiyon) haline gelir. Eğer polimer (poliakrilonitril gibi) monomerde çözünmüyorsa bu geçiş reaksiyonun başlarında olur. Aksi durumda, yani polimer (polistiren gibi) monomerde çözünüyor ya da şişiyorsa, emülsiyonun hali sadece yüksek dönüşümde değişir. "Emülsiyon polimerizasyonu" terimi sistemin başlangıç durumuna ilişkin iken "Süspansiyon polimerizasyonu" terimi final durumuna göre seçilmiştir. Bu biçimsel benzerliğe karşın iki işlem polimer taneciklerinin büyüklüğü (emülsiyon polimerizasyonunda 0,1-0,5 µm, süspansiyon polimerizasyonunda 0,5 µm-2 mm) ve reaksiyon kinetikleri bakımından farklıdır. Bu metodların şu avantajları vardır: Polimerizasyon ısısı, monomerin küçük damlacıklara parçalanması ve suyun yüksek ısı kapasitesi nedeniyle kolayca dağıtılır. Reaksiyon karışımı, yüksek dönüşümde bile çok hareketli kalır çünkü viskozite, monomer/polimer damlacıklarında artarken çözeltinin tümünün viskozitesinde büyük değişiklikler olmaz. Bu sebeple % 50 katı içerikleri kolay muamele edilir. Dispersiyon içindeki polireaksiyonlar laboratuarda kolayca hazırlanabilir. Bazı durumlarda dağılım polimerizasyonları, polikatılmalı ve polibasamaklı reaksiyonlarda da kullanılabilir. Süspansiyon ve emülsiyon teknikleri, oluşan polimerlerin özelliklerini modifiye etmek için ilave yollar sağlar. Örneğin; Tanecik büyüklüğü ve tanecik büyüklüğü dağılımının değiştirilmesi, iyonik grupların küçük miktarla-

rının yapıya girmesi, çekirdek/kabuk yapısına sahip polimer taneciklerinin hazırlanması gibi (Braun et al, 2003).

### **Süspansiyon Polimerizasyonu**

Süspansiyon polimerizasyonu (boncuk veya küre polimerizasyonu olarak da adlandırılır) monomerin su içinde (sürekli faz) damlacıklar halinde (50-500 µm çapında) süspansiyon edilmesiyle gerçekleştirilir. Stiren, akrilik ve metakrilik esterler, vinil klorürler, vinil asetat ve tetrafloroetilen süspansiyon metoduna göre polimerleşir. Su/monomer kütle oranı çoğu polimerizasyonda 1/1'den 4/1'e değişir.

Monomer damlacıklarının (daha sonra polimer taneciklerine dönüşür) birleşmeleri çalkalama ve süspansiyon stabilizörünün (aynı zamanda dağıtıcılar veya yüzey aktif maddeler olarak da adlandırılır) varlığı ile önlenir. Stabilizörlerin suda çözünen polimerler (sıkça elektrolit veya tamponun varlığında) ve suda çözünmeyen inorganik maddeler olmak üzere iki tipi kullanılmaktadır. Suda çözünen polimer sınıfını poli(vinil alkol), hidroksipropil selüloz, sodyum poli(stiren sülfonat) ve akrilik asit-akrilat ester kopolimerinin sodyum tuzu; suda çözünmeyen inorganik maddeler sınıfını ise talk, hidroksiapatit, baryum sülfat, kaolin, magnezyum karbonat ve magnezyum hidroksit, kalsiyum fosfat ve alüminyum hidroksit oluşturur.

Süspansiyon stabilizörünün miktarı genelde sulu fazın (suda çözünen polimerler bazen yüksek derişimlerde kullanılmasına rağmen) kütle yüzdesinin 0,1'inden daha azdır. Bu değer emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan yüzey aktif madde derişimlerinden daha düşüktür ve süspansiyon polimerizasyonunda daha büyük boyutlu monomer damlacıkları elde edilmesini açıklar. Emülsiyon polimerizasyonun aksine süspansiyon polimerizasyonunda iki fazlı sistemin sürekliliği çalkalanmaksızın sağlanamaz. Diğer bir fark süspansiyon polimerizasyonunda kullanılan dağıtıcıların, emülsiyon polimerizasyonundaki gibi kolloidal miselleri nadiren oluşturmasıdır. Süspansiyon polimerizasyonda kullanılan başlatıcılar monomer damlacıklarında çözünür. Böyle başlatıcılar genellikle yağda-çözünen başlatıcılar olarak adlandırılır. Süspansiyon polimerizasyonundaki her monomer damlacığı küçültülmüş bir kütle polimerizasyon sistemi olarak ele alınabilir. Her bir damlacık içindeki polimerizasyon kinetikleri karşılık gelen kütle polimerizasyonununkinin aynısıdır (O'dian, 2008).

## Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyonda çalışmak, aslında sudaki radikal polimerizasyonu ile sınırlıdır. Süspansiyon polimerizasyonuna benzer olarak temel prensip suda eser miktarda çözünen bir monomerin su içinde dağılması ve bu durumda polimerleşmesidir. Bununla birlikte, bu iki işlem arasında bazı farklılıklar vardır. Bunlar;

- Monomerin suda çok az da olsa bir çözünürlüğü gereklidir. Stearil akrilat gibi fazla hidrofobik monomerler emülsiyon koşullarında polimerleşmezler.
- Monomerin emülsifikasyonu, miseller oluşturabilen suda çözünür emülsiyonlaştırıcıların varlığında olur. Polimerizasyonun başlangıcında monomer misellerdeki gibi monomer damlacıkları şeklindedir.
- Birkaç özel durumun dışında suda çözünür başlatıcılar (potasyum peroksodisülfat; redoks sistemleri) kullanılır.
- Başlangıç basamağı tercihen sulu fazda gerçekleştirilir.
- Polimerizasyon, monomer damlacıklarında değil lateks taneciklerine yavaşça şişmek sureti ile misellerde gerçekleşir.
- Polimerizasyonun hızı (sabit başlatıcı derişiminde) misellerin sayısına ve dolayısıyla emülsiyonlaştırıcının derişimine bağlıdır. Polimerizasyon hızı ve derecesi eş zamanlı olarak arttırılabilir.
- Oluşan polimer taneciklerinin büyüklüğü, süspansiyon polimerizasyonunununkinden çok daha küçüktür.

Emülsiyon polimerizasyonu için gerekli malzemeler aslında dört bileşeni içerir. Bunlar; su (deminealize), suda çok az çözünen bir monomer, suda çözünen radikal oluşturucu bir başlatıcı ve bir emülsiyonlaştırıcıdır. Bir emülsiyon polimerizasyonunun gidişatı ve oluşan polimer lateksin özellikleri emülsiyonlaştırıcıdan güçlü bir şekilde etkilenir. Emülsiyonlaştırıcı moleküller hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşur. Hidrofilik kısım üzerindeki elektrik yüküne göre anyonik, katyonik ve non-iyonik emülsiyonlaştırıcılar olarak sınıflandırılır. Anyonik emülsiyonlaştırıcıların örnekleri alkil-bağlı benzen veya naftalen sülfonik asitlerin tuzları yanında yağ asitleri, sodyum dodesil sülfatların  $K^+$ ,  $Na^+$  ve  $NH_4^+$  tuzlarıdır. Katyonik emülsiyonlaştırıcıların örnekleri, en azından tek bir hidrofobik süstitüente sahip olan kuaterner amonyum tuzlarıdır. Tipik non-iyonik emülsiyonlaştırıcılar, etoksillenmiş fenoller ve etilen oksit ve propilen

oksitin blok kopolimerleridir. Çok seyreltik sulu çözeltilerde emülsiyonlaştırıcılar, izole edilmiş moleküller veya elektrolitler olarak davranır. Bununla birlikte emülsifiyer derişiminin artması ile çözeltilerin yüzey gerilimi, viskozite, elektriksel iletkenlik ve ozmotik basınç gibi bazı fiziksel özelliklerinde beklenmedik değişimler olabilir. Bu beklenmedik değişimlerin gözleendiği derişim kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır. Her emülsifiyer için bu değer karakteristiktir. Kritik misel konsantrasyonunun altında emülsifiyer yalnız bir molekül gibi çözüdür, CMC'nin üzerinde emülsifiyer moleküller, düzenli molekül agregatlarını oluşturmak üzere toplanır ve bu miselerde hidrofobik birimler iç kısımlara yönelirken hidrofilik kısımlar sulu faza doğru yönelir. Bu miseller yaklaşık 3,5 nm çapındadır.

Monomerin ilavesi ile misellerin büyüklüğü 4,5-5,0 nm çapına kadar önemli oranda artar. Bununla birlikte, monomer damlacıklarının boyutları misellerinkinden yine de çok daha büyüktür. Emülsiyon polimerizasyonunda genellikle monomerin % 0,5- 5,0' ı kadar emülsifiyer kullanılır. Sudaki yağ emülsiyonlarında, su içeriği monomerin miktarının yarım katından dört katına kadar değişir. Bu miseller sıvıların mL' sinde yaklaşık  $10^{18}$ ' lik bir derişimde bulunurlar ve her misel yaklaşık 100 monomer molekülünü içerir. Aksine monomer damlacıklarının sayısı yaklaşık mL başına  $10^{10}$  kadardır. Bu sebeple monomer damlacıklarının daha geniş hacimlerine rağmen miseller daha geniş yüzey alanı sunar. Sulu fazda oluşan bir radikal, monomer damlacıklarından ziyade daha sıklıkla monomer dolu miseller ile çarpışacaktır. Böylece, polimerizasyon pratik olarak monomer damlacıklarında değil sadece miselerde gerçekleşir. Miselerde tüketilen monomerin yerine sulu faz içinden geçerek monomer damlacıklarından difüzlenenler geçer. Harkins ile Smith ve Ewart'ın teorilerine göre emülsiyon polimerizasyonunun kinetik gidişatı üç kısma ayrılır; Başlangıçta polimerizasyon ilerlerken misellerden bazılarının boyutları hızlıca artar ve hem monomer hem de polimeri içeren lateks olarak adlandırılan taneciklere dönüşür. Bu tanecikler hala monomer damlacıklarından çok daha küçüktürler ve sıvının mL'si başına yaklaşık  $10^{14}$  tanecik olacak şekilde yaklaşık 20-40  $\mu$  m başlangıç çaplarına sahiptirler. Tüketilen monomer sürekli olarak sulu faz içinden difüzyon yolu ile gelen monomer damlacıklarından tamamlanır. Büyümekte olan lateks partiküllerinin yüzeyine sulu fazdan giderek daha çok emülsifiyer molekülü adsorplanarak stabilizasyona yardım ederken hiç polimer içermeyen miseller yavaşça ortadan yok olur. Serbest emülsifiyerin derişimi sonunda kritik misel derişiminin altına düşer

ve bu durumda yüzey gerilimi önemli oranda artar. Bundan sonra, pratikte hiç yeni lateks tanecikleri oluşmaz. Tanecik oluşumu periyodu olarak adlandırılan emülsiyon polimerizasyonunun bu ilk fazı yaklaşık % 10-20'lik dönüşümden sonra tamamlanır.

Bu noktadan sonra, polimerizasyon sadece sayısı sabit kalan lateks taneciklerinde gerçekleşir. Monomer damlacıkları lateks partiküllerine monomer taşıyıcı rezervuar olma fonksiyonlarını devam ettirirler böylece lateks partikülleri içindeki monomer derişimi ve buna bağlı olarak da polimerizasyon hızı sabit kalır. İkinci periyot sırasında, reaksiyon monomer açısından sıfıncı derecedendir.

Polimerizasyonun monomer taneciklerinin tümünü harcadığı yani dönüşümün % 60- 80 düzeyinde olduğu durumda, artık kalan monomerlerin tümü lateks taneciklerinde bulunmaktadır. Bu durumda taneciklerdeki monomer derişimi polimerizasyon ilerledikçe azalır yani reaksiyonunun son periyodu birinci derecedendir. Polimerizasyonun sonunda emülsiyon, orijinal misellerden daha büyük fakat orijinal monomer damlacıklarından daha küçük olan 50-150  $\mu$  m aralığında büyüklüklere sahip polimer taneciklerinden oluşur (Braun et al, 2003). Emülsiyon polimerizasyonu, çeşitli ayırt edici avantajlara sahiptir. Emülsiyon (kolloidal) sisteminin fiziksel durumu işlemin kontrolünü kolaylaştırır. Termal ve viskozite problemleri, kütle polimerizasyonundan daha az önemlidir. Lateks olarak adlandırılan emülsiyon polimerizasyonunun ürünü bir çok durumda ileri bir ayırma gerektirmeksizin doğrudan kullanılabilir. Böylesi uygulamalar boyaları, kaplamaları, apreleri ve yer cilalarını içerir. Emülsiyon ve diğer polimerizasyon işlemleri arasındaki fiziksel farklılıklardan başka kinetik farklılıklar çok önemlidir. Emülsiyon polimerizasyonu, polimerizasyon hızını azaltmaksızın polimerin moleköl kütlesini arttırma kabiliyetine sahip olan eşsiz bir işlemdir. Farklı reaksiyon mekanizması nedeni ile emülsiyon polimerizasyonu, hem yüksek moleköl kütlesi hem de yüksek reaksiyon hızlarına eş zamanlı olarak ulaşma kabiliyeti avantajına sahiptir (O dian, 2008).

### 1.2.2. HEMA

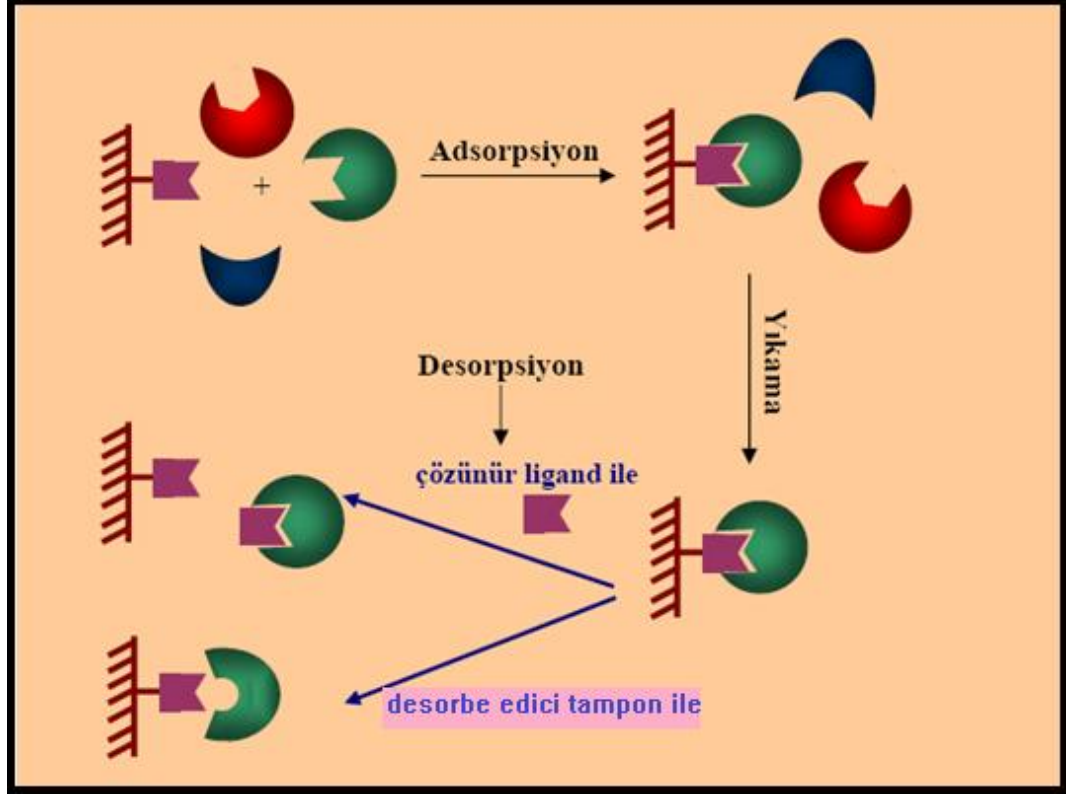
Biyotıp ve biyoteknolojide metakrilat hidrojellerinin kullanımı, son on yılda çok önemli ilerlemeler göstermiştir. 1960' larda gelişen öncü çalışmalardan (Wichterle and Lim, 1960) sonra metakrilat hidrojelleri ilaç dağıtım sistemleri, kontak lensler, gıda teknolojisi, kalite kontrol sistemleri ve biyosensörler için sentetik membranlarda uygulanmaktadır. Metakrilat hidrojeller genellikle iki farklı monomerden oluşur. Oluşan kopolimerin özellikleri monomerlerin yapısına ve derişimine bağlıdır.

HEMA (2-hidroksietil metakrilat), suda çözünebilen bir monomerdır. Enzim ve biyolojik moleküllerin immobilizasyonunda etkili olabilen bu monomer çok düşük sıcaklıklarda (-20, +10 °C arasında) polimerize olmaktadır. Ayrıca HEMA'nın diğer monomerlerle kopolimerizasyonu sonucu şişme derecesi, mekanik güç, optik özellikler ve oksijen geçirgenliği gibi farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip hidrojel ürünler oluşmaktadır. p(HEMA) hidrojel hazırlanmasında kolayca modifiye olabilen ve enzim immobilizasyonunda matriks olarak kullanılan bir polimerdir (Perez vd., 2006). Polimerde hidroksietil gruplarının varlığı materyale hidrofilik karakter ve biyolojik uygunluk sağlamaktadır (Hoffman 2001; Perez vd., 2006). Polihidroksietil metakrilat p(HEMA), hidrofilik karakterde, minimum düzeyde spesifik olmayan protein etkileşimleri sağlayan, yüksek kimyasal ve mekanik kararlılığı ve mikrobiyal ve enzimatik saldırılara karşı dayanıklı olan bir polimerdir (Denizli vd., 1998; Odabası ve Denizli, 2001; Denizli,2008).

### 1.3.Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşimine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak enzimler, koenzimler, kofaktörler, antibadiler, aminoasitler, oligopeptidler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin 2001).

Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.

Katı fazdaki bağlama özelliğinin özgüllüğü seçici bağlama maddesinin (ligand) destek matrisine kovalent bağla bağlanmasıyla sağlanır. Katı fazda örnekten istenen madde seçimli olarak tutulur. Bağlanmayan maddelerin yıkanarak kolondan uzaklaştırılmasından sonra ayrılan, tutunan (veya saflaştırılan) madde sıvı (mobil) fazın iyonik kuvveti veya pH'ı değiştirilerek kolondan elüe edilir. Destek matrisine kovalent bağla bağlanmış ligantın kolona bağlı kalabilme ve hedef molekül serbest bırakıldıktan sonra da biyolojik olarak aktif olabilme kabiliyeti istenen anahtar özelliktir.

Afinite kromatografisi enzim, antibadi gibi büyük moleküllerin saflaştırılmasında veya küçük bileşiklerin araştırmadan önce seçilip çıkartılmasında kullanılır. Ayrıca hücre ayırma işlemleri de afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Çizelge 1.1’de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler (Keçili, 2006).

Safılaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

Küçük ligandları (enzim inhibitörleri) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları (spacer arms), etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keçili, 2006).

### Destek (Matriks)

Matriks, biospesifik ligandın üzerine kovalent olarak bağlandığı materyaldir. Matriks seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk husus matriksin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmasıdır. Bunun yanı sıra yüksek akış hızlarında rijit olması gerekir. Matriks tek başına ayrılması istenen biyomolekülle hiçbir etkileşime girmeyecek şekilde inert ve saf olmalıdır. Matriksin gözenek yapısının biyomolekülün gözeneklere girmesine ve liganda bağlanmasına olanak sağlayacak şekilde büyük olması gerekir. Ayrıca matriks ucuz olmalı ve tekrar kullanılabilir. Destek materyali olarak agaroz, selüloz, silika ve değişik organik polimerler kullanılabilir (Keçili, 2006).

## **Ligand**

Matrikse kovalent olarak bağlanan ve ayrılması veya saflaştırılması istenen biyomoleküle özel, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelerdir.

Ligandı matrikse bağlamak için genelde kimyasal immobilizasyon yöntemleri kullanılır. Birçok durumda ligandın matrikse bağlanması için bağlayıcı materyaller kullanılır. En çok kullanılan grup metilen grubudur. Matriksleri kimyasal olarak kararsız duruma getirmek ve ligand ile bağlanmasını sağlamak için birçok aktivasyon yöntemi kullanılır. En çok kullanılan aktivasyon yöntemi siyanojen bromür aktivasyonudur. Ligandın amino grubu içermediği, matriks ve ligand arasında değişen uzunlukta hidrokarbon zinciri konması gerektiği durumlarda siyanojen bromür ile aktive edilmiş taşıyıcı alifatik diamin bileşikleri ile reaksiyona girerek  $\omega$ -alkil türevleri elde edilir. İyi bir ligand ilk olarak saflaştırılacak madde için özgün ve dönüştürülebilir bağlanma özelliklerine sahip olmalıdır. Ayrıca matrikse, bağlama aktivitesini bozmayacak şekilde tutunmasını sağlayacak kimyasal olarak modifiye edilebilir gruplara sahip olmalıdır.

Biyomoleküllerin saflaştırılmasında birçok ligand kullanılmaktadır. İmmobilize edilmiş lektin birçok glikoprotein saflaştırılmasında kullanılır. Hormon reseptörler hormonların, hormonlar da reseptörlerin saflaştırılmasında kullanılır. İmmünoafinite ile antبادiler antijenlerin saflaştırılmasında kullanılır. Afinite kromatografisinde kullanılacak ligandın sentezi üç adımda incelenebilir;

1. Kullanılacak ligandın seçimi
2. Kullanılacak destek matriksinin seçimi
3. Uygulanacak kimyasal yöntemin seçimi

Kullanılacak ligandın seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ligandın proteine karşı spesifikliğinin fazla olması ve bağlanmanın geri dönüşümlü olmasıdır. Kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir. Birçok biyomolekülün ligand olarak kullanılması düşünülse de çok pahalı olmaları ve kararlılıklarının düşük olması sebebi ile tercih

edilmezler. Pseudo-spesifik (biyomimetik) ligandların geliştirilmesi ile bu tip dezavantajlar büyük ölçüde giderilmiştir(Keçili, 2006).

### **Ara Kollar (Spacer Arms)**

Ligandla matriks arasındaki karbon zincirleridir. Biyolojik maddelerin aktif bölgelerinin molekülün derin kısımlarında olması durumlarında destek matriksiyle liganda tutunan maddeler arasındaki istenmeyen etkileşimleri önlemek amacıyla matriksle ligand arasına bir kol yerleştirilir. Bu arakolun uzunluğu kritiktir. Eğer çok kısa olursa beklenen etkiyi gösteremez ve ligand örnek içindeki hedef maddeleri bağlayamaz. Çok uzun olursa ayırma işleminin seçiciliği azalır ve ara kol ile örnekteki maddeler ile hidrofobik etkileşime girerler (Keçili, 2006).

### **1.3.1. Afinite kromatografisi türleri**

#### **Pseudo-Spesifik Afinite Kromatografisi**

1987’de Cram, Lehn ve Pederson’un Nobel Ödülü almasından günümüze kadar moleküler tanıma ifadesi büyük ilgi görmeye başlamıştır. Moleküllerin, biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak ayrılma ve saflaştırılmasında “Afinite Kromatografisi” seçimliliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yer tutmaktadır.

Afinite kromatografisinde klasik ayırma yöntemlerinden farklı olarak molekülleri seçici olarak tanıma yeteneğine sahip ligandlar kullanılmaktadır. Afinite kromatografisi ile proteinler, enzimler, hormonlar, antibadiler ve antijenler gibi biyolojik moleküllerin saflaştırılması başarı ile gerçekleştirilmiştir. Ancak endüstriyel boyutta düşünüldüğünde yöntemin en önemli dezavantajı kullanılan ligandların oldukça pahalı olmasıdır. Ayrıca biyolojik ligandlar (proteinler, enzim substratları ve inhibitörleri, nükleik asitler ve hormon reseptörleri v.s) oldukça büyük moleküllerdir. Bu ve bunun gibi problemler seçiciliği yüksek ve daha ucuz yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Son yıllarda biyomoleküllerin saflaştırılmasında biyoligandların yerine pseudospesifik (biyomimetik) ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Biyomimetik

ligandların temelini moleküler tanıma oluşturur. Özellikle biyolojik tanıma özelliğine sahip yapıların keşfi ve bu etkileşimlerin mekanistik olarak aydınlatılması ile moleküler tanıma yeteneği olan yapay moleküllerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Biyomimetik ligandlar biyolojik molekülleri taklit ederek saflaştırılması istenen hedef molekül ile moleküler tanıma temeline göre etkileşebilen yapay moleküllerdir. Bu tür ligandların kullanıldığı afinite kromatografisi türüne “Pseudo-afinite kromatografisi” denir (Keçili, 2006).

Psedo-spesifik moleküller ayırma ve saflaştırmanın yanı sıra biyoteknoloji, tıp ve biyoanalitik alanlarında da kullanılmaktadır. Pseudospesifik ligandlar biyoligandlara göre önemli avantajlara sahiptirler (Bueno, 1996). Bu avantajlar arasında ucuz, küçük moleküller, sterillenebilme kolaylıkları ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalarını sayabiliriz. Aynı zamanda psedospesifik ligandların afinite sabitleri ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$   $M^{-1}$ ) düşüktür ve zayıf afinite ligand ailesine aittirler. Buna rağmen elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin toplam etkileri seçici ve kuvvetli bir etkileşime neden olmaktadır. Pseudo-spesifik ligandların (örneğin aminoasit bazlılar) uygulama esnasında matriksten sızma durumunda herhangi bir immün cevaba neden olmamaları biyoligandlara göre önemli avantajları arasındadır (Huang and Carbonell 2000; Baumbach et al, 2009). Ayrıca bu ligandlar biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretilebilmektedirler.

Pseudo-spesifik ligandlar ilgili ilk çalışmalar ligand olarak tekstil boyalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tekstil boyalarının en büyük özelliği, protein yapısındaki dipeptit bağlarını taklit edebilmeleridir. Tekstil boyalarının hedef moleküle spesifitesini arttırmak için uç gruplar takılabilir ya da moleküller yeniden dizayn edilebilirler. Bu yeni tip boyalara “Biyomimetik boyalar” adı verilir. İlk biyomimetik boya tripsin saflaştırılması için diaminometil benzen grubu aracılığıyla klorotriazin halkasını reaktive etmek için benzamidin kullanılmasıyla hazırlanmıştır (Keçili, 2006).

### **1.3.2.Biyoafinite kromatografisinin uygulama alanları**

Biyoafinite kromatografisinin başlıca amacı biyomoleküllerin saflaştırılması ve ayrılmasıdır. Son yıllarda biyoafinite kromatografisi sadece proteinlerin değil, aynı zamanda nükleik asit ve hücrelerinde ayrılmasında başarıyla uygulanmıştır.

#### **Protein Saflaştırma**

Proteinlerin saflaştırılması afinite kromatografisinin ana amacıdır. Bu tekniğin geliştirilmesi (matriks seçimi, metod geliştirilmesi) gerçekte protein saflaştırmanın bir fonksiyonu olarak yapılmıştır. Bu alanda, proteinlerin saflaştırılması ya gerçek biyospesifik afinite ya da psedo-biyospesifik afinite kromatografisi ile yapılır. İlk durumda ligand, bir substrat, kofaktör, reseptör veya antibadi olabilir. İkinci durumda ligand, basit (aromatik, hidrofobik...) ya da kompleks etkileşimde bulunan sentetik ya da doğal bir moleküldür. Örnek olarak albümin, dehidrojenazlar, kinaz gibi pek çok proteine afinite gösteren immobilize edilmiş Cibacron Blue verilebilir.

#### **Hücre Saflaştırma**

Hücre ayrımları için afinite kromatografisi, glutaraldehit, aktiflenmiş AcA ve Mersalil-Trisakril C üzerine immobilize edilmiş antibadilerin kullanımıyla başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Avidin-Ultragel A4R de hücre ayrımı için ilginç ve çok yönlü bir araçtır.

Elüsyon, hücre uygulamasına etki edebilecek iyonik kuvvet veya pH değişimlerinin olmadığı fizyolojik koşullarda gerçekleştirilir. Üç tür elüsyon söz konusudur:

- Yarışmalı elüsyon
- Mekanik elüsyon
- Çift adsorpsiyon-desorpsiyon mekanizması

Rekabete dayalı elüsyon genellikle ligand lektin olduğunda şekerlerle gerçekleştirilir. Mekanik elüsyon cam çubuk kullanılarak yumuşak bir hızlandırma ile süspansiyonda gerçekleştirilir. Çift adsorpsiyon mekanizması ligand ve jel arasında ayrılabilir bağlar içerir.

### **Nükleik Asit Ayırma**

Nükleik asitler, diğer biyomoleküllerle çok sayıda afinite etkileşimlerine sahiptirler. Çift sarmallı DNA oluşumu, pürin ve pirimidin bazları arasındaki (H bağları, hidrofobik, yük-transfer etkileşimleri gibi) baz çiftlenme etkileşimleri sonucudur. Kromozomların oluşumunda, histonlarla DNA'nın birleşmesi, DNA zincirinde çok sayıda enzimin davranışı bu etkileşimlere birkaç örnektir. Nükleik asitler üç farklı tür etkileşimi içerir;

- Baz etkileşimlerini tamamlayıcı
- Proteinlerle etkileşim
- Belirli aromatik moleküllerle etkileşim

Protein ve enzimlerle biyoafinite genellikle nükleik asitlerin immobilizasyonunu içerir. Bu afinite tamamlayıcı sistem, immobilize DNA üzerine proteinlerin etkileşimiyle DNA'nın saflaştırılmasını açıklar. Yine de bazı durumlarda histonlar DNA'nın ayrılması için ligand olarak kullanılırlar.

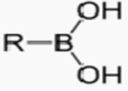
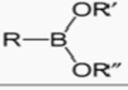
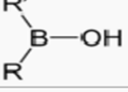
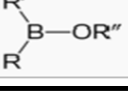
Nükleik asitler ve bazı aromatik moleküller arasındaki afinite mekanizmaları, pürin ve pirimidin bazları ve DNA sarmalı ve dışındaki elektrostatik etkileşim prosesleri arasındaki etkileşim nedeniyledir. Bu oluşum, yük-transfer etkileşimlerini, hidrofobik ve tamamlayıcı iyonik yükleri içerir( Keçili, 2006).

### **1.4.Boronat Affinite Kromatografisi**

Boronik asit fonksiyonel grubu taşıyan destek malzemelerinin kullanımını içeren kromatografik uygulamalar "Boronat Affinite Kromatografisi" başlığı altında toplanabilir. Bu uygulamalar, destek malzemelerinin boronat grupları ile hedef moleküllerin diol grupları arasındaki kompleks oluşumuna dayanır. Bir anlamda

boronatlar, genel lektinler olarak düşünülebilir. Belli bir karbohidrat için spesifikliği, lektine göre daha az olmakla birlikte, lektinlere göre kararlılıklarının ve işlem esnekliklerinin daha fazla olması ve daha düşük maliyetleri gibi üstünlükleri vardır. Boronatlar, ılımlı koşullarda kolayca uygun geometrideki polar fonksiyonel gruplarla tepkimeye girerler (Çizelge 1.2). 1,2 dioller, 1,3 dioller ve katekol tipi bileşiklerin kompleksleri en sık karşılaşılan türler olmasına karşın, 1,2 hidroksi asitler ve 1,2 hidroksilaminler gibi diğer fonksiyonel grupların da boronatlarla kompleks oluşturduğu bilinmektedir (Şenel, 2002). Glikozidik bağlantıların cis-diollerin sayısını azalttığı polisakkaridlerde ise sadece uç şeker grupları kompleks oluşumu için uygundur. Karbohidratlar, nükleozidler, nükleik asitler, katekol bileşikleri ve glikoproteinler gibi çok sayıda bileşik, immobilize boronatların afinite ligandı olarak kullanıldığı boronat afinite kromatografisi ile izole edilebilir ya da saflaştırılır (Singhal, 2002).

Çizelge 1.2. Boronik asit türevleri.

Bileşik	Genel Formül	Kimyasal Yapı
Boronik Asit	$RB(OH)_2$	
Boronik Ester (Boronat esteri)	$RB(OR)_2$	
Boronik Asit	$R_2BOH$	
Boronik Ester (Boronat esteri)	$R_2BOR$	

### Boronat Ligandlarının Biyomoleküllerle Etkileşimi

Boronik asit, üç değerlikli bor elementine bağlı alkil bir sübstitüent (C-B bağı) ve iki hidroksil grubu içeren organik bir bileşiktir. Dehidrate edildiklerinde siklik ve lineer oligomerik anhidritler oluştururlar. Lewis asitleri olarak davranırlar. Fenilboronik asit suda 8.8'lik  $pK_a$  değeri ile fenolle karşılaştırılabilir asitliğe sahiptir. Elektron çeken gruplar, asitlik kuvvetini artırır (De Silva, 2009). Glikoz ve fruktozla siklik ester oluşturduğunda  $pK_a$  değeri sırası ile 6,8 ve 4,5'e iner.

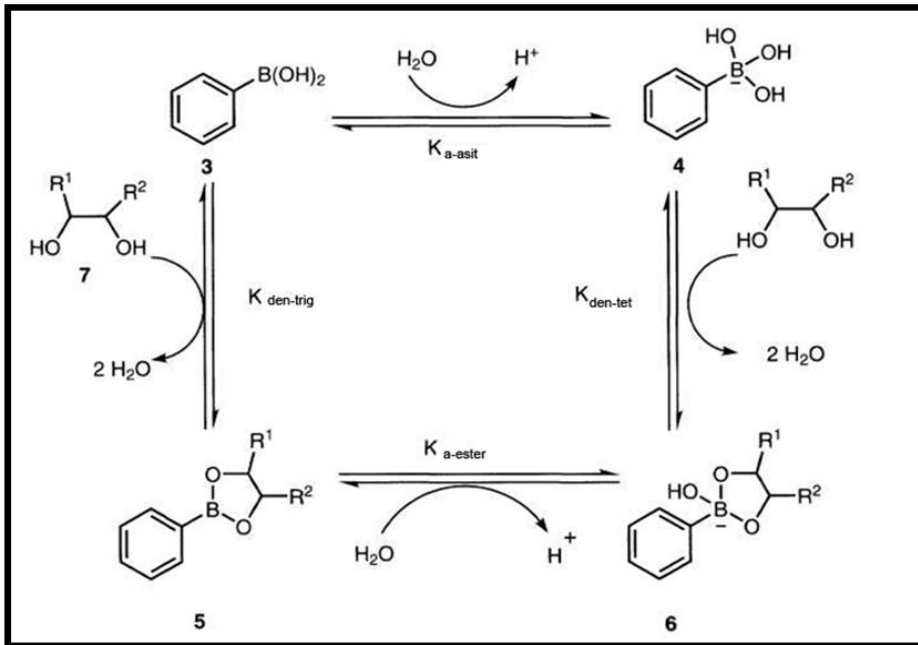
Boronik asitler, 1,2 veya 1,3 diollerle, beş veya altı üyeli siklik ester oluşturarak kovalent olarak tepkimeye girerler( Wang, 2002).

Boronat anyonları ile etkileşen hidroksil gruplarının komşu karbon atomlarında ve aynı düzlemsel konfigürasyonda yer alması gerekir. Açık zincirli poliollerde hidroksil grupları C-C bağı etrafında oldukça serbest dönebildikleri için boronat anyonları ile kompleks oluşumunu sağlayan uygun konfigürasyonlar kolayca sağlanır ve etkileşim kuvveti, karbon zincirinin uzunluğu ile artar. Kapalı halka içeren karbohidratlar için hidroksil gruplarının konformasyonu daha az serbestliğe sahiptir. Normal olarak 1,2 cis-diol grubuna sahip olmayan karbohidratlar ise halka esnemesi ve mutarotasyon yolu ile borat ile tepkimeye girerler. Katekoller ve türevleri hem borat hem de boronat ile kompleks oluşturabilir. Aril diollerle oluşturulan boronat kompleksi, şeker cis-diollerini ile oluşturulardan daha karardır. Etkileşime ait bir mekanizmada, trigonal düzlemsel boronik asidin tetrahedral boronat anyonu oluşturacak şekilde iyonlaştığı ve bu anyonun cis-diolla siklik bir boronat esteri oluşturması önerilir . Diğer bir mekanizma, diol oksijen atomlarının boronik aside nükleofilik saldırısı sonucu birbirleri ile denge de anyonik ve nötral türlerin bir arada oluşması şeklindedir. Ligand kompleksleşmesi ile ilgili B-NMR ve spektroskopik ölçümlere dayalı olarak önerilen mekanizmada ise nötral fenilboronik asidin cis-diol varlığında kompleksleşmiş bir anyon vererek kompleks oluşturduğu ve bu kompleksin bazik koşullarda ayrışmadığı kabul edilir (Chakka, 2006). Nötral boronik asit ise bazik koşullarda iyonlaşır. Cis-diollerle etkileşim için gerekli tetrahedral boronat anyonunun kararlılığı, fenil halkasına elektron çeken grupların (nitro gibi) sokulması ile artırılır. Ayrıca fenil halkasının yol açtığı ikincil hidrofobik bağlanmalar azaltılır. Riboz gibi bazı karbohidratlar için uygun cis-dioller hatta cis-trioller boronatlarla kuvvetle etkileşirler. Literatürde fenilboronik asit diesterleri için rapor edilen ayrışma sabiti değerleri azdır. Boronat-hidroksil etkileşiminde ikincil etkileşimler de söz konusudur (Liu, 2007). Bunlar yüksüz boratın amin ve karboksillerle yük transfer tepkimeleri, fenil bileşeninden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler, aktif tetrahedral formda boronat anyonundan kaynaklanan iyonik etkileşimler ve boronatların hidroksil gruplarından kaynaklanan hidrojen bağı oluşumudur. Boronatların cis-diollerle oluşturdukları kompleksleri incelemek için, elektrokimyasal ve kalorimetrik titrimetri, iletkenlik, spektrofotometre, NMR, kromatografi, elektroforez, X- ışınları kırınımı, absorpsiyon spektroskopisi, floresans işaretleme ve enzim inhibisyonu gibi teknikler kullanılır (Ramamurthy et al, 1999).

### 1.4.1.Fenilboronik asit (PBA)

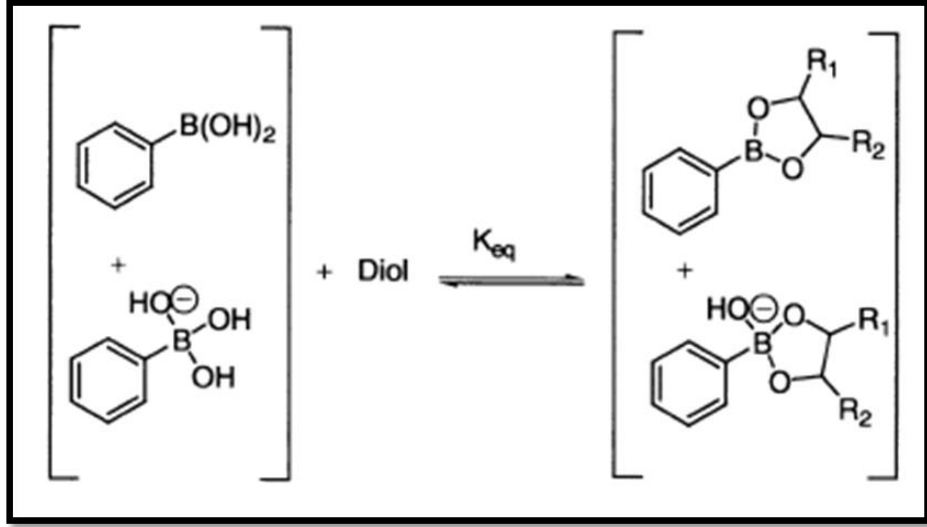
İmmobilize boronatların biyomoleküller ile etkileşimi genellikle fenilboronik asidin (PBA) ligand olarak kullanıldığı sistemlerde incelenmiştir. Çünkü, PBA'nın kararlılığı yüksektir ve fenil halkasının türevleri, boronat ligandlarının kromatografik matrise kazandırılması için uygun alternatifler sağlar.

Biyomolekül ayrılmasında boronat ligandlarının birincil etkileşimi hidroksil grupları ile olur. Hidroksil gruplarının konfigürasyonu ve boronat ligandının koordinasyonu kompleks oluşumunda iki önemli faktördür. Bazı koşullarda, boronat ligandı (PBA) düzlemsel trigonal konfigürasyondan hidroksil grupları içeren bileşiklerle kovalent olarak etkileştiği tetrahedral boronat anyonu formuna iyonlaşır (Liu et al, 1995). Oluşan siklik diesterden kompleks olarak söz edilir. Şekil 1.8'de görülmektedir. Nötral koşullarda, hidroksil grupları ve trigonal olarak koordine edilen boronat ligandını içeren nötral kompleksler de oluşabilir. Ancak sulu çözeltilerde nötral komplekslerin çoğu hidrolize karşı yeterince kararlı değildir.



Şekil 1.8.Fenilboronik asitle diol arasındaki bağlanma (Springsteen, 2004).

Boronik asitler Lewis asitleri olarak davranırlar. Fenilboronik asit suda 8.8'lik pK<sub>a</sub> değeri ile fenolle karşılaştırılabilir asitliğe sahiptir. Elektron çeken gruplar, asitlik kuvvetini artırır. Şekil 1.9'da gösterilmektedir.

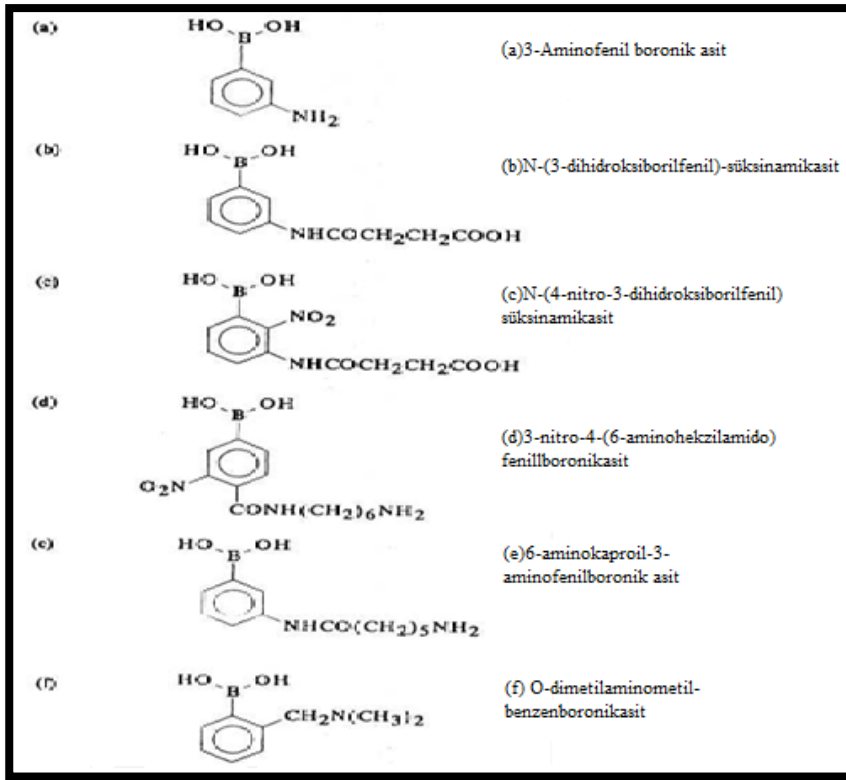


Şekil 1.9. Boronik asitin bağlanması (Springsteen, 2003).

### Fenil Boronik Asit Türevleri

Fenil boronik asit türevleri fenil halkasının hidrofobikliğinin giderilmesi ve farklı uygulama alanlarında kullanılabilmesi amacıyla yapıya farklı modifikasyonlar uygulanarak oluşturulur. Her biri farklı bağlama bölgeleri ile farklı bağ yapıları oluşturarak çeşitli moleküllerin tanı ve ayrılmasında kullanılmaktadır. Şekil 1.10'da verilmiştir.

Özellikle fenil boronatların hidrofobik yapısı nedeniyle protein, glikoprotein ve polinükleotidler gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılması zordur. Hidrofobik etkileşimlerle istenmeyen biyomoleküllerin spesifik olmayan bağlanması da gerçekleşir. Bu nedenle fenil halkasına çeşitli süstituentlerin takılması ile hidrofobik etkileşimler azaltılmaya çalışılır ya da 2-karboksietan boronik asit gibi fenil halkası içermeyen boronat ligandları sentezlenmiştir.



Şekil 1.10.Fenilboronik asit türevleri.

#### 1.4.2.Boronat afinite kromatografisi uygulama alanları

Boronik asit grubu içeren jeller, kromatografik destek malzemesi olarak çeşitli biyomoleküllerin izolasyonu ve immobilizasyonunda önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bu kullanım potansiyeli, boronat grubunun diol yapısı ile spesifik etkileşim özelliğine dayanır. Bu etkileşim temelinde, çeşitli glukoenzimler (glukoz izomeraz, glukoz- 6-fosfat dehidrojenaz) kromatografik yöntemler ile saflaştırılabilmekte, nükleotid bazlı moleküller ( $\beta$ -NAD ve bu molekülün indirgenmiş formları, flavin adenin dinükleotid, FAD, vb.) jel matrisler üzerinde izole veya immobilize edilebilmekte veya glikoz birimleri içeren çeşitli proteinler (glikolize albümin) ve makromoleküllerin (glikolize hemoglobin) kan ortamında derişimi saptanabilmektedir. Bu uygulamalarda kullanılan jeller, genellikle selüloz, agaroz, akrilamid veya 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) bazlıdır. Çoğunlukla partikül formunda hazırlanan bu jellere boronat fonksiyonel grubunun bağlanabilmesi amacı ile farklı ajanlar kullanılmakta bunlar arasında m-aminofenil boronik asit (APBA) en çok kullanılan ligand olarak yer almaktadır.

Bu ligand jel matrise amino grubu üzerinden kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu tür bir bağ oluşumu ise bilinen kimyasal aktivasyon yöntemlerinin uygulanmasını gerektirir. Bu nedenle jel matrisler hidroksil, amin veya karboksil fonksiyonel gruplarından birini içerecek şekilde hazırlanıp, fonksiyonel grubun türüne göre siyanojen bromür, glutaraldehit veya karbodiimidler ile jel matris aktive edilmektedir (Bouriotis et al, 1992). Ancak jele aktive edilebilecek fonksiyonel grup kazandırılması amacı ile kullanılan yöntemler, jel mekanik dayanımında azalmaya neden olmakta; bu matrisin kromatografik kullanımını kısıtlamaktadır. İçerdiği aktive edilebilir grup derişimi ve aktivasyon reaksiyonunun verimine bağlı olarak jel matrisin yapısına boronik asit grubunu içeren ligandın bağlanması mümkün olmaktadır. Boronik asit gruplu jeller ile hedef molekülün izole edilen miktarı, jelin boronik asit içeriği ile orantılıdır. Kimyasal aktivasyon ile jele sınırlı derişimde boronat fonksiyonel grubu yüklenebilir. Ayrıca aktivasyon işlemlerinin çoğunda toksisitesi yüksek ve biyolojik uygulamalar için sorun yaratan kimyasalların kullanımını dezavantaj oluşturur (Şenel, 2004).

Farklı fenilboronat bileşikleri poliakrilamid, sefadeks ve polistirene tutuklanarak fenolatlar, katekolaminler, şeker ve diol yapıları bileşikler ayrıştırılmıştır. Tutuklanan fenilboronatlar, adenilat siklaz, ribonükleotid trifosfat redüktaz ve fosfodiesterazın saflaştırılmasında da kullanılmıştır. Fenil boronat matrisler ayrıca ribonükleozid, nükleotid ve oligonükleotidlerin deoksi türevlerinden ayrılmasında,  $\gamma$ -interferon ve IgG'nin ayrılmasında, nükleozid ve metabolit ölçümü ile kanser tanısında kullanılır. Süstitüe fenil boronatlar, belli patojenlere karşı mikrobiyal aktivite gösterirler. Çoğu afinite sistemlerinin aksine, tutuklanmış boronat uygulamalarında agaroz dışında ligandlar doğrudan desteğe bağlıdır. Ligand ve matris arası potansiyel etkileşimler açısından agaroz, selüloz ve diğer glikoz temelli polisakkaritlere göre daha avantajlıdır. Çünkü yapısında daha az sayıda hidroksil grubu içerir. Fenilboronat tutuklanmış agaroz yapısının özellikleri hidrofobik kol- lar kullanılarak da incelenmiş ve ligandın izole edilecek ajanlarla kimyasal etkileşiminin arttığı gösterilmiştir (Şenel, 2003).

m-Aminofenil boronik asidin, aminoetil poliakrilamid desteğe bağlanması ile elde edilen jellere polihidroksi, aromatik o-hidroksi bileşikler ile amidler,  $\alpha$ -hidroksi asitler, diketo ve triketo ve 1,3-dihidroksi bileşikler bağlanmıştır.

Klinikte diabet teşhisi için tiyobarbitürik asitle kolorimetrik analiz, immünotürbidimetre, radyoimmünokit ve florometre gibi yöntemler kullanılır. Klinik kromatografik ayırma yönteminde “yumuşak jel” olarak adlandırılan agaroz veya sefaroze bazlı malzemeler, HPLC’de kolon dolgu malzemesi olarak kullanılmaz. Tıbbi literatürde enzimatik olmayan yolla üretilen glikolize albüminin glikolize hemoglobine oranla diabet teşhisi yönünden daha faydalı bir indeks olduğu belirtilmektedir. APBA tutuklanmış 2,3–dihidroksi propil metakrilat ile glikolize albümin bazık ortamda adsorplanmış, asidik ortamda desorpsiyon gerçekleştirilerek serum örneklerinden glikolize proteinler ayrıştırılmıştır.

Aminofenil boronik asit bağlı agaroz matrisler, sulu ortamda NaCl ya da MgCl<sub>2</sub> varlığında β-NAD ve FAD gibi nükleotidlerin izolasyonu amacı ile de kullanılmıştır.

İlk boronik asit bazlı, proteazom inhibitörü olarak etkiyen Velcade, antikanser ilacı olarak FDA onayı almıştır (Goy et al, 2006) . Hedef tümör hücrelere çok yüksek derişimde 10B sağlayan nükleozid bazlı, aminoasit bazlı ve siklik tiyoüre bazlı boronik asitler geliştirilerek bor nötron yakalama tedavi (BNCT) ajanları geliştirilmiştir (Yang et al, 2004). AIDS tedavisinde HIV-I proteazın inhibisyonu amacı ile boronik asit grubu içeren bir seri nükleozid, antiviral ajan olarak tasarlanmıştır. Boronik asitlerin enzim inhibitörü, katalizör ve sensör tasarımında kullanımlarının yanı sıra endüstride fermantasyon prosesinin izlenmesinden, ilaçların enantiyometrik saflığının saptanmasına kadar değişen uygulama alanları vardır (Hall et al, 2005).

#### Genel Kullanım Alanları:

- Klinik analizlerde (glikozillenmiş hemoglobin artışı ile oluşan glycemias tanısı)
- Karbohidrat tanınması,
- Nükleozid, modifiye nükleozid, nükleotid, ribonükleotid, oligonükleotid, nükleik asitler tanınması, deoksi türevleri seçimi,
- cAMP’den nükleotid ayırımı,

- nükleotidil peptid izolasyonu
- Katekol aminler tanınması,
- Glikoproteinler ve enzimlerin ayrılmasında,
- Biyomolekül izolasyonu,
- Dopamin, Laktik Asit gibi küçük moleküllerin ayrılmasında,
- Katekol estrogen ve hormon seçimi,
- Proteazlar için inhibitör olarak,
- Diyabetlerde glisemik kontrolde HbA1C saptanmasında,
- Hipoksantin, İnosin belirlenerek patolojik bozuklukların saptanmasında,
- Bazı patojenlere karşı antimikrobiyel aktivite gösterimi,
- Sensör yapımı ve kontrollü ilaç salım sistemleri

gibi çok çeşitli kullanım alanı olmakla birlikte bu çalışmada uygulamada şeker tanınmasına alternatif bir yol amacıyla izlenen fenil boronik asit ile modifiye edilmiş nanopartikül oluşturulmasıyla farklı şekerlerin bağlanma kinetikleri incelenmiştir(Şenel, 2007)

### **1.4.3.Boronik asitlerin oluşturdukları komplekslerin incelenmesi**

Boronatların oluşturdukları kompleksleri incelemek için, elektrokimyasal ( Arimori et al, 2002) ve kalorimetrik titrimetri, iletkenlik, spektrofotometri, NMR , kromatografi, elektroforez, X- ışınları kırınım , absorpsiyon spektroskopisi, FTIR spektroskopisi, floresan işaretleme (James et al, 1996), CP/MAS NMR spektroskopisi, elemental ve termogravimetrik analizler ve enzim inhibisyonu gibi teknikler kullanılır. Diol boronik asit kompleksinin denge sabitlerinin ölçülmesi çalışmalarında birçok faktör göz önüne alınmak durumundadır. Yaygın olarak kullanılan ölçüm yöntemleri floresans ve UV spektrofotometresi temellidir. Ancak floresan ölçüm tekniklerinde ölçüm ortamı floresan bileşik oluşumu üzerinde etkili olduğu için her zaman istenilen doğrulukta sonuçlar alınamamaktadır. Bir diğer denge sabiti ölçüm tekniği ise pH depresyon metodudur.

#### 1.4.4.Çalışma koşulları

Özel olarak modifiye edilmiş boronat matrisleri hariç, ticari boronat destekleri için standard bağlanma pH değeri, kompleks oluşumunda yeterli miktarda boronat anyonu sağlamak üzere 8.0'in üzerinde seçilir. İyonik etkileri ve hidrofobik etkileşimleri önlemek için iyonik şiddet dikkatle seçilmelidir. Önerilen aralık, 10-500 mM'dır (Şenel, 2002). İki değerlikli katyonların, nükleotid bağlanmasında destekleyici rol oynadıkları bilinmektedir (Wilson, 1999). Ayrıca F<sup>-</sup> ve Cl<sup>-</sup> anyonlarının kompleks oluşumunda kararlılığı artırdığı rapor edilmiştir (Westmark et al, 2005). Glisin, morfolin ve HEPES gibi amin içeren tamponların da kompleks oluşumunu desteklediği bilinmektedir. İyi elektron verici olan protonlanmamış aminler, yüksüz borata elektron sağlayarak, yüksüz trigonal formdan aktif tetrahedral forma geçiş şeklinde borat konfigürasyonunda değişime yol açarlar. Ancak komşu hidroksil gruplarına sahip Tris gibi aminler boronatin biyomolekül ile bağlanmasını bloke edebilirler. Tris ve polihidroksil içeren bileşiklerden bağlanma işleminde kaçınılmalıdır. Ancak literatürde Tris ve Tris benzeri bileşiklerin spesifik olmayan etkileşimleri baskılayarak ayırma çözünürlüğünü artırdığını belirten raporlar da mevcuttur (Şenel, 2004).

Bağlanan biyomoleküllerin elüsyonu, genellikle eluentin pH değeri düşürülerek (pH 4.0-6.0) veya riboz gibi diollerin katılması ile sağlanır. Diol eklenmesi özellikle asidik ortamda kararsız olan biyomoleküller söz konusu olduğunda yararlıdır. Tris gibi bazı polihidroksil bileşiklerinin yüksek elüsyon kapasiteleri, boronat ligandı ile üçünlü kompleks oluşturma yeteneklerine dayanır. Elüsyon, izokratik, basamaklı ya da gradient modunda yürütülebilir. Gradient elüsyonu, heterojen örneklerin ayrılmasında iyi sonuçlar verir (Şenel, 2007).

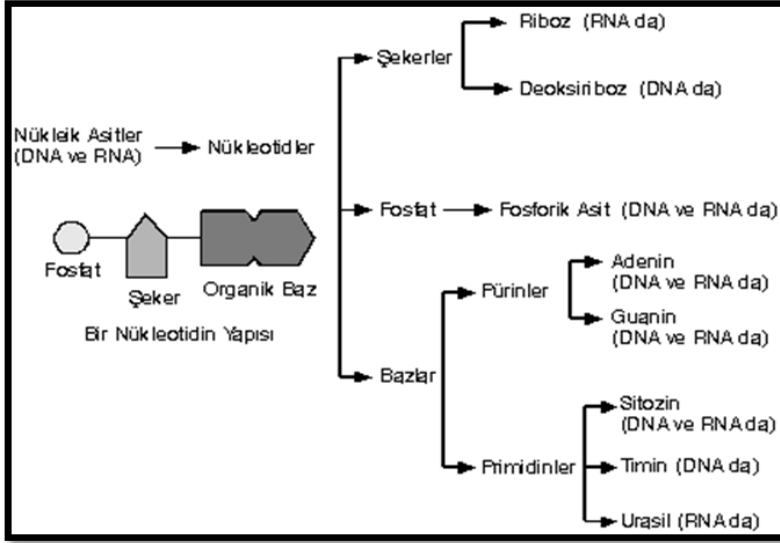
Kromatografik verimin artırılmasında diğer bir seçenek "Zırhlıyıcı Boronat Afinite Kromatografisi" tekniğini kullanmaktır (Larsson et al, 2001). Zırhlıyıcı olarak adlandırılan polimerik bir madde, afinite matrisindeki immobilize liganda bağlanır. Bağlanma kuvveti, ligand ve hedef biyomolekül arasındaki spesifik etkileşimden daha zayıf ancak spesifik olmayan etkileşimlerden daha kuvvetlidir. Kuvvetli spesifik etkileşimler, zırhlıyıcı reaktif varlığından etkilenmezler. Dolayısıyla bu reaktif, ligandı zayıf, spesifik olmayan etkileşimlerden korur. Örneğin düşük molekül ağırlıklı polihidroksil bileşikleri bu amaç için uygun reaktiflerdir. RNA, nükleotidler, glikoenzimler gibi biyomoleküllerin seçimli izolasyonunu içe-

ren geleneksel boronat afinite kromatografisi uygulamalarında, boronik asit içeren partiküllü tek bir kolon kullanılır. Bu amaçla boronik asit grubu içeren poliakrilamid, agaroz ve poliakrilat bazlı jeller genellikle destek malzemesi olarak kullanılmaktadır. Hedef biyomolekülü içeren örnek kolondan geçirilip diol grubu içeren biyomoleküller seçimli olarak kolon destek malzemesinde adsorbe olmaktadır. Uygun desorpsiyon ajanını içeren hareketli fazın uygulanması ile adsorbe olan moleküller elüe edilirler. Glikoproteinlerin ayrılması için boronat fonksiyonel grubu taşıyan çeşitli afinite HPLC uygulamaları geliştirilmiştir. Örneğin bir yüksek performans afinite kromatografi sistemi, seri olarak bağlı kolonlarla oluşturulmuştur. Bu sistem, toplam albümini ayırmak için anyon değiştirici bir kolon ve gliko olmayan albüminin ayrıldığı boronat grubu ile fonksiyonlaştırılmış ikinci bir kolon içerir. Bu ikinci kolon için geleneksel yüksek performans anyon değiştirici kolona, m-amino fenil boronik asit kovalent olarak bağlanmıştır. Bu uygulamaya benzer kromatografik çalışmalarda, boronat afinite kolonu önce serumda glikoproteinlerin zenginleştirilmesi amacı ile kullanılmıştır. Sonra zenginleştirilmiş karışım HPLC sisteminde yüksek performans anyon değiştirici kolona uygulanmıştır. Koyama ve Terauchi tarafından geliştirilen tipik bir “afinite-HPLC” uygulamasında gliko-serum proteinlerini saptamak için boronik asit grubu içeren gözenekli, 14 µm çapında partiküller içeren kolon kullanılmıştır. Hjerten ve Li tarafından geliştirilen bir diğer sistemde ise m-aminofenil boronik asit bağlı, 12-15 µm çapında gözenekli olmayan agaroz partikülleri sabit faz olarak seçilmiş ve glikolize olmayan hemoglobinin ayrılması için HPLC sisteminde kullanılmıştır (Şenel, 2002).

### **1.5.Nükleik Asitler**

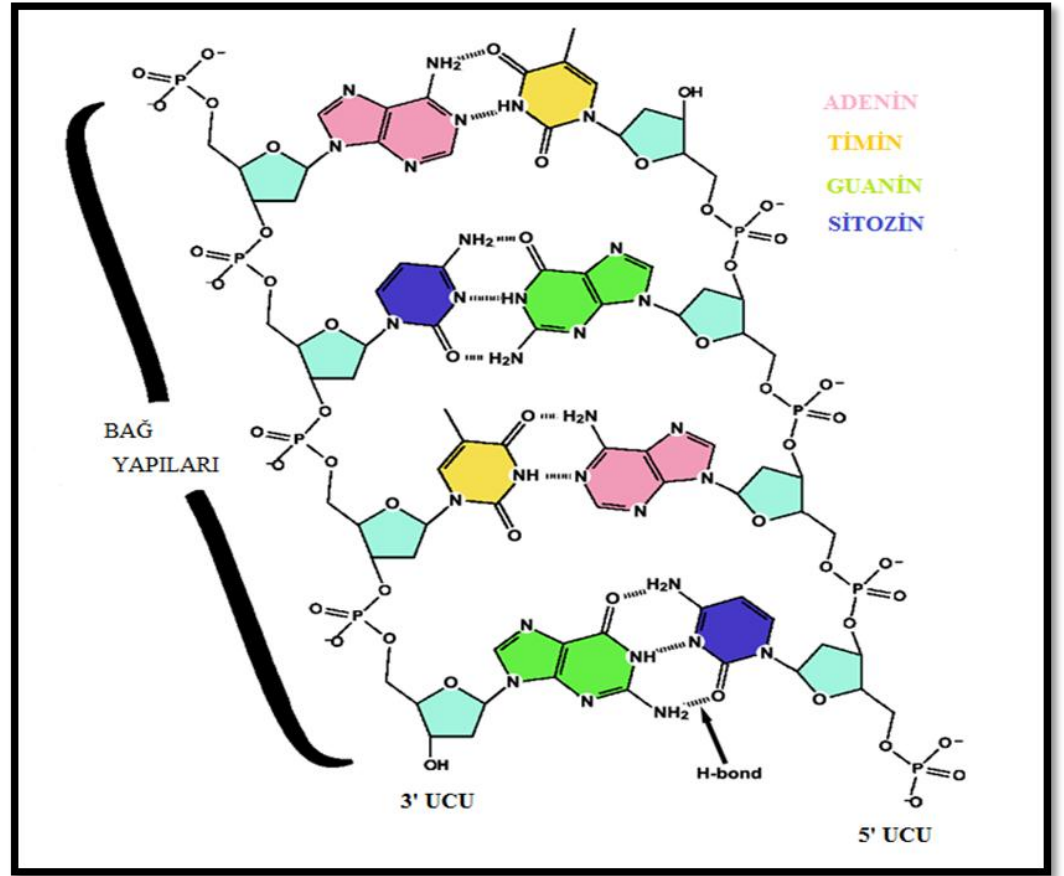
Nükleik asitler, genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesinden sorumlu moleküllerdir. Kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit vardır. Deoksiribonükleik asit (DNA) ve Ribonükleikasit (RNA) ve içerikleri Şekil 1.11’de gösterilmektedir. DNA hücrenin kromozomlarında, mitokondrilerde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Hücrelerde ayrıca, plazmit adı verilen kromozom yapısında olmayan sitoplazmik DNA’lara rastlanır.

Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmektedir. Makromoleküller yapıda şeker ve fosfat birimleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün temelini oluşturur. Azotlu bazlar bu iki yapı bir arada tutmaktadır. Yani nükleik asitler birçok kimyasal ünitenin bir düzen dahilinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmaktadır(Champe and Adams, 2000). Bunlar;



Şekil 1.11.DNA ve RNA'nın içeriği(Murray et al, 2000).

Nükleik asitler, bir nükleotidin 3' C atomu ile diğerinin 5' C atomu arasında fosfodiester köprüleri aracılığıyla birleşmesi ile oluşurlar bu oluşum Şekil 1.12'de verilmiştir.



Şekil 1.12. 5' ve 3' düzeni ve bağ yapıları (Wikipedia., 2011, DNA, <http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA>.)

Nükleotidlerin doğrusal dizisi genellikle, 5' nden 3' yönüne doğru ve sıradaki nükleotid bazının simgesi ile verilir. Örneğin, ATCG, 5'den 3' yönüne, adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) dizisi anlamına gelir. Deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu sonucu da DNA oluşur (Ravanat et al., 2003).

### 1.5.1.DNA ( Deoksiribonükleik Asit)

1869'da Friedrich Miescher DNA'yı saflaştırmıştır. 1919'da Phoebus Levene, nükleotit birimlerini oluşturan baz, şeker ve fosfatı tanımlamıştır. 1937'de William Astbury DNA'nın ilk X ışını difraksiyon görüntülerini elde etmiştir. 1953'te X-ışını kırınım görüntülerini ve bazların eşlendiği bilgisini kullanarak, James D. Watson ve Francis Crick tarafından DNA'nın bugün kabul görmüş yapısı ilk defa öne sürülmüştür. 1962 yılında Watson ve Crick DNA'nın 3 boyutlu yapısını keşifleriyle Nobel ödülünü almışlardır.

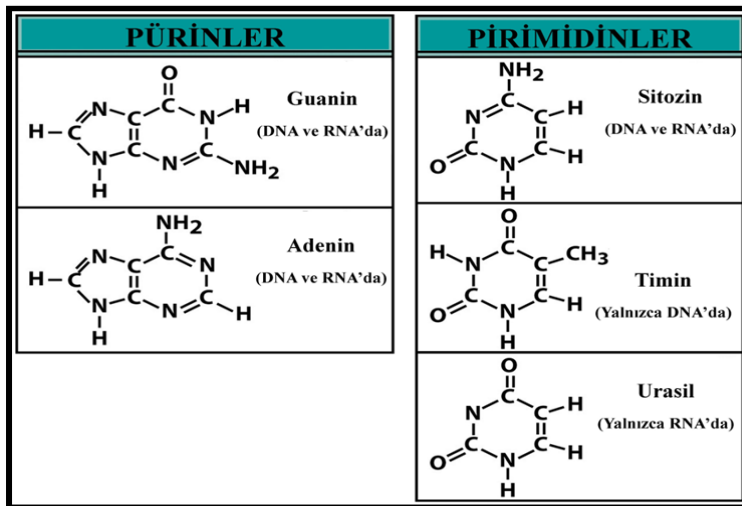
### Watson Crick Modeli (1953):

Sağ el ikili sarmal yapısındadır, iki zincir birbirine antiparaleldir, bazlar arasında 3.4°A mesafe vardır, hidrofobik azotlu bazlar zincirin iç kısmında; hidrofilik şeker, fosfat iskeleti ise zincirin dışında yer alır. Bu moleküler düzenlemeler sarmala önemli bir kimyasal dayanıklılık sağlar. Karşı zincirlerdeki azotlu bazlar, hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleri ile eşleşirler. Sarmalın her bir tam dönüşü 34°A'dur, böylece her dönüşte 10 baz yer alır. Molekülün herhangi bir bölümünde, eksen üzerinde daha geniş olan büyük oluklar ve daha dar olan küçük oluklar yer alır. Sarmalın çapı 20°A'dur. Yapıdaki adenin ve guanine pürindir, sitozin ve timin ise pirimidindir. Pürinlerin sayısı pirimidinlerin sayısına eşittir. Adenin-Timin baz çifti 2 H-bağına sahipken, Sitozin-Guanin baz çifti 3 H-bağına sahiptir ve baz okunuşu 5'-3' yönündedir (Hantz et al., 2000).

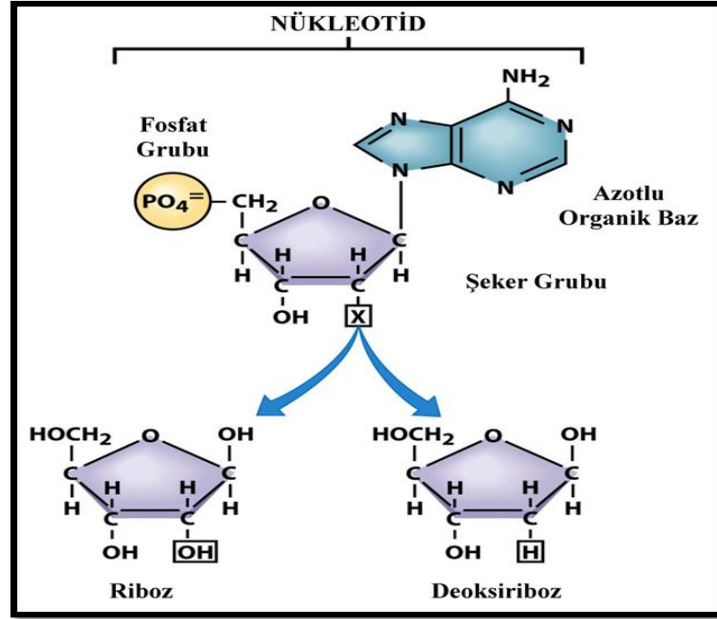
### DNA'nın Genel Yapısı

Nükleotitler, bütün nükleik asit moleküllerinin yapıtaşlarıdır. Yapısal birimler gerekli üç bileşeni içerir;

- Azotlu baz (Şekil 1.13'te verilmiştir.)
- Pentoz şekeri
- Fosfat grubu



Şekil 1.13. Pürin ve pirimidinlerin kimyasal yapısı.

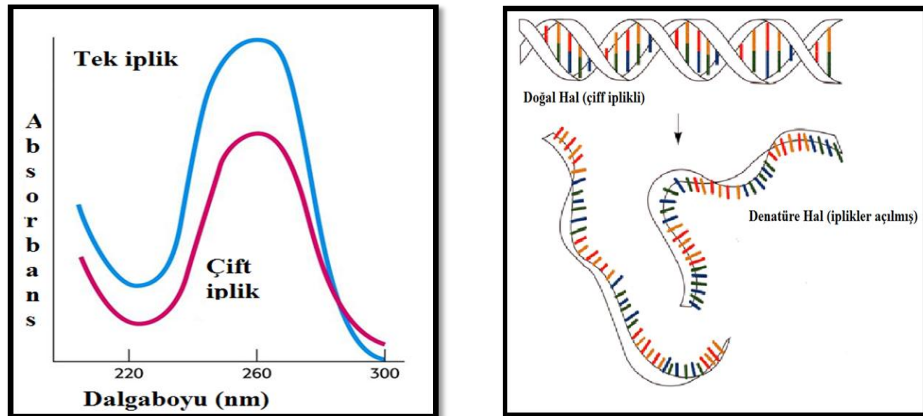


Şekil 1.14. Şeker yapılarının ve moleküler yapının gösterimi.

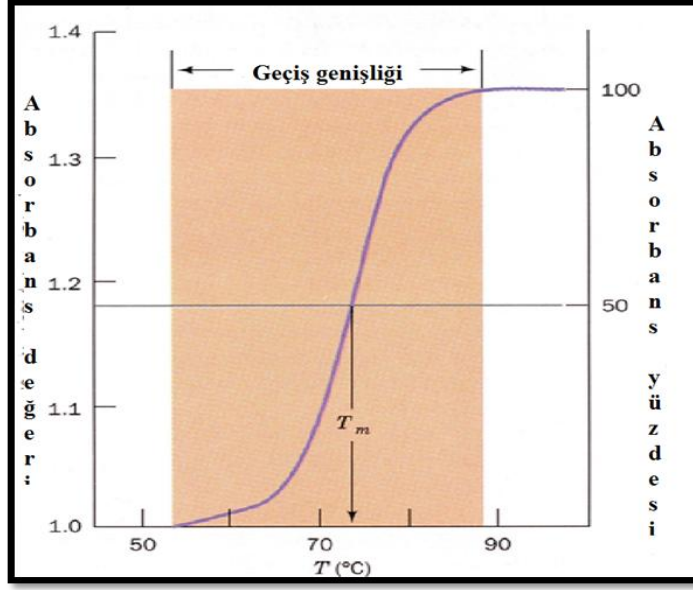
Deoksiriboz bir şekerdir ve glukoza benzeyen bir şekerdir, tek farkı 5 karbonlu olmasıdır. Riboz da aynıdır fakat tek oksijeni fazladır. Şekil 1.14'te gösterilmektedir.

### DNA'nın Fiziksel Özellikleri

Nükleik asitler, ultraviyole ışığı (UV) en kuvvetli olarak 254-260 nm arasındaki dalga boylarında soğurur. DNA karakteristik bir erime ve birleşme sıcaklığına sahiptir (Liu, 2002). Şekil 1.15'te UV bölgedeki absorbanı ve erime durumu gösterilmiştir.



Şekil 1.15. DNA'nın erimesinin ve 260nm dalga boyunda verdiği absorbanların gösterimi



Şekil 1.16. DNA'nın  $T_m$  değerinin gösterilmesi

### 1.5.2. Nükleik asitlerin saflaştırılması

Nükleik asitlerin saflaştırılması veya izolasyonu, moleküler biyoloji çalışmalarının ve bütün rekombinant DNA tekniklerinin ilk basamağıdır.

DNA hücrede serbest bir molekül halinde değildir. Bazı proteinler (histonlar, histon olmayan proteinler vb.) ve RNA ile bir kompleks halinde bulunur. Virüsler gibi canlılarda da protein kılıfı içinde yer alır. DNA'nın izolasyonu, değişik organizma gruplarından hatta aynı organizma grubu içerisinde farklılıklar gösterse de temelde üç aşamadan meydana gelir:

- Hücre duvarının parçalanması (Alkali lisiz)
- Nükleik asit / protein komplekslerinin çözülmesi ve çöktürülmesi
- Nükleik asitlerin ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması

Değişik organizmalardaki (örneğin, prokaryot ve ökaryotlardaki) yapısal farklılıklar çeşitli izolasyon yöntemlerinin kullanılmasını gerektirmektedir. İzolasyonun başarısı, çoğu kez üzerinde çalışılan organizmanın üretilmesi aşamasıyla da ilişkilidir. Örneğin, bakterilerdeki DNA izolasyonunda önemli sorunlardan biri yeterli miktarda DNA'nın elde edilememesidir. Bu sorun özellikle plazmid DNA

izolasyonunda ortaya çıkmaktadır. Gen klonlamasında vektör olarak kullanılan plazmidler genelde yüksek kopya sayısına ulaşabildiklerinden, bunların kopya sayılarını arttırıcı ek uygulamalara gerek yoktur. Buna karşılık bazı plazmid DNA ların replikasyonu büyük ölçüde genomik DNA'nın kontrolü altında olduğundan yeterli plazmid DNA'sı elde etmek zorlaşır. Bu durumda bakteri kültürleri kloramfenikol uygulamasında bırakılarak plazmid sayısı arttırılabilir. Kloramfenikol (genelde 170 µg/mL derişimde) konak hücrenin protein sentezini durdurur ve sonuç olarak bakteri kromozomunun replikasyonunu engeller. Buna karşılık plazmidler replikasyona devam eder ve hücrede kopya sayılarını arttırırlar.

Hücre duvarının parçalanması; sonikasyon, öğütme, homojenizasyon, vb. gibi fiziksel işlemlerle (Carlson and Signs, 2004) yapılabildiği gibi genel olarak kimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Birnboim and Doly, 1979). Hücre duvarının parçalanmasında ilk aşama duvarın zayıflatılmasıdır. Bu işlem ya fiziksel olarak (dondurup-çözme) ya da kimyasal maddeler (lizozim, NaOH, EDTA vb.) uygulanarak yapılır. Tam parçalama işleminde ise iyonik (SDS-Sodyum dodesil sülfat) veya iyonik olmayan deterjanlar kullanılır. Bu işlemler sırasında kimyasalların uygulama süreleri her organizmaya göre değişkenlik gösterebilir. Genellikle bakterilerde lizozim uygulaması gerekli değilse de bazı ırklarda kullanımı uygun olmaktadır.

Parçalama işleminde izlenecek yöntem temelde iki faktöre bağlıdır: (1) DNA'nın boyu; (2) Kullanılan organizma. 15 kb'den daha büyük DNA'lar fiziksel etkenlere karşı çok duyarlı olduklarından uygulama süresi en aza indirgenmeli ve dikkatli çalışılmalıdır. Örneğin, bakterilerde kullanılan bir yol, hücrelerin önce izozmatik sukroz solüsyonuna alınmaları, sonra sırasıyla EDTA, lizozim ve SDS kullanımlarıyla hücre duvarının ve zarının parçalanmasıdır.

Organizmanın hücre duvarı içeriği de parçalamada farklı kimyasalların kullanılmasını gerektirmektedir. Örneğin, bakterilerde lizozim veya proteinaz K ve bir maya olan *Shizosaccharomyces pombe*'de ise novazim gibi farklı bir enzim kullanılabilir. Ayrıca *Escherichia coli*'nin bazı ırklarında parçalama deterjan ve yüksek sıcaklık uygulaması ile yapıldığında büyük miktarda karbonhidrat serbest kalmaktadır. Bu durumda plazmid DNA'sına karbonhidrat bulaşmasını engellemek oldukça zordur. Ayrıca karbonhidratlar birçok enzimin inhibisyonuna

neden olmaktadır. Bu yüzden büyük miktarlarda çalışırken kaynatma yoluyla parçalama yapmaktan sakınılmalıdır.

İkinci aşama olan DNA-protein komplekslerinde kullanılan yöntem genelde denatürasyona dayanır. Bu amaçla çoğunlukla fenol ekstraksiyonu işlemi kullanılır. Fenolle proteinler ve DNA fragmentleri denatüre edilir ve çöktürülerek ortamdan uzaklaşmaları sağlanır. Amonyum asetat (Duarte and Chisona, 1999) ve amonyum sülfat çöktürmesi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında polietilen glikol (PEG) ve PEG-8000-NaCl komplekslerinin kullanımlarına da rastlanmaktadır (Neoh, 1986).

DNA'nın hücrenin diğer molekülerinden ayrılması aynı zamanda genom DNA'sı ile plazmid DNA'sının ayrılmasında önemli bir rol oynar. Bu durum her iki DNA'nın yapısal farklılığından ileri gelmektedir. Genom DNA'sının açık halkasal bir yapı göstermesine karşılık plazmid DNA'sı süper sarmal yapıdadır ("covalently closed circular" [ccc] DNA). Bu iki farklı yapı yüksek bazik ortamda pH 12-12.5) farklı reaksiyon verir. Bu koşullarda genom DNA'sı denatüre olurken plazmid DNA'sı olmaz. Böylece plazmid DNA'sı genom DNA'sından kolaylıkla ayrılır.

Kromatografi nükleik asitlerin saflaştırılması için geniş çapta kullanımı olan bir yöntemdir (Jungbauer et al, 2001). Kromatografik yöntemlerin en önemli avantajları kolaylıkla ölçek büyütülebilmesi ve işletimlerinin kolay olmasıdır. Afinite kromatografisi tek basamakta saflaştırma olanağı sağlayan çok etkili bir yöntemdir (Odde, 1997) fakat yalnızca laboratuvar ölçeğinde çalışmaya olanak sağlar. Kromatografik ayırimda nükleik asitlerin yapısal özellikleri önemli rol oynar. Örneğin yapısındaki fosfat grupları nedeni ile negatif yüklü nükleik asitler iyon – değişim kromatografisi (Prazeres, 2000) ile ayrılabilceği gibi, uzun lineer yapısından ötürü jel filtrasyon kromatografisi (Ferreira, 2004) ile de ayrılabilir.

Büyük ölçekte işlenmesi gereken hacmin büyüklüğü nedeni ile hızlı bir kromatografik süreç gereklidir. Önemli bir geri basınca neden olmaksızın yüksek akış hızlarında çalışabilmeye olanak sağlamak üzere zirkonyum oksit (Edwards, 1996) ve Poros<sup>TM</sup> (McCarthy et al, 1997) gibi kromatografik destek malzemeleri geliştirilmiştir. Herhangi bir kromatografik sistemde en yüksek akış hızında çalışmak için göz önünde bulundurulması gereken faktörler, jel gözeneklerine di-

füzyon hızı (genellikle hızı belirleyicidir) ve herhangi bir tutuklama işlemi için bağlanma reaksiyonunun hızıdır. Bu faktörler göz önünde bulundurularak katı destek yüzey kimyası üzerinde çalışılmaktadır (Jungbauer et al, 1992).

Saflaştırma basamaklarının sayısı ve daha sonrasında uygulanacak yöntemler nükleik asitlerin kullanım amacına bağlıdır. Saflaştırma basamakları kompleksleştikçe beraberinde birçok sorunu da getirmektedir. Karşılaşılan sorunlar genelde nükleik asitlerin yapıları ile ilgilidir (yüksek molekül ağırlıkları ve bundan dolayı yüksek çözelti viskozitesi, esnek moleküler oluşları, yüklü yapıya sahip olmaları vb.)(Duarte, 1999).



## **2. MATERYAL VE METOT**

Yapılan tez çalışması kapsamında deneysel aşamalar;

1. Nanopolimer sentezi
2. Nanopolimerin karakterizasyonu
3. Nanopolimer yüzeyine PBA bağlanmasının optimizasyonu
4. Pseudospesifik nanopolimere DNA adsorplanmasının optimizasyonu
5. Pseudospesifik nanopolimere adsorplanan DNA'nın desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları
6. Pseudospesifik nanopolimerden desorpsiyonu gerçekleştirilen DNA molekülünün elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kimyasal maddeler**

Nanopolimer sentezi için; HEMA (Hidroksietilmetakrilat), EGDMA (Etilen glikol dimetakrilat), KPS(Potasyum per sülfat), PVA (Poli vinil alkol) Aldrich'ten temin edilmiştir. PBA (Fenil boronik asit), DNA (Kurbağa Sperminden) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Elektroforez için; 50bp DNA Ladder Biolabs'dan, Agaroz Jel ve EtBr (etidyum bromür) Sigma Chem.'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Chem.'den temin edilmiştir.

### 2.1.2. Cihaz ve sistemler

Quartz küvet (Hellma), Açılı karıştırıcı (Multistirrer 15), Etüv Hereaus (Function Line), Çalkalamalı su banyosu(Memmert,Wise Bath), Vorteks(Dragon Lab MX-F), Manyetik karıştırıcı (Wisd Laboratory Instrument), pH metre Neomet İSTEK (pH 240-L), Elektroferez tankı ve 3 çıkışlı güç kaynağı (Thermo), Sonik banyo(BANDELIN SONOREX RK255H), Mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin Plus), 0.1mg duyarlı terazi(Kern ABS), UV spektrofotometre Thermo Scientific 60 (UV-vis).

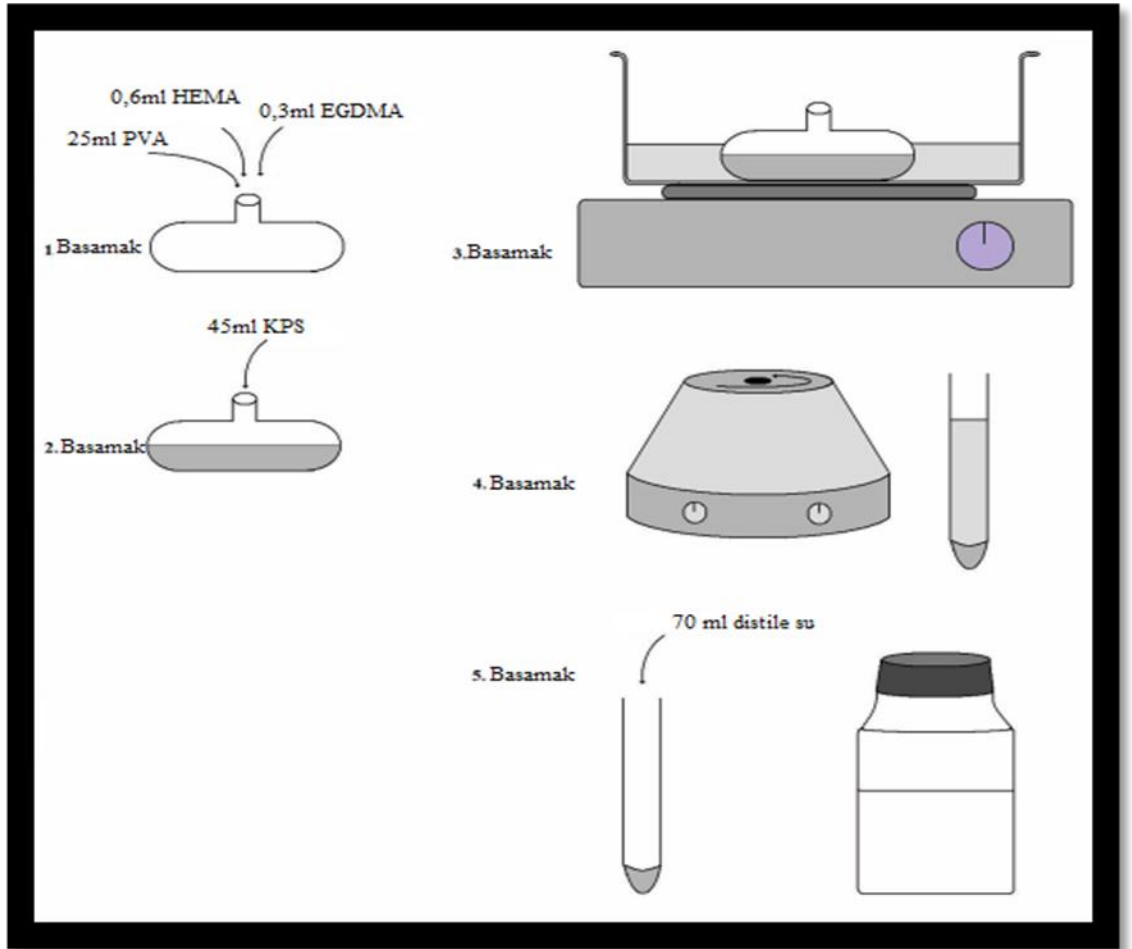
Sentezlenen nanopolimerin karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskopu SEM Philips XL-30S FEG FEI Quanta250 FEG (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi), Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer 100 FTIR, E. Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü) ve Zeta boyut ölçüm cihazı (Malvern Instruments Nanoseries Zeta Sizer, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü) kullanıldı.

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Nanopolimerin sentezi

Çalışmada kullanılan nanopolimerin hazırlanmasında; 0,275 g PVA 25 mL distile su ile ısıtılarak çözüldü. Isıtma sonrası kabarcıklar giderilene kadar ultrasonifikasyon uygulandı. 0,6 mL HEMA ve 0,3 mL EGDMA PVA çözeltisi üzerine eklendi. Ortama son olarak 45mL su içerisinde çözülen 0,0198g KPS çözeltisi çalkalanarak eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan bu partikül ortamı su banyosunda çalkalanarak ve sıcaklık yavaş yavaş 70 C'ye kadar artırılarak yaklaşık 5 saat bekletildi. Süt beyaz bir renk oluştuğunda p(HEMA) nanopolimeri elde edilmiş oldu.

Nanopolimer hazırlama aşamasından sonra çöktürme ve yıkama işlemleri yapıldı. Yıkama işleminde, nanopolimer propilen tüplere alındı. 45 dk 14.100 g'de 25°C'de santrifüjlendi ve 70 mL saf su ile yıkandı. Ardından 45 dk 14.100 g'de santrifüjlendi ve 70 mL etanolle yıkandı. Yıkama sonrası 45 dk 14.100 g'de santrifüjlendi. Yıkama ve santrifüj işlemleri sonunda nanopolimer 70 mL su ile 45dk ultrasonik banyoda bekletildi. Hazırlanan p(HEMA) nanopolimeri kullanılmaya kadar +4°C de saklandı. Polimerizasyon işleminin şematik gösterimi Şekil 2.1'de verilmektedir.



Şekil 2. 1. Nanopolimer sentez basamakları.

### 2.2.2. Nanopolimerin karakterizasyonu

p(HEMA) nanopolimerinin yüzey alanı hesaplandı, bağ yapıları incelendi, boyut analizi gerçekleştirildi, polimerin yapısı görüntüledi ve kuru polimer ağırlığı (hacim başına düşen mg cinsinden polimer miktarı) belirlendi.

#### Nanopolimerin Yüzey Alanının Hesaplanması

p(HEMA) nanopolimerinin yüzey alanını hesaplamak için literatür verilerine dayanan teorik hesaplama formülü kullanılmıştır.

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_p \times d^3$$

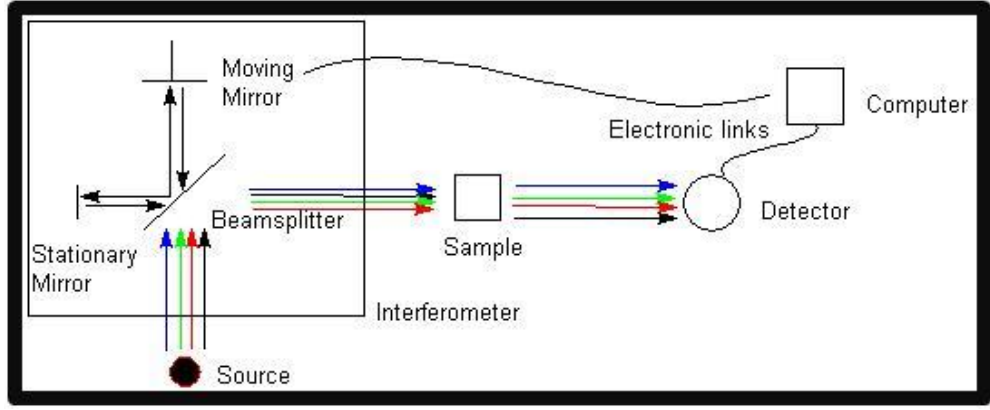
$$\text{Yüzey alanı (m}^2\text{/g)} = N \cdot \text{YA} / \text{gram polimer}$$

N: 1mL süspansiyondaki nanopartikül sayısı

YA: Kürenin yüzey alanı ( $4 \cdot \pi \cdot r^2$ )

#### Nanopolimerinin Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FTIR) İle Yapı Analizi

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Çalışma prensibi: Işık kaynağından çıkan ışınlar bir ışın ayırıcıya gelir. Burada ışın hem sabit aynaya hem de hareketli ayna gönderilir. Daha sonra ışınlar aynadan yansyarak ışın ayırıcıya geri gelir. Buradan da örneğin bulunduğu yere gider. Örnek ile etkileşen ışın heterokromatik yapıdadır. IR spektroskopisinde monokromatörden geçirilen bu ışın tek dalga boyuna indirilir, yani ışın monokromatik yapıdadır. Işın örnek ile etkileştikten sonra algılayıcılar tarafından algılanır ve bilgisayar ile ölçülebilecek anlamlı sinyallere dönüştürülür (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. FTIR çalışma prensibi şematik gösterimi (<http://biyokure.org/fourier-transform-infrared-kizilotesi-spektroskopisi-ftir/5696>, 2011).

Kurutulmuş nanopartiküller KBr ile karıştırılıp kuru yüzeye basılarak FTIR cihazında analizlendi ve bağ yapıları belirlendi. Analizler Perkin Elmer 100 FTIR cihazında gerçekleştirildi.

### Nanopolimerinin Partikül Boyutunun Belirlenmesi

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımı Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Malvern Instruments Zeta Sizer ile yapıldı. Sonuçlar *in vivo* kullanılabilirlik açısından değerlendirildi. Zeta Sizer cihazının çalışma prensibi partiküllerin sıvı içerisinde yaptığı Brownian hareketine dayanmaktadır. Partikül boyutunu belirleyebilmek için partiküllerin sıvıyı hareket ettirme özelliğinden faydalanarak boyut ölçümü yapılmaktadır. Küçük partiküller her zaman daha hızlı hareket edebilmektedir ve büyük partiküller de daha yavaş hareket edebilmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak örnek ortamına dinamik ışık gönderilmektedir ve partiküllerin yaptığı hareketin büyüklüğüne bakılarak boyutu hakkında bilgi elde edilmektedir (Malvern, 2004).

### Nanopolimerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Görüntülenmesi

Liyofilize HEMA nanopolimeri, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezine ait Philips XL-30S FEG cihazında, iletkenliği arttırmak

amacıyla yüzeye altın kaplama yapılarak görüntülendi. Morfolojik özellikleri ve partikül boyutu belirlenerek *in vivo* kullanılabilirlik açısından değerlendirildi. Cihazın çalışma prensibi ise altınla kaplanan yüzeye gönderilen elektron demetinin yüzeyden saçılmasıyla x ışını floresansı ile ve fotonlarla görüntü oluşur. Cihazın özelliklerine göre 10000 kez büyütme yapılabilir ve 3 nm'ye kadar görüntü elde edilebilir.

### **Kuru Nanopolimerin Ağırlığının Belirlenmesi**

Sentezlenen nanopolimerin kurutma işleminin gerçekleştirileceği ependorfların daraları alındı ve içerisine farklı miktarlarda nanopolimerden eklendi. 14.100g'de 20 dk santrifüj edildi ve üst sıvı fazları ortamdan uzaklaştırıldı. Alt fazlar ise ependorf yüzeyine yayılarak etüvde 1 saate yakın kontrol edilerek kurutuldu. Kurutma işleminden sonra daha önce darası alınan ependorflar tartılarak daraları çıkarıldı ve kalan kısım ise ortama eklediğimiz hacim içinde bulunan kuru polimer ağırlığı olarak belirlendi.

Bütün denemelerde hesaplanan kuru polimer ağırlığı kullanılacağı için bu değer hesaplanması oldukça önemlidir. Bu veri ışığında yapılan denemelerde Q ile ifade edilen bağlanma değeri hesaplandı. Q değeri gram polimer başına bağlanan mg miktarı belirtmektedir (Akgöl. ve ark, 2008).

---

$C_{ilk}$ : Başlangıç ilaç konsantrasyonu (mg/mL)

$C_{son}$ : Süre sonundaki ilaç konsantrasyonu (mg/mL)

$V_{toplam}$ : Reaksiyon ortamı hacmi (mL)

### 2.2.3. PBA ve DNA'nın bağlanan miktarının belirlenmesi

#### PBA'nın Bağlanan Miktarının Belirlenmesi

Literatürde belirtildiği gibi 260 nanometre dalga boyunda UV bölgede spektral ölçümler gerçekleştirilerek ortamdaki PBA miktarı belirlendi. Bu hesaplamaları gerçekleştirebilmek için farklı PBA konsantrasyonlarında 260 nm'de kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Winblade et al, 2000).

#### Bağlanması sonunda ortamdaki PBA'nın giderilmesi

Sentezlenen nanopolimere PBA bağlanmasını optimize etmek amacıyla gerçekleştirilen denemelerden sonra optimize edilen koşullarda pseudospesifik nanopolimer hazırlandı. Pseudospesifik nanopolimere DNA bağlanmasını optimize etmek amacıyla DNA bağlama çalışmalarına geçildi. Ancak DNA bağlamadan önce ortamda bağlanmadan kalan PBA'nın giderilmesi gerekmektedir. Bu işlemin yapılmasının amacı PBA ile DNA'nın aynı dalga boyunda ölçülüyor olmasından kaynaklanır. Ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarı bir sonraki deneme olan DNA adsorpsiyon çalışmalarında ortamdaki DNA'nın belirlenmesini girişim yaparak zorlaştırmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla ortamda bağlanmadan kalan PBA yıkamalarla giderildi. Yıkama işlemi, santrifüjlenen nanopartiküllerin üzerine 1mL distile su eklenerek sonik banyo ve vorteks kullanılarak nanopolimerin homojen hale gelmesi sağlandı ve tekrar 14.100g'de 20dk santrifüjlendi. Her santrifüj sonrasında ortamda kalan PBA miktarı üst fazdan bir miktar alınarak 260 nm'de belirlendi.

#### DNA'nın Bağlanan Miktarının Belirlenmesi

Literatürde belirtildiği üzere 260 nm'de ve 280 nm'de ölçüm yapılarak ikisi arasındaki fark alınarak ortamdaki DNA miktarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmadan direk 260 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fark alınarak gerçekleştirilen yöntemde ortamda bulunan protein yapıdaki maddelerin girişimini gidermek için bu fark alınmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bizim kullandığımız kimyasallar protein yapıda olmadıkları için bu giderimin yapılmasına ihtiyaç duyulmadı (Matsunaga, 2001).

#### **2.2.4. Nanopolimer yüzeyine PBA bağlanmasının optimizasyonu**

Nanopolimer sentezlendikten ve karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra nanopolimere PBA bağlama çalışmalarına geçildi. Bu amaçla ortam koşulları optimize edildi. Ortam koşullarından pH, sıcaklık, başlangıç konsantrasyonu ve süre optimize edildi.

##### **PBA Bağlanmasına pH'nın Etkisi**

Nanopolimere PBA bağlanmasını optimize etmek amacıyla Mes, fosfat, tris, hepes ve sodyum borat tamponları kullanıldı. Farklı pH'larda (5,6,8,8.40,9.20,10) bağlanma çalışmaları gerçekleştirildi. 100 µl nanopolimer 14.100 g'de santrifüjlenip üst faz atılarak üzerine 10 mg/mL'lik PBA'dan 300 µl 25 mM'lık tamponlardan 200 µl eklendi ve açılı karıştırıcıda karıştırıldı. 2 saat sonunda örnekler 20 kat seyreltilerek ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarları belirlendi

##### **PBA Bağlanmasına Sıcaklığın Etkisi**

Nanopolimer sentezlendikten sonra PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisi incelendi. Dört farklı sıcaklıkta denemeler gerçekleştirildi; 4°C, 25°C, 37°C ve 55°C. 100 µl nanopolimer 14.100g'de santrifüjlenip üst faz atılarak üzerine 10 mg/mL'lik PBA'dan 300 µl ve 25 mM'lık sodyum borat tamponundan 200 µl eklendi ve açılı karıştırıcıda karıştırıldı. 2 saat sonunda örnekler 20 kat seyreltilerek ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarları belirlendi.

##### **Bağlanma Kapasitesi Üzerine PBA Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi**

Ortam koşullarını optimize etmek amacıyla sentezlenen nanopolimere PBA başlangıç konsantrasyonunun etkisi incelendi ve farklı başlangıç konsantrasyonlarında (0,6-8 mg/ml) PBA hazırlandı. 100 µl nanopolimer 14.100 g'de santrifüjlendi, üst fazı atılarak üzerine PBA çözeltisi ve sodyum borat tamponu eklendi ve açılı karıştırıcıda karıştırıldı. 2 saat sonunda örnekler 20 kat seyreltilerek ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarları belirlendi.

### **PBA Bağlanmasına Zamanın Etkisi**

Sentezlenen nanopolimere PBA bağlanma koşullarını optimize etmek amacıyla zamanın etkisi de incelendi. Bunun için reaksiyon ortamından belirli sürelerde örnekler alınarak santrifüjlendi ve üst fazlarında bağlanmadan kalan PBA miktarı belirlendi. Bu amaçla 0 dk, 5 dk, 15 dk, 45 dk, 75 dk, 120 dk, 480 dk, 1440 dk aralıklarla karışımdan örnekler alındı. 260 nm’de ölçümler alınarak ortamda nanopolimere bağlanmadan kalan PBA miktarları belirlendi.

### **2.2.5.DNA adsorpsiyonu için optimizasyon çalışmaları**

Pseudospesifik nanopolimer sentezi gerçekleştirildikten sonra DNA’nın adsorpsiyonu için ortam koşullarını optimize etmek amacıyla DNA adsorsiyonuna pH etkisi, sıcaklık etkisi, başlangıç konsantrasyonunun etkisi ve iyonik şiddetin etkisi incelendi.

#### **DNA Adsorpsiyonuna pH Etkisi**

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonu için pH’nın etkisini belirlemek amacıyla farklı pH’larda (6,7,8,9,9.20,10) denemeler gerçekleştirildi. 100 µl nanopolimer 14.100 g’de santrifüjlenerek üst faz atıldı ve üzerine 10 mg/mL’lik PBA’dan 350 µl ve 25 mM’lık tampondan 150 µl eklendi ve açılı karıştırıcıda karıştırıldı. 2 saat sonunda 14.100 g’de 20 dk santrifüj yapılarak üst fazda bağlanmayan PBA miktarı ve bağlanan PBA miktarı belirlendi. Bağlanmadan kalan PBA miktarı ortamdan giderilerek DNA adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu için pH denemelerine geçildi. Nanopartiküller üzerine 10 mg/mL DNA çözeltisinden 200µl eklendi ve üzerine tamponlardan 300 µl eklendi ve 2 saat karıştırma işlemi gerçekleştirilerek karıştırma sonunda npler 14.100 g’de 20 dk santrifüjlenerek üst fazda gerekli seyreltmeler yapılarak DNA analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sonunda 260 nm’de ortamda bağlanmadan kalan ve pseudospesifik nanopolimere bağlanan DNA miktarı belirlendi.

### **DNA Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi**

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonu için sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklar (4, 25, 37 ve 55°C) denendi. DNA adsorpsiyon denemelerine sıcaklığın etkisini belirlemeden önce nanopolimere PBA bağlanması yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildikten sonra DNA adsorpsiyon çalışmalarına geçildi. Pseudospesifik nanopolimer üzerine 10 mg/mL'lik DNA çözeltisinden 200 µl ve 25 mM pH 9,20 sodyumborat tampundan 300 µl eklenerek 2 saat karıştırmaya bırakıldı. 2 saat sonunda 14.100 g'de 20 dk santrifüjlenerek üst fazda gerekli seyreltmeler yapılarak DNA analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sonunda 260 nm'de ortamda bağlanmadan kalan ve pseudospesifik nanopolimere bağlanan DNA miktarı belirlendi.

### **DNA Adsorpsiyonuna Başlangıç DNA Konsantrasyonunun Etkisi**

Pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonuna başlangıç konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda çalışmalar yapıldı. Nanopolimere PBA bağlandıktan sonra ve ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarları giderildikten sonra pseudospesifik nanopolimer üzerine farklı konsantrasyonlarda (4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL, 12 mg/mL, 14 mg/mL ve 18 mg/mL) DNA çözeltisinden eklendi. Denemeler 25 mM pH 9,20 sodyum borat tampiondayapıldı. 2 saatlik karıştırma süresi sonunda ortamda pseudospesifik nanopolimere bağlanmadan kalan DNA miktarları belirlendi.

### **DNA Adsorpsiyonuna İyon Şiddetinin Etkisi**

Pseudospesifik nanopolimere DNA bağlanmasını optimize etmek amacıyla iyon şiddetinin etkisi belirlendi. Nanopolimere PBA bağlanması gerçekleştirildikten sonra üç farklı ortam koşulları hazırlanarak denemeler gerçekleştirildi. Nanopartikül üzerine 10 mg/mL DNA'dan 200 µl, 100 µl 25 mM pH 9,20 borat tamponu ve 200 µl tuz eklendi. Denemelerde 1 M CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ve iyonsuz ortam (sadece sodyum borat tamponu)kullanıldı. 2 saat açılı karıştırıcıda karıştırma işleminden sonra 14.100 g'de 20 dk santrifüjlenip üst fazlarda gerekli seyreltmeler

yapılarak 260 nm'de ortamda pseudospesifik nanopolimere bağlanmadan kaan DNA miktarları belirlendi.

### **2.2.6.Pseudospesifik nanopolimerden DNA desorpsiyonu**

Pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyon koşullarının optimizasyonunu gerçekleştirdikten sonra DNA'nın pseudospesifik nanopolimer üzerinden desorpsiyon koşullarını belirlemek amacıyla üç farklı ortam koşulu hazırlandı. Hazırlanan ortamlar; 25 mM pH 8 hepes, tris ve borat tamponlarıdır. Desorpsiyon ortamına tamponlardan 500 µl ve 1 M NaCl tuzundan ise 500 µl eklenerek gerçekleştirildi. Örnekler 1 saat karıştırıldıktan sonra 14.100g'de santrifüjlenerek üst fazlarında 260 nm'de ortamda pseudospesifik nanopolimerden desorbe edilen DNA miktarları belirlendi. Sonuçlar değerlendirilerek en iyi desorpsiyon ajanı belirlendi ve onunla tekrarlanabilirlik denemelerine devam edildi.

### **2.2.7.Pseudospesifik nanopolimerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi**

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyon koşulları optimize edildikten sonra desorpsiyon koşullarının da optimize edilmesinden sonra pseudospesifik nanopolimerin tekrar kullanılabilirlik çalışmalarına hepes tamponu ile devam edildi. İlk desorpsiyon çalışmasından sonra partiküllere tekrar DNA adsorpsiyon ortamı hazırlandı ve 10 mg/mL'lik DNA çözeltisinden 200µl ve 25 mM pH 9,20 sodyum borat tamponundan 300 µl eklenerek 1 saat karıştırıldı. Bu işlemin ardından ise nanopartiküller santrifüjlenerek üst fazları atıldı ve tekrar desorpsiyon ortamına konuldu. Ortamda 500 µl 25 mM pH 8 hepes ve 500 µl 1M NaCl bulunmaktadır. Tekrarlanabilirlik denemeleri dört döngü olarak tekrarlandı. Yapılan bütün denemeler sonunda nanopartiküller 14.100 g'de 20 dk santrifüjlenerek üst fazlarında gerekli seyreltmeler yapılarak 260 nm'de ortamda bulunan DNA miktarları belirlendi.

### **2.2.8. Agaroz jel elektroforezi**

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonu ve desorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra desorpsiyon koşullarında ortamdaki DNA molekülünü belirlemek amacıyla elektroforez yöntemi kullanıldı. Elektroforez

yöntemiyle DNA molekülünü görüntülemek için 40 mL hacimde %1,5'luk jel hazırlandı. 1,000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda ve 50 bp'lik DNA markerı kullanıldı. Çalışmaları gerçekleştirdiğimiz DNA kaynağı en fazla 50 baz çifti içerdiği için 50 baz çiftlik DNA markerı kullanıldı. Jel üzerinde 5 kuyucuğa örnek yüklenerek jelde etidyum bromür ile pseudospesifik nanopolimerden desorbe edilen DNA molekülünün görüntülenmesi gerçekleştirildi.

### 3. SONUÇLAR

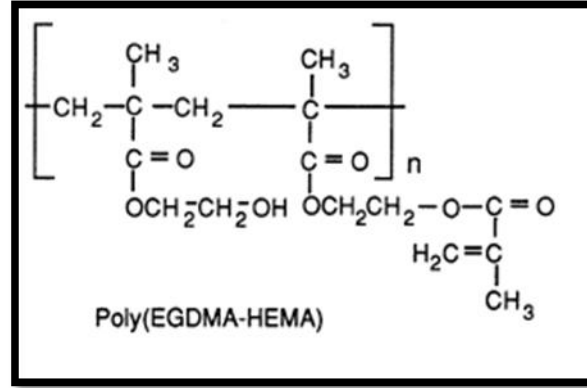
#### 3.1. p(HEMA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen polimerin süt beyazı rengi ile spesifik bir görüntüsü vardır. Şekil 2.3'te sentezlenen nanopolimerin bir fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 2. 3. Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin görüntüsü.

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin olası kimyasal yapısı aşağıdaki Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2. 4. p(HEMA) nanopolimerinin olası kimyasal yapısı.

### 3.1.1.Yüzey alanı hesabı

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_s \times d^3$$

$$\text{Yüzey alanı}(m^2/g) = N \times YA / \text{gram polimer}$$

$$Y.A. = 4 \times \pi \times r^2 = 4 \times 3,14 \times (42,85 \times 10^{-9})^2$$

$$N = 6 \times 10^{10} \times 10 / 3,14 \times 6,29 \times 10^{-4} \times 0,971$$

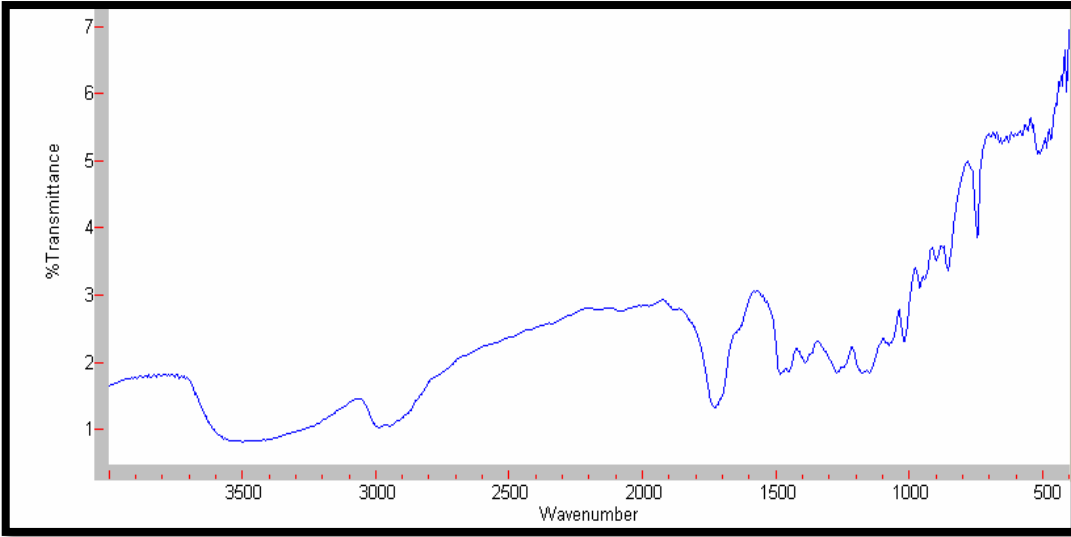
$$\text{Yüzey alanı}(m^2/g) = 7214,5 / 2,9323$$

$$\text{Yüzey alanı}(m^2/g) = 2460 \text{ m}^2/g$$

Sentezlenen nanopolimerin yüzey alanı yukarıdaki eşitlik kullanılarak  $2460 \text{ m}^2/g$  olarak hesaplanmıştır.

### 3.1.2.p(HEMA) Nanopolimerinin Fourier Dönüştümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizi

p(HEMA) nanopolimerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği kullanıldı. Şekilde HEMA nanopolimerinin FTIR spektrumu Şekil 2.5'te bulunmaktadır. Görüldüğü gibi p(HEMA) nanopolimerinin  $3500\text{ cm}^{-1}$  'de -OH bağları,  $3000\text{ cm}^{-1}$ 'de CH alkil bağları,  $1718\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O bağları ve  $1500\text{ cm}^{-1}$  C=C bağları görülmektedir.

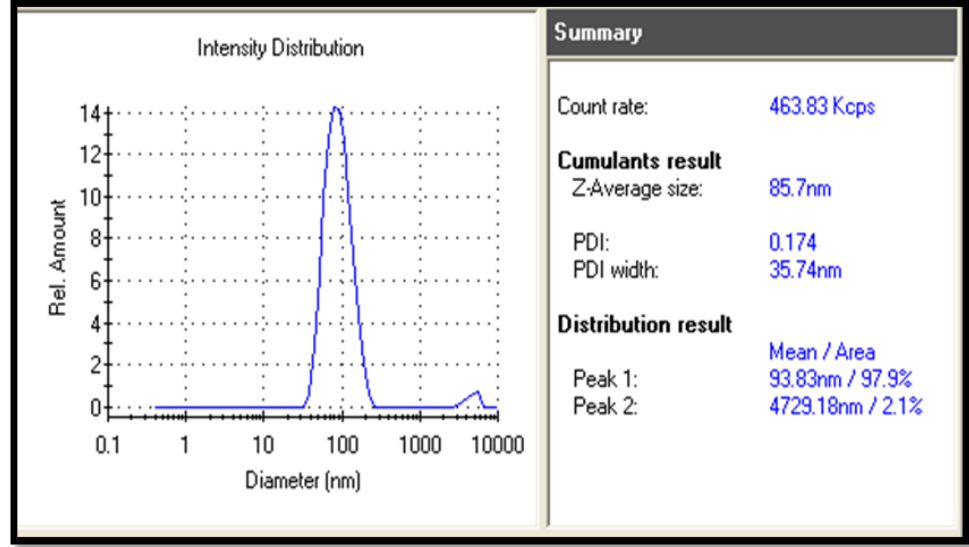


Şekil 2. 5. p(HEMA) Nanopolimerinin FTIR spektrum görüntüsü.

Spektrumdan görüldüğü üzere p(HEMA) nanopolimeri başarıyla sentezlenmiştir. Molekülün kimyasal yapısı ile spektrumda bulunan dalga boylarının ifade ettiği bağ yapıları birbiriyle uyumludur.

### 3.1.3.p(HEMA) Polimerinin partikül boyutunun belirlenmesi

Sentezlenen pHEMA nanopartikülünün  $\zeta$ -boyut analizi sonucu Şekil2.6'da görülmektedir. Yapılan boyut analizleri SEM görüntüleriyle de uyumluluk göstermektedir.

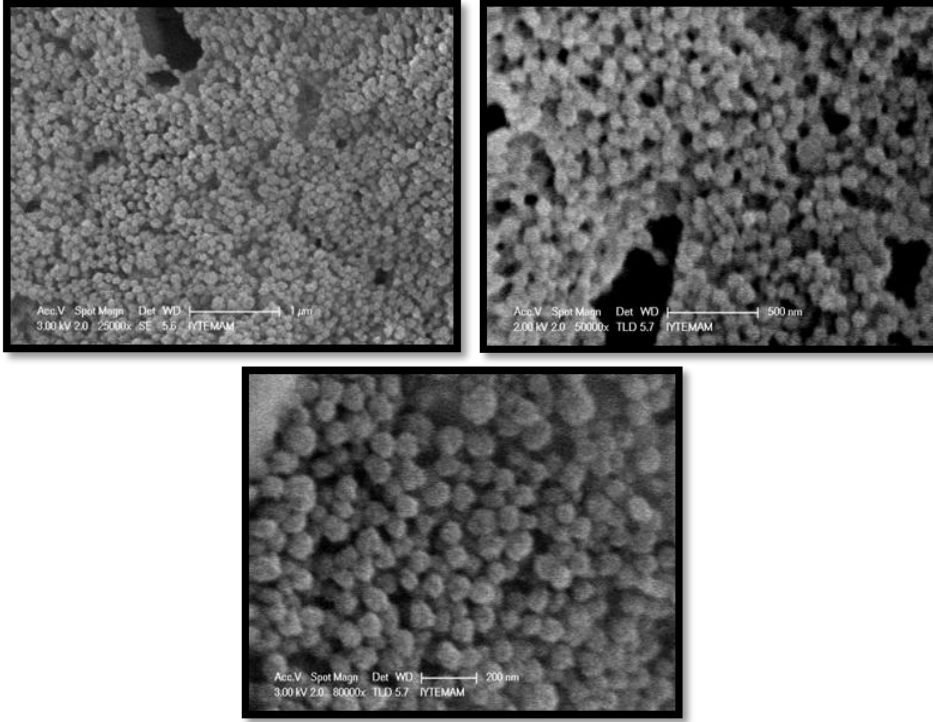


Şekil 2. 6. Zeta boyut analizi.

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin zeta boyut analizinde görülen polidispersite indeksi 1 eklenerek belirtildiği için 1,174 olarak ifade edilebilir. Zeta boyut analizinden görüldüğü üzere sentezlenen nanopolimerlerin boyutları 85,7nm dolaylarındadır. Polidispersite indeksinden görüldüğü üzere sentezlenen nanopolimerlerin boyutları birbirine oldukça yakındır ve oldukça küçüktür. Zeta boyut analizine bakılarak emülsiyon polimerizasyonunun en önemli tercih sebebi olan eş ve nano boyutlu polimerin sentezledi ifade edilebilir.

### 3.1.4.p(HEMA) Nanopolimerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

Emülsiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen p(HEMA) nanopartiküllerinin yüzey morfolojisi ve genel yapısı taramalı elektron mikroskop fotoğrafları ile incelendi (Şekil 2.7). Nanopartiküllerin agregatlaşmalarını önlemek amacıyla santrifüj işlemi yapılarak kurutma yönteminden kaçınıldı ve santrifüj kullanılmadan liyofilizatör ile kurutma işlemi gerçekleştirildi. Şekillerden de görüldüğü üzere polimerlerin farklı büyütmelerdeki görüntüleri ve küresel yapıları rahatlıkla görülmektedir.

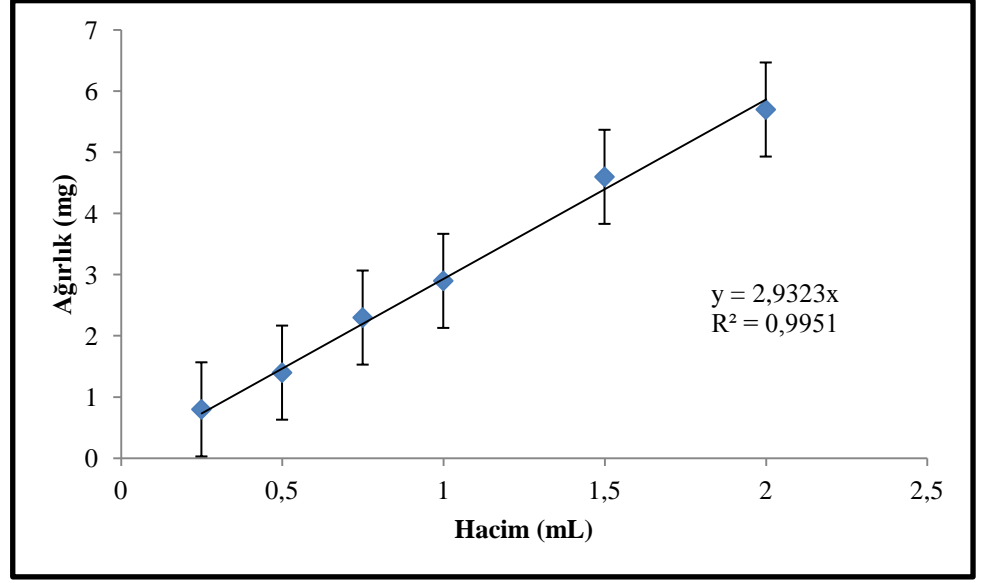


Şekil 2. 7. Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin elektron mikroskop görüntüleri.

Görüntüler üç farklı büyütme altında çekildi. Burada önemli olan agregatlaşma olmaması, boyutlarının küçüklüğü ve boyutlarının zeta ile uyumluluk göstermesidir. En büyük ölçekte büyütme ile görüntülenen Şekil 2.7'den görülmektedir ki 200 nm olarak gösterilen ölçeğe yaklaşık olarak üç nanopartikül sığabilmektedir. Bu da yaklaşık olarak 80 nm civarı bir boyut demektir ve bu sonuç zeta boyut analizi ile uyumludur. Ayrıca görüntülerden de anlaşılmaktadır ki agregatlaşma söz konusu değildir.

### 3.1.5.Kuru Nanopartikül ağırlığının belirlenmesi

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerinin hacim-ağırlık grafiği aşağıda bulunmaktadır. Grafikten görüldüğü üzere 1 mL nanopolimer 2,9323 mg ağırlığa sahiptir.



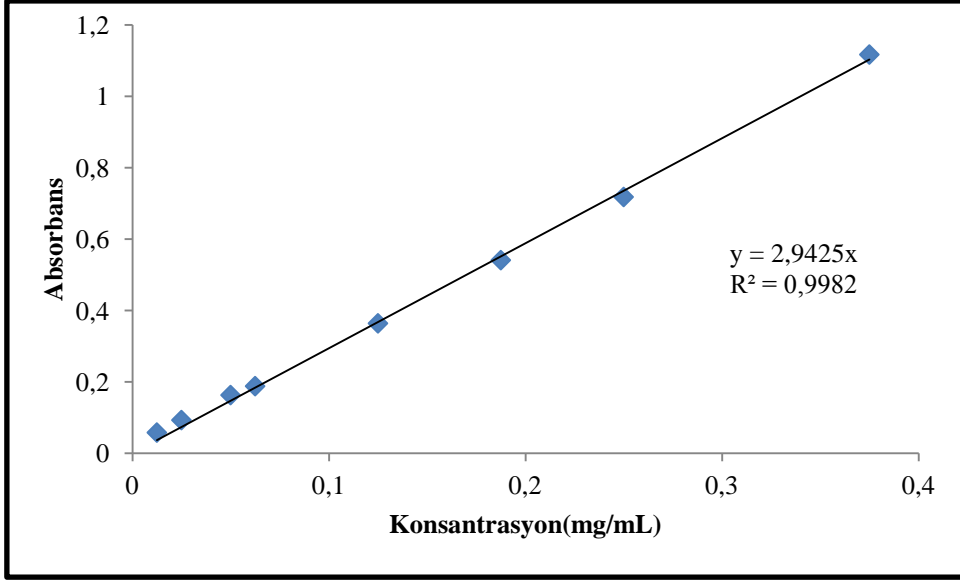
Şekil 2. 8. Kuru partikül ağırlığının hesaplanması.

### 3.2.PBA ve DNA'nın Belirlenmesi

#### 3.2.1.PBA'nın belirlenmesi

Pseudospesifik nanopolimer elde etmek için sentezlenen p(HEMA) nanopolimerine PBA bağlanma koşullarını optimizasyonu için bağlanan ve bağlanmayan PBA'nın miktarını belirlemek üzere spektrofotometre kullanılmıştır. PBA miktarı spektrofotometrede 255-268 nm dalga boylarında tayin edilebilmektedir (Mohapatra et al, 2009).

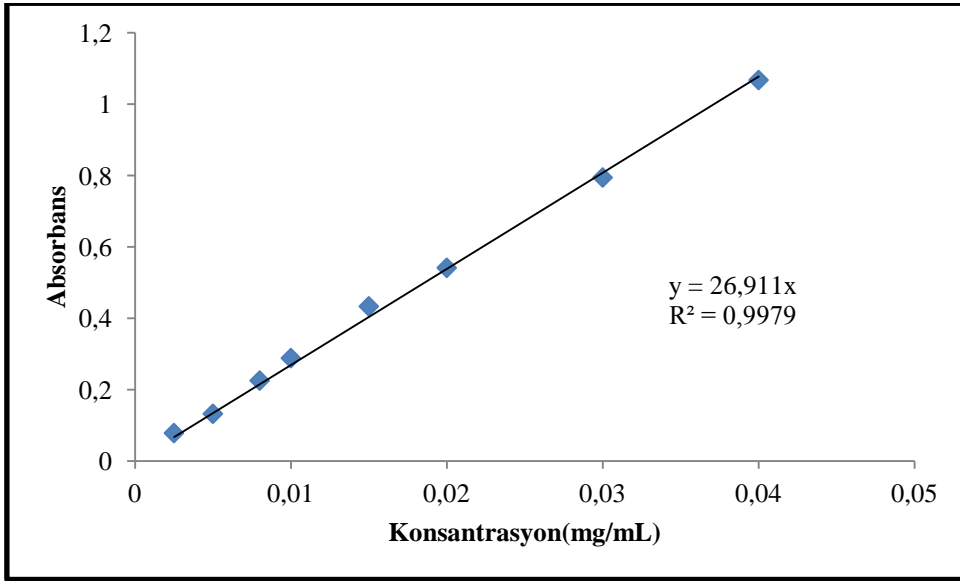
260 nm'de PBA kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyonlarda PBA hazırlanarak çizildi (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. PBA kalibrasyon grafiği.

### 3.2.2.DNA'nın belirlenmesi

Pseudospesifik nanopolimere bağlanmadan kalan ve bağlanan DNA miktarını belirlemek için oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 2.10'de verilmektedir.

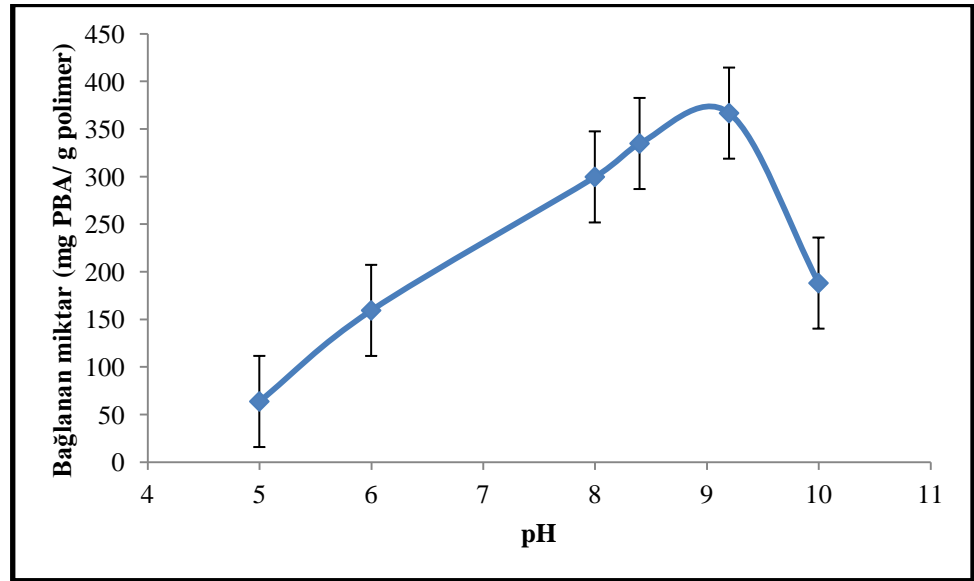


Şekil 2. 10. DNA kalibrasyon grafiği.

### 3.3. Sentezlenen p(HEMA) Nanopolimerine PBA'nın Bağlanması Optimizasyon Sonuçları

#### 3.3.1. PBA bağlanmasına pH'nın etkisi

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerine PBA bağlanmasını optimize etmek için pH'nın etkisi incelendi (Şekil 2.11). Grafikten de görüleceği üzere en iyi bağlanma pH'sı beklendiği üzere 9,2 olarak 25 mM borat tamponunda bulundu. Bu pH'da borat tamponunda en iyi bağlanmanın görülmesinin en önemli sebebi PBA'nın pH ile kimyasal yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır (Şenel, 2003).

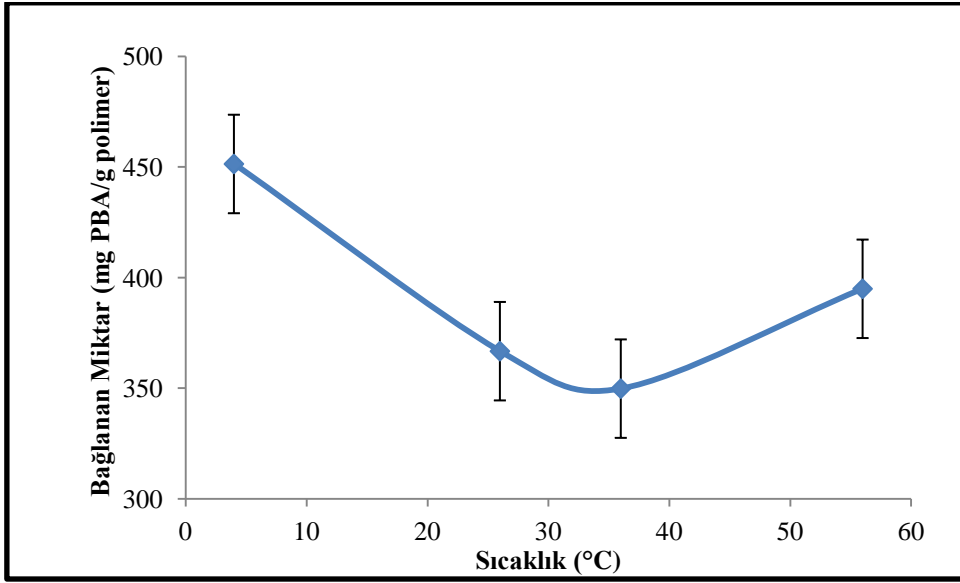


Şekil 2. 11. PBA bağlanmasına pH etkisi (Reaksiyon koşulları: 6mg/mL PBA, 25°C, 2 saat karıştırma).

Grafikten de görüldüğü üzere diğer tamponlarda bağlanma miktarları arasında belirgin bir fark göze çarpmaktadır. Bunun en önemli nedeni kullanılan tamponların pH değerlerinden kaynaklanmaktadır. PBA'nın bağlanma koşullarında ortam pH'sı oldukça etkili olmaktadır.

### 3.3.2.PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisi

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerine PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisinin incelendi ve sonuçlar Şekil 2.12’de verildi. Nanopolimer yüzeyine PBA bağlanması için etkili olan sıcaklık 4°C olarak belirlendi.



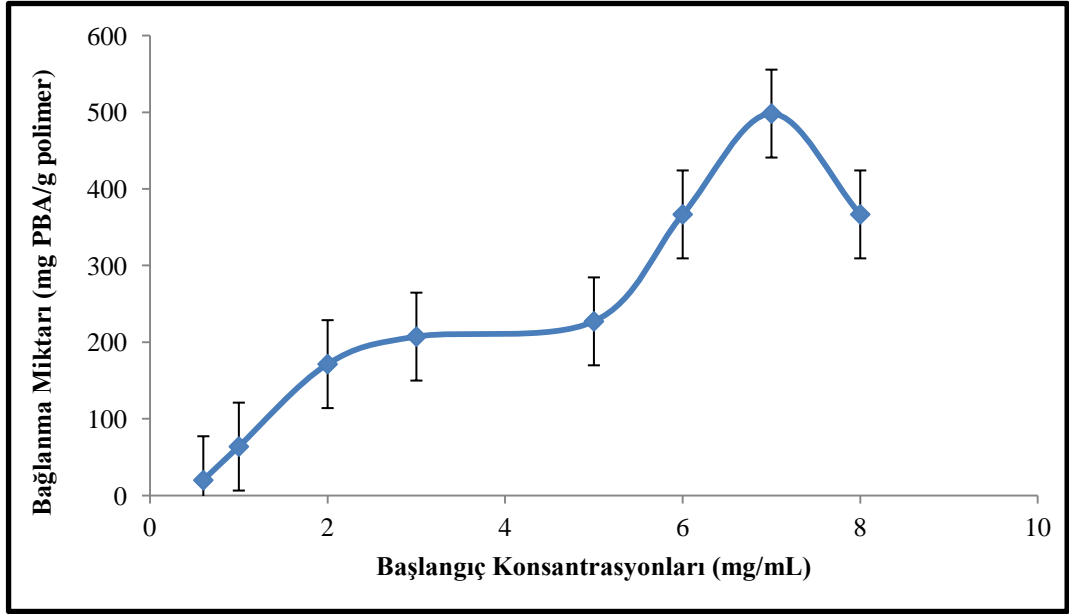
Şekil 2. 12. PBA bağlanmasına sıcaklığın etkisi (Reaksiyon koşulları: 6mg/mL PBA, pH 9,20 sodyum borat tamponu, 2 saat karıştırma).

Çalışmanın gerçekleştirildiği ortam koşulları göz önünde bulundurulduğunda 4°C’de nanopolimere PBA’nın bağlanmasının daha iyi olarak bulunmuştur.

### 3.3.3.PBA bağlanmasına başlangıç konsantrasyonunun etkisi

Sentezlenen p(HEMA) nanopolimerine PBA bağlanmasını optimize etmek amacıyla başlangıç PBA konsantrasyonunun etkisini belirleyebilmek için gerçekleştirilen çalışma sonucunda, başlangıç PBA konsantrasyonu artırıldıkça bağlanan miktarda da artış meydana geldi. Ancak belirli bir değerden sonra partiküller doyuma ulaştı ve ortamdaki fazla PBA miktarı ortam koşullarını olumsuz etkilemiş

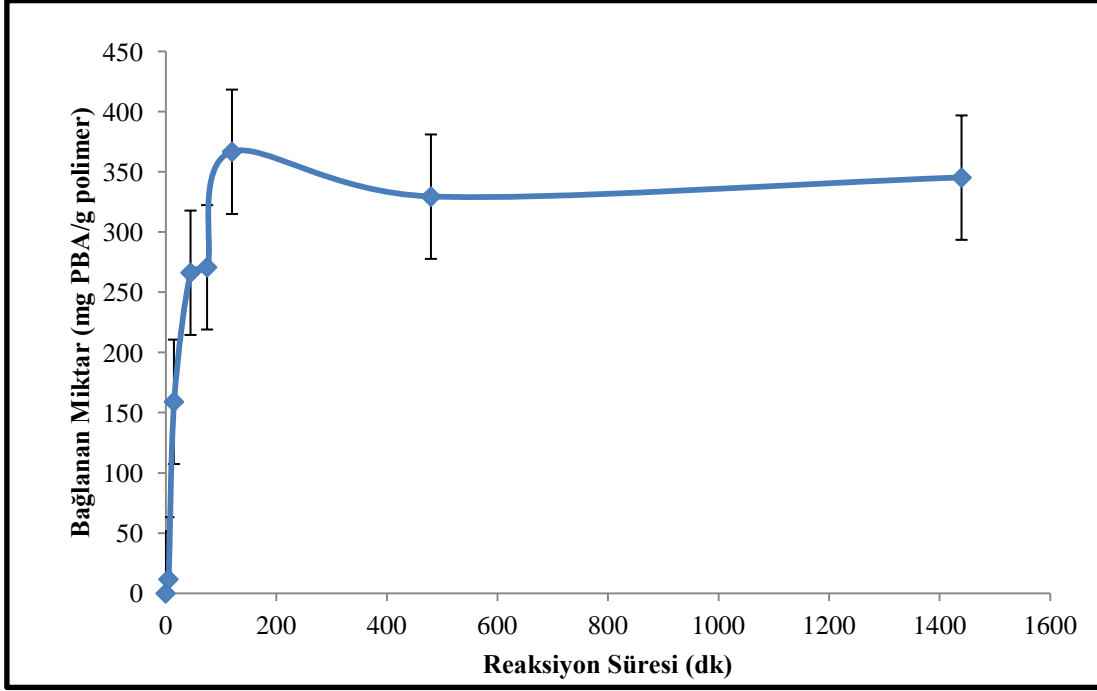
olabilir. Bağlanma için birbiriyle yarışan moleküller bir diğerinin bağlanmasını engellemiş olabilir. Bu durum ise bağlanmada bir miktar düşüşe neden oldu.



Şekil 2. 13. PBA bağlanmasına başlangıç konsantrasyonunun etkisi (*Reaksiyon koşulları: 25°, pH 9,20 sodyum borat tamponu, 2 saat karıştırma*).

### 3.3.4.PBA bağlanmasına zamanın etkisi

p(HEMA) nanopolimerine PBA'nın bağlanmasını optimize etmek amacıyla zamanın etkisi belirlendi. PBA'nın bağlanma miktarı 120. dakikaya kadar hızla artmaktadır ancak 120. dakikadan sonra deneme ortamının daha fazla karıştırılmasına gerek olmadığı maksimum bağlanma miktarı için 2 saat karıştırmanın yeterli olduğu görüldü ve nanopolimere PBA bağlanmasında çok büyük bir farklanma olmadığı görüldü.

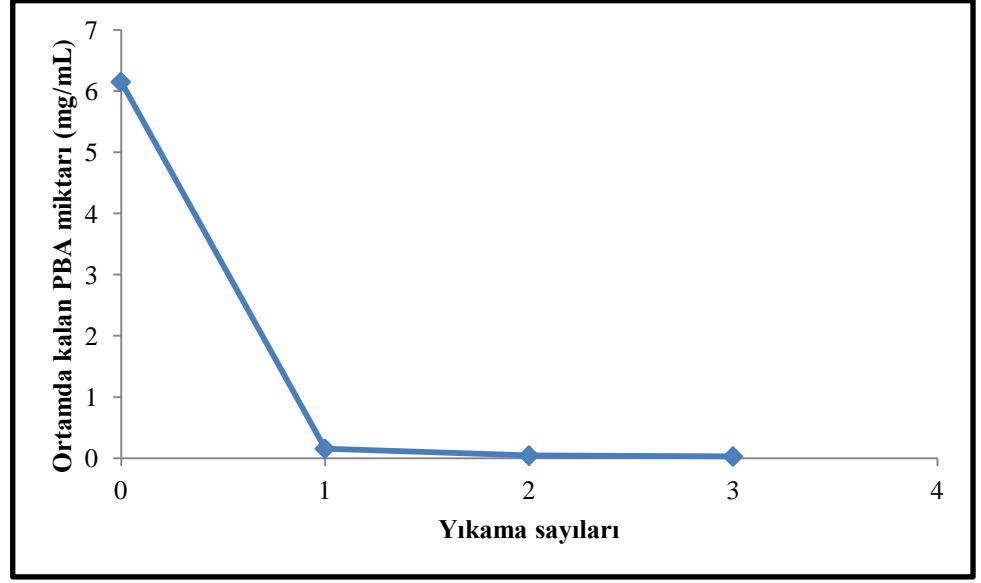


Şekil 2. 14. PBA bağlanmasına zamanın etkisi (*Reaksiyon koşulları: 25°C, 6 mg/mL PBA, pH 9,20 sodyum borat tamponu*).

Yapılan çalışma sonucunda nanopolimere PBA bağlanmasının optimum süresi 120 dk olarak belirlendi.

### 3.3.4. Nanopolimere bağlanmayan PBA'nın yıkanması

Nanopolimere PBA bağlama koşullarını optimize etmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmalardan sonra DNA bağlama çalışmaları için ortamda bağlanmadan kalan PBA miktarını gidermek için distile su ile toplam hacim 1 mL olacak şekilde yıkamalar yapıldı ve bu yıkamalar sonunda ortamda kalan PBA miktarları Şekil 2.15'te gösterilmektedir. 3. yıkama sonunda ortamda bağlanmadan kalan PBA'nın etkin bir şekilde uzaklaştırıldığı görülmektedir.

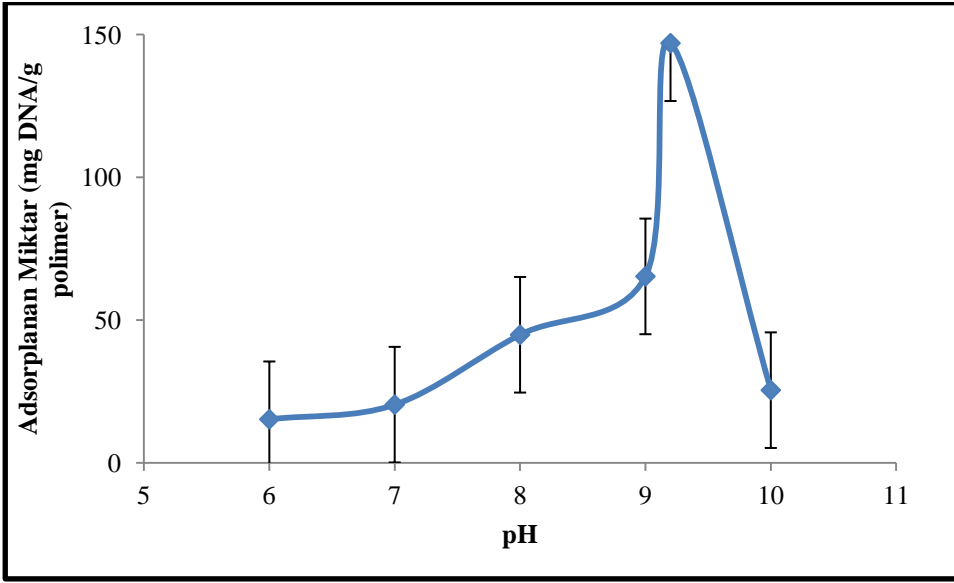


Şekil 2. 15. PBA yıkama döngüsü (*Reaksiyon koşulları: Başlangıç PBA konsantrasyonu 6 mg/mL, 25°C*).

### 3.5.Pseudospesifik Nanopolimere DNA Adsorpsiyonunun Optimizasyon Sonuçları

#### 3.5.1.DNA adsorpsiyonuna pH etkisi

Pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonunda pH'nın etkisi incelendiğinde aşağıdaki grafikten de görüldüğü üzere 25mM pH 9,20 sodyum borat tamponunda daha iyi bir bağlanma elde edildi (Şekil 2.16).



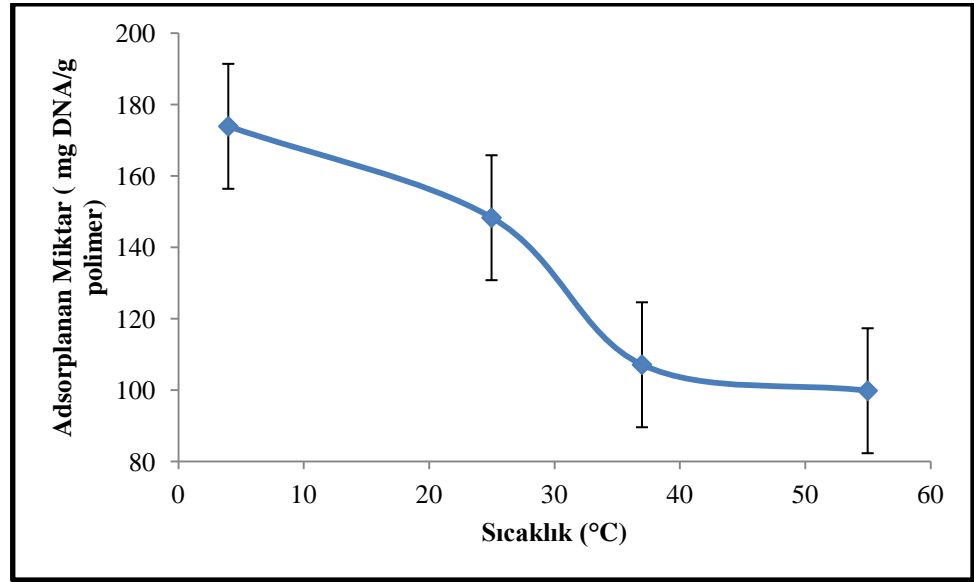
Şekil 2. 16. DNA adsorpsiyonuna pH etkisi (Reaksiyon Koşulları: 25°, 4mg/mL DNA, 2 saat karıştırma) .

Şekilden de görüldüğü üzere en yüksek miktarda DNA bağlanması pH 9,20 sodyum borat tamponunda gerçekleşti. Bunun nedeni PBA'nın  $pK_a$ 'sının 8,8 olmasından kaynaklanmaktadır. Kendi  $pK_a$ 'sının üzerinde kimyasal yapısında meydana gelen değişim ile bağlanmanın gerçekleşebileceği tetragonal hale kavuşmaktadır (Yan et al, 2004). Tris pH 10'da ise bağlanmanın az olmasının nedeni tamponun özelliğinden yani tristen kaynaklanmaktadır. Tris PBA çalışmalarında genellikle desorpsiyon tamponu olarak kullanılan bir tampondur, bu nedenle pH bağlanma için uygun olsa bile tampondan kaynaklı olarak bağlanma daha az miktarlarda gerçekleşmektedir ( Matsunaga, 2001).

### 3.5.2.DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi incelendiğinde 4 °C'de gerçekleştirilen deneme sonucu elde edilen bağlanma oranı diğer sıcaklıklarda gerçekleştirilen deneme sonuçlarına kıyasla daha yüksektir (Şekil 2.17). Grafikten de görüldüğü üzere 4°C'nin dışındaki sıcaklık-

larda DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir. Bu durumu biz DNA'nın yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmamasıyla açıklayabiliriz. Daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmadığı için yapısında meydana gelen değişiklikler nedeniyle bağlanma oldukça düşük değerlerde belirlendi. Özellikle 37°C üzerinde gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmalarında DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyon miktarında belirgin bir düşme görülmektedir.

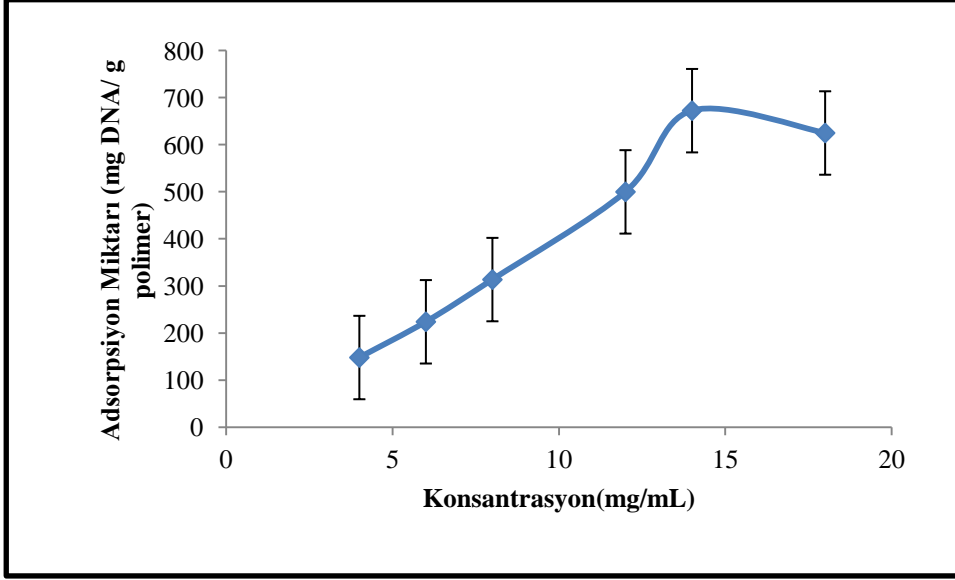


Şekil 2. 17. DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (Reaksiyon koşulları: 4 mg/mL DNA, pH 9,20 sodyum borat tamponu, 2 saat karıştırma).

### 3.5.3. DNA adsorpsiyonuna başlangıç DNA konsantrasyonunun etkisi

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla incelenen başlangıç DNA konsantrasyonunun etkisinde DNA konsantrasyonu artırıldıkça bağlanma da arttığı için adsorpsiyon kapasitesinde konsantrasyona bağlı olarak bir artış görülmektedir. Hem sentezlenen nanopolimerin yüzey alanının geniş olması sebebiyle hem de elde edilen pseudospesifik nanopolimerin spesifik olmasından dolayı adsorpsiyon miktarı bu kadar yüksek değerlere çıkabildi. Gerçekleştirilen çalışmada pseudospesifik

nanopolimere maksimum adsorpsiyonun gerçekleştiği konsantrasyon değeri 14 mg/mL olarak belirlendi.

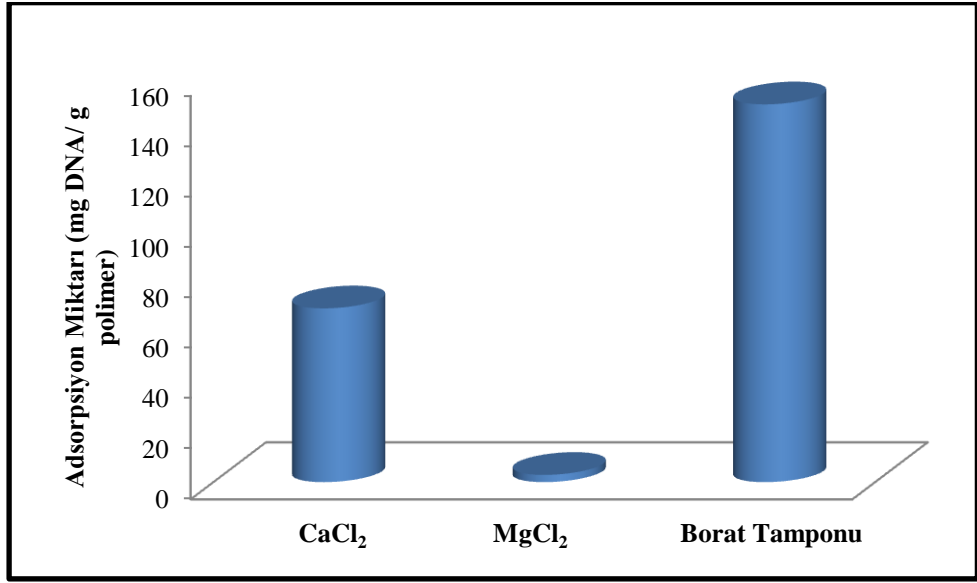


Şekil 2. 18. DNA adsorpsiyonuna başlangıç konsantrasyonunun etkisi (Reaksiyon koşulları: 25°C, pH 9.20 25 mM sodyum borat tamponu, 2 saat karıştırma ve başlangıç konsantrasyonları 4-18 mg/mL).

Grafikten de görüldüğü üzere belli bir konsantrasyon değerinden sonra ortamda bulunan DNA pseudospesifik nanopolimere daha az miktarda bağlanmaktadır.

### 3.5.4.DNA adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi

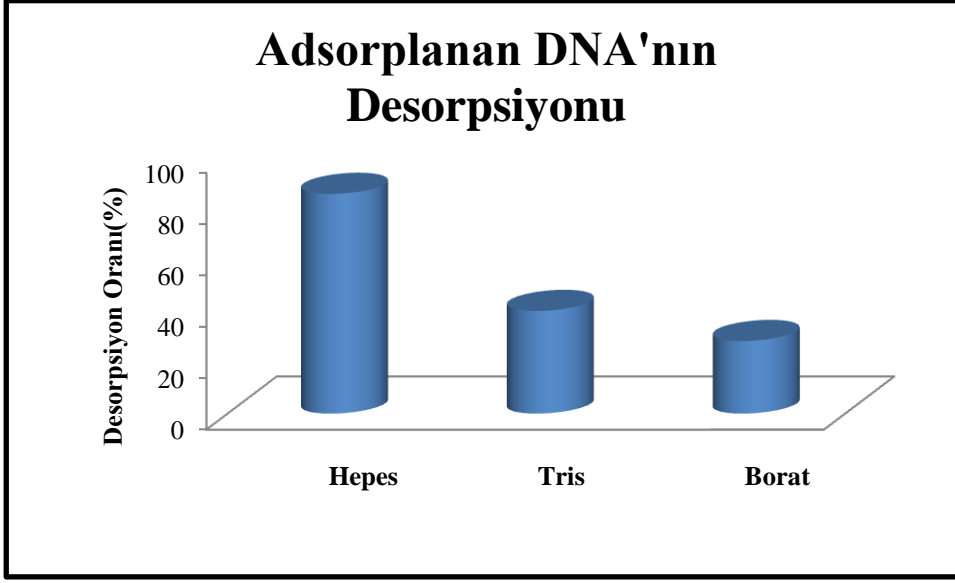
Sentezlenen pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyon koşullarının optimizasyonunda iyon şiddetinin etkisi incelenmek için üç farklı iyon şiddetinde adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ortamda farklı iyon bulunması halinde DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyonunu olumsuz yönde etkiledi.



Şekil 2. 19. DNA adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkisi (*Reaksiyon koşulları: 25°C, pH 9,20 sodyum borat tamponu, 4mg/mL DNA ve 0,4 M iyonik şiddet*).

### 3.6.DNA Desorpsiyonu

Pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyon koşulları optimize edilen DNA molekülünü desorpsiyon ortamını belirlemek için hazırlanan üç farklı desorpsiyon ortamında DNA molekülünün desorpsiyonu gerçekleştirildi. Desorpsiyon çalışmaları literatürde verilen ortamlara benzer koşullar hazırlanarak ortamların da farklarının görülebileceği şekilde gerçekleştirildi (Elmas ve ark, 2003).



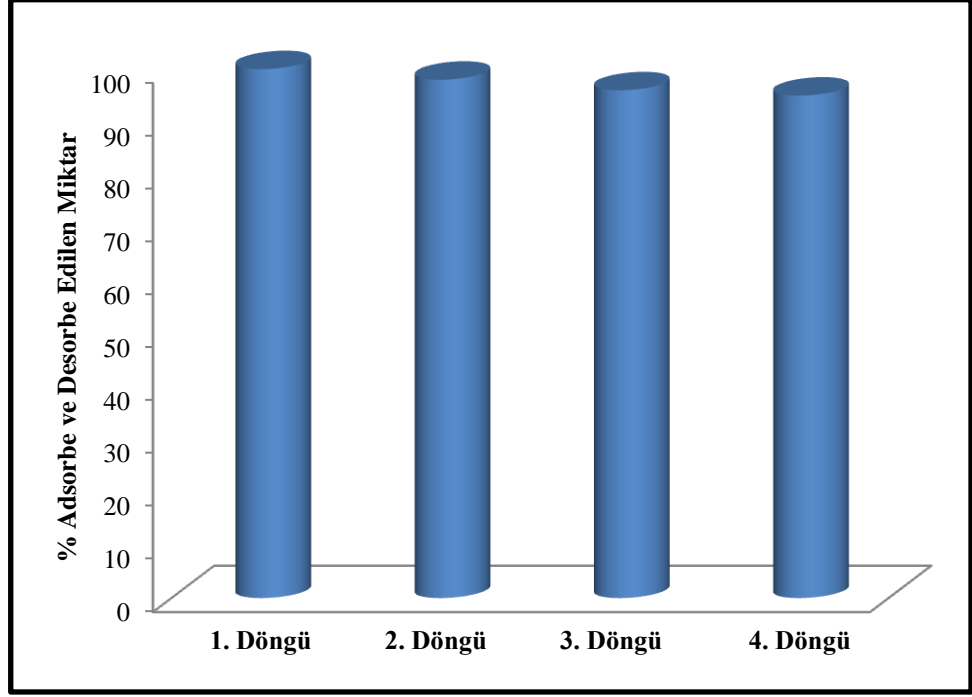
Şekil 2. 20. DNA desorpsiyonu (Reaksiyon koşulları: 25mM tamponlar, 1M NaCl, 25°C, 2 saat karıştırma).

Grafikten de görüldüğü üzere PBA'nın  $pK_a$  değerinin altındaki pH değerleri pseudospesifik nanopolimerden DNA desorpsiyonu için tercih edildi. En fazla miktarda desorpsiyon 25 mM pH 8 hepes tamponunda gerçekleşti. Bir başka benzer çalışmada da Heps tamponu desorpsiyon koşullarında kullanılmıştır (Şenel, 2004).

### 3.7.Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelendiği çalışmada DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyonu ve desorpsiyonu dört kez ardışık olarak gerçekleştirildi. PBA kendi  $pK_a$  değerinin altındaki pH değerlerinde trigonal yapıya sahip bir moleküldür. Ortam koşullarının pH değerinin PBA'nın  $pK_a$  değerinin üzerinde olduğu durumlarda ise PBA molekülü tetragonal hale gelir ve DNA molekülünün yapısındaki şeker molekülü ile bağ yapabilecek kimyasal bir yapı sergiler. Bu durum göz önünde bulundurularak desorpsiyon çalışmalarından sonra pseudospesifik nanopolimerler yıkanarak

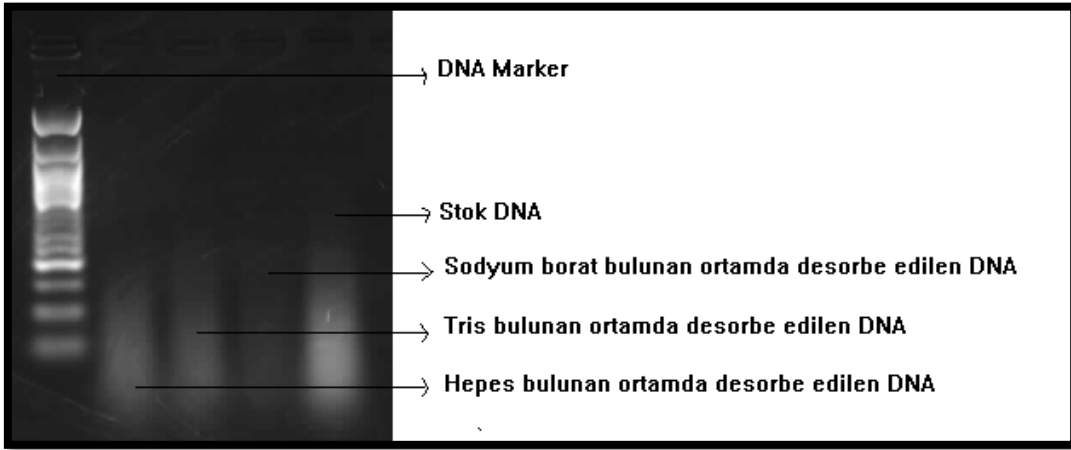
ortam pH değerleri adsorpsiyona elverişli hale getirilmiştir ve buna bağlı olarak bağlanma miktarları birbiriyle uyumluluk göstermektedir.



Şekil 2. 21. DNA adsorpsiyonu ve desorpsiyonu (*Adsorpsiyon koşulları: 4°C, pH 9,20 sodyum borat tamponu ve 1. döngüde adsorplanan DNA miktarı 0,16 mg/m; Desorpsiyon koşulları: 25°C, pH 8 hepes tamponu ve 1. döngüde desorbe edilen DNA miktarı 0,137mg/mL*).

### 3.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Sentezlenen pseudospesifik nanopolimerle adsorpsiyonu gerçekleştirilen DNA molekülünün desorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra desorbe edilen DNA molekülü agaroz jelde yürütülerek görüntülenmesi gerçekleştirildi. Jel görüntüsündeki ilk kuyucukta DNA marker bulunmaktadır, 2. kuyucukta hepes, 3. kuyucukta tris, 4. kuyucukta ise borat bulunan ortamda desorbe edilen DNA görülmektedir. En son kuyucukta ise kimyasal stok olan DNA (kurbağa sperminden elde edilen DNA molekülü) görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi DNA yapısında bir bozunma olmadan izole edilebildi. Stok DNA molekülünden daha az parlaklıkta DNA molekülü görüntülenmesinin nedeni hem adsorpsiyon ortamına daha az konsantrasyonda DNA bulunmasından hem de adsorbe edilenden daha az miktarda DNA'nın desorbe edilmesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 2. 22. Agaroz jelde yürütülen DNA görüntüleri

1. kuyucukta yürütülen markerın içerdiği en küçük baz çifti 50bp olduğu göz önünde bulundurulursa stok DNA örneğinin ve desorbe edilen DNA moleküllerinin 50bp ve daha az baz çifti içerdiği açıkça görülmektedir. Agaroz jel elektroforez yöntemine göre molekül ağırlığı en az olan baz çiftine sahip DNA molekülleri aynı sürede daha çok yol almaktadır (Itoh, 1995).

#### 4.GENEL DEĞERLENDİRME

Odabaşı ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada süspansiyon tekniği ile sentezlenmiş, boyutları 80-120  $\mu\text{m}$  olan manyetik p(HEMA) patikülleri anti-DNA antibadileri kullanılarak 4,4 mg/g DNA adsoplanabilmiştir(Odabaşı ve Denizli, 2001).

Tuncel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada süspansiyon polimerizasyon tekniği ile elde edilen 3 mm boyutundaki N-3-dimetilaminopropil metakrilamid polimeri kullanılarak 50 mg/g DNA izole edilmiştir( Tuncel ve ark., 2000).

Perçin ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada p(HEMA) temelli N-metakriloil-L-histidin metil ester ligandı içeren süpermakrogözenekli kriyojeller hazırlamışlar ve maksimum DNA adsorpsiyon kapasitesini 13,5 mg/g kriyojel olarak bulmuşlardır(Perçin ve ark, 2011).

Ünsal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise polietilenimid tutturdukları süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezledikleri 186 µm boyutundaki p-klorometilstiren polimeri ile 290 mg/g DNA adsorbe etmişlerdir (Ünsal ve ark., 2000).

Bizim yaptığımız çalışmayı ise ele almak gerekirse p(HEMA) nanopolimer sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen nanopolimerin yüzey alanı hesaplandı ve 2460 m<sup>2</sup>/g olarak bulundu. Yüzey alanının genişliği yapılan çalışmalar için çok büyük bir avantajdır çünkü yüzey alanı ne kadar geniş olursa partiküller için bağlanma da yüzey alanı ile orantılı olarak artmaktadır. Sentezlenen nanopolimerin SEM fotoğrafları ile küresel yapıları görüntülendi. Zeta Potansiyel ile nanopartiküllerin boyutları yaklaşık olarak 85,7 nm olarak belirlendi. Sentezlenen nanopolimerin boyutları ile yüzey alanının genişliği birbiriyle uyumluluk göstermektedir. Nanopolimerin FTIR spektrum ölçümleri ile polimerde bulunan bağ yapıları aydınlatıldı. Ayrıca daha sonraki denemelerde kullanılmak üzere kuru polimer ağırlığı 1 mL süspansiyonda 2,9323 mg olarak hesaplandı.

PBA'nın sentezlenen nanopolimere bağlanma koşullarını optimize etmek için ilk olarak değiştirilen parametre ortam pH'sıdır. PBA'nın nanopolimere bağlanmasını optimize etmek için farklılaştırılan pH değerleri içerisinde en yüksek bağlanma pH değeri 9,20 sodyum borat tamponu olarak bulunmuştur ve bağlanma pH'sının 9,20 olmasının önemi PBA'nın pK<sub>a</sub> değerinden kaynaklanmaktadır. DNA için adsorpsiyon koşullarını optimize etmek amacıyla değiştirilen pH değerlerinde de benzer durum söz konusudur ve DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyonu için en uygun pH değeri 9,20 sodyum borat tamponu olarak belirlendi. Bu PBA'nın kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Çünkü PBA kendi pK<sub>a</sub>'sının üzerinde tetragonal konfigürasyonda, aşağısında ise trigonal konfigürasyonda bulunmaktadır. PBA'nın pK<sub>a</sub> değeri 8,8'dir ve bu pK<sub>a</sub> değerinin altındaki pH ortamlarında trigonal konfigürasyondadır, kendi pK<sub>a</sub> değerinin üstündeki pH değerlerinde tetragonal konfigürasyondadır ve ortamda bulunan diol içeren bileşikler ile bağ yapabilmektedir.

Sentezlenen nanopolimere PBA'nın bağlanmasını optimize etmek amacıyla ortam sıcaklığı değiştirilerek yapılan denemeler sonucunda bağlanma için en uy-

gun sıcaklık olarak 4°C bulunmuştur. Ardından DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyonunu optimize etmek amacıyla gerçekleştirilen denemelerde de DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyonu için en uygun sıcaklık 4 °C olarak bulunmuştur ve DNA'nın moleküler yapısını göz önünde bulundurduğumuz zaman sıcaklık için bulunan sonuçlar uygundur.

İyon şiddetinin etkisinin incelendiği denemelerde iyon olmayan ortamda daha fazla bağlanma elde edilmesinin sebebi PBA'nın hidrofobik olmasından kaynaklanmaktadır. Ortamda fazlaca görülen hidrofobik etkileşim ortama iyon eklenmesi durumunda kırılmaya uğramaktadır ve iyon etkisi ile bu özelliğini kaybetmektedir.

Sentezlenen nanopolimer ile gerçekleştirilen PBA bağlanma çalışmalarında ve pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonunun gerçekleştirildiği çalışmalarda başlangıç konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde PBA için nanopolimere maksimum bağlanma miktarı 498,16 mg/g polimer olarak bulunmuş olup; miktar, polimerin boyutu ve yüzey alanının genişliği göz önünde bulundurulduğunda oldukça yüksektir. Aynı şekilde DNA'nın pseudospesifik nanopolimere adsorpsiyon koşullarını optimize etmek için başlangıç konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde maksimum bağlanma miktarı 672,41 mg/g olarak bulunmuştur. Diğer DNA ile gerçekleştirilen ve polimerik yapıların kullanıldığı çalışmalara kıyasla izole edilen DNA miktarı oldukça fazladır ve bu sonuç polimerin yüzey alanının genişliği, boyutunun küçük olmasıyla ve diğer yöntemlere kıyasla daha spesifik bir bağlanma ile çalışmanın yürütülmesine bağlanmaktadır.

Sentezlenen nanopolimere PBA'nın bağlanma çalışmalarında zamanın etkisi incelendiğinde optimum süre 120 dk olarak bulundu ve bu deneme göz önünde bulundurularak daha sonra yapılan çalışmalarda karıştırma süresi 120 dk olarak karışırtmalar gerçekleştirildi.

DNA'nın desorbe edildiği deneme yüksek verimle gerçekleştirildi, ortama NaCl eklenmesiyle ortamın kimyasal yapısı değiştirilerek ortamdaki iyonik şiddet etkisi ile desorpsiyon gerçekleştirildi. Pseudospesifik nanopolimere DNA adsorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra adsorbe olan DNA miktarının % 96'sı desorbe edildi.

Tekrarlanabilirlik denemeleri dört döngü olacak şekilde gerçekleştirildi ve desorpsiyon koşulları ile adsorpsiyon koşulları birbirinden farklı pH'lara sahip olduğu için iki çalışmanın aralarında bir kez pseudospesifik nanopolimer yıkamaları gerçekleştirildi ve pseudospesifik nanopolimere DNA'nın tekrar adsorbe-desorbe olması sağlandı. 4. Döngü sonunda sentezlenen pseudospesifik nanopolimerin tekrar kullanılabilirliğinin olduğu görüldü ve ilk yapılan adsorpsiyon çalışması göz önünde bulundurulduğunda son döngü ile aralarında adsorpsiyon bakımından dikkate değer bir fark bulunmadığı belirlendi.

Sonuç olarak biyoyumlu bir materyal kullanılarak sentezlenen p(HEMA) nanopolimeri ile çalışmalarda ligand olarak kullanılan PBA kullanılarak DNA'ya spesifik, küçük boyutlu, yüzey alanı oldukça geniş olan birpolimerik malzeme elde edildi. Çalışma birçok yönü ile günümüz teknolojik koşullarını kullanımı ile yeni bir çalışmadır ve daha ileride yapılacak olan çalışmalara yardımcı olabilecek birçok özelliğe sahiptir. Örneğin çalışmalarda kullanılan polimerin biyoyumlu olması dolayısıyla vücut içinde kullanımlara izin vermektedir, boyutundan dolayı kan damarları içinden rahatlıkla geçebilmektedir ve yüzey alanının genişliği göz önünde bulundurulursa oldukça fazla miktarda DNA'yı spesifik bağlanmalarla izole edebilmektedir.



## 5. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akgöl, S., Öztürk, N., Karagözler, A.A., Uygun, D.A., Uygun, M., Denizli, A.,** 2008, A new metal-chelated beads for reversible use in uricaseadsorption, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1-2):36-41s.
- Denizli, A., Arıca, M. Y., Baran, T. ve Hasırcı, V.,** 1998, Dye Derived and Metal Incorporated Affinity Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Membranes for Use in Enzyme Immobilization, *Polymer International*, 46, 345-352s.
- Arimori, S., Ushiroda, S., Peter, L.M., Jenkins, A.T.A. and James, T.D.,** 2002, A modular electrochemical sensor for saccharides, *Chemical Communications*, 43:2368-2369p.
- Başaran, O. A.,** 2004, Small-Scale Free Surface Flows with Breakup: Drop Formation and Emerging Applications, *AIChE Journal*, 48, Lafayette, 16p.
- Baumbach, G.A., Lebing, W.R., Hammond, D.J., Wydick, J.E. And,** 2009, A Highly Purified Antithrombin Iıı Concentrate Prepared From Human Plasma Fraction Iv-1 By Affinity Chromatography, *Vox Sanguinis*, 67, Usa, 117p.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.,** 1979, A Rapid Alkaline Extraction Procedure For Screening Recombinant Plasmid DNA, *Nucl. Acid. Res.*, 7, 1513-23p.
- Biyomühendislik Klubü,** FTIR, <http://biyokure.org/fourier-transform-infrared-kizilotesi-spektroskopisi-ftir/5696> (Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2011).
- Bouriotis, V., Martinou, A., Kafetzopoulos, D.,** 1992, Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography, *Journal of Chromatography A*, 664(1), 35-41p.
- Bozkaya, Y.,** ‘‘Nanoteknoloji Ve Uygulamaları’’, <http://www.itab.anadolu.edu.tr/itab/pdf/nylp.pdf> /NANOTEKNOLOJI (2006) ( Erişim Tarihi: 5 Kasım 2011).
- Braun, P. V., Ajayan, P. M., Schadler, L. S.,** 2003, *Nanocomposite Science and Technology*, Kinetic Processes, 527p.
- Bueno, S.M.A., Legallais, C., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A.,** 1996, Experimental Kinetic Aspects of Hollow Fiber Membrane-Based

Pseudobioaffinity Filtration Process for IgG Separation from Human Plasma, *J. Membr. Sci.*, 117, 45–56p.

**Carlson, A., Signs, M., Liermann, L., Boor, R. And Jem, K.J.**, 2004, Primary Isolation Techniques And Integrated Process, *Biotechnology And Bioengineering*, 48, France, 303p.

**Chakka, V. M., Altuncevahir, B., Jin, Z. Q., Li, Y., Liu, J. P.**, 2006, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *J. Appl. Phys.*, 99p.

**Champe and Adams**, 2000, The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287, USA, 2185p.

**Cireli, A., Kutlu, B., Onar, N., Erkan, G.**, 2006, Tekstilde İleri Teknoloji ler, *Tekstil ve Mühendis*, 13(61)7-20s.

**Çıracı, S., Sevinçli, H., Topsakal, M. ve Durgun, E.**, 2008, Electronic and magnetic properties of 3d transition-metal atom adsorbed graphene and graphene nanoribbons, *Material Science*, Ankara, 254s.

**De Silva, A. P., Moody, T. S. and Wright, G. D.**, 2009, Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools, *The Royal Society of Chemistry*, 134, 2385–2393p.

**Denizli, A. ve Pişkin, E.**, 2001, Dye-ligand affinity systems, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 391-416s.

**Denizli, A., Pişkin, E., Dixit, V., Arthur, M., Gitnick, G.**, 1995, Collagen and fibronectin immobilization on PHEMA microcarriers for hepatocyte attachment, *Int. J. Artif. Organs*, 18, Ankara, 90s.

**Duarte, C.M. and Chiscano, C.L.**, 1999, Seagrass biomass and production: a reassessment, *Aquatic Botany*, 65, Spain, 159p.

**Edwards, C.J.**, 2007, Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs, *Proc. R. Soc. B*, 274, Dublin, 1377p.

**Evcin, A.**, Nanomalzemeler, <http://www2.aku.edu.tr/~evcin/nanomaterials/intro.pdf> ( 2010) ( Erişim tarihi: 15 Kasım 2011).

- Ferreira, H., Flaus, A., Rencurel, C., Wiechens, N. and Owen-Hughes, T.,** 2004, Sin mutations alter inherent nucleosome mobility, *EMBO Journal*, 23, 343-353p.
- Feynman,** 1959, 'Nanotechnology'; <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html> ( Erişim Tarihi: 10 Ekim 2011)
- Goy, A., Gericitano, J., Wright, J., MacGregor-Cortelli, B., Neylon, E., Gonen, M., Esseltine, D., Boral, A., Schenkein, D., Busam, K., Teruya-Feldstein, J., Sachs, D. and O'Connor, O.A.,** 2006, Drug-induced cutaneous vasculitis in patients with non-Hodgkin lymphoma treated with the novel proteasome inhibitor bortezomib: a possible surrogate marker of response?, *British Journal of Haematology*, 134(4), 391-398p.
- Hall, N., El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A., Wortman, J.R., Alsmark, U.C.M., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B. and Stuart, K.D.,** 2005, Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa, *Science*, 309(5733), 404-409p.
- Hantz, O., Seignerres, B., Pichoud, C., Ahmed, S. S., Trepo, C. and Zoulim, F.,** 2000, Evolution Of Hepatitis B Virus Polymerase Gene Sequence During Famciclovir Therapy For Chronic Hepatitis B, *J. Infect. Dis.*, 184, 122-123p.
- Harkins, W. D.,** 1947, Emulsion Polymerization, *J. Amer. Chem. Soc.*, 69, 1428p.
- Hjerten, S. and Li, J.,** 1990, High-speed DNA sequencing by using mixed poly (ethylene oxide) solutions in uncoated capillary columns, *J. Chromatogr.*, 510, 543p.

- Hoffman, J.E., Lang, K.M. and Madhavan, M.**, 2001, Imaging the granular structure of high-Tc superconductivity in underdoped  $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_{8+x}$ , *Nature*, USA, 2p.
- Hu, Y., Li, C., Gu, F. and Zhao, Y.**, 2007, Facile flame synthesis and photoluminescent properties of core/shell  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  nanoparticles, *Journal of Alloys and Compounds*, 432, China, L5.
- Huang, P.Y. And Carbonell, R.G.**, 2000, Affinity Chromatographic Screening Of Soluble Combinatorial Peptide Libraries, *Biotechnology And Bioengineering*, 63, North Carolina, 633p.
- Itoh, G., Tamura, J., Suzuki, M., Ito, K.**, 1995, DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis, *Am. J. Pathol.*, 146(6), Japan, 1325–1331p.
- James, T. D., Linnane, P. and Shinkai, S.**, 1996, Fluorescent saccharide receptors: a sweet solution to the design, assembly and evaluation of boronic acid derived PET sensors, *Chemical Communications*, 123, 76-79p.
- Jones, R.A.L., Howse, J.R. and Battaglia, G.**, 2009, Templated Formation Of Giant Polymer Vesicles With Controlled Size Distributions, *Nature Materials*, 8, Usa, 507p.
- Jungbauer, A., Tauer, C., Wenisch, E., Uhl, K., Brunner, J., Purtscher, M., Steindl, F., Buchacher, A.**, 2001, Isolation of isoproteins from monoclonal antibodies and recombinant proteins by chromatofocusing, *Journal of Chromatography A*, 512, Austria, 157p.
- Jungbauer, A., Voraue, K., Skias, M., Trkola, A. and Schulz, P.**, 1992, Scale-up of recombinant protein purification by hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 625(1), 33-39p.
- Keçili, R.**, 2006, Antipirin Bazlı Monolitik Kolon Geliştirilmesi Ve Penisilin Amidohidrolaz Enzimi Ayrılmasında Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, AÜ Kimya Anabilim Dalı, 78s (yayınlanmış).
- Keha, E. ve Kührevioğlu, İ.**, 2000, Temel Biyokimya, Şafak Yayınları, Ankara, 563s.

- Klabunde, C. N., Potosky, A.L., Legler, J.M. and Warren, J. L., 2000,** Development Of A Comorbidity Index Using Physician Claims Data, *Journal of Clinical Epidemiology*, 53, USA, 1258p.
- Koyama, T. and Takeuchi, K., 1996,** *J. Chromatogr. B*, 679, 931p.
- Kumar, B., Gupta, R., Garg, V.K. and Yadav, A.B., 2003,** Dye removal from aqueous solution by adsorption on treated sawdust, *Bioresource Technology*, 89, India, 121p.
- Larsson, H., Akerud, P., Nordling, K., Raub-Segall, E., Claesson-Welsh, L. and Björk, I., 2001,** A Novel Anti-angiogenic Form of Antithrombin with Retained Proteinase Binding Ability and Heparin Affinity, *The Journal of Biological Chemistry*, 276:11996-12002p.
- Lianbing, R., Zhen, L., Yunchun, L., Peng, D. and Hong-Yuan, C., 2009,** Ring-Opening Polymerization with Synergistic Co-monomers: Access to a Boronate-Functionalized Polymeric Monolith for the Specific Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules under Neutral Conditions, *Angewandte Chemie*, 121(36):6832-6835p.
- Liu, C., Tan, W., Zhang, D., Wang, Z., and Zhu, D., 2007,** 4-(N,N-Dimethylamine)benzotrile (DMABN) derivatives with boronic acid and boronate groups: new fluorescent sensors for saccharides and fluoride ion, *J. Mater. Chem.*, 17, 1964-1968p.
- Liu, F., Xiao, S., Rosen, A. E., Hainfeld, J.F., Seman, N.C., Musier-Forsyth, K. and Kiehl, R.A., 2002,** Selfassembly of metallic nanoparticle arrays by DNA scaffolding, *Journal of Nanoparticle Research*, 4, 313–317p.
- Liu, X.C., Hubbard, J.L. and Scouten, W.H., 1995,** Synthesis and structural investigation of two potential boronate affinity chromatography ligands catechol [2-diisopropylamino] carbonyl] phenylboronate and catechol [2-(diethylamino)carbonyl, 4-methyl] phenylboronate, *Journal of Organometallic Chemistry*, 493(1-2), 91-94p.
- Malvern, I.,** Zetasizer Nano Series User Manual, [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) (2004) (Erişim Tarihi: 11 Aralık 2011).

- Mamalis, A.G.**, 2006, Recent advances in nanotechnology, *Journal of Materials Processing Technology*, 181, Greece, 52p.
- Matsunaga, T., Yoza, B., Matsumoto, M.**, 2001, DNA extraction using modified bacterial magnetic particles, *Journal of biotechnology*, 39, 132-134p.
- McCarthy, L.C., Terrett, J., Davis, M.E., Knights, C.J., Smith, A.L., Critcher, R., Schmitt, K., Hudson, J., Spurr, N.K. and Goodfellow, P.N.**, 1997, A First-Generation Whole Genome–Radiation Hybrid Map Spanning the Mouse Genome, *Genome Res.*, 7, 1153-1161p.
- Mohapatra, S., Panda, N. and Pramanik, P.**, 2009, Boronic acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticle as a novel tool for adsorption of sugar, *material science and engineering*, 67:156-158p.
- Mosbach, K. and Haupt, K.**, 2000, Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, *Chem. Rev.*, 100, Sweden, 2495p.
- Murphy, C. J. and Jana, R. N.**, 2002, Controlling the Aspect Ratio of Inorganic Nanorods and Nanowires, *Advanced materials*, Columbia, 14p.
- Neoh, S. H., Gordon, C., Potter, A. and Zola, H.**, 1986, The Purification Of Mouse Monoclonal Antibodies From Ascites Fluid, *J. Immunol Meth*, 91, 231-235p.
- Odabaşı, M. ve Denizli, A.**, 2001, Polyhydroxyethylmethacrylate-based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma, *Journal of Chromatography B*, 760, Ankara, 137-148s.
- Odabaşı, M., Özkayar, N., Özkara, S., Ünal, S. ve Denizli, A.**, 2005, Pathogenic antibody removal using magnetically stabilized fluidized bed, *Journal of Chromatography B*, 826, Ankara, 50s.
- Odde, D.J.**, 1997, Estimation of the diffusion-limited rate of microtubule assembly, *Biophysical Journal*, 73, USA, 88p.
- Odian, G.G.**, 2008, Principles of polymerization, *Science*, 322, NewYork, 104p.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N.**, 2006, Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(3), 159-163s.

- Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E. ve Denizli, A., 2011,** Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, *Int J Biol Macromol.*, 48, 577- 82s.
- Perez. P. And Batten. D.F., 2006,** Human Ecology, *National Library of Australia*, 323p.
- Portmann, B., Vergani, D., Alberti, A., Vergani, G. M., Mondelli, M., 1982,** Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes, *The Journal of Immunology*, 129 (6), 2773-2778p.
- Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M., Monteiro, G.A., Cabral, J.M.S., 2000,** Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications, *Trends in Biotechnology*, 18(9):380-388p.
- Ramamurthy, B., Data, D., Feng, H., Heritage, J.P. and Mukherjee, B., 1999,** Impact of Transmission Impairments on the Teletraffic Performance of Wavelength-Routed Optical Networks, *Journal of Lightwave Technology*, 17(10):1713p.
- Ramsden, D., Boer, G.J. and Flato, G., 1999,** A transient climate change simulation with greenhouse gas and aerosol forcing, *Climate Dynamics*, 16, Canada, 427p.
- Ravanat, J.L., Cadet, J., Douki, T. and Gasparutto, T., 2003,** Radiation-induced damage to cellular DNA: measurement and biological role, *Radiation Physics and Chemistry*, 72, France, 293p.
- Singhal, S.K., Srivastava, A.K., Pant, R.P., Halder, S.K., Singh, B.P. and Gupta, A.K., 2002,** Synthesis of boron nitride nanotubes employing mechanochemical process and its characterization, *Journal of Materials Science*, 43(15): 5243-5250p.
- Smith, W. V. and Ewart, R. H., 1948,** Emulsion Polymerization, *J. Chem. Phys.*, 16, 592p.
- Springsteen, G., Yang, W. , Yan, J., Deeter, S. , Wang, B., 2003,** A novel type of fluorescent boronic acid that shows large fluorescence intensity changes upon binding with a carbohydrate in aqueous solution at physiological pH, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(6):1019-1022p.

- Sun, S., Murray, C.B., Weller, D., Folks, L. and Moser, A., 2000,** Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices, *Science*, 287, New York, 1989p.
- Şenel S., Çamlı S.T. and Tuncel A., 2002,** Nucleotide isolation by boronic acid functionalized hydrophilic supports, *Physicochemical and Engineering Aspects*, 207, Ankara, 127-137s.
- Şenel S., Elmas B. and Tuncel A., 2007,** A new thermosensitive fluorescent probe for diol sensing: Poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylphenylboronic acid)-alizarin red S complex, *Reactive and Functional Polymers*, 67, Ankara, 87-96s.
- Şenel S., Elmas B., Onur M. A. and Tuncel A., 2004,** Thermosensitive N-isopropylacrylamide-vinylphenyl boronic acid copolymer latex particles for nucleotide isolation, *Physicochemical and Engineering Aspects*, 232, Ankara, 253-259s.
- Şenel, S., 2003,** Boronic acid carrying (2-hydroxyethylmethacrylate)-based membranes for isolation of RNA, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 219:17-23s.
- Şenel, S., Elmas, B., Onur, M.A. and Tuncel, A., 2002,** Temperature controlled RNA isolation by N-isopropylacrylamide-vinylphenyl boronic acid copolymer latex, *Colloid Polym Sci*, 280:1137-1146s.
- Şeyda, A., 2006,** Nanoteknoloji ve Tekstilde Uygulama Alanları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, 163s (yayınlanmıştır).
- Tuncel, A., Ünsal, E. ve Çiçek, H., 2000,** pH-sensitive uniform gel beads for DNA adsorption, *Journal of Applied Polymer Science*, 77(14), 3154-3161s.
- Uygun, D. A., 2008,** Protein Saflaştırılması İçin Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu, Doktora tezi, ADÜ Kimya Anabilim Dalı, 170s (yayınlanmıştır).
- Ünsal, E., Bahar, T., Tuncel, M. ve Tuncel, A., 2000,** DNA adsorption onto polyethylenimine-attached poly(*p*-chloromethylstyrene) beads, *Journal of Chromatography A*, 898, 167-177s.
- Üreyen, M.E., 2006,** Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları, *Gemsan Teknik Ve Uygulamaları.pdf* (2006) (Erişim Tarihi: 10 Ekim 2011).

- Wang, B. and Springsteen, G.**, 2002, A detailed examination of boronic acid–diol complexation, *Tetrahedron*, 58(26):5291-5300p.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B. and Malter, J.S.**, 2005, RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light, *Oncogene*, 24:502-511p.
- Wichterle, O. and Lím, D.**, 1960, Hydrophilic Gels For Biological Use, *Letters To Nature*, 185, Prague,117p.
- Wikipedia.**, 2011, DNA, <http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA> (Erişim Tarihi: 17 Mart 2011).
- Wilson, M.A., Behr, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S. and Small, P.M.**, 1999, Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray, *Science*, 284(5419):1520-1523p.
- Winblade, N.D., Hoffman, A.S., Nikolic, I.D. and Hubbell, J.A.**, 2000, Blocking Adhesion to Cell and Tissue Surfaces by the Chemisorption of a Poly-L-lysine-graft-(poly(ethylene glycol); phenylboronic acid) Copolymer|, *American Chemical Society*, 231:124-145p.
- Yan, J., Springsteen, G., Deeter, S. and Wang, B.**, 2004, The relationship among pKa, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols — it is not as simple as it appears, *Tetrahedron*, 35:102-103p.
- Yang, W., Byun, Y., Yan, J., Al-Madhoun, A.S., Johnsamuel, J., Barth, R.F., Eriksson, S., Tjarks, W.**, 2004, The synthesis and biochemical evaluation of thymidine analogues substituted with nido carborane at the N-3 position, *Radiation and Isotopes*, 61(5), 1125-1130p.



## 6.ÖZGEÇMİŞ

Ad : Ceren

Soyad : TÜRKCAN

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 03.10.1987

Adres : Kazım Dirik Mah. Kurtuluş Cad. No:77 Çakır Apt. Kat:5 Daire:9 Bornova/İZMİR

e-posta adresi : cerenturkcan87@gmail.com

Cep Telefonu : 0505 663 32 61

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Atatürk Lisesi (Süper Lise-Amasya) (2001-2002)

Ziya Gökalp Lisesi (Süper Lise-Diyarbakır) (2002-2004)

Çok Programlı Lise (Isparta Senirkent) (2004-2005)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2006-2010)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (2011-2012)

