

**MANYETİK VE MANYETİK OLMAYAN SİLİKA BAZLI
SABİT FAZLAR KULLANAN DNA MİKROEKSTRAKSİYON
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF DNA MICROEXTRACTION SYSTEMS
USING MAGNETIC AND BARE SILICA BASED
STATIONARY PHASES**

SEVİM EDA ÖĞÜT

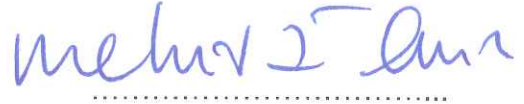
PROF. DR. S. ALİ TUNCEL
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

SEVİM EDA ÖĞÜT' ün hazırladığı “**Manyetik ve Manyetik Olmayan Silika Bazlı Sabit Fazlar Kullanan DNA Mikroekstraksiyon Sistemlerinin Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Başkan



Prof. Dr. S. Ali TUNCEL
Danışman



Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ
Üye



Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN
Üye



Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 01/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

01/06/2017



Sevim Eda ÖĞÜT



DESTEKLERİNİ ESİRGEMEYEN AİLEM'E...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/06/2017

SEVİM EDA ÖĞÜT

ÖZET

MANYETİK VE MANYETİK OLMAYAN SİLİKA BAZLI SABİT FAZLAR KULLANAN DNA MİKROEKSTRAKSİYON SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sevim Eda ÖĞÜT

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali Tuncel

Haziran 2017, 71 sayfa

Monodispers gözenekli silika mikroküreler ve manyetik formları, yeni geliştirilen “aşamalı kalıp hidroliz ve kondenzasyon protokolü” ile sentezlenmiştir. Sorbent olarak manyetik silika mikroküreler ve silika mikroküreler ile sırasıyla kesikli sistemde ve sürekli mikroekstraksiyon sisteminde tam-kandan insan genomik DNA izolasyon kapasitesi incelenmiştir. Mikrokürelerin gözenek boyutu dağılımı ve özgül yüzey alanı nitrojen adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Mikroküre boyutu ile boyut dağılımı ve manyetik davranış ile kristal yapı ise sırasıyla taramalı elektron mikroskopu, titreşimli örnek manyetometresi ve X ışını difraktometresiyle incelenmiştir. Öncelikle, sorbent olarak manyetik silika mikrokürelerin kullanılmasıyla kesikli sistemde insan genomik DNA izolasyonu için koşullar optimize edilmiştir. Ardından manyetik olmayan silika mikroküreler, 300 µm iç çap ve 40 mm uzunluğa sahip kaynaşık silika kapiler kolon içerisine dolgulanmıştır. Mikrokolon, sürekli mikroekstraksiyon sisteminde insan tam-kandan genomik DNA izolasyonu açısından değerlendirilmiştir. Lizat/adsorpsiyon tampon oranının etkisi, DNA izolasyonundaki örnek miktarının verimi ve izole edilen DNA miktarı, üretilmiş olan mikroekstraksiyon sisteminde tespit edilmiştir. Her iki sistemin de kullanılmasıyla tam-kandan edinilen insan genomik DNA

örnekleri, zincirleme polimeraz reaksiyonuyla çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezinde koşturulmuştur. Sonuçlar manyetik silika mikrokürelerinde, silika mikrokürelerin de sırasıyla kesikli sistem ve sürekli mikroekstraksiyon sisteminde insan kanından insan genomik DNA izolasyonu için umut verici birer alternatif sorbent olduklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: tam-kan örneği, DNA izolasyonu, mikroküre, monodispers silika, manyetik silika, mikroekstraksiyon.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DNA MICROEXTRACTION SYSTEMS USING MAGNETIC AND BARE SILICA BASED STATIONARY PHASES

Sevim Eda ÖĞÜT

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. S. Ali Tuncel

June 2017, 71 pages

Monodisperse-porous silica microspheres and their magnetic form were synthesized by a newly developed "staged shape templated hydrolysis and condensation protocol". The human genomic DNA isolation capacity from whole blood was analyzed with magnetic silica microspheres and bare silica microspheres as the sorbents in batch fashion and in a continuous microextraction system, respectively. The pore size distribution and the specific surface area of microspheres were determined by nitrogen adsorption/desorption method. The microsphere size and the size distribution, the magnetic behaviour and the crystal structure were analyzed by scanning electron microscope, vibrating sample magnetometer and X-ray diffractometer, respectively. First, the conditions were optimized for human genomic DNA isolation in batch fashion by using magnetic silica microspheres as the sorbent. Next, the bare silica microspheres were packed into a fused-silica capillary with 300 µm i.d. and 40 mm in length. The microcolumn was evaluated for the isolation of genomic DNA from human whole blood via continuous microextraction. The effects of lysate/adsorption buffer ratio and the sample volume on the DNA isolation yield and the amount of DNA isolated were determined in the microextraction system fabricated. Human genomic DNA samples acquired from whole blood by using both systems, were reproduced by

polymerase chain reaction and then run on agarose gel electrophoresis. The results indicated that both the magnetic silica microspheres and the bare silica microspheres are promising alternative sorbents for human genomic DNA isolation from human blood in batch fashion and continuous microextraction, respectively.

Keywords: Whole blood sample, DNA isolation, microsphere, monodisperse silica, magnetic silica, microextraction.



TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca; bilgisine sonsuz güvendiğim, bütün çalışma sürecim boyunca arkamda durduğuna inandığım, engin tecrübelerini benimle paylaşan ve bu süreçte beni her zaman doğru yönlendiren değerli bilim insanı danışman hocam Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e sonsuz minnetlerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

213S140 nolu ‘‘Polimerik Formda Mikro Akışkanlar Dinamiği Tabanlı Nükleik Asit Mikro-Ekstraksiyon Platformu Geliştirilmesi’’ adlı ve 115M615 nolu ‘‘Fonksiyonel Gruplu Formda Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi ve Biyoteknolojik Uygulama Performanslarının Belirlenmesi’’ adlı proje kapsamında beni destekleyen ve çalışmam boyunca bana burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getirirken hiçbir beklentisi olmayan, zor zamanlarımda yanımda olduklarını bildiğim, koşullar ne olursa olsun her zaman beni destekleyeceklerine inandığım, sevgilerini hep hissetmek isteyeceğim annem Dilek Ögüt'e ve babam Şakir Ögüt'e teşekkürlerin en büyüğünü borçluyum. Bir tanecik abim Cihan Ögüt'e bütün kahrımı çektiği ve her zaman yanımda olduğunu gösterdiği için, bir tanecik küçük kız kardeşim Merve Ögüt'e bir kardeşten öte her zaman bir sırdaş, arkadaş olduğu, her derdimde sanki o ablaymış gibi beni telkin ettiği için tüm kalbimle teşekkür ederim. Ailemize çok sonradan katılan fakat ailemizin bir parçası olan, bütün çıkmazlarımda yol göstermeye çalışan güzel yürekli bir tanecik yengem Betül Ögüt'e, beni bir kardeş gibi sahiplendiği için teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca bana sonsuz sabır gösteren, sevgisini, güzel kalbini ve tüm bildiklerini sunan, yalnızca bir hoca değil aynı zamanda çok iyi bir dost olan, bilgisine ve azmine gıptayla baktığım canım hocam Çiğdem Kip'e; tüm bilgilerini, sevgilerini, özverilerini gösteren diğer hocalarım Özlem Hamaloğlu'na ve Aslıhan Gökaltun'a; her sorunuma çözüm arayan, bilgisine çok güvendiğim ve bana her zaman destek veren hocam Kourosh Salimi'ye; telefonunun susmadığı, sürekli bir sorunu olan ☺ ama kalbinin iyiliğine inandığım Duygu Deniz Usta'ya; laboratuvarımıza sonradan katılan ve buna rağmen birçok anı paylaştığım güzel arkadaşım Ege Ediz'e; akademik anlamda bana yardımda bulunan ve destek veren sevgili laboratuvar arkadaşlarıma;

Zorlu süreçlerden geçerken varlığı olmasaydı ne yapardım diye düşündüğüm, iyi günümde, kötü günümde hep yanımda olan, bütün bu süreci birebir benimle yaşayan, paylaşan ve tabir-i caizse çeken, beraber dopdolu bir çalışma süreci geçirdiğim ve ömrümün sonuna kadar hayatımda olmasını istediğim güzel yürekli çalışma arkadaşım Gülçin Günel Karataş'a; bütün suratsızlığıma rağmen beni seven, sevmeyi başarabilen, her kahrımı her sıkıntıyı senelerdir çeken, hayatımda çok önemli yeri olan ve varlığıyla mutlu olduğum, bir telefonumla imdadıma yetişen, çok güzel anılar paylaştığım ve her zaman paylaşmak istediğim dostum Altay Koyaş'a; son 3 senedir sevgisini, özverisini, güzel kalbini benden hiç esirgemeyen, beni her halimle seven, sahiplenen, destekleyen, her koşulda yanımda olmaya çalışan, çok nemrut olduğum anlarda bile beni güldürmek için yırtınan, sushilerin kralı canımın içi oda arkadaşım Pelin Deniz'e; çooooook uzaklardan bana her an desteklerini, sevgilerini hissettiren, iyi ki hayatımdalar dediğim eski oda arkadaşlarım Elvin Hancı'ya ve Açıyla Ceylan Elmas'a; liseden beri yanımda olan, olmaya çalışan, birçok anı paylaştığım canım arkadaşım Cansu Sevik'e; beni bu yolda yalnız bırakmayan ve birlikte olmaktan çok keyif aldığım arkadaşlarım Aykut Bilir'e, Ebru Tamahkar'a, Gözde Güçlü'ye; her sıkıntıma koşan, adeta bir anne gibi beni sahiplenen, sevgisini hiç esirgmeden gösteren bir tanem, canım bölüm sekreterimiz Hatice Ablama; kahve vermenin ötesinde, güzel kalbini de bana açan canım Serpil Ablama;

Her ne kadar geç tanışmış olsakda, gözümde çok farklı bir değere sahip olan, bana tüm kalbiyle inanan, güvenen, arkamda duran, beni olduğum gibi kabul eden ve ‘‘varlığın yeter’’ diyebilen, varlığı ile birçok şeyin çözülmesini sağlayan, sevgisini benden hiç sakınmadan paylaşan, gelecekte hep var olmasını dilediğim yegâne insanlar statüsüne çok kısa sürede ulaşabilen, hayatıma anlam katan Utku Tanrıvere'ye;

TÜM KALBİMLE TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tam Kan Yapısı.....	3
2.1.1. Kanın Plazma Yapısı	4
2.1.2. Kan Hücreleri.....	4
2.2. DNA'nın Yapısı	6
2.3. Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu	9
2.3.1. Çözelti Bazlı DNA Ekstraksiyon Metodları	9
2.3.1.1. Organik Çözücüler Aracılığıyla DNA Ekstraksiyonu	10
2.3.1.2. Salting-out (Tuzla Çökelme) Yöntemi ile DNA Ekstraksiyonu.....	11
2.3.2. Katı-Fazlı DNA Ekstraksiyon Metodları.....	11
2.3.2.1. Anyon Değiştirici Reçine Bazlı DNA Ekstraksiyonu	12
2.3.2.2. Silika Matriks Bazlı DNA Ekstraksiyon Metodları	13
2.3.2.3. Manyetik Partiküller Aracılığıyla DNA Ekstraksiyonu	13
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonunda Kullanılacak Sorbentlerin Sentezi	15
3.1.1. Materyal.....	15
3.1.2. Çıkış Lateksi Olarak Kullanılacak Poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi.....	16
3.1.3. Kalıp Materyal Olarak Kullanılacak Monodispers-Gözenekli Formda Polimerik Mikrokürelerin Sentezi	17
3.1.4. Kalıp Materyal Kullanılarak Monodispers-Gözenekli Silika Mikroküre Eldesi	18

3.1.5. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi	19
3.2. Silika Bazlı Mikrokürelerin Karakterizasyonu	20
3.2.1. Gözenek Boyutu ve Özgül Yüzey Alanı Tayini	20
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	21
3.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometresi	22
3.2.4. X-Işınları Spektroskopisi	22
3.3. İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu	22
3.3.1. Materyal	22
3.3.2. Kesikli Sistemde DNA İzolasyon Çalışmaları	23
3.3.2.1. Kesikli Sistem Özellikleri	23
3.3.2.2. Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA İzolasyonu	23
3.3.2.3. Kesikli Sistemde İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu	25
3.3.3. Tek Beslemeli Sistemde Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyon Çalışmaları	26
3.3.3.1. Tek Beslemeli Sistemin Kurulumu ve Özellikleri	26
3.3.3.2. Silika Kapiler Kolonların Monodispers-Gözenekli Formdaki Silika Mikroküreler İle Dolgulanması	27
3.3.3.3. Tek Beslemeli Sistemde İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu ..	28
3.4. İnsan Tam-Kan Örneğinden İzole Edilen DNA'nın Tanımlanması	31
3.4.1. PCR ve Yatay Elektroforez	31
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	33
4.1. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers Silika Mikrokürelerin Sentezi	33
4.1.1. Çıkış Lateksi Olarak Kullanılan Monodispers-Gözenekli Formda Polimerik Mikrokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu	35
4.1.2. Monodispers-Gözenekli Polimerik Mikrokürelerin Manyetizasyonu	36
4.1.3. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika (Mag-SiO ₂) ve Silika Katmanı Kaplı Silika (SiO ₂ @Mag-SiO ₂) Mikrokürelerin Sentezi	37
4.2. Tek Beslemeli Sistemde Kullanılan Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu	42
4.3. Kesikli Sistem ile İnsan Genomik DNA İzolasyonu	43
4.4. Kesikli Sistem ile İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu	51
4.5. Tek Beslemeli Sistem İle İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu	55

4.6. İnsan Tam-Kan Örneğinden İzole Edilen Genomik DNA'nın Karakterizasyonu	60
4.6.1. Kesikli Sistem ile İzole Edilen DNA'nın Karakterizasyonu	60
4.6.2. Tek Beslemeli Sistem ile İzole Edilen DNA'nın Karakterizasyonu	61
5. GENEL SONUÇLAR	63
KAYNAKLAR.....	65



ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 3.1 PCR'da kullanılan bileşenler.....	32
Çizelge 3.2 PCR döngü koşulları.....	32
Çizelge 4.1. Manyetik silika bazlı mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı ve özgül yüzey alanı değerleri.....	40
Çizelge 4.2. Literatürde tam-kan'dan DNA izolasyonu yapabilen mikroekstraksiyon sistemlerinin performansları	58



ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Tam-kan yapısı	3
Şekil 2.2. Kan hücreleri	4
Şekil 2.3. Nükleotidlerin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. DNA'da baz eşleşmesi.....	8
Şekil 3.1. Mikroküre sentezinde kullanılan monomer (A) metakrilik asit (MAA) ve çapraz bağlayıcı (B) etilen dimetakrilat (EDMA)	18
Şekil 3.2. Monodispers silika mikrokürelerin sentez şeması.....	19
Şekil 3.3. Tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminin fotoğrafı	27
Şekil 4.1. Manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikroküre sentezinin şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.2. Çıkış lateksi olarak kullanılan monodispers-gözenekli formdaki poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 2500X, (B) 16000X ve (C) 30000X.....	35
Şekil 4.3. Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli formdaki poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 16000X ve (C) 30000X.....	36
Şekil 4.4. Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika (Mag-SiO ₂) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 8000X ve (C) 16000X. 37	
Şekil 4.5. Manyetik özelliğe sahip silika katmanı kaplı monodispers silika (SiO ₂ @Mag-SiO ₂) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 18000X ve (C) 17000X.....	38
Şekil 4.6. Mag-SiO ₂ ve SiO ₂ @Mag-SiO ₂ mikrokürelerin azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrisi. A) Mag-SiO ₂ ve B) SiO ₂ @Mag-SiO ₂	39
Şekil 4.7. Manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikrokürelerin titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri. A) Mag-SiO ₂ , B) SiO ₂ @Mag-SiO ₂	40
Şekil 4.8. Manyetik özelliğe sahip sorbentlerin X-ışınları kırınım spektrumu. A) Poli(MAA-co-EDMA), B) Manyetik Poli(MAA-co-EDMA), C) Mag-SiO ₂ , D) SiO ₂ @Mag-SiO ₂	41

Şekil 4.9. Sentezlenen monodispers silika mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı, yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 1000X, (B) 2000X, (C) 4000X, (D) 16000X, (E) 30000X, (F) 35000X.	42
Şekil 4.10. Monodispers-gözenekli silika mikroküreler için azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemiyle elde edilen gözenek dağılım eğrisi. Burada V gözenek hacmi, d ise gözenek çapını göstermektedir.	43
Şekil 4.11. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO ₂ ve SiO ₂ @Mag-SiO ₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen denge DNA adsorpsiyonu değerleri. Sorbent derişimi: 10 mg/ml, DNA derişimi: 400 ng/µl, adsorpsiyon ortamı hacmi: 1 ml, adsorpsiyon koşulları 2 saat, 100 cpm/dak. desorpsiyon hacmi: 1 ml, desorpsiyon süresi: 1 saat, 100 cpm/dak.	45
Şekil 4.12. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO ₂ ve SiO ₂ @Mag-SiO ₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen desorpsiyon verimi değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.	46
Şekil 4.13. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO ₂ ve SiO ₂ @Mag-SiO ₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen izolasyon verimi değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.	46
Şekil 4.14. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO ₂ ve SiO ₂ @Mag-SiO ₂ sorbentleri kullanılarak izole edilen DNA miktarı değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.	47
Şekil 4.15. Kesikli sistemde DNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin karşılaştırılması.	48
Şekil 4.16. Kesikli sistemde denge DNA adsorpsiyonunun DNA başlangıç derişimi ile değişimi.	49
Şekil 4.17. Kesikli sistemde hgDNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin adsorpsiyon ortamındaki hgDNA derişimi ile değişimi.	50
Şekil 4.18. Kesikli sistemde hgDNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin sorbent derişimi ile değişimi.	51
Şekil 4.19. Kesikli sistemde manyetik silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla insan tam-kan örneğinden hgDNA izolasyonunda izolasyon veriminin sorbent derişimi ile değişimi. Alkol yıkaması sonrasında sorbentin adsorpsiyon ortamı ile etkileştirildiği (●) ve etkileştirilmediği (■) durumda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.	54

Şekil 4.20. Kesikli sistemde manyetik silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla insan tam-kan örneğinden hgDNA izolasyonunda desorplanan DNA miktarının sorbent derişimi ile değişimi. Alkol yıkaması sonrasında sorbentin adsorpsiyon ortamı ile etkileştirildiği (●) ve etkileştirilmediği (■) durumda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.	55
Şekil 4.21. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistemde DNA izolasyonu için farklı mikroekstraksiyon koşulları ile sisteme yüklenen DNA miktarları.	56
Şekil 4.22. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistem ile DNA izolasyonu için izolasyon veriminin mikroekstraksiyon koşulları ile değişimi.....	57
Şekil 4.23. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistem ile DNA izolasyonu için izole edilen (desorplanan) DNA miktarının mikroekstraksiyon koşulları ile değişimi.	57
Şekil 4.24. Kesikli sistemde tam-kan örneğinden izole edilen ve insan ticari genomik DNA'sının PCR ile çoğaltılmış agaroz jel (yatay) elektroforez görüntüleri. L: 100 bp DNA Ladder, (A): İnsan tam kandan elde edilen DNA, (B): İnsan ticari genomik DNA, (-) Kont: Negatif kontrol	61
Şekil 4.25. Tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminde farklı lizat/adsorpsiyon tamponu oranları ile elde edilen ve PCR ile çoğaltılan DNA örneklerin agaroz jel (yatay) elektroforez görüntüleri. 1. 1 kb DNA Ladder, 2. Pozitif kontrol (insan genomik DNA'sı-Sigma-Aldrich, D7011), 3. Tam-kan örneğinden 1/2 lizat/adsorpsiyon tamponu oranı ile tek beslemeli mikro-ekstraksiyon sisteminde izole edilerek, PCR ile çoğaltılan DNA örneği (örnek hacmi: 120 µl), 4. Tam-kan örneğinden 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu oranı ile tek beslemeli mikro-ekstraksiyon sisteminde izole edilerek, PCR ile çoğaltılan DNA örneği (örnek hacmi: 120 µl), 5. Negatif kontrol (distile su).	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

Å	Angstrom
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
cpm	Dakikadaki çalkalama hızı (Circulation per minute)
W	Watt
rpm	Dakikadaki dönme hızı (Rate per minute)
D _n	Sayıcı ortalama çap değeri
N _i	D _i çap değerine sahip partiküllerin sayısı
D _i	Partikül çap değeri
CV	Boy dağılımı için değişim katsayısı
N _T	Toplam partikül sayısı
Q _{DNA}	Denge DNA adsorpsiyonu
C _o	Adsorpsiyon ortamında DNA başlangıç derişimi (ng DNA/µl ortam)
C _f	Adsorpsiyon ortamında DNA sonuç derişimi (ng DNA/µl ortam)
M _s	Adsorpsiyon ortamındaki sorbent miktarını (mg sorbent)
τ	DNA izolasyon verimi (%)
η	DNA desorpsiyon verimi (%)
V _D	Desorpsiyon ortamı hacmi (µl ortam)
n	Desorpsiyon boyunca alınan örnek sayısı
M _{DNA}	DNA miktarı (ng)
Q	Adsorpsiyon ortamı akış hızı (µL/dak)
t	Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)
V _A	Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (µL)
C _A	Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin DNA derişimi (ng/µL)

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
TE	Tris-EDTA
SLS	Sodyum lauril sülfat
GMA	Glisidil metakrilat
MAA	Metakrilik asit
EDMA	Etilen dimetakrilat
TEOS	Tetraetoksisilan
TBAI	Tetrabutylamonyum iyodat
Iso-PrOH	İzopropanol
CTAB	Asetiltrimetilamonyum bromür
PVP K-30	Poli(vinil pirolidon)
PVA	Poli(vinil alkol)
EB	Etil benzen
Et-OH	Etanol
THF	Tetrahidrofuran
AIBN	2,2'-azobisisobütironitril
BPO	Benzoil peroksit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
Gu-HCl	Guanidyum hidroklorür
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
APTES	3-aminopropiltrietoksilan
PMMA	Polimetilmetakrilat
PDMS	Polidimetilsiloksan
MES	Morfolinoetansulfonik asit

1. GİRİŞ

Kan, insanlar ve diğer canlılar için önemli olan besin maddelerinin ve oksijenin taşınımını, bunun yanında metabolik atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan hayati bir sıvıdır. Kan, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi çok sayıda biyolojik örneğin analizini yapılabilmek için, hızlı ve verimliliği yüksek DNA izolasyon metodlarının uygulanması önemli bir yer taşımaktadır.

Biyolojik örneklerden DNA izolasyonu, moleküler tanı yöntemlerinin uygulanabilirliği açısından gerekli olan ilk aşamadır. Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler tekniklerin kullanılmasından bu yana DNA izolasyonu için pek çok metod geliştirilmiştir. En yaygın ve geleneksel olarak kullanılan metodlar içerisinde fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu bulunmaktadır. Ancak bu metodlarda kullanılan toksik maddeler (fenol) sağlık açısından zararlıdır ve inkübasyon basamakları çok uzun sürmektedir [1-3]. Geliştirilen metodlardan bir diğeri silika bazlı çözünmez partiküllerin kullanımını kapsar ve bu partiküller proteinler ile reaksiyona girerek DNA'nın saflaştırılmasına olanak sağlarlar [4]. Biyolojik kaynak olarak kanın kullanıldığı ilk metod anyon değiştirici reçine kullanılan DNA ekstraksiyonudur. Bu metod, Walsh ve arkadaşları tarafından 1991'de tanımlanmıştır ve tam-kandan nükleik asit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için geliştirilen diğer metodlarda bu yaklaşım baz alınmıştır [5]. DNA ekstraksiyon metodları içerisinde yaygın olarak kullanılan katı-fazlı ekstraksiyon sistemleridir. Burada anyon değiştirici reçineler, silika/silika matriks içeren materyaller ve manyetik partiküller önemli rol oynamaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda ilk olarak monodispers-gözenekli forma sahip polimerik mikroküreler laboratuvarımızda geliştirilmiş olan "çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu" ile elde edilmiştir. Polimerik mikrokürelerin çıkış materyali olarak kullanımıyla, DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, manyetik ve normal formda silika bazlı sorbentler "çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi" ile sentezlenmiştir. Çalışmanın amacı; insan tam-kan örneğinden DNA izolasyonunu yüksek verimle gerçekleştirebilecek bir sistem ve sorbentin geliştirilmesidir. İki farklı sistem içeren tez çalışmasında, kesikli sistemde manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli formdaki silika mikroküreler, tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminde ise monodispers-gözenekli forma sahip

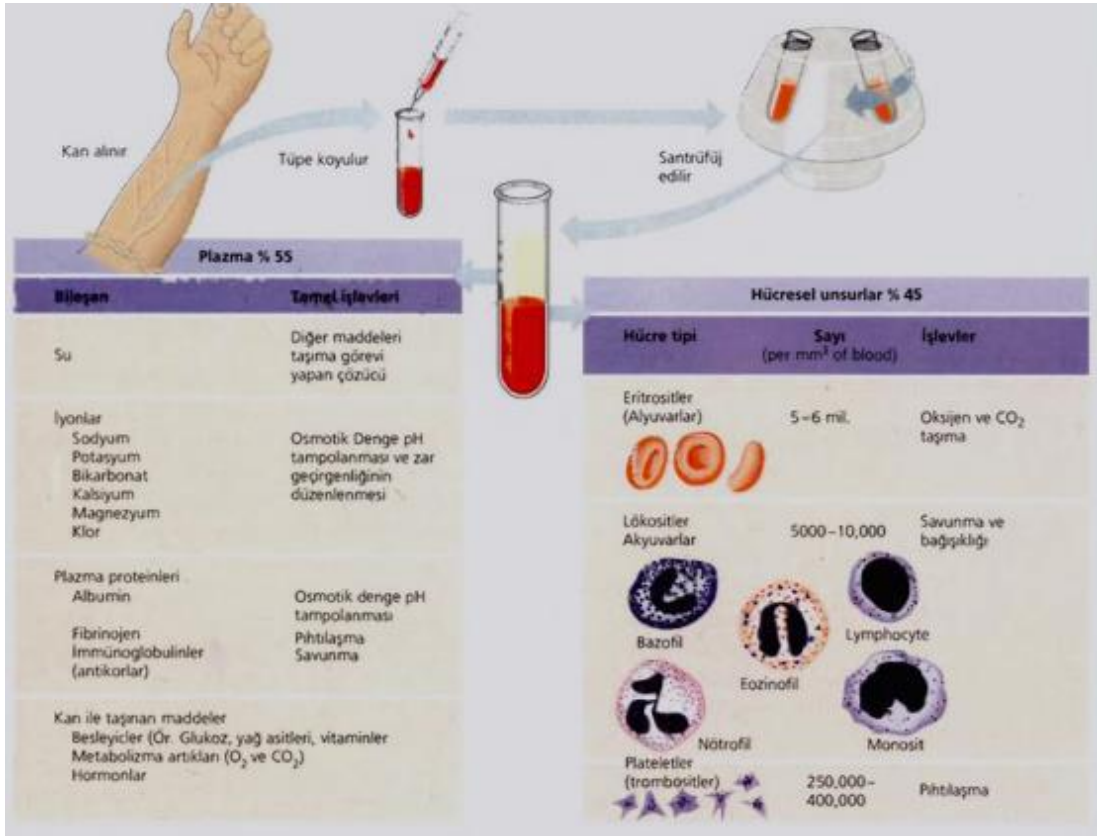
silika mikroküreler kullanılmış ve bu sistemlerin tam-kan örneğinden DNA izolasyon performansının belirlenmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tam Kan Yapısı

Kan, plazma adı verilen sıvının içerisinde bulunan, farklı tipte hücrelerin mevcut olduğu bir dokudur. Kan doku esas olarak iki tip yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki kanın içerisinde bulunan hücrelerin asılı olduğu kan plazması, diğeri ise plazmada dağınık halde bulunan kan hücreleridir. Şekil 2.1’de tam-kan yapısının içeriği verilmektedir [6].



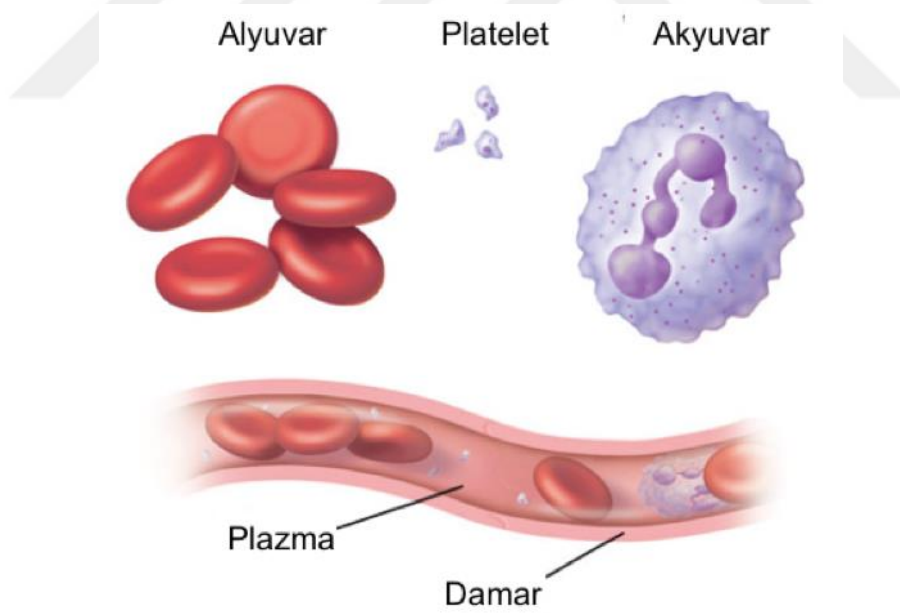
Şekil 2.1. Tam-kan yapısı [6].

2.1.1. Kanın Plazma Yapısı

Kan plazma içeriğinin %90'ı sudan oluşmaktadır. Bunun yanı sıra içerisinde kan elektrolitleri olarak bilinen ve çözülmüş halde bulunan inorganik tuzlar, çözülmüş ve çözünmemiş halde bulunan plazma proteinleri mevcuttur. Kan plazması içerisinde vücudun bir bölümünden diğerine taşınan, besin maddeleri, metabolik atıklar, solunum gazları ve hormonlar gibi çok sayıda madde de bulunmaktadır [6].

2.1.2. Kan Hücreleri

Kan, kemik iliğinden köken almış hayati bir sıvıdır [7]. Kan plazması içerisinde asılı halde bulunmakta olan iki tip hücre vardır, bunlardan ilki oksijen ve karbondioksit taşınımını sağlayan alyuvarlar (eritrositler) diğeri ise savunma işlevi gören akyuvarlardır (lökositler). Bunun dışında, üçüncü kan hücresi elemanı olan plateletler (trombositler) ise kanın pıhtılaşmasında rol oynamaktadır [6]. Kan hücreleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir [7, 8].



Şekil 2.2. Kan hücreleri [9].

Alyuvarlar, kan hücresi içerisinde sayıları en fazla olan elemanlardır. Bu hücrelerin esas görevleri oksijen ve karbondioksitin taşınımıdır. Alyuvarlarda çekirdek bulunmaz. Bunun sebebi ise demirli bir protein olan hemoglobini daha fazla miktarda taşıyabilmek içindir. Bunun dışında alyuvarlar mitokondri de içermedikleri için ATP sentezini yalnızca anaerobik metabolizma ile gerçekleştirirler.

Plateletler, yaklaşık olarak 2-3 µm çapında bulunan hücrelerdir. Bu hücrelerde de aynı alyuvarlarda olduğu gibi çekirdek bulunmaz ve bu hücre parçacıkları, büyük hücrelerdeki sitoplazma parçalarının kopmasıyla oluşmaktadır. Bu hücreler kan dolaşıma girerek kanın pıhtılaşmasını sağlarlar [6].

Akyuvarların beş tane ana tipi bulunmaktadır. Bu hücrelerin her biri birbirinden farklı şekil ve büyüklüktedir. Bu hücrelerden bazıları birkaç loblu çekirdeğe sahipken, bazıları ise büyük ve yuvarlak bir çekirdek içermektedirler [10]. Akyuvarlar, pek çok özelleşmiş fonksiyon için farklılaşmışlardır ve bu hücreler kan dolaşımında hücre bölünmesine maruz kalmazlar [11]. Bu hücrelerin ortak görevleri vücut savunmasını sağlamaktır. Monosit, lenfosit, nötrofil, bazofil ve eozinofil olarak 5 ana gruptan oluşmaktadır.

Monosit: Bu hücreler diğer alyuvar hücrelerine göre daha uzun yaşam süresine sahiptirler ve bakterilerin parçalanmasına yardımcı olurlar.

Lenfosit: Lenfosit hücreleri bakterilere, virüslere ve diğer olası zararlı istilacılara karşı savunma için antibadi oluştururlar.

Nötrofil: Nötrofiller bakteri ve mantarları öldürürler ve sindirirler. Akyuvar hücreleri içerisinde en çok türü bulunan hücrelerdir ve enfeksiyon anında ilk savunma hattını oluştururlar.

Bazofil: Bu küçük hücreler kanda, enfeksiyon ajanlarının saldırısı anında, vücutta alarm oluşturmak için görünür hale gelirler. Vücut bağışıklığının kontrolüne yardım için kimyasal salgılar, örneğin alerjik hastaların bir işareti olan histamin proteini gibi.

Eozinofil: Bu hücreler parazitlere saldırırlar ve öldürürler, kanserli hücreleri imha ederler ve alerjik yanıtlara yardımcı olurlar [11].

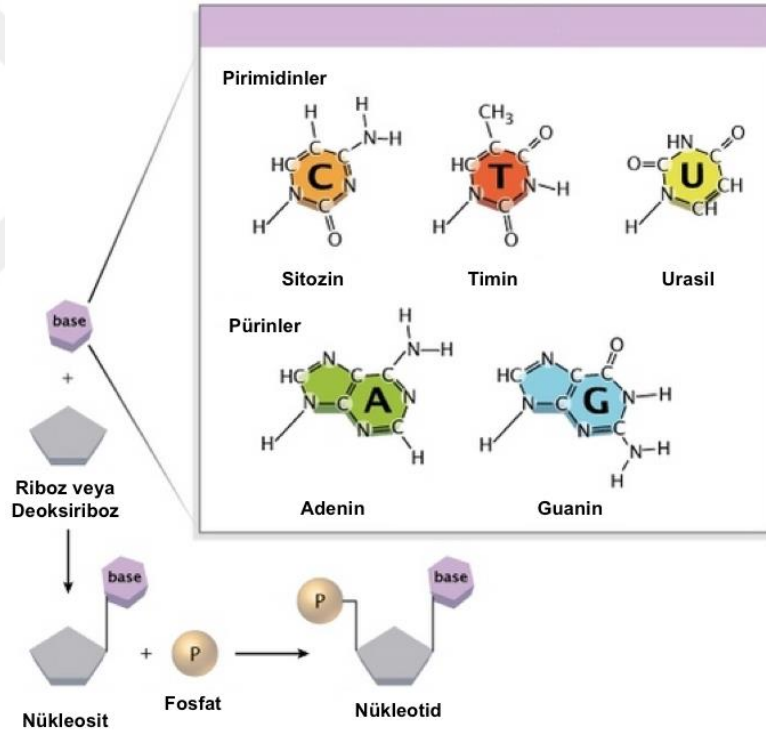
2.2. DNA'nın Yapısı

1940'larda biyologlar, DNA'nın kimyasal yapısının sadeliğinden dolayı, bu yapının genetik materyal olduğunu kabul etmekte zorlanmışlardır. 1950'lerin başında, DNA'nın yapısı ilk olarak X ışını kırınım çözümlenmesi analiziyle incelenmiştir. Bu teknik, molekülün üç boyutlu atomik yapısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. X ışını kırınım sonucuna göre DNA; heliks şeklinde sarılı iki adet polimer iplikten oluşmaktadır [8]. Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins'in çalışmış olduğu X ışını kristalografisi, James Watson ve Francis Crick'in DNA'nın yapısındaki üç boyutlu ve çift sarmal modelini elde etmelerine yardımcı olmuştur [9, 12, 13].

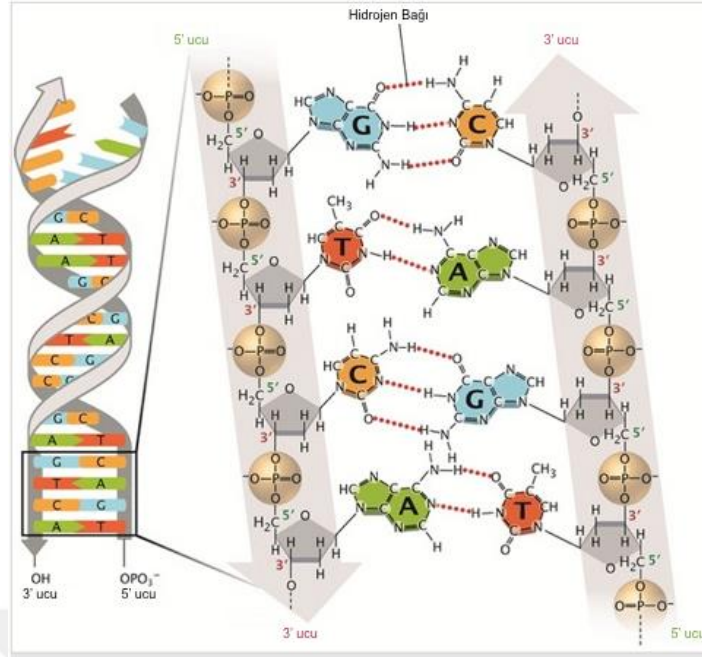
DNA ya da deoksiribonükleik asit, insanlar ve hemen hemen bütün organizmalar için kalıtsal bir materyaldir. İnsan vücudunda bulunan neredeyse bütün hücreler aynı DNA'ya sahiptirler. Çoğu DNA hücre çekirdeğinde yer alır ve bunlara çekirdeksel DNA denilmektedir ancak az sayıda da olsa DNA mitokondri içerisinde de yer almaktadır ve bunlara ise mitokondriyal DNA (mtDNA) denilmektedir. DNA hakkında bilgi verebilmek için öncelikle DNA yapısında bulunan 4 adet azotlu bazdan bahsetmek gerekir. Bu bazlar DNA'da bulunan kodları oluşturmaktadır. 4 azotlu baz DNA'da adenin, timin, sitozin ve guanin şeklinde adlandırılmaktadır. İnsan DNA'sı 3 milyar baz çiftinden meydana gelmektedir. DNA bazları birbirleri ile eşleşmektedir, adenin ile timin, guanin ile sitozin ve bunlara tamamlayıcı (komplementer) baz çifti denilmektedir. Bu eşleşme hidrojen bağı ile meydana gelmektedir. Hidrojen bağı ile yapılan baz eşleşmeleri DNA yapısına kimyasal dayanıklılık sağlamaktadır. Azotlu bazlar 9 atomlu iki halkalı pürinler, adenin-guanin, 6 atomlu tek halkalı piridinler, sitozin-timin-urasil, olmak üzere iki çeşide ayrılmaktadır. Her bir azotlu baz aynı zamanda bir şeker molekülüne ve bir fosfat molekülüne bağlıdır. Şeker, baz ve fosfatın birlikte oluşturduğu yapıya nükleotid adı verilmektedir. Pürinler, pirimidinler ve nükleotidlerin kimyasal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

DNA'da bulunan şeker yapısı 5 karbon atomu (pentoz şekeri) içerir ve deoksiribonükleik asit adını yapısında bulunan şekerden yani deoksiribozdan almıştır. Azotlu baz, şekerin C-1' atomuna kimyasal bağ ile bağlanmaktadır. Nükleotidlerde bulunan fosfat grubu ise şekere C-2', C-3' ya da C-5' atomu üzerinden bağlanır. Nükleotidler iki uzun sarmal boyunca düzenli bir halde bulunmaktadır. Birden fazla nükleotidin yani polinükleotidin oluşması için fosfat

grubu ile şeker grubu arasında fosfodiester bağı meydana gelir. Oluşan fosfodiester bağı DNA'nın ve RNA'nın kovalent iskelet yapısını oluşturmaktadırlar. Tekrarlanan fosfodiester bağları polinükleotid zincirinde ki şeker-fosfat omurgasının meydana gelmesini sağlar, bu yapı ise DNA'nın düzenli zincirini oluşturur. Polinükleotid zincirinde bulunan bazların sıralanması ise şeker-fosfat omurgasının aksine düzensiz bir yapıya sahiptir. Düzensiz şekilde yerleşmiş olan azotlu bazların oluşturduğu uzun yapı DNA'nın bilgi içeriğinin temelidir. Fosfodiester bağları DNA zincirinde ki polariteyi sağlamaktadır. DNA zinciri, bir ucunda 5' fosfat ya da 5' hidroksil yapısına, diğer ucunda ise 3' fosfat ya da 3' hidroksil yapısına sahiptir. DNA zinciri bir ucu 5' ucundan 3' ucuna doğru uzanırken, diğer ucu ise 3' ucundan 5' ucuna doğru uzanmaktadır [9, 13-16].



Şekil 2.3. Nükleotidlerin kimyasal yapısı [12].



Şekil 2.4. DNA'da baz eşleşmesi [12].

1953'den bu yana bilim adamları Watson-Crick modelinde bazı küçük değişiklikler yapmışlardır ve bu modeli 7 esas özellik altında açıklamışlardır. Bu özellikler:

1. DNA çift sarmal yapısındadır ve bu iki sarmal birbirlerine hidrojen bağı ile bağlanmaktadır.
2. Çoğu DNA çift sarmalı bir merkez eksen etrafında kıvrılarak sağ-el ikili sarmal yapısını oluşturur.
3. Sarmalın tam bir dönüşünde, her bir zincir için, 10 baz yer alır ve bu tam dönüş 3.4 Å (0.34 nm)'dır.
4. Zincir üzerinde bulunan bazlar düzlemseldir ve bu düzlemler eksene dik bir şekilde konumlanmıştır. Azotlu bazlar, her baz arasında 3.4 Å (0.34 nm) mesafe olacak şekilde, sarmalın içine dizilmişlerdir.
5. Molekül eksenini üzerinde sıra ile majör oluklar ve minör oluklar yer almaktadır.
6. İki zincir birbirine antiparaleldir. Zincirin biri 5' uçtan başlarken, karşı zincir 3' ucundan başlamaktadır.
7. Sarmal 20 Å (2 nm) çapa sahiptir [6].

2.3. Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

DNA, 1869 yılında İsviçreli bilim adamı Friedrich Miescher tarafından akyuvarların çekirdeğinden yeni bir madde olarak izole edilmiştir. Başlangıçta akyuvarları oluşturan ve hücrenin sitoplazmasındaki ana bileşenleri gösteren farklı bir protein tipi olduğu konusunda yoğunlaşmıştır. Yaptığı testler süresince asit ilave edildiğinde ve çözöldüğü zaman tekrar alkali ilave ettiğinde çözeltide çökmüş bir madde olduğunun farkına varmıştır. Bu çalışmada ilk defa, işlenmemiş çökelti halindeki DNA'yı elde etmiştir. Miescher yeni bir protokol geliştirerek sitoplazmadan hücrelerin çekirdeklerini ayırmış ve daha sonra DNA'yı izole etmiştir. Ancak protokol, daha fazla analiz yapmak için, yeterli malzeme elde etmede başarısız olmuştur. Miescher, fazla miktarda saflaştırılmış çekirdeklerin eldesi için ikinci bir protokol geliştirmiş ve daha sonra öğrencisi Richard Altman izole edilen yapıya nükleik asit ismini vermiştir [9, 15, 17-21].

DNA ekstraksiyonu için ilk laboratuvar prosedürleri, yoğunluk gradientli santrifügasyon stratejileri ile geliştirilmiştir. Meselson ve Stahl 1958 yılında bu metodu kullanarak, DNA'nın yarı korumalı (semiconservative) replikasyonunu ispat etmişlerdir [15].

Genelde, başarılı bir nükleik asit saflaştırması için gereken 4 önemli adım vardır: 1) dokuların ya da hücrelerin işe yarar bir halde parçalanması, 2) nükleoprotein kompleks yapısının denatürasyonu, 3) nükleazın (nükleik asitlerin parçalanmasını sağlayan enzim) inaktivasyonu, 4) kontaminasyonun (kirliliğin) uzaklaştırılması. Çoğu bilimsel araştırmada izole edilmiş nükleik asidin saflığı doğrudan sonucu etkilemektedir [19, 22].

DNA ekstraksiyonu için kullanılan metodlar ikiye ayrılmaktadır: solüsyon (sıvı-çözelti) bazlı DNA ekstraksiyon metodları ve katı fazlı DNA ekstraksiyon metodları [18].

2.3.1. Çözelti Bazlı DNA Ekstraksiyon Metodları

Çözelti bazlı DNA ekstraksiyon metodunun genel olarak iki yaklaşımı bulunmaktadır. Bunlardan ilki organik çözücüler aracılığıyla DNA ekstraksiyonu, ikincisi ise salting-out (tuzla çökelme) yöntemi ile DNA ekstraksiyonudur.

2.3.1.1. Organik Çözücüler Aracılığıyla DNA Ekstraksiyonu

Burada bahsedilecek olan yöntem başlıca birkaç basamaktan oluşur: 1) Deterjan/kaotropik içeren solüsyonlar [sodyum lauril sülfat (SLS) ya da N-lauril sarkosinat] eklenerek hücrelerin parçalanması, 2) DNaz ve RNaz'ların inaktivasyonu, 3) DNA'nın RNA (ribonükleik asit), protein ve lipidleri kaldırarak saflaştırılması, 4) Ekstrakte edilen nükleik asidin tekrar süspansiyon haline getirilmesi [19, 20, 23].

Bu metod ilk olarak 1977'de Ullrich ve arkadaşları tarafından, RNA ekstraksiyon tekniğinde olan guanidyum izotiyosiyanat ile plazmid DNA'nın izole edilmesinde kullanılmıştır [24]. Daha sonra Chirgwin ve arkadaşları tarafından 1979'da geliştirilmiştir. Bu metotta guanidyum tiyosiyanat kullanımına ihtiyaç duyulmuş ve uzun süren santrifüjleme işlemi sezyum klorür tamponu aracılığıyla gerçekleştirilmiştir [25]. Chomczynski and Sacchi tarafından 1987 yılında geliştirilen başarılı protokol ise; guanidyum tiyosiyanat-fenol-kloroformun kullanıldığı ve daha kısa süren santrifüj işleminin olduğu RNA ekstraksiyon metodudur [26]. Son kullanılan RNA ekstraksiyon metodu, RNA, DNA ve proteinlerin izole edilmesinde kullanılmıştır ancak DNA ekstraksiyonu için, RNaz aktivitesinin tam anlamıyla inhibe edilemediği guanidyum tiyosiyanat-fenol-kloroform çözeltisinin yerine izoamil alkol-fenol-kloroform çözeltisi kullanılmıştır [23].

DNA, sodyum asetat-etanol ya da izopropanol (2:1 veya 1:1 oranlarında) gibi yüksek tuz derişimine sahip organik solventler eklendikten sonra santrifüjleme işlemi ile çöktürülmüştür. %70 etanol eklenerek çözeltide bulunan fazla tuz uzaklaştırılmış ve tekrar santrifüj edilerek DNA pelleti toplanmıştır. Toplanan DNA pelleti, TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8.0) tamponu ya da steril distile su ile tekrar kullanılabilir hale getirilmiştir [20, 27].

Fenol-kloroform yüksek derecede korozif, yanıcı ve toksik malzemelerdir. Güvenliğin artırılması, protokollerin kolaylaştırılması ve kullanılan çözücüler ile olan fiziksel temasın önlenmesi amacıyla belirli protokoller tanıtılmıştır. Tanıtılan protokoller, silika jel polimerinin dahil edilmesini veya benzil alkol gibi farklı çözücülerin kullanımını içermektedir [28, 29].

2.3.1.2. Salting-out (Tuzla Çökelme) Yöntemi ile DNA Ekstraksiyonu

1988'de Miller ve arkadaşları tarafından yayınlanan protokolde, yüksek tuz konsantrasyonunda protein çökmesi yoluyla DNA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir [30]. Geleneksel protokol ilk başta SLS (sodyum lauril sülfat)-proteinaz K ile hücrenin bozulmasını ve parçalanmasını içermektedir. Bu protokol yüksek konsantrasyonlu tuzların, genellikle 6 M sodyum klorür, eklenmesi ile devam etmektedir. Oluşturulan karışım santrifüj edilir, proteinler alt katmana çöktürülür ve üst kısımda kalan DNA süpernatantı yeni bir tüpe alınır. DNA daha sonra etanol veya izopropanol kullanılarak çöktülür [20, 30-32]. Fakat proteinaz K'nın kullanımı, diğer solüsyon bazlı yaklaşımlarda kullanılan reaktiflere kıyasla daha pahalı ve zaman alıcıdır. Bu nedenle DNA'dan proteinlerin uzaklaştırılması için alternatif reaktifler bulunmaya çalışılmıştır [33-36].

1991'de Lahiri and Nurnberger, organik solventlerin kullanımını ve proteinaz-K ile olan uzun inkübasyon sürecini ortadan kaldıracak, DNA ekstraksiyon protokolü geliştirmişlerdir. Bu protokolde kan hücrelerini parçalamak için Nonidet TM P-40 (NP-40; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), kontaminantları (kirlilikleri) inaktive etmek ve uzaklaştırmak için %10 SLS-yüksek derişimli tuz tamponları kullanılmıştır [33].

2005 yılında Nasiri ve arkadaşları tarafından yayınlanan protokolde ise proteinaz-K yerine deterjan kullanılmıştır [37].

2.3.2. Katı-Fazlı DNA Ekstraksiyon Metodları

İlk olarak 1989'da McCormick tarafından, kan örnekleri kullanılarak katı fazlı DNA ekstraksiyon metodu tanımlanmıştır. Bu yöntemde silika bazlı partiküller kullanılmış ve partiküller proteinler ile de etkileşerek DNA'nın saflaştırılmasına olanak sağlamıştır [4]. Bu metoddan itibaren katı/sıvı DNA ekstraksiyonlarında kullanılmak üzere farklı prosedürler geliştirilmiş ve bunların çoğu ticari olarak temin edilebilir ekstraksiyon kiti formuna dönüştürülmüştür.

Yöntemlerin çoğunda hücre parçalanmasını sağlamak için benzer adımlar izlenmektedir. Takiben, DNA'nın adsorpsiyonu, adsorbe DNA'nın yıkanması ve en son yapılan elüsyon işlemleri uygulanmaktadır. Çoğu katı faz tekniğinde nükleik asitlerin merkezkaç kuvveti varlığında sorbente bağlanması için spin kolonlar

kullanılır. Spin kolonlar, silika matrisleri, cam partikülleri ya da tozu, ince silisli toprak ya da anyon değiştirici taşıyıcılardan yapılır ve genellikle bu bileşiklerin gereken kimyasal forma dönebilmesi için spesifik pH değerine sahip tampon çözeltilerin kullanılmasına ihtiyaç duyulur. Daha önce uygun liziz tamponlarıyla parçalanmış kan hücreleri kolona yüklenir ve santrifüj edilir. Burada DNA, bağlama çözeltilerinin (binding solution) sağladığı tuz deşişiminin koşulları ve pH'ın yardımıyla sorbente bağlanır. Bazı proteinler ve diğer biyokimyasal bileşenlerde sorbente bağlanabilmektedir. Bu bileşenler ise daha sonra kompetitif faktörler içeren yıkama tamponları kullanılarak uzaklaştırılır. Son olarak DNA sorbentten desorbe edilir, distile su ya da Tris-EDTA (TE) tamponu ile steril hale getirilir [19, 20, 38].

2.3.2.1. Anyon Değiştirici Reçine Bazlı DNA Ekstraksiyonu

Anyon değiştirici reçine olarak adlandırılan pozitif yüklü kimyasal maddelerin, negatif yüklü nükleik asit, kontaminant ya da enzimlere, örneğin nükleazlar, bağlanma özelliği bulunmaktadır. Bu maddeler, kan örneklerinden DNA ekstrasyonu protokollerinin bir kısmında kullanılmaktadır [39]. Biyolojik kaynak olarak kanın kullanıldığı ilk protokol Walsh ve arkadaşları tarafından 1991'de tanımlanmıştır [5]. Tam-kandan nükleik asit ekstraksiyonunun gerçekteştirilmesi için diğer protokollerde bu yaklaşım baz alınmıştır. Bu protokollerde düşük örnek hacmi (1ml'den az kan) gerekmektedir. Genellikle bu protokolda tek tüp reaksiyonu uygulanmıştır. Tek tüp reaksiyonu farklı adımlar ve reaktifler içermektedir. Kan örnekleri proteinaz-K kullanılarak ve/veya yüksek sıcaklıkta inkübasyon ile parçalanabilir. Ortamda bulunan kontaminantların ise Chelex® 100 reçine (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) denilen stiren-divinilbenzen kopolimerlerinden yapılmış bir sorbent ile çöktürölerek uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemler sonucunda süpernatant içerisinde tek zincirli DNA elde edilmiştir [5, 40, 41].

Seligson ve arkadaşları tam kan örneklerini kapsayan çeşitli kaynaklardan nükleik asit izole etmek için yöntemlerinde anyon değiştirici sorbentler kullanmışlardır [42]. Bu protokolda, negatif yüklü fosfat omurgasına sahip DNA'nın bağlanması için pozitif yüklü dietilaminoetil selüloz gruplarının yüzeyde olduğu rezini içeren

kolonlar kullanılmıştır. DNA'nın kolona RNA ve kirliliklerden daha kuvvetli bağlanabilmesi, nükleik asit protokollerinde kullanılan tamponların pH koşullarının ve tuz konsantrasyonlarının değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. RNA ve protein gibi kirlilikler, DNA içeren kolondan, tuz tampon ortamı ile yıkanabilmektedir [19, 42].

2.3.2.2. Silika Matriks Bazlı DNA Ekstraksiyon Metodları

Pozitif yüklü olan silika matriksler, negatif yüklü olan DNA iskeletine karşı yüksek bir affiniteye sahiptirler. Yüksek tuz koşullarında ve yüksek pH'da sodyum katyonları kullanılarak DNA'nın fosfat iskeletinde bulunan negatif yüklü oksijen ile sıkı bir bağlantı gerçekleştirilmiştir. Kontaminantlar, ardışık yıkama basamakları ile uzaklaştırılır ve bu işlem, TE tamponu ya da distile su kullanılarak, düşük iyonik kuvvet altında ($\text{pH} > 7$) DNA yıkaması ile devam eder. Ticari olarak kullanılan kitler, silika bazlı yaklaşım ile üretilmiştir. Kit protokollerinde, kan örnekleri birkaç dakika boyunca liziz tamponuyla inkübe edilir. Çoğu protokol, minimum kontaminasyon ile yüksek verimde DNA üretmek için yaklaşık olarak 40 dakika ile 1 saat arasında değişen sürelerde tamamlanır [19, 20, 38]. Diyatumlu toprak olarak da bilinen yüksek miktarda silika içeren maddeler DNA saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem ilk olarak Boom ve arkadaşları tarafından 1990'da tanımlanmıştır. Kaotropik ajan içeren ortamda bulunan DNA, silika matrikse bağlanmaktadır. Bu işlemin devamı olarak yıkama işlemi için alkol içeren tampon ortamı, son olarak DNA'nın ayrıştırılması amacıyla düşük konsantrasyonlu tuz tamponu ya da steril distile su kullanılır [43].

2.3.2.3. Manyetik Partiküller Aracılığıyla DNA Ekstraksiyonu

Manyetik ayırma kullanılarak nükleik asit ekstraksiyon tekniği 1990'lı yılların başından beri geliştirilmektedir. Bu yöntem ilk olarak 1994'de Hawkins ve arkadaşları tarafından, bakteriyel hücre lizatlarından plazmid DNA eldesinde kullanılmıştır [44]. 2006'da Saiyed ve arkadaşları tarafından, manyetik nanopartiküller kullanılarak, tam kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu protokolü geliştirilmiştir. Manyetik partiküller bir veya birden fazla manyetik çekirdekten meydana gelmektedir. Bu yapılar terminal fonksiyonel gruba sahip polimer, silika ya da hidroksiapatit matrise manyetit (Fe_3O_4) ya da maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) kaplanarak oluşturulur. Saiyed ve arkadaşlarının oluşturduğu

protokolde 30 µl tam-kan, eşit hacme sahip %1'lik (w/v) SLS solüsyonu ile karıştırılır. Karıştırılmış tüp iki ya da üç defa altüst edilir ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Karışıma ilk olarak 10 µl manyetik partikül daha sonra 75 µl (1.25 M sodyum klorür ve %10'luk polietilen glikol 6000) bağlama tamponu eklenir. Manyetik partikül ve tamponun eklendiği karışım altüst edildikten sonra 3 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Manyetik pelet kısmı dışardan uygulanan bir magnet yardımıyla sabitlenir ve süpernatant uzaklaştırılır. Tüpte bulunan manyetik pelet kısmı %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılır. Kuruyan pelet tekrar 50 µl TE tamponuyla muamele edilir ve DNA'ya bağlanan manyetik partiküller, sürekli çalkalama ile 65°C'de inkübe edilerek ayrıştırılır [45, 46].



3. MATERYAL ve METOD

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, silika bazlı sorbentlerin sentezini, farklı sorbentler kullanılarak insan tam-kan örneğinden DNA izolasyonunun kesikli ve sürekli sistemlerdeki performansını içermektedir. Monodispers silika mikrokürelerin ve manyetik silika mikrokürelerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Her iki mikroküre türünün gözeneklilik özellikleri azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile belirlenmiştir. Manyetik silika mikrokürelerin, manyetizasyon davranışı ise Titreşimli Örnek Manyetometresi ile tayin edilmiştir.

İnsan tam-kan örneğinden DNA izolasyonu çalışmalarında, kesikli sistemde manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikroküreler, sürekli sistemde ise monodispers silika mikroküreler kullanılmıştır. Kesikli sistemde yapılmış olan DNA izolasyonu çalışmaları kapsamında ilk olarak tampon ortamında insan genomik DNA'sı kullanılmış ve temel değişkenlere bakılmıştır. Temel değişkenler belirlendikten sonra, insan tam-kan örneği kullanılarak DNA izolasyon çalışmalarına başlanmıştır. Sürekli sistem çalışmalarında monodispers silika mikroküreler kapiler kolona dolgulanmış ve insan tam-kan örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar tez içeriğinde daha detaylı olarak anlatılmaktadır.

3.1. İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonunda Kullanılacak Sorbentlerin Sentezi

3.1.1. Materyal

Monodispers-gözenekli forma sahip silika mikrokürelerin eldesi için gerekli olan çıkış lateksinde monomer olarak kullanılan, glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asit (MAA) Sigma-Aldrich Co., AB.D.'den temin edilmiş ve alındığı şekilde polimerizasyonda kullanılmıştır. Polimerik mikroküre sentezi için çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDMA) aynı şekilde Sigma-Aldrich Co., A.B.D.'den temin edilmiştir. Tetraetoksisilan (TEOS), tetrabutilamonyum iyodat (TBAI), izopropanol (Iso-PrOH), setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), poli(vinil pirolidon) (PVP K-30, ortalama molekül ağırlığı: 40.000 Da), poli(vinil alkol) (PVA, ortalama molekül ağırlığı: 85.000-146.000 Da, Hidroliz derecesi: % 89) ve sodyum lauril sülfat (SLS)

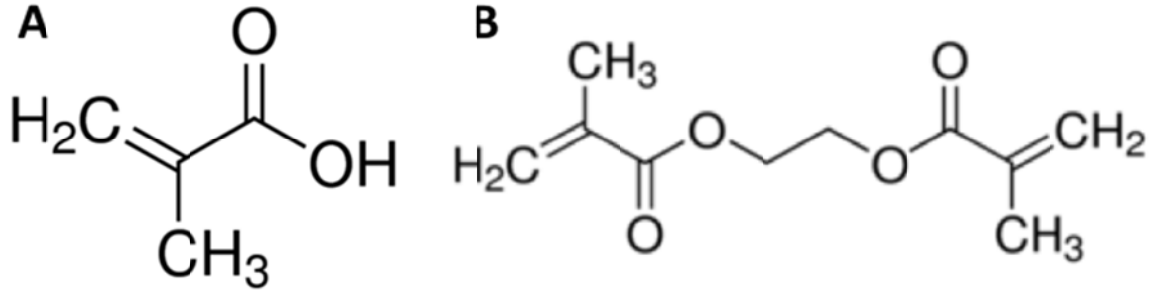
yine aynı firmadan alınmıştır. Etil benzen (EB) ve etanol (Et-OH) diluent olarak, tetrahidrofuran (THF) ise çözücü olarak kullanılmış ve Riedel De Haen (Almanya) firmasından alınmıştır. 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) ve benzoil peroksit (BPO) polimerizasyon işleminde başlatıcı olarak kullanılmış ve Across Organics (İngiltere) firmasından alınmıştır. 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) polimerizasyon işleminden önce metanol ile etkileştirilmiştir. Manyetik monodispers silika mikrokürelerin eldesi için demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+3}) ve demir (II) klorür terahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+2}) tuzları kullanılmış ve Sigma-Aldrich Co., A.B.D.'den temin edilmiştir.

3.1.2. Çıkış Lateksi Olarak Kullanılacak Poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi

Poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) lateks partiküller, monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin çıkış materyali olarak kullanılan poli(metakrilik asit-co-etilen dimetakrilat), poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin eldesi için sentezlenmiştir. Monodispers formda olan poli(GMA) lateks partiküllerin eldesi için dispersiyon polimerizasyonu yöntemi uygulanmıştır. Polimerizasyon işlemi için, mutlak etanol (30 ml) sızdırmaz cam Pyrex® reaktör içerisine konulmuş, PVP K-30 (0.45 g) ve GMA (3 ml) etanolde çözündürülmüştür. Başlatıcı olarak kullanılan AIBN (0.28 g), hazırlanmış olan çözelti içerisine eklenmiş ve 1 dakika süre boyunca ultrasonik banyoda (Elma LC 30, Germany) çözünmesi sağlanmıştır. Cam reaktör, sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosu (Memmert, Germany) içerisine yerleştirildikten sonra, polimerizasyon işlemi için, 70°C'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık olarak 40 dakikada istenilen sıcaklığa ulaşılmış ve cam reaktör içerisinde hazırlanmış olan çözelti çalkalamalı su banyosunda 24 saat boyunca, dakikada 120 vuru ile (120 cpm) karıştırılmıştır. Polimerizasyon işlemi sonlandığında, cam reaktörün oda sıcaklığında soğuması beklenmiştir. Elde edilen poli(GMA) lateks partiküller, ardışık yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Yıkama aşamasında partiküllere öncelikle etanol daha sonra distile-deiyonize su ile santrifüjleme-dekantasyon (Hettich Universal 320 R, Germany) işlemi uygulanmıştır. Santrifüjlenen poli(GMA) lateks partiküller son basamakta distile-deiyonize su ile ultrasonik banyoda dağıtılmıştır. Sulu dispersiyon ortamında bulunan lateks partiküllerin derişimleri gravimetrik yöntem uygulanarak belirlenmiştir.

3.1.3. Kalıp Materyal Olarak Kullanılacak Monodispers-Gözenekli Formda Polimerik Mikrokürelerin Sentezi

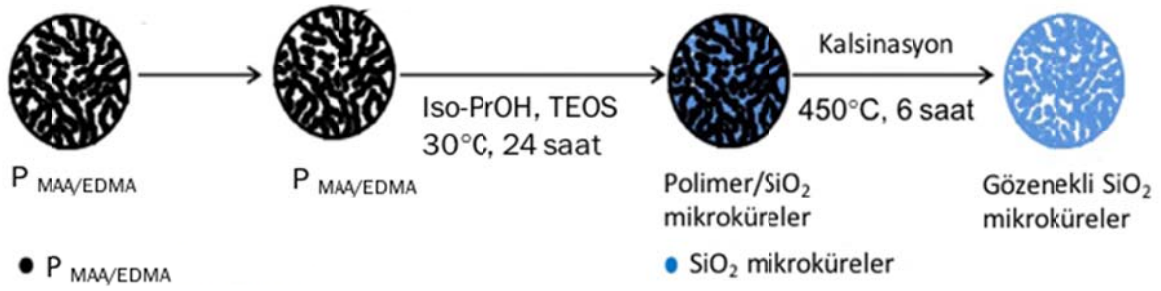
Monodispers-gözenekli forma sahip polimerik mikroküreler, laboratuvarımızda geliştirilmiş olan “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” yöntemi ile elde edilmektedir. Yöntem aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır. İlk olarak 50 ml %0.25 SLS içeren sulu ortama, gözenek yapıcı olan EB (3.5 ml) eklenerek 5 dakika boyunca ultrasonikasyon (200 W) işlemine maruz bırakılmıştır. Bu işlem sayesinde gözenek yapıcı solventin mikron boyutlu damlacıklar halinde dağılması sağlanmıştır. Sonuç ortamına çıkış lateksi olarak elde edilmiş poli(GMA) mikroküreler (0.3 g) eklenmiş, 1 dakika süre boyunca ultrasonikasyon işlemi uygulanmıştır. Gözenek yapıcı solvent ile poli(GMA) lateks partiküllerin denge şişme değerine ulaşması için, 24 saat boyunca oda sıcaklığında (25 °C) manyetik karıştırıcı (IKA RO 10, Germany) yardımıyla karıştırılmıştır. Devam eden süreçte, %0.25 SLS içeren 50 ml distile su içine, fonksiyonel monomer olarak MAA (2 ml), çapraz bağlayıcı olarak EDMA (4 ml) ve başlatıcı olarak ise BPO (0.25 g) eklenmiştir. Bu ortama 5 dakika boyunca ultrasonikasyon işlemi uygulanmıştır. Kullanılmış olan fonksiyonel monomer (MAA) ve çapraz bağlayıcı (EDMA) Şekil 3.1’ de verilmektedir. Elde edilen emülsiyon, bir önceki basamakta denge şişme değerine ulaşmış poli(GMA) partiküllerini içeren dispersiyona eklenerek, 24 saat boyunca oda sıcaklığında (25 °C) manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Son 24 saatlik sürecin ardından ilk basamakta hazırlanmış olan ve stabilizatör olarak kullanılan 10 ml distile su içerisinde çözündürülmüş PVA (0.8 g) çözeltisi ortama eklenmiştir. Sonuçta elde edilmiş olan dispersiyon 300 ml’lik cam Pyrex® reaktör içerisine alınmış ve çalkalamalı su banyosunda 80 °C’da, 150 cpm hızda 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, ortam oda sıcaklığında soğutulmuştur. Polimerizasyona dahil olmayan monomer ve gözenek yapıcı solventlerin uzaklaştırılması için, santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak, 3 kez teknik etanol ile yıkanmıştır. Ortam, yıkama işleminden sonra 2 kez oda sıcaklığında THF ile ekstrakte edilmiş ve tekrar 3 kez etanol ile santrifüjleme-dekantasyon işlemi uygulanarak yıkanmıştır. Son olarak elde edilen poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler etanol içerisine alınarak dispers edilmiştir.



Şekil 3.1. Mikroküre sentezinde kullanılan monomer (A) metakrilik asit (MAA) ve çapraz bağlayıcı (B) etilen dimetakrilat (EDMA).

3.1.4. Kalıp Materyal Kullanılarak Monodispers-Gözenekli Silika Mikroküre Eldesi

Monodispers silika mikroküre eldesi için, “çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi” kullanılmıştır. Yöntemde “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” ile elde edilen poli(MAA-co-EDMA) partikülleri kalıp materyal olarak kullanılmıştır. İlk olarak, Iso-PrOH (50 ml) ve distile su (5 ml) içeren ortamda TBAI (0.25 g) çözündürülmüştür. Çözünme işlemi sağlandıktan sonra, ortama amonyum hidroksit (0.25 ml) eklenmiştir. Amonyum hidroksit eklenmesinin ardından kalıp materyal olarak kullanılacak olan poli(MAA-co-EDMA) partiküllerin ultrasonikasyon yoluyla dispers edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen ortam, 1 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 400 rpm’de karıştırılmıştır. 1 saatlik süre sona erdiğinde karışmaya devam etmekte olan ortam içerisine %25 TEOS içeren Iso-PrOH-TEOS (5 ml) çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem sonunda, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı 30°C’ye ayarlanmış ve elde edilen son ortam ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 400 rpm hızla 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saat sonunda oluşan kompozit partiküller, santrifüjleme-dekantasyon yoluyla, 2 kez Iso-PrOH ve 2 kez distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan silika-polimer kompozit mikropartiküller santrifüjlenmiş ve üzerindeki süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Mikropartiküller, 70°C’lik etüvde 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Son basamak olarak, kompozit mikropartiküllere 450°C’de, hava ortamında 6 saat boyunca kalsinasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde polimerik kısmın uzaklaştırılması sağlanmış ve böylece monodispers-gözenekli forma sahip silika mikroküreler elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Monodispers silika mikrokürelerin sentez şeması.

3.1.5. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi

Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika mikroküre eldesi içinde, “çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi” kullanılmıştır. Monodispers-gözenekli formdaki silika mikrokürelerin eldesi için kalıp materyal olarak kullanılmış olan poli(MAA-co-EDMA) partikülleri, manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler içinde kullanılmaktadır. Bu aşamada ilk olarak, poli(MAA-co-EDMA) partiküllerinin manyetizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Manyetizasyon işleminde, ikili çöktürme yöntemi kullanılarak absorbe Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının mikroküreler içerisine immobilize edilmiş Fe_3O_4 nanopartikül formuna dönüştürülmesi sağlanmıştır. Burada kullanılan Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları, mikroküreler üzerinde bulunan karboksil gruplarıyla kompleks oluşum gerçekleştirmiştir. Burada gerçekleşen kompleks oluşumda, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları mikroküreler üzerine adsorplanmıştır. Sulu ortama (50 ml) uygun derişimdeki demir (III) klorür heksahidrat (0.27 g) ve demir (II) klorür tetrahidrat (0.4 g) içeren, poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler (0.7 g) eklenmiştir. Elde edilen ortam, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla N_2 varlığında karıştırılmıştır. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması ve demir iyonlarının mikropartiküller içerisine adsorplanması için 10 dakika boyunca vakumlanmıştır. Isıtıcılı manyetik karıştırıcının sıcaklığı $85^\circ C$ 'ye yükseltilmiş ve istenilen sıcaklığa ulaşınca ortam içerisine uygun hacimde derişik amonyak (50 ml) eklenmiştir. Derişik amonyak, ortamda bulunan mikrokürelerin gözenekli yapısı içerisindeki demir tuzları indirgeyerek, Fe_3O_4 nanopartikül haline gelmesini sağlamaktadır. Amonyak eklenmesinin ardından

ortam 1 saat boyunca 85°C'de karıştırılmıştır ve sürecin sonunda oda sıcaklığında soğutulmuştur. Manyetik özelliğe sahip olan mikroküreler mıknatıs yardımıyla izole edilmiş ve 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan mikroküreler son basamakta distile su içerisinde dağıtılmıştır.

Elde edilen manyetik özelliğe sahip poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelere, monodispers-gözenekli forma sahip silika mikrokürelerin eldesinde olan prosedürün aynısı uygulanmıştır. Burada, manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli forma sahip silika mikroküreleri elde ederken, yalnızca yıkama işlemi mıknatıs yardımıyla yapılmaktadır. Elde edilen manyetik özelliğe sahip mikroküreler, yukarıda anlatıldığı gibi, 70°C'de 24 saat boyunca etüvde kurumaya bırakılmış ve ardından 450°C'de 6 saat boyunca kalsine edilmiştir. Kalsinasyon işlemi sayesinde polimerik kısmın uzaklaştırıldığı manyetik özelliğe sahip mikroküreler distile su içerisinde dağıtılmıştır.

3.2. Silika Bazlı Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.2.1. Gözenek Boyutu ve Özgül Yüzey Alanı Tayini

Elde edilen mikrokürelerin gözenek boyutu ve özgül yüzey alanı tayini laboratuvarımızda mevcut Quantochrome, Nova 2200e Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlemde ilk olarak mikroküreler 24 saat boyunca 80°C'de kurutulmuştur. Yapılan işlemin ardından yaklaşık olarak 0.05 g olan mikroküreler cihazdaki örnek hücrelerine yerleştirilmiş ve 6 saat boyunca 250°C'de vakumlanmıştır, bu sayede mikroküreler üzerinde kalan nem uzaklaştırılmıştır. Ölçüm işlemi sıvı azot içerisinde yerleştirilen örnek haznesinde yapılmaktadır. Cihazın ölçüm prensibi mikroküreler üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azotun buhar basıncından yararlanarak hesaplanması temeline dayanmaktadır. Azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi Brunauer-Emmett-Teller (BET) modeline göre değerlendirilmiş ve böylece özgül yüzey alanı tayin edilmiştir.

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

Sentezi gerçekleştirilmiş olan mikrokürelerin ortalama boy ve boy dağılımı ile yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope, SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) ile belirlenmiştir. Örneklerin hazırlanma aşamasında, %25'lik SLS çözeltisi kullanılarak (ağırlıkça %10 partikül içerecek şekilde), çözelti 1 dakika boyunca ultrasonik banyo yardımıyla dağıtılmıştır. Elde edilen dispersiyondan 0.2 ml alınmış ve SEM cihazının örnek diski üzerindeki karbon banda yayılmıştır. Karbon bant üzerindeki dispersiyon oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş olan dispersiyon, plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme (physical vapor deposition) yöntemiyle altın ile kaplanmaktadır. Kaplanan mikroküreler SEM cihazında ortalama boy ve boy dağılımının tayini için farklı büyütme oranlarında görüntülenmektedir. Her bir örnek için alınmış olan SEM fotoğraflarında yaklaşık 50-100 partikülün boy ölçümleri, mikrokürelerin ortalama boy değerinin tespiti için yapılmıştır. Burada bahsedilmiş olan ortalama boy değeri aşağıdaki formüller ile hesaplanmaktadır:

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (3.1)$$

$$CV = [(\sum N_i (D_i - D_n)^2 / [N_T - 1])^{1/2} / D_n] \times 100 \quad (3.2)$$

Formülde gösterilen D_n sayıca ortalama çap değerini (μm), N_i ise D_i (μm) çap değerine sahip partiküllerin sayısını ifade etmektedir. Boy dağılımı için değişim katsayısı (coefficient of variation, CV) ise mikrokürelerin monodispers özelliğinin hesaplanması için belirlenmektedir. Partikül boy standart sapma değerinin, sayıca ortalama çap değerine oranı CV değerini vermektedir ve CV değerleri (3.2)'de gösterilmiş olan denkleme göre hesaplanmıştır. Denklem (3.2)'de bulunan N_T ise toplam partikül sayısını ifade etmektedir.

3.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometresi

Manyetik silika mikrokürelerin manyetizasyon davranışları ve doygunluk manyetizasyon değerleri Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM, Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) ile tayin edilmektedir. Bu işlemin ilk basamağında öncelikle mikroküreler 80°C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Daha sonra yaklaşık olarak 0.4 g olan mikroküreler, cihazın özel tüplerine yerleştirilmiştir ve oda sıcaklığında süper iletken mıknatısa sahip sistem ile manyetik alan şiddetine karşı manyetizasyon değerini veren histerisis formundaki manyetizasyon eğrileri elde edilmiştir.

3.2.4. X-Işınları Spektroskopisi

Manyetik silika mikrokürelerin kristal yapısı X-ışını kırınım yöntemi (XRD, Rigaku Ultima-IV, A.B.D.) ile tayin edilmiştir. Diğer ölçümlerde olduğu gibi bu ölçümde de manyetik silika mikroküreler 80°C'de 24 saat kurutulmuştur. Kurutulmuş olan mikroküreler cihazın örnek diski üzerine yerleştirilmiştir. Cihazın ölçüm prensibi, manyetik silika mikropartiküllerin kristal fazının kendine özgü atomik dizilimlerini esas alarak, X-ışınlarının karakteristik bir düzen içerisinde kırması temeline dayanmaktadır.

3.3. İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

3.3.1. Materyal

Deneylerde kullanılmak üzere, 100mM Tris-EDTA (1X TE) tamponu ve bu tampon içerisinde çözülen guanidyum hidroklorür (kaotropik tuz), Gu-HCl Sigma-Aldrich Co., WI, A.B.D. firmasından temin edilmiştir. 1X TE ve kaotropik tuz herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan izolasyon deneylerinde kullanılmıştır. İnsan tam-kan örneği (BCR634) ve insan genomik DNA örneği (DNA Salt from Human Placenta, D7011) de aynı şekilde Sigma'dan temin edilmiş ve alındığı şekilde kullanılmıştır. DNA izolasyon deneylerinde kullanılan mutlak etanol ise Riedel-De Haen, Almanya firmasından temin edilmiştir.

3.3.2. Kesikli Sistemde DNA İzolasyon Çalışmaları

3.3.2.1. Kesikli Sistem Özellikleri

Tez kapsamında, kesikli sistem çalışmaları için manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikroküreler kullanılmıştır. İlk olarak insan genomik DNA çalışmaları için en uygun koşullar belirlenmiş ve bu koşullara göre insan tam-kan örneğinden yapılacak olan çalışmalara ön hazırlık yapılmıştır. İnsan genomik DNA çalışmaları için 10 mg/ml mikropartikül, farklı pH değerlerine sahip adsorpsiyon ortamı ile muamele edilmiştir. Bu aşamada sabit DNA konsantrasyonu kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmada 10 mg/ml sorbent derişimine sahip mikropartikül kullanılarak, sabit pH değerinde bulunan adsorpsiyon ortamında farklı DNA konsantrasyonları denenmiş ve manyetik silika mikroküreler üzerindeki adsorpsiyon-desorpsiyon kapasitesine bakılmıştır. Son aşamada ise, sabit DNA konsantrasyonu ve sabit pH'da bulunan adsorpsiyon ortamı ile farklı sorbent derişimine sahip manyetik yapıya sahip mikropartiküllerin adsorpsiyon-desorpsiyon kapasitesi incelenmiştir. İnsan tam-kan deneylerinde yapılan çalışmalarda ise ilk önce lizat örneği hazırlanmış ve pH değeri belirlenen adsorpsiyon ortamında deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.2. Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA İzolasyonu

Manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler (10 mg) 1XTE tamponuyla dispers edilmiş ve 3 kez aynı tampon kullanarak sıvı kısım magnet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Son yıkama işleminin ardından üzerinde kalan sıvı kısım da magnet yardımıyla atılmış ve 10 mg mikroküre üzerine pH 6.0 değerindeki 6M Gu-HCl içeren-TE tamponu eklenerek dispers edilmiştir. 3 kez de bu tampon ile, magnet kullanılarak, yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemleri sona erdiğinde, ilk olarak adsorpsiyon tamponu (pH 6.0, 6M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu) içerisinde çözündürülen insan genomik DNA (0.4 mg/ml) çözeltisinden 1 ml alınarak mikroküreler üzerine eklenmiş ve 2 saat boyunca sabit sıcaklıkta (25°C) rotator yardımıyla karışmaya tabi tutulmuştur. Bu aşama sayesinde insan genomik DNA'sının manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler üzerine adsorbe olması sağlanmıştır. 2 saatlik süre sona erdiğinde sorbent magnet yardımıyla sıvı kısmından ayrılmıştır. Ayrılan sıvı kısmın derişimi florometrik ölçüm kiti (Qubit, 2.0

Fluorometer, Q32866-Invitrogen, Thermo-scientific, A.B.D.) ile tayin edilmiştir. Manyetik özelliğe sahip mikrokürelerin adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra denge DNA adsorpsiyonu (Q_{DNA} , ng DNA/mg sorbent) aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır.

$$Q_{DNA} = [(C_0 - C_f) / C_0] \times C_0 \times V_A / M_s \quad (3.3)$$

Burada:

C_0 : Adsorpsiyon ortamında DNA başlangıç derişimi (ng DNA/ μ l ortam)

C_f : Adsorpsiyon ortamında DNA sonuç derişimi (ng DNA/ μ l ortam)

V_A : Adsorpsiyon ortamının hacmi (ml)

M_s : Adsorpsiyon ortamındaki sorbent miktarını (mg sorbent) göstermektedir.

Adsorpsiyon sonrası izole edilmiş olan mikrokürelere hacmen 80/20 oranında bulunan etanol/su çözeltisi (1 ml) ile 1 dakika boyunca vortekslenme işlemi uygulanmış, sonrasında yıkanan mikroküreler magnet yardımıyla sıvı kısmından ayrıştırılmıştır. Yıkama işlemi biten mikrokürelere, desorpsiyon işlemi için, 1 ml desorpsiyon ortamı (1X TE tamponu, pH 8.5) eklenmiştir. Bu aşamada DNA içeren sorbentlerin desorpsiyon ortamıyla dağılması için öncelikle vorteksleme işlemi uygulanmıştır. Desorpsiyon ortamında dağılan sorbentler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında (25°C) rotator yardımıyla karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda, sorbentler sıvı kısmından magnet yardımıyla ayrılmış ve sıvı kısımda bulunan DNA derişimi Qubit ile ölçülmüştür. Desorpsiyon ortamındaki DNA derişiminin (C_{DNA} , ng DNA/ μ l ortam) desorpsiyon ortamı hacmi (V_D , μ l ortam) ile çarpılması sayesinde izole edilen DNA miktarı (ng) bulunmuştur.

Bu verilere göre DNA desorpsiyon verimi (η) aşağıdaki ifade ile hesaplanmaktadır:

$$\eta = (\text{desorplanan DNA miktarı} / \text{adsorplanan DNA miktarı}) \times 100 \quad (3.4)$$

$$\eta = [C_{DNA} \times V_D] / [(C_0 - C_f) / C_0] \times C_0 \times V_A \times 100 \quad (3.5)$$

DNA izolasyon verimi (τ) ise aşağıdaki ifade yardımıyla bulunmaktadır:

$$\tau = (\text{desorplanan DNA miktarı} / \text{yüklenen DNA miktarı}) \times 100 \quad (3.6)$$

$$\tau = [C_{DNA} \times V_D] / [C_0 \times V_A] \times 100 \quad (3.7)$$

3.3.2.3. Kesikli Sistemde İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

Bu aşamada ilk olarak, tam-kan içeriğinden elde edilecek DNA'nın tampon ortamına geçebilmesi için lizat hazırlanmıştır. Tam-kanda bulunan lökosit membranı ve çekirdeği uygun koşullarda patlatılmış ve açığa çıkan DNA'nın tampon ortamı içerisinde çözündürülmesi sağlanmıştır. Bu sayede lizat, DNA izolasyon çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmiştir. Aşağıda anlatılan yöntem ile tam-kandan lizat eldesi sağlanmıştır [47, 48].

Öncelikle, lizat için kullanılacak olan uygun tampon ortamı seçilmiş ve hazırlanmıştır. Tampon ortamına eklenmek üzere 100 µl Triton-X, 900 µl adsorpsiyon ortamı (6 M Gu-HCl, 1X TE tamponu, pH 6.0) içerisine eklenerek 2 dakika boyunca vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminin ardından, 1 saat boyunca rotator yardımıyla 10 devir/dakika hızla karıştırılmış ve böylece çözündürme işlemi gerçekleştirilmiştir. 75 µl tam-kan örneğine, 150 µl hacimce %10'luk Triton-X içeren adsorpsiyon ortamı ve 15 µl proteinaz-K çözeltisi (proteinaz-K derişimi: 20 mg/ml) eklenmiştir. Elde edilen son çözelti, 56 °C'de 30 dakika boyunca su banyosunda tutulmuştur. Burada yapılan işlemin amacı, yukarıda bahsedildiği gibi, tam-kanda bulunan lökosit membranının hidrolizinin ve çekirdeğin patlatılmasının ardından DNA'nın lizat ortamına geçmesini sağlamaktır. Lizat ortamındaki DNA derişiminin ölçümü Qubit floresan kiti ile belirlenmiştir. Bu ölçüm için, insan genomik DNA'sı lizat ortamı içerisinde kullanılmış, DNA standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden elde edilen ölçüm değerleri referans alınarak, tam-kan örneğinden elde edilen DNA derişiminin belirlenmesi sağlanmıştır. Kullanılmış olan lizat hazırlama yöntemine göre, 10 µl tam-kan örneğinden 350 ng DNA elde edildiği ölçülmüştür. Bu ölçüm, literatürde elde edilmiş olan değer ile uyumluluk göstermektedir [49]. Adsorpsiyon öncesinde hazırlanan lizat örneği, farklı hacimlerdeki adsorpsiyon tamponu ile karıştırılmış böylelikle bir seri adsorpsiyon ortamı elde edilmiştir. Birbirinden farklı hacimde bulunan adsorpsiyon ortamları ile insan tam-kan örneğinden DNA izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

Lizat hazırlama işleminin ardından manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin (10-200 mg) adsorpsiyon aşaması için ilk olarak insan genomik DNA izolasyonu aşamasında da yapılmış olan yıkama prosedürleri uygulanmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından, hazırlanmış olan lizat ve adsorpsiyon tamponu ¼ hacim oranında karıştırılmıştır. Her bir sorbentin üzerine hazırlanan lizat+adsorpsiyon

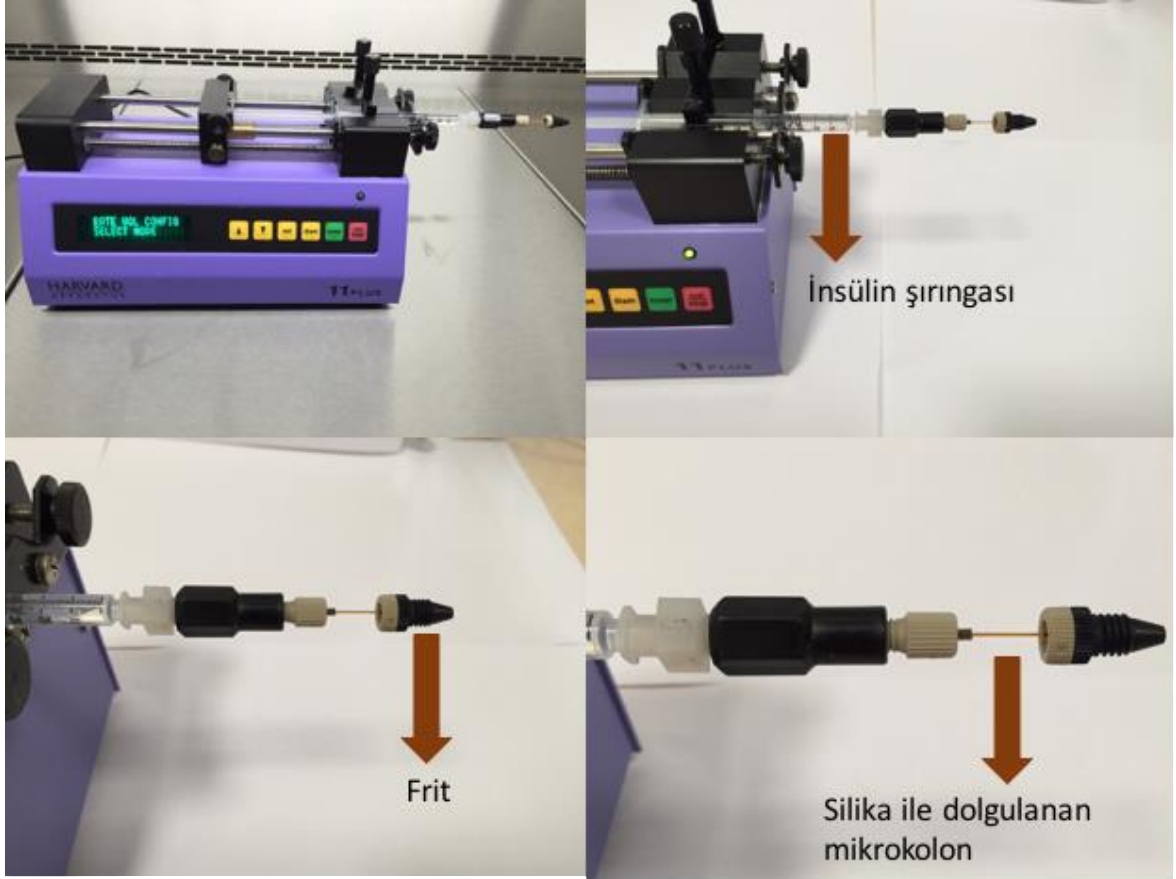
tamponu çözeltisi (1 ml) ilave edilmiştir. Sonuç dispersiyonda bulunan sorbentlere DNA'nın adsorpsiyonu için, 2 saat boyunca oda sıcaklığında (25°C) rotator yardımıyla karıştırılmaya bırakılmıştır. Süre bitiminde sorbentler magnet yardımıyla izole edilmiş, sorbentlerden ayrılan sıvı kısımdaki DNA derişimi (ortamda absorbe edilmeyen DNA'nın derişimi) ise Qubit floresan kiti ile ölçülmüştür. Adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra sorbentler 80/20 hacim oranında etanol/su (1 ml) ile yıkamaya tabi tutulmuş (15 dk, 30 devir/dakika) ve böylelikle sorbentler sıvı kısımda bulunan serum proteinlerinden uzaklaştırılmıştır. Etanol/su yıkamasının ardından deneyler iki kola ayrılmaktadır. Farklı sorbent miktarlarıyla yapılan deney grubundan ilki mutlak etanol yıkamasının ardından direkt desorpsiyon ortamıyla etkileştirilmiştir. Diğer deney grubu ise mutlak etanol basamağının ardından adsorpsiyon tamponuyla (1 ml) manyetik izolasyon yardımı ile bir kez yıkandıktan sonra desorpsiyon ortamına aktarılmıştır. İki deney grubunda da sorbentler, 1 ml desorpsiyon ortamı (1X TE tamponu, pH 8.5) ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında (25°C) 1 saat süreyle karıştırılmaya bırakılmıştır. Desorpsiyon işleminin ardından sorbentler magnet yardımıyla sıvı kısmından ayrılmış, alınan sıvı kısımdaki DNA derişimi Qubit floresan kiti ile ölçülmüştür. Qubit floresan kiti ile yapılan ölçümler (3.4) ile (3.7) arasındaki denklemlere göre değerlendirilmiştir.

3.3.3. Tek Beslemeli Sistemde Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyon Çalışmaları

3.3.3.1. Tek Beslemeli Sistemin Kurulumu ve Özellikleri

Tez kapsamının bu aşamasında, tek beslemeli sistemin (sürekli mikroakış sisteminin) kullanımı için sentezlenmiş olan monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin kapiler kolon içerisine dolgulanması ve DNA izolasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi için kapiler kolon içerisinden akış geçirilmesi hedeflenmiştir. Oluşturulmuş olan sisteme ait örnek fotoğraf Şekil 3.3'de gösterilmektedir. Sürekli mikroakış sisteminde DNA izolasyon çalışmaları için insan tam-kan örneğinden hazırlanmış lizatın, adsorpsiyon ve desorpsiyon tamponunun kapiler kolona aktarılması aşamasında gerekli olan insülin şırıngası (1 ml) kullanılmaktadır. Sistem, akışın kontrol edildiği enjeksiyon pompasını ve akışın geçirileceği kapiler mikrokolonu içermektedir. Enjeksiyon pompası üzerine

yerleştirilen insülin şiringası sayesinde lizat ve tamponların partikül ile dolgulanmış olan mikrokolona iletilmesi sağlanmaktadır. Sıvı akışı sağlanırken, dolgularan partiküllerin kolondan çıkışını engellemek için kolonun uç kısmına, yaklaşık 0.5 mm çapında bulunan ve gözenek açıklığı 2 μ m olan paslanmaz çelik özelliğindeki frit kullanılmaktadır.



Şekil 3.3. Tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminin fotoğrafı.

3.3.3.2. Silika Kapiler Kolonların Monodispers-Gözenekli Formdaki Silika Mikroküreler İle Dolgulanması

Dolgulama işlemi, mikro-HPLC pompası (Dionex-Ultimate3000, A.B.D.) aracılığıyla 300 μ m iç çapa, 430 μ m dış çapa sahip silika kapilere (160 mm uzunluğunda) ardışık olarak monte edilmiş olan HPLC kolonu (50 mm x 4.6 mm i.ç.) ile gerçekleştirilmektedir. Bu işlem için, monodispers-gözenekli forma sahip olan silika mikrokürelerin 1XTE tamponu içerisinde olan %5'lik süspansiyonu, HPLC kolonu içerisine konulmuş ve bu kolon mikro-HPLC pompasına takılmıştır. Dakikada 10 μ l

akış hızına ayarlanmış olan mikro-HPLC pompası, 1XTE tamponunu mikrokürelerle dolgulanmış olan HPLC kolonuna göndermektedir. Bu sayede mikroküreler, HPLC kolonuna seri bağlı ve ucunda paslanmaz çelik frit bulunan kapilere doğru hareket etmektedir. Sistemin ucunda bulunan paslanmaz çelik frit sayesinde, kolon içerisindeki mikrokürelerin kolon dışına çıkması engellenmiş ve kapiler içerisine dolgulanması sağlanmıştır. Bu işlem 1 saat boyunca uygulanmış ve bu sayede kolon içerisindeki mikrokürelerin iyice sıkıştırılması sağlanmıştır. Sıkıştırılma işleminde olabilecek sorunlara karşı, 1 saatlik süreç boyunca dolgulama işlemi optik mikroskopla incelenmiştir. Bu işlem sonunda kapiler kolon, 40 mm uzunluğunda, elmas kesici yardımıyla kesilmiş ve kesilen kolon ucuna frit takılarak deneylerde kullanılacak mikrokolon elde edilmiştir.

3.3.3.3. Tek Beslemeli Sistemde İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

İnsan tam-kandan DNA izolasyonu için yapılması gereken ilk basamak lizat örneğinin hazırlanmasıdır. Bu işlemde kullanılacak insan tam-kanı (BCR634) Sigma'dan temin edilmiştir. İlk olarak çekirdekdeki DNA'nın uygun tampon ortamı içerisine geçmesi için lökosit membranı ve çekirdeği patlatılmıştır. Lizat eldesi için gereken prosedür aşağıda anlatılmaktadır.

İlk olarak lizat örneğinin oluşturulması için uygun tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için; 100 µl Triton-X, 900 µl adsorpsiyon ortamı (6 M Gu-HCl, 1X TE tamponu, pH 6.0) karıştırılmış ve çözündürülmüştür. Çözündürülme işlemi, adsorpsiyon ortamı ve Triton-X 2 dakika boyunca vortekslenmiş, bu işlem sonucunda 1 saat boyunca rotator yardımıyla karıştırılmıştır. Lizat eldesi için, 75 µl insan tam-kan'ı, hazırlanmış olan Triton-X ve adsorpsiyon tamponuyla (150 µl) karıştırılmış bu işlemden sonra üzerine 15 ml proteinaz-K çözeltisi (proteinaz-K derişimi: 20 mg/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 30 dakika boyunca 56°C'lik su banyosunda tutulmuştur. Bu sayede lökosit membranının parçalanması ve çekirdek içerisindeki DNA'nın açığa çıkması sağlanmıştır. Açığa çıkan DNA'nın derişimi Qubit ile ölçülmüştür. Yapılan ölçüm 10 µl tam-kan içersinde 350 ng DNA'nın elde edilebileceğini göstermiştir. Bu sonuç, literatürdeki ölçümlerle uyumlu bir sonuç göstermiştir [49]. Elde edilen lizat örneği farklı hacimlerdeki adsorpsiyon tamponuyla karıştırılmış ve izolasyon işlemi için kullanılacak

adsorpsiyon ortamı elde edilmiştir. İzolasyon çalışmaları için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

İzolasyon işlemine başlamadan önce ilk olarak, dolgulama işlemi yapılmış mikrokolon 1XTE tamponu (pH:8.5) ile 30 dakika boyunca 5 µl/dak akış hızıyla, ardından 6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu (pH:6.0) ile 5 µl/dak akış hızıyla 30 dakika boyunca yıkanmaktadır. Bu yıkama işlemleri sayesinde kolonun DNA adsorpsiyon işlemi için koşullandırılması sağlanmıştır. Tam-kandan elde edilen lizat örneği 1/1, 1/2 ve 1/4 hacim oranlarında adsorpsiyon tamponu ile karıştırılarak, elde edilen adsorpsiyon ortamları insülin şırıngasına çekilmiştir ve ucuna uygun bağlantı elemanı takılarak DNA izolasyonunda kullanılacak olan mikrokolonla birleştirilmiştir. Her bir lizat/adsorpsiyon tamponu oranı için mikrokolona 20, 40, 80 ve 120 µl DNA içeren ortam yüklemesi yapılmıştır. Sistem hazırlandıktan sonra lizat ve adsorpsiyon tamponu içeren çözelti belirli süre boyunca 5 µl/dak akış hızıyla kolondan geçirilmiştir. Bu sayede lizat içerisinde bulunan DNA'nın kolon üzerine adsorpsiyonu sağlanmıştır. Bu geçiş esnasında, kolon içerisinden çıkan örnek ölçüm için eppendorf içerisine toplanmaktadır. İşlem süresi dolduğunda enjektör pompasına 80/20 (% hacim) oranında etanol/su içeren insülin şırıngası takılmış ve 5 µl/dak akış hızıyla 45 dakika boyunca mikrokolonun yıkanması sağlanmıştır. Bu işlem mikrokolon içerisinde kalmış olan serum-proteinlerin uzaklaştırılması için yapılmaktadır. Yıkama işleminin ardından desorpsiyon ortamı (1X TE tamponu, pH 8.5) 16 dakika boyunca, 5 µl/dak akış hızıyla DNA içeren mikrokolon içerisinden geçirilmiştir. Bu işlem esnasında kolondan 4 dakikada bir kez 20 µl örnek alınmış ve derişimler Qubit florometrik kiti ile tayin edilmiştir. Bu işlem ile toplanan veriler aşağıdaki ifadeler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tek beslemeli sistemde izole edilen edilen DNA miktarı ($M_{DNA, izole, ng}$)

$$(M_{DNA, izole, ng}) = \sum_{i=1}^n V_i C_{DNA, i}$$

Burada:

V_i : Belirli bir zaman değeri için alınan örneğin hacmi (μl)

$C_{\text{DNA}, i}$: Belirli bir zaman değeri için alınan örneğin DNA derişimi ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

n : Desorpsiyon boyunca alınan örnek sayısı

olarak tanımlanmaktadır.

Tek beslemeli sistemde DNA desorpsiyon verimi (Θ , % Ağ.)

$$\Theta = [M_{\text{DNA, izole}}/M_{\text{DNA, adsorplanan}}] \times 100 \quad (3.8)$$

$$M_{\text{DNA, adsorplanan}} = M_{\text{DNA, yüklenen}} - M_{\text{DNA, adsorplanmayan}} \quad (3.9)$$

$$M_{\text{DNA, yüklenen}} = Q \times C_0 \times t \quad (3.10)$$

$$M_{\text{DNA, adsorplanmayan}} = V_A \cdot C_A \quad (3.11)$$

Burada:

$M_{\text{DNA, yüklenen}}$: Mikrokolona yüklenen DNA miktarı (ng)

Q : Adsorpsiyon ortamı akış hızı ($\mu\text{l}/\text{dak}$)

t : Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)

C_0 : Adsorpsiyon ortamındaki DNA derişimi ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

$M_{\text{DNA, adsorplanmayan}}$: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin DNA miktarı (ng)

V_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (μl)

C_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin DNA derişimi ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

olarak tanımlanmaktadır.

Tek beslemeli sistemde DNA izolasyon verimi ise (τ , % Ağ.)

$$\tau = [M_{\text{DNA, izole}}/M_{\text{DNA, yüklenen}}] \times 100 \quad (3.12)$$

olarak tanımlanmaktadır.

3.4. İnsan Tam-Kan Örneğinden İzole Edilen DNA'nın Tanımlanması

3.4.1. PCR ve Yatay Elektroforez

Tam-kan örneğinden (Sigma, BCR634) sorbentler aracılığıyla kesikli ve tek beslemeli sistemde saflaştırılan genomik DNA ve ticari insan genomik DNA (Sigma, D7011) 'larının termal döngü cihazı kullanılarak (BioRad T100, Thermal Cycler, A.B.D.) çoğaltılması sağlanmıştır. Bu amaçla GAPDH primer çifti (5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' ve 5'-GGCATGGACTGTGGTCTGC-3') (Alpha DNA, Montreal, Kanada) kullanılmış ve uzunluğu 280 bp olan DNA bölgesinin çoğaltımı hedeflenmiştir. Reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için DNA içermeyen bir negatif kontrol kullanılmıştır. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jelde 1XTBE tamponu kullanılarak 100 voltta 40 dakika yürütülmüştür.

Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı (BioRad, Gel Doc[™] EZ Imager, A.B.D.) yardımıyla görüntülenmiştir. PCR'da kullanılan bileşenler ve PCR döngüsü sırasıyla Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. PCR'da kullanılan bileşenler

PCR Bileşenleri	Hacim (µl) ^A	Hacim (µl) ^B
Distile Su (dH ₂ O)	37	39
PCR Tamponu (10X)	5	5
MgCl ₂ (25 mM)	4	3
dNTP ^(a) (10X)	1	1
İleri Primer (F) (10 µM)	1	0.5
Geri Primer (R) (10 µM)	1	0.5
Saflaştırılmış DNA (14 ng)	0.5	0.5
Taq DNA Polimeraz (1U/µl)	0.5	0.5
TOPLAM	50	50

A) Tam-kan örneğinden elde edilen DNA, B) İnsan ticari genomik DNA'sı, (a) dNTP: deoksinükleosidtrifosfat.

Çizelge 3.2. PCR döngü koşulları

PCR Aşaması	Sıcaklık °C	Süre (s)	Döngüler
Ön Denatürasyon	95	30	1
Denatürasyon	95	30	-
Bağlanma	53	40	40
Uzama	68	60	-
Son Uzama	68	300	1
Saklama	+8	-	-

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers Silika Mikrokürelerin Sentezi

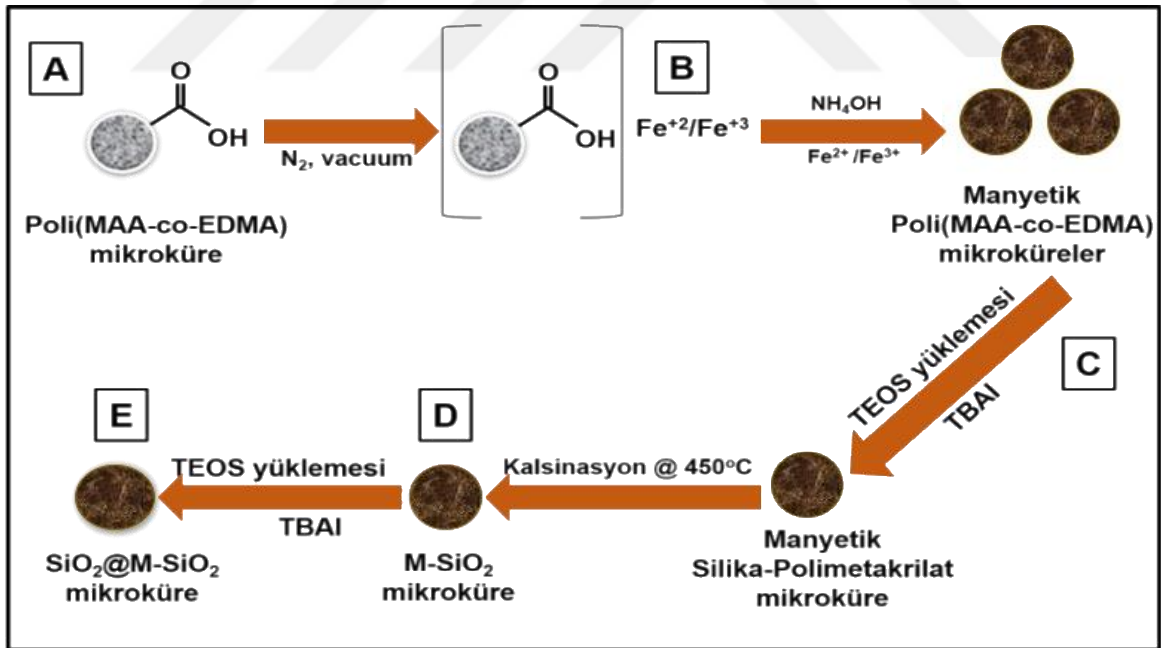
Manyetik özelliğe sahip mikroküreler çok basamaklı hidroliz kondenzasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Bu sentez yöntemi Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Çok basamaklı hidroliz kondenzasyon yönteminde uygulanan aşamalar aşağıda sırasıyla ifade edilmektedir:

- a) Kalıp materyali olarak kullanılan poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin sentezi
- b) Poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin manyetizasyonu
- c) Manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler üzerine silika öncül olan TEOS’un adsorpsiyonu
- d) Manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler içerisinde TEOS’un hidroliz-kondenzasyon tepkimesi ile silika-jel formuna dönüşmesi ve manyetik formda polimer/silika-jel kompozit mikrokürelerin eldesi
- e) Hava ortamında kalsinasyon basamağı ile polimerik kısmın kompozit mikrokürelerden yakılarak uzaklaştırılması ve manyetik silika mikrokürelerin eldesi

Yukarıda anlatıldığı gibi dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen monodispers formda poli(GMA) lateks mikroküreler (2 μm) çıkış materyali olarak kullanılmıştır ve manyetik silika mikroküre sentezinde kalıp olarak kullanılan monodispers-gözenekli formda poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler “çok basamaklı mikrosüspanسیون polimerizasyonu” ile elde edilmiştir. Devam eden basamakta, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları, MAA birimlerinin karboksil grubu üzerinden kompleks oluşumu yoluyla, mikroküreler üzerine adsorplanmıştır böylece poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin manyetizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1 B).

Adsorpsiyon sonrası demir iyonlarının manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllere dönüştürülme işlemi ortama bazik reaktant eklenerek sağlanmıştır. Manyetik özelliğe sahip poli(MMA-co-EDMA) mikrokürelerin sentezi ikili çöktürme (binary precipitation) yöntemiyle elde edilmiştir. Burada poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin gözenekli yapısı içerisinde manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin oluşumu ve immobilize edilmesi sağlanmıştır. Devam eden basamakta manyetik polimer mikroküreler üzerine silika öncül olarak kullanılan TEOS yine adsorpsiyon

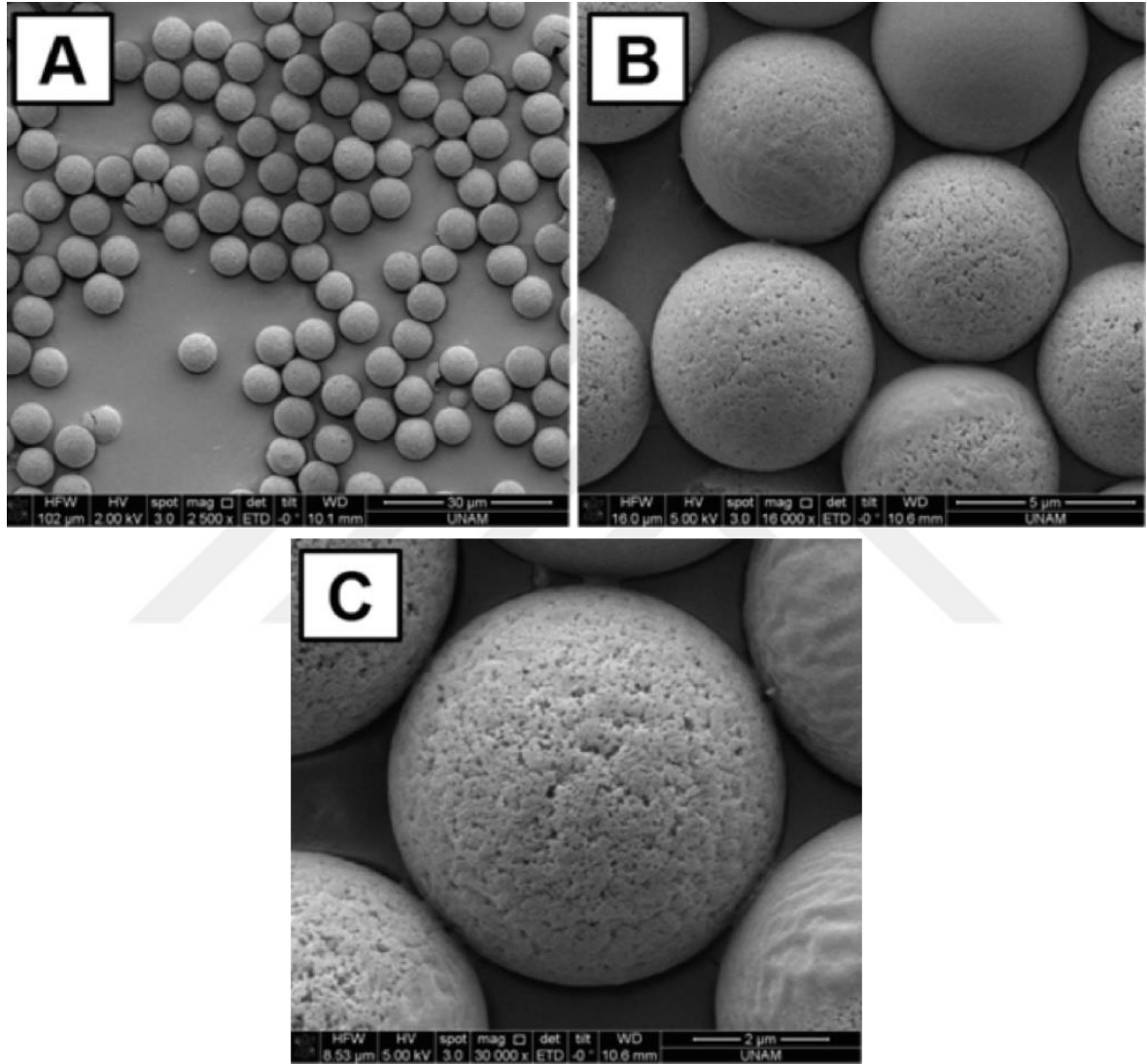
yoluyla yüklenmiş (Iso-PrOH/Su ortamında) ve manyetik özelliğe sahip silika jel/polimer kompozit mikrokürelerin oluşumu adsorplanan TEOS'un manyetik polimer mikroküreler içerisinde hidroliz-kondenzasyon reaksiyonu ile sağlanmıştır. Mikrokürelere 450°C'da, hava ortamında 6 saat süre ile kalsinasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem ile polimerik kısmın yapıdan uzaklaşması ve monodispers-gözenekli formda manyetik silika mikrokürelerin (Mag-SiO₂) eldesi sağlanmıştır (Şekil 4.1 D). Kalsinasyon sırasında, polimerik kısım yanarak uzaklaşmış, silika matrisin gözenekli yapısı sıkışmış ve böylece manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin silika mikroküre yapısı içerisine immobilizasyonu sağlanmıştır. Sonuç olarak, manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikroküreler elde edilmiştir. Monodispers-gözenekli formda manyetik silika mikrokürelerin içerisinde manyetik nanopartiküllerin daha iyi immobilize edilmesi için manyetik silika mikroküreler bir sonraki basamakta silika katmanı ile kaplanmıştır (Şekil 4.1 E). Böylece elde edilen silika kaplı manyetik silika mikrokürelerin (SiO₂@Mag-SiO₂) daha kararlı bir manyetizasyon davranışı ve kimyasal dayanım kazandığı gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikroküre sentezinin şematik gösterimi.

4.1.1. Çıkış Lateksi Olarak Kullanılan Monodispers-Gözenekli Formda Polimerik Mikrokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

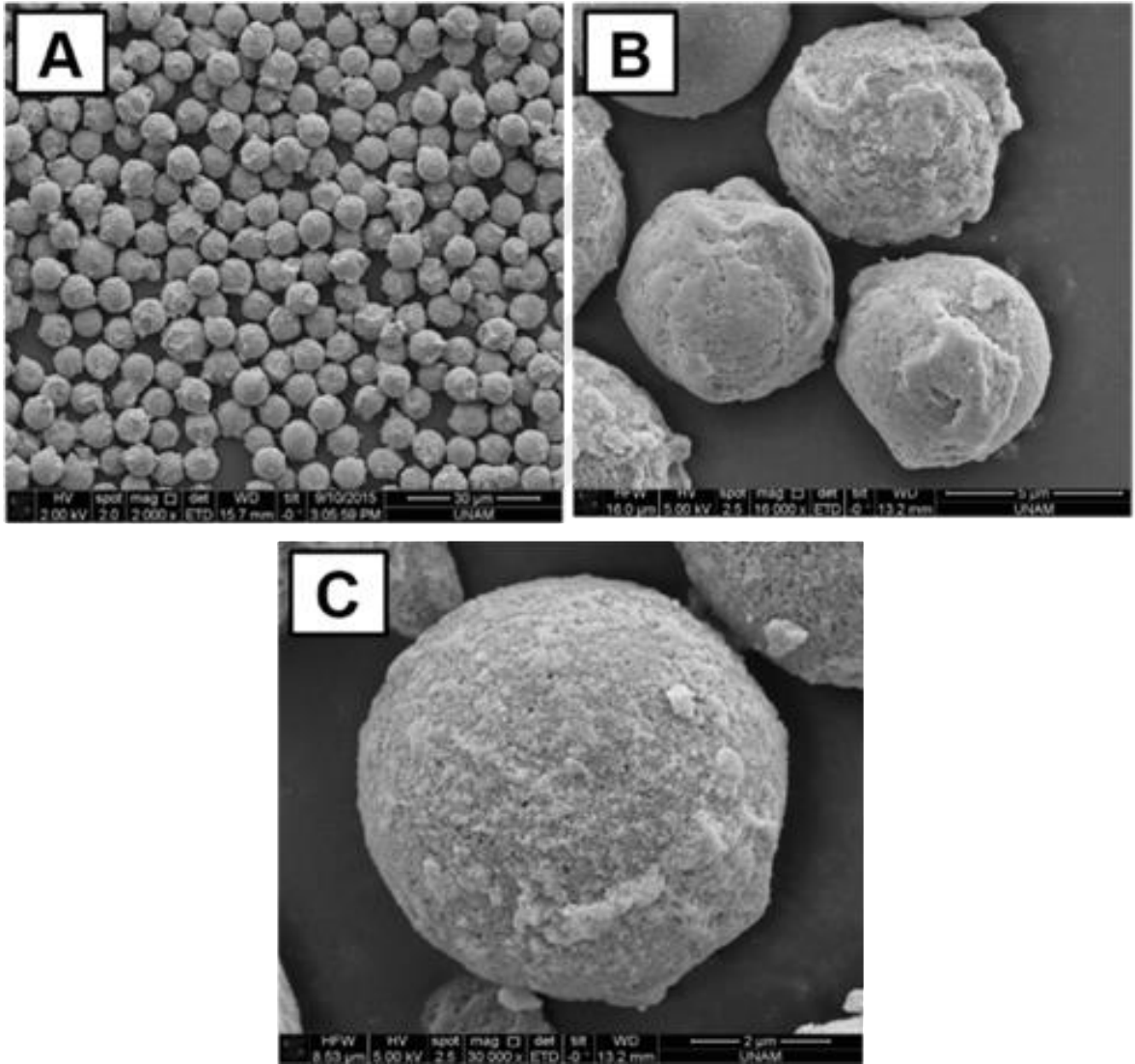
Çıkış lateksi olarak kullanılmış olan monodispers-gözenekli poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin yüzey morfolojisini ve boy dağılım özelliklerini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.2’de verilmektedir.



Şekil 4.2. Çıkış lateksi olarak kullanılan monodispers-gözenekli formdaki poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 2500X, (B) 16000X ve (C) 30000X.

4.1.2. Monodispers-Gözenekli Polimerik Mikrokürelerin Manyetizasyonu

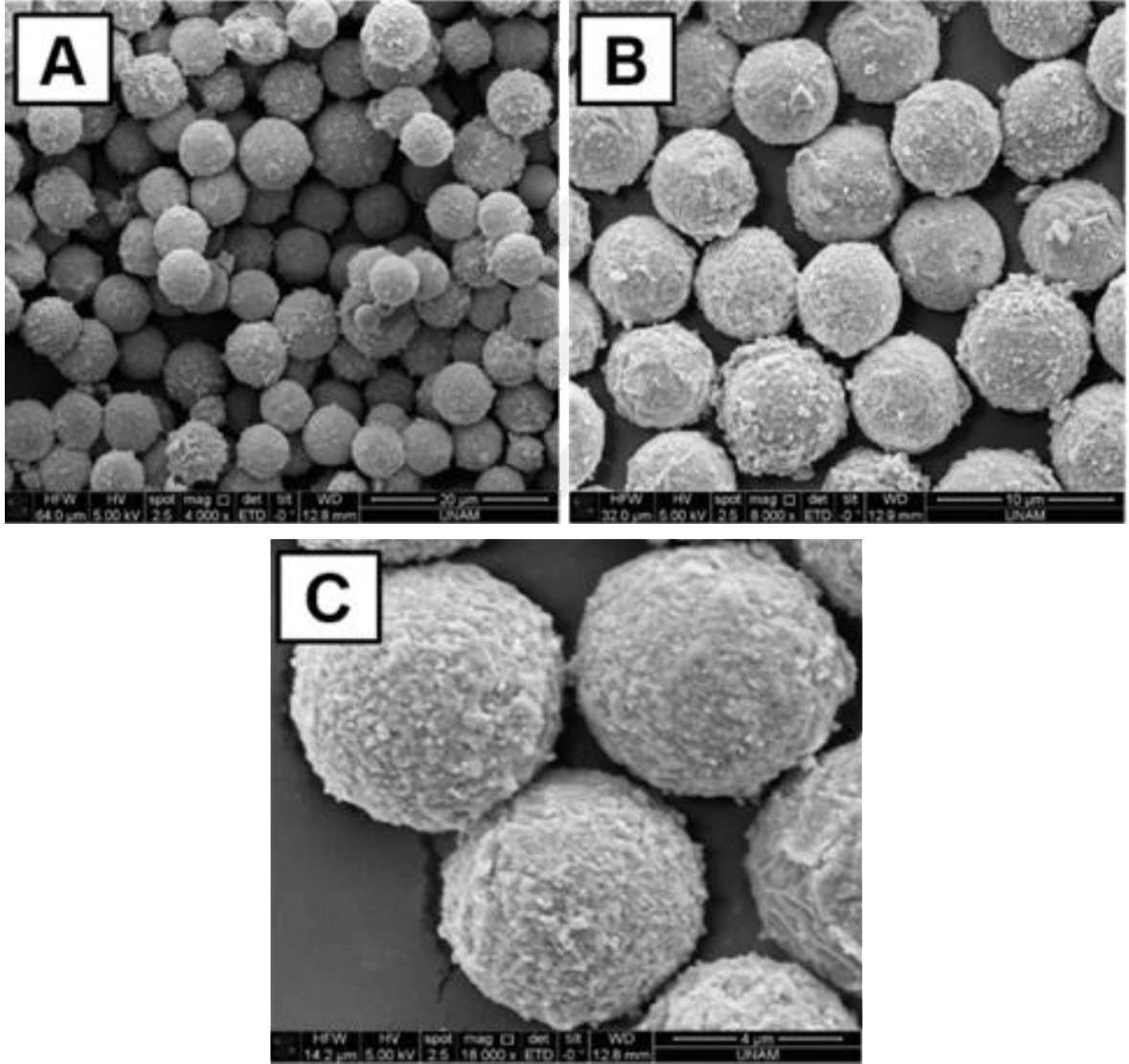
Manyetik formda poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin boy dağılım özelliğini ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.3'te gösterilmektedir. Mikrokürelerin üzerinde ve gözenekli yapı içerisinde manyetik demir oksit birikiminin olması, SEM fotoğraflarında gözlenen küresel formun bozulmasına neden olmaktadır. Küresel form tam olarak korunamamıştır ancak manyetik polimerik mikrokürelerin dar boy dağılımlı şekilde sentezlenebildiği görülmektedir.



Şekil 4.3. Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli formdaki poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 16000X ve (C) 30000X.

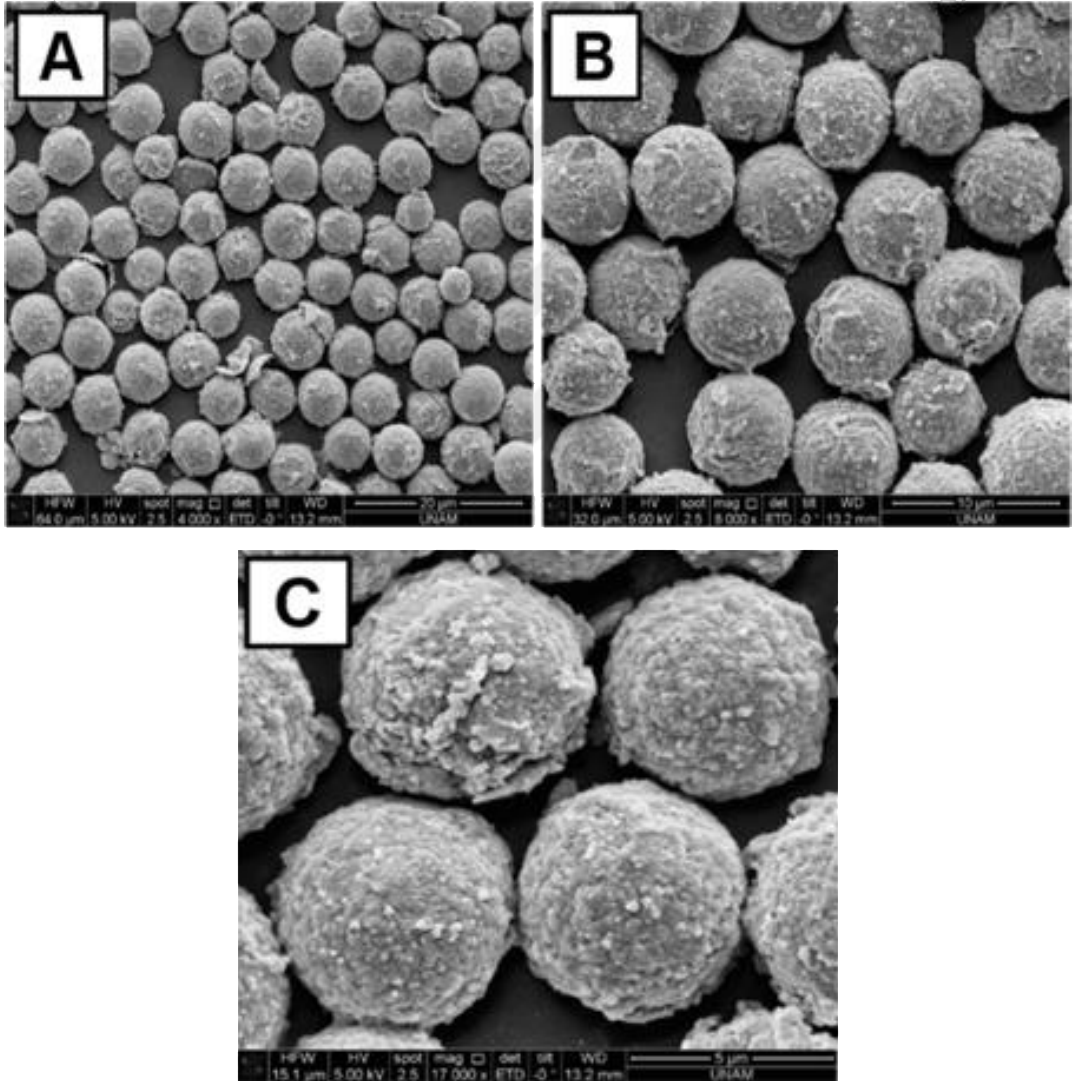
4.1.3. Manyetik Özelliğe Sahip Monodispers-Gözenekli Silika (Mag-SiO₂) ve Silika Katmanı Kaplı Silika (SiO₂@Mag-SiO₂) Mikrokürelerin Sentezi

Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Mag-SiO₂ mikrokürelerin oldukça dar bir boy dağılımı ile sentezlendiği SEM fotoğraflarında görülmektedir. Şekil 4.4(C)'de mikroküre yüzeyinde makrogözeneklerin varlığı görülmektedir.

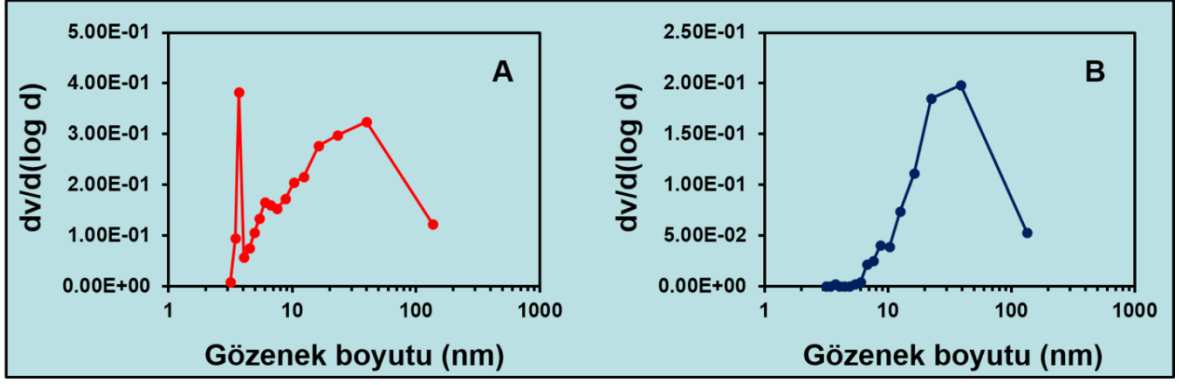


Şekil 4.4. Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika (Mag-SiO₂) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 8000X ve (C) 16000X.

Elde edilen $\text{SiO}_2@\text{Mag-SiO}_2$ mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.5'te verilmiştir. Burada, manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin yüzeyi silika katmanı ile kaplanmıştır ($\text{SiO}_2@\text{Mag-SiO}_2$). Manyetik silika mikropartiküllerin tekrar silika ile kaplanmasındaki amaç biyomoleküller ile istenmeyen (non-spesifik) etkileşimin minimum olduğu bir yüzey oluşturulmasıdır. SEM fotoğraflarında görüldüğü gibi, silika kaplama sonucu mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve boy özelliklerinde önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Manyetik özelliğe sahip silika katmanı kaplı monodispers silika ($\text{SiO}_2@\text{Mag-SiO}_2$) mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 4000X, (B) 8000X ve (C) 17000X.



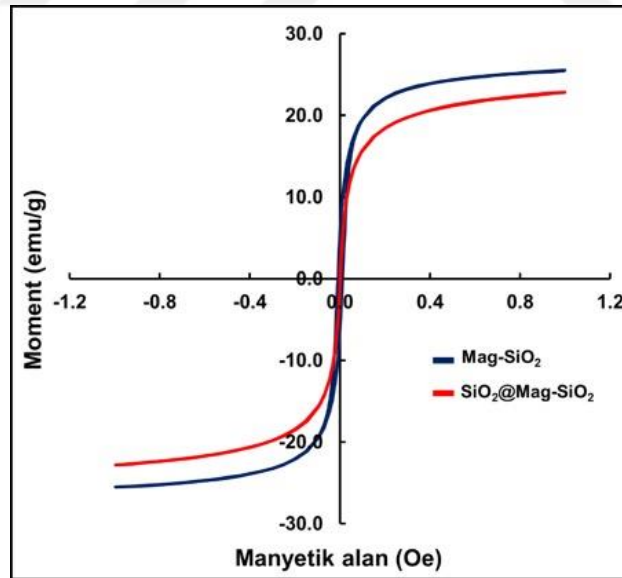
Şekil 4.6. Mag-SiO₂ ve SiO₂@Mag-SiO₂ mikrokürelerin azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrisi. A) Mag-SiO₂ ve B) SiO₂@Mag-SiO₂.

Şekil 4.6'da verilen gözenek boy dağılım eğrisi ve BET ile elde edilen yüksek yüzey alanı, sentezlenen mikrokürelerde mezogözenek ve makrogözenek yapısının bir arada olduğunu göstermektedir. Manyetik silika mikroküreler için ortalama gözenek boyutu 8.6 nm olarak tayin edilmiştir. Manyetik silika üzerinde oluşturulan silika katmanı özgül yüzey alanında yaklaşık olarak 2/3 oranında bir düşüş meydana getirmektedir. Bunun sebebi olarak mezogözenekli yapının silika ile dolgulanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.6(A)'da yaklaşık 3.5 nm'de gözlenen mezogözenekli fraksiyona ait pikin, Şekil 4.6(B)'de görülmemesiyle bu durum açıklanabilir. Bunun dışında silika kaplama ile gözenek boy dağılım eğrisinde önemli bir değişim meydana gelmemekte ve ortalama gözenek boyutu değerinde önemli bir değişim olmamaktadır. Manyetik silika mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımını veren değişim katsayısı ve özgül yüzey alanı değerleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Manyetik silika bazlı mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı ve özgül yüzey alanı değerleri.

Mikroküre türü	Ortalama boy (μm)	Değişim katsayısı (CV%)	Yüzey alanı (m^2/g)	D_n (nm)
Mag-SiO ₂	6.0	4.3	249	8.61
SiO ₂ @Mag-SiO ₂	6.3	4.1	80	9.79

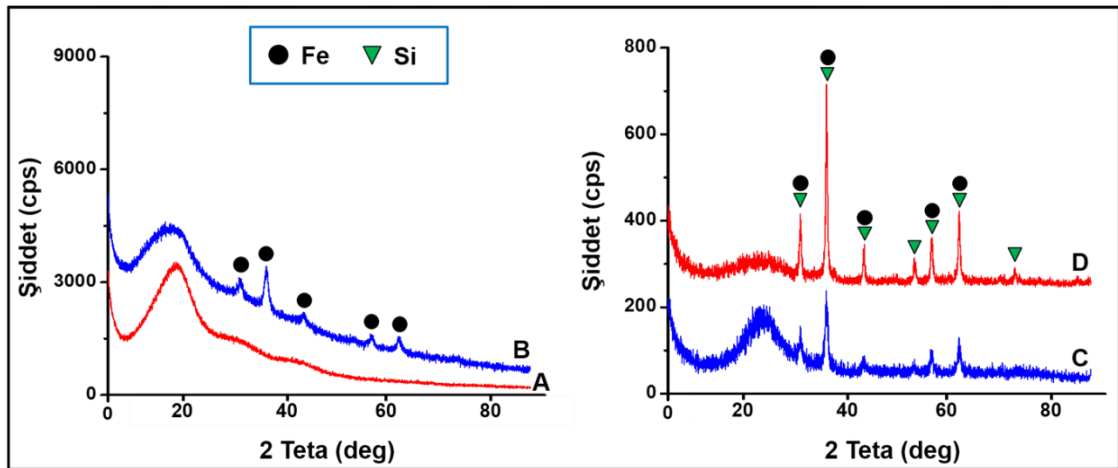
Manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Literatürde, etkili bir şekilde biyomoleküllerin izolasyonunu sağlamak için, manyetik mikro/nanopartiküllerin doygunluk manyetizasyon değerinin (DMD) alt sınırı 16.5 emu/g olarak verilmektedir [50].



Şekil 4.7. Manyetik özelliğe sahip monodispers silika mikrokürelerin titreşimli örnek manyetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri. A) Mag-SiO₂, B) SiO₂@Mag-SiO₂.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi Mag-SiO₂ mikroküreler için DMD 26 emu/g olarak elde edilmiştir ve bu değer Mag-SiO₂ mikrokürelerin yeterli manyetik özellik taşıdığını göstermektedir. Silika katmanı ile kaplanmış Mag-SiO₂ mikrokürelerin manyetizasyon eğrileri yardımıyla DMD 21.9 emu/g olarak elde edilmiştir.

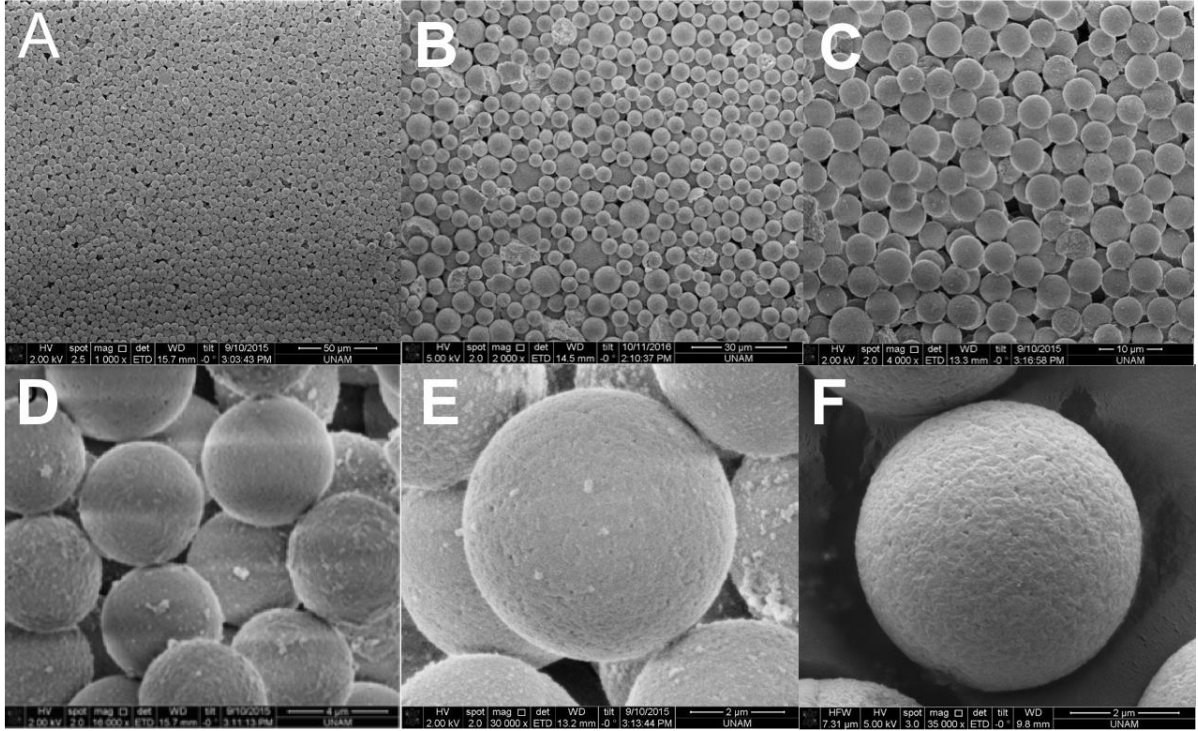
Manyetik özelliğe sahip sorbentlerin X-ışınları kırınım desenleri Şekil 4.8’de gösterilmektedir. Şekil 4.8(A) monodispers poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin beklenen amorf yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Manyetizasyon sonrası poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerde Fe₃O₄ nanopartiküllerin immobilizasyonu ile birlikte demir kristallerine özgün pikler spektrum üzerinde saptanmıştır (Şekil 4.8 B). Şekil 4.8(C)’de ise Mag-SiO₂ mikrokürelerde kristal Fe ve Si formlarına ait piklerin daha şiddetli olduğu gözlemlenmiştir. Burada siyah ve yeşil renkler ile Fe ve Si kristallerine ait pikler gösterilmiştir. Silika katmanı ile kaplanmış manyetik silika mikrokürelerin kristal yapısına ait X-ışını spektrumu ise Şekil 4.8(D)’de verilmiştir. Burada silika katmanının kaplanması ile birlikte özellikle Si kristallerine ait piklerin şiddeti de artmış ve Fe kristal formuna ait pikler ile birlikte her iki formun varlığı net olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Manyetik özelliğe sahip sorbentlerin X-ışınları kırınım spektrumu. A) Poli(MAA-co-EDMA), B) Manyetik Poli(MAA-co-EDMA), C) Mag-SiO₂, D) SiO₂@Mag-SiO₂.

4.2. Tek Beslemeli Sistemde Kullanılan Monodispers-Gözenekli Silika Mikrokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında, tek beslemeli sistem için laboratuvarımızda geliştirilmiş olan “monodispers-gözenekli silika mikroküreler” kullanılmıştır. Silika bazlı yeni bir tür sorbent olarak sentezlenen monodispers silika mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı, yüzey morfolojisini ve iç yapısını gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.9’da verilmektedir.

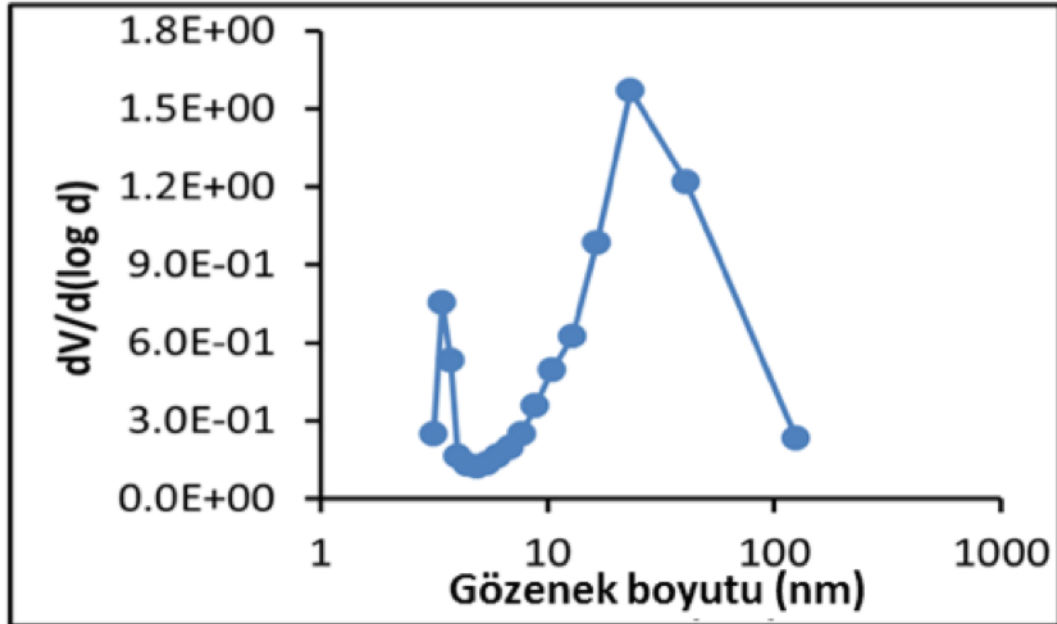


Şekil 4.9. Sentezlenen monodispers silika mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı, yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları. Büyütme (A) 1000X, (B) 2000X, (C) 4000X, (D) 16000X, (E) 30000X, (F) 35000X.

Yukarıda görüldüğü gibi monodispers-gözenekli silika mikroküreler dar bir boy dağılımı ile elde edilmiştir (Şekil 4.9 A, B ve C). Şekil 4.9 (E)’de mikrokürelerin yüzey morfolojisi gösterilmektedir. Şekil 4.9(E) ve 4.9(F)’de mikroküre yüzeyinde makrogözeneklerin varlığını gözlenebilmektedir.

BET yöntemi ile monodispers silika için ortalama gözenek boyutunun 13.5 nm olarak tayin edilmiştir. Monodispers silika için BET ile gözlenen mezogözenekli yapının ve SEM ile gözlenen makrogözenekli yapının varlığı, sentezlenen mikrokürenin her iki gözenek formunu (mezogözenek ve makrogözenek) bir arada içeren bimodal bir gözenek boy dağılımına sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Monodispers-gözenekli silika mikroküreler için gözenek dağılım eğrisi azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemiyle elde edilmiş ve burada silika mikroküreler için mezogözenek ve makrogözenek bölgelerini birlikte içeren yaygın bir dağılım gözlenmiştir. Gözenek dağılım eğrisi 4.10'da verilmektedir.



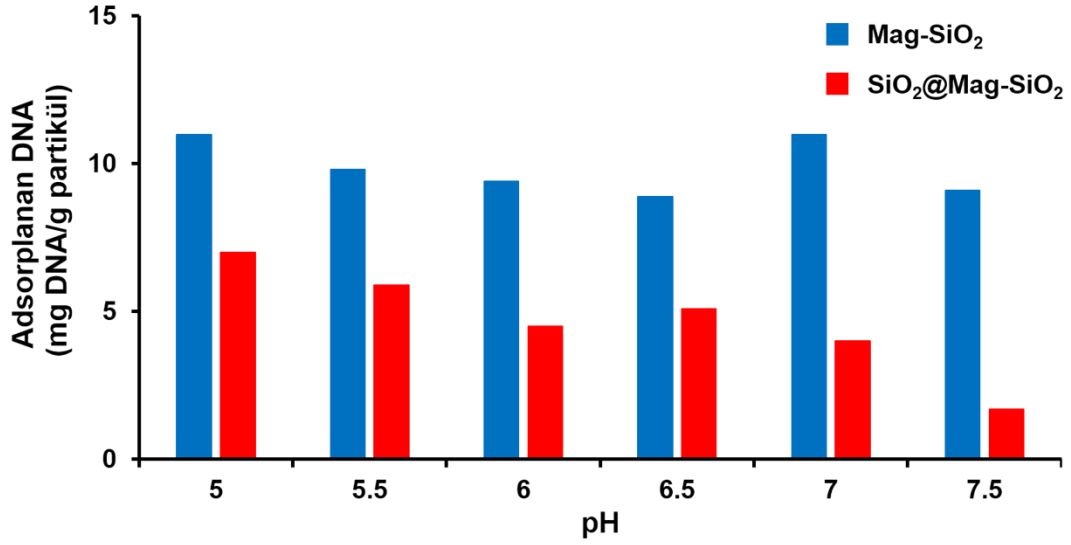
Şekil 4.10. Monodispers-gözenekli silika mikroküreler için azot adsorpsiyon/desorpsiyon yöntemiyle elde edilen gözenek dağılım eğrisi. Burada V gözenek hacmi, d ise gözenek çapını göstermektedir.

4.3. Kesikli Sistem ile İnsan Genomik DNA İzolasyonu

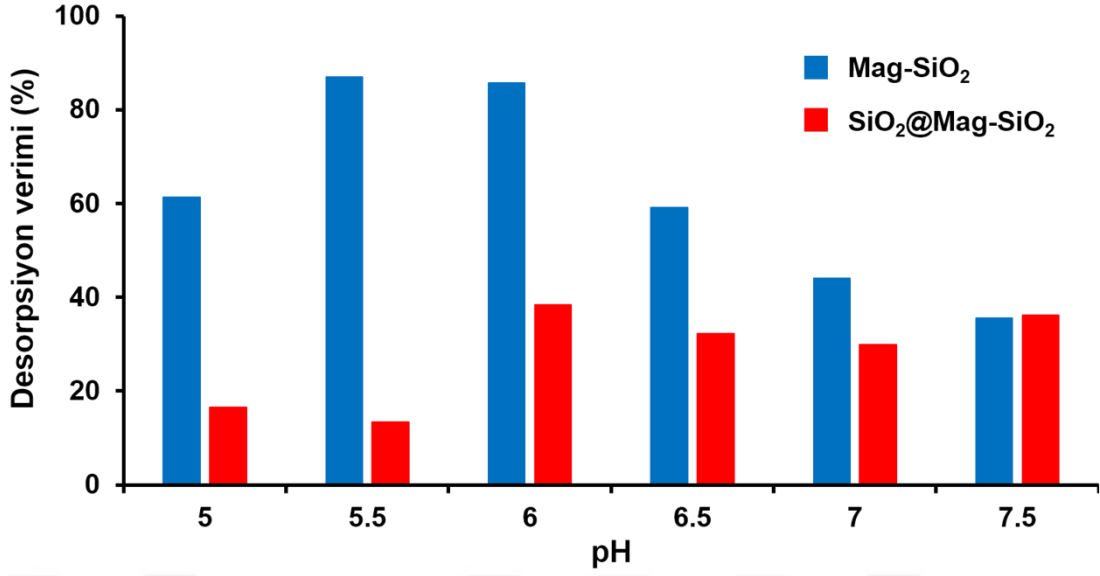
Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika mikroküreler, kesikli sistemde insan tam-kan örneğinden DNA izolasyon çalışmalarında sorbent olarak kullanılmıştır. İlk olarak insan genomik DNA izolasyon çalışmaları tampon

ortamında gerçekleştirilmiş ve temel değişken etkileri tespit edilmiştir. İnsan tam-kan örneğinden DNA izolasyon çalışmaları değişkenlerin tespitinden sonra gerçekleştirilmiştir.

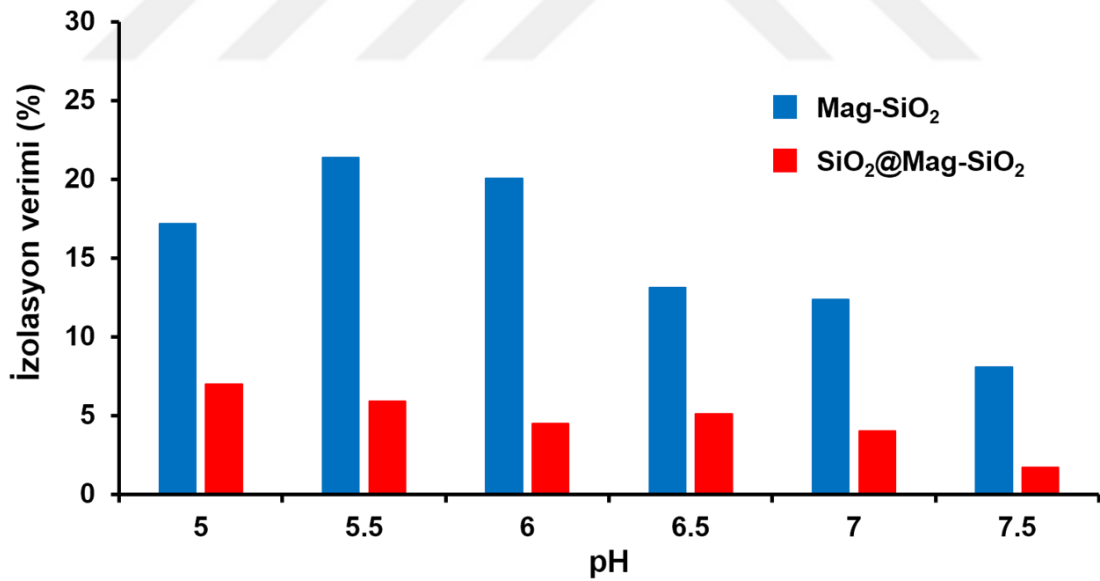
İnsan genomik DNA izolasyon çalışmalarında kullanılacak uygun sorbent türü belirlenmiştir. Deneylerde manyetik silika mikroküreler (Mag-SiO₂) ve SiO₂ kaplı manyetik silika mikroküreler (SiO₂@Mag-SiO₂) sorbent olarak çalışılmıştır. İki sorbent türü için, DNA başlangıç derişimi 400 ng/μl değerinde tutularak, farklı pH değerlerine sahip olan adsorpsiyon tamponunda (1X TE tamponu + 6M Gu-HCl, 1 ml) izolasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemi sırayla; 1) adsorpsiyon, 2) alkol-su yıkaması, 3) desorpsiyon basamaklarını içermektedir. Desorpsiyon basamağında yaygın olarak kullanılan, 1XTE pH 8.5 tamponu, desorpsiyon tamponu olarak tercih edilmiştir. Her iki sorbent türü kullanılarak yapılan izolasyon çalışmalarında adsorpsiyon ortamındaki pH değişiminin dengede adsorplanan DNA miktarına, desorpsiyon ve izolasyon verimlerine, izole edilen DNA miktarına etkisi sırasıyla Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14'de verilmektedir.



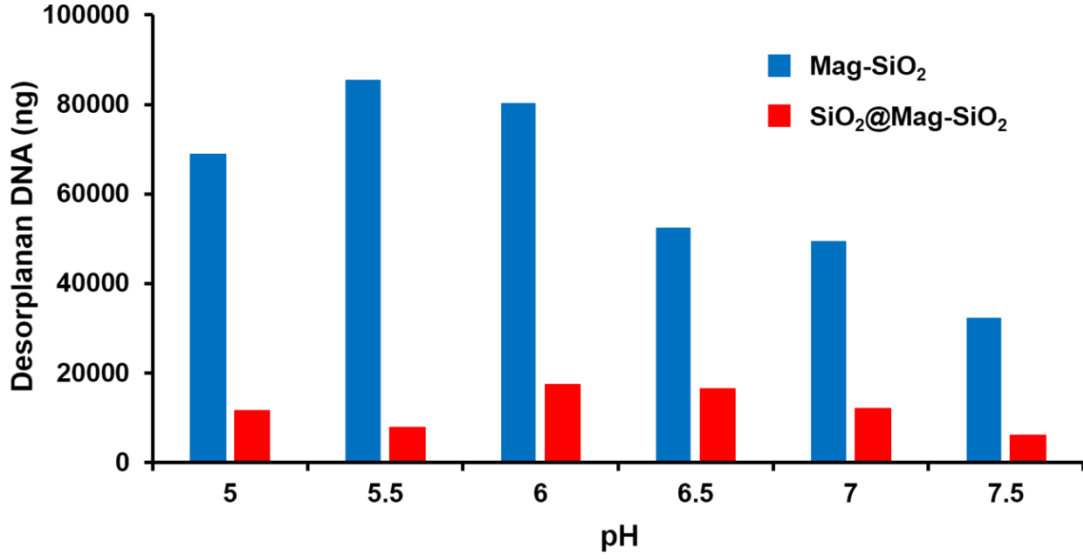
Şekil 4.11. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO₂ ve SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen denge DNA adsorpsiyonu değerleri. Sorbent derişimi: 10 mg/ml, DNA derişimi: 400 ng/μl, adsorpsiyon ortamı hacmi: 1 ml, adsorpsiyon koşulları 2 saat, 100 cpm/dak. Desorpsiyon hacmi: 1 ml, Desorpsiyon süresi: 1 saat, 100 cpm/dak.



Şekil 4.12.Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO₂ ve SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen desorpsiyon verimi değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



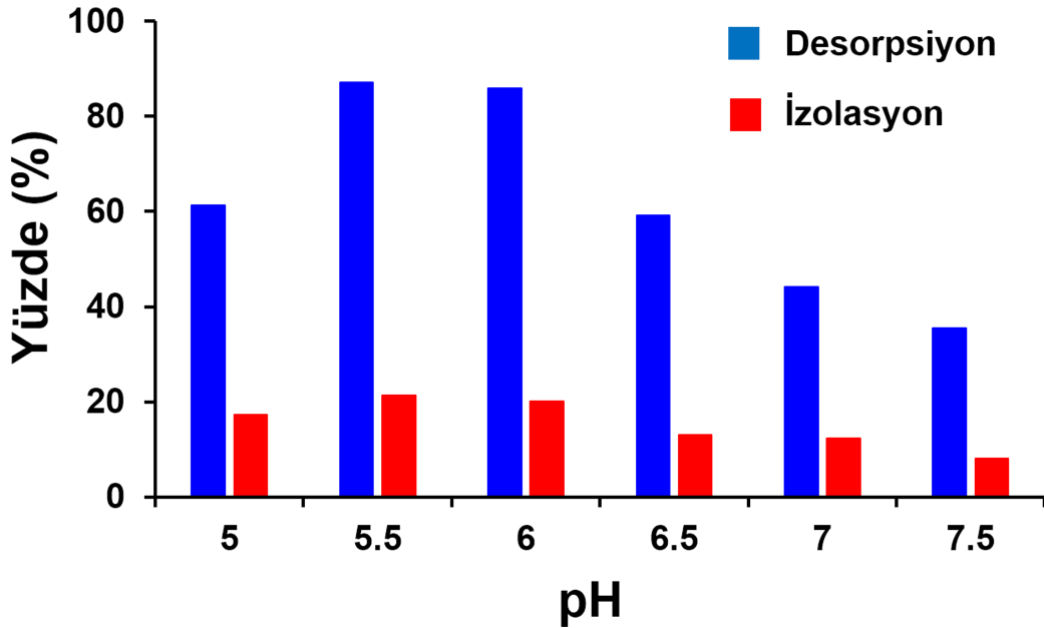
Şekil 4.13.Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO₂ ve SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentleri kullanılarak elde edilen izolasyon verimi değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı pH değerine sahip adsorpsiyon ortamlarında Mag-SiO₂ ve SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentleri kullanılarak izole edilen DNA miktarı değerleri. Koşullar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

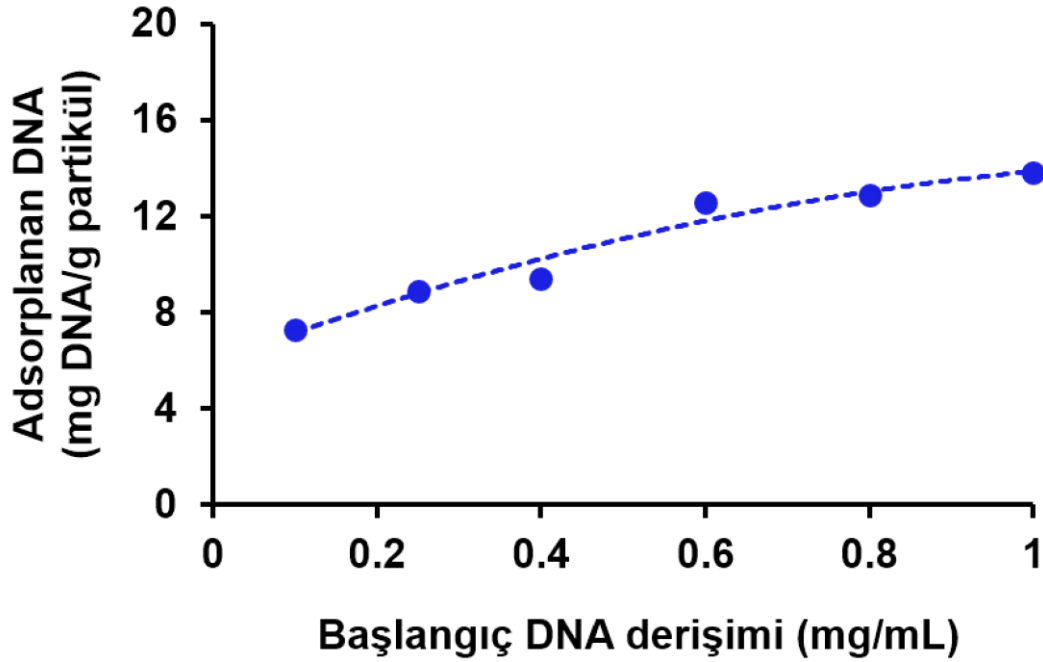
Mag-SiO₂ sorbentinin, SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentine kıyasla, farklı pH değerlerine sahip adsorpsiyon tamponuyla yapılan çalışmalarda daha yüksek denge DNA adsorpsiyonu elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.11). pH 6.0-7.0 aralığında, insan genomik DNA adsorpsiyonu için bu farklılık net olarak gözlenmiştir. Söz konusu pH aralığında, desorpsiyon verimi yönünden Mag-SiO₂ sorbenti ile SiO₂@Mag-SiO₂ sorbenti arasında belirgin bir farklılık gözlenmemektedir (Şekil 4.12). DNA izolasyon verimlerinin ve izole edilen DNA miktarlarının Mag-SiO₂ sorbentinde SiO₂@Mag-SiO₂ sorbentine kıyasla daha yüksek olduğu Şekil 4.13 ve 4.14 üzerinde gösterilmiştir. İki sorbent arasındaki farkın en önemli nedeni olarak 4.1.3’de açıklanan özgül yüzey alanları arasındaki fark olduğu düşünülmektedir. Manyetik silika mikrokürelerin silika katman ile kaplanması sonucunda özgül yüzey alanı 249 m²/g’den 80 m²/g değerine düşmektedir. Bu düşüş nedeniyle dengede adsorplanan DNA miktarı azalmaktadır. Bu durum silika kaplı mikrokürelerin desorpsiyon ve izolasyon veriminin ve izole edilen DNA miktarının azalmasına neden olmaktadır. Bu sebeple tez kapsamında, insan tam-kan deneylerinde kullanılmak üzere, Mag-SiO₂ sorbentinin seçimi uygun görülmüştür.

Manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika (Mag-SiO₂) mikroküreler ile tampon ortamında yapılan insan genomik DNA (hgDNA) izolasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir. Bu çalışmalarda kullanılmak üzere, insan genomik DNA'sı Sigma-Aldrich, A.B.D. (D7011) tarafından temin edilmiştir. Tez kapsamında ilk olarak Mag-SiO₂ sorbentinin, farklı pH değerlerine sahip adsorpsiyon tamponlarındaki denge DNA adsorpsiyon etkisi incelenmiştir. Bu aşamada adsorpsiyon ortamı hacmi 1 ml, başlangıç DNA konsantrasyonu 400 ng/μl, sorbent derişimi ise 10 mg/ml olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon aşaması oda sıcaklığında (25 °C) ve ön deneyler sonucu belirlenen 2 saatlik süre boyunca 300 rpm karıştırma hızıyla gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon ortamının pH değeri değiştirilerek, Mag-SiO₂ sorbenti için denge desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin karşılaştırılması (%) Şekil 4.15'de gösterilmiştir. En iyi desorpsiyon ve izolasyon verimi pH 5.5-6.0 değerlerinde gözlenmiştir. Bu sonuç literatürde kullanılan silika bazlı DNA izolasyon sorbentleri ile benzer bir davranışı göstermektedir [51]. Bu sonuçlara göre manyetik özelliğe sahip silika mikroküreler ile kesikli sistemde yapılacak olan diğer DNA izolasyon deneylerinin pH 6.0 tampon ortamında yapılması uygun bulunmuştur.

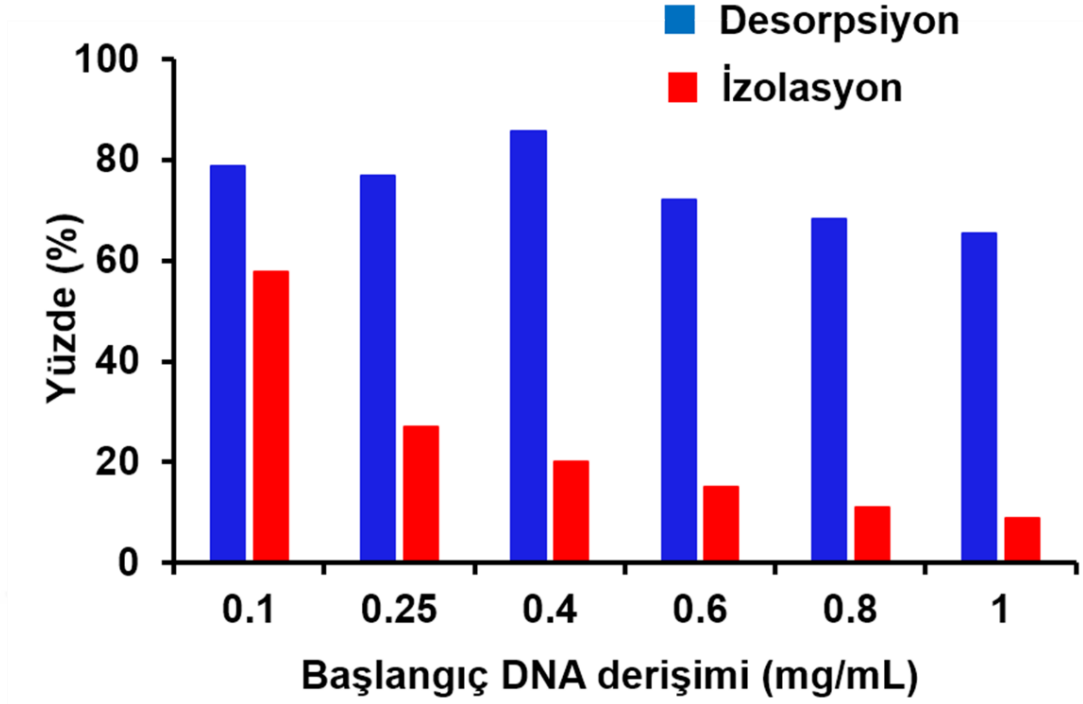


Şekil 4.15. Kesikli sistemde DNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin karşılaştırılması.

Farklı DNA derişimlerinde, sorbentin denge DNA adsorpsiyonuna etkisi ve adsorpsiyon-desorpsiyon verimleri Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir. Burada adsorpsiyon hacmi 1 ml, adsorpsiyon ortam pH’ı 6 ve sorbent derişimi ise 10 mg/ml olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon deneyleri oda sıcaklığında (25 °C), 300 rpm karıştırma hızı ile 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16’da görüldüğü gibi, artan başlangıç DNA derişimine karşılık olarak sorbentin denge DNA adsorpsiyon değeri artış göstermiştir. Elde edilen grafikte maksimum denge DNA adsorpsiyon değeri yaklaşık 14 mg DNA/g mikroküre olarak elde edilmiştir. Literatürdeki benzer sorbentlerin denge DNA adsorpsiyonları ile yapılan karşılaştırmada sentezlenen manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerin denge DNA adsorpsiyon değerinin iyi düzeyde olduğu söylenebilir [52].

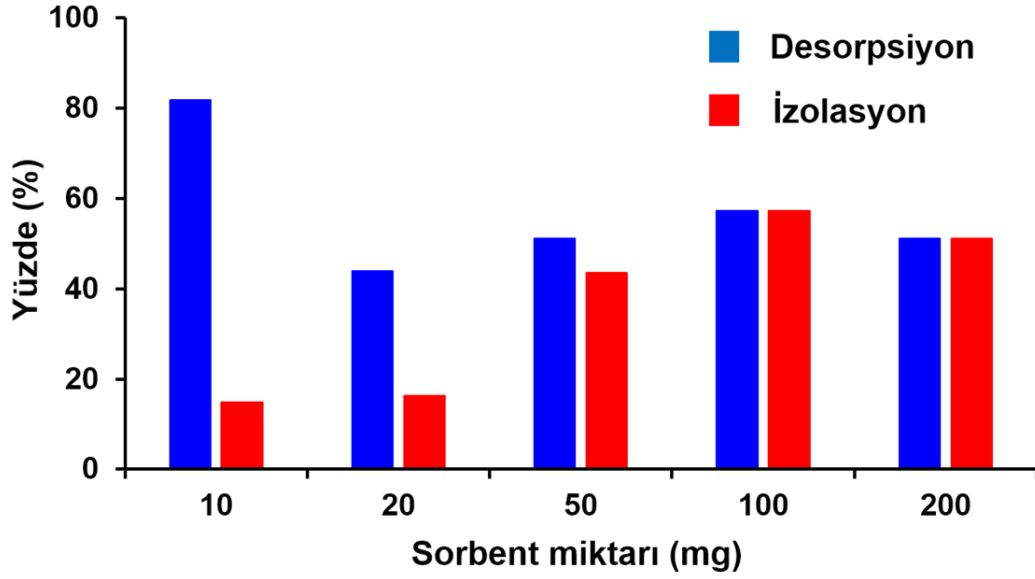


Şekil 4.16. Kesikli sistemde denge DNA adsorpsiyonunun DNA başlangıç derişimi ile değışimi.



Şekil 4.17. Kesikli sistemde hgDNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin adsorpsiyon ortamındaki hgDNA derişimi ile değışimi.

Bundan sonraki çalışmada ise sorbent derişiminin denge DNA adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Burada DNA başlangıç derişimi 400 ng/μl, adsorpsiyon hacmi 1 ml, adsorpsiyon ortamı ise pH 6'da tutulmuştur. Adsorpsiyon koşulları yukarıda belirtilen koşullar ile aynıdır. Sorbent derişiminin desorpsiyon ve izolasyon verimlerine etkisi Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Kesikli sistemde hgDNA desorpsiyon ve izolasyon verimlerinin sorbent derişimi ile değişimi.

Şekil 4.18’de görüldüğü gibi sorbent derişimi ile birlikte desorpsiyon verimi azalarak platoya ulaşmakta, izolasyon verimi ise başlangıçta beklendiği şekilde artış göstermektedir ancak daha sonra belirli bir plato değerinde kalmaktadır. Artan sorbent derişimi ile DNA izolasyon veriminde artış olması beklenen bir özelliktir. Yüksek sorbent derişimlerinde izolasyon ve desorpsiyon verimlerinin birbirine eşit olduğı görülmektedir. Bu durumun nedeni sorbent tarafından ortamda bulunan DNA’nın tamamının adsorplanmasıdır fakat burada önemli olan kısım desorpsiyon verimidir. Adsorplanan DNA ancak belli oranda sorbent tarafından desorplanabilmektedir. Bundan dolayı artan sorbent derişimlerinde DNA kazanımı kısıtlanmaktadır. Şekil 4.18’deki durum değerlendirilecek olursa tampon ortamında bulunan genomik DNA’nın 100 veya 200 mg/ml sorbent derişimlerinde maksimum %50-60 oranında izole edilebileceğı görülmüştür.

4.4. Kesikli Sistem ile İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

Tez kapsamında, kesikli sistem ile insan genomik DNA izolasyonu çalışmalarının ardından, manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli silika mikroküreler ile insan tam-kan örneğinden DNA izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu aşamada yapılan deneylerde insan tam-kan örneğine 3.3.2.3’de anlatılan lizat hazırlama prosedürü uygulanmıştır. Deneylerde ¼ hacim oranıyla lizat/adsorpsiyon tamponu

hazırlanmıştır. Çalışmalarda farklı sorbent miktarlarının (10-200 mg aralığında) DNA izolasyonuna etkisi incelenmiştir. 10 ve 20 mg sorbent ile yapılan DNA izolasyonu çalışmalarında herhangi bir sonuç gözlenememiştir. Bunun nedeni olarak desorplanan DNA derişiminin, ölçümlerin yapıldığı Qubit floresan cihazının minimum okuduğu değerin altında kalmasıdır (Qubit, 2.0 Fluorometer, Q32866-Invitrogen, Thermoscientific, A.B.D.).

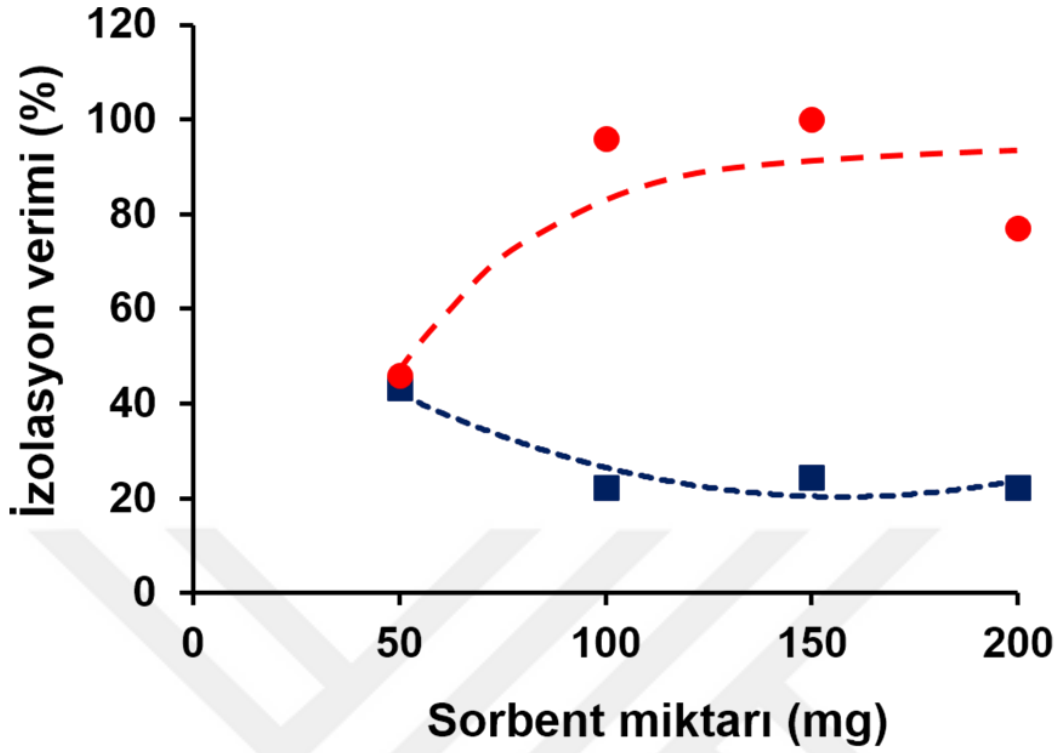
10 ve 20 mg sorbent miktarıyla yapılan çalışmalarda elde edilen veriler beklenen şekilde sonuçlanmadığı için bundan sonra yapılacak çalışmalarda 50 mg'dan daha yüksek sorbent miktarları ile çalışılmıştır. Bu amaçla, yapılan çalışmalardaki izolasyon verimi ve izole edilen DNA miktarının sorbent derişimi ile değışimleri sırasıyla Şekil 4.19 ve 4.20'de verilmiştir.

Tez kapsamında, insan tam-kan örneğinden genomik DNA izolasyonuna yönelik olarak iki farklı yöntem uygulanmıştır. Uygulanan protokolün ilkinde, sorbentler sırasıyla adsorpsiyon ortamı, etanol-su çözeltisi ve desorpsiyon ortamı ile etkileştirilmektedir. Adsorpsiyon aşamasından sonra, DNA adsorpsiyon ortamında bulunan sorbent yüzeyine, lizat ortamındaki diğer lizis elemanları da (özellikle hidrolize proteinler, peptidler vb.) DNA ile birlikte bağlanmakta ve parçalanan proteinlerin sorbent yüzeyinden uzaklaştırılması için literatürde de yaygın olarak kullanılan, etanol-su çözeltisi ile yıkama işlemi uygulanmaktadır. Yıkama işlemiyle istenmeyen lizis elemanları sorbent üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra sorbent desorpsiyon ortamı ile etkileştirilerek, DNA'nın sorbent üzerinden desorpsiyon ortamına geçişi sağlanmaktadır.

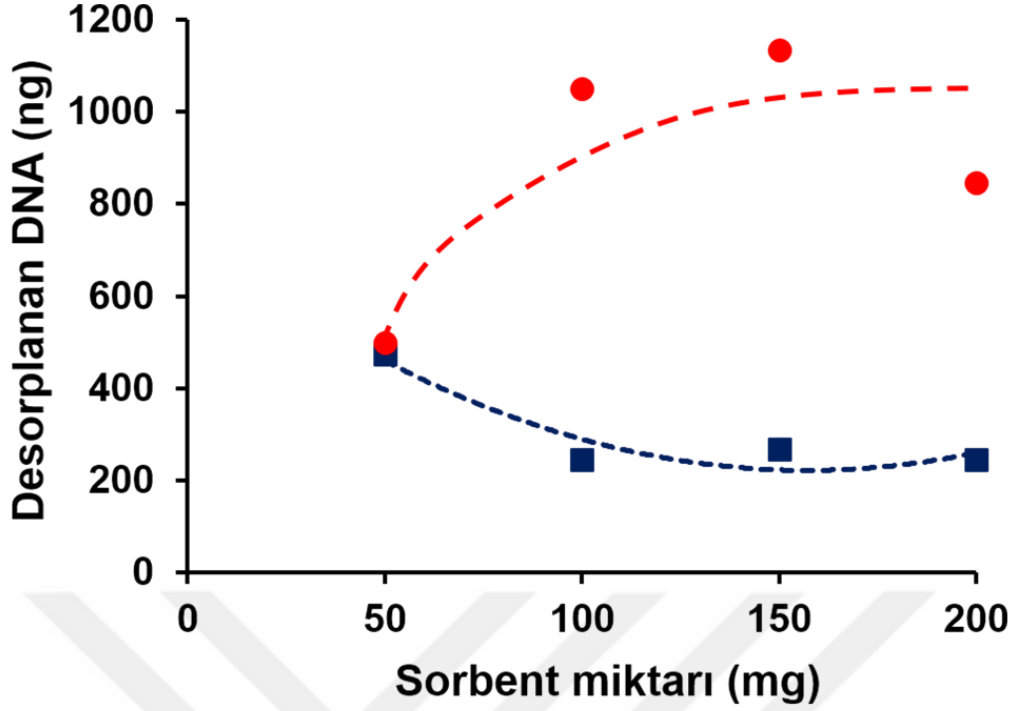
İkinci izolasyon yönteminde ise aynı protokol ekstra bir basamak eklenerek uygulanmıştır. Bu protokolde, adsorpsiyon ve etanol-su ortamları ile etkileşiminin ardından sorbent desorpsiyon basamağına geçmeden önce tekrar kaotropik tuz içeren adsorpsiyon tamponu ile yıkanmıştır ve daha sonra desorpsiyon tamponu ile etkileştirilmiştir. Böylece etanol-su yıkaması ile protein hidroliz ürünlerinin sorbent yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra sorbent yüzeyinde adsorbe durumda olan DNA'nın tekrar kaotropik tuz ile etkileşimi sağlanmıştır. Literatürde belirtildiği gibi, adsorpsiyon sırasında kaotropik tuz kullanımı, DNA molekülünün stabilizasyonunu sağlamaktadır. DNA'nın sorbent yüzeyi ile güçlü-özgül olmayan (non-spesifik) etkileşimlere girmesini sağlamakta ve sorbent üzerine tersinmez (desorbe edilemeyen) formda bağlanmasını engellemektedir. Bu sebepten dolayı,

protokole bu aşama eklenirken, adsorbe DNA moleküllerinin etanol-su yıkaması sonrasında yüzeyden daha kolay şekilde desorbe edilebilmesi hedeflenmiştir.

Şekil 4.19’da verilen izolasyon verimi ve 4.20’de verilen izole edilen DNA miktarları incelendiğinde ikinci yöntemin ilk yönteme kıyasla, özellikle 100 mg ve üzerindeki sorbent miktarları için, çok daha yüksek izolasyon verimi ile DNA kazanımının yapılabildiği görülmüştür. 100 mg ve üzeri sorbent miktarları için etanol-su yıkaması sonrasında, direkt desorpsiyon ortamı kullanılması durumunda izole edilen DNA miktarı %20-25 oranında iken, etanol-su yıkaması sonrasında kaotropik tuz içeren adsorpsiyon tamponu ile yıkama yapılması durumunda %80’den daha yüksek verimler ile DNA izolasyonu yapılabildiği gözlenmiştir. Her iki yöntem arasındaki bu farklılık, etanol-su ortamı ile etkileşim sonrasında adsorbe DNA’nın sorbent yüzeyinden desorpsiyon eğiliminin azalmasına bağlanmıştır. Etanol-su ortamı ile etkileşim sonrasında DNA’nın moleküler konformasyonunda ortaya çıkabilecek olası değişim veya bu ortamda DNA’nın yüzey ile olası hidrofobik etkileşimi bu davranışın nedeni olabilir. Etanol-su yıkaması sonrasında adsorbe DNA’nın kaotropik tuz içeren adsorpsiyon ortamı ile etkileştirilmesi sonucunda bu olasılıklar ortadan kalkmakta ve DNA yüksek bir izolasyon verimi ile geri kazanılabilmektedir. Diğer yandan, izolasyon verimindeki artışa bağlı olarak, izole edilen DNA miktarı da Şekil 4.20’de görüldüğü üzere belirgin şekilde artmıştır.



Şekil 4.19. Kesikli sistemde manyetik silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla insan tam-kan örneğinden hgDNA izolasyonunda izolasyon veriminin sorbent derişimi ile değişimi. Alkol yıkaması sonrasında sorbentin adsorpsiyon ortamı ile etkileştirildiği (●) ve etkileştirilmediği (■) durumda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

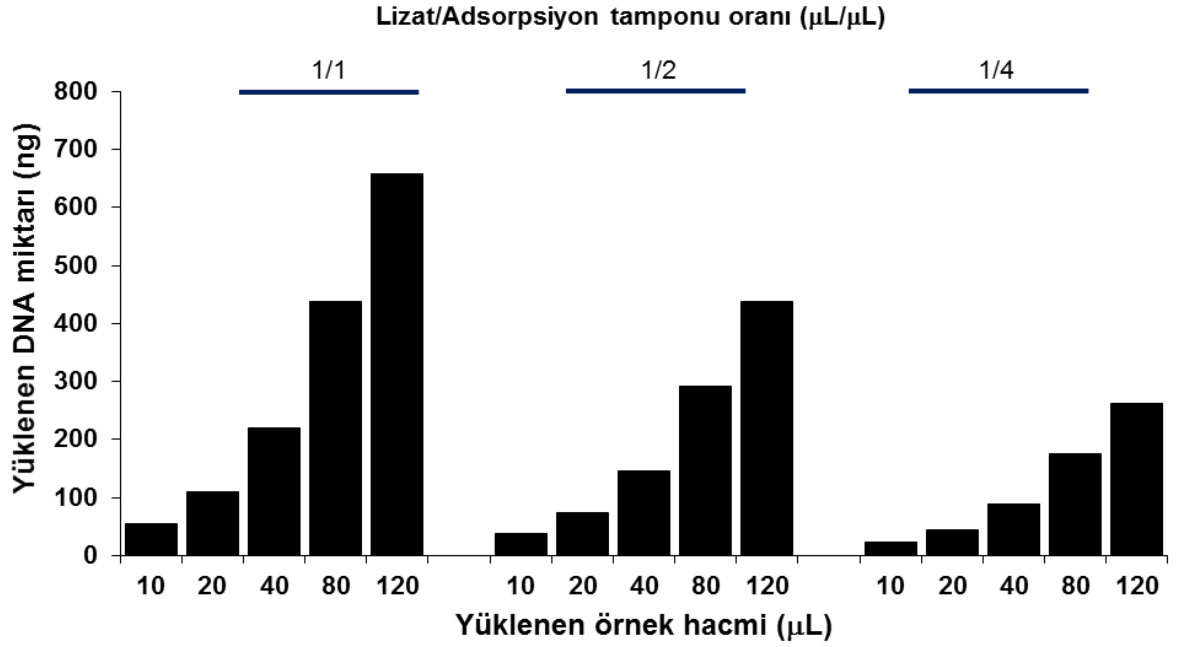


Şekil 4.20. Kesikli sistemde manyetik silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla insan tam-kan örneğinden hgDNA izolasyonunda desorplanan DNA miktarının sorbent derişimi ile değişimi. Alkol yıkaması sonrasında sorbentin adsorpsiyon ortamı ile etkileştirildiği (●) ve etkileştirilmediği (■) durumda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

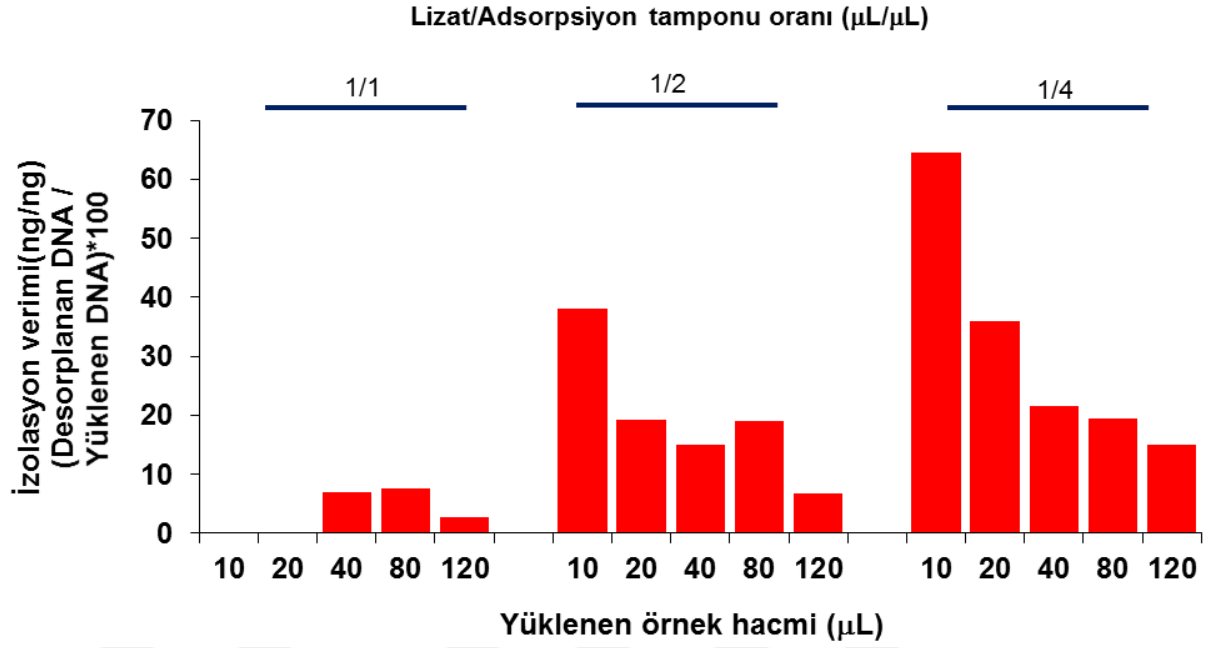
4.5. Tek Beslemeli Sistem İle İnsan Tam-Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

Tek beslemeli sistem kullanılarak tam-kandan DNA izolasyonu için deneylerde, farklı sorbent miktarı, farklı miktarda lizat/adsorpsiyon tamponu hacimsel oranı ve mikroekstraksiyon kolonuna yüklenen farklı miktardaki adsorpsiyon ortamı (lizat + adsorpsiyon tamponu toplam hacmi) kullanılmıştır. Bu deneylerde sorbent olarak makrogözenekli ve mezogözenekli formda iki-dağılımlı (bimodal) gözenek yapısına sahip 5.1 μm boyutundaki monodispers silika mikroküreler kullanılmıştır. Bu seçimin yapılmasının nedeni ise hem kesikli adsorpsiyon sisteminde buzağı DNA'sı, hem de sürekli mikroekstraksiyon sisteminde insan genomik DNA'sı kullanılarak yapılan deneylerde en iyi izolasyon performansının, monodispers silika mikroküreler ile elde edilmiş olmasıdır.

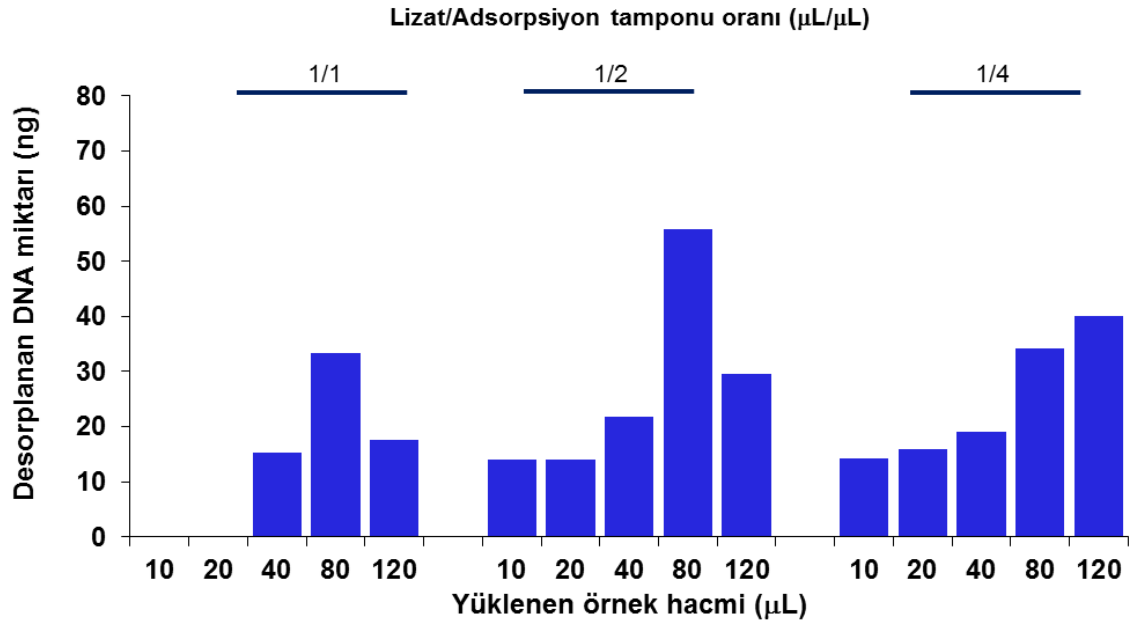
Tam-kandan DNA izolasyonu için monodispers silika örneği silika kapiler mikrokolonda sorbent olarak kullanılmıştır. Lizat/adsorpsiyon çözeltisinin hacimsel oranı, 1/1, 1/2 ve 1/4 değerlerinde denenmiştir. Her bir lizat/adsorpsiyon çözeltisi hacimsel oranı için sisteme yüklenen toplam adsorpsiyon ortamı hacmi 10– 120µl aralığında değiştirilmiştir. Tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminde tam-kandan genomik DNA izolasyonu için, farklı mikroekstraksiyon koşulları (farklı lizat/adsorpsiyon çözeltisi hacimsel oranları ve farklı örnek hacimleri) ile sisteme yüklenen DNA miktarları Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Bu koşullarda elde edilen izolasyon verimi değerleri ve izole edilen DNA miktarları ise sırasıyla Şekil 4.22 ve 4.23’te verilmektedir.



Şekil 4.21. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistemde DNA izolasyonu için farklı mikroekstraksiyon koşulları ile sisteme yüklenen DNA miktarları.



Şekil 4.22. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistem ile DNA izolasyonu için izolasyon veriminin mikroekstraksiyon koşulları ile değişimi.



Şekil 4.23. Tam-kan örneğinden tek beslemeli sistem ile DNA izolasyonu için izole edilen (desorplanan) DNA miktarının mikroekstraksiyon koşulları ile değişimi.

Çizelge 4.1. Literatürde tam-kan'dan DNA izolasyonu yapabilen mikroekstraksiyon sistemlerinin performansları.

DNA sorbent türü	Adsorpsiyon	Desorpsiyon	Verim (%)	M _{DNA} (ng)	Kaynak
APTES modifiye silikon wafer mikrokanal	%10 Triton-X/proteinaz K çözeltisi	0.05 M Na ₂ CO ₃ /0.05 M NaHCO ₃ pH 10.6	34	10	(Nakagawa vd.,2005)
Silikon/Pyrex mikrokanal	1XTE tampon pH 7.5	0.05 M Na ₂ CO ₃ /0.05 M NaHCO ₃ pH 10.6	32	35	(Potrich vd.,2012)
Kitosan modifiye PMMA/PDMS mikrokanal	10 mM MES, pH 5	10 mM Tris+ 50 mM KCl pH 9.0	75	5	(Cao vd.,2006)
Silika monolit	6 M Gu-HCl	10 mM TE, pH 8.5	10	25	(Wu vd.,2006)
Amin modifiye silika monolit	50 mM TE tampon pH 7.0	300 mM K ₂ HPO ₄ pH 10.0	52	52	(Liu vd.,2006)
Kitosan modifiye PMMA mikrokanal	50mM MES/ 1 % Triton X-100 pH 4.24	10 mM Tris/ 50 mM KCl, pH 9	48	6	(Reedy vd.,2011)

(*): Kaynak gösterilen bütün çalışmalarda insan tam-kan örneği kullanılmış olup, 6 nolu referansta, sazan balığı tam-kan örneği kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar ile bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla literatürden alınan ve mikroakış sistemleri ile tam-kan örneğinden DNA izolasyonunu hedefleyen çalışmalarda elde edilen DNA izolasyon verimleri ve izole edilen DNA miktarları, sistemlerin çalışma koşulları ile birlikte Çizelge 4.2'de gösterilmektedir [47, 48, 53-56].

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi sabit lizat hacminde artan adsorpsiyon tamponu hacmi ile mikrokolon içerisine yüklenen DNA miktarları gösterilmektedir. Lizat/adsorpsiyon tamponu oranı 1/1'den, 1/4 değerine çıkarıldığı zaman, DNA izolasyon veriminin ve izole edilen DNA miktarının arttığı görülmektedir. Bu sonuç, DNA adsorpsiyonunun fazla miktarda lizat içeren ortamda, daha az adsorbe olması ile açıklanabilir. Buna ek olarak, fazla miktarda adsorpsiyon tamponu içeren ortamda, kaotropik tuz/DNA ağırlık oranı yükselmekte ve lizis işlemi

sonucunda oluşan ve DNA adsorpsiyonunu zorlaştıran hücrel artıkların (özellikle protein hidroliz ürünleri ve peptidler) derişimleri azalmaktadır. Bu sayede DNA'nın sorbent üzerine adsorpsiyonunu kolaylaştırmakta ve bu durum DNA adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek oranda kaotropik tuz içeren ortamda gerçekleştirilen adsorpsiyon aşaması sayesinde DNA'nın sorbent yüzeyinden desorpsiyonu da daha kolay gerçekleşmektedir. Bu faktörler doğrultusunda yüksek DNA izolasyon verimleri ve izole edilen DNA miktarları 1/2 ve 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu oranları ile elde edilmektedir. Tamkan örneğinden DNA izolasyonunda en yüksek izolasyon verimi %64'dür ve bu sonuç 1/4 lizat/adsorpsiyon tampon oranına sahip 10 µL örnek hacmi ile elde edilmiştir. Bu koşullarda elde edilen izole DNA miktarı ise 14.1 ng'dır. Ayrıca 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu oranı ile bütün örnek yükleme hacimlerinde yeterince yüksek DNA izolasyon verimlerinin ve izole DNA miktarlarının elde edildiği görülmektedir. Aynı sistemle maksimum izole edilen DNA miktarı 55.8 ng'dır (%19 izolasyon verimi) ve bu sonuca 1/2 lizat/adsorpsiyon ortamı oranına sahip 80 µl örnek yükleme hacmi kullanılarak ulaşılmıştır.

Geliştirilen sistemle elde edilen değerler, literatürde mevcut ve DNA izolasyonu için geliştirilmiş mikrokış sistemleri ile Çizelge 4.2'de karşılaştırılmaktadır. Literatürdeki sistemlerde izole edilen DNA miktarlarının, tez çalışmasında izole edilen miktarlara kıyasla daha düşük olması en önemli özelliktir. Bu durum geliştirilen mikroeekstraksiyon sisteminin tamkan örneğinden DNA izolasyonu için oldukça iyi sayılabilecek bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Literatür incelendiğinde bağıl olarak yüksek DNA izolasyon verimlerine ulaşmak için, izole edilen DNA miktarlarının çok düşük (5-6 ng civarında) tutulduğu koşullarda ancak sağlanabildiği görülmektedir [53, 56]. Fakat elde edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için yeterince yüksek miktarda izole edilmesi önem taşımaktadır. Hem DNA izolasyon verimi ve hem de izole edilen DNA miktarının yüksek olduğu durum sazan balığı kanı kullanılmış olan Liu vd., 2009 çalışması ile gözlenebilmektedir.

Çizelge 4.2'de en yüksek izolasyon verimi % 75 olarak kitosan modifiye PMMA/PDMS mikrokanaal ile elde edilmiş ve bu sistemle tamkan örneğinden 5 ng DNA izolasyonu yapılabildiği gösterilmiştir [53]. Tez kapsamında yapılan çalışmada ise monodispers silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı tek beslemeli DNA

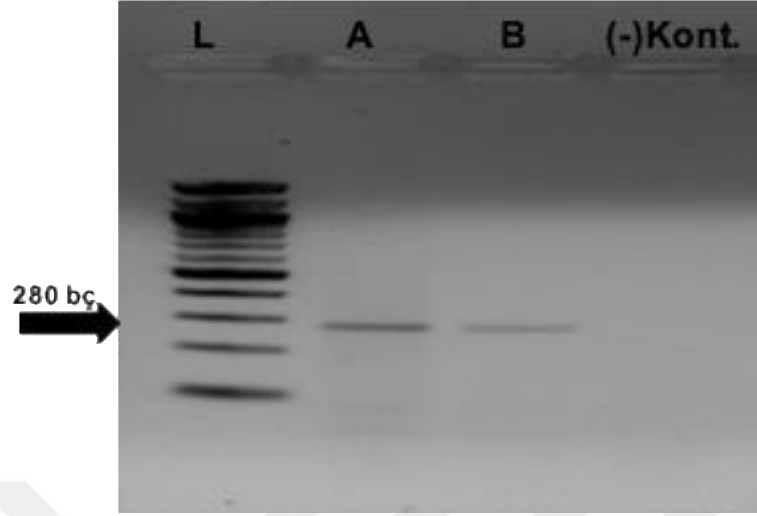
mikroekstraksiyon sistemi ile 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu hacim oranına sahip 10 µL örnek hacmi ile %64 izolasyon verimi ve 14 ng DNA izolasyonu sağlanabilmektedir. Çizelge 4.2’de verilen mikroakış sistemleri için izole edilen DNA miktarı ve izolasyon verimi birlikte düşünüldüğünde en iyi izolasyon performansının geliştirilen mikroekstraksiyon sistemi ile elde edildiği görülmektedir. Bu sonuç, sentezi laboratuvarımızda yapılan yeni sorbentin iyi bir DNA izolasyon performansına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, geliştirilen sistem ile tampon ortamında ve tam-kan ile elde edilen izolasyon performansları değerlendirildiğinde, literatürdeki birçok sorbentin aksine geliştirilen sistemde kullanılan silika bazlı sorbentin izolasyon performansının lizat ortamında bulunan hücresel kalıntılardan ve protein hidroliz ürünlerinden daha az etkilendiği görülmektedir. Bu durumun büyük olasılıkla, geliştirilen sorbentin sahip olduğu iki dağılımlı gözenek yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek DNA adsorpsiyonuna imkan veren ve mezogözenekli yapıdan kaynaklanan yüksek özgül yüzey alanı ve makrogözenekli yapının varlığı ile büyük ölçüde azalan partikül içi difüzyon kısıtlaması ile bu sonucun yakalandığı düşünülmektedir. Monodispers silika’nın sorbent olarak kullanılarak yapılan izolasyon deneylerinde, izole edilen DNA miktarının tamamı desorpsiyon periyodundaki ilk 4 dakikalık süre içerisinde elde edilmiştir. İlk 4 dakikanın ardından toplanan desorpsiyon çözeltisine ait örneklerde DNA varlığına rastlanmamıştır.

4.6. İnsan Tam-Kan Örneğinden İzole Edilen Genomik DNA’nın Karakterizasyonu

4.6.1. Kesikli Sistem ile İzole Edilen DNA’nın Karakterizasyonu

Kesikli sistemde tam-kan’dan manyetik monodispers silika mikroküreler aracılığıyla saflaştırılan genomik DNA ve ticari insan genomik DNA’larının karakterizasyonu için PCR’da 280 bç’lik GAPDH bölgesinin çoğaltılması hedeflenmiştir. Hedef bölgenin çoğaltılmasıyla elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde koşturulmasıyla elde edilen sonuçlar Şekil 4.24’de gösterilmiştir. GAPDH primer çiftinin kullanımıyla A’da insan tam kanından, B’de ise ticari insan genomik DNA’sının hedeflenen bölgelerinin çoğaltımlarının aynı şekilde ve başarıyla gerçekleştiği Şekil 4.24’de görülmektedir. En son kuyuya sadece primer

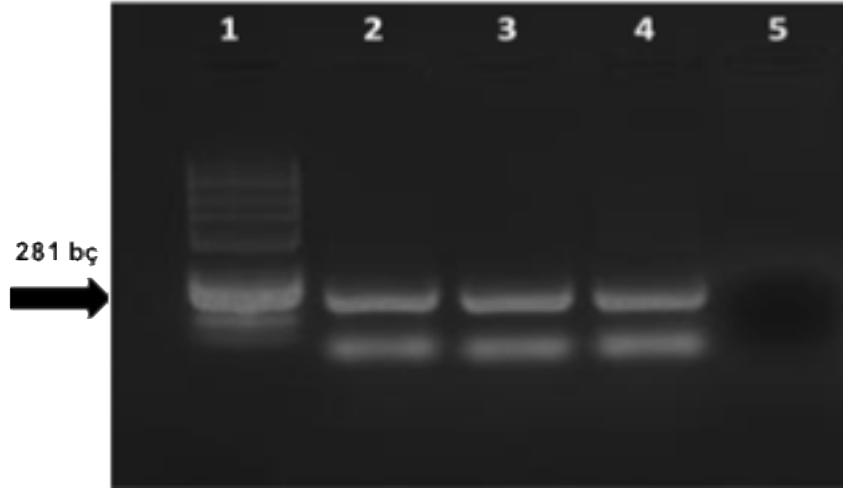
reaktiflerinin konulduğu fakat DNA içermeyen PCR ürünü negatif (-) kontrol olarak konulmuş ve beklenildiği gibi herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.24. Kesikli sistemde tam-kan örneğinden izole edilen ve insan ticari genomik DNA'sının PCR ile çoğaltılmış agaroz jel (yatay) elektroforez görüntüleri. L: 100 bp DNA Ladder, (A): İnsan tam kandan elde edilen DNA, (B): İnsan ticari genomik DNA, (-) Kont: Negatif kontrol

4.6.2. Tek Beslemeli Sistem ile İzole Edilen DNA'nın Karakterizasyonu

Tek beslemeli sistem ile farklı lizat/adsorpsiyon tamponu oranlarını içeren tam-kan'dan izole edilen DNA örneği, GAPDH primer çifti kullanılarak, PCR ile çoğaltılmış ve bu aşamadan sonra agaroz jel (yatay) elektroforezinde koşturulmuştur. Alınan jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.25'te verilmektedir.



Şekil 4.25. Tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminde farklı lizat/adsorpsiyon tamponu oranları ile elde edilen ve PCR ile çoğaltılan DNA örneklerin agaroz jel (yatay) elektroforez görüntüleri. 1. 1 kb DNA Ladder, 2. Pozitif kontrol (insan genomik DNA'sı-Sigma-Aldrich, D7011), 3. Tam-kan örneğinden 1/2 lizat/adsorpsiyon tamponu oranı ile tek beslemeli mikro-ekstraksiyon sisteminde izole edilerek, PCR ile çoğaltılan DNA örneği (örnek hacmi: 120 μ l), 4. Tam-kan örneğinden 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu oranı ile tek beslemeli mikro-ekstraksiyon sisteminde izole edilerek, PCR ile çoğaltılan DNA örneği (örnek hacmi: 120 μ l), 5. Negatif kontrol (distile su).

Buradan görüldüğü gibi GAPDH primer çifti ile yapılan ve PCR ile çoğaltılan DNA bölgesinin uzunluğu beklenen şekilde elde edilmiştir. Farklı lizat/adsorpsiyon tamponu oranları ile tam-kan örneğinden izole edilerek PCR ile çoğaltılan DNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri, saf insan genomik DNA örneğinden alınan jel elektroforez görüntüsü ile çok iyi şekilde eşleşmiştir. Bu sonuç uygulanan mikroekstraksiyon prosedürü ile elde edilen DNA'nın moleküler bütünlüğü korunarak izole edildiğini göstermektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

Tez kapsamında ilk olarak, insan tam-kan örneğinden genomik DNA izolasyonu amacıyla kullanılacak olan, silika mikrokürelerin oluşturulması için poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Polimerik mikroküre sentezinin ardından kesikli sistemde kullanılmak üzere manyetik özelliğe sahip monodispers-gözenekli formda silika mikroküreler ve tek beslemeli mikroekstraksiyon sisteminde kullanılmak üzere monodispers-gözenekli silika mikroküreler sentezlenmiştir.

- Manyetik formda sentezlenen poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin SEM fotoğrafları incelendiğinde dar bir boy dağılımına sahip olduğu gözlenmiştir. Ancak partikül üzerinde ve gözenekli yapı içerisinde manyetik demir oksit birikiminin olması küresel formun bozulmasına neden olmuştur.
- Sentezlenen manyetik poli(MAA-co-EDMA) polimerik mikroküreler üzerinden manyetik silika sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen manyetik yapıya sahip monodispers-formda silika mikrokürelerin ortalama gözenek boyutu 8.6 nm olarak tayin edilmiştir. Yüzeyi tekrar silikayla kaplanan, $\text{SiO}_2\text{@Mag-SiO}_2$, mikrokürelerin ortalama gözenek boyutu 9.8 nm olarak tayin edilmiştir.
- Monodispers silika mikroküreler içinde manyetik özelliğe sahip silika mikrokürelerde kullanılan poli(MAA-co-EDMA) kalıp materyal olarak kullanılmıştır. Sentezlenen monodispers mikrokürelerin ortalama gözenek boyutu, BET yöntemi ile hesaplanarak, 13.5 nm olarak tayin edilmiştir. Hem BET ile gözlenen mezogözenekli yapının hem de SEM ile gözlenen makrogözenekli yapının varlığı sentezlenen mikrokürenin her iki gözenek formunu (mezogözenek ve makrogözenek) bir arada içeren bimodal bir gözenek boy dağılımına sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Sentezlenen silika mikroküreler ile yapılan çalışmalarda, kesikli sistem ve tek beslemeli sistem kullanılarak, insan tam-kan örneğinden DNA izolasyon performansı incelenmiştir.

- Kesikli sistem ile yapılan çalışmalarda ilk olarak ticari olarak alınmış olan insan genomik DNA kullanılmıştır. Burada temel değişkenler, tam-kan deneylerinin en iyi performansta çalışılabilmesi için, optimize edilmiştir.

Deneylerde en iyi performansa sahip olan manyetik partikülün seçimi ve adsorpsiyon tampon ortamının pH'ı belirlenmiş olup, tam-kan deneyleri için seçilen koşullar ile çalışmalar sürdürülmüştür. $\text{SiO}_2@\text{Mag-SiO}_2$ mikrokürelerinin DNA adsorpsiyon-desorpsiyon performansı Mag-SiO_2 mikrokürelere kıyasla daha düşüktür. Adsorpsiyon ortamı pH 6'da hem izolasyon hem de desorpsiyon açısından yüksek verim sağlamıştır. Tam-kan örneğinden yapılan DNA izolasyon çalışmalarında Mag-SiO_2 mikroküreleri ile çalışmış ve adsorpsiyon ortam pH'ı 6 olarak seçilmiştir.

- Kesikli sistemde tam-kan örneğinden DNA izolasyonu için iki farklı prosedür denenmiştir. Bu prosedürlerden ilkinde izolasyon çalışmalarında uygulanan aşamalarda bir değişiklik olmamıştır. İkinci prosedürde ise etanol/su yıkamasından sonra adsorpsiyon tamponu (pH 6) ile yıkama basamağı eklenmiştir. Standart izolasyon prosedüründe elde edilen verim %20-25 civarında iken, adsorpsiyon tamponu eklenmiş prosedürde bu verim %80 civarında seyretmiştir.
- Tek beslemeli sistem için yapılan çalışmalarda hangi lizat/adsorpsiyon tamponu oranının yüksek verimle sonuçlanacağı ve bunun yanında mikrokolon içerisine gönderilen lizat miktarının da izolasyon verimindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda 1/4 lizat/adsorpsiyon tamponu kullanılarak 10 µl örnek hacmine sahip olan sistemin diğerlerine kıyasla daha yüksek izolasyon verimine ulaştığı gözlenmiştir. Bu verim %64'dür ve literatür ile kıyaslandığında bu oran insan tam-kan örneğinden DNA izolasyonu için yüksek bir değerdir.
- Yeni bir sentez yöntemi ile elde edilmiş olan sorbentlerin, literatürdeki örneklerle bakıldığında, insan tam-kan örneğinden DNA izolasyonuna oldukça elverişli olduğu ve yüksek verimle DNA izolasyonu gerçekleştirdiği ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] T. A. Ciulla, R. M. Sklar & S. L. Hauser, "A Simple Method for DNA Purification from Peripheral Blood", *Analytical Biochemistry*, 174 (2), 485-488, **1988**.
- [2] L. M. Kunkel, K. D. Smith, S. H. Boyer, D. S. Borgaonkar, S. S. Wachtel, O. J. Miller, W. R. Breg, H. W. Jones, Jr, & J. M. Rary, "Analysis of Human Y-Chromosome-Specific Reiterated DNA in Chromosome Variants", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (3), 1245-1249, **1977**.
- [3] D. Planelles, F. Llopis, N. Puig & J. Montoro, "A New, Fast and Simple DNA Extraction Method for HLA and VNTR Genotyping by PCR Amplification", *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 10 (3), 125-128, **1996**.
- [4] R. M. McCormick, "A Solid-Phase Extraction Procedure for DNA Purification", *Analytical Biochemistry*, 181 (1), 66-74, **1989**.
- [5] P. S. Walsh, D. A. Metzger, and R. Higuchi, "Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material", *Biotechniques*, 10 (4), 506-513, **1991**.
- [6] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, & R. B. Jackson, *Campbell Biology*. Pearson, Boston, **2011**.
- [7] B. J. Bain, *A Beginner's Guide to Blood Cells*. John Wiley & Sons, Massachusetts, **2008**.
- [8] M. Raff, B. Alberts, J. Lewis, A. Johnson & K. Roberts, "Molecular Biology of the Cell", 4. Baskı, Garland Science, New York, **2002**.
- [9] Public Broadcasting Service, Watson and Crick describe structure of DNA, <http://www.pbs.org/wgbh/aso/databank/entries/do53dn.html> (Ocak, **2017**).
- [10] L. Dean, Blood Groups and Red Cell Antigens, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/-ch1.1.3.2> (Ağustos, **2016**).
- [11] University of Rochester Medical Center, What Are White Blood Cells?, <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=160&ContentID=35> (Nisan, **2016**).
- [12] L. Pray, "Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick", *Nature Education*, 1 (1), 100, **2008**.
- [13] National Human Genome Research Institute, Deoxyribonucleic Acid (DNA), <https://www.genome.gov/25520880/deoxyribonucleic-acid-dna-fact-sheet/> (Ekim, **2016**).
- [14] W. S. Klug, M. R. Cummings, C. A. Spencer, M. A. Palladino & S. M. Ward, *Concepts of Genetics*. Pearson, **2009**.
- [15] L. Buckingham & M. L. Flaws, *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods & Clinical Applications*. F.A. Davis, Philadelphia, **2007**.
- [16] U.S. National Library of Medicine, What is DNA?, <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/dna> (Ocak, **2017**).

- [17] S. Aldridge, *The Thread of Life: The Story of Genes and Genetic Engineering*. Cambridge University Press, Cambridge, **1996**.
- [18] D. Chacon-Cortes & L. R. Griffiths, "Methods for Extracting Genomic DNA from Whole Blood Samples: Current Perspectives," *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, (2), 1-9, **2014**.
- [19] S. C. Tan & B. C. Yiap, "DNA, RNA and Protein Extraction: The Past and The Present", *BioMed Research International*, 2009, 1-10, **2009**.
- [20] F. M Carpi, F. Di Pietro, S. Vincenzetti, F. Mignini & V. Napolioni, "Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications," *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 5 (1), 1-7, **2011**.
- [21] S. Suguna, D. Nandal, S. Kamble, A. Bharatha & R. Kunkulol, "Genomic DNA Isolation from Human Whole Blood Samples by Non Enzymatic Salting Out Method," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (6), 198-199, **2014**.
- [22] M. V. Cseke, L. J. Kirakosyan, A. Kaufman & P. B. Westfall, *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRC Press, Boca Raton, **2011**.
- [23] J. Sambrook & D. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [24] A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter & H. M. Goodman, "Rat Insulin Genes: Construction of Plasmids Containing the Coding Sequences", *Science*, 196 (4296), 1313-1319, **1977**.
- [25] J. M. Chirgwin, A. E. Przybyla, R. J. MacDonald & W. J. Rutter, "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry*, 18 (24), 5294-5299, **1979**.
- [26] P. Chomczynski & N. Sacchi, "The Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On", *Nature Protocols*, 1 (2), 581-585, **2006**.
- [27] R. Dahm, "Friedrich Miescher and the Discovery of DNA", *Developmental Biology*, 278 (2), 274-288, **2005**.
- [28] L. Tilzer, S. Thomas & R. F. Moreno, "Use of Silica Gel Polymer for DNA Extraction with Organic Solvents," *Analytical Biochemistry*, 183 (1), 13-15, **1989**.
- [29] J. V. Ness, B. M. Cimler, R. B. Meyer Jr. & N. M. Vermeulen, "Non Toxic Compositions and Methods Useful for the Extraction of Nucleic Acids", U.S. Patent 5,393,672, **1995**.
- [30] S. A. Miller, D. Dykes & H. Polesky, "A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA From Human Nucleated Cells", *Nucleic Acids Research*, 16 (3), 1215, **1988**.
- [31] F.L. Greene, D.L. Page, I.D. Fleming, A. Fritz, C.M. Balch, D.G. Haller & M. Morrow (eds.), "Breast", *AJCC Cancer Staging Manual*, 6. Baskı, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, 223-240, **2002**.

- [32] J. Grimberg, S. Nawoschik, L. Belluscio, R. McKee, A. Turck & A. Eisenberg, "A Simple and Efficient Non-Organic Procedure for the Isolation of Genomic DNA from Blood", *Nucleic Acids Research*, 17 (20), 8390-8390, **1989**.
- [33] D. K. Lahiri & J. I. Nurnberger Jr., "A Rapid Non-Enzymatic Method for the Preparation of HMW DNA from Blood for RFLP Studies", *Nucleic Acids Research*, 19 (19), 5444, **1991**.
- [34] A. Bahl & M. Pfenninger, "A Rapid Method of DNA Isolation Using Laundry Detergent", *Nucleic Acids Research*, 24 (8), 1587, **1996**.
- [35] J. Drábek & M. Petrek, "A Sugar, Laundry Detergent and Salt Method for Extraction of Deoxyribonucleic Acid from Blood", *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*, 146 (2), 37-39, **2002**.
- [36] J. N. Gaaib, A. F. Nassief & A. Al-Assi, "Simple Salting-Out Method For Genomic DNA Extraction from Whole Blood", *Tikrit Journal of Pure Science*, 16 (2), 1813-1662, **2011**.
- [37] H. Nasiri, M. Forouzandeh, M. Rasaei & F. Rahbarizadeh, "Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent", *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19 (6), 229-232, **2005**.
- [38] C. W. Price, D. C. Leslie & J. P. Landers, "Nucleic Acid Extraction Techniques and Application to the Microchip", *Lab on a Chip*, 9 (17), 2484-2494, **2009**.
- [39] S. Herzer, "DNA Purification", *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, (ed.: A. S. Gerstein), John Wiley and Sons, 167-196, **2001**.
- [40] F. Gavazaj, I. Mikerezi, V. Morina, B. Gavazaj & F. Cakaj, "Short Tandem Repeats (STR) Used as DNA Markers and Their Stability under the Effect of Environmental Factors", *Journal of International Environmental Application and Science*, 7 (5), 967-970, **2012**.
- [41] J. M. Butler, "DNA Extraction from Forensic Samples Using Chelex", *Cold Spring Harbor Protocols*, 4 (6), 5229, **2009**.
- [42] D. B. Seligson & E. J. Shrawder, "Method of Isolating and Purifying Nucleic Acids from Biological Samples", U.S. Patent 4,935,342, **1990**.
- [43] R. Boom, C. Sol, M. Salimans, C. Jansen, P. Wertheim-van Dillen & J. Van der Noordaa, "Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids", *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), 495-503, **1990**.
- [44] T. L. Hawkins, T. O'Connor-Morin, A. Roy & C. Santillan, "DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase", *Nucleic Acids Research*, 22 (21), 4543, **1994**.
- [45] Z. Saiyed, C. Bochiwal, H. Gorasia, S. Telang & C. Ramchand, "Application of Magnetic Particles (Fe₃O₄) for Isolation of Genomic DNA from Mammalian Cells", *Analytical Biochemistry*, 356 (2), 306-308, **2006**.

- [46] Z. Saiyed, C. Ramchand & S. Telang, "Isolation of Genomic DNA Using Magnetic Nanoparticles as a Solid-Phase Support", *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20 (20), 204153, **2008**.
- [47] L. Liu, S. Yu, S. Yang, P. Zhou, J. Hu & Y. Zhang, "Extraction of Genomic DNA Using a New Amino Silica Monolithic Column", *Journal of Separation Science*, 32 (15-16), 2752-2758, **2009**.
- [48] Q. Wu, J. M. Bienvenue, B. J. Hassan, Y. C. Kwok, B. C. Giordano, P. M. Norris, J. P. Landers & J. P. Ferrance, "Microchip-Based Macroporous Silica Sol-Gel Monolith for Efficient Isolation of DNA from Clinical Samples", *Analytical Chemistry*, 78 (16), 5704-5710, **2006**.
- [49] J. Wen, C. Guillo, J. P. Ferrance & J. P. Landers, "Microfluidic-based DNA Purification in a Two-stage, Dual-phase Microchip Containing a Reversed-phase and a Photopolymerized Monolith," *Analytical Chemistry*, 79 (16), 6135-6142, **2007**.
- [50] Z. Ma, Y. Guan & H. Liu, "Synthesis and Characterization of Micron-sized Monodisperse Superparamagnetic Polymer Particles with Amino Groups", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43 (15), 3433-3439, **2005**.
- [51] J. Wen, L. A. Legendre, J. M. Bienvenue & J. P. Landers, "Purification of Nucleic Acids in Microfluidic Devices", *Analytical Chemistry*, 80 (17), 6472-6479, **2008**.
- [52] S. Intorasoot, J. Techateerawat & A. Intorasoot, "Genomic DNA Isolation from Dried Blood Using Gelatin-coated Magnetic Particles", *Current Science*, 105 (1), 81-84, **2013**.
- [53] W. Cao, C. J. Easley, J. P. Ferrance & J. P. Landers, "Chitosan as a Polymer for pH-induced DNA Capture in a Totally Aqueous System", *Analytical Chemistry*, 78 (20), 7222-7228, **2006**.
- [54] T. Nakagawa, T. Tanaka, D. Niwa, T. Osaka, H. Takeyama & T. Matsunaga, "Fabrication of Amino Silane-coated Microchip for DNA Extraction from Whole Blood", *Journal of Biotechnology*, 116 (2), 105-111, **2005**.
- [55] C. Potrich, L. Lunelli, L. Pasquardini, D. Sonn, D. Vozzi, R. Dallapiccola, L. Marocchi, I. Ferrante, O. Rossotto & C. Pederzoli, "One-shot Genetic Analysis in Monolithic Silicon/Pyrex Microdevices", *Biomedical Microdevices*, 14 (6), 1103-1113, **2012**.
- [56] C. R. Reedy, C. W. Price, J. Sniegowski, J. P. Ferrance, M. Begley & J. P. Landers, "Solid Phase Extraction of DNA from Biological Samples in a Post-based, High Surface Area Poly (Methyl Methacrylate)(PMMA) Microdevice", *Lab on a Chip*, 11 (9), 1603-1611, **2011**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sevim Eda ÖĞÜT

Doğum Yeri : Gaziantep

Medeni Hali : Bekar

E-posta : eda.ogut@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Lab. 12

Beytepe/ANKARA

Eğitim

Lise : Gaziantep Anadolu Lisesi, Yabancı Dil Ağırlıklı, Gaziantep

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce : İleri Düzey

Almanca : Başlangıç Düzeyi

İş Deneyimi

- 02/2017 – ... : Biyolog (Sanko Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Gaziantep)
- 05/2015 – ... : Şirket Müdürü (Partech Yazılım Donanım Mühendislik Biyoteknoloji Nanoteknoloji Elektronik Ar-Ge Enerji Danışmanlık İthalat İhracat Sanayi ve Ticaret Ltd. Şirketi, Ankara), T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Teknogirişim Desteği
- 09/2012 – 10/2012 : Yaz Stajı (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara)
- 07/2011 – 08/2011 : Yaz Stajı (Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep)

Deneyim Alanları

- Polimer Teknolojileri
- Mikroakışkan Sistemleri

- Biyoteknoloji
- DNA Ekstraksiyon Çalışmaları
- Biyokimya
- Klinik Araştırmalar
- Nanoteknoloji

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- Polimerik Formda Mikro Akışkanlar Dinamiği Tabanlı Nükleik Asit Mikro-Ekstraksiyon Platformu Geliştirilmesi, Tübitak (213S140), Proje Dönemi: 01/10/2014 – 01/10/2016, Bütçe: 414.112 TL.
- Fonksiyonel Gruplu Formda Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi ve Biyoteknolojik Uygulama Performanslarının Belirlenmesi, Tübitak (115M615), Proje Dönemi: 01/10/2015 – 01/04/2017, Bütçe: 301.815 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- Gunal G, Kip C, **Ogut E**, İlhan H, Kibar G, Tuncel A, 2017, Comparative DNA isolation behaviors of silica and polymer based sorbents: Monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, Artif Cells Nanomed Biotechnol :1-7.
- Gunal G, Kip C, **Ogut E**, Usta DD, Senlik E, Kibar G, Tuncel A, 2017, Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica- and polymer-based stationary phases, Materials Science and Engineering: C, Volume 74: 10–20.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Ali Tuncel, Gülçin Günal, **Eda Öğüt**, Hasan İlhan, Çiğdem Kip, DNA Isolation Performance of Monodisperse-Porous Polymer Microspheres Functionalized with Different Ligands As Sorbents In Microfluidic System, HPLC 2015, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Geneva, Switzerland, 21-25 Haziran, **2015**.

- Ali Tuncel, Hasan İlhan, Gülçin Günal, **Eda Öğüt**, Çiğdem Kip, DNA Isolation Performance of Plain/Magnetic Silica Microspheres with Bimodal Pore-Size Distribution Using Mesoporous Silica Microspheres as A Reference Material, HPLC 2015, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Geneva, Switzerland, 21-25 Haziran, **2015**.
- **E. Öğüt**, Ç. Kip, G. Günal, D.D. Usta, H. İlhan, A.Tuncel, A Microfluidic Human Genomic DNA Extraction System Using Monodisperse-Porous Silica Microspheres with Bimodal Pore Size Distribution, HPLC 2016, 44th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Francisco, ABD, 19-24 Haziran, **2016**.
- G. Günal, **E. Öğüt**, D. D. Usta, K. Salimi, M.C. Demir, Ç. Kip, A. Tuncel, Magnetic-monodisperse silica microspheres for human genomic DNA microextraction in-batch fashion, HPLC 2016, 44th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Francisco, ABD, 19-24 Haziran, 2016.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 01/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: MANYETİK VE MANYETİK OLMAYAN SİLİKA BAZLI SABİT FAZLAR KULLANAN DNA MİKROEKSTRAKSİYON SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 64 sayfalık kısmına ilişkin, 01/06/2017 tarihinde şahsım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %1'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

01/06/2017

Adı Soyadı: Sevim Eda ÖĞÜT

Öğrenci No: N13121929

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Programı: Biyomühendislik – Yüksek Lisans

Statüsü: ☒ Y. Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL