

**TROMBİN VE LİZOZİM’İN ÖZGÜN APTAMER
KULLANILARAK ZENGİNLEŞTİRİLMELERİ VE KÜTLE
SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNLERİ**

**ENRICHMENT OF THROMBIN AND LYSOZYME USING
SPECIFIC APTAMER AND THEIR DETECTION BY MASS
SPECTROMETER**

ÜLKÜ GÜLER

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Mehmet SAÇAK

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Bekir SALİH

Üye :.....
Prof. Dr. Günay KİBARER

Üye :.....
Prof. Dr. Belma IŞIK

Üye :.....
Doç. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TROMBİN VE LİZOZİM'İN ÖZGÜN APTAMER KULLANILARAK ZENGİNLEŞTİRİLMELERİ VE KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNLERİ

ÜLKÜ GÜLER

ÖZ

Aptamerler, çok farklı özelliklerde sentezlenebilen, hedef moleküle yüksek seçicilikle bağlanan, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) oligonükleotitleridir. Aptamerler, hedef moleküllerin (peptitler, proteinler, fosfolipitler, karbonhidratlar, nükleik asitler, ilaçlar, boyalar, enzimler ve aminoasitler gibi) üç boyutlu yapılarını yüksek afinite ve seçicilik ile tanıyabilmektedir. Aptamerler, afinite ve duyarlılıkları bakımından antikorlara alternatif adaylardır. Protein-antiprotein etkileşimleri protein-aptamer etkileşimlerine göre daha zayıftır. Protein- aptamer kompleksleri için ayrışma denge sabitinin (K_{ds}) değeri 10^{-9} - 10^{-12} M aralığındadır.

Aptamerlerin yukarıda bahsedilen uygun olan özelliklerinden dolayı, tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kan serumunda düşük miktarlarda bulunan lizozim enziminin ve trombin proteinin aptamer bağlı polimerik yüzeylerde yüksek seçicilikle zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak, Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı Kütle Spektrometresi (MALDI-Kütle Spektrometresi) ile yapılacak analizlerde kullanılacak en uygun matriksin tespit edilmesi çalışmaları lizozim enzimi, lizozim aptameri ve lizozim enzimi-aptamer kompleksleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler için uygun olan matriksler tespit edildikten sonra, lizozim enzimi zenginleştirilmesinde kullanmak amacıyla, amin fonksiyonel gruplu polistiren divinil benzen (PS-DVB) polimerik yüzeylerine Sülfö-Süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1- karboksilat (Sulfo-SMCC) çapraz bağlayıcısı aracılığıyla, 5' ucunda -SH fonksiyonel grubu bulunan lizozim aptamerinin kovalent olarak bağlanmasıyla aptamer bağlı yüzeyler elde edilmiştir. Lizozim enzimiyle muamele edilen yüzeyler üzerinde tripsin enzimi ile parçalama işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen ürünler, MALDI-Kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Alınan sonuçlar değerlendirildiğinde, 0.07 pmol/ μ L gibi çok düşük lizozim enzimi derişimine sahip örnek içerisinde lizozim enziminin başarıyla zenginleştirilebildiği görülmüştür. Ayrıca, farklı proteinlerin de içerisinde bulunduğu

karmaşık örnek çözeltileri kullanılarak MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan zenginleştirme çalışmalarında geliştirilen malzeme ve yöntem kullanılarak lizozim enziminin yüksek seçicilikle zenginleştirildiği gözlenmiştir. Trombin proteininin zenginleştirme çalışmaları da aynı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Trombin proteini zenginleştirmesi için kullanılan amin fonksiyonel gruplu PS-DVB polimerik yüzeylere de Sulfo-SMCC çapraz bağlayıcısı aracılığıyla, 5' ucunda SH fonksiyonel grubu bulunan trombin aptameri kovalent olarak bağlanarak aptamer bağlı yüzeyler elde edilmiştir. Trombin proteini ile muamele edilen yüzeyler üzerinde tripsin enzimi ile parçalama işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen peptit türleri, MALDI-Kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Alınan sonuçlara göre, 0.0007 pmol/µL derişimdeki trombin, bulunduğu örnek içerisinde başarıyla zenginleştirilmiştir. Ayrıca, farklı proteinlerin de içerisinde bulunduğu karmaşık örnek çözeltileriyle yapılan zenginleştirmelerde, MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan analizler sonucunda, lizozim enzimine ait peptit fragment kütlelerinin sinyalleri, seçiciliğin yüksek olduğunu göstermiştir. Son olarak, doğal örnek olarak kullanılan kan plazmasından trombin proteininin zenginleştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan analiz sonuçlarına göre, tez kapsamında geliştirilen malzeme ve yöntem kullanılarak trombin proteininin kan serumundan yüksek seçicilikle zenginleştirilebildiği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Oligonükleotit, Aptamer, Antikor, Sulfo-SMCC, Trombin, Lizozim, Kütle Spektrometresi, protein zenginleştirilmesi

Danışman: Prof. Dr. Bekir Salih, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

ENRICHMENT OF THROMBIN AND LYSOZYME USING SPECIFIC APTAMER AND THEIR DETECTION BY MASS SPECTROMETER

ÜLKÜ GÜLER

ABSTRACT

Aptamers are Deoxyribonucleic acid (DNA) and Ribonucleic acid (RNA) oligonucleotides that can be synthesized in a variety of properties and bind to target molecule with very high selectivity. Aptamers recognize the three dimensional structure of the target molecules (such as peptides, proteins, phospholipids, carbohydrates, nucleic acids, drugs, dyes, enzymes and amino acids) with high specificity and affinity. Aptamers are alternative candidates to antibodies in respect to their sensitivities and affinities. Protein - antiprotein interactions are weaker than the interactions between protein and aptamer. Dissociation equilibrium constants of protein- aptamer complexes (K_d s) are in the range of 10^{-9} - 10^{-12} M.

Due to the convenient properties of the aptamers mentioned above, in the scope of this thesis, the aim of the study is to enrich the lysozyme and thrombin on the aptamer attached polymeric surfaces. Firstly, proper Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS) matrices were chosen for analysis of lysozyme enzyme, lysozyme aptamer and lysozyme enzyme-lysozyme aptamer complexes. After determining the matrices for lysozyme enrichment, lysozyme aptamer, which has the SH- functional group at 5' end, was attached to the amine functionalized polystyrene divinyl benzene particles (PS-DVB) covalently using Sulfo-Succinimidyle-4-(N-maleimidomethyl) siklohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) crosslinker. After the incubation of lysozyme enzyme solutions with the aptamer attached polymeric surfaces, the tryptic digestion was applied. Then the digest solution was being analyzed using MALDI-MS. When the analysis results were taken into consideration, it was seen that even very low concentration of lysozyme such as 0.07 pmol/ μ L could be detected as the result of enrichment. Also, enrichment of the lysozyme process was applied to the complex sample solutions which include a number of proteins were analyzed using MALDI-MS and it was observed that lysozyme enzyme could be enriched with high

selectivity from the very complicated protein matrix solutions. The same procedure was also applied to the enrichment of thrombin protein. For thrombin enrichment, thrombin aptamer which has the SH- functional group at 5' end was attached to the amine functionalized PS-DVB particles covalently using Sulfo-SMCC crosslinker. The aptamer attached polymeric particulates were incubated with thrombin solution and then tryptic digestion was applied. When the digest solution was analyzed using MALDI-MS following the enrichment, it was noticed that 0.0007 pmol/ μ L thrombin could be detected. The process was also applied to the enrichment of thrombin from the complex sample solution which includes different type of proteins at high concentrations. The results obtained from MALDI-MS showed that thrombin could be enriched from the complex solution with high selectivity. Finally, the enrichment of the thrombin from human plasma as a real complex sample was studied. According to the results obtained from MALDI-MS, it was observed that thrombin could be enriched from the human blood plasma sample with high selectivity using the efficient materials developed in this study.

Keywords: Oligonucleotide, Aptamer, Antibody, Sulfo-SMCC, Thrombin, Lysozyme, Mass Spectrometry, Protein enrichment.

Supervisor: Prof. Dr. Bekir Salih, Hacettepe University, Department of Chemistry

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince, yüksek ilminin yanı sıra, insani ve ahlaki yönü ile de ilerlemek istediğim yolda bana ışık tutan, sabrını ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, çok değerli hocam, sayın Prof. Dr. Bekir Salih' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli bilgileri ve deneyimleriyle çalışmalarına katkıda bulunup bakış açımı genişleten, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, motivasyon ve moral takviyeleri ile de beni hep destekleyen, sayın hocam Dr. Ömür Çelikbıçak' a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Sareg ekibine katıldığım ilk günden beri gerek hocalığı, gerek arkadaşlığı ile her zaman yardımına koşan, bilgilerini benimle her daim paylaşan, özellikle tez çalışmamda bana çok destek olan, yardımseverliği anlatılmakla bitmeyecek Arş. Gör. Mehmet Atakay' a her zaman minnettar kalacağım.

Laboratuvarda geçirdiğim süreyi güzel sohbetleri, güleryüzleri ile keyifli ve huzurlu bir hale getiren, ihtiyacım olduğunda benden yardımlarını esirgemeyen, Arş. Gör. H. Mehmet Kayılı, Aslı Çal, Ayşegül Özgen, Funda Yıldırım, Selim Gerişlioğlu, Burak Tavşanlı, Gizem Kaynar, Selin Özdemir ve tüm SAREG ekibine teşekkür ederim.

Amerika' dan elektronik postaları ile ihtiyacım olduğunda bilgi ve deneyimlerini bana aktaran sayın hocam Basri Gülbakan' a teşekkür ederim.

Tez kapsamında kullanılan kan plazmasını temin eden sayın hocam Dr. Oytun Portakal' a teşekkür ederim.

Tez kapsamında kullanılan amin fonksiyonel gruplu 'PS-DVB' malzemesinin sentezlenmesindeki katkılarından dolayı sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Cengiz Uzun' a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince iyi ve kötü her anımda, tüm samimiyetleri ve sevgileri ile yanımda olan canım arkadaşlarım Hacer Acar, Petek Özдорuk ve Gürkan Tokat' a teşekkür ederim.

Sonsuz destekleri ve fedakarlıkları ile her daim yanımda olan, attığım her adımda güvenlerini ve desteklerini arkamda hissettiğim biricik aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antikorlar	4
2.2. Oligonükleotit - Protein Etkileşimi	5
2.3. Aptamerler	5
2.3.1. Antikor- Aptamer Karşılaştırması	6
2.3.2. Aptamerin hedef molekül tanımlaması ve etkileşimleri	8
2.3.3. Aptamer seçimi	9
2.3.4. Aptamer Uygulamaları	10
2.3.4.1 Aptamerlerin Analitik Uygulamaları	10
2.3.4.2. Aptamerler ile yapılan ek uygulamalar	11
2.3.4.3. İmmünohistokimya	11
2.3.5. Aptamer immobilizasyonu	11
2.3.5.1 Altın üzerine direk bağlama	12
Düzlemsel altın yüzeylerde tiyoller	12
Altın parçacıklar üzerinde tiyoller	14
2.3.5.2. İşlevsel Olarak Modifiye Edilmiş Yüzeylere Kovalent Bağlanma ...	14
Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Genel Kimyası	14
Altın üzerinde kendiliğinden biraraya gelmiş tabakaların üzerine aptamer bağlanması	16
Silikat ve silisyum alt-tabakalar	16
Biyokaplamalar	17
2.3.6. Aptamerlerin 5' ve 3' bağlanmalarının karşılaştırılması	17

2.4. KÜTLE SPEKTROMETRESİ	18
2.4.1. Kütle spektrometresi çalışma prensibi	18
2.4.1.1. Örnek verme sistemi.....	19
2.4.1.2. İyon Kaynağı.....	19
İyonlaştırma.....	20
2.4.1.3. Kütle Analizörü	21
2.4.1.4. Dedektörler	23
2.4.2. Ardışık Kütle Spektrometresi (MS/MS)	24
2.4.3. Yeni nesil kütle spektrometreleri	24
2.4.3.1. Matriks-yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı - Uçuş Zamanlı- Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)	25
MALDI sisteminin prensipleri.....	26
Örnek hazırlama.....	26
İyonlaştırma Prensipleri.....	29
Kütle Analizörü	31
Lineer uçuş zamanlı kütle spektrometresi	32
Reflektron uçuş zamanlı kütle spektrometresi.....	33
İyonların belirlenmesi	33
2.4.3.2. Elektrosprey iyonlaştırmalı-kütle spektrometresi (ESI-MS).....	34
2.4.4. Biyomoleküller ve Kütle Spektrometresi.....	35
2.4.4.1. Peptit ve Proteinler	36
2.4.5. ESI and MALDI nin peptit ve protein analizlerinde kullanımı.....	36
2.4.7. Oligonükleotitlerin kütle spektrumları	39
2.5. Biyokonjugasyon kimyası	40
2.5.1. Heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar.....	41
2.5.1.1. SMCC ve Sülfo-SMCC	41
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR	43
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	43
3.2. Lizozim enzimi, lizozim aptameri ve enzim-aptamer komplekslerinin MALDI- Kütle Spektrometresi ile analizleri	43
3.2.1. Kullanılan MALDI matrikslerin hazırlanışları	44
3.3. Kompleks oluşumu üzerine tampon çözeltisinin etkisinin incelenmesi	46

3.4. Kompleks oluşumuna tuz etkisinin incelenmesi	47
3.5. Lizozim enziminin ve lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin tripsin ile parçalanma ürünlerinin MALDI-MS ile analizleri	47
3.6. BSA ve Sitokrom c proteinlerinin çözeltide tripsin enzimi ile parçalanması:48	
3.7. Aptamer bağlı polimerik yüzeylerde enzim ve protein zenginleştirilmesi	48
3.7.1. Katı yüzey üzerinde proteolitik parçalanmanın incelenmesi.....	49
3.7.2. MALDI örneklerinin hazırlanması	50
3.8. Lizozim enziminin aptamer bağlı polimerik yüzeyde zenginleştirilmesi	50
3.9. Düşük derişimde lizozim enzimi çözeltisinin çözeltide tripsin ile parçalanmasının incelenmesi.....	51
3.10. Trombinin çözeltisinin analizi.....	51
3.11. Tripsin ile parçalanmış trombin peptitlerinin bulunduğu çözeltinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizi	51
3.12. Trombinin aptamer bağlı polimerik yüzeylerde zenginleştirilmesi.....	51
3.13. Düşük derişimde trombin proteininin çözeltide tripsin ile parçalanmasının incelenmesi	52
3.14. Kan plazmasından trombin zenginleştirilmesi	53
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1. Lizozim enzimi, lizozim aptameri ve enzim-aptamer komplekslerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile incelenmesi	54
4.1.1. Lizozim enzimi analizi için uygun MALDI matriksi seçimi.....	54
4.1.2. Lizozim aptameri analizi için uygun MALDI matriksinin seçilmesi	55
4.1.3. Enzim-aptamer kompleksi için uygun MALDI-Kütle spektrometresi şartlarının belirlenmesi.....	57
4.1.3.1 Kompleks oluşumu üzerinde tuz etkisinin incelenmesi	61
4.1.3.2. Kompleks oluşumu üzerinde tampon çözelti etkisinin incelenmesi	63
4.2. Lizozim enziminin ve lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin, BSA ve Sitokrom c proteinlerinin tripsin enzimi ile parçalanma ürünlerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizleri	64
4.3. Lizozim enziminin aptamer bağlı polimerik yüzeyde zenginleştirilmesi	69
4.4. MALDI-Kütle Spektrometresi ile Trombin analizi.....	74
4.4.1 Tripsin ile parçalanmış trombin peptitlerinin bulunduğu çözeltinin analizi	75
4.4.2 Aptamer bağlı polimerik yüzeyde trombin zenginleştirilmesi.....	76

5. SONUÇLAR	84
KAYNAKLAR.....	867
ÖZGEÇMİŞ	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aptamerlerin yüzeylere kovalent bağlanmaları için yaygın olarak kullanılan reaksiyon dizileri. CDI sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik karbonildiimidazol, SMCC sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik süksinimidil 4 (Nmaleimidometil) sikloheksan- 1-karboksilat, EDC sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimiddir.....	15
Şekil 2.2. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.	19
Şekil 2.3. MALDI desorpsiyon iyonlaşma sürecinin şematik olarak gösterimi.....	30
Şekil 2.4. Uçuş zamanlı kütle spektrometresinde refletron ve lineer modun şematik olarak birlikte gösterimi.	33
Şekil 2.5. Sülfö-SMCC' nin antikor-enzim bağlanmasındaki rolü.....	42
Şekil 3.1. Kullanılan MALDI matrikslerinin molekül yapıları.	44
Şekil 3.2. Aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.	49
Şekil 4.1. Lizozim enzimi çözeltisinin değişik matriksler kullanılarak MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri. (A) 3-HPA matriksi kullanılarak gerçekleştirilen lizozim enzimine ait MALDI-Kütle Spektrometresi analizi, (B) DHB matriks ile lizozim enziminin MALDI analizi, (C) HABA matriks ile lizozim enziminin MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi, D) SA matriksi ile lizozim enziminin MALDI analizi ve E) THAP matriks çözeltisi ile lizozim enziminin MALDI analizi.....	55
Şekil 4.3. DHB 2 matriksi kullanılarak analiz edilen 1:1 mol oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğe ait pozitif iyon ve lineer mod da alınmış MALDI-Kütle spektrumu.	58
Şekil 4.4. ATT 1 matriksi kullanılarak analiz edilen mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğe ait pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu.	59
Şekil 4.5. Lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksi pozitif iyon ve lineer mod da MALDI-Kütle spektrometresi analizleri. (A) DHB 4 matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spektrumu, (B) ATT 2 matriks çözeltisi mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spektrumu, (C) DHB 5 MALDI matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spektrumu ve (D) ATT 3 matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spektrumu.....	61
Şekil 4.6. CaCl ₂ ve MgCl ₂ çözeltilerinin aptamer-enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra DHB 3 matriksi kullanılarak alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları (A) 20 mM CaCl ₂ , (B) 10 mM CaCl ₂ , (C) 5 mM CaCl ₂ , (D) 1 mM CaCl ₂ , E) 10 mM MgCl ₂	62

Şekil 4.7 Çeşitli tampon çözeltiler kullanarak, DHB 3 matriksi ile gerçekleştirilen aptamer-enzim kompleksinin alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrometresi spektrumları (A) 100 mM NaCl ve 10 mM MgCl₂ içeren 20 mM Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi ile, (B) MgCl₂ içeren Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi ile, (C) MgCl₂ içeren Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi kullanılarak, ısıtılıp soğutulmuş aptamer çözeltisine lizozim enzimi çözeltisi eklenmesi ile ve D) 20 mM Tris-HCl pH= 7.5 tampon çözeltisi ile. 64

Şekil 4.8. CHCA matriksi kullanılarak çözeltide lizozim enziminin tripsin ile parçalanma ürünlerinin MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri. (A) 2 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) 18 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (C) 24 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu..... 65

Şekil 4.9. CHCA matriksi kullanılarak çözeltide lizozim enziminin disülfid bağları kırıldıktan sonra tripsin ile parçalanma ürünlerinin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumları. (A) 2 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) 18 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu ve (C) 24 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu. 66

Şekil 4.10. CHCA matriksi kullanılarak çözeltide lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin tripsin ile parçalanma ürünlerinin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu. 67

Şekil 4.11. Disülfid bağları kırılmış BSA proteininin tripsin enzimi ile parçalanma ürünlerinin CHCA MALDI matriksi kullanılarak elde edilen pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu. 67

Şekil 4.12. CHCA matriksi kullanılarak disülfid bağları kırılmış Sitokrom c proteininin tripsin enzimi ile parçalanma ürünlerinin pozitif iyon ve lineer mod da elde edilen MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu. 68

Şekil 4.13. Aptamer bağlı polimerik yüzeyde lizozim enzimi zenginleştirilmesi. (A) 7 pmol/µL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi, (B) 0.7 pmol/µL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi ve C) 0.07 pmol/µL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi. 70

Şekil 4.14. 0.07 pmol/µL derişimindeki disülfid bağları kırılmış lizozim enzimi çözeltisinin tripsin ile parçalama uygulandıktan sonra yapılan MALDI-Kütle spektrometresi analiz spektrumu..... 71

Şekil 4.15. Lizozim enzimi çözeltisi ile muamele edilmiş kontrol aptameri bağlı polimerik yüzeyde enzimatik parçalama sonucunda elde edilen peptit fraksiyonlarının pozitif iyon ve lineer mod kütle spektrumu. 72

Şekil 4.16. Lizozim enzim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde 7 pmol/µL lizozim enziminin, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi

sonucunda alınan MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları. (A) Lizozim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında lizozim enzimi zenginleştirilmesi analizi sonucundaki pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (B) Kontrol aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında lizozim enzimi zenginleştirilmesi sonucunda alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu..... 73

Şekil 4.17. Lizozim enzim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde 0.7 pmol/μL lizozim enziminin, BSA ve Sitokrom C proteinleri varlığında zenginleştirilmesi sonucunda alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu..... 74

Şekil 4.18. 7 pmol/μL derişimdeki Trombin proteini çözeltisinin DHB 1 matriksi ile alınmış pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu. 75

Şekil 4.19. Disülfid bağları kırılmış trombin proteinin, CHCA matriksi kullanılarak elde edilen pozitif iyon ve lineer mod MALDI-kütle spektrumu. 76

Şekil 4.20. (A) Trombin bağlayıcı aptamerin G-quadrupleks yapısı. (B) X- ışını ile aptamer-trombin etkileşimi (C) NMR ile aptamer-Trombin etkileşimi..... 77

Şekil 4.21. Trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde trombin zenginleştirilmesi amacı ile elde edilen pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumları. (A) 0.7 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi, (B) 0.07 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi, (C) 0.007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi ve (D) 0.0007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi. 78

Şekil 4.22. Disülfid bağları kırıldıktan sonra tripsin ile çözeltide parçalanmış 0.0007 pmol/μL trombin çözeltisinin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu.. 79

Şekil 4.23. Aptamer bağlanmış polimerik yüzeyde trombinin, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi. (A) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.7 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.07 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (C) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (D) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.0007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu..... 81

Şekil 4.24. Trombin ile muamele edilmiş kontrol aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde tripsin ile proteinin enzimatik olarak parçalanması sonucunda elde edilen peptitlerin pozitif iyon ve lineer modda alınan MALDI-kütle spektrumu. 82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aptamer-antikör karşılaştırması.....	7
Çizelge 2.2. Kütle spektrometrisinde kullanılan analizör çeşitleri.	21
Çizelge 2.3. MALDI matrislerinin kullanımı.	28
Çizelge 2.4. MALDI için kullanılan lazer kaynakları.	29
Çizelge 4.1. Tripsin enzimi ile parçalanmış lizozim enzimi, BSA ve Sitokrom c proteinlerine ait peptit fragmentlerinin kütleleri.	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ACN	Asetonitril
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskop
ATT	6-aza-2-tiyotiyamin
B	Manyetik Alan
BSA	Sığır Serum Albümini
C	Sitozin
CDI	1,1' - karbonildiimidazol
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
CID	Çarpışma ile oluşturulan parçalanma
Da	Dalton
DHB	2,5-dihidroksi benzoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	1,4-Ditiyotreitol
E	Elektriksel Alan
EI	Elektron iyonlaştırmalı
ESI	Elektro spre y iyonlaştırma
FAB	Hızlı atom bombardımanı
FTICR	Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans
FT-OT	Fourier dönüşümlü orbitrap
G	Guanin
HABA	2-(4'-Hydroksibenzenazo) benzoik asit
IT	İyon tuzaklı
KCE	Kinetik Kapiler Elektroforez
Kds	Ayrışma Denge Sabiti
m/z	Kütle-yük oranı
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
MCP	Çok kanallı plaklar

MS ⁿ	Ardışık kütle spektrometresi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pM	Pikomolar
PS-DVB	Polistiren divinil benzen
Q	Dörtlütuplu
QCM	Kuarts kristal mikrodenge
RAIRS	Yansımali absorpsiyon infrared spektroskopi
RNA	Ribonükleik asit
SA	3,5–Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit
SAM	Kendiliğinden biraraya gelmiş tek tabaka
SELEX	Üstel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi
SLD	Lazer desorpsiyonlu yumuşak iyonlaştırmalı
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
Sulfo-SMCC	Sülfo-Süksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1-karboksilat
T	Timin
TFA	Trifloroasetik Asit
THAP	2',4',6'-Trihidroksiasetofenon
TOF	Uçuş zamanlı
U	Urasil
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopi
3-HPA	3-Hidroksipikolinik asit

1. GİRİŞ

Nükleik asitler genel adıyla bilinen deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA), canlıların hücrelerinde bulunan genetik maddeyi oluştururlar. DNA ve RNA'nın, fosfat grupları-azotlu bazlar-monosakkaritleri bir arada içeren temel yapıtaşlarına nükleotid adı verilir. Oligonükleotitler, nükleotidlerin birbirleriyle reaksiyona girerek fosfodiester bağlarıyla oluşturduğu moleküller, yani kısaca DNA ya da RNA zincirleridir. Genetik şifrenin temel nükleotit alt-birimi bazdır. DNA'da dört çeşit baz bulunmaktadır. Bunlar, pürin adı verilen çift halkalı bileşikler olan adenin (A) ile guanin (G); pirimidin adı verilen tek halkalı bileşikler olan timin (T) ile sitozin (C) dir. RNA'da genetik şifrede kullanılan bazlar adenin, guanin, sitozin ve urasil (U) dir. Urasil, RNA'da, DNA'da timinin bulunduğu yerlerde bulunan bir pirimidindir. DNA üzerinde yan yana bulunan her 3 bazlık dizilim kodon (3 harften oluşan kod) olarak isimlendirilen bir şifreyi oluşturur. Her bir kodon, içerdiği bazların cinsi ve sırasına bağlı olarak belirli bir aminoasit'i şifreler (genetik şifre). Canlı hücrelerinde 20 farklı aminoasit bulunmakta olup bu aminoasitlerin dizilim şekli, oluşan proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını belirler. Aminoasitler yan zirlerinde bulunan yapılarındaki gruplarının (R) farklı olmasına göre değişik adlar alırlar. Az sayıda aminoasit birleşmesiyle peptitler, çok sayıda aminoasit birleşmesiyle proteinler oluşur. 1960 ve 1970 den beri genetik mühendisliği ve moleküler biyolojinin gelişmesiyle, proteinler ve oligonükleotit dizileri arasındaki çok özgün etkileşimlerle karşılaşmak olağan hale gelmiştir. Bunlara örnek olarak hedef bölünme dizileri transkripsiyon faktörleri ve bunların dizilimine özgün DNA promotor öğeleri verilebilir. Nükleik asit-protein komplekslerinin yapıları hakkında bilgi sahibi olmak, biyolojik olayların nasıl gerçekleştiğini anlamak için oldukça önemlidir. Bu bilgiler ışığında, transkripsiyon, translasyon, replikasyon, rekombinasyon ve genomik hasarlar gibi biyolojik süreçler hakkında, hastalık tedavi ve teşhisleri için çok önemli olan bilgiler elde edilebilir (Lopez-Colon et al., 2011). Tek zincirli nükleik asitlerin üç boyutlu kompleks yapısı, temel yapısı nedeniyle hücre içi hibridizasyonu sağlar ki belirli bir moleküler şekil katlanmaya başlar. Bu moleküler şekil, yüksek bağlanma afinitesine ve üç boyutlu yapısına bağlı olarak, şekle özel tanımlanan hedef moleküle bağlanmaya yardımcı olur. Aptamerler, yaklaşık 15-60 bazdan oluşan, tek zincirli RNA ve DNA oligonükleotitleridir. Teşhis ve tedavi edici özelliğe sahip olan hücresel hedefler

için seçilirler. Nükleozitlere, organik boyalara, aminoasitlere, peptitlere, proteinlere, virüslere, ilaçlara ve hücrelerdeki hedef proteinlere, 1 pikomolar (pM) ile 1 nanomolar (nM) arasında değişen denge sabitleri (Kds) ile bağlanabilirler. Proteinlere seçici ve kuvvetli olarak bağlanabilen afinite ajanları olan antikörlara kıyasla, aptamerler antikor kullanımındaki zorlukların aksine çok fazla avantaja sahiptir. Aptamerler ucuzdur ve kimyasal olarak sentezlenebilmeleri sayesinde kısa sürede elde edilebilirler. Kimyasal olarak kararlı, modifiye edilebilen ve raf ömrü uzun yapılardır. Aptamerler, biyolojik örneklerdeki düşük miktarlarda bulunan proteinlerin tayinlerinde biyo-işaretleyici olarak kullanılabilirler ve bu sayede oldukça fazla matriks yaratabilecek protein karışımlarından hedef molekülün izole edilmesini sağlarlar. Aptamerler, üstel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi (SELEX) adı verilen, 10^{13} - 10^{16} tek zincirli RNA veya DNA zincirleri içeren gelişigüzel kütüphanelerden kombinasyonla seçilirler. Toggle-SELEX, Tailored-SELEX, Photo-SELEX gibi çeşitli SELEX protokolleri ile istenilen özgün özelliklere sahip aptamerler elde edilebilir. Aptamerler, altın parçacıklar ya da yüzeyler, silika veya silikat tabakalar, polimerik yüzeyler gibi çeşitli tabakalara kovalent olarak bağlanıp, immobilize edildikten sonra hedef molekülü yakalayıcı yüzeylerin oluşturulmasında kullanılabilirler. Aptamerler, çok çeşitli hedef moleküllere bağlanabilmeleri sayesinde, analitik, biyoanalitik ve tanısal uygulamalar gibi birçok sayıda uygulamada kullanılabilmektedirler.

Bu çalışmada hedef olarak seçilen proteinler trombin ve lizozimdir. Trombin ve lizozim insan vücudu için çok önemli proteinlerdir. Trombin, protrombinin aktive edilmiş halidir. Birçok fonksiyona sahip çok yönlü bir proteindir. Kanın pıhtılaşmasında merkez rolü üstlenir. Trombosit aktivasyonunu sağlar. Fibrinin fibrinojene dönüşümünü katalizler. Kanamayı durdurmada da kullanılır. Protein c'nin aktive edilme işleminde trombodülin ile birleşerek, trombin aktive edici fibrinoliz inhibitörü olarak rol alır. Güçlü bir mitojen, çizgisiz kas hücrelerini etkileyici, makrofaj ve endotel hücre olarak ta rol alır. Stokinezin salınmasından, damarlar üzerinde etkili maddelerden ve kimyasallara ilgi duyan maddelerden sorumludur. Epitel tabaka geçirgenliğini artırır, endotel hücrelerin adhezyonunu sağlar. Kas hücrelerinin kılma ve büzülmesini sağlar. Sinirsel hastalıkların ilerlemesini kontrol altına alır ve kas gelişiminde anahtar rol oynar. Trombin üretimi azaldığında ya da trombin eksikliğinde hemofili ortaya çıkar. Uygun olmayan

bölgelerde düzensiz trombin üretimi trombotik tıkanmalara sebep olur. Tümörlerin büyümesine sebep olur ve kemik absorpsiyonunu başlatır. Toplardamar döngüsünde trombozis ve damar pıhtılarının embole oluşu son yıllarda yapılan çalışmalarda belirlenmiş ve patolojiye katkı sağlamıştır. Fakat trombozis için risk teşhis ve koruma metodlarındaki adım adım ilerlemeler oldukça eksiktir. Lizozimler ise, fagositlerden salgılanır. Kan, serum, plazma ve tüm vücut sıvılarında bulunur (burun, boğaz, ağız ve barsak salgıları). En fazla gözyaşında bulunmaktadır. Bakteri duvarındaki N-asetil nuramik asit ve N-asetil glikozamin arasındaki bağı parçalar. Lizozim enzimi mikropları öldürür ve birçok bakteri türünü parçalar. Yukarıda bahsedilen birçok nedenden dolayı hem trombin hemde lizozim canlı organizmada büyük öneme sahip olup bunların çok düşük miktarlarını tayin etmek ve yapılarındaki hangi değişimlerin hangi tür etkilere neden olduğunu belirlemek büyük önem arz etmektedir. Hem düşük miktarlarının zenginleştirilip tayin edilebilir duruma getirilmesi hem de aminoasit dizilimlerindeki mutasyonların belirlenip hastalık tanılarında kullanılabilmesi için seçimli olarak diğer protein matriksinden uzaklaştırılması ve önzenginleştirilmesinin yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında trombin ve lizozim aptameri amin fonksiyonlu polimerik matriks üzerine ara bağlantı sağlayan kimyasal ile bağlanıp ön zenginleştirilmesi yapılmış hem de tripsin enzimi ile yüzeydeki trombin ve lizozim enzimatik olarak parçalanıp gözlenebilme değeri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Seçimliliğinin belirlenmesi amacı ile BSA ve Sitokrom c proteinlerinin yüksek oranda bozucu etki yaptığı bir ortamda seçimli olarak çalışılan türlerin zenginleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca trombin ve lizozim'in kontrol aptamerleri ile de özgün seçicilik tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan tüm çalışmalar sonucunda son yıllarda geliştirilen ve protein ve peptitlerin çok düşük derişimlerde detaylı olarak analizi gerçekleştirilen Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı-Kütle Spektrometresi (MALDI-Kütle Spektrometresi) sistemi kullanılmıştır. Ayrıca MALDI-Kütle Spektrometresi ile özgün etkileşimler moleküler temelde analiz edilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antikorlar

Antikorlar (immünoglobulinler) omurgalıların ümmün sistemleri tarafından üretilirler ve virüsler gibi enfeksiyona sebep olan işgalcilerden korunmayı sağlarlar. Antikorlar yabancı moleküllere (antijenlere) özgün olarak bağlanan değişken bir glikoproteinler ailesidir. Antijen-antikor etkileşimlerinin en önemli özelliği onların yüksek özgünlüğü ve affiniteleridir. Antikorlar son 25 yıl içerisinde çok hızlı gelişme kaydetmeleriyle özel bir ilgi çeken, en iyi bilinen moleküler tanımlayıcı ajanlardır (Beck et al., 2010). Antikorlar, hedef moleküllerin seçici tanımlanmasında veya yakalanmasında durgun faz olarak immobilize edilebilirler (Chen et al., 2009; Wojciechowski et al., 2010). Proteinler ayrıca hem önderiştirme hücrel örnekler hem de kanser hücrelerinin immünohistokimyasal tayinleri için kullanılırlar (Naoe et al., 2007). Ayrıca, antijen/antikor yanıtı içeren aşılarda yüz milyonlarca ölüme sebep olan, grip ve çiçek v.b. hastalıklarına karşı koruma sağlanmıştır (Burton, 2002). Antikorlar doğrudan antijenleri inaktive ederler ve dolaylı olarak onların gelişmiş fagositoz ve tamamlayıcı aktivasyonları üzerinden yıkımlarını sağlarlar. Antikorlar, antijenite, yük fonksiyonu ve boyutlarına göre sınıflandırılırlar. Bu farklılıklar (1) antijen bağlanmasındaki çeşitlilik, (2) bağlanma özgünlüğü ve (3) biyolojik aktiviteler gibi antikor fonksiyonlarını açıklar. Her bir antikor, iki aynı hafif zincir ve iki aynı ağır zincirden oluşur, bu sebeple iki antijen bağlayıcı zincir bölgeleri aynı olur.

Antikorlar büyük başarılar sağlamalarına rağmen, onlarla alakalı birçok zorluk söz konusudur. Antikor eldesinde, fizyolojik koşullar için optimizasyon koşulları sınırlıdır ve tayin platformları gibi canlı dışı uygulamalarda biyolojik sistem gerekir (Nimjee et al., 2005; Stoltenburg et al., 2007). Biyolojik gereksinimleri nedeniyle, antikorlar ana sisteme zarar verecek biyolojik toksinlere karşı çoğalamazlar. (Jayasena, 1999). Ayrıca, antikorların tayin ve yakalama işlevlerini koruyarak belli bölgelerinden modifiye etmek oldukça zordur ve antikorlar ısı değişimleri ve uzun süreli saklama durumlarında denatüre olmaya yatkınlardır. Antikor tarama süreçlerinde başka bir sorun ise zaman ve masraftır (Oliveira et al., 2008). Çünkü biyolojik ortamlardan antikor eldesi oldukça zaman alıcı ve pahalıdır. Bunlara ek olarak ulaşılabilir antikorların sınırlı sayıda olması (Sampson, 2003), türler arası

reaktiflikteki zorluklar ve uygulama üzerinde bir bağışıklık yanıtının üretimi de antikör uygulamalarında ciddi sorunlara yol açar (Nimjee et al., 2005). Bu kısıtlamaları çözmek üzere tasarlanmış moleküller, çeşitli hedef-ligand bağlanma fonksiyonları için çok önemli adaylar olacaktır.

2.2. Oligonükleotit - Protein Etkileşimi

Nükleik asitler genetik bilgileri kodlama dışında ayrıca üç boyutlu kıvrımlı modellerine dayalı olarak, çok yüksek afinite ligandı olarak işlev görürler. Tek zincirli nükleik asitlerin üç boyutlu kompleks yapısı, temel yapısı nedeniyle hücre içi hibridizasyonu sağlar ki belirli bir moleküler şekil katlanmaya başlar. Bu moleküler şekil, yüksek bağlanma afinitesine ve üç boyutlu yapısına bağlı olarak, şekle özel tanımlanan hedef moleküle bağlanmaya yardımcı olur. Moleküler şekil tanımlayıcı nükleik asitlerle protein etkileşimlerine verilebilecek doğal örnekler; tRNA, ribozomlar, DNA bağlayıcı proteinler ve DNAz' lardır (Breaker, 1997; Razvan et al., 2004) .

2.3. Aptamerler

Aptamer terimi, latince uygun anlamına gelen 'aptus' tan türemiştir. Yapısal uyuma dayalı olarak hedef moleküle yüksek afinite ile özgün olarak bağlanan, yaklaşık 15-60 bazdan oluşan, tek zincirli RNA ve DNA oligonükleotitleridir. Bu yapı; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşim, van der Waals etkileşimleri, Watson-Crick baz çifti ve aromatik halkaların istiflenmesi kombinasyonlarıyla oluşur (Luzi et al., 2003; Stoltenburg et al., 2007). Aptamerler 1990 larda ilk kez tanımlandıklarında, bir organik boyayı (Ellington and Szostak, 1990) ya da DNA polimerazı tanımlamalarına göre iki gruba ayrılmışlardır (Tuerk and Gold, 1990). Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte aptamerler daha geniş hedef kitleleri için uygulamaya konulmuştur. Bu hedefler; metal iyonları (Ciesiolka et al., 1995; Hofmann et al., 1997), küçük organik molekülleri (Ellington and Szostak, 1990; Manniron et al., 1997; Kato et al., 2000; Tang et al., 2000; Grate and Wilson, 2001; Mann et al., 2005), nükleotidleri ve türevlerini (Sassanfor and Szostak, 1993; Kiga et al., 1998; Meli et al., 2002), kofaktörleri (Burgstaller et al., 1994; Lauhan et al., 1995; Wilson et al., 1998), nükleik asitleri (Ko et al., 1999; Boiziau et al., 1999), aminoasitleri (Famulokad and Szostak, 1992; Geiger et al., 1996), karbonhidratları (Fukusaki et

al., 2000; Srisawat et al., 2001), antibiyotikleri (Lato et al., 1995; Wallace and Schroeder, 1998; Berens et al., 2001), peptitleri (Nieuwlandt et al., 1995), proteinleri (Jellinek et al., 1994; Green et al., 1996; Weigand et al., 1996; White et al., 2001; tahiri-Alaoui et al., 2002), bütün hücreleri (Daniels et al., 2003; Shangguan et al., 2006; Sangguan et al., 2008), virüsleri, ve virüs bulaşmış hücreleri (Pan et al., 1995; Tang et al., 2009) ve bakterileri (Bruno and Kiel, 1999; Hamula et al., 2008) içermektedir.

Antikorlara benzer olarak aptamerler, hedef proteinlere 1 pM ile 1 nM arasında değişen K_d ile bağlanırlar. Bu nükleik asit ligandları nükleik asitlere, proteinlere, küçük organik bileşiklere ve hatta bütün organizmalara bağlanırlar (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk et al., 1990; Wilson and Szostak, 1999; Tombelli et al., 2005; Lee et al., 2006; Klussmann, 2006). Aptamerlerin afinite ligantları olarak yapısal kararlılıkları; biyomoleküler etkileşimlerin termodinamik parametreleri, (ısı, entropi gibi), dengenin katı kriterleri (K_d) ve kinetik (koff, kon) ile hesaplanabilir. Yani, 'akıllı aptamerler' terimi, hedef molekülün değişen derişim aralığından etkilenebilen değişik denge sabitlerine (K_d) sahip aptamerler havuzu için icat edilmiştir. Geniş aralıklarda tanımlanmamış K_d değerine sahip ve yüksek seçicilikte, akıllı DNA aptamerleri üretmek için, yakın zamanda Kinetik Kapiler Elektroferez (KCE) kullanılmıştır (Drabovich et al., 2007).

2.3.1. Antikor- Aptamer Karşılaştırması

Aptamerler kendi kendine katlanmayan, tek zincirli ve redoksa duyarsız yapılardır. Ayrıca, proteinlerde bulunan büyük hidrofobik çekirdekleri yoktur ve bu sayede birikme yapmazlar. Peptitlere, proteinlere ve bazı küçük kimyasallara zıt olarak, DNA aptamerleri; iyi tanımlanmış, yüksek oranda tekrarlanabilir, diziden bağımsız ve kolayca genişletilebilen bir işlem ile kimyasal sentez üzerinden elde edilirler (Burbulis et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Aptamerler kimyasal olarak sentezlenebildikleri için deneyden deneye çeşitliliği ortadan kaldırır ki bu çeşitlilik terapötik proteinlerin üretimini ve teşhis edici antikor reaktiflerinin değişkenliğini karmaşıktırır (Cload et al., 2006).

Güçlü bağlayıcı ligantların tercihen afinite denemeleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), analizleri ile seçildiği, çok basamaklı bir işlem olan üstel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi (SELEX) yöntemi ile tanımlanan aptamerler, ayrıca kolayca analiz edilebilirler ve aptamer-hedef tanımlaması için gereken minimum zinciri karakterize etmeyi sağlarlar. Diziler, birincil ve ikincil yapı motifleri için kontrol edilebilirler (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003; Hofacker, 2003; Merkhham and Zuker, 2008) ve tanımlanan aptamerlerin tek baz yönlendirmeli optimizasyonu, antikor yaklaşımları için çok daha zorlayıcı olabilir. Birçok uygulamada, aptamerler, antikorlarla doğrudan yer değiştirerek başarılı bir şekilde kullanılabilirler.

Çizelge 2.1. Aptamer-antikor karşılaştırması.

Aptamerler	Antikorlar
• Çeşitli fonksiyonel grup modifikasyonları söz konusudur. • Sıcaklık muamelesi gibi çeşitli koşullar altında orjinal konformasyonlarına geri dönebilirler. • Raf ömürleri sınırsızdır. • Aptamerden aptamer-protein kompleksini ayırmak kolaydır. • Hedef moleküle bağlanma afiniteleri yüksektir. • Seçimi laboratuvar ortamında gerçekleşir ki herhangi bir küçük molekülü, biyopolimeri ya da hücreyi hedefleyebilir. • Ucuzdur ve birkaç hafta gibi çok kısa sürede üretilirler. • Düzenli aktiviteleri matriksten bağımsızdır. • Aptamerlerin afinite parametreleri isteğe bağlı olarak kontrol edilebilir.	• Sınırlı modifikasyona sahiptirler. • Sıcaklık geri dönüşü olmayan denatürasyona sebep olur. • Raf ömürleri sınırlıdır. • Antikorlardan, antikor-protein kompleksini ayırmak oldukça zordur. • Hedef moleküle bağlanma afiniteleri aptamerlere göre düşüktür. • Seçimi biyolojik bir organizma gerektirir, toksinler veya imünojenik olmayan moleküller varlığında etkin değildirler. • Antikorların üretilmesi oldukça pahalıdır ve uzun zaman alır. • Antikorların aktivitesi çeşitli matrikslerde değişkenlik gösterir. • Antikorlar için ise afinite parametrelerini kontrol etmek oldukça zordur.

2.3.2. Aptamerin hedef molekül tanımlaması ve etkileşimleri

Aptamerler DNA ve RNA sekans havuzlarından, organik boyalar, ilaçlar, metal iyonları, aminoasitler, antibiyotikler ve proteinler gibi çeşitli hedef moleküllerle seçici bir şekilde bağlanma afinite yeteneklerine bağlı olarak seçilirler (Tuerk and Gold, 1990; Jellinek et al., 1993; Jenison et al., 1994; Famulok, 1994; Wiegand et al., 1996; Ciesiolka and Yarus, 1996; Wallace and Schoreder, 1998). Yüksek afinitede aptamerin tanımlayabileceği bir hedef çeşidinde sınırlama olmamasına rağmen, protein aptamerlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları özellikle dikkat çekicidir (Germamm et al., 1998; et al., 1998; Hamaguchi et al., 2001; Rehder and McGown, 2001; Fang et al., 2001; Liss et al., 2002; Fang and Tan, 2002). Bir aptamerin bir hedef proteinle etkileşiminin nasıl olduğunun anlaşılması büyük teorik ve pratik önem taşır (Jiang et al., 2003).

Ribozomlar gibi doğal nükleik asit algılayıcıları evrimsel baskı altında en uygun afiniteyi sağlayarak biyolojik işlem ağlarının bir parçası olurlar. Hücre dışı seçilen aptamerler, sadece evrimsel baskı altında yüksek afinitede hedef molekülü bağlayıcı ligantlardır. Seçilen aptamerler genellikle hedef ligantlarının büyük bir kısmını çevrelerler ve algılayıcının moleküler tanımlayıcı elementini oluştururlar. Ligandı çevreleyen aptamerin bu üç boyutlu kıvrımlı yapısı, yüksek özgünlük ve afinite ile sonuçlanan çok fazla sayıda ayırıcı etkileşim sağlar. Hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri birçok aptamerde gözlenen temel kuvvetlerdir (Hermann and Patel, 2000). Ayrıca sterik etki, istiflenme, şekil uygunluğu ve elektrostatik etkileşimler gibi diğer kuvvetlerde aptamer ve onun ligandı arasında gözlenirler (Jiang et al., 1996; Hermann and Patel, 2000). Aptamerlerin bağlanma afiniteleri çoğunlukla liganda bağlıdır ve çeşitli protein hedefleri için pikomolarla (1×10^{-12} M) yüksek nanomolar (1×10^{-9} M) aralığında değişir. Küçük organik moleküller hedeflendiğinde, ayrışma sabiti beklendiği gibi az sayıda etkileşim sonucu, yüksektir (genellikle mikromolar). Her durumda, etkileşimler oldukça özgün olma eğilimindedir ve aptamerler çok benzer bileşikler arasında bile ayrılabilirler (Cho et al., 2009).

2.3.3. Aptamer seçimi

Aptamerler hedef moleküllerin geniş oligonükleotit (genellikle 40-60 baz birimlik) havuzlarında inkübasyonu ile seçilirler. Geniş oligonükleotit havuzlarının büyüklüğü, özgün aptamer izolasyonunu ve seçiciliğini sağlar. Oligonükleotit havuzlarının yapısal ve bilgilendirici karmaşıklıkları ve onların fonksiyonel aktiviteleri nükleik asit ligandlarının geliştirilmesinde işlemsel süreç geliştirilmesi için ilginç ve aktif bir alandır (Carothers et al., 2004). Seçiciliğin çarpıcı bir örneğinde, küçük molekül teofilin (1,3-dimetilksantin) 10.000 kat düşük afiniteyle kafeine (1,3,7-trimetilksantin) bağlanır ki kafein teofilinden sadece bir tane metil grubuyla farklılık gösterir. SELEX adı verilen, tek zincirli RNA veya DNA zincirleri içeren gelişigüzel kütüphanelerden başlayan bir yöntem, modifikasyon ve çeşitliliklerle birlikte özgün aptamerlerin seçimi için kullanılır. Kütüphane ilgilenilen hedef ile inkübe edilerek seçim sürecinin ilk halkası başlatılır. Bunu tipik olarak, tekrarlamalı absorpsiyon döngüleri, bağlanmış DNA/RNA' nın geri kazanımı ve amplifikasyonu takip eder. DNA/RNA bağlanmasının izolasyonu, saflık ve seçiciliğin sağlanmasında en kritik basamaktır. Örneğin, aptamer-hedef kompleksi, bağlanmamış DNA/RNA zincirlerinden nitroselüloz üzerinden süzme ile ya da afinite kromatografisi ile ayrılabilir. Aptamer izolasyonunu ve etkinliğini arttırmak için birçok ayırma tekniği geliştirilmiştir. Bunlar, Akım Sitometre (Yang et al., 2003), Kapiler Elektforez (CE) (Tok et al., 2010), Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) (Misino and Kumar, 2005) ve Atomik Kuvvet Mikroskop'u (AFM)' dir (Miyachi et al., 2009; Ogino et al., 2009; Miyachi et al., 2010). Bu işlemler kullanılarak çok kısa bir sürede yeni aptamerler üretmek mümkündür. SELEX protokolündeki çeşitlilikler aptamerlerin istenilen özgün özelliklerle birlikte izolasyonunu sağlar. Örneğin Toggle-SELEX, alternatif döngülerde benzer hedeflere karşı seçilen daha geniş özgünlüklere sahip aptamerlerin izolasyonu için kullanılır (White et al., 2001). Tailored-SELEX, çoğaltılmasından önce ve sonra birincil uçların bağlanma ve bölünmelerini içererek (Vater et al., 2003), kimyasal olarak daha hızlıca sentezlenebilen daha kısa aptamer zincirlerinin izolasyonlarını sağlar. Photo-SELEX, hedefleri için UV ile indüklenen çapraz bağlı aptamer içeren ışık duyarlı nükleotidler içererek, bağlanma afinitesini oldukça yükseltir aptamer işlev alanlarını genişletir (Golden et al., 2000).

2.3.4. Aptamer Uygulamaları

Aptamer problemlerin doğası onlara kullanımlarında esneklik kazandırır. Aptamerler sadece bağlayıcı ajan olarak kullanılmazlar, ayrıca teşhis amaçlı, terapötik olarak ve oldukça fazla sayıda analitik uygulamada kullanılırlar.

2.3.4.1 Aptamerlerin Analitik Uygulamaları

Antikorlar, sıklıkla immünoafinite kolon ligandları olarak kullanılırlar. Fakat bu bağlanma muntazam değildir. Bu da, bağlanma kapasitesini düşürür ve bazı durumlarda ayırma fazının kolondan çözünmesine sebep olur (Ralevet et al., 2006). Bunun aksine, aptamerler kolayca kimyasal olarak modifiye edilerek bağlanma kolonu için uygun hale getirilirler. Antikorlardan çok daha küçük boyutlardadırlar ve kromatografide durgun faz için daha yüksek ligand yoğunluğu sağlarlar. Aptamerler, küçük moleküller ve proteinler için afinite ligandları olarak görev alırlar. (Romig et al., 1999; Reg et al., 2001; Rehder-Silinski and L. B. McGown; 2003). Aptamerler yüksek ligand yoğunlukları ve kimyasal olarak kolay modifiye edilebilmeleri sayesinde özgün hedefler için biyosensör olarak ta kullanılmaktadırlar. Problar; akustik algılama (Liss et al., 2002) optik algılama (Lee and Walt, 2000; McCauley et al., 2003; Kirby et al., 2004) etiketleme yapılmadan tayini sağlayıcı biyosensörler, (Savran et al., 2004) ve floresan sinyal algılama (Jhaveri et al., 2000; Wang et al., 2008) için yüzeylere bağlanmaları amacıyla kimyasal olarak modifiye edilirler. Aptamerlerin eşsiz özellikleri, biyomedikal ve tedavi edici uygulamalar için heyecan verici fırsatlar sunar. Problar ayrıca in vivo görüntüleme için de geliştirilmiştir (Pieve et al., 2009; Sennello and Smith, 1997) ve hedeflenmiş ilaç taşınmasıyla yan etkileri azaltıcı, ümit verici sonuçlar göstermişlerdir (Tong et al., 2009; Taghdisi et al., 2010; Wu et al., 2010). Tedavi edici aptamerler, birçok kategoriye ayrılabilirler (Proske et al., 2005). Bunlar; proteinleri hedefleyen ve doğal olarak nükleik asitleri bağlayan aptamerler (Sullenger et al., 1990; Browning et al., 1999), etkin olarak kendilerinin panzehiri olarak görev alan düzenlenebilir aptamerler (Rusconi et al., 2004), aptamer bağlanmasını güçlendirici multivalent aptamerler (Santulli-Marotto et al., 2003; Kim et al., 2008) ve hastalıkları tedavi etmek için proteinleri, transkripsiyon faktörlerini, hücre-yüzey belirteçlerini vb. hedefleyen inhibitör aptamerlerdir (Bates et al., 1999; Hicke et al., 2001).

2.3.4.2. Aptamerler ile yapılan ek uygulamalar

Son zamanlarda, aptamerler küçük organik molekülleri, hücresel toksinleri (Hirao et al., 1997; Tang and Breaker, 1998; Yang et al., 1998; Stojanovic et al., 2001; Stojanovic et al., 2002; Babendure et al., 2003; Hirao et al., 2004; Sazani et al., 2004; Liu and Lu, 2006), virüsleri (Gapinath et al., 2006) ve hatta ağır metal iyonları (Li and Lu, 2003; Chang et al., 2005; Swearingen et al., 2005; Wrzesinski and Ciesiolka, 2005) gibi küçük hedefleri bağlamak için geliştirilmişlerdir (Ferreira et al., 2008). Ayrıca, aptamerler Western-blot uygulamalarında da iyi performans gösterirler (Tombelli and Mascini, 2009; Shin et al., 2010). Bahsedildiği üzere, aptamerlerin en önemli özelliği ve avantajı konjugasyon, kovalent bağlanma, floresans belirti vb. için hızlıca modifiye edilip sentezlenebilmeleridir. Basitçe aptamerler, 5'- ya da 3'- uçlarından florofor, amin, tiyol veya biotin içeren seçeneklerle sentezlenebilirler ve küreciklere ve nanoparçacıklara bağlanabilirler. 5'- ya da 3' ucundan biyotinlenmiş aptamerler konjuge streptavidin/yabanturpu peroksidaz (strep-HRP) ile tayin edilebilirler. Bu şekilde fonksiyonelleştirilmiş parçacıklar transkripsiyon faktörlerini (oguro et al. 2009) yoğunlaştırmak için ya da manyetik küreler şeklinde bakteriyel patojenleri (Joshi et al., 2009) veya kanser hücrelerini (Smith et al., 2007) zenginleştirmek için kullanılırlar.

2.3.4.3. İmmünohistokimya

Aptamerleri, antikorlar yerine konveksiyonel histoloji ve moleküler görüntülemeye kullanmak diğer bir uygulanabilir durumdur. Örneğin, geçmiş yıllarda doğrudan ya da dolaylı olarak işaretlenmiş aptamerler, teker teker reseptörleri (Chen et al., 2009) tayin etmek için ya da kanserli olmayan hücrelerden kanserli hücreler (Chen et al., 2008) türetmek için kullanılmışlardır.

2.3.5. Aptamer immobilizasyonu

Aptamerlerin immobilizasyonları için birçok kimyasal metot vardır ve bunların hepsi DNA hibritlerinin ve diğer biyomoleküllerin immobilizasyonları için daha önceden geliştirilmiş olan metotlara dayanır (Witmann, 2005; Witmann, 2006).

2.3.5.1 Altın üzerine direk bağlama

Düzlemsel altın yüzeylerde tiyoller

Aptamerlerin diğer yüzeyler üzerinde sensör olarak rapor edilmesi 1998 yılında (Potyrailo et al., 1998) gerçekleşirken, altın üzerinde aptasensörlerden ilk defa 2002 yılında bahsedilmiştir (Liss et al., 2002). Tiyol uçlu bağlayıcılara DNA bağlanması, DNA hibritleşme çalışmalarından çok önce rapor edilmiştir (Witmann, 2005; Witmann, 2006). Aptamerlerin altın yüzeylere bağlanma metotları genellikle, altın filmler üzerinde tiyolün kemisorpsiyonuyla oluşturulmuş diğer biyolojik olmayan tek tabakalı yüzeyleri takip eder. Tipik olarak, temiz bir altın substrat, tiyol uçlu aptamerin sıvı tampon çözeltisine batırılmasıyla altın yüzey üzerinde tek tabaka oluşturur. Altın yüzey düzlemsel bir substrat olabilir, bu yüzeyler SPR (Baldrich et al., 2004; Schlensog et al., 2004; Balamurugan et al., 2006) ya da kuvars kristal mikrodenge (QCM) sensorler (Liss et al., 2002; Minunni et al., 2004) ve elipsometride (Balamurugan et al., 2006) kullanılabilir. Son zamanlarda altın nanoparçacıklar üzerinde tek tabaka oluşumuyla ilgili birçok çalışma vardır. (Davlov et al., 2004; Huang et al., 2005). Altın yüzeyler üzerinde aptamer tek tabakalarının oluşumunun kolay olması nedeniyle, bu metot ayrıca, immobilize edilmiş aptamer ve onun tanımlayıcı partneri arasındaki etkileşimlerin çalışılması ve görüntülenmesi için AFM ucu (Basner et al., 2006) ve cantilever uçları (Savran et al., 2004) gibi prob uçlarının işlevselleştirilmesinde kullanılabilirler. Aptamerlerin altın yüzeylere doğrudan bağlanması aptamer dizisine bağlı tiyol-alkan kullanılarak gerçekleştirilir (Herne and Tarlow, 1997). Substrat olarak altın kullanılması birçok avantaja sahiptir, bunların en yaygın olanları, altın yüzey üzerine moleküllerin immobilizasyonlarının kolay olması, tek tabaka oluşturabilme yeteneği ve tek tabakaların oldukça düzenli yapılarıdır. Daha önce bahsedildiği gibi, aptamer immobilizasyon metotları genellikle diğer tek tabakaların bu şekilde oluşumlarını takip eder ve altın üzerinde tiyolün kemisorpsiyonu üzerinden gerçekleşir. Yani tiyol uçlu bir aptamer, altın yüzey üzerinde kendiliğinden biraraya gelmiş tek tabakalı (self-assembled monolayer, SAM) yüzey oluşturmada kullanılabilir. Birkaç sebepten dolayı metalik yüzeyler arasında en yaygın olarak altın kullanılır (Love et al., 2005). İlk olarak, altın havada kararlı ve tabaka ya da parçacık olarak ticari yoldan birçok kaynaktan elde edilebilir. İkinci olarak altın tiyole yüksek afinite ile

bağlanır ve altın tabakalar, hedef biyomolekülleri içeren karmaşık sıvı ortamında kararlıdır (Love et al., 2005). Üçüncü olarak düzlemsel altın yüzeylerin en önemli özelliklerinden biri, sadece aptamer tek tabaka oluşması için kolay olmaları değil, aynı zamanda aptamer bağlı tabakaların yapılarının fiziksel karakterizasyonları, bileşimleri ve bağlanma özellikleri için de çok kullanışlıdır. Aptamer tek tabakalarının bileşenlerinin ve yapılarının yüzey analizleri için kullanılan metotlar; X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) (Bain and Whitesides, 1989; Duwez, 2004), optiksel elipsometri (Parter et al., 1987; Roy, 2004) prob tarama mikroskopisi (Stranic et al., 1993; Quate, 1997; Binning and Rahrer, 2000), yansımali absorpsiyon infrared spektroskopisi (RAIRS) (Allara and Nazzo, 1985; Stranic et al., 1993; Quate, 1997; Binning and Rahrer, 2000; Roy, 2004) ve temas açısı hesaplamalarıdır (Whitesides and laibinis, 1990). Bağlanma analizleri ve aptasensörlerden, etkin bağlanmaları okumak için; SPR spektroskopisi (Baldrich et al., 2004; Schlensog et al., 2004; Balamurugan et al., 2006). QCM (Liss et al., 2002; Minunni et al., 2004) ve diğer kütle-sensörleri metotları gibi, birçok analitik metotlardan yararlanılır. Buna rağmen, en sık kullanılan metotlar floresans (Potyrailo et al., 1998; Lee and Walt, 2000, Spiridonova and Kopylov, 2002; Hionik et al., 2005; Yamamoto and Kumar, 2005; Cho et al., 2006; Lin et al., 2006; Su et al., 2007; Lin et al., 2007) ve elektrokimyasal metotlardır (Pavlov et al., 2004; Xiano et al., 2005; Xu et al., 2005; Rodriguez et al., 2005; Baker et al., 2006; Floch et al., 2006; Xu et al., 2006; Wu et al., 2007). Aptasensörler ayrıca etkileşim çalışmalarında, elektrokimyasal öz direnç (Rodriguez et al., 2005, Xu et al., 2005), enzim bağlı aptamer çalışması (Baldrich et al., 2004; Baldrich et al., 2005), UV (Davlov et al., 2004; Huang et al., 2005) ve elektrokimyasal indikatörler (Ikebukuro et al., 2005) gibi diğer birçok okuma metotlarının kullanılması ile geliştirilmişlerdir. Bağlanma çalışmalarına ek olarak, aptamer bağlı tek tabakalar AFM uçlarını ve bağlantı uçlarını işlevselleştirmek için kullanılabilirler ve böylece immobilize aptamer ve protein arasındaki etkileşim kuvvetleri hesaplanabilir (basner et al., 2006). Altın üzerindeki tek tabakalar aptamerlerin yüzeye immobilize olmalarında çok önemli bir rol aldığı için, uygun tiyol uçlu aptamerlerin kullanımı da eşit dercede önem kazanmaktadır.

Altın parçacıklar üzerinde tiyoller

Aptamerler, hedef ve onun hedef tanımlayıcı elementinin birleşmesini takiben, nanopartüküllerin yönettiği agregasyonla sonuçlanan kromatografik değişimler üzerinden, sensör olarak kullanılan altın nanoparçacıklar üzerine immobilize edilmişlerdir (Huang et al., 2005). Kromatografik sensörler avantajlıdır çünkü genellikle karmaşık analiz cihazları içermezler ve bu da basit ve uygun bir sensör metodu sağlar.

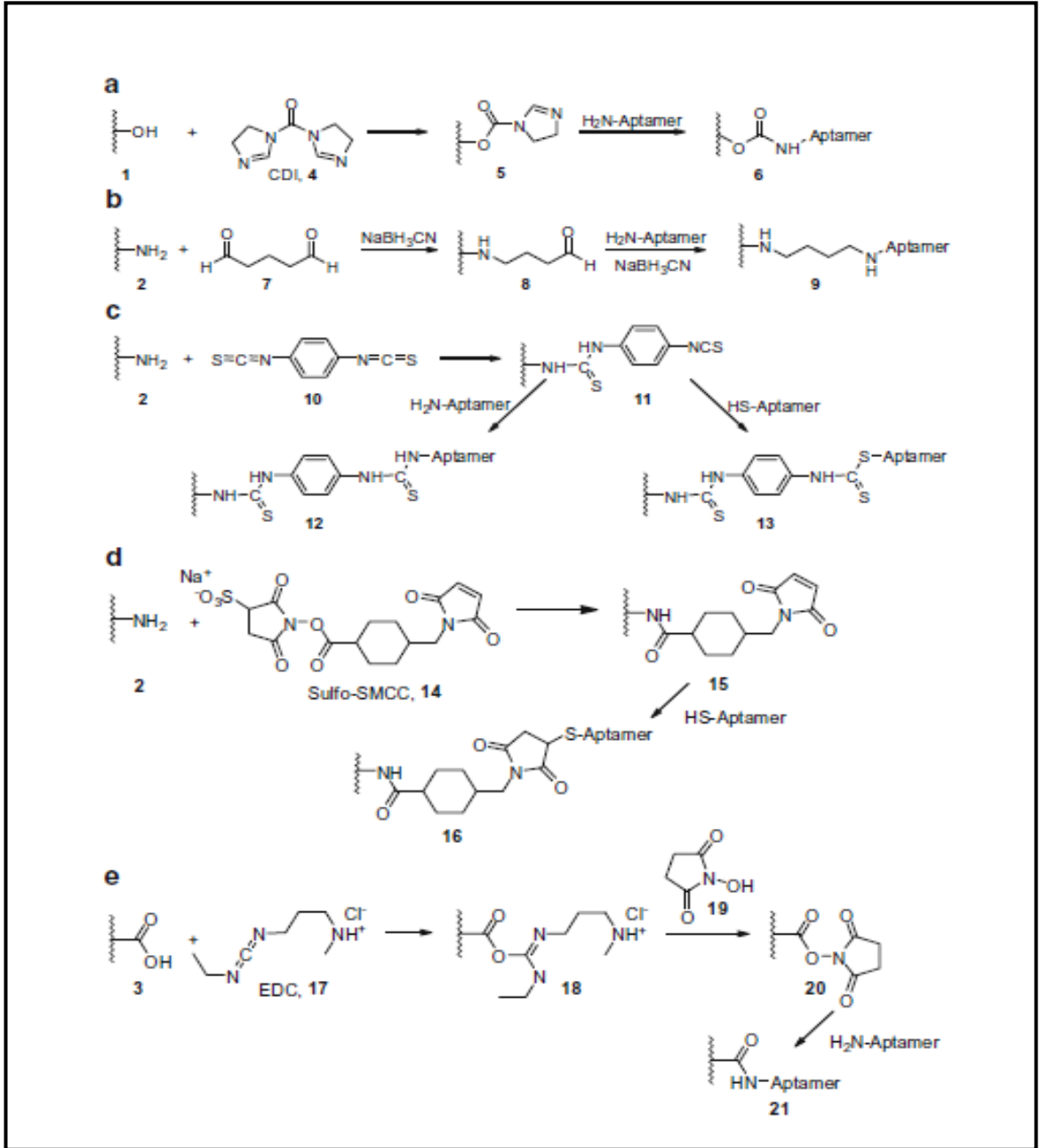
Birçok durumda, asimetrik karışık disülfid kullanılarak altın üzerine doğrudan bağlanma ile yapılan deneyler için, aptamerlerin altın nanoparçacıklara immobilizasyonları [aptamer-S-S-(CH₂)₆OH], ticari kaynaklardan alınmıştır (Liu and Lu, 2004). Immobilizasyon işlemi, ardışık bir seri işlemle gerçekleştirilir. Karışık disülfid öncelikle düşük iyonik kuvvette bir tampon çözeltisinde çözünür, iyonik kuvvet derişik tampon çözeltisi eklenerek kademeli olarak arttırılır. Her bir tampon çözelti eklemesinde 20 dakika inkübasyon için beklenir ve çözelti 1.0 M olana kadar bu işleme devam edilir. Daha sonra, çözelti oda sıcaklığında bir gece boyunca bırakılır. Metal nanoparçacıklarda DNA immobilizasyonu için diğer metotlar rapor edilmişlerdir ve gelecekte aptamer immobilizasyonu için daha kullanışlı metotlar oluşturulabilir (Fritzsche and Tatan, 2003).

2.3.5.2. İşlevsel Olarak Modifiye Edilmiş Yüzeylere Kovalent Bağlanma

Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Genel Kimyası

Farklı kojugasyonların yapılabilmesi için birçok seçenek mevcuttur. Öncelikle bir parça yüzey (altın, silikat, polimer) aktif dış tabakayla işlevselleştirilir. Yüzey işlevselleştirme stratejisi seçeneği, aptamere bağlı hangi tür uç fonksiyonel grubun olduğuna bağlıdır. Şimdiye kadar, aptamerler; amin, tiyol ya da biyotin uçları bağlı olarak kullanılmışlardır ki bu da bu fonksiyonel gruplara bağlanmak amacı ile kullanılacak kimyasal yapıları sınırlar. Biyotin uçlu aptamerler, avidin ve onun bir türevinin immobilize edildiği yüzeylere konjuge edilebilir. Amin veya tiyol uçlu aptamerlerin kovalent bağlanması, daha önce diğer biyomoleküller için benzer uygulamalarda kullanılan standart kimyasal metotlar kullanılarak geliştirilmiştir. Bu aptamer immobilizasyon yöntemlerinin çoğu, tabloda özetlenen bir ya da birden

fazla reaksiyon yollarını izler. Bunlar sadece mümkün olan tüm konjugasyon kimyalarının toplamını gösterir (Heise and Bier, 2006).



Şekil 2.1. Aptamerlerin yüzeylere kovalent bağlanmaları için yaygın olarak kullanılan reaksiyon dizileri. CDI sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik karbonildiimidazol, SMCC sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik süksinimidil 4 (Nmaleimidometil) sikloheksan- 1-karboksilat, EDC sembolü ile gösterilen kimyasal bileşik 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimiddir (Balamurugan et al., 2008).

Yüzey bağlanmasında kullanılan en yaygın üç grup hidroksil, amin ve karboksilik asit yüzey fonksiyonel gruplarıdır. Hidroksilli yüzeyler öncelikle reaktif bir ara ürün oluşturmak için 1,1' - karbonildiimidazol (CDI) ile modifiye edilirler ve bu da amino uçlu aptamer gruplarında kararlı bir kabamat bağı oluşturur (Potyrailo et al., 1998; Liss et al., 2002; Clark and Remcho, 2003). Amin uçlu yüzeyler, aptamer bağlanması için bir çok seçenek sağlarlar. Örneğin, bir amin gruplu yüzey, simetrik biyofonksiyonel dialdehid bağlayıcı olan glutaraldehid ve aldehid ile bir imin bağı oluştururlar, kimyasal süreçlerin amin uçlu aptamer gruplarıyla devam edebilmesi için diğer aldehidi serbest bırakırlar. (Lee and Walt, 2005; Stadtherr et al., 2006). Simetrik diiazotiyosiyanatlar da amin bağlı yüzeylerin hem tiyol uçlu hem de amin uçlu aptamerlere bağlanmasında biyofonksiyonel bağlayıcılar olarak kullanılabilirler (Zhu et al., 2006).

Altın üzerinde kendiliğinden biraraya gelmiş tabakaların üzerine aptamer bağlanması

Altın yüzeyler, aptamerlere birbirini takip eden konjugasyon için SAM' ler ile kolayca hazırlanabilirler. Bu metodun en büyük avantajı, altta yatan tek tabakanın, altın yüzeylere özgün olmayan aptamer adsorpsiyonunu önlemek için tasarlanabilmesidir. Çünkü bu, altın yüzeye özgün olmayan bağlanma ihtimali çok yüksek olan, baz birimlerinde amin gruplar içeren uzun oligonükleotitler için önemli bir problem oluşturmaktadır.

Silikat ve silisyum alt-tabakalar

Silikatlar ve silisyum, aptamer immobilizasyonu için alt-tabakalar olarak kullanılırlar. Silikatlar kolayca bulunabilirler ve cam parçacıklar, kapiler tüpler, silika jel veya kürecikler gibi şekillerde elde edilebilirler (Zhu et al., 2006). Düşük fiyatta olmalarına ve yaygın kullanılabilirliklerine ek olarak, silikat yüzeyler ayrıca spektroskopik sinyal kazanımı için optik şeffaflık avantajı sağlar ve altın tabakalarda karşılaşılan floresans sinyal söndürme durumunu göstermezler. Silisyum yapıştırıcılar ya da AFM (Jiang et al., 2003) uçları gibi silisyum yüzeylere kovalent bağlanma, silan reaktiflerinin konjuge olabilmeleri için, silisyum oksit dış tabakasının kullanımını sağlayabilir. Silikat ve silisyum alt-tabakalarının çoğu uygulamaları için öncelikle silanoksit yüzeyin, aminopropil veya glisidoksiopropil

fonksiyonel grup içeren trialkoksisilan reaktifi kullanılarak fonksiyonelize edilmesi gerekir.

Biyokaplamalar

Aptamer içeren birçok biyoreseptörün yüzey immobilizasyonu için, avidin (veya avidinin bir türevi) ve biyotin arasındaki özgün ve kuvvetli etkileşimden yararlanılır. Bu metot işlevsel olarak kolaydır ve genellikle biyotinin avidine etkin şekilde immobilizasyonu için oda sıcaklığında tampon çözelti içerisinde, avidin kaplı substrat ile biyotin bağlı aptamer inkübasyonunu gerektirir. Örneğin, streptavidin fiziksel adsorpsiyonla ya da kovalent olarak uygun substrata immobilize edilebilir. Biyotin bağlı aptamerler, standart fosforamit kimyası kullanılarak elde edilen biyotin konjuge edilmiş aptamer olarak ticari alınabilirler. Bunlara ek olarak; avidin-, streptavidin-, veya nötravizdin kaplı cam parçalar (Liss et al., 2002; Baldrich et al., 2005; Colet et al., 2005; Cho et al., 2006), streptavidin kaplı manyetik küreler (Kawde et al., 2005) ve 20-µm büyüklüğünde akışa karşı sürekli kullanılabilen polistiren parçacıklarına kovalant bağlı streptavidin bulunduran perfüzyon kromatografi kolonu POROS BA (Michaud et al., 2003) içeren, streptavidin ve avidin (ya da türevleri) kaplı substratlar satın alınabilir. Silikat üzerinde avidin kullanılan çalışmalar bugüne kadar ticari ürünler olarak kullanılmışlardır. Benzer olarak, polistiren mikrotiter plakalar üzerinde streptavidin de kullanılmıştır. Buna rağmen, genellikle, altın üzerine immobilize edilmiş avidin ve onun türevleri ticari olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle, birçok kovalent işlem geliştirilmiştir.

2.3.6. Aptamerlerin 5' ve 3' bağlanmalarının karşılaştırılması

Bağlayıcı ve fonksiyonel grup ucu katı destek yüzeye aptamerin 5'-ucu ya da 3'-ucundan bağlanabilir. Literatürde, iki pozisyonda aptasensör geliştirmede kullanılmaktadır. Buna rağmen, sadece birkaç çalışmada bu iki çeşit uç çalışabilirliğine değinilmiştir (Cho et al., 2006). Trombin, lizozim, IgE ve risin (toksik bir protein) için biyotin uçlu aptamerlerde bu etki incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki, bu etki aptamere özgü olarak değişmektedir. Anti-lizozim ve anti-IgE aptamerleri 3'-ucundan immobilizasyonu takiben 14–30% daha fazla duyarlılık göstermektedirler. Anti-risin ve anti-trombin aptamerleri ise 5'-ucundan immobilizasyonu takiben 26–28% daha fazla duyarlılık göstermektedirler.

2.4. Kütle Spektrometresi

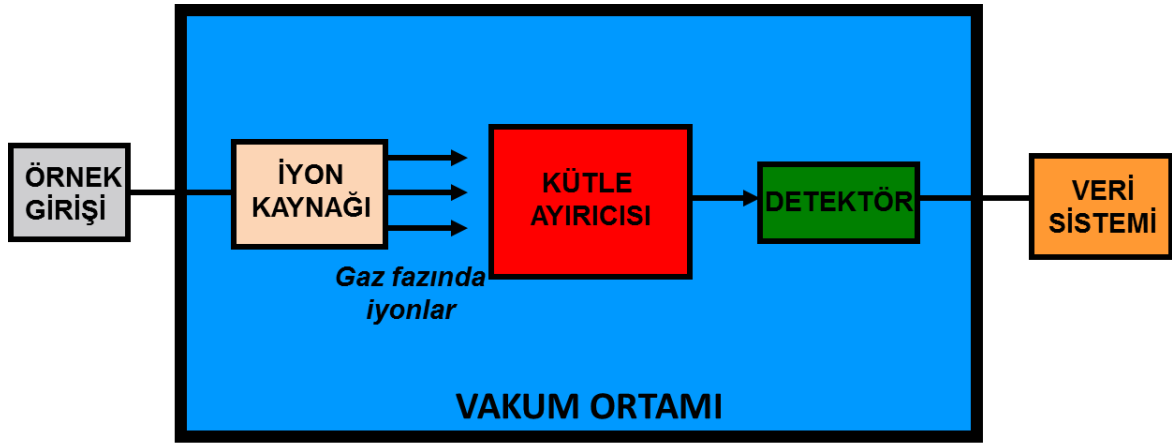
Kütle spektrometresi halen kullanımda bulunan tüm analitik yöntemlerin en geniş uygulama alanı olanıdır ve maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde, inorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, karmaşık karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde, katı yüzeylerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında, bir numunedeki atomların izotopik oranların bulunmasında oldukça yararlı bir yöntemdir. Ayrıca kütle spektrometrisi, protein ve DNA analizlerinde kullanılan günümüzün en güçlü enstrümental analiz cihazlarından biridir. 1898' lerin başlarında, Wien kanıtlamıştır ki ışınlar, üstüste paralel elektrik ve manyetik alandan geçirilerek saptırılabilir. Sir Joseph J. Thomson (1856–1940) çalışmalarında, negatif yüklü katot ışın parçacıklarını (Thomson, 1897) ve pozitif ışınları bir parabol kütle spektrografı (Thomson, 1913) ile analiz etmesi üzerinden kütle spektrometresinin doğuşu başlamıştır. Thomson, 1913 yılında Neon'un ^{20}Ne ve ^{22}Ne olmak üzere iki izotopunun olduğunu göstererek kütle spektrometresinde ilk adımı atmıştır (Karlsson, 2001). Günümüzde çok çeşitli türlerde son derece hassas kütle spektrometreleri geliştirilmiş, tıp, kimya ve fizik gibi bilim alanlarının en önemli cihazları haline gelmiştir (Chace at all., 1999; Clayton, 2001; Mosharrafa at all., 1971).

Büyük mol kütleli moleküllerin (özellikle biyopolimer ve sentetik polimerler) Kütle Spektrometrik şartlarda uçuculukları hemen hemen yok denecek kadar az ve kararlılıkları çok düşüktür. Bu nedenle mol kütlelerinin tayini mümkün olmamaktadır. 1990'lı yılların başına kadar kullanılan ticari Kütle Spektrometreleri ile maksimum ulaşılan mol kütlesi 4.000 Dalton'dan öteye gidememiştir. Daha büyük mol kütleli maddelerin kütle spektrometreleri ile analizlerinde başarı sağlanamamıştır. MALDI kütle spektrometresi ve Elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray Ionization, ESI) kütle spektrometresiyle tanışma bu alanda yeni bir çığır açmıştır. "Yumuşak iyonlaştırma" teknikleri olarak da bilinen bu tekniklerle, proteinler ve diğer biyomoleküllerin kütlelerinin, bir bütün halinde, yapıyı bozmadan mükemmel bir doğrulukla ölçülebilmesi başarılmıştır (Salih, 2005).

2.4.1. Kütle spektrometresi çalışma prensibi

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü parçacıkları kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek

analizleme esasına göre çalışmaktadır. Kütle spektrometresi, vakum ortamında gaz faz iyonları haline dönüştürülmüş atom ve moleküllerin bağıl miktarlarını ve kütlelerini ölçen bir cihazdır. Bu normalde, ilgilenilen analitin (katı, sıvı ya da gaz) örnek giriş sistemine verilmesinden sonra, iyon kaynağında iyonlaştırılması, bunu takiben iyonların kütle analizörü bölgesinde ayrılması ve son olarak dedektörde tayin edilmeleriyle gerçekleştirilir.



Şekil 2.2. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.

Birçok ticari ve laboratuvar ortamında yapılan cihaz mevcut olmasına rağmen, bütün kütle spektrometreleri şekilde görüldüğü gibi dört temel bileşenden oluşurlar: örnek verme sistemi, iyonlaştırma kaynağı, kütle ayırıcısı ve tayin sistemi.

2.4.1.1. Örnek verme sistemi

Örnek verme sistemi bir örneği iyon kaynağına transfer eder. Temel gereksinim, örnek molekülleri atmosferik basınçtan iyon kaynağındaki yüksek vakuma transfer edilirken basınç problemlerinin ortadan kaldırılmasıdır.

2.4.1.2. İyon Kaynağı

İyon kaynağı doğal örnek türlerini gaz fazı iyonlarına dönüştürür. Bu amaçla birçok iyonlaştırma tekniği geliştirilmiştir.

İyonlaştırma

Kütle spektrometresinde analizin ilk aşamasında iyon kaynaklarında, analiz edilecek örnekler iyonlaştırılır. Kütle spektrometresi için çeşitli iyonlaştırma teknikleri kullanılır. İyonlaştırma süreci boyunca analiz edilecek analitin iyonlaştırılmasında dikkate alınması gereken en önemli durumlar, iç enerjinin transferi ve analitin fizikokimyasal özellikleridir. Bazı iyonlaştırma teknikleri çok enerjiktir ve genişletilmiş parçalanmaya sebep olabilir. Sert iyonlaşma tekniği olarak da adlandırılan elektron iyonlaştırma (EI) ve hızlı atom bombardımanı (FAB) gibi bu teknikler, molekülün daha küçük parçalara parçalanmasına neden olurlar. Bu parçalanmalar her molekül için kendine özgü olup, moleküle ait bir parmak izi olarak tanımlanır. Bu tür sert iyonlaştırma tekniklerinde, yapıda meydana gelen parçalanmalar büyük mol kütleli bileşiklerin analizini olanaksız hale getirir. FAB iyonlaşma tekniğiyle ancak 4.000 Da'dan daha küçük moleküllerin analizi gerçekleştirilebilir. Diğer tekniklerde, yani yumuşak iyonlaşma tekniklerinde ise (MALDI ve ESI), molekülde herhangi bir parçalanma meydana gelmeden, M^+ ve $[M+H]^+$ moleküler iyon pikleri oluşur. Bu şekilde örneğin MALDI tekniğiyle 1.000.000 Da kadar mol kütleleri tayin edilebilir (Manz ve ark., 2003). Elektron iyonlaştırma, kimyasal iyonlaştırma ve alan iyonlaştırma sadece gaz-faz iyonlaştırma için uygundur ve bu yüzden kullanımları, yeterince uçucu ve termal olarak kararlı türlerle sınırlıdır. Buna rağmen, bileşiklerin büyük bir kısmı termal olarak değişkendir ve yeterli buhar basıncına sahip değildirler. Bu bileşiklerin molekülleri, direk olarak yoğunlaşmış hallerinden gaz faza ekstrakte edilmek zorundadırlar. Direk iyonlaştırma kaynakları iki çeşittir: sıvı faz iyon kaynağı ve katı faz iyon kaynağı. Sıvı-faz iyon kaynaklarında analit çözelti halindedir. Bu çözelti damlacıklar halinde sisleştirilerek kaynağa verilir, iyonlar atmosferik basınç altında üretilir ve bazı vakum aşamalarıyla kütle spektrometresine odaklandırılır. Elektrosprey, atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaştırma ve atmosferik basınçlı fotoiyonlaştırma kaynakları bu tür iyonlaştırma kaynağı örnekleridir. Katı-faz iyon kaynaklarında, analit uçucu olamayan katman halindedir. Çok çeşitli örnek hazırlama yöntemleriyle elde edilirler. Bu yöntemler, katı ya da viskoz sıvı olabilen matriks kullanımını içeririr. Bu katman, daha sonra enerjik parçacıklarla veya katmanın yüzeyinin yakınlarındaki iyonu desorbe eden fotonlarla uyarılır. Bu iyonlar, bir elektrik alan tarafından ekstrakte edilebilirler ve analizöre doğru

odaklandırılırlar. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon, ikincil iyon kütle spektrometresi, plazma desorpsiyon ve alan desorpsiyon kaynaklarının hepsi bu stratejiyi kullanarak iyon üretirler. Hızlı atom bombardımanı uçucu olamayan sıvı matriks kullanır. Temelde iyon kaynakları iyonları, nötral molekülleri gaz fazında iyonlaştırarak, elektron fırlatma, elektron yakalama, protonlanma, proton uzaklaştırma, iyon katılımı ile iyon oluşturma veya yüklü türlerin yoğunlaştırılmış fazdan gaz faza transferleri üzerinden üretirler. İyonlaştırma işlemi, sıklıkla, gaz-faz iyon-molekül reaksiyonlarını içerir (Hofmann and Stroobant, 2007).

2.4.1.3. Kütle Analizörü

Öncelikle, üretilen gaz-faz iyonları, tayin edilecekleri kütlelerine göre ayrılmalıdırlar. Kütle analizörü tarafından hesaplanacak olan iyonların fiziksel özellikleri, onların sadece kütlelerinden, kütle/yük (m/z) oranlarıdır. Bu yüzden, şu söylenmelidir ki çoklu yüklü iyonların görünen m/z değerleri, onların gerçek kütlelerinin kesirli parçalarını oluşturmaktadır. Birçok çeşitli kütle analizörleri geliştirilmiştir. Aslında, iyonların kütle/yük oranlarına göre ayrılmaları değişik prensiplere dayanır (çizelge 2.2.). Bütün kütle analizörleri, yalnız ya da birleştirilmiş, statik ya da dinamik elektriksel ve manyetik alan kullanırlar. Kütle analizörlerinin birçok yaygın türleri arasındaki temel farklılıklar, ayırmayı sağlamak için kullanılan alanlardaki şartlara dayanır. Herbir kütle analizörü kendi avantajlarına ve kısıtlamalarına sahiptir (Hoffman and Stroobant, 2007).

Çizelge 2.2. Kütle spektrometrisinde kullanılan analizör çeşitleri.

Analizör çeşidi	Sembol	Ayırma prensibi
Elektriksel Alan	E veya ESA	Kinetik enerji
Manyetik Alan	B	Momentum
Dörtkutuplu	Q	m/z (alan kararlılığı)
İyon tuzaklı	IT	m/z (rezonans frekansı)
Uçuş zamanlı	TOF	hız (uçuş zamanı)
Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans	FTICR	m/z (rezonans frekansı)
Fourier dönüşümlü orbitrap	FT-OT	m/z (rezonans frekansı)

Manyetik ve elektriksel alan ayırıcılı cihazlar, yüksek ayırma gücünde ölçümler alınmasını sağlamaktadırlar. Dört kutuplu ve dört kutuplu-iyon yakalamalı (QIT) gibi kütle ayırıcıların geliştirilmesi, daha küçük ve ekonomik cihazların üretimlerini sağlamıştır. İyon siklotron rezonans (ICR) cihazları, hem yüksek ayırma gücü hem de kimyasal reaksiyon koşullarına eşdeğer koşullarda veri alınmasını sağlayabilmektedirler. İlk ticari QIT kütle spektrometresi, 1953 yılında Wolfgang Paul (Paul and Steinwedel, 1953) tarafından keşfedildikten yaklaşık 40 yıl sonra, 1984 yılında Finnigan tarafından ticari olarak kullanılmıştır (Stafford, 1984). İlk iyon yakalama cihazı, radyo frekansı kullanılarak iyonların belirli bir yerde biriktirilerek tutulabildiği bir sistem olarak ifade edilmiştir. Stafford tarafından kütle seçici kararsızlığın keşfedilmesiyle, seçilen iyonların biriktirilip analiz edilebilmesine olanak tanıyan iyon yakalamalı kütle spektrometrisi alanı ortaya çıkmıştır. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda, elektrotlara özgün radyo frekansı uygulanarak oluşturulan kuadratik elektriksel alanda kütle/yük oranlarına göre farklılık gösteren iyonlar hapsedilmektedirler. İyonların kaydedilmeleri sırasında, elektrotların potansiyelleri değiştirilerek iyon yörüngelerinde kararsızlık yaratılır ve böylece iyonlar yörüngelerinden kütle/yük oranları artan sırayla çıkarlar. Daha sonra iyonlar, çıkış lensine odaklanarak sinyalleri detektör tarafından kaydedilir. Tandem kütle spektrometrisi (MS^n), R. G. Cooks ve arkadaşları tarafından, ters geometrili mıknaş cihazı ile yarı kararlı iyonlar üzerine araştırma yaparlarken, ortaya çıkarılmıştır. 1968 yılında McLafferty iyon yapılarının aydınlatılması için çeşitli cihazlarla tandem kütle spektrometrisi uygulamaları yapmış ve aynı zamanda Jennings, çarpışma ile oluşturulan parçalanma (Collision-Induced Dissociation, CID) yöntemini tanımlamıştır. Bu alanda, Yost ve Enke tarafından tasarlanan üçlü dört kutup kütle spektrometresi ilk zamanlarda ciddi anlamda popüler hale gelmiştir (Yost and Enke, 1978). Kütle analizörleri içerisinde en sık kullanılanlardan biri uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörüdür ve en çok MALDI tekniğinde kullanıldığı görülmektedir. TOF kütle analizöründe izlenecek bir iyonun kütlesi için teorik olarak bir limit yoktur. Burada temel prensip, farklı kütlelerdeki iyonların vakum atmosferinde uçuş hızlarının farklılığıdır. Uçuş zamanlı kütle analizöründe, iyonları hızlandırmak için elektriksel bir alan uygulanır ve dedektöre çarpma süreleri belirlenir. Eğer iyonların yükleri aynı ise kinetik enerji belirleyici olur yani iyonların hızları yalnızca kütlelerine bağlı kalır. Büyük molekül kütlesine

sahip olan iyonların hızları, küçük iyonlara göre daha düşüktür. Bu şekilde farklı zamanlarda dedektöre çarparak kütleleri belirlenir (Wollnik, 1993). Uçuş zamanlı kütle ayırıcısının bir kaç avantajı vardır: (1) teorik olarak kütle sınırı olmaması; (2) yüksek hızda veri kaydedilebilmesi; (3) yüksek duyarlılığa sahip olması; (4) temelde basit bir yapıya sahip olması ve değişikliklere uygun olmasıdır. MALDI iyonlaştırma yöntemi, TOF ayırıcısı ile birlikte kullanılmak için oldukça uygundur. MALDI yönteminin teorik olarak sınırsız kütle aralığında analiz yapılmasına olanak veren TOF kütle ayırıcısı ile birleştirilmesiyle biyomolekül analizleri için ideal bir sistem oluşturulmuştur (MALDI-TOF) (Wurz and Gubler, 1996).

2.4.1.4. Dedektörler

Kütle spektrometresinde, iyonlar kütle analizöründen geçerler, bir dedektör tarafından tayin edilip, kullanılabilir sinyale dönüştürülürler. Dedektörler iyonlardan, iyonların miktarlarıyla orantılı olarak elektrik akımı üretebilirler. Kütle spektrometresinde kullanılan dedektörler 2005 yılında gözden geçirilmiştir (Koppelaar et al., 2005). Birçok çeşit dedektör bulunmaktadır. Dedektör seçimi, cihazın dizaynına ve gerçekleştirilecek analitik uygulamaya bağlıdır. Çeşitli yaklaşımlar iyonları tespit etmek için kullanılır. Buna rağmen, iyonların tespiti her zaman onların yüküne, kütlelerine ya da hızlarına dayanır. Bazı dedektörler (Faraday kafesi), bir iyon yüzeye çarpıp ve nötralize olduğunda üretilen yük akımının hesaplanmasına dayanır. Diğerleri (elektron çoğaltıcılar veya elektro-optik iyon detektörleri) daha fazla elektrik akımı veren ikincil elektronların üretildiği yüzeyle iyonların çarpışması sonucu açığa çıkan kinetik enerji transferine dayanır. İyonların FT-ICR ya da orbitrap kütle spektrometreleriyle tayinleri karakteristik olarak bu tayinlerden farklıdır. Bu durumda dedektör iyon yörüngelerine yakın kütle analizör bölgesinde bulunan bir çift metal tabakadan oluşur. İyonlar, metal plakaları birbirine bağlanan bir devrede ürettikleri akım görüntüsü ile tayin edilirler. Çünkü belirli bir anda kütle analizörünü terk eden iyon sayısı genellikle oldukça azdır, kullanılabilir sinyal elde etmek için sıklıkla önemli amplifikasyonların yapılması gereklidir. Aslında, dedektörde saniyede 10 iyon karşılık gelen elektrik akımı 1.6×10^{-18} amperdir. Sonuç olarak, geleneksel bir elektronik amplifikatör tarafından sonraki amplifikasyonların yapılması gereklidir. Ayrıca, iyon dedektörleri iki sınıfa ayrılabilirler. Bazı dedektörler tek seferde tek bir kütle iyonlarını sayarlar

ve bu yüzden bütün iyonların varışını sırayla bir noktada tayin ederler (nokta iyon toplayıcıları). Fotografik dedektörler gibi diğer dedektörler, görüntü akım dedektörleri veya dizi dedektörleri, çoklu kütleleri sayma yeteneğine sahiptirler ve aynı anda bir düzlem boyunca bütün iyonların varışını tayin ederler (dizi dedektörleri). Bu dedektörler kütle spektrometrisinde çoğu uygulamada etkindirler. Buna rağmen, bir dedektör ideal olarak ayırıcılık etkisinden arındırılmış olmalıdır. Çünkü genelde dedektörün etkinliği iyonların kütleleri arttıkça azalır. Bu yüksek kütleli iyonların tayinine sınırlamalar getirir ve bu verilerden dolayı bir kantitatif analizi bozabilir çünkü artan kütleyle, alınan sinyal katlanarak azalır. Diğer yandan, kütle spektrometrisindeki gelişmeler tamamen yeni iyonlaştırıcı kaynaklarının ve analizörlerin gelişimini sağlamıştır ki bunlar çok yüksek molekül ağırlıklı analitlerin çalışılmasına olanak sağlamaktadır. (Hoffmann and Stroobant, 2007).

2.4.2. Ardışık Kütle Spektrometresi (MS/MS)

MS/MS şeklinde ifade edilen ardışık kütle spektrometrisi (tandem mass spectrometry), arka arkaya yerleştirilmiş iki benzer (QqQ gibi) ya da farklı (QToF gibi) kütle ayırıcısı arasında yer alan çarpışma hücresi (collision cell) içerisinde, birinci kütle ayırıcısında seçilerek gelen iyonların inert gaz molekül (N_2) ya da atomları (He, Ar, gibi) ile çarpıştırılarak kontrollü bir şekilde, enerjinin kademeli olarak değiştirilmesi sonucu parçalanması ve elde edilen küçük iyon parçalarının takip eden ikinci kütle ayırıcısında izlenmesi işlemidir. Analiz basamaklarının sayısını arttırmak mümkündür: ilk kütle ayırıcısında başlangıç iyon ya da iyonlar (precursor ions) seçilir, sonra bu iyonların parçalanmasından elde edilen ikincil iyonlar da seçilerek daha küçük iyonlara parçalandıktan sonra son kütle ayırıcısından geçen parçalanma ürünleri analiz edilir. Bu da genellikle MS^3 olarak adlandırılır. Gerçekleştirilen kütle spektrometrik analiz basamaklarının sayısı daha da arttırılabilir. Bu tür çalışmalar kütle spektrometrisinde MS^n olarak ifade edilmektedir n analiz edilen iyonların oluşturulma sayısını ifade etmektedir (Hoffmann, Stroobant, 2007).

2.4.3. Yeni nesil kütle spektrometreleri

Son yıllarda kütle spektrometresinde yumuşak iyonlaşma ile iyon oluşumu sağlayan MALDI ve ESI yöntemlerinin geliştirilmeleriyle kütle spektrometresinde

biyomoleküllerin detaylı bir şekilde analiz edilmelerinin yolu açılmış ve yumuşak iyonlaştırmanın makro moleküllerin analizlerindeki önemi, 2002 yılında John Fenn ve Koichi Tanaka' nın paylaştıkları Nobel ödülü ile kabul edilmiş oldu.

2.4.3.1. Matriks-yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı - Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)

1988 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından Matriks-yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı - Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS) ilk olarak tanımlanmıştır (Karas et al., 1987; Karas and Hillenkamp, 1988; Hillenkamp et al., 1990). O zamandan bu yana, büyük inorganik bileşikler, sentetik polimerler, oligonükleotitler ve proteinler gibi, uçucu olmayan ve termal olarak kararlı geniş bir aralıkta, bozulmadan gaz fazına geçişi sağlayan güçlü bir kaynak olmuştur. Koichi Tanaka proteinlerin "lazer desorpsiyonlu yumuşak iyonlaşması" (SLD) çalışmalarını 1987'de yayınlamıştır. Ancak, bu SLD çalışmalarının, daha etkili ve daha yaygın bir kullanıma sahip olan yeni bir uygulamasını, 1990 ların başında iki Alman bilim adamı Prof. F. Hillenkamp ve Prof. M. Karas, yepyeni bir Kütle Spektrometrik teknik olarak tasarlamışlardır. Yaptıkları bu çalışma ile American Chemical Society'nin 1995 yılındaki ödülüne layık görüldüler. Kullandıkları yeni Kütle Spektrometrik sistemin iyonlaştırma kaynağının dışındaki analizör ve dedektör sistemleri daha önceki Kütle Spektrometrelerinde var olan kısımlardan hemen hemen farklılık göstermemekle birlikte, yeni bir iyonlaştırma kaynağı tasarlamışlardır. Bu iyonlaştırma kaynağına, Matriks-yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI) adını verdiler. Daha sonra 2002 yılında Tanaka, bu çok önemli buluşuyla Nobel ödülüne layık görüldü (Manz ve ark., 2003). MALDI diğer lazer iyonlaştırma tekniklerinden daha hassastır. MALDI, 100000 Da' u aşan çok yüksek mol kütleli analitlerin desorpsiyonuna ve iyonlaşmasına olanak sağlar. Örneğin MALDI, 300000 Da mol kütleline kadar olan proteinlerin femtomollerinin tayinine olanak sağlar (Karas and Hillenkamp, 1988; Spengler and cotter, 1990). MALDI kütle spektrometresi, hem sentetik polimerler hem de biyopolimerler için kuvvetli bir analitik sistem olmuştur (Pasch and Schrepp, 2003). MALDI kullanarak biyolojik materyalleri görüntülemek de bir diğer ilginç uygulamadır (Stoeckli, 2001; Pierson et al., 2004). Aslında MALDI, LD ve SIMS ile birlikte dokular içerisinde hedef biyomoleküllerin dağılımlarını haritalamada kullanılır. Doğrudan doku

bölgelerinde peptit, protein ve biyomoleküllerin çalışılmasını sağlar. MALDI kaynağının yapısı uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörü için çok uygundur. Buna ek olarak, TOF analizörü geniş bir kütle aralığında iyonları analiz etme yeteneğine sahiptir ve böylelikle MALDI tarafından üretilen yüksek kütleli iyonları analiz edebilir. Tüm bunlar, çoğu MALDI spekturumunun neden MALDI-TOF spektrometresiyle elde edildiğini açıklar.

MALDI sisteminin prensipleri

Örnek hazırlama

İlk aşamada, analiz edilecek bileşik matriks olarak adlandırılan, küçük organik moleküller içeren bir çözücü içinde çözülür. Bu moleküller kullanılan lazerin dalga boyunda güçlü bir absorpsiyona sahip olmalıdır. Bu karışım analizden önce kurutulur ve çözelti hazırlanırken kullanılan sıvı çözücü uzaklaştırılır. Bu da analit katkılı matriks kristalleri kalıntısı olan katı bir çözelti ile sonuçlanır. MALDI-Kütle Spektrometresi analizlerinde, en önemli ve zor kısım örnek hazırlama bölümüdür. Çalışılacak analit için, uygun matriksin seçimi, örnek: matriks oranının belirlenmesi, en uygun örnek hazırlama yönteminin uygulanması MALDI-Kütle Spektrometresi tekniğinin etkinliğini önemli ölçüde belirler. Örnek hazırlama yöntemi genel olarak, örnek ve matriks çözeltilerinin hazırlanıp, belirli oranda birbirlerine karıştırılması, daha sonra bu karışımın 'MALDI örnek tutucusu' adı verilen metal bir plaka üzerine uygulanmasını ve bu örnek tutucu üzerinde kristallenmesini ve ardından cihaza verilmesi basamaklarını içerir. İyi spektrumlar elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken bir başka nokta da, tampon içerisindeki tuz derişiminin minimuma indirilmesidir (Manz et al., 2003; Salih et al., 2005). Analit molekülleri matriks molekülleri boyunca gömülü olduklarından tamamen birbirlerinden ayrılırlar. Matriks moleküllerinin sayısı analit moleküllerinin sayısını aşar ve bu da analit moleküllerini birbirinden ayırarak örnek moleküllerinin kümelenmesini önler. Ayrıca matriks, gelen enerjinin çoğunu absorplayarak lazer ışınlarının örnek üzerindeki zararını minimuma indirir ve lazerden analite enerji transferinin etkinliğini artırır. Bu sayede hassasiyet oldukça yükselir. Hem iyonlaşma hem de desorpsiyon sağlayan MALDI matriks kullanımı, iyonlaşma metodu için çok önemli bir faktördür. MALDI matriksi, analitle uyumlu olarak çözücüde çözünebilir, vakumda kararlı, analiti izole edici, lazer ışınlarını absorbe

edici ve analit iyonlaşmasını sağlayıcı olmalıdır. Değişik çeşitlerde örnek hazırlama metotları vardır. Bunlardan katı matriks örnek hazırlama metodu olanlar; kurutulmuş damlacık, vakum kurutma, öğütölmüş kristal, hızlı buharlaştırma, kaplama, sandviç, yavaş kristallendirme, elektrosprey ve matriks kaplanmış yüzeylerdir. Bunlar içerisinde kurutulmuş damlacık metodu en yaygın kullanılan yöntemdir. Örnek hazırlama yöntemleri arasında en eski ve en sık kullanılan yöntem olan 'kurutulmuş damlacık ' metodunda, öncelikle doygun bir matriks çözeltisi hazırlanır. Bu matriks çözeltisi, matriksin çözünürlüğüne bağlı olmak üzere, su, su-asetonitril veya su-alkol içerisinde yaklaşık olarak hazırlanır. İkinci bir ependorf içerisinde, örnek, uygun ve matriks çözeltisi ile karışabilir bir çözücü içerisinde hazırlanır. Daha sonra bu matriks ve örnek çözeltileri uygun oranlarda karıştırılır ve bu karışımın 1 µL'si MALDI örnek tutucusu üzerine uygulanarak oda sıcaklığında kristallenmeleri sağlanır. Bir başka önemli örnek hazırlama yöntemi ise "ince tabaka" (thin-layer) metodudur. Burada önce matriks çözeltisi örnek tutucusu üzerine uygulanır ve çözücü hızlı bir şekilde buharlaştırılır, matriks molekülleri kristallendirilir. Örnek tutucusu üzerinde ince bir tabaka elde edilir. Daha sonra örnek çözeltisi bu ince matriks tabakasının üzerine uygulanır ve hızlı bir şekilde kristallendirilir. Sıvı matriks hazırlama metotları; kimyasal sıvı, parçacık katkılı (iki-faz) sıvı ve kimyasal katkılı sıvıdır. Özel örnek hazırlama metotları ise; katı destek olarak, 2D jeller üzerinde MALDI örneği hazırlama ve çözünmeyen katı örneklerden örnek hazırlamadır.

Çizelge 2.3. MALDI matrikslerinin kullanımı.

Tayin edilen molekül	Matriks Kısaltması	Matriks
Peptit/protein		
Kütle < 10 kDa	CHCA	α –siyano-4-hidroksisinnamik asit
Kütle > 10 kDa	SA	sinapinik asit
	HABA	2-(4-hidroksifenilazo)benzoik asit
IR -Lazer		Süksinik asit
UV-Lazer		2,6-dihidroksiasetofenon
UV-Lazer		Ferulik asit
UV-Lazer		Kafeik asit
Sıvı matriks		Gliserin
Sıvı matriks		4-Nitroalalin
Oligonükleotit		
Kütle 3.5 kDa	THAP	2,4,6-trihidroksiasetofenon
Kütle 3.5 kDa	HPA	3-hidroksipikolinik asit
		Antranilik asit
		Salisilamit
Sentetik polimer		
Apolar	IAA	Trans-3-indolakrilik asit
	DIT	Ditranol
Polar	DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
IR-Lazer		Süksinik asit
Organik moleküller		
	DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
		İzovanilin
Karbonhidratlar		
	DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
	CHCA	α –siyano-4-hidroksisinnamik asit
		3-Aminoquinolin
Asidik	THAP	2,4,6, trihidroksiasetofenon
Lipidler	DIT	Ditranol
Dentrimeler		
	SA	Sinapinik asit
	DIT	Ditranol
Fulerenler	SA	Sinapinik asit
İnorganik moleküller	DCTB	T-2-(3-(4-Bütil-fenil)-2-metil-2-propnolidin)melononitril
Oligosakkaritler		1-izoquinolinol

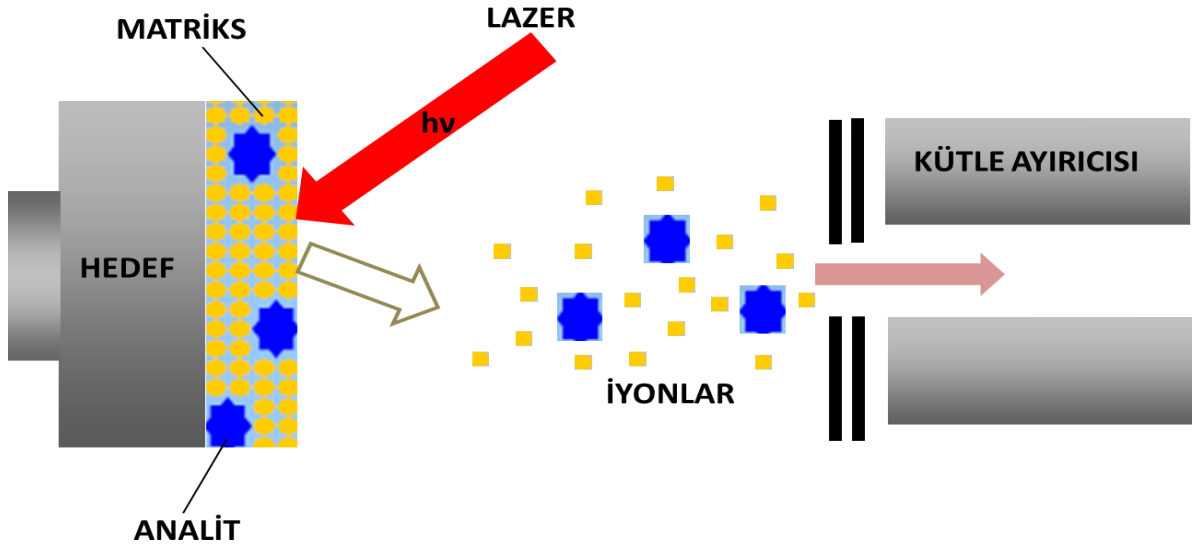
İyonlaştırma Prensipleri

Bu aşama, kütle spektrometresinin içinde vakum atmosferindeki katı örnek moleküllerinin yumuşak desorpsiyonu ve iyonlaşması temeline dayanır. İlk önce örnek, matriks molekülleriyle beraber metal bir örnek tutucu üzerinde birlikte kristallendirilir. Numunenin MALDI kütle spektrometresine girişini sağlayan örnek tutucu ile uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) girişi arasına elektriksel bir alan uygulanır. Daha sonra örnek-matriks karışımı, kesikli bir lazer ışınına maruz bırakılır. Bu aşamada, lazer kaynağından yayılan ışının dalga boyunda kolayca absorpsiyon yapabilen uygun bir matriksin seçilmesi çok önemlidir, aynı zamanda analit moleküllerinin molekülleri bu dalga boyunda ışını absorplamamalıdır. Lazer kaynağından yayılan fotonlarla, örnek-matriks kristalleri bombardıman edildiğinde, matriks molekülleri hemen uyarılır ve enerjisini komşu analit moleküllerine kontrollü bir şekilde aktararak örnek molekülleriyle beraber gaz fazına geçer ve bazı analit ve matriks molekülleri bu işlem esnasında iyonlaşır. Gaz fazındaki iyonlar, elektriksel bir alan uygulanarak, uçuş zamanlı kütle analizörüne (TOF) doğru hızlandırılırlar.

Çizelge 2.4. MALDI için kullanılan lazer kaynakları.

Lazer	Dalga boyu	Foton enerjisi (kkal/mol)	Foton enerjisi (eV)	Puls genişliği
Azot	337 nm	85	3.68	< 1ns – birkaç ns
Nd: YAG μ^3	355 nm	80	3.49	5 ns
Nd: YAG μ^4	266 nm	107	4.66	5 ns
Ekzimer (XeCl)	308 nm	93	4.02	25 ns
Ekzimer (KrF)	248 nm	115	5.00	25 ns
Ekzimer (ArF)	193 nm	148	6.42	15 ns
Er: YAG	2.94 μm	9.7	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μm	2.7	0.12	100 ns + 1 μs

Matriks molekülleri, analit moleküllerinden proton alarak ya da vererek, iyonlaşma enerjisini transfer ederler. Genelde elde edilen analit iyonları $[M-H]^+$ veya $[M+H]^+$ molekül iyonları olduğu gibi, tampon çözeltilerinden gelen alkali metal iyonlarının katılmasıyla $[M+Na]^+$ iyonları da olabilir. Ayrıca çok yüklü moleküler iyonlar da oluşabilir. Şekil 2.3. MALDI desorpsiyon iyonlaşma sürecini şematik olarak göstermektedir.



Şekil 2.3. MALDI desorpsiyon iyonlaşma sürecinin şematik olarak gösterimi.

Bir MALDI deneyinde, MALDI kütle spektrumunda pozitif iyon modunda sadece birkaç çeşit iyon yaygın olarak gözlenir. Bu iyonlar, radikal molekül katyonları, protonlanmış moleküler iyonlar ve katyonize moleküler iyonlardır. Gaz faz molekül iyonlarının oluşumu genel olarak ikiye ayrılır. *Birincil iyonlaşma* örnek içerisindeki nötral moleküllerden iyon eldesini ifade eder. Bu işlem, lazer ışınlarının birkaç basamakta matriks tarafından absorplanmasıyla başlar, ta ki uyarılmış matriks bir elektron vererek, matriks moleküler katyonu ya da anyonu üretinceye kadar devam eder.

İkincil iyonlaşma birincil işlem ile doğrudan üretilmeyen iyonları ifade eder. Bu iyonlaşma süreci, iyon-molekül etkileşimlerini içerir. İyon-molekül reaksiyonları, MALDI' de en yaygın gözlenen iyonlar olan, tek yüklü protonlanmış moleküler katyonların görünüşüyle bağlantılı olarak proton transfer reaksiyonlarını içerir.

Protonlanmış moleküler iyonlar, analitin proton ilgisi matriksin proton ilgisinden büyük olduğu zaman kütle spektrometresinde gözlenir.

Kütle Analizörü

Kütle spektrometresinin iyon kaynağında desorpsiyon/iyonlaşma sonrası iyonlar oluşur, bu iyonlar daha sonra kütle analizörüne gönderilirler ve kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılırlar. Manyetik sektör (B), lineer dört kutuplu (Q), lineer dört kutuplu iyon tuzaklı (QIT), Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (FT-ICR) ve uçuş zamanlı gibi çok çeşitli kütle analizörleri vardır. Buna rağmen, MALDI için, iki kütle analizörü en yaygın olarak kullanılır. Bunlar TOF ve FT-ICR' tır. Bu ikisi içinden, TOF; dizaynında ve kullanımında hiçbir zorluk olmaması, maliyeti etkinliği, teorik olarak sınırsız kütle aralığı, ard arda tüm yüklü türleri tayin edebilme yeteneği, hızlı analiz süresi ve MALDI iyonlaşma kaynağı ile iyi uyumlu olması gibi özellikleriyle en evrensel olarak en çok kullanılanıdır (Muddiman, 1997). Lazer ışını tarafından desorbe edilen iyonlar, elektriksel alan içerisinde belli bir kinetik enerjiyle hızlandırılırlar. Daha sonra bu iyonlar, elektriksel alan uygulanmayan bir tüp içerisine girerler ve burada kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler. Tüpün sonunda, iyonlar detektöre çarparlar ve uçuş zamanları yüksek bir doğrulukla elektronik olarak ölçülür. Hareket eden iyonların kinetik enerjileri teorik olarak eş. 2.1. ile tanımlanır:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot V \quad (2.1)$$

burada " m " iyonun kütlesi, " v " iyonun hızlandırma bölgesinden sonraki hızı, " z " iyonun yükü, " e " elektronun yükü ve " V " uygulanan elektriksel alanın gerilimidir. Serbest yol içerisinde hareket eden küçük iyonlar, büyük iyonlara göre daha fazla hız kazanırlar ve dedektöre daha önce ulaşırlar. Burada hız " v " , elektriksel alan uygulanmayan hareket tüpünün serbest yol uzunluğunun " L " , uçuş zamanına " t " bölünmesi olarak da tanımlanabilir;

$$V = \frac{L}{t} \quad (2.2)$$

Eş. 2.1' deki hız ifadesi, eş. 2. 2' de yerine yazılırsa:

$$\frac{m}{z} = \frac{2.e.V.t^2}{L^2} \quad (2.3)$$

Burada m/z oranı, uçuş süresinin karesi ile doğru orantılıdır. Bu yüzden bir iyonun kütlesi analizörün, kütlesi ve yükü bilinen örneklerle bir kez kalibrasyonunun yapılmasıyla, uçuş zamanı ölçülerek belirlenebilir. Bu şekilde süre ölçümü ile büyük iyonlar dahi yüksek bir doğrulukla saptanabilir ve bu da biyomoleküllerin moleküler ağırlıklarının tayini için uçuş zamanlı kütle analizörünü (TOF) en ideal yöntem yapar. Tipik olarak uçuş tüpleri yaklaşık iki metre uzunluğundadır. Diğer analizörlerle kıyaslandığında, bu yöntemin duyarlılığı çok iyidir, çünkü uçuş zamanlı analizör içerisinde ön ayırmadan geçen bütün iyonlar dedektöre ulaşırlar (Manz ve ark., 2003).

Lineer uçuş zamanlı kütle spektrometresi

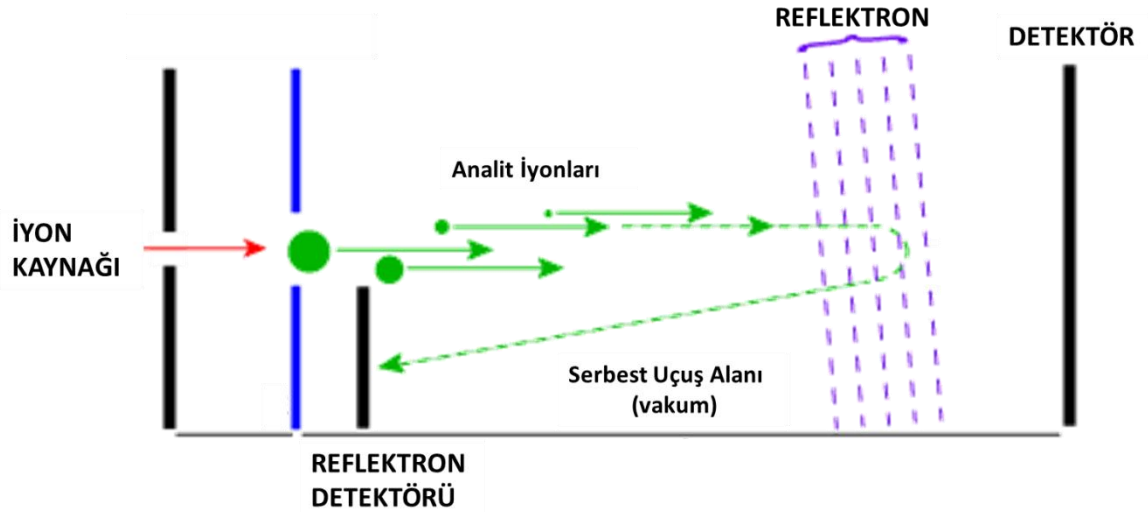
İyonlar elektrik potansiyeli tarafından sabit kinetik enerji ile hızlandırılırlar ve genellikle bu hızlandırma potansiyeli 1-30 kV' tur. Hızlandırılan bölgenin uzunluğu 1 cm' den azdır (Hillenkamp et al., 1991). Hızlanan iyonlar serbest alan bölgesine girerler ve tüpün sonundaki detektöre çarparlar. Uçuş yolunun uzunluğu 0.01-2 m arasında değişir (Hillenkamp et al., 1994). Farklı m/z oranlarındaki iyonlar farklı hızlarda hareket ederek detektöre farklı zamanlarda ulaşırlar. İyon kütlesi, standart iyonların uçuş zamanları hesaplanarak belirlenir (Siuzdak et al., 1996). Kütle ayırıcılığı (R) birbirine yakın değerlerde iki kütleyi birbirinden ayırma yeteneğidir (eşitlik 4) ve kütle spektrometresinde çok önemli bir parametredir (Hillenkamp et al., 1994).

$$R = M/\Delta m \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte; M gözlenen kütle, Δm ise ayrılması istenen ve kütleleri birbirine en yakın iki kütle arasındaki kütle farkıdır. Kütlesi 350 kDa' a kadar olan örneklerin ayırıcılığı lineer TOF kütle spektrometresinde yapılabilir (Karas et al., 1990; Weickhardt et al., 1996).

Reflektron uçuş zamanlı kütle spektrometresi

Reflektron modunda, TOF analizöründe uçuş tüpünün sonuna iyonların yönünü değiştirecek bir kuvvet uygulayan, karşı bir elektriksel alan uygulanır. Eşit kütleli fakat daha yüksek kinetik enerjili (hızı yüksek) iyonlar, karşı elektriksel alan içinde daha derinlere girerler ve yönlerini değiştirmek için daha uzun süre gerekir fakat uçuş alanında hızları daha düşük olan iyonlara yetişirler. Bu odaklanma noktası için dedektörün yeri doğru ayarlandığında, çok keskin ve birbirlerinden iyi ayrılmış sinyaller elde edilir. Lineer mod TOF ile yüksek molekül ağırlıklarına (100 - 900 kDa) çıkılabilir ancak kütle arttıkça ayırıcılık azalır. Reflektron mod TOF ise düşük molekül ağırlıklarıyla (10 - 90 kDa) sınırlıdır fakat ayırıcılık (10.000 civarında) çok iyidir (Manz et al., 2003).



Şekil 2.4. Uçuş zamanlı kütle spektrometresinde reflektron ve lineer modun şematik olarak birlikte gösterimi.

İyonların belirlenmesi

MALDI kütle spektrometresinde dedektör olarak genelde çok kanallı plaklar (MCP) kullanılır. Bu plaklar, fiber optik özellikli, kurşun içeren cam materyallerden

yapılmış silindirik birçok kanal içerir. Kanalların çapı 4 µm ile 25 µm arasında değişir ve merkezden-merkeze olan uzaklıkları 6 µm ile 32 µm arasında olabilir (Hoffmann et al., 1996). Plakalara çarpan iyonların enerjileri, dedektör yüzeyinde elektriksel enerjiye dönüştürülür. Oluşturulan elektron sinyali yükseltilir ve toplanır. Cihazın dizaynına bağlı olarak bu dedektörler tek başına da kullanılabileceği gibi, duyarlılığı artırmak için iki veya üç tanesinin kombinasyonu şeklinde de kullanılabilirler.

2.4.3.2. Elektrosprey iyonlaştırmalı-kütle spektrometresi (ESI-MS)

Elektrosprey iyonlaştırma ESI, ES, IS kodlarıyla tanımlanabilir; ayrıca, iyon spre, nanospre, sonik spre ve saf elektrospre de denilmektedir. En yumuşak iyonizasyon tekniğidir. Polar ve uçucu olmayan bileşikler için ideal bir iyonlaştırma yöntemidir. Bunlar arasında, proteinler, peptitler, nükleik asitler, farmasötikler ve doğal ürünler sayılabilir. Son yıllarda, elektrospray iyonlaştırma ile protein ve peptit karışımlarının kütle spektrometrisinde analizleri oldukça yaygınlaşmıştır. ESI, özellikle buharlaştırılması ve iyonlaştırılması zor olan büyük biyolojik moleküller için kullanışlı bir iyonlaştırma tekniğidir. İyonlar birden fazla pozitif yüke sahip olacak şekilde oluşturularak tayin edilebilmelerinin mümkün olması açısından ESI, desorpsiyon/iyonlaştırmalı yöntemlere kıyasla bazı durumlarda daha avantajlı olabilmektedir. Sıvı halde bulunan örnek, cihaz içerisine enjekte edilir ve akış hızı yaklaşık 1-10 µL/dk olacak şekilde bir iğne boyunca pompalanır (De Hoffmann et al., 1996). Nanolitre mertebesinde akış hızı (50-400 nL/dk) sağlanması da mümkündür. Enjekte edilen çözelti, içerisindeki analit moleküllerinde yük oluşturmak amacıyla, ucuna elektriksel potansiyel (3-5 kV) uygulanan iğne şeklindeki bir kapilerin ucundan püskürtülür (spraying) (Simpson, 2003). Bu püskürtme sonucu çok küçük damlacıklar şeklinde elde edilen çözelti bulutunun üzerine kurutucu gaz gönderilir. Bu kurutucu gazın amacı, damlacıkların içerisinde yer alan ve çözünme esnasında analit moleküllerinin etrafını sarmış olan çözücü moleküllerinin, hızla buharlaştırılarak uzaklaşmasını sağlamaktır. Çözücünün buharlaştırılması sonucunda, giderek küçülen çözelti damlacıklarında yer alan analit molekülleri, sahip oldukları yükler nedeniyle birbirlerini iterek kulombik patlamalara sebep olurlar. Bu patlamalar neticesinde aynı türün farklı yüklü iyonlarının oluşumu sağlanmış olur (Hoffmann et al., 1996). Bu sayede sahip

oldukları birden fazla fonksiyonel grup nedeniyle birden fazla yük oluşturma eğiliminde olan büyük moleküller çoklu yük taşıyan iyonlar haline dönüştürülebilirler. ESI kolaylıkla ayırma teknikleri ile birleştirilebilir.

2.4.4. Biyomoleküller ve Kütle Spektrometresi

Molekül ağırlığı tayini, biyopolimerleri tanımlamak için kullanılan ilk çalışmalar arasındadır. 1970' lerin sonuna kadar, bu bilginin elde edilmesini sağlayan yöntemler; elektroforetik, kromatografik ve ultrasentrifüj metotlarıydı. Sonuçlar çok kesin değildi. Çünkü molekül ağırlığı dışında, konformasyon ve hidrofobiklik gibi karakteristik özelliklere bağlı olarak ta sonuçlar değişmekteydi. Bu yüzden, bir makromolekülün kesin molekül ağırlığını bulma olasılığı, onun kimyasal yapısına bağlı olarak hesaplama yapmaktır. O zaman, kütle spektrometrik iyonlaşma teknikleri olan elektron iyonlaşma (EI) (Bleakney, 1929) ve kimyasal iyonlaşma (CI) (Munson and Field, 1966), analit moleküllerinin gaz fazında bulunmasını ve bu sebeple sadece uçucu molekülleri ya da uçucu hale getirilmeleri için örneklerin türevlendirilmelerini gerektirmekteydi. Ayrıca, molekül ağırlığı 5000 Da' a kadar uçucu olmayan moleküllerin iyonlaşmasını sağlayan alan desorpsiyonlu iyonlaşma tekniği (FD) (Beckey, 1963), deneyimli operatör gerektiren hassas bir teknikti (Morris, 1980). Bu da, büyük, uçucu olmayan ve sıklıkla ısı dayanıklı biyolojik moleküller üzerinde kütle spektrometresi uygulamasını sınırlamaktaydı. Plazma desorpsiyonu (PD) (Thorgersen et al., 1974; Harkansson, 1982), (FAB) (Barber et al., 1981) ya da lazer desorpsiyonu (LD) (Cotter, 1984) gibi, sıvı ya da katı yüzeylerden önceden var olan iyonların emisyonuna bağlı olarak desorpsiyon-iyonlaşma metotlarının gelişmesi, biyomoleküler analiz alanında kütle spektrometrisi için ilk hamleyi sağlamıştır. O zamandan beri, asıl problem iyonların üretiminden yüksek kütleli tek yüklü iyonların analizi olmuştur. Bu iyonların teknik olarak yüksek hassasiyette ve yüksek çözünürlükte tayini zordur. 1990' ların başlarında, iki yeni iyonlaşma tekniği olan ESI (Fenn et al., 1989) ve TOF analizörüne bağlı MALDI (Karas and Hillenkamp, 1988) geliştirildi ve biyolojik araştırmalarda kütle spektrometrisinin rolü artarak devam ettirildi. Bu yöntemler, yüksek molekül ağırlığında biyomoleküllerin analizlerinin yüksek kesinlikle yapılmasını sağlamıştır. Bugün fen bilimlerinde, kütle spektrometrisi en yaygın olarak kullanılan analitik tekniktir (Suizdak, 2003; Burlingame, 2005).

2.4.4.1. Peptit ve Proteinler

Peptit ve proteinler, birbirlerine peptit bağlarıyla bağlı 20 tane en yaygın amino asit kombinasyonundan oluşan lineer polimerlerdir. Ayrıca, ribozom tarafından üretilen protein, aminoasitlerin birbirine eklenmesi sonrasında, post-translasyonel modifikasyon olarak adlandırılan kovalent modifikasyonlara uğrayabilirler. 200' ün üzerinde modifikasyon bugüne kadar tanımlanmıştır (Krihna and Wold, 1997; Walsh, 2006). Bunlardan en önemlileri glikolizasyon, disülfid köprülerinin oluşması, fosforilasyon, sülfasyon, hidroksilasyon, karboksilasyon ve N-uçlu asidin asetilasyonudur. Kütle spektrometresi yalnızca peptit ve moleküllerin molekül ağırlığının bulunmasında değil aynı zamanda özellikle ardışık kütle teknikleriyle kullanıldığında sekans analizlerinin yapılmasında da kullanılır.

2.4.5. ESI and MALDI nin peptit ve protein analizlerinde kullanımı

Kütle spektrometrisinde sıklıkla, peptit ve protein çalışmalarında, iyonlaşma metodu olarak ESI ve MALDI kullanılır. Bütün bu teknikler, kararlı iyon oluşumuyla ve parçalanma ürünlerinin varlığıyla tanımlanırlar. ESI çok yüklü iyonlar üretir. Bu da; dörtkutuplu, iyon yakalayıcı ve manyetik cihazlar gibi geleneksel kütle spektrometreleri ile büyük moleküllerin tayininin yapılmasını sağlar. ESI ve MALDI' nin tayin sınırı, örneğin yapısı, hazırlanması, safsızlıkları ve cihazı kullanan operatörün yeteneği gibi birçok faktöre bağlıdır. Peptit ve proteinler için tayin sınırı, pratikte femtomol ile pikomol arasındadır. Hatta attomol sınırı bile rapor edilmiştir. (Worm et al., 1994; Martin et al., 2000). Yarışmalı iyonlaşma sebebiyle, kompleks karışımların analizleri karmaşıktır (Cohen and Chait, 1996). MALDI ve ESI' da gözlenen bu durum, çözeltideki diğer peptitlerin varlığında bulunan bazı peptitlerin moleküler iyon türlerinin baskılanmasıyla tanımlanır. Bu peptitlerin sinyalleri tamamen kaybolabilir ve bu yüzden bu peptitler, tek başlarına analiz edilebilmeleri durumunda kolayca tayin edilebilir sinyaller verebilecekken, karışım halinde tayin edilmelerinde uygun sinyallerin alımında zorluklarla karşılaşılacaktır. Yarışmalı iyonlaşmadan, karışımın içerdiği peptitlerin kimyasal türevlendirilmesi üzerinden pH ya da matriksi değiştirerek kaçınılabilir ya da ters faz sıvı kromatografisi üzerinden karışımın kısmi fraksiyonuyla her bir fraksiyonun aynı hidrofobiklikte peptit içermesi sağlanarak bu durum düzeltilebilir. Hem ESI hem de MALDI için, örnek derişimi ve kirletici maddelerin karmaşıklığı, hem hassasiyette hem de kütle

doğruluğunda önemli rol oynar. Biyolojik örnekler sıklıkla, fazla sayıda kirlilik içeren peptit ve proteinlerin seyreltilmiş çözeltileridir. Bu iki sorun, seyreltme ve kirlilik, özellikle pikomol gibi toplam örnek miktarı düşük olduğunda baş edilmesi kolay olmayan sorunlardır. Farklı kaynaklardan gelen kirlilikler tampon çözeltileri, uçucu olmayan tuzları, deterjanları ve kaynağı bilinmeyen birçok bileşiği içerir. ESI sadece düşük miktarda kirlilik iyonlarını tolere edebilir. Bu iyonlar, ilgilenilen kaynaktan gelen iyonların çokluğunu azaltırlar ve onları tamamen baskılayabilirler. Ayrıca sıklıkla eklenen iyonların oluşumuna sebep olurlar. Dahası birçok tür üzerinde iyon akımı dağılımıyla hassasiyeti azaltırlar. Buna ek olarak, mol kütlelerinin tayinini ya da eğer protonlamış molekül iyonlarından bağlanan iyonlar ayıramazsa mol kütlelerinin doğruluğunu karmaşıktırır. Genellikle, MALDI birçok kirlilik için ESI' a göre daha tolere edicidir. Bu, örneğin matriks ile kristallenmesi sırasında gerçekleşen bazı ayırmalara bağlı bir durum olabilir (Beavis and Chait, 1990). Hangi iyonlaşma metodu olursa olsun, kütle spektrumlarının kalitesi, kirlilik azaldıkça artar. İkinci problem genellikle biyolojik örnek içerisinde ilgilenilen bileşiğin düşük derişimidir. Analiz için gerekli olan hacim hem ESI hem de MALDI için mikrolitre aralığındadır (Wilm et al., 1996) ve sadece bunun bir parçası analiz boyunca harcanır. Fakat derişim gözlenen spektrumda çok önemli etkiye sahiptir.

2.4.6. Aptamerler ile zenginleştirilecek proteinler

2.4.6.1. Trombin

MALDI ve ESI kütle spektrometreleri ile protein komplekslerinin oluşum analizleri yapılabilir, mutasyonlar ve proteinlerin hangi ortamda ne kadar bulunduğu tespit edilebilir. İnsan vücudu için çok önemli biyomoleküller olan trombin proteini ve lizozim enzimi bu tez kapsamında aptamer bağlı polimerik yüzeylerde zenginleştirildikten sonra, MALDI-Kütle Spektrometresi ile analiz edilmişlerdir. Trombin proteini, α -trombin, insan vücudunda birçok işlemde yer alan bir tripsin benzeri serin proteazdır. Trombin, pıhtılaşma sürecinde fibrinojenin fibrine dönüştüğü son basamakta görev alır. Trombin aynı zamanda inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi diğer faaliyetlerde de görev alır. Yaralanmaya tepki olarak, trombin monositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktiktir. Trombinler, sitokinez, kemotaktik faktör ve büyüme faktörü içeren çok fazla sayıda medyatörü

serbest kılan nötrofilleri ve trombositleri aktive edebilir. Bunların hepsi, iltahapları yok eder ve bir yaralanmanın iyileşmesini sağlar. Trombinin civciv embriyo fibroblastları ve düz kas hücreleri için mitojenik olduğu kanıtlanmıştır. Trombin trombositleri aktive etmektedir (Vu et al, 1991). Trombin protrombinin aktifleşmiş ürünüdür. 1989’ da, Bode ve arkadaşları trombinin X-ışını yapısını yayınlamışlardır. Aynı grup 1992’ de saflaştırılmış kristalini rapor etmişlerdir. Çünkü dizi homolojisi yüzünden, trombin numaralandırma kemotripsinojen dizisini temel alır. Trombin molekülü iki zincirden oluşur. A zinciri 36 aminoasitten oluşur ve proteolitik aktiviteden bağımsızdır. B zinciri 259 aminoasitten oluşur ve protrombinin karboksil ucu dizisinden türer. B zinciri üç tane aktif amin bölgesi içerir, bunlar: His57, Asp102 ve Ser195. Trombin bir proteazdır ve tripsin benzeri davranışa sahiptir. Arjinin ayrıldıktan sonra kendi substratlarını ayırmayı tercih eder. Trombin, polipeptit zincirlerini bağlayan iki tane disülfid bağı içerir. Tripsin gibi, trombin B zinciri aktif bölge kısmı olarak Ser, His ve Asp içerir fakat ayrıca ek olarak, onu tripsinden daha derin ve ince yapan, aktif bölge yarığında uzanan loblar içermesidir. Trombin, tripsinden farklı olarak ekstra yüzey yapıları içerir, bu da makromoleküler substratlarla etkileşimini sağlar ve onu daha seçici bir proteaz yapar. Kan pıhtılaşması, trombin enziminin oluşması ve bu enzimin çözünür halde bulunan fibrinojen’i (Faktör I) parçalayarak katı haldeki fibrin pıhtısına çevirmesi şeklinde özetlenebilir. Normal koşullarda dolaşan kanda trombin yoktur. Kanda proenzim şeklinde Protrombin (FII) bulunur. Trombin kanın pıhtılaşmasındaki merkezi rolünün yanı sıra, giderek daha belirgin hale gelmiştir ki, trombin ve trombin reseptörleri birçok diğer psikolojik işlemlerde yer almaktadırlar ve tümör ilerlemesi ve metastazı, iltihaplanma, sinirsel bozukluklar ve kardiyovasküler komplikasyonlar gibi hastalık durumlarını belirlemede katkıda bulunmaktadırlar.

2.4.6.2. Lizozim

Lizozim enzimi ise, memelilerde bulunan özel bir proteindir ve genellikle ‘vücudun kendi antibiyotiği’ olarak adlandırılır. Canlı içinde, lizozim bakterilerin polisakkarit duvarlarında bulunan bir asetal grubun bölünmesini katalizleyen bir biyomoleküldür. Doğal ilaç gibi davranır (Vocadlo et al., 2004). Bakteri eritici özelliğe sahiptir yani bakteriyel enfeksiyon riskini azaltır. Bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Tükürük, gözyaşı, ter ve mukus gibi vücut salgılarında bulunur. Lizozim

içte 4 disülfid bağı ve 129 aminoasit birimi içeren tek polipeptit zincirinden oluşmuş oldukça küçük bir proteindir. Molekül ağırlığı 14,400' dür. İsoelektrik noktası 11,0' dır (Vocadlo et al., 2004) ve beyaz yumurta proteini % 3,5 lizozim içerir (Hoover et al., 1999). Nötral pH' larda lizozim pozitif yüke sahiptir. 17 pozitif yük ve 9 negatif yükten oluştuğu için net yükü + 8' dir (Blake et al., 1965). Lizozimin önemli katalitik grupları olan Asp 52 ve Glu 35, grup özgün reaksiyonların kullanımı vasıtasıyla deneysel olarak tanımlanmıştır. Ayrıca lizozimin pH hızı profilinin analizi, bu enzimin pK' ları 3,8 ve 6,7 olan katalitik olarak önemli iki iyonlaşabilir gruba sahip olduğunu göstermiştir. Alexander Fleming, lizozimin ilk defa antibakteriyel özelliğini tespit etmiştir. David Philips lizozimin üç boyutlu yapısını tanımlamıştır. Lizozim karbonhidrat bağlayan bir protein ve enzim olması açısından ilk proteindir. Protein veri bankasında depolanan en yaygın proteindir. Moleküler genetiğin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Lizozimin salya, serum ve idrardaki bulunma miktarı bir çok hastalıkta klinik indeks olarak kullanılır (Levinson et al., 2002). Romatizmal hastalıklarda gözyaşındaki lizozim miktarı azalır. Bu azalma hastalığın teşhis edilmesine katkıda bulunur. Akut monositik veya myelomonositik lösemi, kronik myeloid lösemi, bazı böbrek hastalıkları ve kronik enfeksiyonlarda (tüberkiloz gibi) serum lizozim düzeyi artar. Lizozimin oldukça küçük bir yapıda olması ve kolaylığı onu, protein tayinlerinde yeni metotların geliştirilmesinde mükemmel bir model bileşik yapmaktadır. Tavuk yumurtası beyazı lizozimi uzun süredir sistematik protein-protein etkileşimleri çalışmalarında önemli bir model sistemdir. Lizozimin yüksek çözünürlükte kristal yapısı uygunluğu, hem serbest hali hem de çeşitli antikorlarla kompleksi, geniş deneysel ve teorik araştırmalara yol açmıştır (Hibbits et al., 1994; Shick et al., 1997; Xavier and Willson, 1998; Wibbenmeyer et al., 1999; Sinha et al., 2002).

2.4.7. Oligonükleotitlerin kütle spektrumları

Uzun yıllar, kütle spektrometresi nükleik asitlerin analizlerinde önemli bir rol oynamıştır. Çünkü nükleik asitler biyopolimerlerin en polar olanlarıdır. Analizlerinde ESI ve MALDI' nin avantajlarından çok fazla yararlanılır çünkü bu teknikler çok küçük miktarda oligonükleotitlerin analizini sağlarlar. Buna rağmen, peptit ve proteinler gibi kolayca analiz edilemezler. Bunun bir sebebi, genellikle sodyum ve potasyum atomlarını içeren oluşuma bağlı olarak fosfodiester

gruplarıyla alkali metal iyonlar arasında çok güçlü bağların oluşmasıdır. Oligonükleotitler en iyi negatif iyon modunda tayin edilirler. Çeşitli kütle değerleri üzerinden moleküler türlerin iyonlarının bu dağılımı, sinyal-yük oranının azalmasıyla ilişkilidir. Her bir iyonun ayrılması yüksek ayırıcılık gerektirir. Genellikle, ayrılma iyi olmaz ve geniş bir pikle sonuçlanır. Bu, kütle tayininde kesinliği düşürür. Ayrıca, küçük kütle farklılıklarında bileşikler içeren karışımlar ayrılmamaktadır. Amonyum iyonları örneğe eklenirse bu zorluğun üstesinden gelinebilir (Stults and Masters, 1991). Böylece fosfodiester gruplarına bağlanan alkali metal iyonları yer değiştirir fakat gaz fazında amonyak uçar ve serbest oligonükleotitten ayrılırlar. Oligonükleotitlerin analizlerinde ikinci bir sorun onların kolay parçalanmalarıdır. Oligonükleotitler nükleik asit bazlarını 1,2- eliminasyon mekanizmasıyla kaybetme eğilimindedirler. Şekerin 5' ya da 3' ucundan nükleik asit zincirlerinin parçalanması bir baz kaybetmesinden sonra gerçekleşebilir. Bu kararlılık problemi MALDI analizlerinde ESI analizlerine göre daha önemli bir konudur. Oligonükleotitler, hem pozitif hem de negatif iyon modunda analiz edilebilirler. Buna rağmen, negatif iyon modu özellikle ESI analizlerinde daha yüksek hassasiyet ve ayırıcılık sağlar. Oligonükleotitlerin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizlerindeki başarısı matriks seçimine ve örnek hazırlanmasına bağlıdır. En temel ilerleme; oligonükleotitler için özgün yeni matriks seçenekleri ile sonuçlanmıştır (Hoffmann, and Stroobant, 2007). Örneğin, 3-hidroksipikolinik asit bunlardan biridir (Wu et al., 1993). Örnek hazırlamadaki temel hedef, her yerde bulunan alkali metal iyonlarından gelen girişimin ortadan kaldırılmasıdır. Bunun için, katyon değiştirme kolonlarının kombinasyonları kullanılarak, amonyum tuzlarının örneğe eklenmesiyle, alkali metal iyonları amonyum ile yer değiştirmesi sağlanır. MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumlarında nükleotide ait moleküler iyon sinyallerinin gözlenmesi ayrıca nükleotidin yapısına, büyüklüğüne ve nükleik asit bazlarının bileşimine de bağlıdır.

2.5. Biyokonjügasyon kimyası

Biyokonjügasyon, her bir bileşenin kendi özelliklerinin birleşimine sahip, iki ya da daha fazla molekülün birleşerek yeni bir kompleksi oluşturmasını içerir. Bireysel altiviteleriyle beraber doğal ya da sentetik bileşikler, özgün maddelerin oluşturulması için kimyasal olarak birleştirilebilirler. Böylelikle, kompleks bir

karışımda hedefi ayırt ederek bağlanabilen protein, başka bir molekülle çapraz bağlanabilir ve tayin edilebilmeleri için izlenebilir eşlenik oluşturabilirler. Algılama bileşeni hedef bileşen için görünürlük sağlar çünkü yeri belirlenebilir kompleks oluşturur. Modifiye edilmiş ya da konjuge moleküller, saflaştırma, özgün hücre bileşenlerini tayin ya da yer belirleme ve hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. Çapraz bağlı ve modifiye edilmiş kimyasallar, peptit ve proteinlerin, şeker ve polisakkaritlerin, nükleik asit ve oligonükleotitlerin, yağların ve kimyasal olarak türevlendirilebilen diğer düşünülebilir bütün moleküllerin doğal hallerini ve fonksiyonlarını değiştirmek için uygulanabilirler. Dikkatli modifikasyonlar ve konjugasyon stratejileri ile proteinlerin yapıları ve işlevleri incelenebilir, aktif bölge konformasyonu keşfedilebilir ya da reseptör-ligand etkileşimleri açıklanabilir. Biyokonjüge reaktifler; sıfır uzaklıklı çapraz bağlayıcılar, homobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar, heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar, trifonksiyonel çapraz bağlayıcılar gibi çeşitli gruplara ayrılır. Modifiye edilmiş ya da konjüge moleküllerin üretilmesi için, biyokonjugasyon kimyasında gelişmeler olmasaydı, fen bilimlerinde bugün bilinen birçok araştırma olanaksız olurdu.

2.5.1. Heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılar

2.5.1.1. SMCC ve Sülfo-SMCC

Süksinimidil-4-(N-maleimidomethyl)sikloheksan-1- karboksilat (SMCC) ve onun suda çözünebilen benzeri olan Sülfo-Süksinimidil-4-(N-maleimidomethyl)sikloheksan-1- karboksilat (Sulfo-SMCC), amin ve sülfidril içeren moleküllerin kovalent konjugasyonuna izin veren N-hidroksisüksinimid (NHS) ester ve maleimid gruplar içeren heterobiyofonksiyonel çapraz bağlayıcılardır. NHS esterleri birincil aminler ile pH 7-9 arasında reaksiyona girerler ve amit bağları oluştururlar. Bu sırada maleimidler sülfidril gruplarıyla pH 6.5-7.5' te reaksiyona girerler ve kararlı tiyoeter bağları oluştururlar. Sulu çözeltilerde NHS esteri hidrolitik bozunması, hızın pH ile arttığı, yarışmalı reaksiyondur. Maleimid grup'u NHS-ester grubuna göre daha karardır fakat pH değerleri > 7.5 olduğunda yavaşça hidroliz olur ve sülfidriller için reaksiyon özgünlüğünü kaybederler. Bu sebeple bu çapraz bağlayıcılarla konjugasyon genellikle pH 7.2-7.5' ta gerçekleştirilir ki NHS-ester (amin hedefli) reaksiyonu, maleimid reaksiyonundan (sülfidril hedefli) önce ve ardarda olur. Bu reaktiflerdeki sikloheksan halkası, bu halkayı içermeyen diğer

benzer reaktiflere göre maleimid gruplarının hidroliz hızını düşürür (Ishikawa et al., 1983). Bu özellik, SMCC veya Sulfo-SMCC ile daha önceden maleimid aktive edilmiş proteinlerin, sülfidril içeren moleküllerin sonraki konjugasyonu için, liyofilize edilmesini ve saklanması sağlar. Birçok maleimid aktive edilmiş protein ürünleri bu şekilde üretilir. SMCC ve Sulfo-SMCC sıklıkla antikor-enzim ve hepten taşıyıcı protein konjugasyonları hazırlama için iki aşamalı reaksiyonlarda kullanılır. İlk olarak, amin içeren protein, bir kaç kat molar fazlalıkta çapraz bağlayıcı ile reaksiyona girer ve ardından reaksiyona girmemiş fazla reaktif, diyaliz ile ya da tuzdan arındırma ile uzaklaştırılır. Son olarak, sülfidril içeren molekül eklenir ve birinci proteine önceden bağlanmış maleimid gruplarıyla reaksiyona girer. Sulfo-SMCC suda ve yaklaşık 10 mM' a kadar sulu tampon çözeltilerde çözünebilir fakat çözünürlük artan tuz derişimiyle azalır.

Şekil 2.5. Sülfö-SMCC' nin antikor-enzim bağlanmasındaki rolü.

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

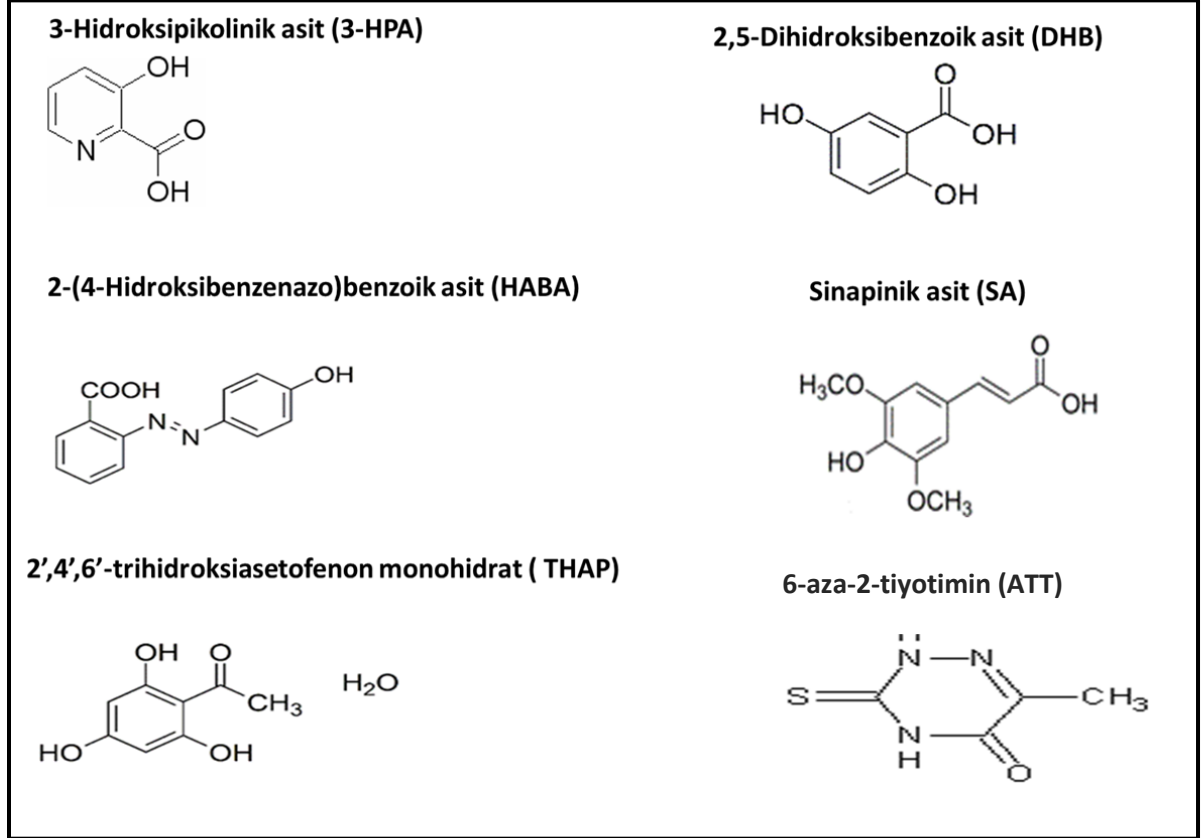
Sığır Serum Albümini (BSA), sitokrom c, lizozim, trombin, tripsin (sığır pankreasından), amonyum bikarbonat, asetonytril, trifloroasetik asit, α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA), 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), 2-(4'-Hidroksibenzenazo)benzoik asit (HABA), sinapinik asit (3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit (SA), 3-Hidroksipikolinik asit (3-HPA) 6-aza-2-tiyotiyamin (ATT), 2',4',6'-Trihidroksiasetofenon (THAP), ditranol, diamonyum sitrat, amonyak, Tris(hidroksimetil)aminometan, hidroklorik asit (HCl), asetonytril (ACN), 1,4-Ditiyotretitol (DTT), iyodoasetamid, fosforik asit (H_3PO_4), magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve kalsiyum klorür ($CaCl_2$) Sigma Aldrich (A.B.D.) den alınmıştır. Sülfosüksinimidil-4-(N-maleimidometil) sikloheksan-1- karboksilat (Sülfos-MCCC) çapraz bağlayıcı ajan Thermo Scientific (A. B. D.) den temin edilmiştir. Amin fonksiyonel gruplu polistren divinil benzen (grubumuz tarafından sentezlenmiştir, Aşkun, et al.). 5' Tiyol C6 S-S 100 nmol HPLC ile saflaştırılmış trombin aptameri (5'-TTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG-3', 21 baz), kontrol aptameri (5'-TTTTTTAAGTTCATCTCCCCGGTGGTGGTTGTGGTT-3', 37 baz), lizozim aptameri (5' TTTTTTATCAGGGCTAAAGAGTGCAGAGTTACTTAG-3', 36 baz) Integrated DNA Technologies (IDT, ABD) den satın alınmıştır.

3.2. Lizozim enzimi, lizozim aptameri ve enzim-aptamer komplekslerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizleri

Lizozim ve aptameri suda çözülerek 70 pmol/ μ L aptamer stok çözeltisi ve lizozim enziminin 70 pmol/ μ L enzim stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hem lizozim enzimi hem de lizozim aptameri suyla seyreltilerek sırası ile 7 pmol/ μ L ve 0.7 pmol/ μ L derişimlerdeki çözeltileri hazırlanmıştır. Değişik MALDI matriksleri kullanılarak, çeşitli karışımlarda hem lizozim enzimi hem de lizozim aptamerinin 70 pmol/ μ L, 7 pmol/ μ L ve 0.7 pmol/ μ L derişimlerinde MALDI-Kütle Spektrometresi analizleri yapılmıştır. Ayrıca değişik matrikslerde, aynı derişimler olan lizozim ve onun aptamerleri eşit hacimlerde karıştırılarak oluşturulan aptamer-enzim komplekslerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizleri de gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, aptamer, enzim ve aptamer-enzim kompleksi için en uygun matrikslerin

tespiti için şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Analizi yapılan örneklerin hazırlanışı bazen kurutulmuş damlacık metodu uygulanarak bazen de ince tabaka metoduyla örnek tutucusu üzerine uygulanmışlardır.

3.2.1. Kullanılan MALDI matrikslerin hazırlanışları



Şekil 3.1. Kullanılan MALDI matrikslerinin molekül yapıları.

3-HPA matriksinin hazırlanışı: 50 mg/mL su/asetonitril (50:50; v/v) çözücü karışımında hazırlanan 3-HPA çözeltisi ile 50 mg/mL suda çözünerek hazırlanmış diamonyum sitrat çözeltisinin sırasıyla 9:1 oranında karıştırılmasıyla MALDI matriksi hazırlanmıştır.

THAP matriksinin hazırlanışı: Su/asetonitril (50:50; v/v) çözücü karışımında hazırlanan 10 mg/mL THAP çözeltisi ile suda çözünerek hazırlanmış 50 mg/mL diamonyum sitrat çözeltisinin sırasıyla 9:1 oranında karıştırılmasıyla MALDI matriksi hazırlanmıştır.

HABA matriksinin hazırlanışı: 1.3 mg/mL HABA çözeltisi su/asetonitril (50:50; v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

2,5-DHB matriksinin hazırlanışı: Bu matriks için değişik bileşenlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Bunlar:

- DHB 1 matriksi: 10 mg/mL DHB çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.
- DHB 2 matriksi: 10 mg/mL DHB çözeltisi deiyonize su çözücüsünde hazırlanmıştır.
- DHB 3 matriksi: 10 mg/mL DHB çözeltisi 50 mM amonyak çözeltisinde hazırlanmıştır.
- DHB 4 matriksi: 10 mg/mL DHB çözeltisi 500 µL ACN ve 500 µL 50 mM amonyum sitrat dibazik çözeltileri karışımında hazırlanmıştır.
- DHB 5 matriksi: 10 mg/mL DHB çözeltisi 500 µL ACN ve 500 µL 50 mM amonyak içeren çözücü karışımında hazırlanmıştır.

CHCA matriksinin hazırlanışı: 10 mg/mL CHCA çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

Sinapinik asit matriksinin hazırlanışı: 10 mg/mL sinapinik asit çözeltisi su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v/v) çözücü karışımında hazırlanmıştır.

ATT matriksinin hazırlanışı: Bu matriks nötral matriks olması nedeni ile aşağıdaki farklı şekillerde hazırlanmıştır:

- ATT 1 matriksi: 10 mg/mL ATT, 20 mM amonyum sitrat ve asetonitril (50:50; v/v) içeren çözücü karışımında hazırlanmıştır.
- ATT 2 matriksi: 10 mg/mL ATT, 500 µL ACN ve 500 µL 50 mM amonyum sitrat dibazik içeren çözücüde hazırlanmıştır.

- ATT 3 matriksi: 10 mg/mL ATT, 500 µL ACN ve 500 µl 50 mM amonyak çözeltisi içeren çözücüde hazırlanmıştır.

Kontaminasyon ve bozunma problemlerini en az değere indirebilmek için bütün matriks çözeltileri günlük ve taze olarak hazırlanmıştır.

3.3. Kompleks oluşumu üzerine tampon çözeltisinin etkisinin incelenmesi

- Daha iyi kompleks oluşumunun gözlenmesi için uygun tampon çözeltisi belirleme çalışmaları yapıldı. İlk olarak, 0.242 g Tris(hidroksimetil)aminometan 90 mL deiyonize suda çözüldükten sonra 100 mM NaCl ve 10 mM MgCl₂ eklendi. Oda sıcaklığında pH 7,5 oluncaya kadar HCl ilave edildi ve son hacim 100 mL' ye su ile tamamlandı. 7 pmol/µL aptamer iki saat boyunca bu tampon çözeltinin içinde inkübe edildi. Aynı tampon çözelti ile stok çözeltisinden seyreltilen 7 pmol/µL lizozim enzimi aptamer çözeltisine eklendi. DHB 3 matriksi ile ince tabaka yöntemiyle örnek tutucusu üzerine uygulandı.
- Başka bir tampon çözeltisi oluşturmak için, 0.242 g Tris (hidroksimetil) aminometan 90 mL deiyonize suyla çözüldükten sonra 10 mM MgCl₂ eklendi. Oda sıcaklığında pH= 7.5 oluncaya kadar HCl ilave edildi ve son hacim 100 mL' ye su ile tamamlandı. 7 pmol/µL aptamer iki saat boyunca bu tampon çözeltinin içinde inkübe edildi. Aynı tampon çözelti ile stok çözeltisinden seyreltilen 7 pmol/µL lizozim enzimi aptamer çözeltisine eklendi.. Enzim-aptamer kompleksi DHB 3 matriksi ile ince tabaka yöntemiyle örnek tutucusu üzerine uygulandı.
- 0.242 g Tris(hidroksimetil)aminometan 90 mL deiyonize suyla çözüldükten sonra 10 mM MgCl₂ eklendi. Oda sıcaklığında pH= 7.5 oluncaya kadar HCl ilave edildi ve son hacim 100 mL' ye su ile tamamlandı. 7 pmol/µL aptamer iki saat boyunca bu tampon çözeltinin içinde inkübe edildi ve ardından 80 °C' ye ısıtılıp soğutuldu. Aynı tampon çözelti ile stok çözeltisinden

seyreltilen 7 pmol/ μ L lizozim enzimi aptamer çözeltisine eklendi. Enzim-aptamer kompleksi DHB 3 matriksi ile ince tabaka yöntemiyle örnek tutucusu üzerine uygulandı.

- Son olarak, 20 mM pH= 7.5 olan Tris- HCl tampon çözeltisi hazırlandı. 7 pmol/ μ L 20 μ L lizozim enzimi ve 7 pmol/ μ L 20 μ L lizozim aptameri 20 mM pH= 7.5 olan Tris- HCl tampon çözeltisi ile ayrı ayrı seyreltilerek elde edildikten sonra karıştırıldı. DHB 3 matriksi ile hazırlanan örnekler ince tabaka yöntemi kullanılarak analiz edilmek üzere örnek tutucusu üzerine uygulandı.

3.4. Kompleks oluşumuna tuz etkisinin incelenmesi

- 7 pmol/ μ L 10 μ L lizozim enzimi ile 7 pmol/ μ L 10 μ L lizozim aptameri karıştırıldı. 1 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM derişimlerinde CaCl_2 çözeltileri hazırlandı. 5' er μ L karışım örneğinden alınıp, sırasıyla her derişimdeki CaCl_2 çözeltilerinden 1 μ L alınarak karıştırılıp 4 farklı analiz örneği hazırlandı. DHB 3 matriks çözeltisi hazırlandı ve dört farklı örnek çözeltisiyle ayrı ayrı karıştırılıp, ince tabaka yöntemi kullanılarak, analiz edilmek üzere örnek tutucusu üzerine uygulandı.
- 10 mM 1 mL MgCl_2 çözeltisi hazırlandı. 7 pmol/ μ L 20 μ L lizozim enzimi ve 7 pmol/ μ L 20 μ L lizozim aptameri, stok çözeltilerinden, MgCl_2 çözeltisi ile ayrı ayrı seyreltilerek elde edildikten sonra karıştırıldı. DHB 3 matriksi ile hazırlanan örnekler ince tabaka yöntemi kullanılarak analiz edilmek üzere örnek tutucusu üzerine uygulandı.

3.5. Lizozim enziminin ve lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin tripsin ile parçalanma ürünlerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizleri

0,4 mg/mL 100 μ L lizozim aptameri çözeltisi hazırlanıp 0.2 mg/mL' ye deiyonize su ile seyreltildi. 1 mL deiyonize su içerisinde çözülerek 0.2 mg/mL tripsin çözeltisi hazırlandı. Önce disülfid bağlarını kırmadan triptik parçalama işlemi uygulanmıştır.

Bunun için hazırlanan lizozim enzimi çözeltisinin 100 µL' sine, hazırlanan tripsin çözeltisinden 10 µL eklenerek 37 °C' de 24 saat inkübasyon yapıldı. 2. 18. ve 24. saatlerde triptik parçalamaya uğrayan protein çözeltilerinden bir miktar alınarak 1 µL TFA eklenip parçalama işlemleri durdurulmuştur ve CHCA matriksi ile MALDI-Kütle Spektrometresi' nde analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin tripsin ile parçalanma çalışması yapıldı. Bunun için, 50 µL 0.4 mg/mL lizozim enzimi ve 50 µL 0.4 mg/mL lizozim aptameri karıştırılarak 10 µL tripsin çözeltisinden eklenerek 37 °C' de 2 saat inkübe edildi. Parçalama işlemi 1 µL TFA eklenerek durdurulduktan sonra CHCA matriksi ile MALDI-Kütle Spektrometresi' nde analizleri gerçekleştirildi. Bu işlemler, disülfid bağları kırılarak da parçalama işlemleri gerçekleştirildi. Lizozim enzimi çözeltisine (1 mg/mL) 10 mM DTT eklenerek yarım saat 80 °C' de bekletildi. Ardından 0.1 M iyodoasetamid çözeltisinden eklenip karanlıkta yarım saat muamele edildi. Son olarak, 100 µL tripsin çözeltisinden eklenerek triptik parçalama başlatıldı. Benzer şekilde, 2. 18. ve 24. saatlerde triptik parçalamaya uğrayan çözeltilerden bir miktar alınarak CHCA matriksi ile MALDI-Kütle Spektrometresi' nde analizleri gerçekleştirildi.

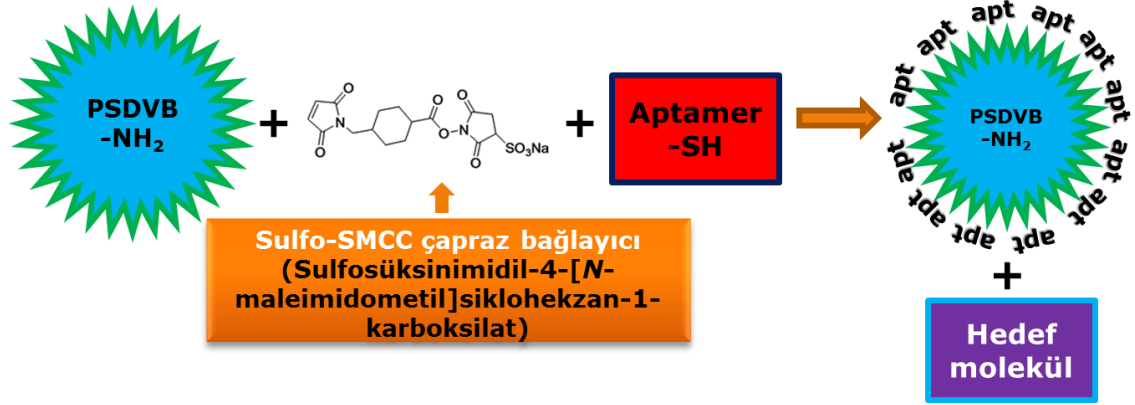
3.6. BSA ve Sitokrom c proteinlerinin çözeltide tripsin enzimi ile parçalanması:

Bu amaçla öncelikle disülfid bağları kırılarak parçalama işlemleri gerçekleştirildi. 1 mg/mL BSA ve 1 mg/mL sitokrom c çözeltilerine 10 mM DTT eklenerek yarım saat 80 °C' de bekletildi. Ardından 0.1 M iyodoasetamid çözeltisinden eklenerek karanlıkta yarım saat muamele edildi. Son olarak, 100 µL 1 mg/mL tripsin çözeltisinden eklenerek triptik parçalama başlatıldı. İki saat sonunda 10 µL TFA çözeltisi eklenerek parçalama işlemleri durdurulduktan sonra, CHCA matriksi kullanılarak MALDI-Kütle Spektrometresi sistemi ile analizleri gerçekleştirildi.

3.7. Aptamer bağlı polimerik yüzeylerde enzim ve protein zenginleştirilmesi

10 mg amin fonksiyonel gruplu polistiren divinil benzen hassas olarak tartıldı. Üzerine 100 µL pH= 7.2 Tris-HCl tampon çözeltisi eklendi. 2 mg/µL Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısından 200 µL eklenip 30 °C' de sıcak su banyosunda 6 saat bekletildi. Daha sonra yüzeydeki fazla çapraz bağlayıcıyı uzaklaştırmak için tampon çözelti ile yıkandı. 100 µL aptamer (hangi protein ya da enzim analiz

edilecekse onun aptameri) önce 80 °C' de su banyosunda ısıtılıp soğutuldu. Ardından çapraz bağlayıcı ile muamele edilmiş yüzeye gerekli olan aptamer eklenerek bir gece bekletildi. 8.000 rpm' de iki dakika santrifüj işlemi uygulandıktan sonra çözelti aptamer bağlı polimerik yüzey üzerinden uzaklaştırıldı ve polimerik yüzey üç defa tampon çözelti ile yıkandı. Aptamer bağlı polimerik yüzey dört eşit parçaya ayrılıp ayrı ayrı ependorflara alınarak enzim ve protein zenginleştirme işlemlerinde kullanılmak üzere saklandı. Zenginleştirilip analiz edilecek örnek bunlardan birine eklenerek dört saat boyunca 30 °C' de inkübe edildi. 8.000 rpm' de iki dakika santrifüj uygulandıktan sonra ortamdaki fazla protein ya da enzim uzaklaştırılıp, yüzey tampon çözelti ile yıkandı.



Şekil 3.2. Aptamer bağlı yüzeylerin elde edilmesinin ve hedef molekül ile etkileştirilmesinin şematik gösterimi.

3.7.1. Katı yüzey üzerinde proteolitik parçalanmanın incelenmesi

Protein veya enzim tutturulmuş aptamer bağlı polimerik yüzeye 10 µL 9 mM DTT eklenerek 80 °C' de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra 10 µL 20 mM iyodoasetamid eklenerek karanlıkta yarım saat bekletilip disülfid bağlarının kırılması gerçekleştirildi. Sonra, 25 µL 50 mM amonyum bikarbonat ve 5 µL 1 mg/mL tripsin çözeltisinden ilave edildi. Bir gece boyunca 37 °C' ta triptik parçalama işlemi uygulandıktan sonra 3 µL TFA eklenerek enzimatik parçalama işlemi sonlandırıldı.

3.7.2. MALDI örneklerinin hazırlanması

10 mg/mL CHCA matriksi hacimce 50:50:0,1 ACN/H₂O/TFA karışımında hazırlanmıştır. Enzimatik parçalamaya uğratılmış katı yüzey üzerindeki proteinlerden oluşan peptitleri içeren süpernatant ile matriks karıştırılarak kurutulmuş damlacık metoduyla örnek tutucusuna uygulandı. Örnekler açık atmosferde kurutulduktan sonra MALDI-Kütle spektrometresi ile analiz edildi.

3.8. Lizozim enziminin aptamer bağlı polimerik yüzeyde zenginleştirilmesi

Oluşturulan yöntemde yukarıda deneysel kısımda anlatıldığı gibi, amin fonksiyonel gruplu polistiren divinil benzen polimeri üzerinde Sülfö-SMCC çapraz bağlayıcısı aracılığıyla yüzeye tutturulan lizozim aptameri içeren polimerik partiküller aşağıdaki örneklerin analizleri için kullanılmıştır:

- 7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi
- 7.5 pmol/μL BSA ve 8.3 pmol/μL sitokrom c karışımına eklenen 7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi
- 0.7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi
- 7.5 pmol/μL BSA ve 8.3 pmol/μL sitokrom c karışımına eklenen 0.7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi
- 0.07 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi

Kontrol aptamerinin katı yüzeye aynı yöntemle tutturulmasıyla oluşturulan polimerik yüzey üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda analiz edilen çözeltiler aşağıdaki şekildedir:

- 7.5 pmol/μL BSA ve 8.3 pmol/μL sitokrom c karışımına eklenen 7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi
- 0.7 pmol/μL lizozim enzimi çözeltisi

3.9. Düşük derişimde lizozim enzimi çözeltisinin çözeltide tripsin ile parçalanmasının incelenmesi

100 mikrolitre 0.07 pmol/ μ L lizozim enzimine 10 μ L 9 mM DTT eklenerek 80 °C' de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra 10 μ L 20 mM iyodoasetamid eklenerek karanlıkta yarım saat bekletilip disülfid bağlarının kırılması gerçekleştirildi. Ardından, 25 μ L 50 mM amonyum bikarbonat ve 5 μ L 1 mg/mL tripsin çözeltisinden ilave edildi. Bir gece boyunca 37 °C' ta triptik parçalama işlemi uygulandıktan sonra 3 μ L TFA eklenerek enzimatik parçalama işlemi sonlandırıldı.

3.10. Trombinin çözeltisinin analizi

7 pmol/ μ L derişimindeki trombin çözeltisi, DHB 1 matriksi ile muamele edildikten sonra ince tabaka yöntemiyle örnek tutucuya uygulanıp MALDI-Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir.

3.11. Tripsin ile parçalanmış trombin peptitlerinin bulunduğu çözeltinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizi

100 μ L 7 pmol/ μ L trombin çözeltisi disülfid bağları kırılarak parçalama işlemine uğratıldı. Çözelti üzerine 10 mM DTT eklenerek yarım saat 80 °C' de bekletildi. Ardından 0.1 M iyodoasetamid çözeltisinden eklenip karanlıkta yarım saat inkübe edildi. Son olarak, 100 μ L tripsin çözeltisinden eklenerek enzimatik parçalama başlatıldı. İki saatlik inkübasyon süresinin sonunda tripsin ile parçalama işlemi 1 μ L TFA eklenerek durduruldu. Enzimatik parçalama ile oluşan peptitlerin bulunduğu çözeltiden bir miktar örnek alınarak CHCA matriksi ile karıştırıldıktan sonra MALDI-Kütle Spektrometresi' nde analiz edildi.

3.12. Trombinin aptamer bağlı polimerik yüzeylerde zenginleştirilmesi

Trombin zenginleştirilmesi için, daha önce lizozim enziminin zenginleştirilmesinde uygulanan ve onu takiben tripsin ile yüzeyde parçalama yaparak uygun matriks ile karıştırılıp MALDI analizleri gerçekleştirilen sistemlere benzer olarak, trombin aptameri yüzeye bağlanarak aynı işlemler gerçekleştirilmiştir. Trombin aptameri bağlı polimerik yüzeylerde trombin zenginleştirilmesi için analizi yapılan örnekler aşağıda verilmiştir.

- 0.7 pmol/ μ L trombin çözeltisi
- 7.5 pmol/ μ L BSA ve 8.3 pmol/ μ L sitokrom c karışımına eklenen 0.7 pmol/ μ L trombin çözeltisi
- 0.07 pmol/ μ trombin çözeltisi
- 7.5 pmol/ μ L BSA ve 8.3 pmol/ μ L sitokrom c karışımına eklenen 0.07 pmol/ μ L trombin çözeltisi
- 0.007 pmol/ μ trombin çözeltisi
- 7.5 pmol/ μ L BSA ve 8.3 pmol/ μ L sitokrom c karışımına eklenen 0.007 pmol/ μ L trombin çözeltisi
- 0.0007 pmol/ μ L trombin çözeltisi
- 7.5 pmol/ μ L BSA ve 8.3 pmol/ μ L sitokrom c karışımına eklenen 0.0007 pmol/ μ L trombin çözeltisi.

Kontrol aptamerinin katı yüzeye aynı yöntemle tutturulmasıyla oluşturulan polimerik yüzey üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, 0.7 pmol/ μ L trombin çözeltisi analiz edilmiştir.

3.13. Düşük derişimde trombin proteininin çözeltide tripsin ile parçalanmasının incelenmesi

100 mikrolitre 0.0007 pmol/ μ L lizozim enzimine 10 μ L 9 mM DTT eklenerek 80 °C' de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra 10 μ L 20 mM iyodoasetamid eklenerek karanlıkta yarım saat bekletilip disülfid bağlarının kırılması gerçekleştirildi. Ardından, 25 μ L 50 mM amonyum bikarbonat ve 5 μ L 1 mg/mL tripsin çözeltisinden ilave edildi. Bir gece boyunca 37 °C' ta triptik parçalama işlemi

uygulandıktan sonra 3 µL TFA eklenerek enzimatik parçalama işlemi sonlandırılmıştır.

3.14. Kan plazmasından trombin zenginleştirilmesi

Trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyler, yukarıda deneysel kısımda bahsedilen zenginleştirme işleminin aynısı uygulanarak 1 mL kan plazması ile inkübe edilmiştir. Ardından yüzeye tutunan trombin deki disülfid bağları kırıldıktan sonra tripsin enzimi ile parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzim ile proteinlerin parçalanmaya uğratılmasıyla elde edilen trombin peptitlerinin bulunduğu çözeltiden bir miktar alınarak 1 mL hacimce % 50:50:1 deiyonize su/asetonitril/TFA içeren çözelti karışımı 10 mg CHCA çözünmesiyle hazırlanan matriks çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım ince tabaka yöntemiyle örnek tutucuya uygulanarak MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizi gerçekleştirilmiştir.

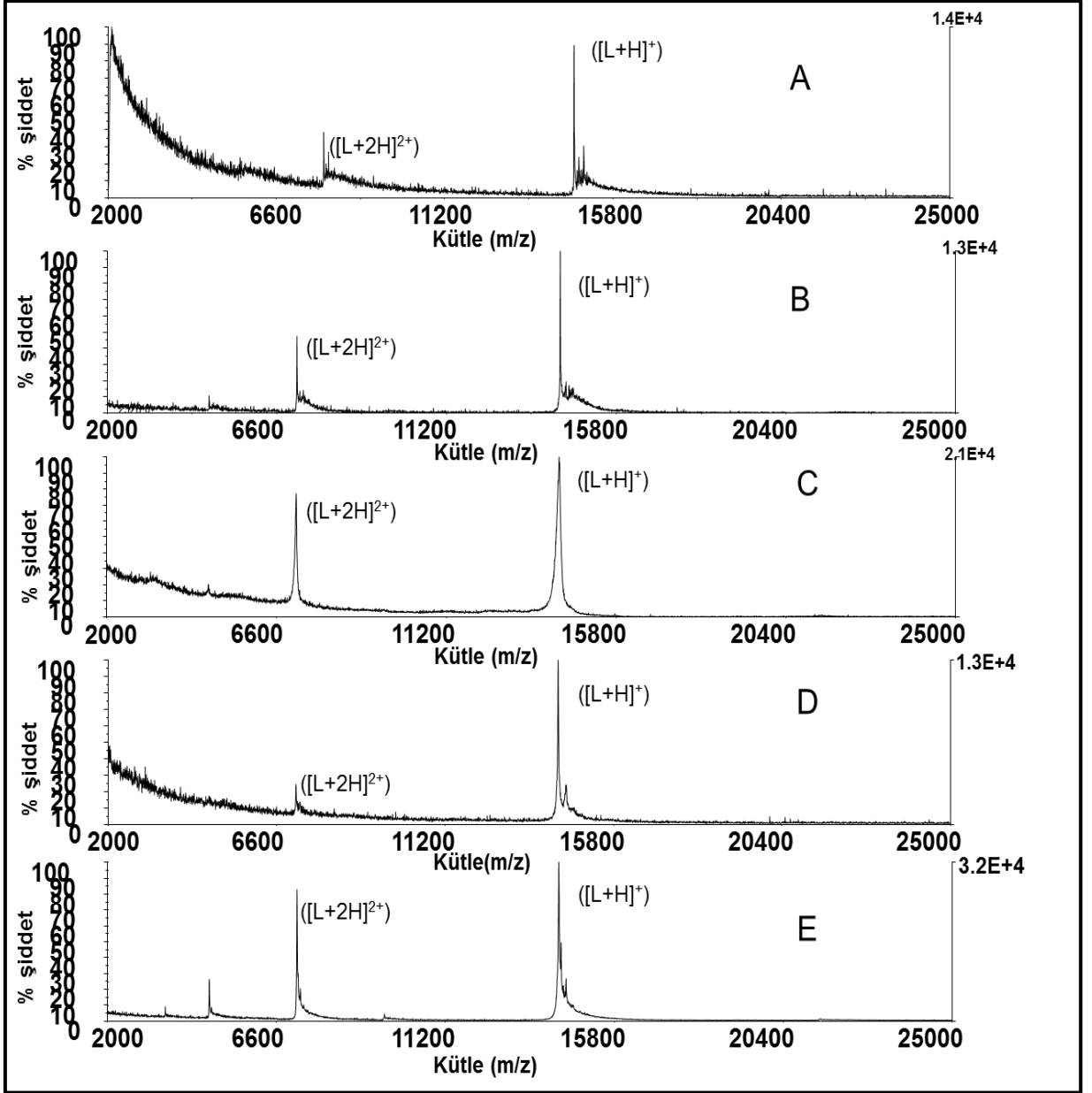
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Lizozim enzimi, lizozim aptameri ve enzim-aptamer komplekslerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile incelenmesi

Peptit, protein ve oligonükleotitlerin MALDI-Kütle Spektrometresi ile gerçekleştirilen analizlerdeki başarı, matriks seçimine ve örnek hazırlanmasına yakından bağlıdır. Lizozim enziminin, lizozim aptamerinin ve lizozim enzimi-lizozim aptamer kovalent olmayan komplekslerinin kütle spektrometrik koşullarda, gaz fazındaki kararlılıklarının test edilmesi için öncelikle çözelti ortam şartlarına bağlı olarak analiz edilmelerine çalışılmıştır. Enzim, aptamer ve enzim-aptamer komplekslerinin MALDI-Kütle Spektrometresinde en uygun şartlarda analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla farklı türdeki MALDI matrikslerinin karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmıştır.

4.1.1. Lizozim enzimi analizi için uygun MALDI matriksi seçimi

70 pmol/ μ L stok lizozim enzimi çözeltisinden suyla seyreltilerek hazırlanan 7 pmol/ μ L lizozim enzimi çözeltisinin değişik matriksler kullanılarak, ince tabaka MALDI örnek hazırlama metodu uygulanarak MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri yapılmıştır. Lizozim enzimi 14300 Da mol kütesine sahiptir. Şekil 4.1’ de lizozim enzimine ait protone olmuş moleküler iyon sinyali ($[L+H]^+$) ve onun “2+” yüklü çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ($[L+2H]^{2+}$) gözlenmektedir. Beş farklı matriks kullanılarak alınan sonuçlar değerlendirildiğinde, proteinlerin MALDI-Kütle Spektrometresi ile tayinlerinde sıklıkla kullanılmakta olan HABA matriksi varlığında elde edilen MALDI kütle spektrumunda, protone olmuş moleküler iyon sinyali ile birlikte “2+” yüklü çift protonlanmış moleküler iyon sinyali, yüksek şiddet ve ayırcılıkta gözlenmektedir. Dolayısıyla, HABA matriksinin lizozim enzimi MALDI-Kütle spektrometresi analizi için en uygun matriks olduğu tespit edilmiştir. Tüm matriksler içerisinde elde edilen MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları değerlendirildiğinde, DHB, HABA ve sinapinik asit matrikslerinde de elde edilen spektrumların da bazı kısıtlamalar yanında bu çalışmalarda da kullanılabileceği görülmektedir. Bu matrikslerin dışında denenen tüm matrikslerde ise çok uygun spektrumlar elde edilememiştir.

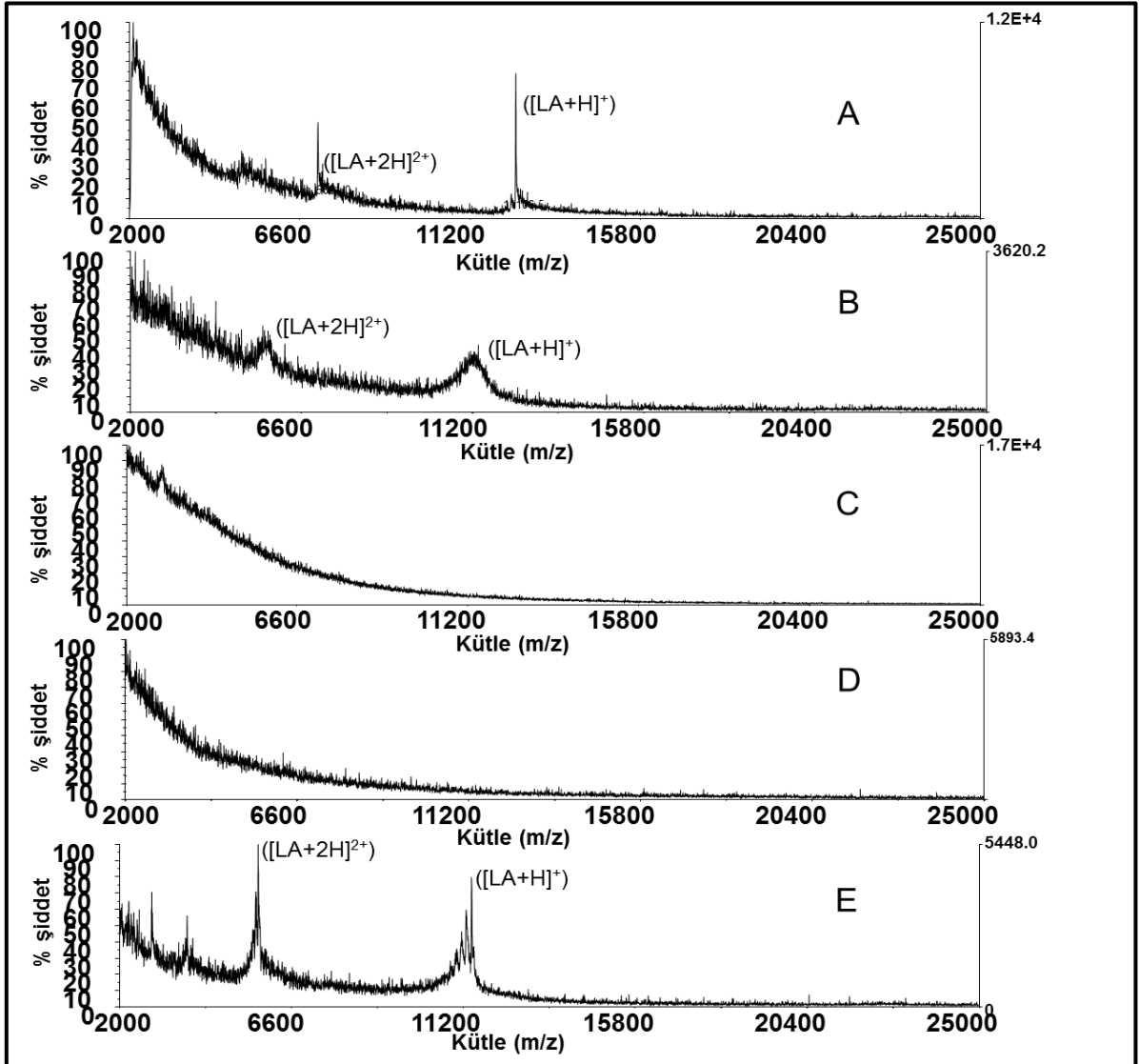


Şekil 4.1. Lizozim enzimi çözeltisinin değişik matriksler kullanılarak MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri. (A) 3-HPA matriksi kullanılarak gerçekleştirilen lizozim enzimine ait MALDI-Kütle Spektrometresi analizi, (B) DHB matriks ile lizozim enziminin MALDI analizi, (C) HABA matriks ile lizozim enziminin MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi, D) SA matriksi ile lizozim enziminin MALDI analizi ve E) THAP matriks çözeltisi ile lizozim enziminin MALDI analizi.

4.1.2. Lizozim aptameri analizi için uygun MALDI matriksinin seçilmesi

70 pmol/µL stok lizozim aptameri çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 7 pmol/ µL lizozim aptameri çözeltisinin değişik matriksler kullanılarak, ince tabaka MALDI örnek hazırlama metodu kullanılarak MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi yapılmıştır. Lizozim aptameri 11470 Da mol kütesine sahiptir ve Şekil 4.2' de

lizozim aptamerine ait protone moleküler iyon sinyali ($[LA+H]^+$) ve “2+” yüklü çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ($[L+2H]^{2+}$) gözlenmektedir. Denenen matrikslerden; lizozim aptameri için sadece 3-HPA, DHB ve THAP matriks çözeltilerinin çalıştığı görülmektedir. Bunların içerisinde, oligonükleotitlerin analizlerinde MALDI matriksi olarak sıklıkla kullanılan THAP matriksinin, lizozim aptamerine ait, hem ayırıcılık hem de pik şiddeti yüksek moleküler iyon sinyalini ($[LA+H]^+$) ve “2+” yüklü çift protonlanmış moleküler iyon sinyalini ($[L+2H]^{2+}$) içeren kütle spektrumunu verdiği gözlenmektedir. Lizozim aptameri için Şekil 4.2 de verilen MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları değerlendirildiğinde THAP MALDI matriksinin dışında bu çalışmada seçilen diğer matrikslerinde belli kısıtlamalar çerçevesinde kullanılabileceği gözlemlenmiştir. Bu çalışılan matrikslerin dışındaki matrikslerin kullanıldığı çalışmalarda uygun sonuçlar elde edilememiştir.



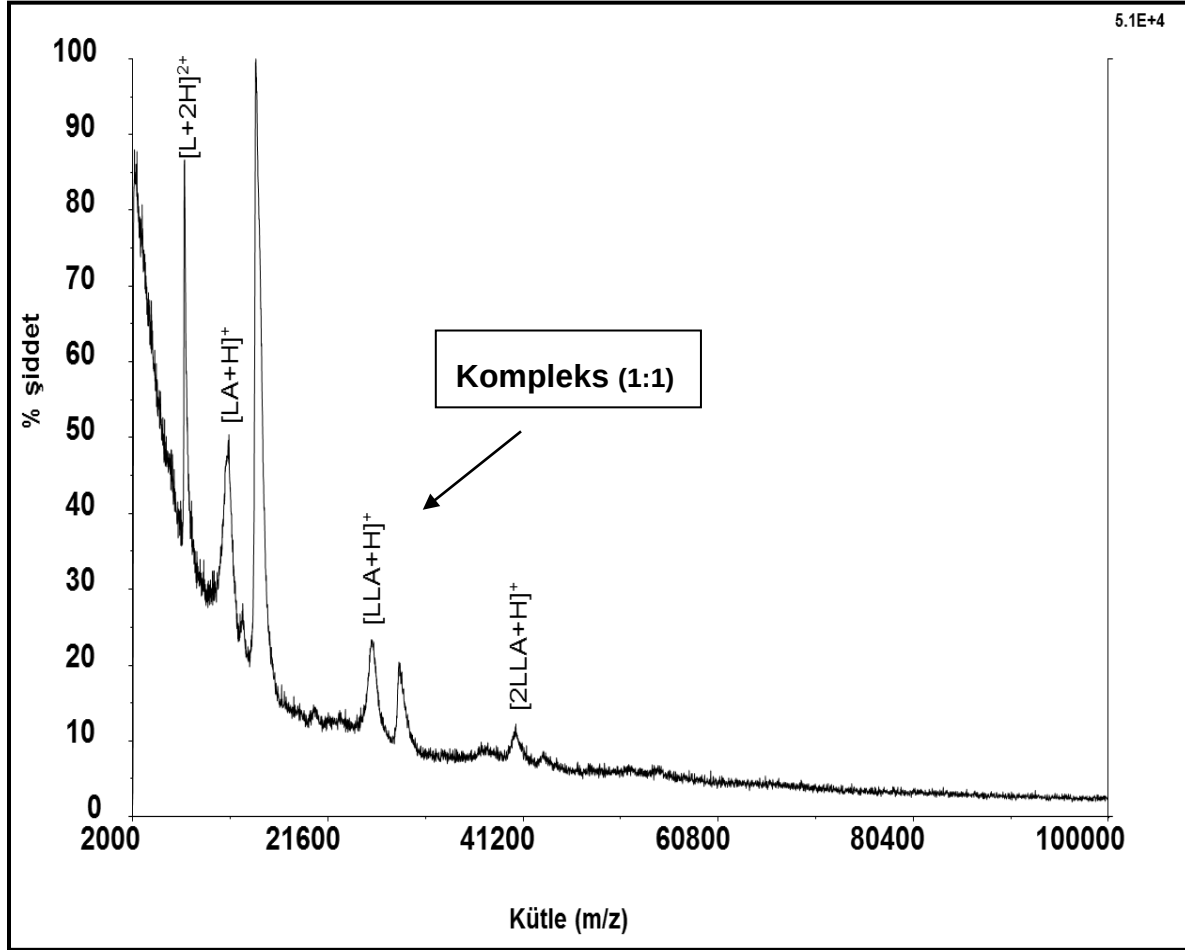
Şekil 4.2. Lizozim aptamerinin değişik matriksler kullanılarak pozitif iyon ve lineer modda MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri. (A) 3-HPA matriksi ile lizozim aptamerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi, (B) DHB matriksi ile lizozim aptamerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi, (C) HABA matriksi ile lizozim aptamerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi, D) SA matriks çözeltisi ile lizozim aptamerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi ve E) THAP matriks çözeltisi ile lizozim aptamerinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi.

4.1.3. Enzim-aptamer kompleksi için uygun MALDI-Kütle spektrometresi şartlarının belirlenmesi

Mol oranı olarak 1:1 lizozim enzimi ile lizozim aptamerini içeren, hacimce % 50:50 karıştırılarak elde edilen çözeltide kompleks oluşumunun gözlenmesi için MALDI-Kütle spektrometresi analizleri gerçekleştirilmiştir. Aptamer-enzim kompleksinin en iyi şekilde gözlenebileceği uygun matriksin tespit edilmesi amacıyla örnekler değişik MALDI matriksleri ile, ince tabaka MALDI örnek hazırlama metodu kullanılarak hazırlanmıştır. DHB matriksi her ne kadar saflaştırılsa bile fazla miktarda Na^+ ve K^+ iyonlarını içermektedir. Bu nedenle DHB matriksinin kullanıldığı analizlerde elde edilen kütle spektrumlarında bu iyonların varlığından ve gaz fazında oluşturdıkları katılmalarından dolayı kaynaklanan pik genişlemesi gözlenmektedir. Ayrıca alınan spekturumlarda, 25800 deki komplekse ait protone moleküler iyon piki ile 28000' deki lizozim enziminin dimerinin protone moleküler iyon sinyal şiddeti hemen hemen aynıdır (Şekil 4.3) ve bu durum oluşan komplekse ait sinyalin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu tür olumsuzluklara rağmen, DHB matriksi, diğer matrikslere göre özellikle oligonükleotit-protein etkileşimleri sonucu oluşan komplekslere ait iyonların gözlenmesinde çok daha başarılı sonuçların elde edilmesini sağladığı deneysel çalışmalarla tespit edilmiştir.

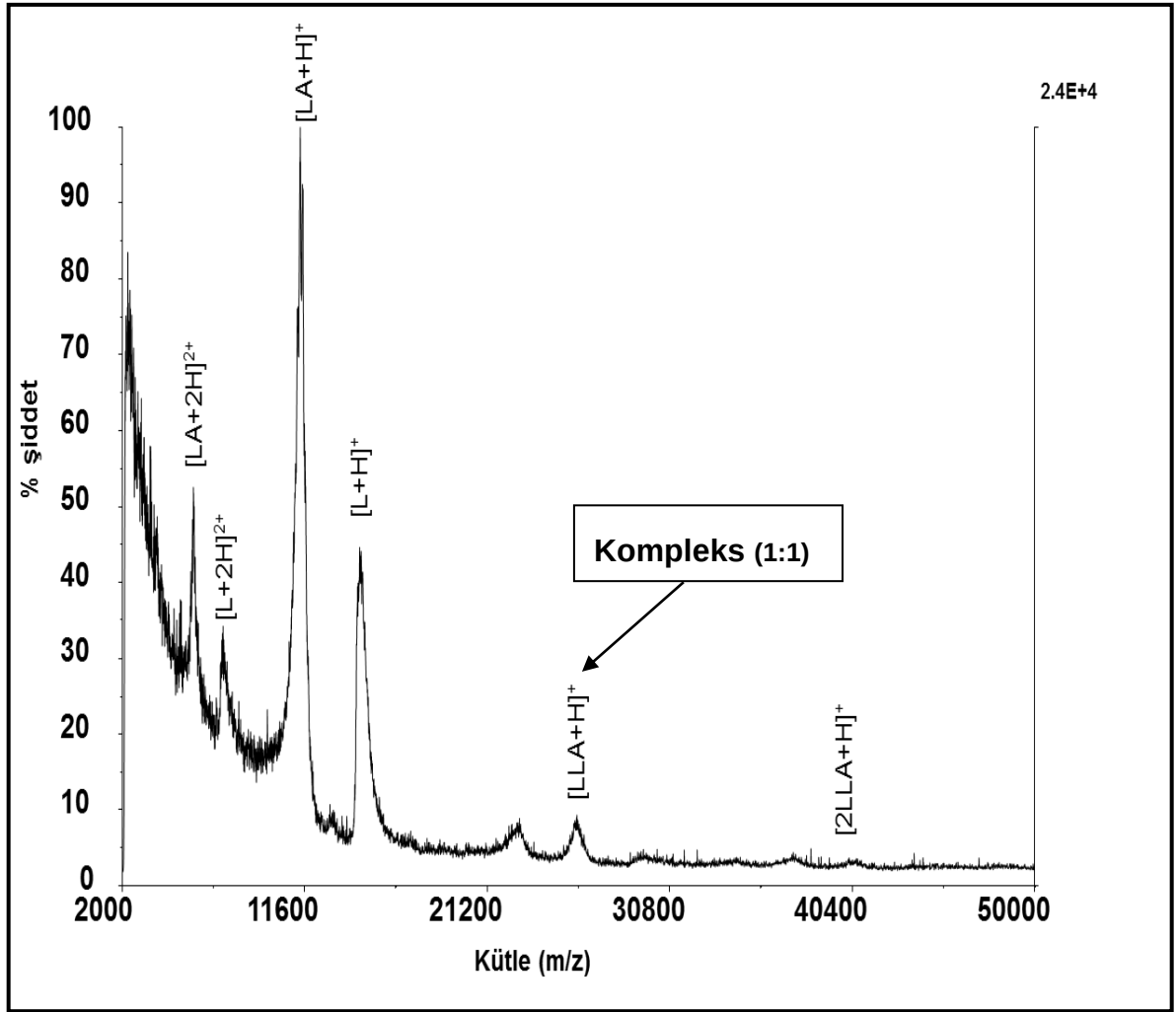
Ortamin pH değeri, komplekse ait sinyal oluşumuna büyük ölçüde etki etmektedir. Hem peptitlerin hem de oligonükleotitlerin protonlanma dereceleri onların yük durumlarını kontrol etmektedir ve bu durum, çözelti fazında meydana gelen iyonik etkileşimleri etkilemektedir. DHB (pH=2.0) gibi asidikliği yüksek bir matriksin kullanılmasından dolayı ortam pH değerinin azalmasıyla birlikte diğer türlerden

kaynaklanan karmaşık sinyallere kıyasla enzim-aptamer kompleks iyonuna ait sinyalin şiddetinin arttığı gözlenmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. DHB 2 matriksi kullanılarak analiz edilen 1:1 mol oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğe ait pozitif iyon ve lineer mod da alınmış MALDI-Kütle spektrumu.

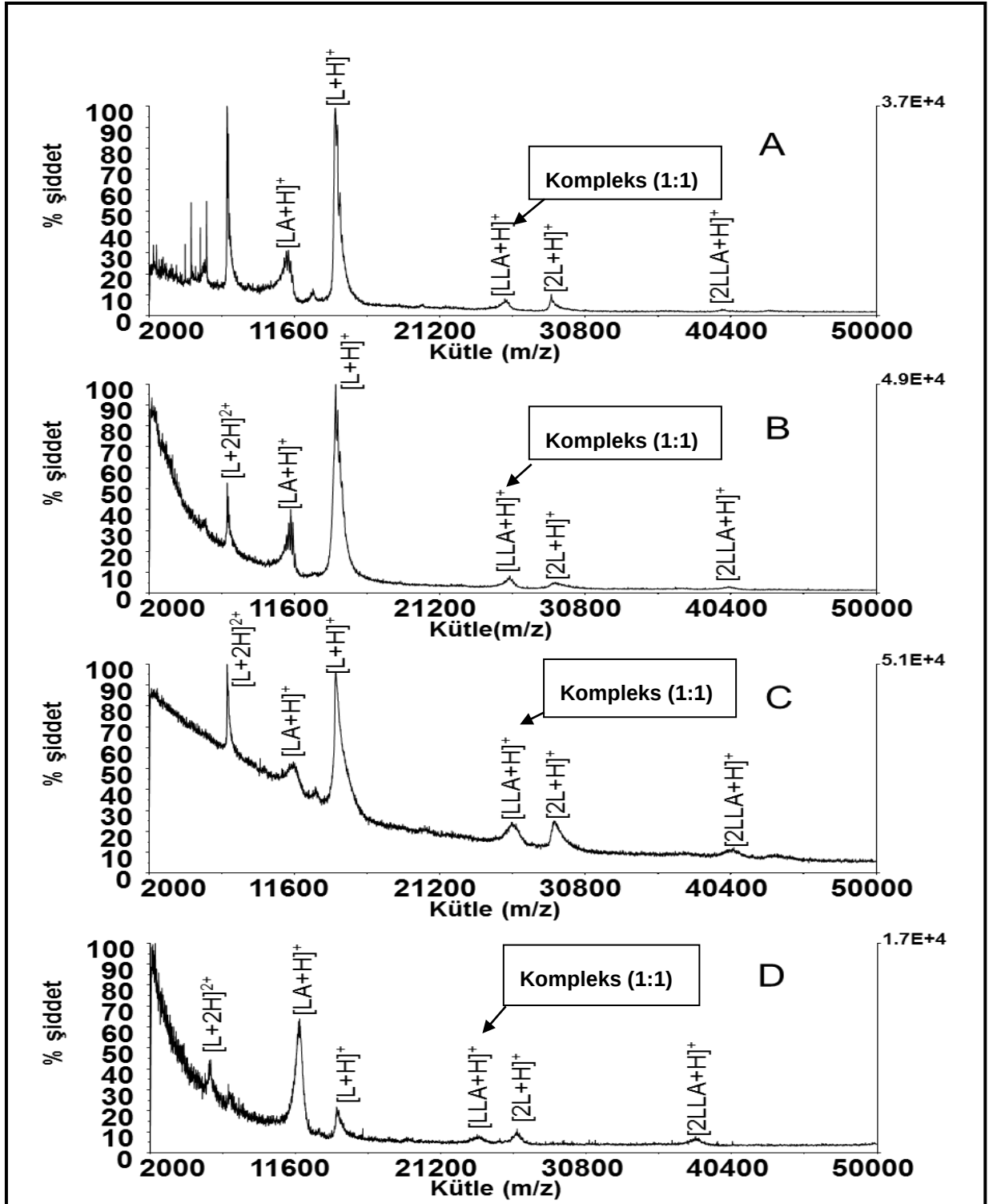
Uygun MALDI matriks seçimi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında ATT (pH=7.0) matriksi kullanılarak fizyolojik pH değerinde de enzim-aptamer kompleks oluşumu incelenmiştir. Lizozim enzimini ve lizozim aptameri mol olarak 1:1 oranında karıştırılarak oluşturulan örneğin MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan analizinden elde edilen kütle spektrumlarında alınan sonuçlar değerlendirildiğinde, özellikle oluşan komplekslere ait sinyal şiddetlerinin ve ayırıcılık değerlerinin, DHB matriksi kullanılarak elde edilen kütle spektrumlarındaki kadar iyi olmadıkları gözlenmiştir (Şekil 4.4). Bu durum, MALDI şartlarında fizyolojik pH ortamının etkinliğinden, lazer enerjisinin kompleksi kararsız hale getirmesi sebebiyle uygun olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.4. ATT 1 matriksi kullanılarak analiz edilen mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğe ait pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spekturumu.

Oligonükleotitlerin MALDI analizlerinde, küçük kütlelerdeki iyonların katılmasıyla oluşan iyonların birbirlerinden ayrılması yüksek kütlelerde zor olduğundan pik genişlemeleri gözlemlenmektedir. Bu hem ayırıcılığı düşürmekte hem de elde edilen piklerin şiddetlerinde azalmalara yol açmaktadır. Dolayısıyla, ortamda bulunan alkali metal iyonları kaynaklı girişimin ortadan kaldırılması, MALDI analizleri sonucunda daha anlamlı kütle spektrumlarının elde edilmesini sağlamaktadır. Bu sebeple, bir amonyum tuzu olan amonyumsitrat dibazik tuzunun örneğe eklenmesiyle girişimin ortadan kaldırılması ön görülmüştür ve eklenen iyonların ortadan uzaklaştırılmasıyla pik genişlemesinin engellenmesi hedeflenmiştir. Çünkü fosfodiester gruplarına kolaylıkla bağlanabilen alkali metal iyonları amonyumla yer değiştirir ve gaz fazında amonyak uçarak serbest

oligonükleotitten ayrılırlar. Ayrıca, bunu sağlamak amacıyla amonyak çözeltisinin matris çözeltisine eklenmesiyle de analizler yapılmıştır.

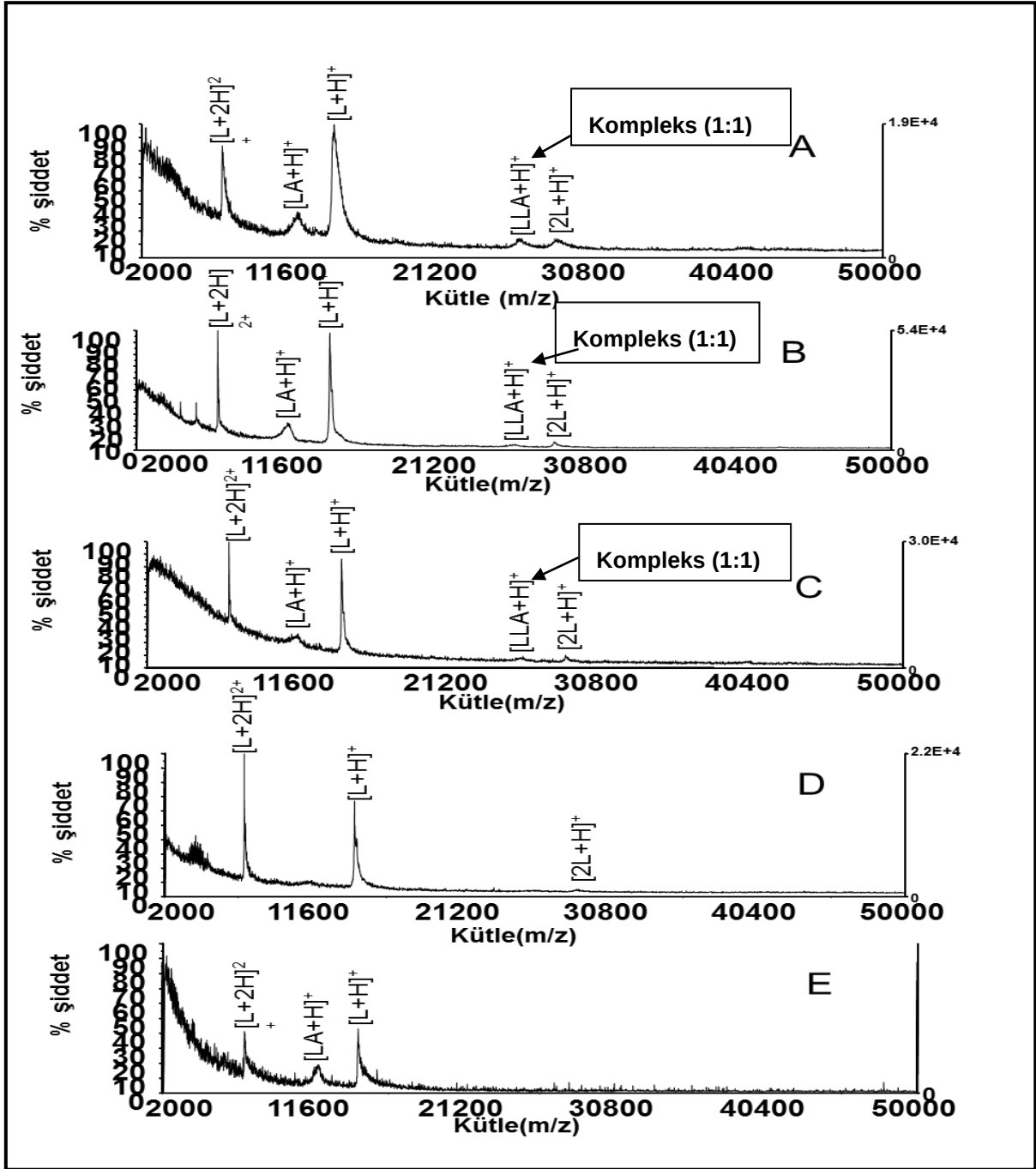


Şekil 4.5. Lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksi pozitif iyon ve lineer mod da MALDI-Kütle spektrometresi analizleri. (A) DHB 4 matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spekturumu, (B) ATT 2 matriks çözeltisi mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spekturumu, (C) DHB 5 MALDI matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spekturumu ve (D) ATT 3 matriks çözeltisi kullanılarak mol olarak 1:1 oranında lizozim enzimi ve lizozim aptameri içeren örneğin kütle spekturumu.

ATT ve DHB matrikslerinin pH değerlerinde değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda, kompleks kararlılığından ziyade, gaz fazındaki kararsızlık ve lazer ışınına maruz kalan örneğin kararsızlığı sebebiyle, yüksek şiddete sahip kompleks iyon sinyalleri elde edilememiştir.

4.1.3.1 Kompleks oluşumu üzerinde tuz etkisinin incelenmesi

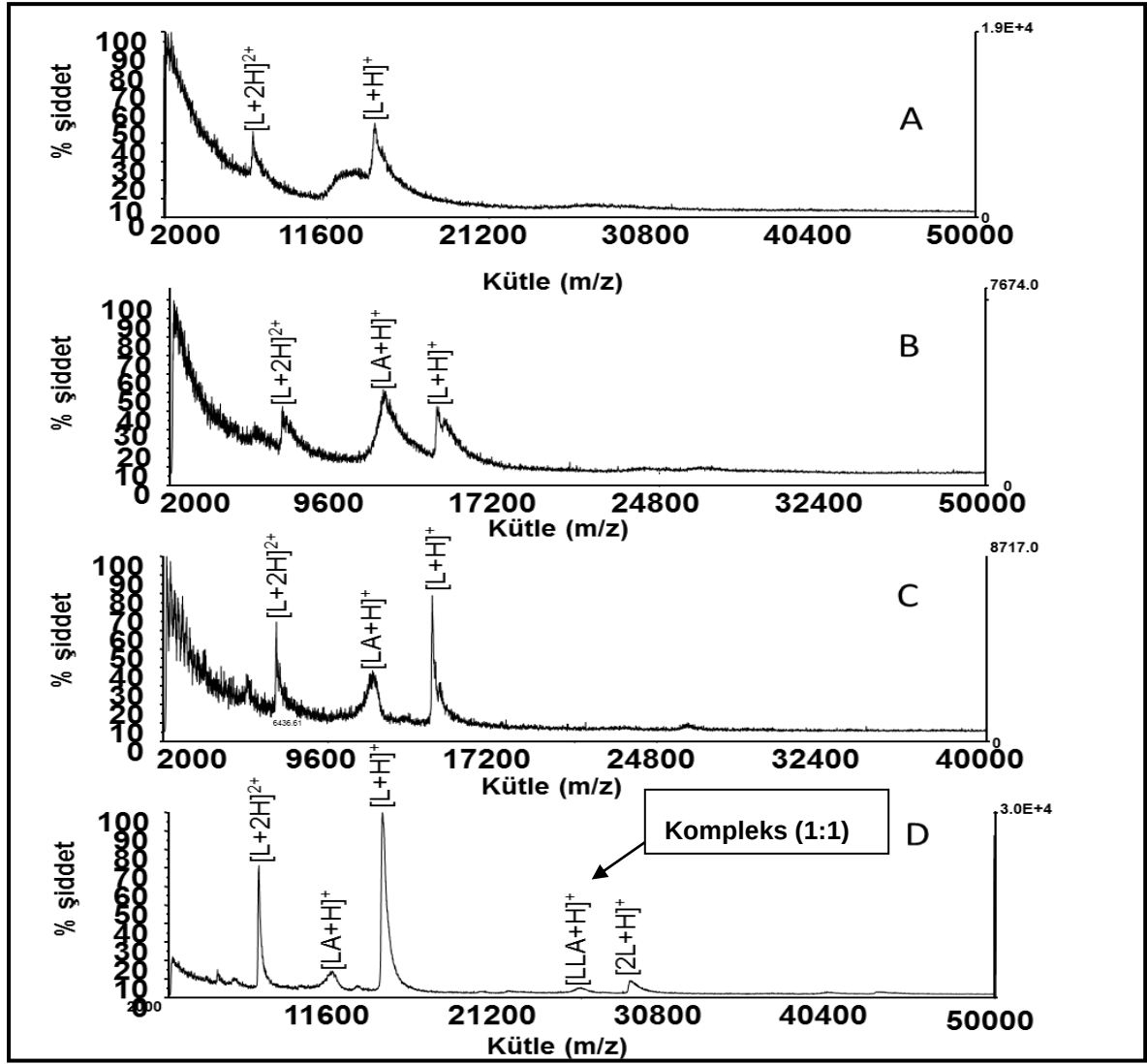
Literatürde aptamerlerle ilgili yapılan bir çok çalışmada CaCl_2 , MgCl_2 ve NaCl gibi bir çok tuzun tampon çözeltielerde kullanıldığı verilmiştir (Ahn et al., 2010). Bu tuzlarda bulunan alkali metallerin aptamer kararlılığını arttırarak, aptamerin hedef moleküle daha iyi bir etkileşime girmesini sağladığı öne sürülmektedir. Bunun nedeni, özgün olmayan elektrostatik etkileşimlerin tuz kullanarak giderilebilmesidir. Bu durumun kompleks oluşumu üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla değişik derişimlerde hazırlanan CaCl_2 çözelti ve 10 mM derişimindeki MgCl_2 çözeltisi kullanılmıştır. Her bir tuz çözeltisi ayrı ayrı aptamer-lizozim enzimi karışımlarına eklenerek analizler yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına bakıldığında, literatürün aksine özellikle MALDI-Kütle spektrometresi şartlarında tuzların yarattığı olumsuz etkiden dolayı kompleks oluşumuna ait spekturumlarda moleküler iyon sinyallerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Alınan kütle spekturumları arasında en iyi sinyal şiddetine sahip spekturumun 20 mM CaCl_2 çözeltisi ile muamele edilen enzim-aptamer karışımına ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.6.). Diğer analitik ölçüm yöntemlerinin aksine kütle spektrometresi ile tuz etkisinin incelenmesinin zor olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, kütle spektrometresinde gaz fazında katyonların oluşturdukları ve spesifik olmayan katyon eklenmelerinin kompleks kararlılıklarını azalttığı ve çözelti fazını yansıtmadığından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.6. CaCl_2 ve MgCl_2 çözeltilerinin aptamer-enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra DHB 3 matriksi kullanılarak alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları (A) 20 mM CaCl_2 , (B) 10 mM CaCl_2 , (C) 5 mM CaCl_2 , (D) 1 mM CaCl_2 , (E) 10 mM MgCl_2 .

4.1.3.2. Kompleks oluşumu üzerinde tampon çözelti etkisinin incelenmesi

MgCl₂ ve NaCl gibi tuz içeren tamponlarla yapılan çalışmaların MALDI-Kütle Spektrometresi koşullarına uygun olmadıkları görülmektedir. Sadece 20 mM Tris-HCl içeren tampon çözelti ile aptamer-enzim kompleks sinyali gözlenebilmektedir (Şekil 4.7). Ayrıca, literatürde aptamerlerin ısıtılıp soğutularak konformasyonlarının, hedef moleküle bağlanmaları için daha uygun hale geldiği söylenmektedir. Literatürde verilenlerin aksine, bu çalışmada sıcaklık etkisine dayalı yapılan çalışmalarda aptamer çözeltisinin ısıtılmasının kompleks oluşumuna ciddi bir etkisinin olmadığı MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumlarından tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen ilgili veriler bu tez kapsamında sunulmamıştır.

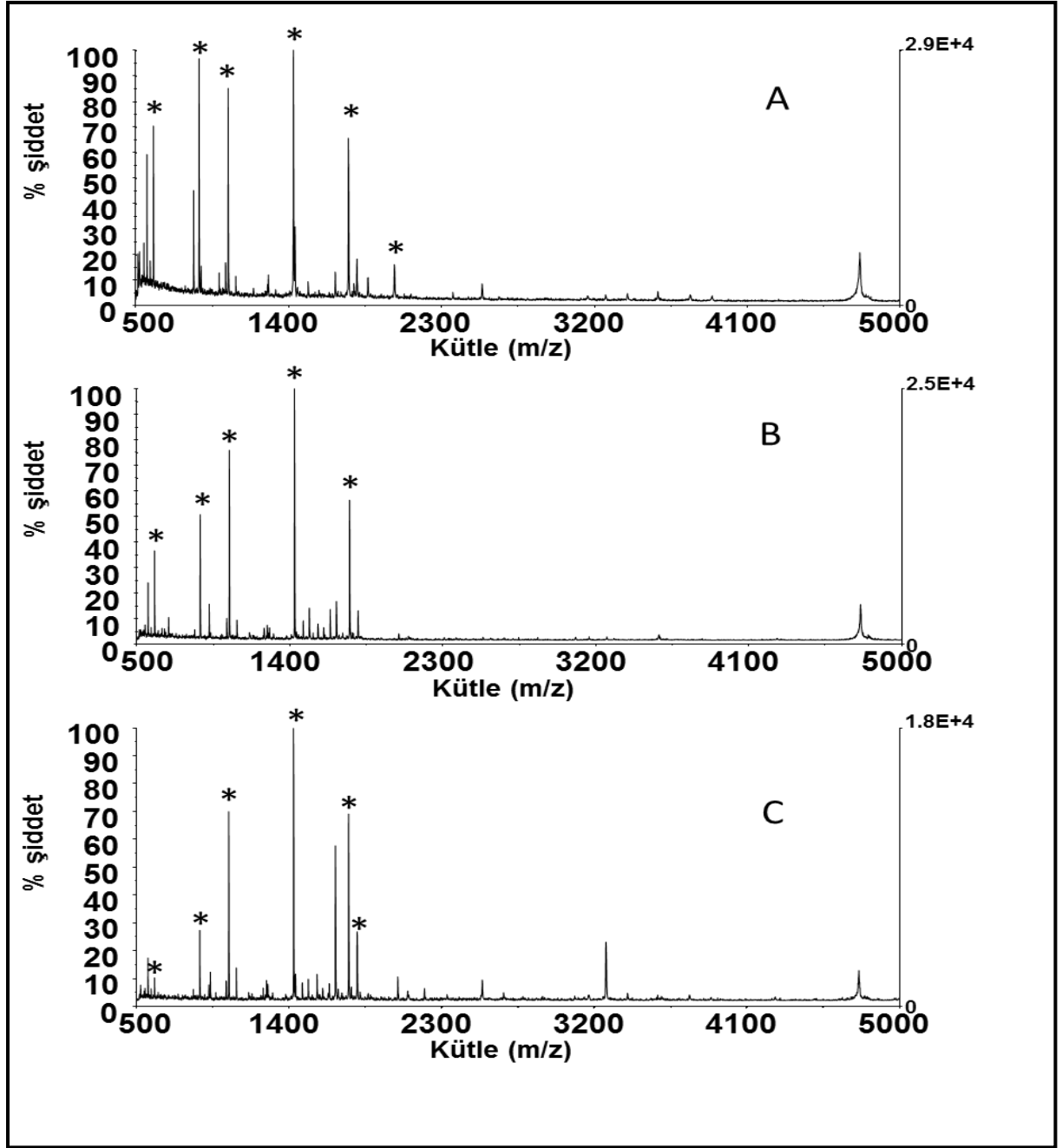


Şekil 4.7 Çeşitli tampon çözeltiler kullanarak, DHB 3 matriksi ile gerçekleştirilen aptamer-enzim kompleksinin alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrometresi spektrumları (A) 100 mM NaCl ve 10 mM MgCl₂ içeren 20 mM Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi ile, (B) MgCl₂ içeren Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi ile, (C) MgCl₂ içeren Tris-HCl (pH= 7.5) tampon çözeltisi kullanılarak, ısıtılıp soğutulmuş aptamer çözeltisine lizozim enzimi çözeltisi eklenmesi ile ve D) 20 mM Tris-HCl pH= 7.5 tampon çözeltisi ile.

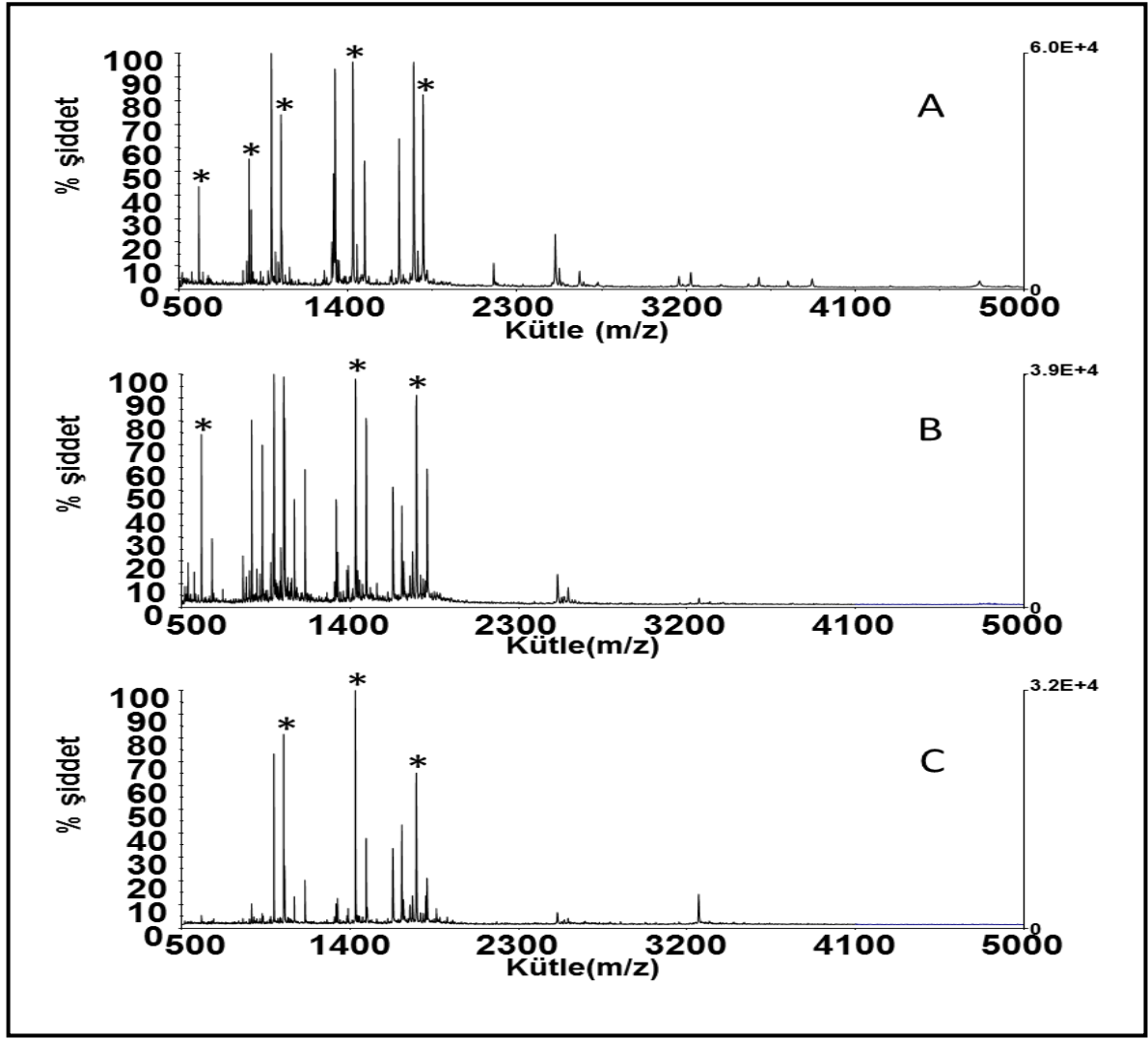
4.2. Lizozim enziminin ve lizozim enzimi-lizozim aptameri kompleksinin, BSA ve Sitokrom c proteinlerinin tripsin enzimi ile parçalanma ürünlerinin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizleri

Disülfid bağları kırılarak yapılan analizlerde, lizozim enzimi için daha fazla parçalanma ürününü görülmektedir (Şekil 4.9.). Ayrıca 2 saat parçalanmaya uğratılmış örnekte, oldukça fazla parçalanma ürününe rastlanmıştır ve iyon sinyallerin şiddetleri de yeterince yüksektir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Bu durumda, disülfid bağları kırılarak, 2 saat gibi kısa bir parçalanma süresinde, lizozimin

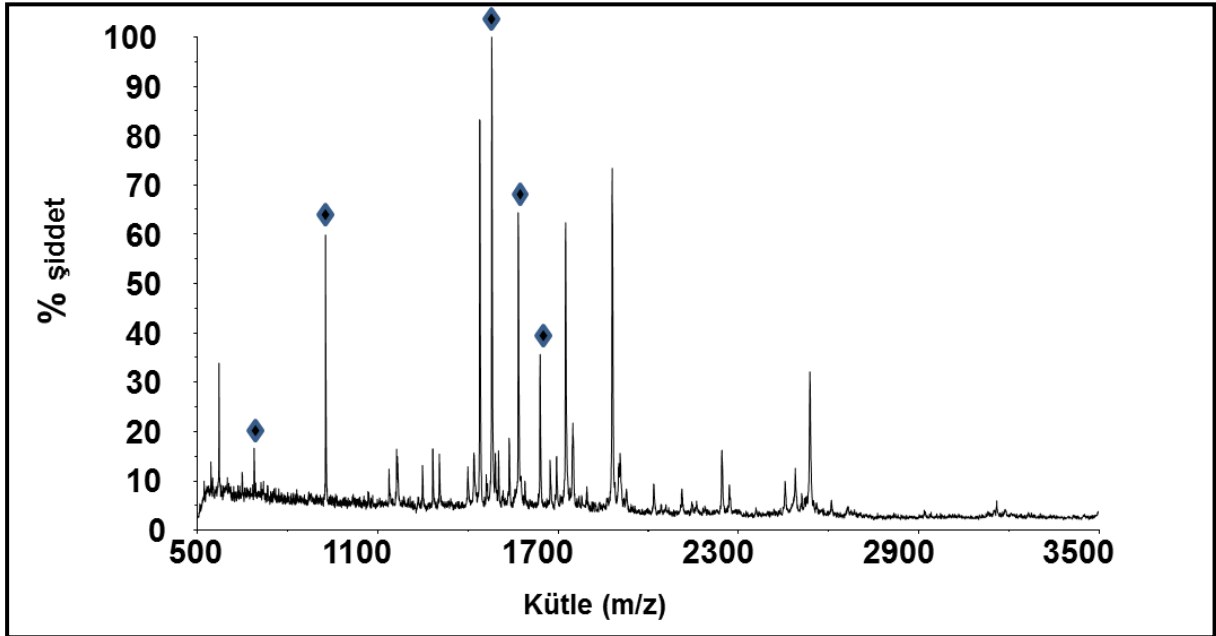
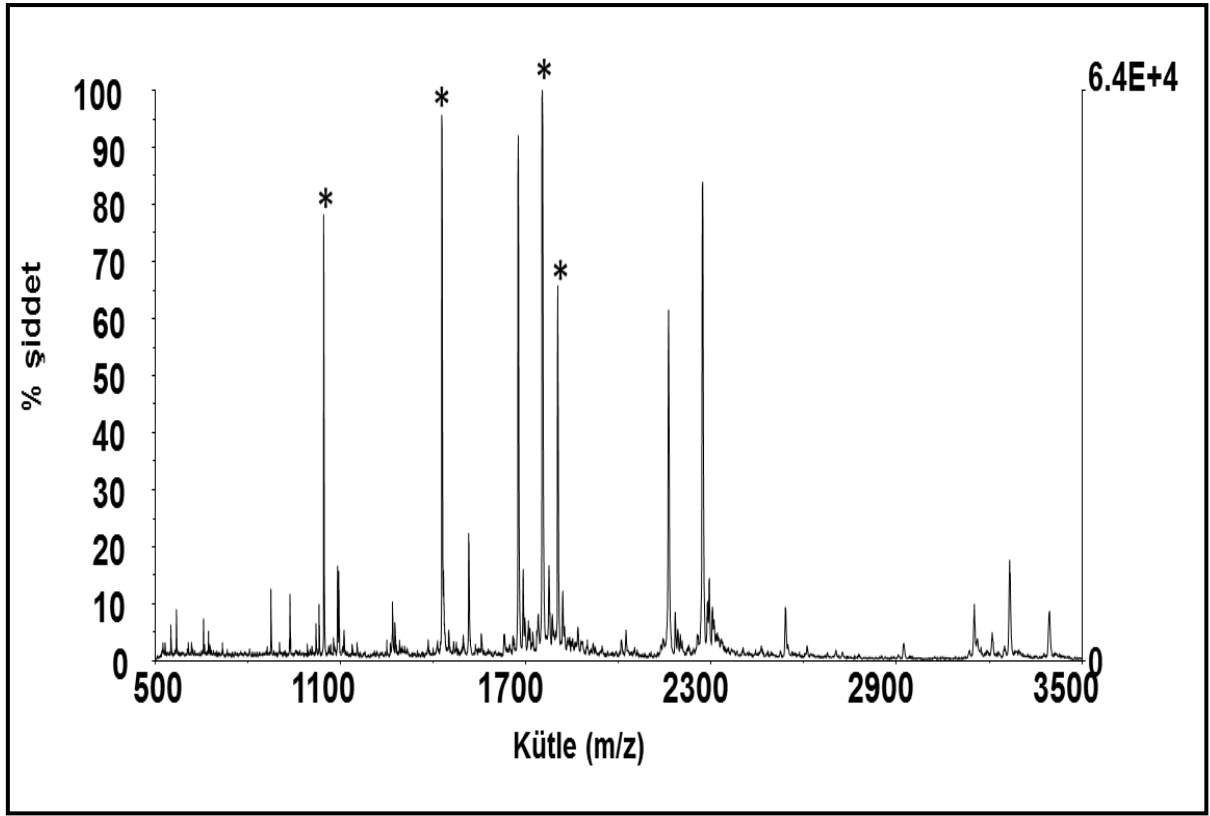
parçalanma ürünlerini gözlemlemek uygun olduğu için çalışmalarda enzimatik parçalama için disülfid bağlarının kırılarak ve 2 saatlik enzimatik parçalama süresinin yeterli olduğuna karar verilmiştir.

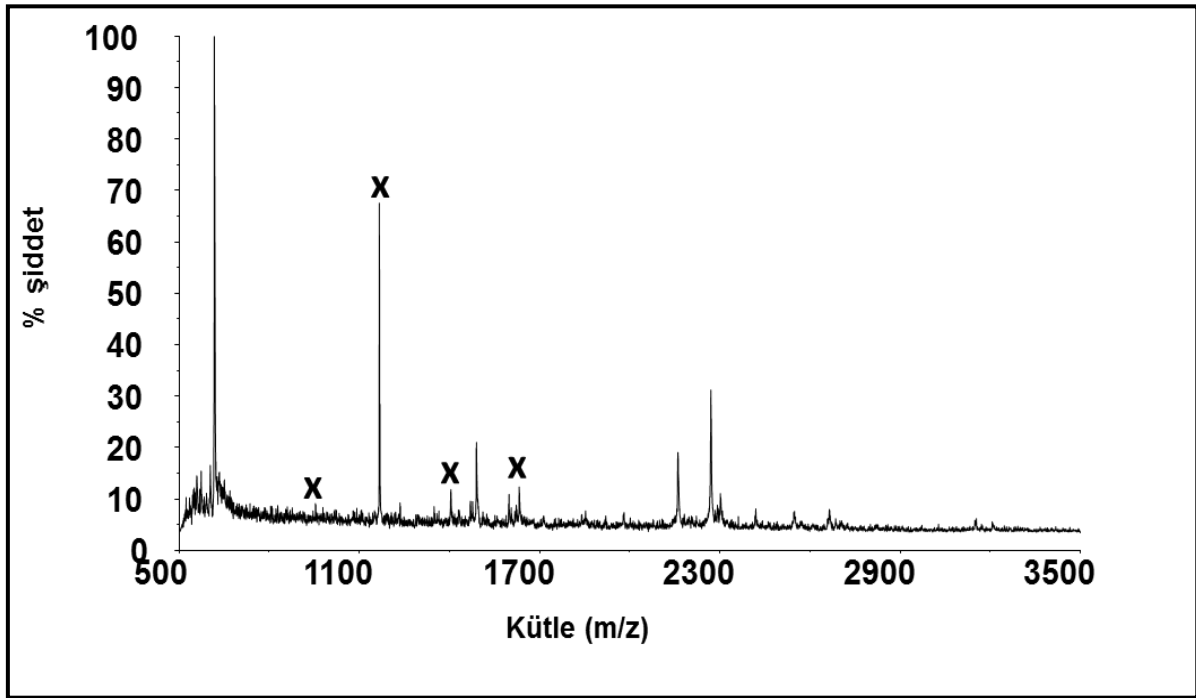


4.8. CHCA matriksi kullanılarak çözeltide lizozim enziminin tripsin ile parçalanma ürünlerinin MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri. (A) 2 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) 18 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (C) 24 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu.



Şekil 4.9. CHCA matriksi kullanılarak çözeltide lizozim enziminin disülfid bağları kırıldıktan sonra tripsin ile parçalanma ürünlerinin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumları. (A) 2 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) 18 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu ve (C) 24 saat süresince parçalamaya uğratılmış örneğin pozitif iyon ve lineer mod MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu.





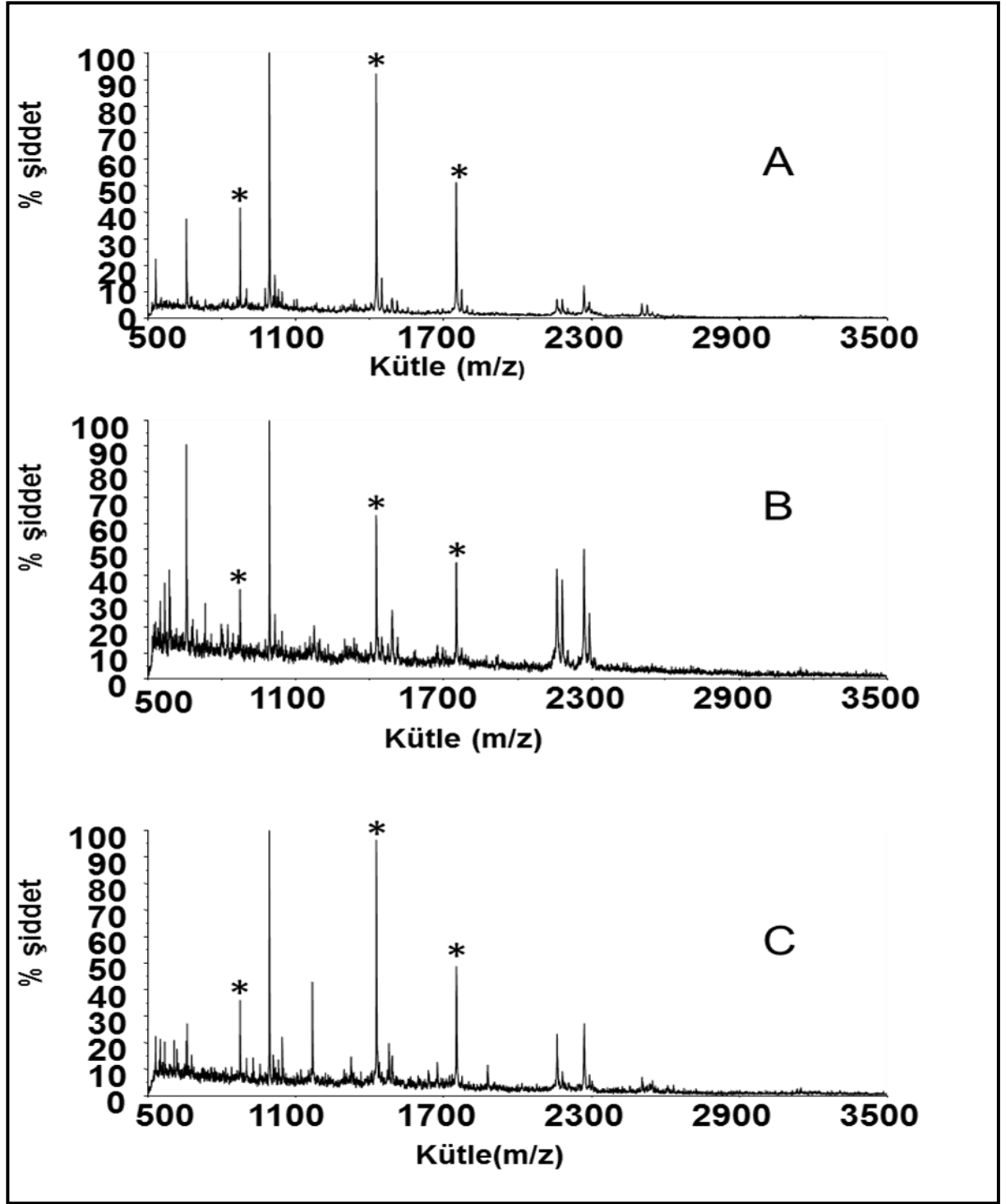
Şekil 4.12. CHCA matriksi kullanılarak disülfid bağları kırılmış Sitokrom c proteininin tripsin enzimi ile parçalanma ürünlerinin pozitif iyon ve lineer mod da elde edilen MALDI- Kütle Spektrometresi spektrumu.

Çizelge 4.1. Tripsin enzimi ile parçalanan lizozim enzimi, BSA ve Sitokrom c proteinlerine ait peptit fragmentlerinin kütleleri.

Lizozim (monoizotopik)	BSA (monoizotopik)	Sitokrom c (monoizotopik)
606.37	689.31	955.50
874.41	927.74	1168.62
992.50	1479.75	1237.64
1045.54	1567.74	1633.81
1311.65	1640.11	
1428.65		
1675.80		
1753.83		
1803.89		

4.3. Lizozim enziminin aptamer bağı polimerik yüzeyde zenginleştirilmesi

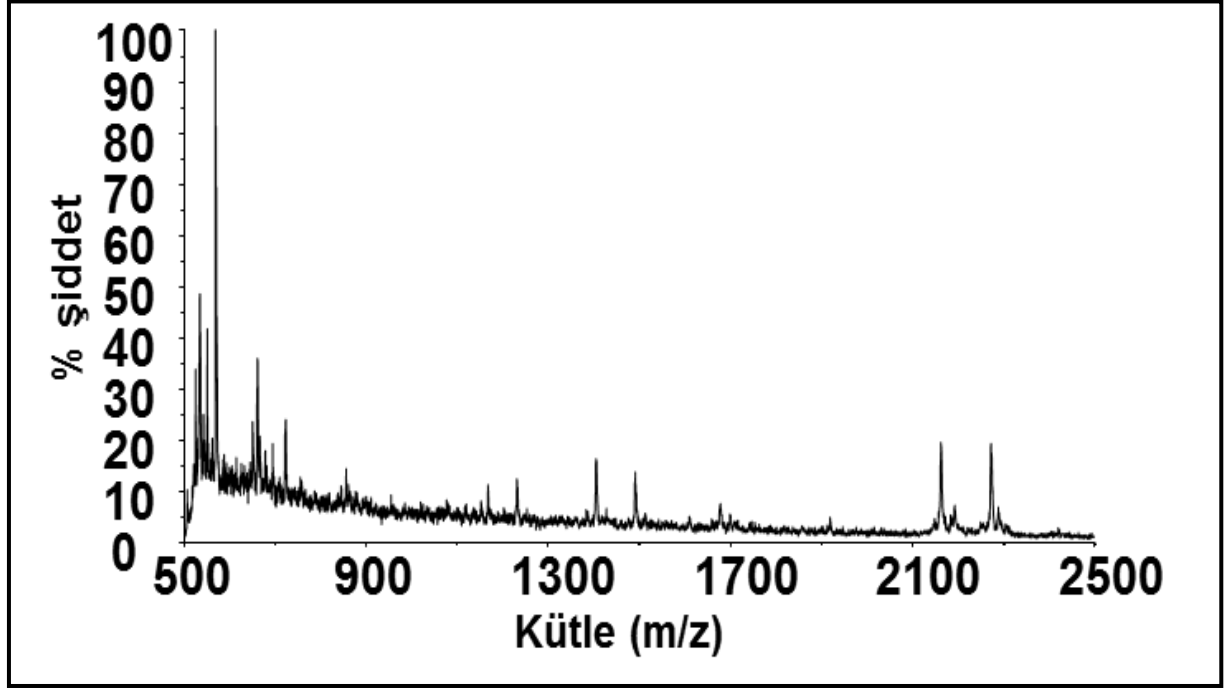
Lizozim aptameri bağı amin fonksiyonel gruplu polimerik yüzeylerin lizozim ile muamele edildikten sonra, polimerik yüzeyde tripsin ile parçalama yapıp elde edilen lizozime ait peptit fragment kütlelerini gösteren moleküler iyon sinyalleri Şekil 4.13' de izlenmektedir. İlk olarak, 7 pmol/μL derişimdeki, lizozim enziminin analizi gerçekleştirildiğinde, lizozim peptit fragment kütlelerine ait sinyallerin şiddetleri ve ayıricılıkları yüksek olarak gözlenmiştir. Ardından daha düşük derişimlerde lizozim enziminin zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. 0.7 pmol/μL ve 0.07 pmol/μL derişimindeki lizozim enziminin analizleri gerçekleştirildiğinde de yine lizozime ait peptit fragment kütleleri, şiddeti ve ayıricılığı yüksek iyon sinyalleri gözlenerek elde edilmiştir. Gözlenebilme sınırının altında olan 0.07 pmol/μL derişimindeki lizozim enziminine çözelti ortamında tripsin ile parçalama uygulandıktan sonra yapılan analizde lizozim enzimine ait peptit fragment kütlelerine rastlanmamıştır. Dolayısıyla, gözlenebilme sınırının oldukça altında kalan derişimlerdeki lizozim enziminin tayini çözelti halinde yapılamıyorken, aptamer bağı polimerik yüzeyde zenginleştirilerek tayin edilebileceği Şekil 4.13.C' de görölmektedir.



Şekil 4.13. Aptamer bağlı polimerik yüzeyde lizozim enzimi zenginleştirilmesi. (A) 7 pmol/μL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi, (B) 0.7 pmol/μL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi ve C) 0.07 pmol/μL derişiminde lizozim enziminin zenginleştirilmesi.

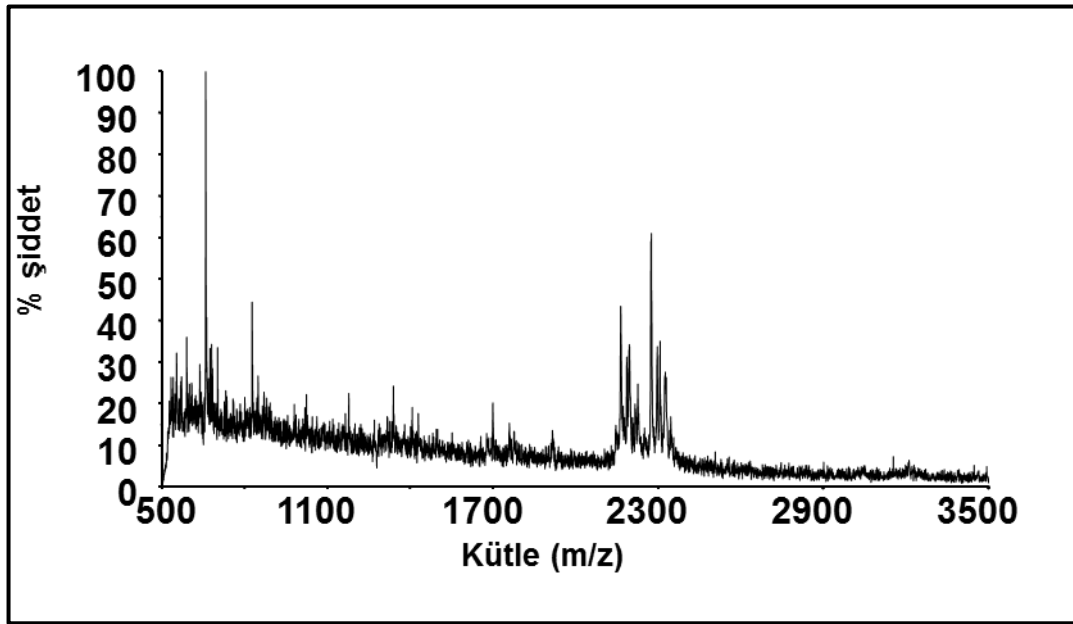
Tayin sınırının altında kalan, 0.07 pmol/μL derişiminde lizozim enzimi çözeltisi tripsin ile parçalandığında elde edilen MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumunda,

sadece tripsin enzimine ait fragment kütlelerinin sinyalleri gözlenmektedir ve lizozime ait herhangi bir parçalanma ürününe rastlanmamaktadır (Şekil 4.14).



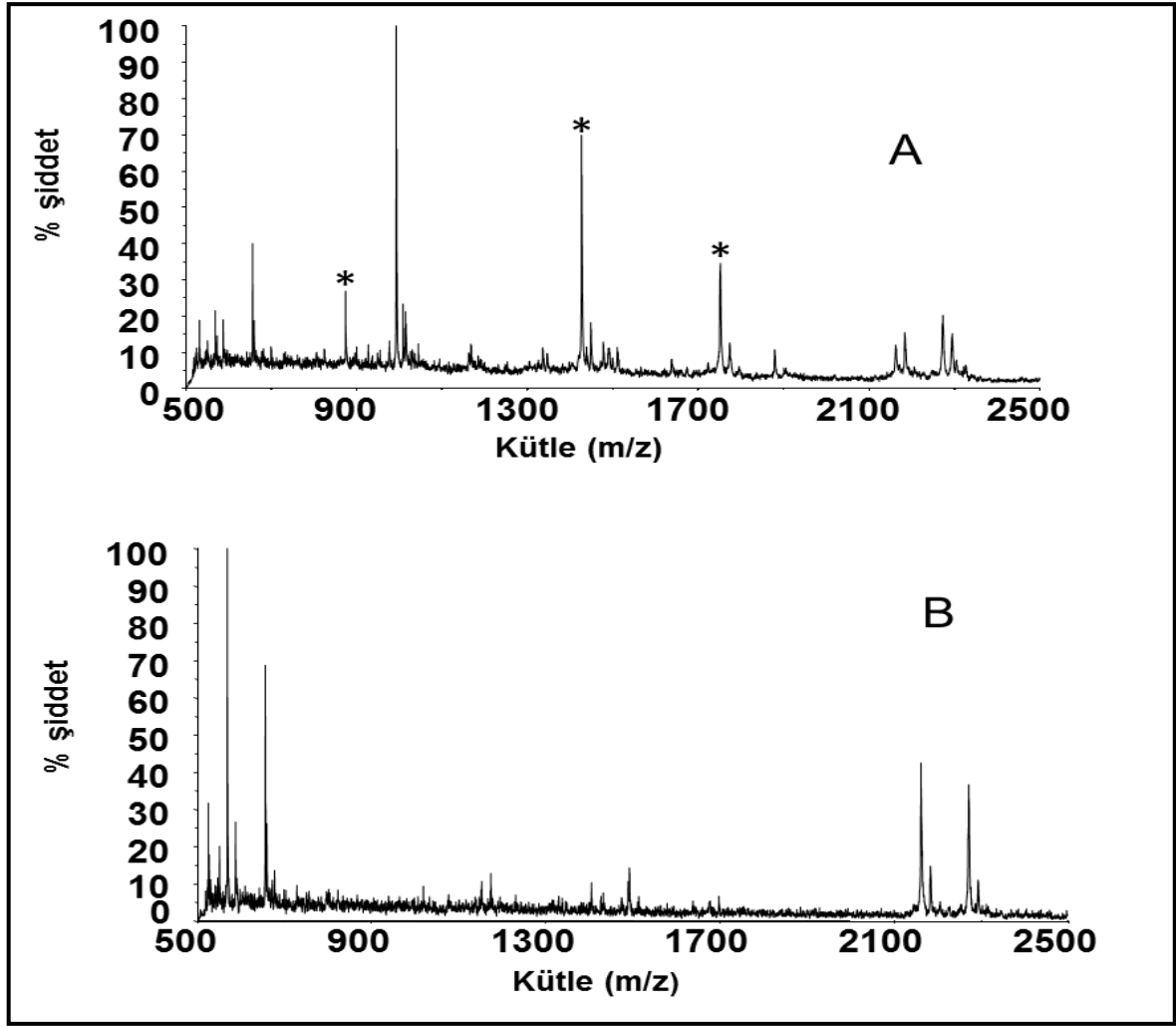
Şekil 4.14. 0.07 pmol/μL derişimindeki disülfid bağları kırılmış lizozim enzimi çözeltisinin tripsin ile parçalama uygulandıktan sonra yapılan MALDI-Kütle spektrometresi analiz spektrumu.

Lizozim aptamerinin lizozim enzimine özgün bir oligonükleotit dizisi olduğunu göstermek amacıyla kontrol aptameri bağlı polimerik yüzey, 0.07 pmol/ μL lizozim enzimi çözeltisi ile muamele edilmiştir. Polimerik yüzeyde tripsin ile parçalama işlemi uygulandıktan sonra yapılan MALDI-kütle spektrometresi analizinden elde edilen spektrumda lizozim enzimine ait peptit fragment kütlelerine ait sinyallere rastlanmamıştır. Gözlenen sinyaller, enzimatik parçalama için kullanılan tripsin enziminin otokatalizinden gelmektedir (Şekil 4.15). Bu durum lizozim aptamerinin lizozime özgü bir yapı olduğunu kanıtlamıştır.

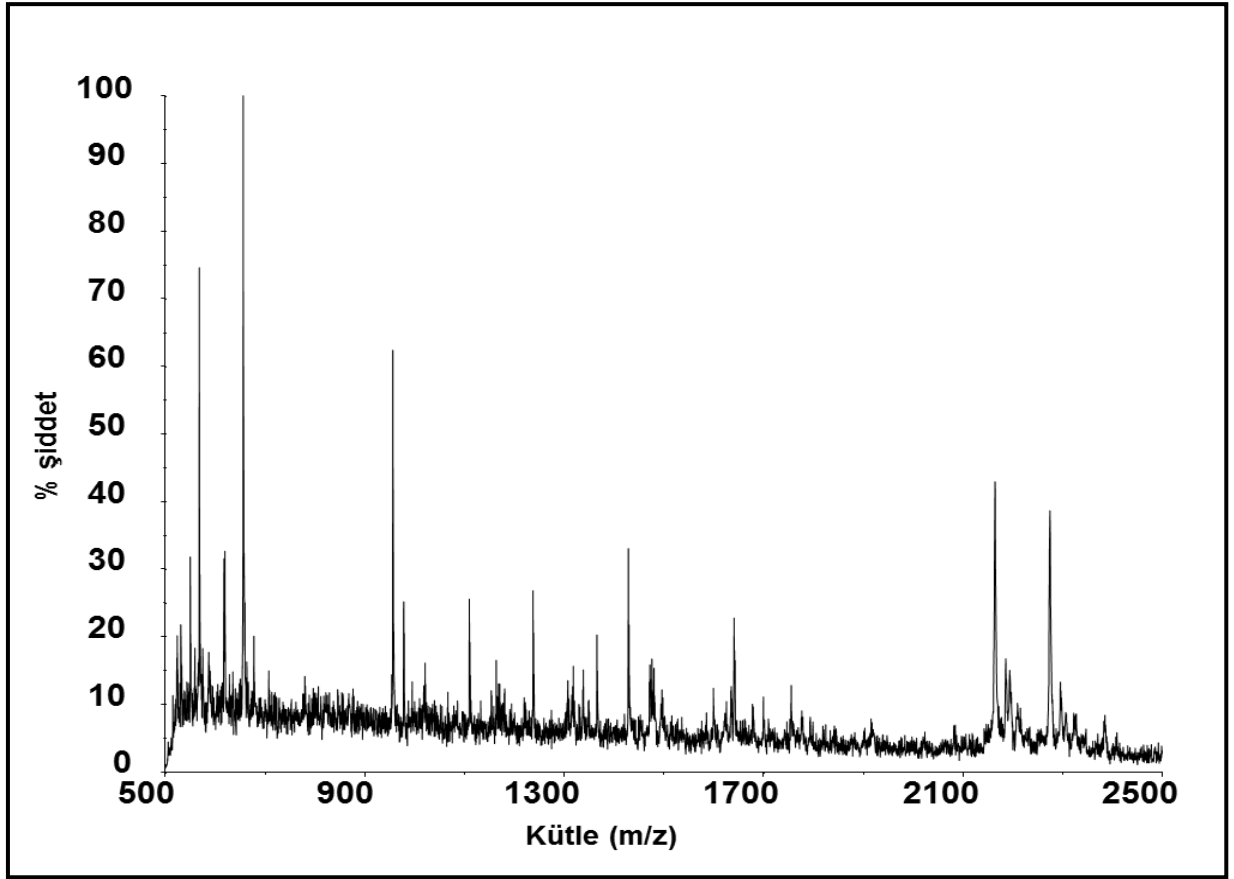


Şekil 4.15. Lizozim enzimi çözeltisi ile muamele edilmiş kontrol aptameri bağlı polimerik yüzeyde enzimatik parçalama sonucunda elde edilen peptit fraksiyonlarının pozitif iyon ve lineer mod kütle spektrumu.

Lizozim aptameri-lizozim enzimine özgün etkileşiminin gözlenebilirliğinin ve farklı proteinleri de içeren oldukça fazla bozucu matriks ortamında lizozimin zenginleştirilebilmesinin test edilebilmesi amacıyla, BSA ve Sitokrom c proteinlerinin de bulunduğu lizozim enzimi içeren bir çözelti ortamı hazırlanmıştır. Lizozim aptameri bağlı polimerik yüzeyle bu ortamın muamelesi ve polimerik yüzeyde yapılan tripsinle parçalama işlemi sonrasında MALDI-Kütle spektrometresi analizi gerçekleştirilmiştir. Alınan spektrumlarda, lizozim enzimi peptit fragment kütlere ait sinyaller yüksek şiddette gözlenmektedir. Ayrıca karışım ortamına ilave edilen proteinlerden gelebilecek herhangi bir peptit'in varlığına rastlanmamış olması seçiciliğin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol aptameri bağlanmış polimerik yüzey kullanılarak aynı deney tekrarlanmıştır ve MALDI-Kütle spektrometresi analizi sonucu alınan spektrumda lizozim enzime ait peptit fragment kütlelerinin sinyalleri gözlenmemiştir, sadece tripsinin otokatalizinden gelen sinyallere rastlanmaktadır (Şekil 4.16.B). Daha düşük derişimlere inerek, 0.7 pmol/ μ L lizozim enzimi için aynı deney tekrarlanmıştır ve yine lizozim enzimi peptit fragment kütlere ait sinyaller yüksek şiddette gözlenmiştir (Şekil 4.17).



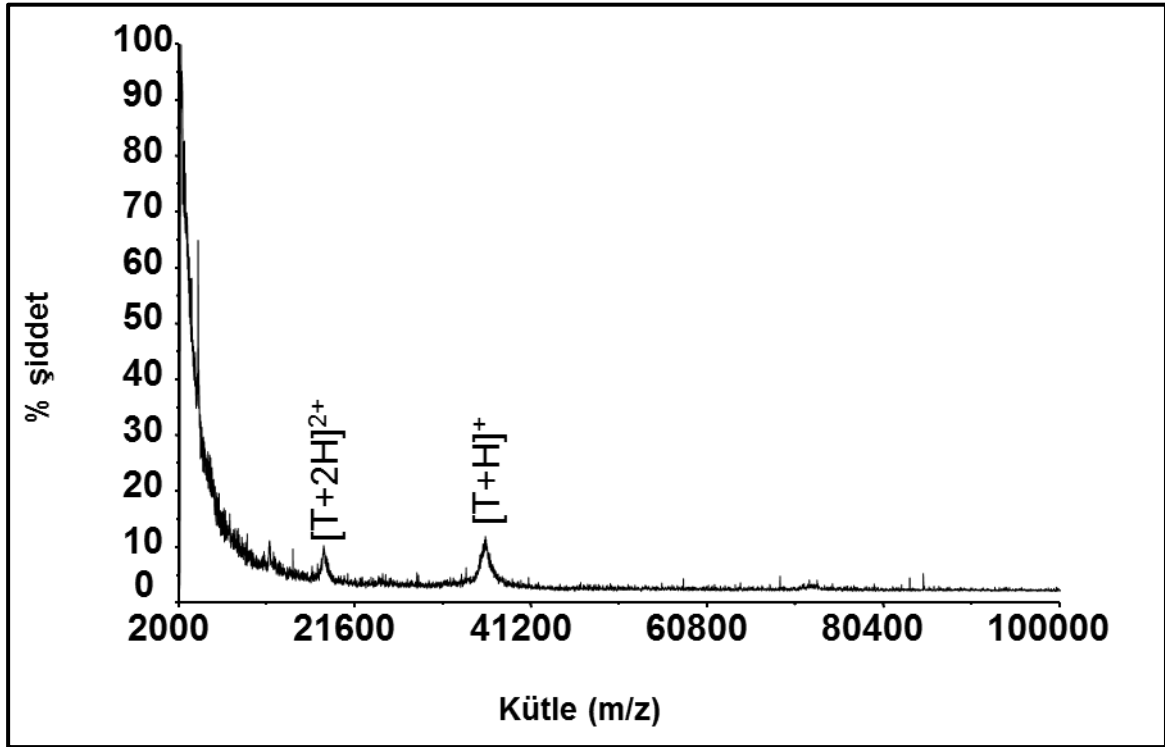
Şekil 4.16. Lizozim enzim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde 7 pmol/µL lizozim enziminin, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi sonucunda alınan MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumları. (A) Lizozim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında lizozim enzimi zenginleştirilmesi analizi sonucundaki pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (B) Kontrol aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında lizozim enzimi zenginleştirilmesi sonucunda alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu.



Şekil 4.17. Lizozim enzim aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde 0.7 pmol/µL lizozim enziminin, BSA ve Sitokrom C proteinleri varlığında zenginleştirilmesi sonucunda alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu.

4.4. MALDI-Kütle Spektrometresi ile Trombin analizi

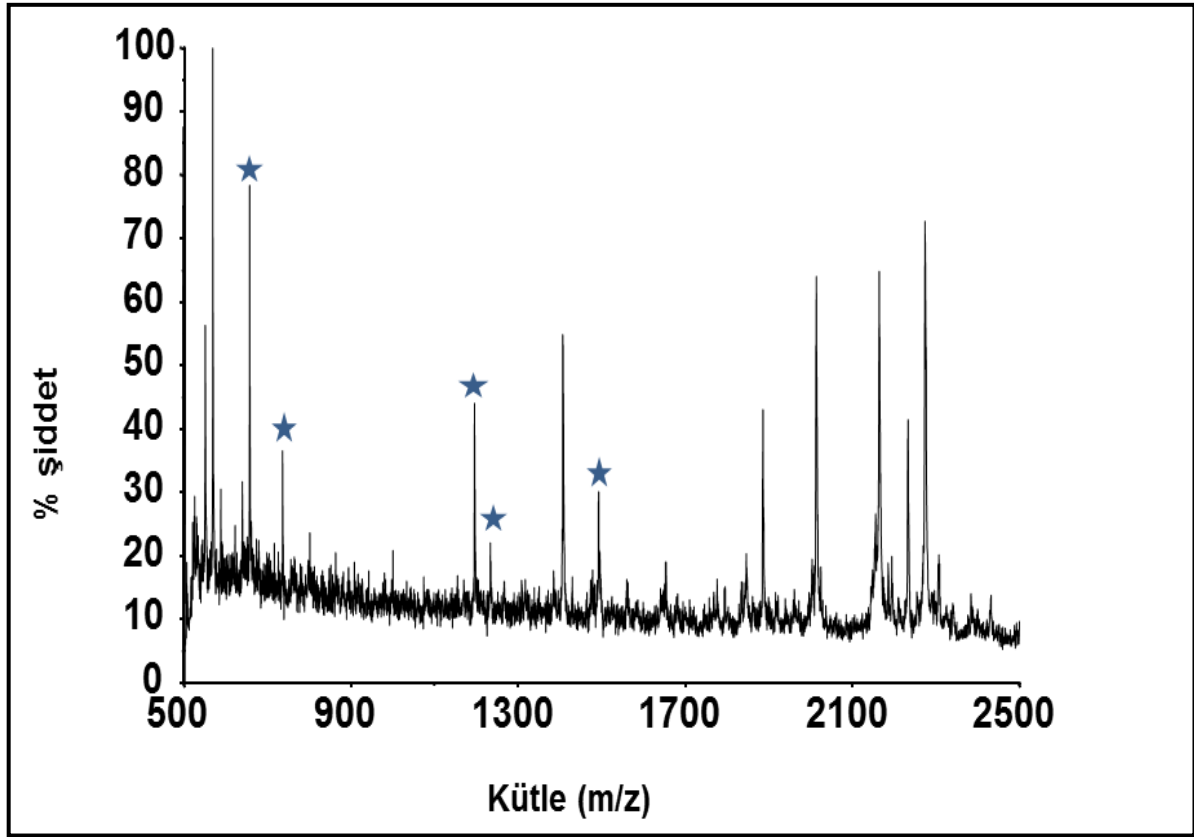
70 pmol/µL stok trombin çözeltisinden suyla seyreltilerek hazırlanan 7 pmol/ µL trombin proteini çözeltisinin DHB 1 matriksi kullanılarak, MALDI sisteminde örnek hazırlama amacı ile kullanılan ince tabaka metodu ile MALDI-Kütle Spektrometresi analizi yapılmıştır. Trombin 36 kDa mol kütesine sahiptir. Elde edilen spektrumda, trombin molekülü moleküler iyon sinyali ($[T+H]^+$), ve “2+” yüklü çift protonlanmış moleküler iyon sinyali ($[T+2H]^{2+}$) görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. 7 pmol/ μ L derişimdeki Trombin proteini çözeltisinin DHB 1 matriksi ile alınmış pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu.

4.4.1 Tripsin ile parçalanmış trombin peptitlerinin bulunduğu çözeltinin analizi

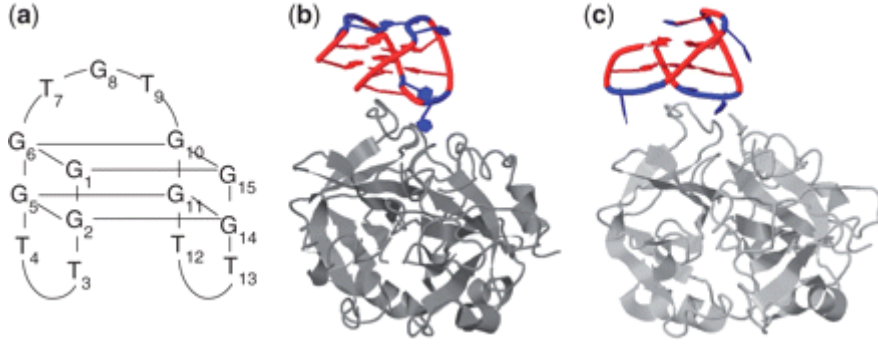
Disülfid bağları kırıldıktan sonra, tripsin enzimi ile parçalamaya uğratılmış trombin çözeltisinin MALDI-Kütle Spektrometresi analizi ile elde edilen peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyallerine içeren kütle spektrumu Şekil 4.19' da görülmektedir. Trombin proteinine ait özgün peptit fragment kütleleri 656.35, 734.35, 798.46, 954.56, 977.49, 1194.60, 1234.65 ve 1490.80 Da dır.



Şekil 4.19. Disülfid bağları kırılmış trombin proteinin, CHCA matrisi kullanılarak elde edilen pozitif iyon ve lineer mod MALDI-kütle spektrumu.

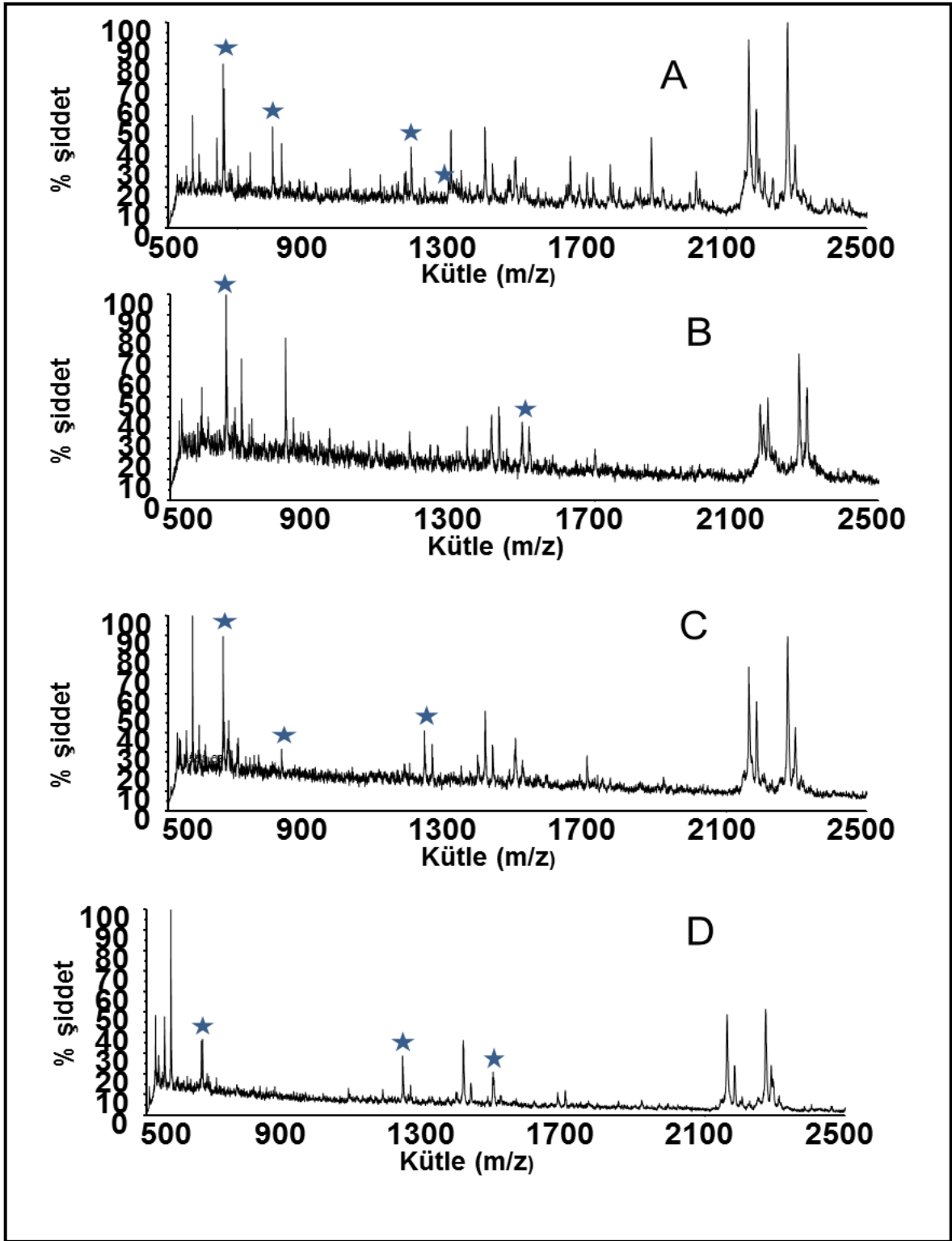
4.4.2 Aptamer bağlı polimerik yüzeyde trombin zenginleştirilmesi

DNA aptamerleri G-kuadrupleks yapıya sahip olabilirler ve bu yapı aptamerin hedef moleküle bağlanmasını sağlar (Vairamani and Gross, 2002). Özellikle G-kuadrupleks yapıya sahip olan trombin aptameri trombin proteinine bağlanır ve oldukça kararlı bir aptamer-protein kompleksi oluşmasına neden olur. Bu oluşum şematik olarak Şekil 4.20 de verilmiştir. Çünkü aptamer-hedef molekül etkileşimlerinde aptamerin geometrik yapısı çok büyük öneme sahiptir.

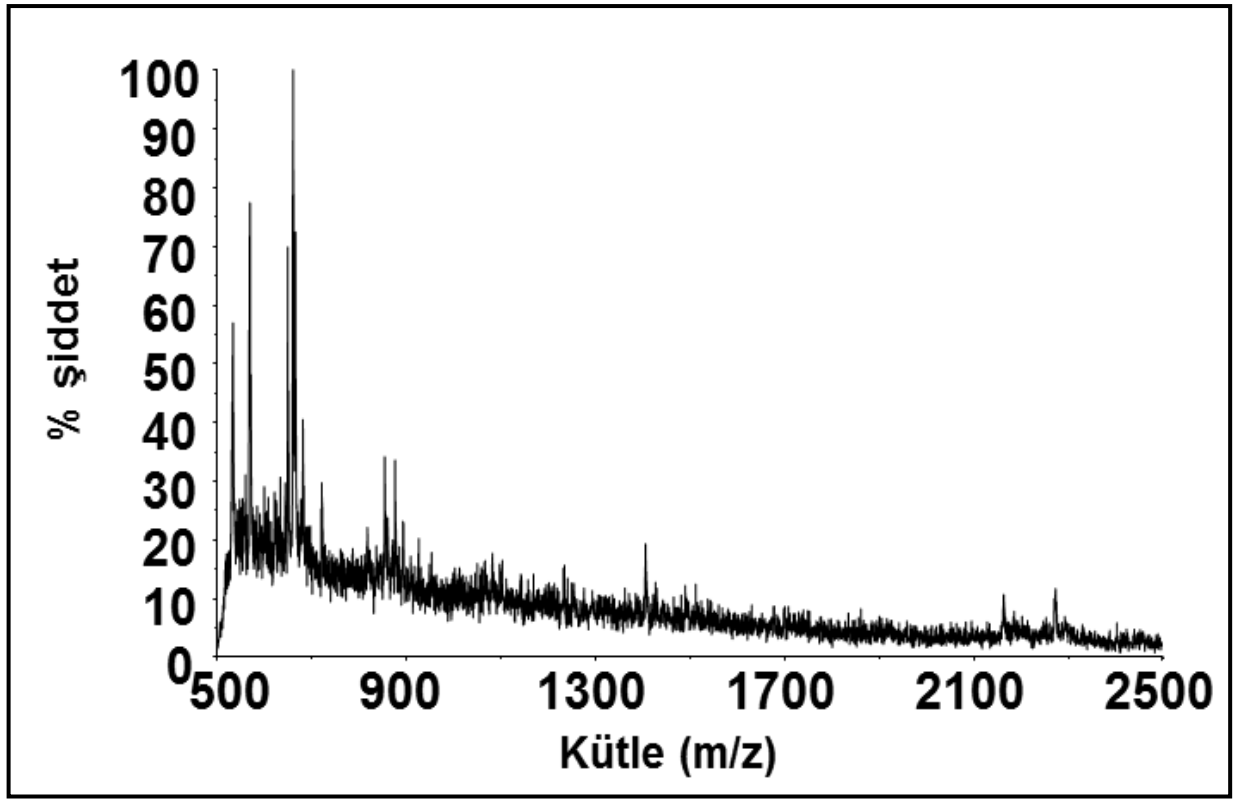


Şekil 4.20. (A) Trombin bağlayıcı aptamerin G-quadrupleks yapısı. (B) X- ışını ile aptamer-trombin etkileşimi (C) NMR ile aptamer-Trombin etkileşimi

Trombin proteininin aptamer bağlı polimerik yüzeyde zenginleştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Gözlenebilme sınırının çok altında olan 0.0007 pmol/µL trombin proteini çözeltisi tripsin ile parçalandıktan sonra yapılan analizlerde, trombin proteinine ait peptit fragment kütlelerine, rastlanmamaktadır (Şekil 4.22). Ancak, trombin aptameri bağlı yüzeylerde gözlenebilme sınırının çok altında olan derişimlerde bile trombin proteinin zenginleştirilip tayin edilebildiği görülmektedir (Şekil 4.21).



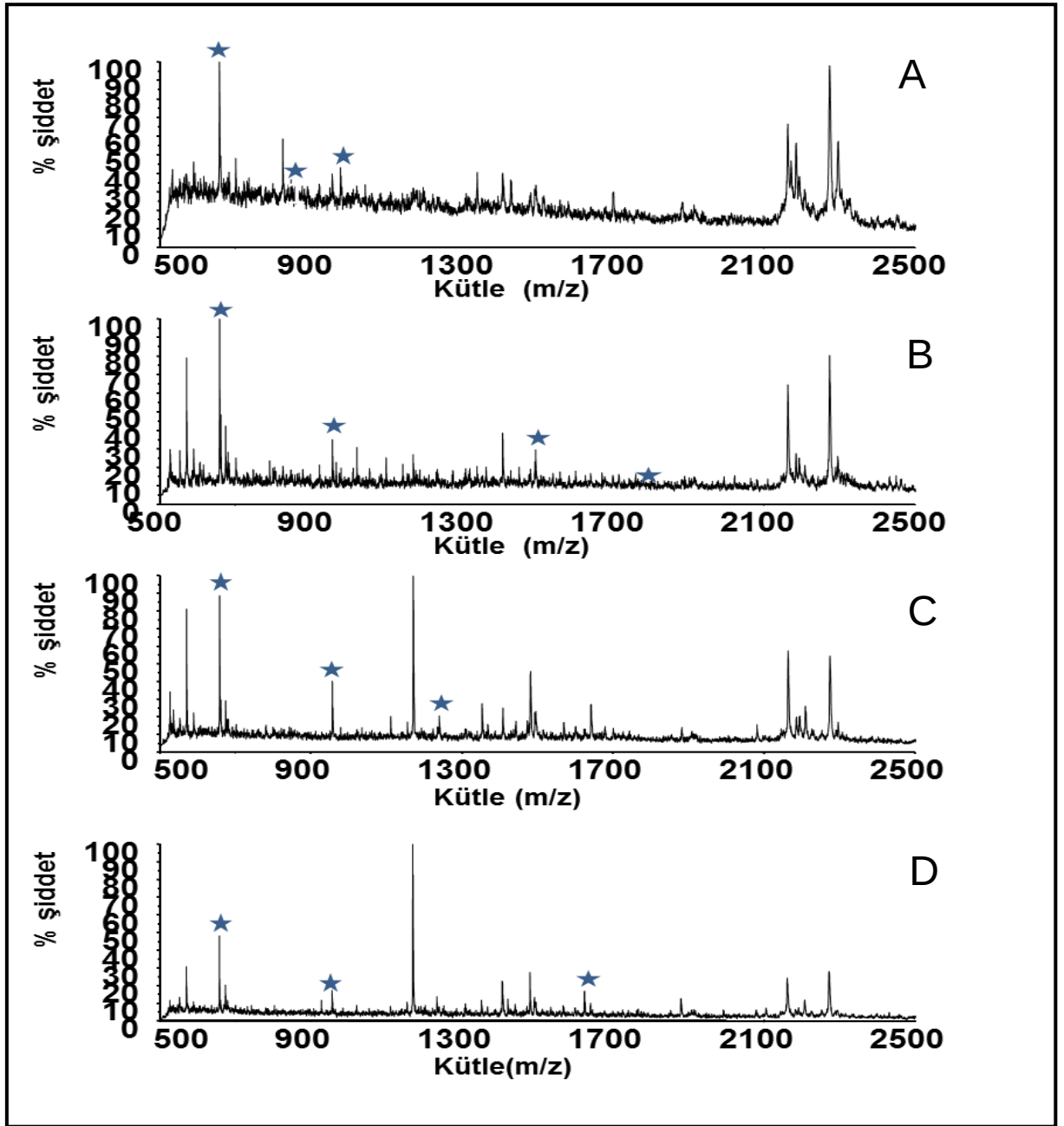
Şekil 4.21. Trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde trombin zenginleştirilmesi amacı ile elde edilen pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumları. (A) 0.7 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi, (B) 0.07 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi, (C) 0.007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi ve (D) 0.0007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesi.



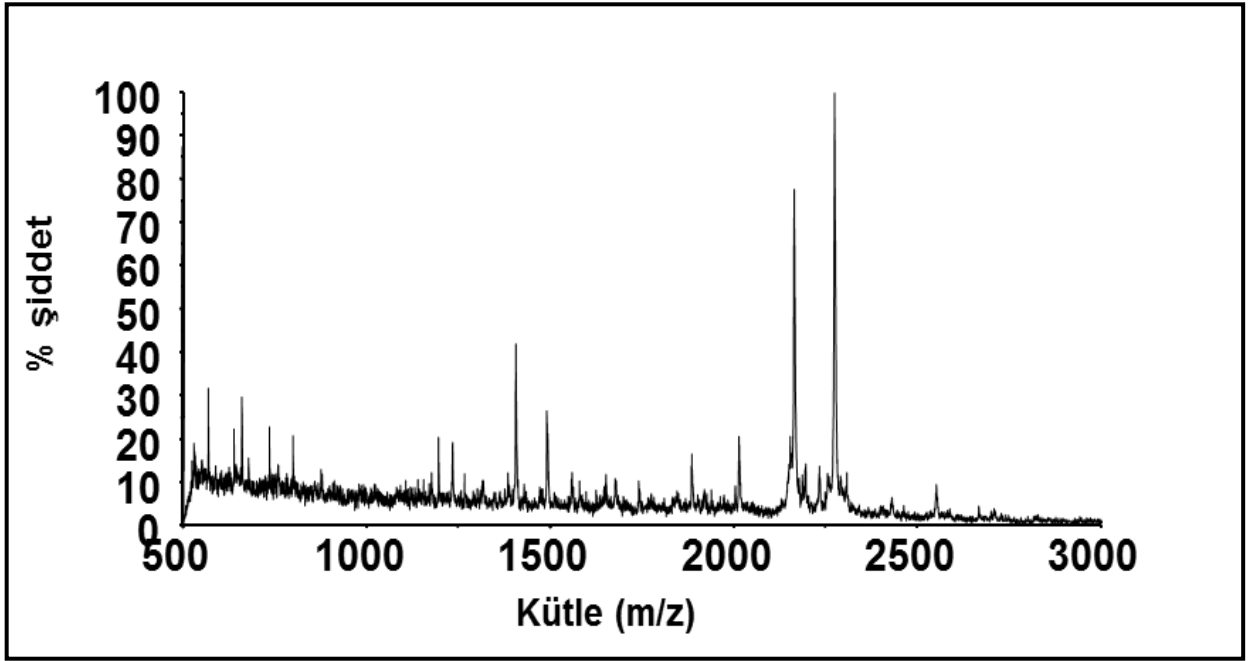
Şekil 4.22. Disülfid bağları kırıldıktan sonra tripsin ile çözeltide parçalanmış 0.0007 pmol/μL trombin çözeltisinin pozitif iyon ve lineer mod MALDI-Kütle spektrumu.

Trombin proteininin, trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi çalışmaları diğer proteinlerin derişimi sabit tutularak değişik derişimlerdeki trombin proteini çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.0007 pmol/μL gibi çok düşük bir derişimdeki trombin proteini çözeltisinden trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde önderştirilerek analizi gerçekleştirildiğinde normal şartlarda 1.0 pmol/μL düzeyinde olan tayin sınırının çok altında bir gözlenebilme sınırında tayin edilebildiği ve trombin proteininin peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyallerinin şiddetlerinin, ayıricılığıının ve seçiciliğinin yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.23). Ortamda bulunan Sitokrom c proteinin en şiddetli sinyal veren peptit fragmen kütlesi olan 1168 Da daki sinyalin şiddetinin, trombin proteini derişimi düştükçe, girişiminin artması sebebiyle yükseldiği gözlenmektedir. Şekil 4. 23. te bu girişimin 0.07 pmol/μL trombine kadar tölere edildiği görülmektedir. Trombin aptamerinin trombin proteini ile özgün bir etkileşime girdiğini göstermek amacıyla kontrol aptameri bağlı polimerik yüzey trombin proteini ile muamele edilmiştir. Daha sonra tripsin enzimi ile yüzeyde

parçalanma gerçekleştirilerek MALDI-Kütle spektrometresi analizi yapılmış ve elde edilen spektrumda trombin proteini peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyalleri tespit edilememiştir, gözlenen yüksek şiddette sinyaller tripsin enzimine ait otokataliz ürünlerinin sinyalleridir (Şekil. 4.24). Bu sonuçlar, trombin proteininin özgün olarak onun aptamerinin bağlı olduğu yüzeyde zenginleştirilebildiğini göstermiştir. Trombin proteininin gözlenebilme sınırının bu çalışmada normal şartlarda gerçekleştirilene göre en az 1000 kat artırıldığı ve düşük düzeylerde bulunan trombin proteini hem zenginleştirilip analiz edilebilmekte hem de yapısında oluşabilecek bir mutasyon proteolitik enzim parçalanması sonucu kütle spektrometrik olarak tespit edilebilecek duruma getirilebilmekte olduğunu göstermektedir.



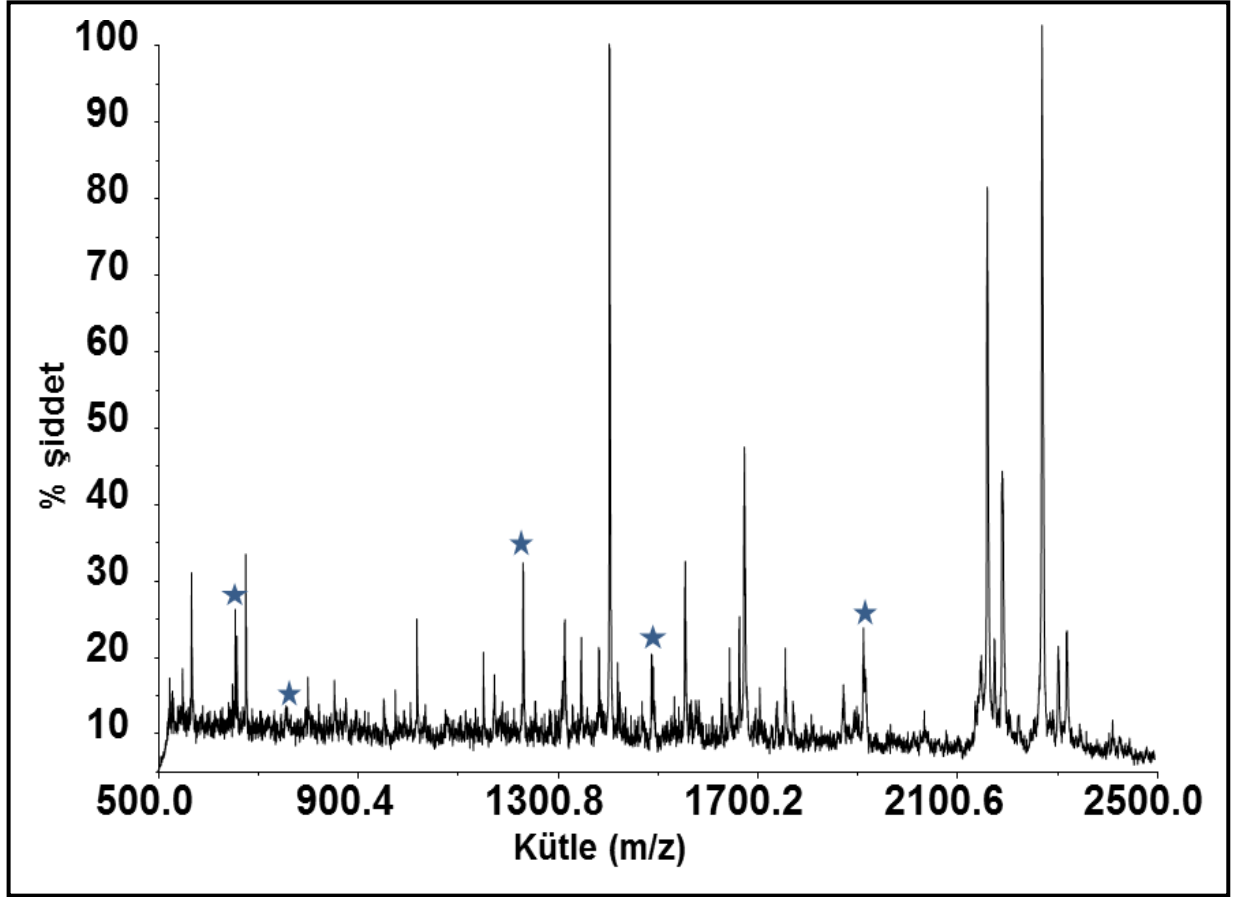
Şekil 4.23. Aptamer bağlanmış polimerik yüzeyde trombinin, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi. (A) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.7 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (B) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.07 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu, (C) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu ve (D) BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında 0.0007 pmol/μL trombin zenginleştirilmesine ait pozitif iyon MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumu.



Şekil 4.24. Trombin ile muamele edilmiş kontrol aptameri bağlanmış polimerik yüzeyde tripsin ile proteinin enzimatik olarak parçalanması sonucunda elde edilen peptitlerin pozitif iyon ve lineer modda alınan MALDI-kütle spektrumu.

4.4.3 Kan plazmasında trombin zenginleştirilmesi

Trombin normalde kanda bulunmaz, yalnızca pıhtılaşma olayı uyarıldığı zaman oluşur. Uyarılmadan önce kanda protrombin denilen inaktif şekilde bulunur. Protrombin kanda 2 pmol/ μ L derişiminde bulunur. Kan damarının yaralandığı bölgede enzimatik olarak trombine çevrilir. Trombin de faktör XIII ü aktive eder. Pıhtılaşmaya bırakılan kan örneğinde, pıhtılaşma sonrası ayrılan sıvıya serum denir. Serum plazmadan farklı olarak fibrinojen ve bazı pıhtılaşma faktörlerini kapsamaz, bunun dışında bileşimi plazma ile aynıdır. Trombin aptameri bağlı polimerik yüzey kullanılarak kan plazmasında trombin proteinin zenginleştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan trombin aptameri bağlı polimerik yüzey 1 mL kan plazması ile muamele edililip yüzeyde tripsin ile parçalama yapıldıktan sonra yapılan MALDI-Kütle spektrometresi analizi sonucu elde edilen kütle spektrumunda trombin proteini peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyalleri gözlenmiştir ve seçicilik yüksektir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Aptamer bağlı polimerik yüzeyde insan plazması trombin'i zenginleştirilerek yüzeyde tripsin enzimi ile proteolitik parçalanma gerçekleştirildikten sonra alınan pozitif iyon ve lineer mod MALDI-kütle spektrumu.

Şekil 4.25 den kandaki diğer yüksek oranda bulunan proteinlerin yanında düşük düzeylerde gözlenen trombin proteini aptamer bağlı yüzeylerde özgün olarak matriks içerisinde ayrılıp zenginleştirildikten sonra kolaylıkla tayin edilebileceği görülmektedir. Ancak burada protein matriksi büyük oranda elimine edilmekle birlikte tripsinin otokatalizinden gelen peptitlere rastlanmaktadır. Bu ise kütle spektrometrik olarak gerçekleştirilen proteomiks çalışmalarında bir başka önemli noktadır. Bunun üstesinden gelmenin yolu ya kromatografik yöntemle bu ilgilenilen peptitleri ayırıp analiz etmek ya da tripsin enzimi tutuklanmış malzemeler kullanılarak otokatalitik etkinin ortadan kaldırılması sağlanabilmektedir. Bu ise yeni bir araştırmanın konusudur.

5. SONUÇLAR

- 7 pmol/ μ L lizozim enzimi çözeltisinin değişik matrisler kullanılarak MALDI-Kütle spektrometresi ile analizleri yapılmıştır. 3-HPA, DHB, HABA, SA ve THAP matrisleri kullanılarak alınan sonuçlar değerlendirildiğinde, HABA matrisinin lizozim enzimi MALDI-Kütle spektrometresi analizi için en uygun matris olduğu tespit edilmiştir.
- 7 pmol/ μ L lizozim aptameri çözeltisinin değişik matrisler kullanılarak, MALDI-Kütle spektrometresi ile analizi yapılmıştır. Denenen matrislerden, oligonükleotitlerin analizlerinde MALDI matrisi olarak sıklıkla kullanılan THAP matrisinin lizozim aptameri analizi için en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir.
- Mol oranı olarak 1:1 lizozim enzimi ile lizozim aptamerini içeren hacimce % 50:50 karıştırılarak elde edilen çözeltide kompleks oluşumunun gözlenmesi için MALDI-Kütle spektrometresi analizleri gerçekleştirilmiştir. DHB matrisinin, diğer matrislere göre özellikle oligonükleotit-protein etkileşimleri sonucu oluşan komplekslere ait iyonların gözlenmesinde çok daha başarılı sonuçların elde edilmesini sağladığı görülmüştür. DHB gibi asidikliği yüksek bir matrisin kullanılmasından dolayı ortam pH değerinin azalmasıyla birlikte diğer türlerden kaynaklanan karmaşık sinyallere kıyasla enzim-aptamer kompleks iyonuna ait sinyalin şiddetinin arttığı gözlenmiştir.
- ATT matrisi kullanılarak fizyolojik pH değerinde de enzim-aptamer kompleks oluşumu incelendiğinde MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan analizinden elde edilen kütle spektrumlarında alınan sonuçlara göre, özellikle oluşan komplekslere ait sinyal şiddetlerinin ve ayıricılık değerlerinin, DHB matrisi kullanılarak elde edilen kütle spektrumlarındaki kadar iyi olmadıkları gözlenmiştir. Bu durum, MALDI şartlarında fizyolojik pH ortamının etkinliğinden daha fazla lazer enerjisinin kompleksi kararsız hale getirmesi sebebiyle uygun olmadığını göstermektedir.
- ATT ve DHB matrislerinin pH değerlerinde değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda, kompleks kararlılığından ziyade, gaz

fazındaki kararsızlık ve lazer ışınına maruz kalan örneğin kararsızlığı sebebiyle, yüksek şiddete sahip kompleks iyon sinyalleri elde edilememiştir.

- Diğer analitik ölçüm yöntemlerinin aksine kütle spektrometresi ile tuz etkisinin incelenmesinin zor olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni ise, kütle spektrometresinde gaz fazında katyonların oluşturdukları ve özgün olmayan katyon eklenmelerinin kompleks kararlılıklarını azalttığı ve çözelti fazını yansıtmadığındandır.
- Kompleks oluşumu üzerinde tampon çözelti etkisi incelendiğinde, $MgCl_2$ ve $NaCl$ gibi tuz içeren tamponlarla yapılan çalışmaların MALDI koşullarına uygun olmadıkları görülmektedir. Sadece 20 mM Tris-HCl içeren tampon çözelti ile aptamer-enzim kompleks sinyali gözlenebilmiştir.
- Aptamer çözeltisinin ısıtılıp soğutulduktan sonra kullanılmasının, kompleks oluşumuna ciddi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.
- Lizozim enziminin enzimatik parçalanması için disülfid bağları kırıldıktan sonra 2 saatlik enzimatik parçalama süresinin yeterli olduğu görülmüştür. Literatürde, enzimatik parçalama süresi 4 saat olarak belirtilirken (Ahn et al., 2010), tez kapsamında geliştirilen yöntem ile iki saat gibi kısa bir sürede lizozim enziminin parçalama ürünleri elde edilebilmiştir.
- 0.7 pmol/ μL ve 0.07 pmol/ μL derişimindeki lizozim enziminin analizleri gerçekleştirildiğinde, lizozime ait peptit fragment kütleleri, şiddeti ve ayıricılığı yüksek iyon sinyalleri gözlenerek elde edilmiştir. Bu durum, normalde gözlenebilme sınırı yaklaşık 1 pmol/ μL olan lizozim enziminin daha düşük derişimlerde zenginleştirilerek tayin edilebildiğini göstermiştir.
- Tayin sınırının altında kalan, düşük derişimlerde lizozim enziminin tayini çözelti halindeyken yapılamazken, tez kapsamında geliştirilen malzeme ve yöntem kullanılarak zenginleştirme yapıp tayini mümkün hale getirilmiştir.
- Kontrol aptameri ile yapılan çalışma ile lizozim aptamerinin lizozime özgü bir yapı olduğu kanıtlanmıştır.

- BSA ve Sitokrom c proteinlerinin de içerisinde bulunduğu lizozim enzimi içeren karmaşık örnek çözeltileri kullanılarak yapılan zenginleştirme çalışmalarında, MALDI-Kütle spektrometresi ile yapılan analizler sonucunda, tez kapsamında geliştirilen malzeme ve yöntem kullanılarak lizozim enziminin yüksek seçicilikle zenginleştirildiği gözlenmiştir.
- Tez kapsamında geliştirilen malzeme ve yöntem kullanılarak trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde 0.0007 pmol/μL gibi çok düşük derişimlerdeki trombin proteini başarıyla zenginleştirilmiştir. Yapılan literatür taramaları neticesinde, trombin proteini için elde edilen bu değerlerin, literatürde yer alan benzer çalışmalarda ifade edilen gözlenebilme ve tayin sınırlarının yaklaşık 1000 kat altında olduğu tespit edilmiştir. Böylece, düşük düzeylerde bulunan trombin proteini hem zenginleştirilerek analiz edilebilmekte hem de yapısında oluşabilecek bir mutasyon proteolitik enzim parçalanması sonucu kütle spektrometrik olarak tespit edilebilir hale gelmiştir (Dick and McGown, 2004).
- Trombin proteinin, trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde, BSA ve Sitokrom c proteinleri varlığında zenginleştirilmesi çalışmalarında değişik derişimlerdeki trombin proteini çözeltileri kullanıldığında, 0.0007 pmol/μL gibi çok düşük bir derişimdeki trombin proteini çözeltisinden trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde önderiştirilerek analizi gerçekleştirildiğinde normal şartlarda 1.0 pmol/μL düzeyinde olan tayin sınırının çok altında bir gözlenebilme sınırında tayin edilebildiği ve trombin proteini peptit fragment kütlelerine ait iyon sinyallerinin şiddetlerinin, ayırcılığının ve seçiciliğın yüksek olduğu görölmüştür.
- Kontrol aptameri ile yapılan çalışma ile trombin aptamerinin trombine özgü bir yapı olduğu kanıtlanmıştır.
- Kan plazması ile muamele edilen trombin aptameri bağlı polimerik yüzeyde tez kapsamında geliştirilen yöntem kullanılarak, trombin proteini yüksek seçicilik ile zenginleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Tahiri-Alaoui, L. Frigotto, N. Manville, J. Ibrahim, P. Romby and W. James, 2002, High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands, *Nucleic Acids Res.*, 30, e45.
- Ahn, J., Lee, S. W., Kang H. S., Jo, M., Lee, D., Laurell, T., Kim, S., 2010, Aptamer Microarray Mediated Capture and Mass Spectrometry Identification of Biomarker in Serum Samples, *Journal of Proteom Research*, 9, 5568-5573.
- Allara, D. L., Nuzzo, R. G., 1985, Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface, *Langmuir*, 1, 52–63.
- Aşkun, H., Gülbakan, B., Çelikbıçak, Ö., Uzun, C., Güven, O., Salih, B., 2008, Preconcentration and matrix elimination for the determination of Pb(II), Cd(II), Ni(II), and Co(II) by 8-hydroxyquinoline anchored poly(styrene-divinylbenzene) microbeads, *Journal of Applied Polymer Science*, 4, 2714–2722.
- Babendure J. R., Adams S. R., Tsien R. Y., 2003, Aptamers Switch on Fluorescence of Triphenylmethane Dyes, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 14716-7.
- Bain, C. D., Whitesides, G. M., 1989, Attenuation Lengths of Photoelectrons in Hydrocarbon Films, *J. Phys. Chem.*, 93, 1670–1673.
- Baker, B. R., Lai, R. Y., Wood, M. S., Doctor, E. H., Heeger, A. J., Plaxco, K. W., 2006, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 3138–3139.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper S.A., Spivak, D.A., (2008), Surface immobilization methods for aptamer applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1009-1021.
- Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper S.A., McCarley, R.L., Spivak, D.A., (2006), Designing highly specific biosensing surfaces using aptamer monolayers on gold, *Langmuir*, 22, 6446–6453
- Baldrich, E., Acero, J. L., Reekmans, G., Laureyn, W., O’Sullivan, C. K., 2005, *Anal. Chem.*, 77, 4774–4784
- Baldrich, E., Restrepo, A., O’Sullivan, C. K., 2004, Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance, *Anal. Chem.*, 76, 7053–7063
- Barber, M., Bordoli, R. S., Sedwick, R. D., Tyler, A. N., 1981, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 7, 325.
- Basner, B., Elnathan, R., Willner, I., 2006, *Anal. Chem.*, 78, 3638–3642.

- Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O., Miller, D. M., 1999, Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, *J. Biol. Chem.*, 274, 26369-26377.
- Beavis, R. C. and Chait, B. T., 1990, High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 62, 1836.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., N., Corvaia, 2010, The next generation of antibody drug conjugates comes of age, *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 345-352.
- Beckey, H. D., 1963, Mass spectrometric analysis with a new source for the production of ion fields at thin wires or metal edges, *Fresenius, Z. Anal. Chem.*, **197**, 80.
- Berens, C., Thain, A., Schroeder, R., 2001, A tetracycline-binding RNA aptamer *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 2549-2556.
- Binnig, G., Rohrer, H., 2000, *IBM J. Res. Dev.*, 44:, 279–293.
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., Sarma, V. R., 1965, Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution, *Nature*, 206, 757-761.
- Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M., Schluesener, H., 2001, Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels, *J. Biol. Chem.*, 276, 16464-16468.
- Bleakney, W., 1929, A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor, *Phys. Rev.*, 34, 157.
- Boiziau, C., Dausse, E., Yurchenko, L., Toulme, J. J., 1999, DNA aptamers selected against the HIV-1 trans-activation-responsive RNA element form RNA-DNA kissing complexes, *J. Biol. Chem.*, 274, 12730-12737.
- Breaker, R.R., 1997, DNA Enzymes, *Nat Biotechnology.*, 15(5), 427-31.
- Browning, C. M., Cagnon, L., Good, P. D., Rossi, J., Engelke, D. R., Markovitz D. M., 1999, Potent Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Gene Expression and Virus Production by an HIV-2 Tat Activation-Response RNA Decoy, *J. Virol.*, 73, 5191-5195.
- Bruno J. G., Kiel, J. L., 1999, In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 457-464.
- Bunka, D. H. J., Stockley, P. G., 2006, Aptamers come of age, *Nature Publishing Group*, 4, 588.

- Burgstaller, P., Famulok, M., 1994, Isolation of RNA Aptamers for Biological Cofactors by In Vitro Selection, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 33, 1084-1087.
- Burlingame, A.L., 2005, *Methods in Enzymology, Biological Mass Spectrometry*, vol. 204, Academic Press, New York.
- Burton, D. R., 2002, Antibodies against viruses: passive and active immunization, *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 706-713.
- Carothers, J. M., Oestreich, S. C., Davis, J. H., Szostak, J.W., 2004, Informational Complexity and Functional Activity of RNA Structures, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 5130-5137.
- Chace, D. H., Diperna, J. C., Naylor, E. W., 1999, Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium, *Acta paediatr. suppl.*, 432:457.
- Chang, I. H., Tulock, J., Liu, J., Kim, W. S., Cannon Jr. D., Lu, Y., Bohn, P., Sweedler, J., Cropek D., 2005, Miniaturized Lead Sensor Based on Lead-Specific DNAzyme in a Nanocapillary Interconnected Microfluidic Device, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 3756.
- Charlton, J., Sennello, J., Smith, D., 1997, In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase, *Chem Biol.*, 4, 809–816.
- Chen, H. W., Medley, C. D., Sefah, K., Shangguan, D., Tang, Z., Meng, L., Smith, J. E., Tan, W., 2008, Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers, *Chem Med Chem.*, 3, 991-1001.
- Chen, Y., Munteanu, A. C., Huang, Y. F., Phillips, J., Zhu, Z., Mavros, M., Tan, W., 2009, Mapping receptor density on live cells by using fluorescence correlation spectroscopy, *Chemistry*, 15, 5327-5336.
- Chen, Y., Tang, S., Ding, S., He, F., Xiao, X., 2009, *Anal. Lett.*, **42**, 2793-2806.
- Cho, E. J., Collett, J. R., Szafranska, A. E., Ellington, A. D., Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets, 2006, *Anal. Chim. Acta*, 564, 82–90.
- Cho, E. J., Lee, J. W., Ellington, A. D., 2009, Applications of Aptamers as Sensors, 3 *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2, 241–64.
- Ciesiolka, J., Gorski, J., Yarus, M., 1995, Selection of an RNA domain that binds Zn^{2+} , *Rna-a Publication of the Rna Society*, 1, 538-550.
- Clark, S. L., Remcho, V. T., 2003, Electrochromatographic retention studies on a flavin-binding RNA aptamer sorbent, *Anal. Chem.*, 75, 5692–5696.

- Clayton, P. T., 2001, Application of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism, *J. Inher. Metab. Dis.*, 24, 139-50.
- Cohen, S. L., Chait, B. T. 1996, Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins, *Anal. Chem.*, 68 (1), 31–7.
- Collett, J. R., Cho, E. J., Ellington, A. D., 2005, Production and processing of aptamer microarrays, *Methods*, 37, 4–15.
- Cotter, R. J., 1984, Lasers and Mass Spectrometers, *Anal. Chem.*, **56**, 485A.
- Daniels, D. A., Chen, H., Hicke, B. J., Swiderek, K. M., Gold, L., 2003, A tenascin C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 15416-15421.
- Dass, C., 2007, Fundamentals of contemporary mass spectrometry, John Wiley and Sons , Memphis, 6,7 p.
- Deng, Q., German, I., Buchanan D., Kennedy, R.T., 2001, Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase, *Anal. Chem*, 73, 5415-5421.
- Dharmasiri, U., Balamurugan, S., Adams, A. A., Okagbare, P. I., Obubuafo, A., Soper, S. A., 2009, Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device, *Electrophoresis*, 30, 3289-3300.
- Dick, L. W., McGown, L. B., 2004, Aptamer-Enhanced Laser Desorption/Ionization for Affinity Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 76, 3037-3041.
- Drabovich, A.P., Okhonin, V., Berezovski, M., Krylov, S.N., 2007, Smart aptamers facilitate multi-probe affinity analysis of proteins with ultra-wide dynamic range of measured concentrations, *J. Am. Chem. Soc*, 129, 7260-7261.
- Duwez, A. S, 2004, Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, 134:, 7–138.
- Ellington, A. D., Szostak, J. W., 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346, 818-822.
- Ellington, A. D., Szostak, J. W., 1992, election in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures, *Nature*, 355, 850-852.
- Famulok, M., Szostak, J. W., 1992, Stereospecific recognition of tryptophan agarose by in vitro selected RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3990-3991.

- Fang, X., Cao, Z., Beck, T., Tan, W., 2001, Molecular aptamer for real time oncoprotein platelet derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy, *Anal. Chem.*, 73, 5752-5757.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Whitehouse, C. M. 1989, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246, 64.
- Ferreira, C. S., Papamichael, K., Guilbault, G., Schwarzacher, T., Gariépy, J., Missailidis, S., 2008, DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390, 1039-1050.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gustafsdottir, S. M., Ostman, A., Landegren U., 2002, Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays, *Nat. Biotechnol.*, 20, 473-477.
- Fritzsche, W., Taton, T. A. 2003, Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based DNA detection, *Nanotechnology*, 14, R63–R73.
- Fukusaki, E., Kato, T., Maeda, H., Kawazoe, N., Ito, Y., Okazawa, A., Kajiyama, S., Kobayashi, A., 2000, DNA Aptamers that Bind to Chitin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 423-425.
- Geiger, A., Burgstaller, P., vonderEltz, H., Roeder, A. Famulok, M., 1996, RNA Aptamers That Bind L-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity, *Nucleic Acids Res.*, 24, 1029-1036.
- German, I., Buchanan, D. D., Kennedy, R. T., 1998, Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 70, 4540-4545.
- Golden, M. C., Collins, B. D., Willis, M. C., Koch, T. H., 2000, Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers, *J. Biotechnol.*, 81, 167–178.
- Gopinath, S. C. B., Misono, T. S., Kawasaki, K., Mizuno, T., Imai M., Odagiri, T., Kumar, P. K. R., 2006, An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion, *J. Gen Virol.*, 87, 479-487.
- Gopinath, S. C. B., Sakamaki, Y., Kawasaki, K., Kumar, P. K. R., 2006, An Efficient RNA Aptamer against Human Influenza B Virus Hemagglutinin, *Journal of Biochemistry*, 139(5), 837-846 .
- Grate, D., Wilson, C., 2001, Inducible regulation of the *S. Cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA-aptamer complex, *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 2565-2570.

- Green, L. S., Bell, C., Janjic, N., 2001, Aptamers as reagents for high-throughput screening, *Biotechniques*, 30, 1094-1110.
- Green, L. S., Jellinek, D., Jenison, R., Ostman, A., Heldin, C. H., Janjic, N., 1996, Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain, *Biochemistry*, 35, 14413-14424.
- Hamaguchi, N., Ellington, A., Stanton, M., 2001, Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins, *Anal. Biochem.*, 294 (2), 126-131.
- Hamula, C. L. A., Zhang, H. Q., Guan, L. L., Li, X. F., Le, X. C., *Anal. Chem.*, 2008, 80, 7812-7819.
- Harkansson, P., Kamenski, I., Sundquist, B. *et al.*, 1982, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 2498.
- Hermann, T., Patel, D. J., 2000, Adaptive recognition by nucleic acid aptamers *Biochemistry*, *Science* 287, 820-825.
- Hermanson, G. T., 1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, England, 235-237.
- Herne, T. M., Tarlov, M. J, 1997, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 419–423.
- Hianik, T., Ostatná, V., Zajacova, Z., Stoikova, E., Evtugyn, G., 2005, Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 291–295.
- Hibbits, K. A., Gill, R. C., Willson, D. S., 1994, Isothermal titration calorimetric study of the association of hen egg lysozyme and the anti-lysozyme antibody HyHEL-5, *Biochemistry*, 33, 3584–3590.
- Hicke, B. J., Marion, C., Chang, Y. F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., Schmidt, P. G., Warren, S., 2001, Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein, *J. Biol. Chem.*, 276, 48644-48654.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T., 1991, Matrix assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry*, 63, A1193-A1202.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Ingeldoh, A. and Stahl, B., 1990, Matrix assisted UV-laserdesorption ionization: a new approach to mass spectrometry of large molecules, in *Biological Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, p. 49.
- Hirao, I., Harada, Y., Nojima, T., Osawa, Y., Masaki, H., Yokoyama, S., 2004, In Vitro Selection of RNA Aptamers that Bind to Colicin E3 and Structurally Resemble the Decoding Site of 16S Ribosomal RNA, *Biochemistry*, 43, 3214-3221.

- Hirao, I., Yoshinari, S., Yokoyama, S., Endo, Y., Ellington A. D., 1997, In vitro selection of aptamers that bind to ribosome-inactivating toxins, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 37, 283-4.
- Hofmann, E., Stroobant, V., 2007, *Mass spectrometry principles and applications*, John Wiley and Sons, Belgium, 306-346.
- Hofmann, H., Limmer, P., Hornung, V., Sprinzl, M., 1997, *Rna-a Publication of the Rna Society*, 3, 1289-1300.
- Hoober, K. L., Sheasley, S. L., Gilbert, H. F., Thorpe, C. J., *Biol. Chem.* 1999, Sulfhydryl Oxidase from Egg White: A Facile Catalyst for Disulfide Bond Formation in Proteins and Peptides, 274, 22147-22150.
- Huang, C. C., Huang, Y. F., Cao, Z., Tan, W., Chang, H. T., 2000, *Anal. Chem.*, 77, 5735-5741.
- Ikebukuro, K., Kiyohara, C., Sode, K., 2005, Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner, *Biosens Bioelectron*, 20, 2168-2172.
- Iliuk, A. B., Hu, L., Tao, W. A., 2011, Aptamer in Bioanalytical Applications, *Anal. Chem.*, 83, 4440-4452.
- Ishikawa, E., 1983, Enzyme-labeling of antibodies, *J. Immunoassay*, 4, 209-327.
- Jayasena, S. D., 1999, Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, *Clinical chemistry*, 45, 1628-1650.
- Jayasena, S. D., 1999, Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, *Clinical Chemistry*, 45, 1628-1650.
- Jellinek, D., Green, L. S., Bell, C., Janjic, N., 1994, Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor, *Biochemistry*, 33, 10450-10456.
- Jhaveri, S. D., Kirby, R., Conrad, R., Maglott, E. J., Bowser, M., Kennedy, R. T., Glick, G., Ellington, A. D., 2000, Designed signaling aptamers that transduce molecular recognition to changes in fluorescence intensity, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2469-2473.
- Jiang, F., Kumar, R. A., Jones, R. A., Patel, D. J., 1996, Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex, *Nature* 382, 183-186.
- Jiang, Y., Zhu, C., Ling, L., Wan, L., Fang, X., Bai, C., 2003, Specific Aptamer-Protein Interaction Studied by Atomic Force Microscopy, *Anal. Chem.*, 75, 2112-2116.
- Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H. P., Kumar, S., Jaykus, L. A., Schefers, J., Sreevatsan, S., 2009, Selection, characterization, and application of

- DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars, *Mol. Cell. Probes*, 23, 20-28.
- Karas, M. and Hillenkamp, F.H., 1988, *Ion Formation from Organic Solids IV*, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 103.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.*, 60, 2299.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. and Hillenkamp, F, 1987, *Int. J. Mass Spectrom, Ion Processes*, 78, 53.
- Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., and Hillenkamp, F., 1990, Principles and applications of matrix-assisted UV-laser Desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 241, 175
- Karas, M., Hillenkamp, F.H., 1988, *Anal. Chem.*, 60, 2229.
- Karlsson, E., B., 2001, The Nobel Prize in Physics. In: Levinovitz AW and RRingertz N, eds. *The Nobel Prize: The first 100 Years*, Imperial College press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 31.
- Kato, T., Takemura, T., Yano, K., Ikebukuro, K., Karube, I., 2000, In vitro selection of DNA aptamers which bind to cholic acid, *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 1493, 12-18.
- Kawde, A. N., Rodriguez, M. C., Lee, T. M. H., Wang, W., 2005, Label-Free Bioelectronic Detection of Aptamer-Protein Interactions, *Electrochem Commun.*, 7, 537–540.
- Kiga, D., Futamura, Y., Sakamoto, K., Yokoyama, S., 1998, An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1755-1760.
- Kim, Y., Cao, Z., Tan, W., 2008, Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor, *PNAS*, 105, 5664-5669.
- Kirby, R., Cho, E. J., Gehrke, B., Bayer, T., Park, Y. S., Neikirk, D. P., McDevitt, J. T., Ellington, A. D., 2004, Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins, *Anal. Chem.*, 76, 4066-75.
- Klussmann, S., 2006, *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. doi: 10.1002/3527608192.index
- Ko, J. H., Cho, B. J., Ahn, K., Lee, Y., Park, I., 1999, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 20,1335-1339.
- Koppelaar, D.W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., 2005, Mass spectrometry detectors, *Anal. Chem.*, 419A–27A.

- Krihna, R., Wold, F., 1997, Protein Structure – A Practical Approach, 2nd edn (ed. T.E. Creighton), Oxford University Press, New York, 391–402.
- Lato, S. M., Boles, A. R., Ellington, A. D., 1995, In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution, *Chem. Biol.*, 2, 291-303.
- Lauhon, C. T., Szostak, J. W., 1995, RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 1246-1257.
- Le Floch, F., Ho, H. A., Leclerc, M., 2006, Label-free electrochemical detection of protein based on ferrocene-bearing cationic polythiophene and aptamer. *Anal. Chem.*, 78, 4727–473.
- Lee, J.F., Stovall, G.M., Ellington, A.D., 2006, Aptamer therapeutics advance, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 282–289.
- Lee, M., Walt, D. R., 2000, A fiber optic microarray biosensors using aptamer as receptors, *Anal. Biochem.*, 282, 142–146.
- Lee, Y. J., Lee, S. W., 2006, In Vitro Selection of Cancer-Specific RNA Aptamers, *Journal of microbiology and biotechnology*, 16, 1149-1153.
- Levinson S. S., Elin, R. J., Yam, L., 2002, Light chain proteinuria and lysozymuria in a patient with acute monocytic leukaemia, *Clin. Chem. (Washington, D. C.)*, 48, 1131-1132.
- Li, J. J., Fang, X., Tan, W., 2002, Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (1), 31-40.
- Lin, C., Katilius, E., Liu, Y., Zhang, J., Yan, H., 2006, Self-assembled signaling aptamer DNA arrays for protein detection, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 5296–5301.
- Lin, C., Liu, Y., Yan, H., 2007, Self-Assembled Combinatorial Encoding Nanoarrays for Multiplexed Biosensing, *Nano Lett*, 7, 507–512.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E., 2002, An aptamer-based quartz crystal protein biosensor, *Anal. Chem.*, 74, 4488–4495
- Liu, J., Lu, Y., 2003, A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 6642-6643.
- Liu, J., Lu, Y., 2004, Adenosine-dependent assembly aptazyme functionalized gold nanoparticles and its application as a calorimetric biosensor, *Anal. Chem.* 76, 1627–1632.
- Liu, J., Lu, Y., 2006, Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 117, 90-94.

- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M., 2005, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev.*, 105, 1103–1169.
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M., 2003, New trends in affinity sensing - aptamers for ligand binding, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 22, 810-818.
- Majerfeld, I., Puthenvedu, D., Yarus, M., 2005, RNA affinity for molecular L-histidine; Genetic code origins, *J. Mol. Evol.*, 61, 226-235.
- Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R., Strehlitz, B., 2005, In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 338, 1928-1934.
- Mannironi, C., DiNardo, A., Fruscoloni, P., Tocchini-Valentini, G. P., 1997, In vitro selection of dopamine RNA ligands, *Biochemistry*, 36, 9726-9734. 160.
- Manz, A., Pamme, N. and Iossifidis, D., 2003, *Bioanalytical Chemistry*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 188p.
- Manz, A., Pamme, N. and Iossifidis, D., 2003, *Bioanalytical Chemistry*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 188p. J. J. Thomson, 1897, Cathode Rays, *Philos. Mag.*, 44, 293.
- Martin, S. E., Shabanowitz, J., Hunt *et al.*, 2000, Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 4266–74.
- McCauley, T. G., Hamaguchi, N., Stanton, M., 2003, Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules, *Anal. Biochem.*, 319, 244-250.
- Meli, M., Vergne, J., Decout, J. L., Maurel, M. C., 2002, Adanine aptamer complexes: a bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base, *J. Biol. Chem.*, 277, 2104-2111.
- Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., Peyrin, E., 2003, A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8672–8679.
- Minunni, M., Tombelli, S., Gullotto, A., Luzi, E., Mascini, M., 2004, Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein, *Biosens Bioelectron*, 20, 1149–1156.
- Misono, T. S., Kumar, P. K. R., 2005, Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.*, 342, 312–317.

- Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C., Kondo, A. J., 2009, *Biosci. Bioeng.*, 108, 64.
- Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C., Kondo, A., 2010, Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res.*, 38, e 21.
- Morris, H. R., 1980, *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, Heyden, London.
- Mossharafa, M., Stauffer, W. M., Reed, J. H., 1971, Recent developments in clinical mass spectrometry, *Biomed Sci Instrum*, 8, 71.
- Muddiman, D. C., Bakhtiar, R., Hofstadler, S. A., Smith, R. D., 1997, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: Instrumentation Andapplications, *Journal Of Chemical Education*, 74 (11), 1288.
- Munson, M. S. B., Field, F. H., 1966, Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction , *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2621.
- Naoe, M., Ogawa, Y., Morita, J., Omori, K., Takeshita, K., Shichijyo, T., Okumura, T., Igarashi, A., Yanaihara, A., Iwamoto, S., Fukagai, T., Miyazaki A., Yoshida, H., 2007, Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the Cell Search System, *Cancer*, **109**, 1439-1445. 159
- Nieuwlandt, D., Wecker, M., Gold, L. 1995, in Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P, *Biochemistry*, 34, 5651-5659.
- Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., Sullenger, B. A., 2005, Aptamers: an emerging class of therapeutics, *Annu. Rev. Med.*, 56, 555- 583.
- Oguro, A., Ohtsu, T., Nakamura, Y., 2009, An aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eukaryotic initiation factor 4A, *Anal. Biochem.*, 388, 102-107.
- Oliveira, J. R., Nunes, F. B., Simoes Pires, M. G., Silva Melo, D. A., Fagundes Donadio, M. V., 2008, Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Anti-Infect. Agents Med. Chem.*, 7, 249-257.
- Pan, W. H., Craven, R. C., Qiu, Q., Wilson, C. B., Wills, J. W., Golovine, S., Wang, J. F., 1995, Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 11509-11513.
- Pappas, D., Wang, K., 2007, Cellular separations: A review of new challenges in analytical chemistry, *Analytica chimica acta*, 601, 26-35.
- Pasch, H. and Schrepp, W., 2003, *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*, Series: Springer Laboratory XVIII.

- Paul, W., Steinwedel, H. Z., 1953, A New Mass Spectrometer Without A Magnetic Field, *Naturforsch*, 8a: 448-450.
- Pavlov, V., Xiao, Y., Shlyahovsky, B., Willner, I., 2004, Aptamer-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Optical Detection of Thrombin, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11768–11769.
- Phillips, J. A., Xu, Y., Xia, Z., Fan, Z. H., Tan, W., 2009, Enrichment of cancer cells using aptamers immobilized on a microfluidic channel, *Analytical Chemistry*, 81, 1033–1039.
- Pierson, J., Norris, J. L., Aerni, H. R., 2004, Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry, *J. Proteome Res.*, 3, 289.
- Pieve, C. D., Perkins, A. C., 2009, Missailidis, S., Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with (99m)Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice, *Nucl. Med. Biol.*, 36, 703-10.
- Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D, 1987, Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3559–3568.
- Potyrailo, R. A., Conrad, R. C., Ellington, A. D., Hieftje, G. M., 1998, Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors, *Anal. Chem.* 70, 3419-3425.
- Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A., 2005, Aptamers—Basic research, drug development, and clinical applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 367–374.
- Quate, C. F., 1997, Scanning Probes as a lithography tool for nanostructures, *Surf. Sci.*, 386, 259–264.
- Ravelet, C., Grosset, C., Peyrin, E., 2006, Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers, *Journal of Chromatography A*, 1117, 1-10.
- Razvan, N., Shirley Mei, S., Zhongjie Liu, Z. and Yingfu Li. Y., 2004, Engineering DNA aptamers and DNA enzymes with fluorescence-signaling properties, *Pure Appl. Chem.*, 76, 1547–1561.
- Rehder, M. A., McGown, L. B., 2001, Open-tubular capillary electrochromatography of bovine β -lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase, *Electrophoresis*, 22 (17), 3759-3764.

- Rehder-Silinski, M. A., McGown, L. B., 2003, Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1008, 233-245.
- Rodriguez, M. C., Kawde, A. N., Wang, J., 2005, Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge, *Chem Commun.*, 207, 4267–4269.
- Romig, T. S., Bell, C., Drolet, D. W., 1999, Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 731, 275-284.
- Roy, D., Fendler, J., 2004, Reflection and Absorption Techniques for Optical Characterization of Chemically Assembled Nanomaterials, *Adv. Mater.*, 16, 479–508.
- Rusconi, C. P., Roberts, J. D., Pitoc, G. A., Nimjee, S. M., White, R. R., Quick, G., Scardino, E., Fay, W. P., Sullenger, B. A., 2004, Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo, *Nat Biotechnol.*, 22, 1423–1428.
- Ruta, J., Ravelet, C., Baussanne, I., Decout, J. L., Peyrin, E., 2007, Aptamer-based enantioselective competitive binding assay for the trace enantiomer detection, *Anal. Chem.*, 79, 4716-4719.
- Salih, B., 2005, Poliamin Kanser ilaçlarının CKII Enzimi ve MYC Onkoproteinler ile Etkileşim Mekanizmalarının Kapiler Elektroforez ve MALDI-MS, ile incelenmesi, DPT Projesi Sonuç Raporu, Proje No:02 K 020 290-14, Ankara.
- Sampson, T., 2003, *World Patent Information*, 25, 123-129.
- Santulli-Marotto, S., Nair, S. K., Rusconi, C., Sullenger, B., Gilboa, E., 2003, Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity, *Cancer Res*, 63, 7483-7489.
- Sassanfar, M., Szostak, J. W., 1993, An RNA motif that binds ATP, *Nature*, 364, 550-553.
- Savran, C. A., Knudsen, S. M., Ellington, A. D., Manalis, S. R., 2004, Micromechanical Detection of Proteins Using Aptamer-Based Receptor Molecules, *Anal. Chem.*, 76, 3194 -3198.
- Sazani, P. L., Larralde, R., Szostak J. W., 2004, A Small Aptamer with Strong and Specific Recognition of the Triphosphate of ATP., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 8371.

- Schlenso, M. D., Gronewold, T. M. A., Tewes, M., Famulok, M., Quandt, E., 2004, A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands, *Sens Actuators B* 101, 308–315
- Sefah, K., Tang, Z. W., Shangguan, D. H., Chen, H., Lopez-Colon, D., Li, Y., Parekh, P., Martin, J., Meng, L., Phillips, J. A., Kim, Y. M., Tan, W. H., 2009, Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers, *Leukemia*, 23, 235-244.
- Shangguan, D. H., Meng, L., Cao, Z. H. C., Xiao, Z. Y., Fang, X. H., Li, Y., Cardona, D., Witek, R. P., Liu, C., Tan, W. H., 2008, Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells, *Anal. Chem.*, 80, 721-728.
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z. W., Cao, Z. H. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. Y. J., Tan, W. H., 2006, Aptamer–Drug Conjugation for Targeted Tumor Cell Therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 11838-11843.
- Shick, K. A., Xavier, K. A., Rajpal, A., Smith-Gill, S. J., Willson, R. C., 1997, Association of the anti-hen egg lysozyme antibody HyHEL-5 with avian species variant and mutant lysozymes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1340, 205–214.
- Shin, S., Kim, I. H., Kang, W., Yang, J. K., Hah, S. S., 2010, An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer-functionalized quantum dots, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 3322-3325.
- Simpson, R. J., 2003, *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Ch. 8.
- Sinha, N., Mohan, S., Lipschultz, C. A., Smith-Gill, S.J., 2002, Differences in electrostatic properties at antibody–antigen binding sites: implications for specificity and cross-reactivity, *Biophys. J.*, 83, 2946–2968.
- Siuzdak, G., 1996, *Mass Spectrometry of biotechnology*; academiic Press: San Diago, Calif., xvi, 161
- Siuzdak, G., 2003, *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, MCC Press, San Diego, CA.
- Smith, J. E., Medley, C. D., Tang, Z., Shangguan, D., Lofton, C., Tan, W., 2007 Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells, *Anal. Chem.*, 79, 3075-3082.
- Smith, J. E., Tan, W. H., 2008, Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers, *Chem Med Chem*, 3, 991-1001.
- Soper, S. A., Spivak, D. A., 2008, Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1019-1021.

- Spengler, B. and Cotter, R.J., 1990, Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis, *Anal. Chem.*, **62**, 793.
- Spiridonova, V. A., Kopylov, A. M., 2002, *Biochemistry*, (Moscow), 67, 850–854. Potyrailo, R. A., Conrad, R. C., Ellington, A. D., Hieftje, G. M., 1998, Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors, *Anal. Chem.*, 70, 3419–3425.
- Srisawat, C., Goldstein, I. J., Engelke, D. R., 2001, Sephadex-binding RNA ligand rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures, *Nucleic acids research*, 29, 1-5.
- Stadtherr, K., Wolf, H., Lindner, P., 2005, An aptamer-based protein biochip, *Anal. Chem.*, 77, 3437–3443.
- Stafford., M., 1984, Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 60(1), 85-92.
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E. and Caprioli, R. M., 2001, Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues, *Nat. Med.*, 7, 493.
- Stojanovic, M. N., de Prada P., Landry, D. W., 2001, Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 4928-4931.
- Stojanovic, M. N., Landry, D. W., 2002, Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 9678-9679.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., 2007, SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular engineering*, 24, 381-403.
- Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., 1998, One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1959–1964.
- Stranick, S. J., Weiss, P. S., Parikh, A. N., Allara, D. L., 1993, *J. Vac. Sci. Technol. A.*, 11, 739–741.
- Stults, J. T. and Masters, J. C., 1991, Improved electrospray ionization of synthetic oligodeoxynucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 5, 359-363.
- Su, S., Nutiu, R., Filipe, C. D. M., Li, Y., Pelton, R., 2007, Adsorption and covalent coupling of ATP-binding DNA aptamers onto cellulose, *Langmuir*, 23, 1300–1302.

- Sullenger, B. A., Gallardo, H. F., Ungers, G. E., Gilboa, E., 1990, Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication, *Cell*, 63, 601–608.
- Swearingen, C. B., Wernette, D. P., Cropek, D. M., Lu, Y., Sweedler, J. V., Bohn, P. W., 2005, Immobilization of a Catalytic DNA Molecular Beacon on Au for Pb(II) Detection, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 442-448.
- Taghdisi, S. M., Abnous, K., Mosaffa, F., Behravan, J., 2010, Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer, *Journal of Drug Targeting* 18, 277–281.
- Tang, J. J., Xie, J. W., Shao, N. S., Yan, Y., 2006, DNA aptamer that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods, *Electrophoresis*, 27, 1303-1311.
- Tang, J., Breaker R. R. , 1998, Mechanism for allosteric inhibition of an ATP-sensitive ribozyme, *Nucleic acids research*, 26, 4214-4221.
- Tang, Z. W., Shangguan, D., Wang, K. M., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H. W., Li, Y., Tan, W. H., Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells, 2007, *Anal. Chem.*, 79, 4900-4907.
- Tang, Z., Parekh, P., Turner, P., Moyer, R. W., Tan, W., 2009, Generating Aptamers for Recognition of Virus-Infected Cells *Clinical Chemistry*, 55, 813-822.
- Thiel, K. W., Giangrande, P. H., 2009, Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers, *Oligonucleotides*, 19, 209-222.
- Thomson, J. J., 1913, *Rays of Positive Electricity and the Application to Chemical Analyses*, Longmans, Green & Co., London.
- Thorgersen, D. F., Skowronsky, R. P., Macfarlane, R. D., 1974, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 616.
- Tok, J., Lai, J., Leung, T., Li, S. F. Y., 2010, Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 31, 2055–2062.
- Tombelli, S., Mascini, M., 2009, Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 11, 179-188.
- Tombelli, S., Minunni, S., Mascini, M., 2005, Analytical applications of aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2424-2434.
- Tong, G. J., Hsiao, S. C., Carrico, Z. M., Francis, M. B., 2009, Viral Capsid DNA Aptamer Conjugates as Multivalent Cell-Targeting Vehicles, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 11174-11178.

- Tuerk, C., Gold, L., 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249, 505-510.
- Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K., Klussmann, S., 2003, Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX, *Nucleic Acids Res.*, 31, 30.
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J.; Laine, R., Withers, S. G., 2001, Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate., *Nature*, 412, 835 - 838.
- Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M., 1994, Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Anal. Chem.*, 66, 3281.
- Wallace, S. T., Schroeder, R., 1998, In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics, *Rna-a Publication of the Rna Society*, 4, 112-123.
- Walsh, C.T., 2006, Posttranslational Modifications of Proteins: Expanding Nature's Inventory, Roberts and Co. Publishers, Greenwood Village, CO.
- Wang, K., Marshall, M. K., Garza, G., Pappas, D., 2008, Open Tubular Capillary Cell Affinity Chromatography: Single and Tandem Blood Cell Separation, *Analytical Chemistry*, 80, 2118-2124.
- Weickhardt, C., Moritz, F.; Grotemayer, J., 1996, Time of flight mass spectrometry, State-of-the-art in chemical analysis and molecular science, *Mass Spectrometry Reviews*, 15, 139-162
- Wernette. D. P., Kim, H. K., Liu, J., Swearingen, C. B., Yue, Z., Zavareh, M., Ingram, C. W., Economy, J., Shannon, M. A., Bohn, P. W., Lua, Y., 2007, New Catalytic DNA Biosensors for Trace Contaminants in Water.
- White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., Sullenger, B., 2001, *Mol. Ther.*, 4, 567-573.
- Wibbenmeyer, J. A., Schuck, P., Smith-Gill, S. J., Willson, R. C., 1999, Salt links dominate affinity of antibody HyHEL-5 for lysozyme through enthalpic contributions, *J.Biol. Chem.*, 274, 26838–26842.
- Wiegand, T. W., Williams, P. B., Dreskin, S. C., Jouvin, M. H., Kinet, J. P., Tasset, D., 1996, High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I, *J. Immunol.*, 157, 221-230.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T. *et al.*, 1996, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature*, 379 (6564), 466–9.

- Wilson, C., Nix, J., Szostak, J., 1998, Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot, *Biochemistry*, 37, 14410-14419.
- Wilson, D. S., Szostak, J. W., 1999, In vitro selection of functional nucleic acids, *Annu Rev Biochem*, 68, 611–647.
- Wittmann, C., 2005, Topics in current chemistry, Immobilisation of DNA on chips, I. Springer, vol 260, Berlin Heidelberg New York.
- Wittmann, C., 2006, Topics in current chemistry, Immobilisation of DNA on chips II. Springer, vol 261, Berlin Heidelberg New York.
- Wojciechowski, J., Danley, D., Cooper, J., Yazvenko, N., Taitt, C. R., 2010, Multiplexed Electrochemical Detection of Yersinia Pestis and Staphylococcal Enterotoxin B using an Antibody Microarray, *Sensors*, 10, 3351-3362.
- Wollnik, H., 1993, Time-of-flight mass analyzers, *Mass Spectrometry Reviews*, 12:89-114.
- Wrzesinski, J., Ciesiolka, J., 2005, Characterization of structure and metal ions specificity of Co^{2+} -binding RNA aptamers, *Biochemistry*, 44, 6257-6268.
- Wu, K. J., Stedding, A. and Becker, C. H., 1993, Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7, 142-146.
- Wu, Y., Sefah, K., Liu, H., Wang, R., Tan, W., 2010, DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 5-10.
- Wu, Z. S., Guo, M. M., Zhang, S. B., Chen, C. R., Jiang, J. H., Shen, G. L., Yu, R. Q., 2007, Reusable electrochemical sensing platform for highly sensitive detection of small molecules based on structure switching signaling aptamers, *Anal. Chem*, 79, 2933–2939.
- Wurz, P., Gubler, L., 1996, Fast micro-channelplate detector for particles, *Rev. Sci. Instrum.*, 67, 1790-1793.
- Xavier, K. A., Willson, R. C., 1998, Association and dissociation kinetics of anti-hen egg lysozyme monoclonal antibodies HyHEL-5 and HyHEL-10, *Biophys. J.*, 74, 2036–2045.
- Xiao, Y., Lubin, A. A., Heeger, A. J., Plaxco, K. W., 2005, Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor, *Angew Chem Int Ed.*, 44, 5456–5459.

- Xiao, Y., Piorek, B. D., Plaxco, K. W., Heeger, A. J., 2005, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 17990–17991.
- Xu, D., Yu, X., Liu, Z., He, W., Ma, Z., 2005, Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes, *Anal. Chem.*, 77, 5107–5113
- Xu, D., Han, H., He, W., Liu, Z., Xu, D., Liu, X., 2006, *Electroanalysis*, 18, 1815–1820.
- Xu, Y., Phillips, J. A., Yan, J., Li, Q., Fan, Z. H., Tan, W., 2009, Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells, *Analytical Chemistry*, 81, 7436–7442.
- Xu, Y., Yang, L., Ye, X., He, P., Fang, Y., 2006, An Aptamer-Based Protein Biosensor by Detecting the Amplified Impedance Signal, *Electroanalysis*, 15, 1449–1456.
- Yamamoto, R., Baba, T., Kumar, P. K., 2000, Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1, *Genes Cells*, 5, 389-396.
- Yamamoto-Fujita, R., Kumar, P. K. R., 2005, Aptamer-Derived Nucleic Acid Oligos: Applications to Develop Nucleic Acid Chips to Analyze Proteins and Small Ligands, *Anal. Chem.*, 77, 5460– 5466.
- Yang, X. B., Li, X., Prow, T. W., Reece, L. M., Bassett, S. E., Luxon, B. A., Herzog, N. K., Aronson, J., Shope, R. E., Leary, J. F., Gorenstein, D. G., 2003, Construction and selection of bead bound combinatorial oligonucleoside phosphorothioate and phosphorodithioate aptamer libraries designed for rapid PCR based sequencing, *Nucleic Acids Res.*, 31, 8.
- Yang, Q., Goldstein, I. J., Mei, H. Y., Engelke D. R., 1998, DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 5462-5467.
- Ylera, F., Lurz, R., Erdmann, V. A., Furste, J. P., 2002, *Biochemical and biophysical research communications*, 290, 1583-1588.
- Yost, Y. A., Enke, C. G., 1978, Selective Ion Fragmentation with a Tandem Quadropole Mass Spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2274- 2275.
- Zhu, H., Suter, J. D., White, I. M., Fan, X., 2006, Aptamer Based Microsphere Biosensor for Thrombin Detection, *Sensors*, 6, 785–795.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ülkü GÜLER

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Yılı : 1987

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2001 - 2005 Cumhuriyet Lisesi, ANKARA

Lisans : 2005 - 2010 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, ANKARA

Yüksek Lisans : 2010 - 2012 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü,
Fizikokimya Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi :2010 - Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen
Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya Anabilim Dalı.