

**BIYOTİNLEYİCİ AYIRMA SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI**

Semra Özgün KÖSE

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Haziran 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Semra Özgün KÖSE' nin "**Biyotinleyici ayırma sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları**" başlıklı Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 16/06/2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Rıdvan SAY
Üye : Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
Üye : Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOTİNLEYİCİ AYIRMA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

Semra Özgün KÖSE

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 64 sayfa**

Bu çalışmada; rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) metoduna göre sentezlenen kriyojel kolon aracılığıyla primerlerin 5' ucundan biyotinlenmesi tek basamakta gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; ilk olarak DNA ligaz çapraz bağlı HEMA ve fotosensitif monomer tabanlı monolitik kriyojel kolon geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sentezlenen enzim tabanlı kriyojel kolon sistemi ile Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığına sahip olan primerin 5' ucuna biyotin bağlanarak avidite etkinliği oluşturulmuştur. Bu etkileşimin ispatı, numunelerin mikropilaka okuyucu ile 354 nm' de elde edilen absorbans değerlerinde görülen artış ile yapılmıştır. Tasarlanan KKKA hastalığına sahip olan primerlerin etkinliği ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kanıtlanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında, floresans özelliği gösteren streptavidin çapraz bağlı ve fotostabil Kuantum nanokristaller (QD) oluşturulmuş ve biyotinlenmiş 5'-ssDNA proplar streptavidin-QD platformlara bağlanmıştır. Daha sonra; hastalık tanısı gerçekleştirecek 3'-ssDNA komplementlerinin hibridizasyonuna dayalı floresans değişimleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, DNA Ligaz, Kriyojel, Biyotin, Streptavidin, Kuantum Nanokristal

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF BIOTINYLATED SEPARATION SYSTEMS

Semra Özgün KÖSE

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program**

**Supervisor: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 64 pages**

In this study, biotinylation of primers from 5' end using cryogel column synthesized by ruthenium-based photosensitive cross-linking technique has been realized. For this purpose, firstly, DNA ligase cross-linked HEMA and monolithic photosensitive monomer based cryogel column have been developed and characterized.

In the second part of the study, avidity efficiency has been formed via binding of biotin to 5' end of the primer having Crimean Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) by using synthesized enzyme based cryogel column system. The proof of this interaction has been performed by observation of increase the absorption of the samples at 354 nm using microplate reader. The efficiency of the designed primers having CCHF has been proved by using polymerase chain reaction (PCR).

In the last step of this study, streptavidin cross-linked and photostable Quantum nanocrystals (QDs) having fluorescence property have been formed and biotinylated 5'-ssDNA probes have bound to streptavidin-QD platforms. Then, the fluorescence changes based on the hybridization of 3'-ssDNA complements which cause diagnosis of disease have been investigated.

Keywords: Crimean Congo Hemorrhagic Fever, DNA Ligase, Cryogel, Biotin, Streptavidin, Quantum Nanocrystal

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen “DNA Biyotinleyici Ligaz, Streptavidin ve Protein G tabanlı Ayırma, Zenginleştirme Kitleri ve Materyallerinin Geliştirilmesi” başlıklı 1130016 nolu TÜBİTAK 1511 kodlu proje çerçevesinde çalışmalarımı yürüttüğüm Bionkit LTD. ŞTİ.’ ne ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’ ne,

Tez çalışmalarım boyunca ilgisi ve yardımlarıyla yanımda olan, büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, bana yol gösteren ve her zaman beni destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Rıdvan SAY’ a,

Deneysel çalışmalarım esnasında teorik ve pratik her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Arzu ERSÖZ’ e, Doç. Dr. Sibel Emir DİLTEMİZ’ e, Doç. Dr. Filiz YILMAZ’ a, Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ’ e, Arş. Gör. Özlem Biçen ÜNLÜER’ e,

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi’ ne ait kontrol DNA’ ların teminindeki destekleri için Prof. Dr. Zati VATANSEVER’ e,

Çalışmalarım boyunca her zaman destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarıma,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, saygı ve sevgilerini hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşım Rüstem KEÇİLİ’ ye,

PCR çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Halil İbrahim AKBAŞ ve Derya KARAARSLAN’ a,

Maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, ilgilerini, sevgilerini, desteklerini benden hiç esirgemeyen, her zaman bana sonsuz güvenen çok değerli Ailem’ e,

Ve en güzel anılarımı paylaştığım, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, yüreklendiren, hayatımın aşkı, sevgili eşim Ender KÖSE’ ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Semra Özgün KÖSE

Haziran 2015

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kırım-kongo kanamalı ateşi hastalığı.....	1
1.1.1. Türkiye’ deki Yayılımı ve Salgın Lokasyonları	4
1.1.2. KKKA Virüsünün Yapısı ve Moleküler Biyolojisi.....	5
1.2. Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi	7
1.3. Enzimler	7
1.3.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	9
1.3.2. Enzim Aktiflik Birimleri	10
1.3.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	11
1.3.4. Kimyasal Yöntemler	12
1.3.5. Fiziksel Yöntemler	14
1.3.6. Makrogözenekli Kriyojeller	17
1.3.7. DNA Ligaz	20
1.4. Biotin	24

1.5.	Streptavidin	25
1.6.	Kuantum nanokristaller (QD).....	26
2.	MATERYAL VE METOT	30
2.1.	Materyal.....	30
2.1.1.	Kullanılan kimyasallar	30
2.1.2.	Kullanılan cihazlar	30
2.2.	Metot	31
2.2.1.	Fotosensitif Monomer Sentezi	31
2.2.2.	MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys Sentezi	33
2.2.3.	DNA Ligaz Çapraz Bağlı Fotosensitif Kriyojel Kolon Sentezi	34
2.2.4.	Karakterizasyon Çalışmaları	34
2.2.5.	Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi	35
2.2.6.	Primerlerin Hazırlanışı	36
2.2.7.	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	36
2.2.8.	Agaroz Jelde Görüntüleme.....	36
2.2.9.	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Sahip Primerin 5' Ucundan Biyotinlenmesi	38
2.2.10.	Kuantum Nanokristallerle Floresans Ölçümleri.....	39
3.	BULGULAR	40
3.1.	DNA Ligaz Çapraz Bağlı Fotosensitif Kriyojel Kolon Materyalinin p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve poli(HEMA) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu	40
3.1.1.	Yüzey Morfolojisi	40
3.1.2.	Yüzey Alanı Ölçümü.....	41
3.1.3.	Şişme Testi	41
3.1.4.	FT-IR Analizleri	42
3.1.5.	Sıkıştırma Testi	42

3.1.6.	Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi.....	42
3.1.7.	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Sonucu Elde Edilen Agaroz Jel Görüntüsü.....	44
3.1.8.	Kırım Kongo-Kanamalı Ateşi Teşhisi	45
3.1.9.	Nanokristallerle Yapılan KKKA Hastalığının Teşhisi.....	52
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	54
	KAYNAKLAR	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. KKKA Hastalığı'nın Dünya'da Yayılışı	2
Şekil 1.2. KKKA hastasına ait kanamalı bir kol	4
Şekil 1.3. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin seyri.....	5
Şekil 1.4. Bunyavirüslerin şematik yapısı	6
Şekil 1.5. Enzimlerin genel çalışma prensibi.....	9
Şekil 1.6. Anahtar-kilit modeli	9
Şekil 1.7. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	12
Şekil 1.8. Çapraz bağlanma modeli	13
Şekil 1.9. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi.....	19
Şekil 1.10. DNA ligaz enziminin kristal yapısı	20
Şekil 1.11. DNA ligazın enzim reaksiyonunun adımları	21
Şekil 1.12. DNA ligazın birleştirme mekanizması	23
Şekil 1.13. Biotinin molekül yapısı	24
Şekil 1.14. Biotin-streptavidin etkileşimi	25
Şekil 1.15. Atomik yapıya sahip kuvantum nanokristaller	27
Şekil 1.16. Üstte küçük (mavi) parçacıklardan büyük (kırmızı) parçacıklara kadar dizilmiş CdSe nanokristallerin (boyutları 1-10 nm arasında) yakın-ultraviyole lamba altındaki emisyon renkleri. Alta; CdSe nanokristallerinin fotoluminesans spektrumları	27
Şekil 1.17. Kuvantum nanokristallerin boyut etkisi	28
Şekil 1.18. CdSe/ZnS yapısına ait kristal şekli	29
Şekil 2.1. N-metakriloil amino-(L)- tirozin sentezi	32
Şekil 2.2. Diklorobis(2-2'-bipiridil)(MATyr) ₂ -Rutenyum (II) molekül yapısı	32
Şekil 2.3. Klorobis(2-2'-bipiridil)(MATyr) ₂ -Rutenyum (II) molekül yapısı.....	33

Şekil 2.4. MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys sentezinin molekül yapısının gösterimi	33
Şekil 2.5. DNA Ligaz çapraz bağlı kriyojel kolon ile KKKA-F primerinin biyotinlenmesi	38
Şekil 2.6. Kuantum nanokristal-[MACys-Ru(bipyr) ₂ -MACys]-Streptavidin-Biyotinlenmiş KKKA-F yapısı	39
Şekil 3.1. Boş poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü	40
Şekil 3.2. DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun SEM görüntüsü	41
Şekil 3.3. DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun FT-IR spektrumu	42
Şekil 3.4. DNA ligazın CD spektrumu	43
Şekil 3.5. Streptavidinin CD spektrumu	43
Şekil 3.6. RT-PCR sonrasında elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Marker (Guangzhou Geneshun Biotech Ltd, 100bp Ladder plus, 1, 2, 3, 4 farklı primerler ile 5 tasarladığımız primerler ile KKKA cDNA' sını kullanarak hazırlanan PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü)	44
Şekil 3.7. KKKA-F primerine biyotinin 5' ucundan takılmasının 354 nm' deki absorbans değerlerinin grafiği	45
Şekil 3.8. 1 ppm Kuantum nanokristalin floresans spektrumu Ex:480 nm	46
Şekil 3.9. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] floresans spektrumu Ex:480 nm	46
Şekil 3.10. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin floresans spektrumu Ex:480 nm	47
Şekil 3.11. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm	47

Şekil 3.12. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] – streptavidin 2,5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm.....	48
Şekil 3.13. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] – streptavidin 1 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm.....	48
Şekil 3.14. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] – streptavidin 0,05 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm	49
Şekil 3.15. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] – streptavidin 0,01 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm	49
Şekil 3.16. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm.....	50
Şekil 3.17. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 2,5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm.....	50
Şekil 3.18. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 1 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm.....	51
Şekil 3.19. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 0,05 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm	51
Şekil 3.20. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil) ₂ -MACys] - streptavidin 0,01 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm	52
Şekil 3.21. Stern-Volmer grafiği.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. KKKA vakalarının % ölüm (mortalite) oranları.....	3
Çizelge 1.2. Enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler.....	15

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	:	Amonyum Persülfat
MATyr	:	Metakriloil amido tirozin
MACys	:	Metakriloil amido sistein
HEMA	:	Hidroksietilmetakrilat
MBAAm	:	N, N'- Metilen bisakrilamit
kDa	:	Kilodalton
TEMED	:	Tetraetilmetilendiamin
U	:	Enzim Ünitesi
FT-IR	:	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
BET	:	Gözenek boyutu analizörü
ssDNA	:	Tek zincirli Deoksiribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik Asit
RT-PCR	:	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
QD	:	Kuantum nanokristal
KKKA	:	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
F	:	Forward
R	:	Reverse
cDNA	:	Komplementer DNA
dNTP	:	Deoksiribonükleotit Trifosfat
rpm	:	Dakikada döndürme hızı
TAE	:	Tris-Asetik asit-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
bp	:	Baz çifti
Gn, Gc	:	Glikoproteinler

1. GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Hyalomma cinsine ait kenelerin ısırması ya da viremi döneminde olan sığır, koyun, keçi ve deve gibi evcil hayvanlara veya insana ait kan, enfekte doku ve vücut sekresyonları ile temas sonucu bulaşan zoonoz viral bir hastalıktır. İnsanlarda ateş, kanama, vasküler hasar ve % 3-30 arasında değişen ölüm oranı ile ortaya çıkan klinik bir semptomdur [1-3].

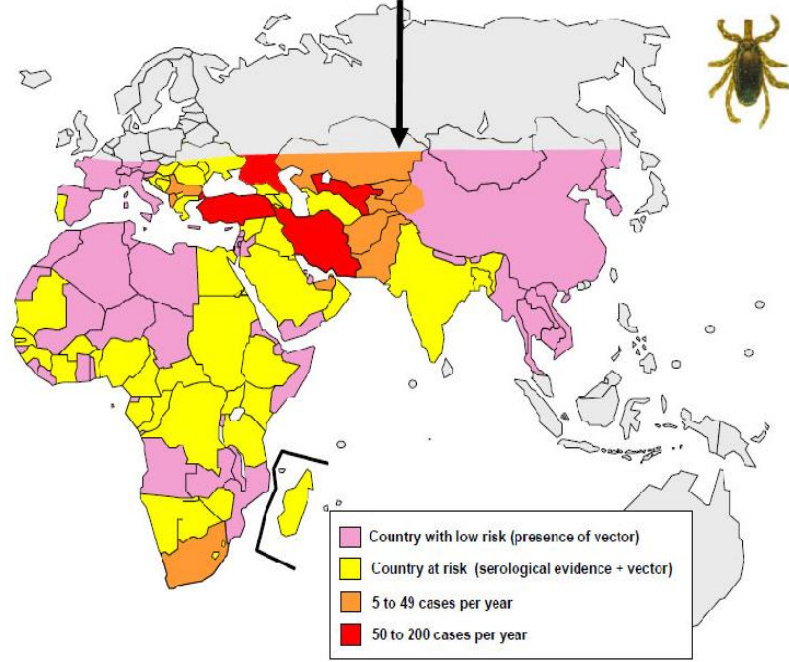
KKKA hastalığına neden olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV), kanamalı virüsler arasında yer alır. Kanamalı virüsler 4 aileye ayrılır. Bunlar; Flaviviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae ve Filoviridae' dir [4]. Bunyaviridae ailesi birbirinden farklı 5 cins içermektedir. Bunlar; *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus*'lerdir [5].

Nairovirus' ler; KKKA virüsü, Dera Ghazi Khan virüsü, Hughes virüs grubu, Nairobi Sheep Disease (NSD) virüs grubu, Qalyup virüs grubu, Sakhalin virüs grubu ve Thaifora virüs grubu [6] olmak üzere 7 farklı serogruba ayrılmaktadır. Bunlar da 34 çeşit virüsü kapsamaktadır [7]. Bu *Nairovirus*' lerden, KKKA virüsü hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaya rağmen ciddi belirtiler göstermemektedir ancak insanlarda ölümlerle sonuçlanabilen yüksek semptomlar gösterir [6]. Bilinen sadece 3 virüs hastalığına neden olur. Bunlar; KKKA, Dugbe virüs ve Nairobi'dir [8].

1.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı

KKKA hastalığı ilk kez II. Dünya Savaşı yıllarında (1944-1945), Batı Kırım steplerinde çoğunlukla Sovyet askerleri arasında ve ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyada görülmektedir (Şekil 1.1) [1]. İlk zamanlarda Kırım Hemorajik Ateşi adı verilen, hastalık için endemik bölge Balkan yarımadası olup Afrika, Asya, Güneydoğu, Avrupa ve Ortadoğuda 30 ülkenin üzerinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Şekil 1.1). [9-11].

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞININ COĞRAFİK DAĞILIMI



Şekil 1.1. KKKA Hastalığı'nın Dünya'da Yayılışı

Diğer taraftan, hastalık Afrika, Batı Asya, Ortadoğu ve Güney Avrupa'da yaygın olarak görülmektedir [12]. Ayrıca Kazakistan, Özbekistan, Dubai, Makedonya, Yunanistan, Arap Yarımadası, Pakistan, Irak, Afganistan, Kuveyt, Rusya, Yugoslavya, İran, Kosova, Makedonya, Bulgaristan, Çin ve Moritanya' da KKKA salgınları bildirilmiştir.

Hemorajik vakaların Afrika' da ilk kez tanınması 1960' lı yıllarda olduktan sonra Kongo' ya ek olarak Burkina, Faso, Tanzanya ve Senegal' den de vakalar bildirilmiştir. En çok vaka bildirimini yapılan Afrika Ülkeleri' nden olan Güney Afrika' da 1981 yılına kadar 123 KKHA vakası tanımlanmış, bunlardan 27'si, (%22) mortalite ile seyretmiştir [13].

Son yıllarda İran' da KKKA vakalarında artma olmuştur. 2000-2006 yılları arasında 873 şüpheliden 341 vakanın KKKA virüsü taşıdığı doğrulanmış ve doğrulanan 341 hastadan 57' si ölmüştür. 2002 yılında ise enfekte olmuş 9 İran' lı hastadan KKKA virüsü izole edilmiş ve genetik olarak incelenmiştir [14,15].

Dünyada görülen KKKA vakalarının % ölüm (mortalite) oranları aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.1) [1,9,13-19].

Çizelge 1.1. KKKA vakalarının % ölüm (mortalite) oranları

Ülke Adı	Tarih	Olgu Sayısı	% Ölüm Oranı
Sovyetler Birliği	1944-1945	200 ve üzeri	?
Bulgaristan	1953-1974	1105	%17
	1975-1996	279	%11
	1997-2003	124	%22
Çin	1965-1994	260	54 (%21)
	1997	26	5 (%20)
Afrika	1981	123	27 (%22)
	1984-1994	48	%24
Pakistan	1994	7	%28.5
	2002	200 ve üzeri	En az 2
Kosova	2001	69	6 (%8.6)
Birleşik Arap Emirlikleri	1979-1994	63	%15.5
	1994-1995	35	22 (%62)
Suudi Arabistan	1979	5	%40
	1989-1990	40	12 (%30)
İran	2000-2006	341	%16.7
Rusya	1999	65	6 (%9)
Irak	1979	10	7 (%70)
Türkiye	2002-2006	1103	59 (%5.4)

1.1.1. Türkiye’deki Yayılmı ve Salgın Lokasyonları

Türkiye’de ilk kez 2002 yılının bahar ve yaz aylarında Tokat başta olmak üzere ülkemizin bazı illerinde görülmüş ve yapılan çalışmalar sonucu hastalığın KKKA olduğu saptanmıştır [20,21]. Bu yılda özellikle Tokat SSK Hastanesi’nde bir hemşirenin ölümünden sonra spekülasyonlar üzerine başlatılan araştırmalar hastalığın tanınmasını sağlamıştır [22].

Başta Karadeniz ve Orta Anadolu olmak üzere Sivas, Çorum, Amasya, Yozgat, Gümüşhane, Erzurum, Erzincan, Kastamonu, Bolu, Ankara, Kars gibi toplamda yaklaşık 22 ilde vakaların ortaya çıkması ile KKKA hastalığının görüldüğü alanlar daha da genişletilmiştir [23].

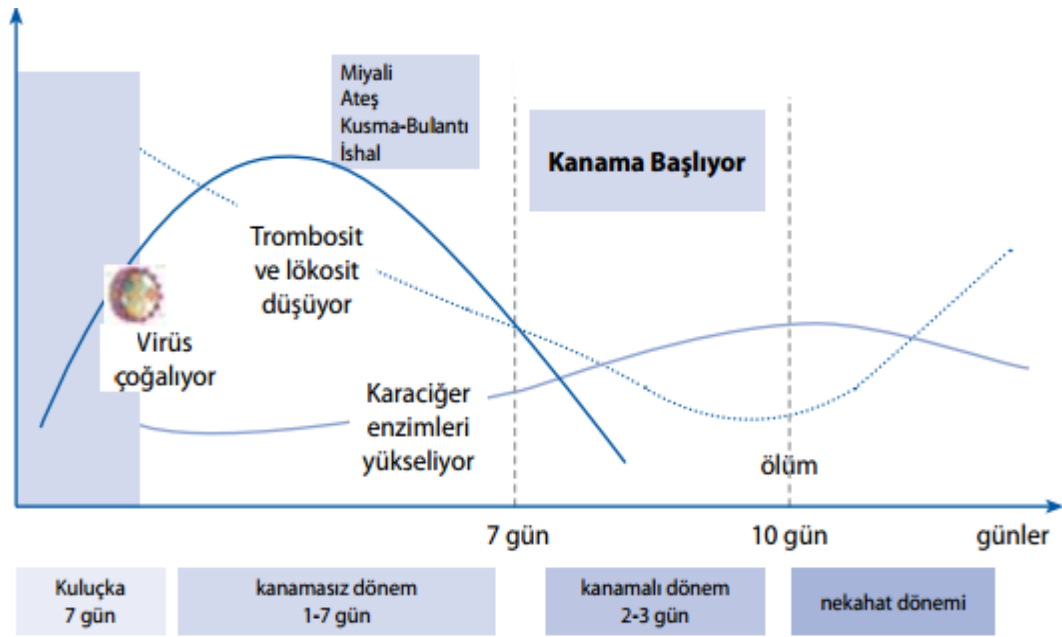
Virüs, ilk enfekte ettiği bölgeden bölgesel lenf nodlarına, karaciğer ve dalağa yayılır. Bu bölgelerde, virüs, doku makrofajlarını ve dendritik hücreleri enfekte eder (Şekil 1.2). Çözünür faktörler, virüsün enfekte ettiği monosit ve makrofajlardan salınır. Lokal ve sistemik olarak hareket eder. Virüsün enfekte ettiği bu hücrelerden salınan kemokinler makrofajları enfeksiyon bölgesine toplar [9].



Şekil 1.2. KKKA hastasına ait kanamalı bir kol

KKKA hastalığında inkübasyon süresinin ardından grip benzeri semptomlar görülmeye başlar. Bunlar yaklaşık bir hafta sonra azalır. Belirtileri, ateş, halsizlik, baş ağrısı, kırıklık, duygu durumunda dalgalanma, zihinsel karmaşa, burun kanaması, dışkıda ve idrarda kanama, yüz ve göğüste kırmızı döküntüler,

gövde, kol ve bacaklarda morluklar görülür (Şekil 1.2). Bunlar kanama pıhtılaşma bozukluğuna bağlıdır. Kanama yani hemoraji belirtileri rahatsızlığın ilk 3-5 gününde görülmeye başlar. Daha da ilerleyerek, akciğer, karaciğer (ağrılı ve büyük karaciğer), böbrek yetmezliği ile ölüm oluşabilir. Ani ateş yükselmesi (39-41 °C), baş ağrısı, kas ağrıları ve baş dönmesi ile karakterizedir. Ateş ortalama 4-5 gün sürer. Kanamalı dönem kısadır, hızlı gelişir ve genellikle hastalığın 3 ve 5. günlerinde başlar. Kanama, hastalığın büyük çoğunluğunda hastalığın başlamasından sonra 5-7 gün içinde ve hastanede yattıkları sırada gelişir. Ateş yüksekliği ile kanamanın başlaması arasında ilişki yoktur (Şekil 1.3) [1].



Şekil 1.3. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin seyri

1.1.2. KKKA Virüsünün Yapısı ve Moleküler Biyolojisi

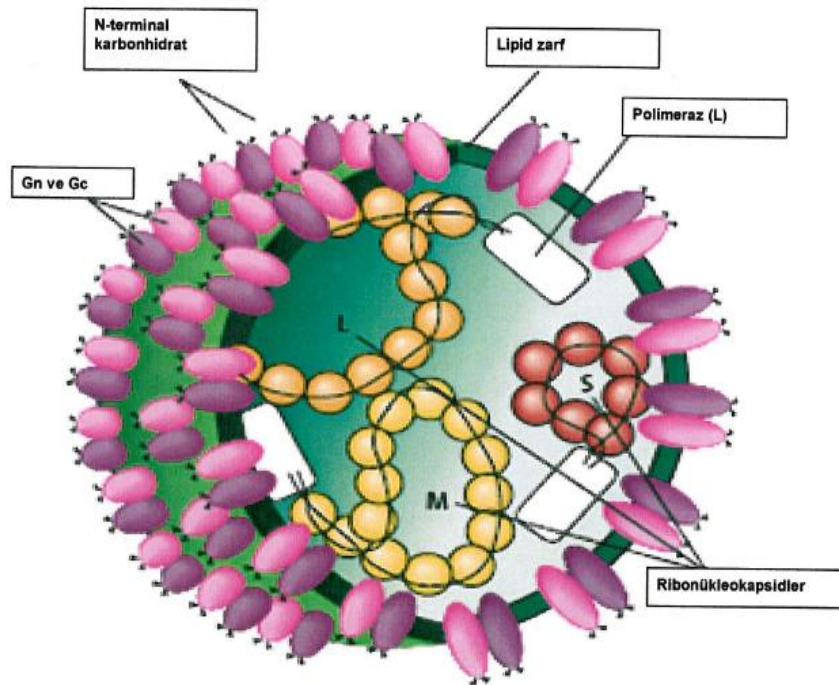
KKKA virüsünün yapısı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Murphy ve arkadaşları ilk olarak KKKA virüsünün morfolojisini yeni doğan enfekte farelerin beyinlerinde tanımlamıştır [24]. Genel olarak KKKA virüsü ve *Nairovirüslerin* temel özellikleri olan morfogenez, üreme siklusu ve fizikokimyasal özelliklerinin *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyeleri gibi oldukları bilinmektedir.

Nairovirüsler dış ortama dayanıksızdır ve konakçı dışında yaşayamazlar. Bu virüsler 56 °C’ de 30 dakikada inaktif olurken, kanda 40 °C’ de 10 gün

yaşayabilirler. Virüs %1 hipoklorit ve % 2 gluteraldehite duyarlıdır. Ultraviyole ışınları ile hızla inaktif olurlar [25].

Bunyavirüsler, zarflı, negatif kutuplu, 3 parçalı, tek zincirli RNA genomuna sahiptirler (Şekil 1.4). Üç genom parçası, 4 yapısal proteinle şifrelenmiştir [28]. RNA bağımlı RNA polimeraz (L protein) L (Large) segmenti tarafından, glikoproteinler (GN, GC), M (Medium) segmenti tarafından, nükleokapsit proteini (NP) ise, S (Small) segmenti tarafından şifrelenmiştir [26]. KKKA virüsünde, yaklaşık 45 kDa ağırlığında, GN ve GC' den ayrı olarak üçüncü bir yapısal glikoprotein belirlenmiştir. Fakat bu glikoproteinin şifrelenme stratejisi henüz analiz edilememiştir [27]. Üç RNA segmentinin hepsinin 3' ucundaki ilk 8 ile 13 nükleotitlik dizi korunmuş dizidir, 5' ucundaki komplementer olan konsensus dizisiyle birlikte, segmentlerin sonu nonkovalent olarak bağlıdır, dolayısıyla RNA, nükleokapsit içerisinde serbest bağlı dairesel konfigürasyondadır [28].

KKKA virüsünün, M segmentinin L ve S segmentlerinin uçlarına çok fazla komplementer olduğu gösterilmiştir. Bunların rolü RNA polimerazın bağlanması için önemli cis-acting elementler olarak kuvvetlendirilmiştir (Şekil 1.4) [29].



Şekil 1.4. Bunyavirüslerin şematik yapısı

1.2. Rutenyum Tabanlı Amino Asit Monomerleriyle Fotosensitif Çapraz Bağlama Ve Anadoluca Yöntemi

Yaşam bilimleri ve biyoteknolojide kullanılmak üzere geliştiren ANADOLUCA konsept yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach), rutenyum tabanlı, fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezleri; fotosensitif proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanması işlemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için istenen mikro veya nanoyapılar entegre edilebilir. Protokol, birçok proteinde yer alan sistein, triptofan ve tirozin amino asitlerine rutenyum tabanlı amino asit monomerler tarafından elektron kuşaklar atılarak sağlam çapraz bağlı konjugasyon işlemleri ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemde fotosensitif monomerler, kovalent ve çapraz bağlanma işlemi nedeniyle doğru antikor oryantasyonu için yönlendirme sağlanmakta ve denatürasyon engellenmektedir.

ANADOLUCA yöntemi, silika materyallere, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, karbon nanotüplere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeylerine protein entegrasyonu yanı sıra proteinimsi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında ve ilgili yüzeylerle entegrasyonuna da uygulanabilir.

ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi olanığı), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nano-biyokonjugatların oluşturulduğu bir yöntemdir.

Bu yöntem ile multifonksiyonel, biyouyumlu, stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugasyon işlemleri sağladığı gibi kataliz ve tayin amaçlı da kullanılabilir. Oluşan nano-biyokonjugatlarda proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonları etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsız bir yöntemdir [30].

1.3. Enzimler

Enzimler canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve

hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden çok yüksek verimlerle ürün elde edilmesini sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler [31].

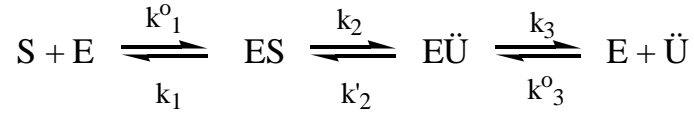
Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını yaklaşık 10^{20} ye kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^4 kadar arttırabilmektedir.

Enzimler, oldukça spesifik maddelerdir. Enzimle ilişkili olan substrata çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoisomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda yüzlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir [32,33].

Bazı enzimler katalizleme reaksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken bazıları da protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar, “kofaktör” adı verilen bu gruplar bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Koenzimle birlikte olan enzim molekülüne “haloenzim”, kofaktörsüz olan protein kısmına ise “apoenzim” denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgülüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar [33].

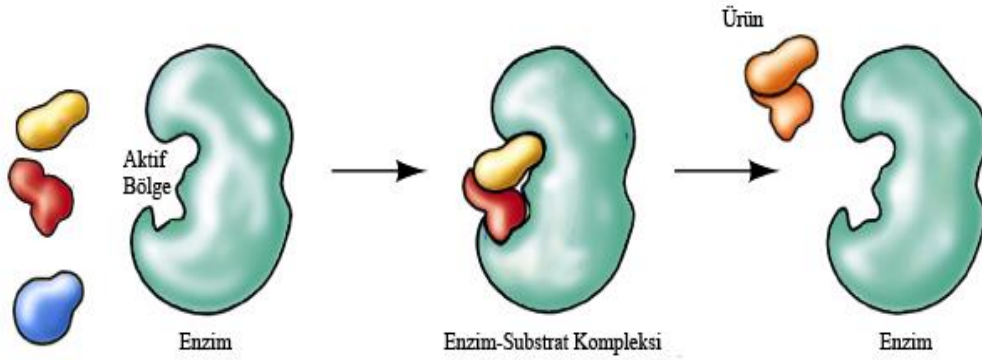
Enzimler sadece canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada faaliyet gösterir. Bu tip enzimlere “intraselüler” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da “ekstraselüler” (hücre dışı) enzimler denir.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere “substrat” denir. Substratlar enzimde “aktif merkez” denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşan bu aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur. Aktif bölge substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Substrat ürün yapısına çevrilir ve sonra enzim üründen ayrılır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Enzimlerin genel çalışma prensibi

Alman Kimyacı Emil Fischer 1894 yılında enzimin aktif bölgesiyle substratın oluşturduğu spesifik Enzim-Substrat kompleksini Anahtar-Kilit ilişkisi ile tasvir etmiştir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Anahtar-kilit modeli

1.3.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler kullandıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyon tipine göre adlandırılmaktadır. Enzimin etkilediği substrat ve reaksiyon tipi '-az' eki getirilerek adlandırılmıştır. Ancak son zamanlarda bu şekilde adlandırılmaları önemini kaybetmiştir. Yeni keşfedilen ve sayıları günden güne artan enzimler Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından yeni bir adlandırılmaya ve sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur.

Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizler. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Dehidrojenazlar ve redüktazlar bu gruptandır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler. Alkol- dehidrojenaz, redüktaz, tirozinaz bu grubun örnekleridir.

Transferazlar: Verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Amino-transferazlar, CoA-transferazlar bu grubun örnekleridir.

Hidrolazlar: Ester, glikozid, peptid, C-N, C-C, C-X, P-N, asit anhidrit bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, fosfatazlar bu grubun örnekleridir.

Liyazlar: Çift bağ oluşumunu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

İzomerazlar: Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizleyen enzimlerdir. Aminoasit rasemazlar, glukozfosfat-izomerazlar, yağ asidi cis-trans izomerazlar, fosfogluktomutazlar bu grubun örnekleridir.

Ligazlar: ATP' nin AMP ve P_{Pi}' ye parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açılCoA - sentetazlar bu grubun örnekleridir [34].

1.3.2. Enzim Aktiflik Birimleri

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktarlarının ölçümü çok zordur. Ancak aktiviteleri ölçülebilir. Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir.

Enzim ünitesi: Optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dakikada 1 µmol substratın dönüşümünü (veya 1 µmol ürünün oluşumunu) katalizleyen enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite: Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktiviteden yola çıkarak enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür.

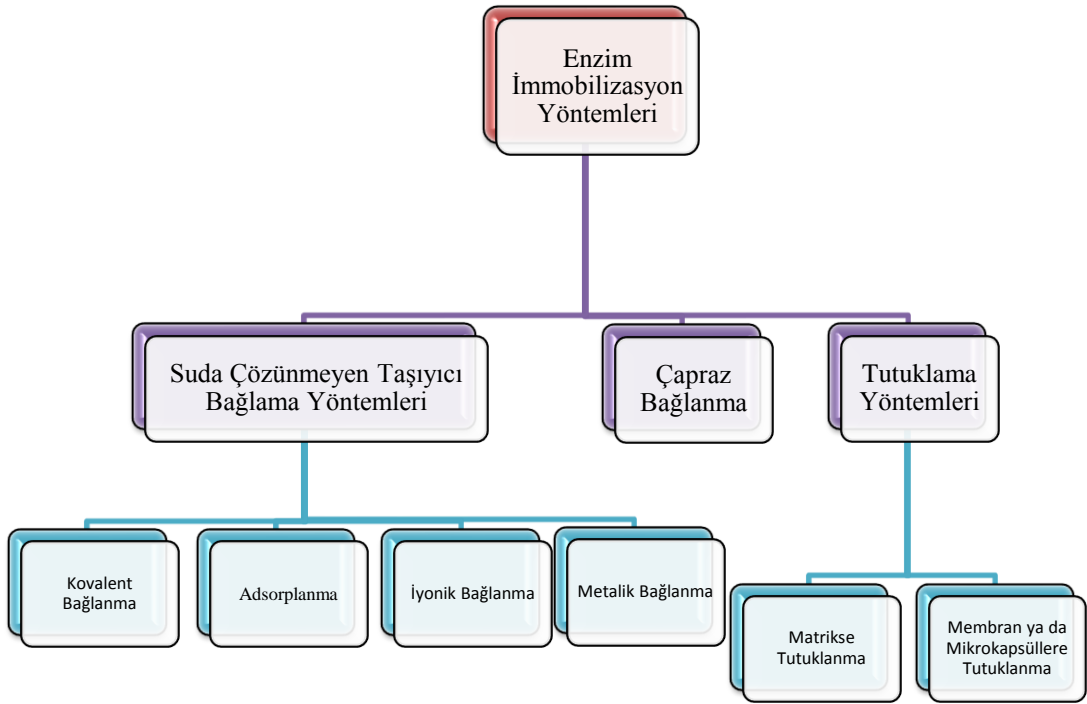
Spesifik aktivite kavramı özellikle bir enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan bir ölçüttür. Örneğin, ham özütlerdeki yüksek protein derişiminin ancak küçük bir kısmını ilgilendığımız enzime ait protein oluşturmaktadır. Bu nedenle ölçüm yapıldığında oldukça yüksek bir enzim ünitesi elde etmek olasıdır, fakat bu durumda enzimin spesifik aktivitesi düşük olacaktır. Enzimi saflaştırdıkça çözeltilerdeki enzim ünitesi sabit kalırken, protein derişimi düşeceği için spesifik aktivite yükselecektir. Enzim en yüksek saflığa eriştiğinde spesifik aktivite sabit bir değere ulaşacaktır.

Katal: Enzim aktivitesi birimi olarak ünite terimi günümüzde yaygın olarak kullanılmakla beraber, Uluslararası Biyokimya Birliği, Enzim Alt Komisyonu tarafından önerilmiş bir birim de katal (Kat)' dır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Katal, tanımından da anlaşılacağı gibi, büyük ölçekli bir birimdir ve bu nedenle aktiviteleri tanımlamak için nanokatal ve pikokatal birimleri çok daha kullanışlıdır.

Turnover Sayısı (Moleküler Aktivite): Optimum koşullarda, bir saniyede bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısıdır [35].

1.3.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler kimyasal ve fiziksel alıkonma olarak iki ana başlık altında incelenebilir. Kimyasal immobilizasyon çapraz bağlanma ve suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanma olarak, fiziksel bağlanma ise tutuklanma yöntemleri olarak ayrılır. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 1.7' deki gibi yapılabilir.



Şekil 1.7. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.3.4. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [36]. Kimyasal yöntemlerle immobilizasyonda, enzimin çok kararlı olması ve destek maddesinin dayanıklı olması gibi avantajlar vardır. Ancak immobilizasyon veriminin sınırlı olması, özel reaksiyon şartları gerektirmesi, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanması için aktivasyon işlemini gerektirmesi gibi sorunlar da söz konusudur [37].

Proteinlerin kovalent bağların oluşumunu temel alan immobilizasyonu en yaygın kullanılanlardandır. Bu metodun bir avantajı, enzim ile destek arasındaki bağların güçlü doğası sayesinde kullanıldıklarında enzimlerin çözeltiye karışmamalarıdır. Fakat, yüksek bağlı enzim aktivitesine ulaşmak için, katalik aktivite için esansiyel olan amino asit uçlarının destek ile enzim arasındaki kovalent bağda yer almaması gerekir. Bazı durumlarda bu şartı sağlamak oldukça zor olmaktadır. Aktivite verimini bazen artıran basit bir prosedür de, substrat

analoglarının varlığında eşleşme reaksiyonunu gerçekleştirmektedir [38]. İmmobilizasyon için kovalent metotlar, enzimin üründe kesinlikle bulunmamasını gerektiren durumlarda kullanılmaktadırlar. İmmobilizasyon için çok sayıda ticari destekler vardır. Her durumda en iyisi, katalizin ilgili özelliklerini ve kullanım amacını göz önünde bulundurarak seçim yapmaktır. Ancak, genellikle birden fazla yaklaşım denemek ve özel durum için belli bir metod uydurmak gereklidir [39,40].

1.3.4.1. Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyon

Taşıyıcı destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır [37]. Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda eğer taşıyıcı destek maddesi aktif değilse önce destek maddesi aktifleştirilir, daha sonra da enzimin kovalent bağlanması gerçekleştirilir [36].

1.3.4.2. Çapraz Bağlanma

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zordur (Şekil 1.8) [41].



Şekil 1.8. Çapraz bağlanma modeli

Enzim aktifliği, reaksiyon süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu metodun en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu metodun dezavantajı ise yüksek aktivlik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır [42].

1.3.5. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu, v.b) enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Esas itibariyle fiziksel immobilizasyon yöntemleri tamamen tersinirdir. Bununla birlikte çoğu özel örneklerde göz ardı edilemeyecek kadar tersinmez bağ oluşumları da gözlenir. Fiziksel yöntemler adsorpsiyon ve hapsetme ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır [42].

1.3.5.1. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon

Enzimin taşıyıcı destek üzerine fiziksel adsorpsiyonu, geniş uygulama alanı olan basit bir immobilizasyon yöntemidir [43]. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu katı destek taşıyıcı üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyonu sağlayan kuvvetler; hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. Adsorpsiyon yönteminde uygun bir çözelti içinde çözülmüş halde bulunan enzim, destek ile belli bir süre etkileştirilerek enzimin desteğe tutturulması sağlanır. İmmobilize enzimde hemen hemen hiçbir kimyasal değişiklik olmaz. Çünkü destek materyali ile kimyasal bir tepkime olmamaktadır. Etkin bir immobilizasyon işlemi için, sıcaklık, adsorbanın miktarı, enzim derişimi, iyonik şiddet, pH ve çözücü karakteri gibi değişkenlere bağlıdır. Adsorpsiyon ortamının koşulları, enzimin fizyolojik koşullarına çok yakın olarak

düzenlendiğinde, aktivite kaybı oldukça düşüktür. Bu avantajların yanında optimum koşulların sağlanma güçlüğü ve enzimle destek arasında zayıf bir çekim varsa enzimin desorpsiyonu ile ürün kirlenmesi gibi dezavantajlar da söz konusu olabilir. Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan adsorbanslar; anyon ve katyon değiştiricili reçineler, aktif karbon, sentetik ve doğal polimerler, silikajel, nişasta, killer, alümina, bentonit, seramikler ve gözenekli camlardır [44].

1.3.5.2. Hapsetme ile İmmobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir [45]. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir [36]. Bu yöntem çok kolay uygulanabilen fiziksel bir yöntemdir. Kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcılara ihtiyaç yoktur. Ancak enzimin immobilizasyon işleminde sırasında inaktive olabilmesi gibi sorunlar olabilir. Enzim hapsetme yöntemi için organik ve anorganik yapıya sahip birçok taşıyıcı destek maddesi kullanılır. Bu taşıyıcılar partikül, tüp, membran ve fiber şeklinde olabilir. Çizelge 1.2’ de enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler

Doğal Destek Maddeleri	Sentetik Destek Maddeleri
Polisakkarit kökenliler <ul style="list-style-type: none"> - Selüloz - Aljinat - Karragenan 	Poliakrilatlar Polistiren Vinil ve alil polimerler Poliamitler
Protein Kökenliler <ul style="list-style-type: none"> - Kollajen 	Maleik andrit bazlı kopolimerler

Enzim hapsedilmesi için taşıyıcı destek maddesi seçilirken çeşitli faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir. Bunlar; fiziksel form, sertlik ve dayanıklılık gibi mekanik özellikler, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı direnç, hidrofilik-hidrofobik uç oranı, geçirgenlik, yüzey alanı, maliyet ve kolay bulunabilirliktir. Hapsetme yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

1.3.5.3. Mikrokapsül ile Hapsetme Yöntemi

Bu yöntemde enzim molekülleri 10-1000 µm çaplı küçük yarı geçirgen membranlara hapsedilir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Enzimlerin mikrokapsülleme için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur.

Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emilmesidir.

Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsülleme olur. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [46]. Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunun olasılığını artırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.

1.3.5.4. Kafes Tipi Hapsetme Yöntemi

Kafes tipi hapsetme yöntemi, çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer ya da polimer çözeltilerine uygun bir kimyasal başlatıcı, UV veya gama-ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur. Enzim

molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün sürekli kafes içine giriş-çıkış yapabilir. Enzim kimyasal değişime uğramaz. Ayrıca bu yöntemde farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevleri hazırlanabilir. Jelatinimsi yapıya sahip enzim türevleri, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolamasını sağlar. Çapraz bağlı polimer oluşturularak enzim hapsedilmesinde en çok kullanılan polimer, N,N-metilen-bis-akrilamit ile çapraz bağlanarak oluşturulan poliakrilamittir [47].

Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir [45, 48, 49]

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifliğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.
- Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
- Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.

Metodun dezavantajları ise;

- Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması,
- Küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve
- Makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesidir.

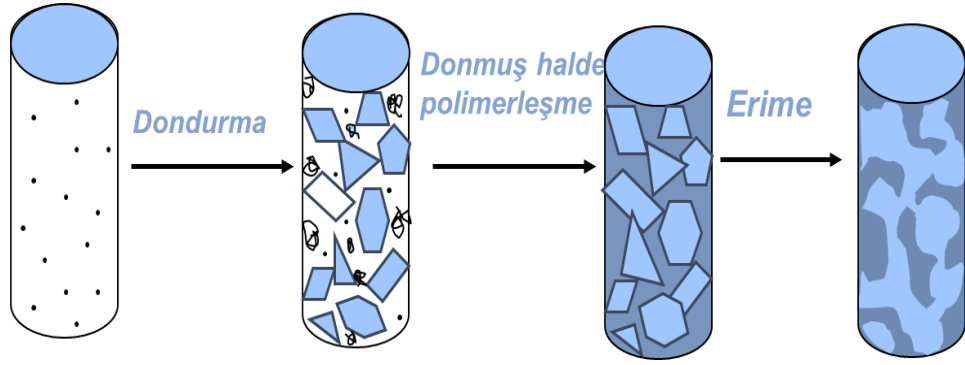
1.3.6. Makrogözenekli Kriyojeller

“Jel” adı altında toplanan polimerik malzemeler polimer-immobilize çözücü sistemleridir. Bu malzemelerde makromoleküller 3B ağ yapısı oluşturacak şekilde birbirine bağlanmış durumdadır. Jel morfolojisi (homo- veya heterofaz) jel hazırlama yöntemine; bağların yapısı ise polimerlerin kimyasal özelliğine bağlıdır. 3B-ağ yapısı içerisinde immobilize olan çözücünün rolü çok önemlidir [50].

Çözücü sıkı polimer yapısının oluşmasına izin vermemekte ve sistemin çökmesini önlemektedir. Jeller, akış ve yıkılma olmaksızın tersinir deformasyonlara dayanabilen fiziksel malzemelerdir. Polimerik ağ yapısında bulunan moleküllerarası bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılır: kimyasal ve fiziksel jeller [51].

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere (veya süpermakrogözeneklere) sahiptir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktır. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plasmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin (*E. coli*) kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matris olarak kullanılmaktadır. Polimerik jellerin geniş spektrumda kullanım olanağı bazı gereksinimlere sebep olmaktadır. Bu gereksinimler, biyolojik uygulamalar için yeni nesil jel malzemelerin geliştirilmesini ve üretimini tetiklemektedir. Biyoteknolojide uygulanma potansiyeli olan polimerik jellerden biri de kriyojellerdir. Kriyojeller, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip monomer çözeltilerinin donma noktalarında altında gerçekleştirilen kriyojenik uygulama yöntemi ile hazırlanmaktadır. Kriyojeller, ilk olarak 1960' lı yıllarda rapor edilmiş ve büyük ilgi görmüştür. Bu malzemelerin biyomedikal ve biyoteknoloji potansiyelleri ise yeni keşfedilmiştir [50]. Kriyotropik jelleşme ile elde edilen polimerik malzemelerin morfolojisi donmamış sistemde üretilen jellere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Kriyojeller, diğer kimyasal jeller sınıflarına (kovalent, iyonik, non-kovalent) göre farklıdır. Özellikle ısıl başlatıcılı jeller (termotropik) kriyojel hazırlanmasında kullanılamazlar. Bazı istinalar dışında, donma-kurutma yöntemiyle hazırlanan polimerik malzemeler, kriyojellerle benzer özellik göstermektedir. Çözücünün dondurulması ve çözücü kristallerinin süblimleştirilmesiyle hazırlanan polimerik malzemelerde birbirine bağlı gözenekler içeren bir ağ sistemi elde edilmektedir. Fakat, donmamış sıvı fazda herhangi bir jel oluşumu gözlenmemektedir. Donma-kurutma yöntemiyle sadece ince filmler, plakalar veya küçük partiküller hazırlanabilmektedir. Donma-kurutma yöntemiyle silindir veya ince blokların hazırlanması teknik olarak mümkün değildir. Fakat, kriyojeller istenilen şekil ve boyutta bloklar, silindirler, granüller ve diskler halinde hazırlanabilmektedir. Ayrıca, kriyojellerin üretiminde

çözücünün düşük basınçta uzaklaştırılmasına gerek olmadığı için donma-kurutma yönteminden daha kolaydır. Geniş birbirine bağlı gözenekli ağ yapısı, kriyojellerin temel yapısal karakteridir. Süngerimsi yapı içerisindeki gözenek sistemi analit moleküllerinin aktarımla taşınmasını kısıtlamamaktadır. Kriyojel içerisinde oluşturulan makrogözeneklerin boyutları 10-250 µm aralığında değişim göstermektedir. Geniş gözeneklerin oluşturduğu ağ yapısı kriyojellerin nano-mikro aralığında ölçeğe sahip birçok biyomolekülün ayrılmasında destek malzemesi olma potansiyeli kazandırmaktadır (Şekil 1.9) [53].



Şekil 1.9. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi

Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

Jel oluşum ajanlarını içeren reaksiyon karışımı, çözücünün donma noktasının bir kaç derece altında dondurulur. Donmuş haldeki sistem, tek parça katı blok gibi görünmesine rağmen donmamış sıvı mikrofaz (UFLMP) içeren heterojen bir karışımdır [54].

UFLMP içerisindeki jel oluşum ajanlarının derişimi çözücünün donmasının etkisiyle yükselmiştir. Kriyoderişme olarak adlandırılan bu olay, donmuş sistemlerde jel oluşumunun hızlanmasına sebep olmaktadır. Aynı derişime sahip sıvı monomer çözeltilerine göre jelleşme oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir [55].

Çözücü kristalleri, gözenek oluşturucu ajan olarak işlev görmektedir. Çözücü eritildiğinde, boşluklar oluşmakta, makrogözenekler çözücü ile dolmaktadır. Çözücü ve jel faz arasındaki yüzey gerilimi, gözeneklerin yapısının yuvarlaklaşmasına ve gözenek yüzeylerinin daha düzenli olmasına sebep olmaktadır. Donma işlemi gerçekleştiğinde, çözücü kristalleri diğer kristallerle birleşene kadar büyümektedir. Eritme işlemi sonra jel içerisinde birbirine bağlı

gözeneklerden oluşan bir ağ sistemi oluşmaktadır. Gözeneklerin şekil ve boyutları, birçok faktöre bağlıdır; monomer derişimi ve kriyotropik uygulama sıcaklığı en önemli etki eden faktörlerdir [56].

1.3.7. DNA Ligaz

Genel olarak ligazlar; yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak, karbon ile karbon, oksijen, kükürt, azot arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Ligazlar, tek polipeptid zincirinden ibarettir. Prokaryot ve ökaryotlarda bulunur. Sağ kalıp kolda 5'-P→3'-OH istikametinde kesikli olarak sentezlenen nükleotidleri (Okazaki fragmentleri) birleştirir. Ligazlar; ATP' nin AMP (adenozin monofosfat) ve P_{pi} (pirofosfat)' a parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir.

DNA ligaz; DNA'nın herhangi bir kırık bölgesinde bulunan serbest 3'-OH grubu ile aynı zincirin diğer ucunda bulunan 5'- fosfat grubu arasında bir fosfodiester bağı yaparak kırığı kapatır. Bu görevini ATP veya diğer bir enerji kullanarak yapar.

DNA enzimlerinin en önemli görevlerinden biri, DNA molekülünün kopyalanmasına yardımcı olmaktır. Moleküler biyolojide DNA ligaz; iki DNA molekülünü uç uca birleştiren özel bir ligaz tipidir (Şekil 1.10).

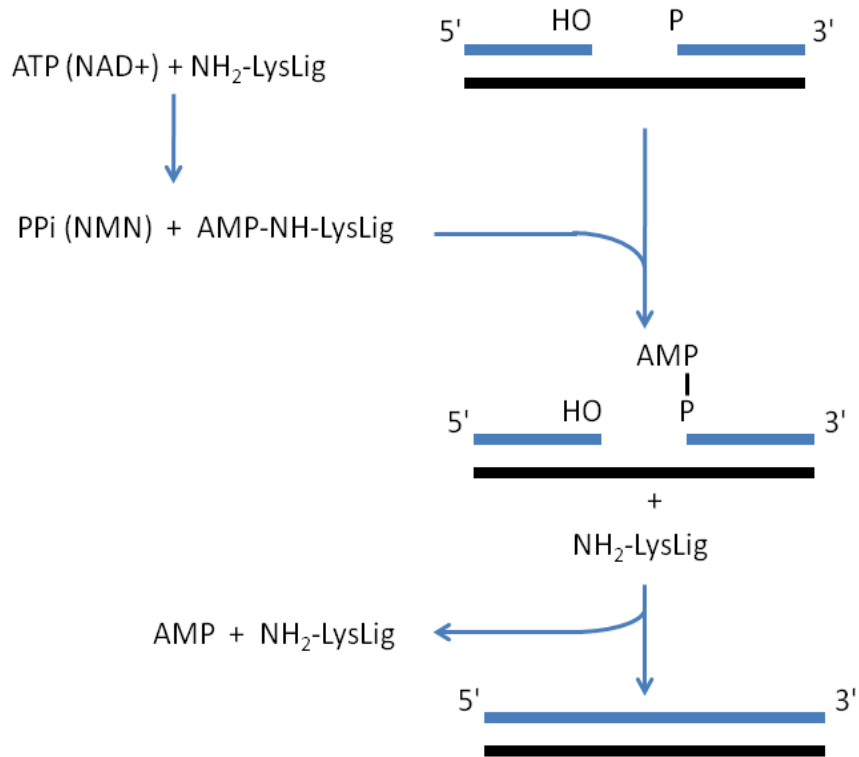


Şekil 1.10. DNA ligaz enziminin kristal yapısı

DNA ligazlar, DNA zincir kırıklarının DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamiri esnasında birleştirilmesinde rol alan önemli enzimlerdir. DNA ligazlar iki iplikli DNA' da tek zincir kırıklarındaki

fosfodiester bağların oluşumunu katalizlemektedir. Tüm organizmalarda bulunmalarına rağmen amino asit dizileri, moleküler büyüklük ve özellikleri bakımından organizmalar arasında farklılıklar göstermektedirler.

Bu enzimler, kofaktör özelliklerine göre aktivasyon için NAD (nikotinamid adenin dinükleotit) gerektiren ve ATP gerektiren olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Ökaryotik organizmalardaki DNA ligazlar ATP gerektiren enzimlerdir. NAD gerektiren DNA ligazlar ise sadece prokaryotik organizmalarda gözlenmiştir. Bu kofaktörlerin fosfat bağının kesilmesi ile reaksiyon için gerekli enerji elde edilir. Arta kalan AMP molekülü enzimde bulunan bir lizin kalıntısı tarafından bağlanır. Birleştirilecek DNA molekülünün 5' ucundaki fosfat, lizine bağlı AMP' deki 5' fosfata saldırarak, AMP' yi DNA' ya bağlayan bir pirofosfat bağı oluşturur. Nihayet, kopuk DNA zincirinin 3'-OH grubu, 5' uçtaki pirofosfat grubuna saldırarak AMP 'nin serbest bırakılmasına ve DNA zincir uçlarının birleşmesine neden olur (Şekil 1.11) [57-59].



Şekil 1.11. DNA ligazın enzim reaksiyonunun adımları

1.3.7.1. DNA Ligaz Tipleri

NAD ve ATP kullanan DNA ligazların biyokimyasal mekanizmaları aynı olmasına karşın amino asit dizileri bakımından birbirlerinden çok farklıdır ve iki ayrı grup oluştururlar.

1.3.7.2. Bakteriyel DNA Ligazlar

E.coli DNA ligazı DNA ikileşmesi sırasında oluşan Okazaki parçalarının birleştirilmesi, ayrıca DNA tamiri için gereklidir. Bakteriyofaj T4 ve T7' de bulunan DNA ligazlar da aynı göreve sahiptir ama konak bakteride bulunan DNA ligaz, faj DNA' sının ikileşmesinde işlev görebildiği için onların varlıkları faj çoğalması için zorunlu değildir [59].

1.3.7.3. Ökaryotlarda DNA Ligazlar

İnsanda LIG1, LIG3 ve LIG4 genleri tarafından kodlanan üç DNA ligaz geni vardır. LIG1 ve LIG4 tüm ökaryotlarda bulunmakta, LIG3 ise sadece omurgalı hayvanlarda bulunmaktadır [58].

- **DNA Ligaz I:** DNA ligaz I enzimi 125 kDa molekül ağırlığındadır ve replikasyon sırasında iş gören en önemli enzimlerdendir. DNA ligazın spesifik olarak okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde etkili olduğu ve replikasyon için başka proteinlerle etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. DNA ligaz I aynı zamanda baz ekzisyon tamiri (BER) için de gerekli olup bu tamir mekanizmasında hasarlı baz DNA ikili sarmalından uzaklaştırılır ve asidik bir bölge oluşturulur. Daha sonra fosfodiester omurgada bir boşluk oluşturularak yaklaşık 30 baz çiftlik kısım çıkarılır. Daha sonra bu bölge diğer hasar görmemiş iplik kalıp olarak kullanılarak tamir edilir. Tekrar sentezlenen ve doldurulan boşluk DNA ligaz ile iki DNA parçası arasında fosfodiester bağı oluşturulur.
- **DNA Ligaz II ve III:** DNA ligaz I' in keşfinden sonra moleküler çalışmalar ile DNA ligaz II ve III tanımlanmıştır. Bu iki enzim oldukça büyük moleküler ağırlığa sahiptir. Ligaz II ve III 160' dan fazla rezidü (polipeptitlerdeki herbir amino asit) ile birbirine mükemmel bir eşleşme

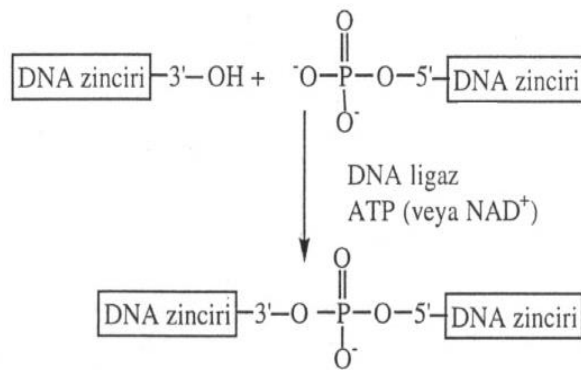
göstermiştir ve bu durum ligaz II' nin aslında ligaz III' ün bir parçası olduğu fikrini vermiştir.

- **DNA Ligaz IV:** DNA ligaz IV enzimi 96 kDa molekül ağırlığındadır. DNA ligaz IV enziminin ekzisyon tamir mekanizmaları, tek zincir kırıkları ve bazların kovalent değişimlerinin düzeltilmesi işlemlerinde görev aldığı bildirilmiştir.
- **DNA Ligaz V:** DNA ligaz V yeni bulunan bir enzim olup yaklaşık 44 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu ve iki zincir kırıklarının kapatılmasında aktivite göstermektedir [60,61].

1.3.7.4. DNA Ligaz Uygulamaları

DNA ligazlar, laboratuvarında rekombinant DNA dizileri oluşturmak için vazgeçilmez birer araç haline gelmişlerdir. Örneğin restriksiyon enzimleri ile elde edilen DNA parçalarının bir plazmit içine yerleştirilebilmesi için DNA ligazlar kullanılır. Uçları birleştirilen DNA moleküllerinin uçları "yapışkan" veya "küt" olabilir.

Başarılı bir ligasyon (birleştirme) reaksiyonu için en iyi sıcaklığın bulunması gereklidir. Çoğu reaksiyon bakteriofaj T4'ten elde edilen T4 DNA ligazı ile katalizlenir. Ancak ligasyonun başarılı olması için enzim etkinliği ile DNA uçlarının ergimesi arasında bir denge bulunması gerekir (Şekil 1.12) [59].



Şekil 1.12. DNA ligazın birleştirme mekanizması

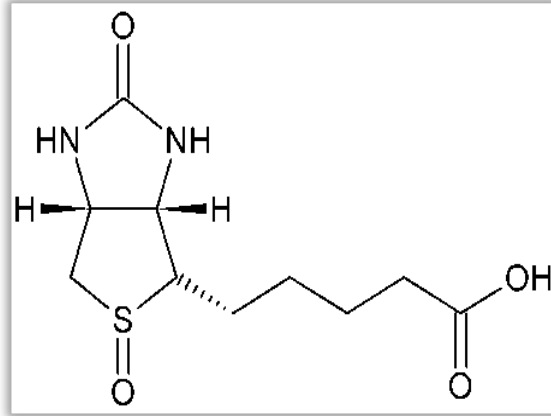
Yapışkan uçsuz DNA' ların da ligasyonu mümkündür ama reaksiyon çok daha yavaştır. Reaksiyon ortamında polietilen glikol ve 150-200 mM NaCl bulunması DNA moleküllerinin bitişmesini kolaylaştırır [60].

1.3.7.5. Sağlık Açısından DNA Ligaz

DNA ligaz enzimlerinde yokluğu veya doğru çalışmaması sonucu genom yapısında bozukluklar meydana gelir. DNA ligaz I mutasyonu taşıyan hastalarda DNA ikileşmesi ve tamiri iyi çalışmamasından dolayı immün bozukluklar, güneş ışığına duyarlılık, ve büyüme gecikmesi görülmüştür. Memeli hayvanlarda DNA ligaz I veya IV eksikliği kanser olasılığını artırdığı gösterilmiştir. DNA ligaz IV yokluğu sendromunda rekombinasyon bozukluğundan kaynaklanan immün yetmezlik görülür. Fare modellerinde ve çoğu insan hastada DNA ligaz IV yokluğu kansere yol açmaktadır [58].

1.4. Biotin

Biotin, literatürde, H vitamini veya B₇ vitamini olarak da adlandırılan ve güncel haberlerde karşımıza sıklıkla "güzellik vitamini" adıyla çıkan bir vitamindir (Şekil 1.13). Kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından da üretilen biyotin sağlıklı bir yaşam için gerekli olan önemli bir vitamindir.



Şekil 1.13. Biotinin molekül yapısı

Biotin; yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmalarında bir koenzimdir. Aynı zamanda hücre gelişimine katkıda bulunur, kanın şeker seviyesini ortalama düzeyde tutmaya yardımcı olur. Özellikle kemik iliği için çok önemli olmasının yanı sıra sağlıklı sinir dokuları için de gereklidir.

Biotin proteinlere bağlanarak CO₂ fiksasyonunu veya dekarboksilasyonunda enzimlerin prostetik grubu olarak görev yapar. Piruvat

karboksilaz enzimi tarafından katalizlenen piruvatın oksaloasetata dönüşümünde görev yapar.

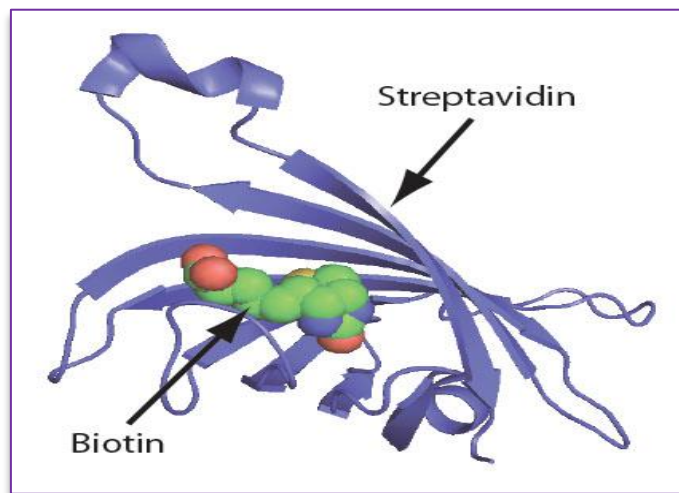
Biyotin; moleküler biyoloji uygulamalarında önemli bir moleküldür. Bunun en büyük sebebi ise, streptavidin ve avidin için yüksek afinite göstermesidir. Bu hareketlilik, saflaştırma, kuvvetlendirme ve bağlanma için kullanılabilir [62,63].

1.5. Streptavidin

Streptavidin, *Streptomyces avidinii*' den elde edilen tetramerik (dört altbirimli) bir proteindir. Biotin-streptavidin kompleksinin ayrışma katsayısı (K_d) 10^{-14} mol/L mertebesindedir, bu bağlanma doğada bilinen en güçlü non-kovalent etkileşimlerden biridir (Şekil 1.14).

Streptavidin moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılır. Çünkü biyotine olan olağanüstü afinitesinin yanı sıra aşırı pH, sıcaklık, organik çözücüler, denatüranlar, deterjanlar (SDS, Triton gibi) ve proteolitik enzimler bu proteinin biyotine bağlanmasını etkilemez.

Streptavidinin doğadaki işlevi bilinmemektedir. Bu protein hücre dışına salgılandıktan sonra ortamdaki biyotin moleküllerine bağlanıp onları başka mikroorganizmalar tarafından kullanılmaz hale getireceği için, streptavidinin bir antibiyotik görevine sahip olabileceği öne sürülmüştür [64].



Şekil 1.14. Biotin-streptavidin etkileşimi

Streptavidin-biyotin kompleksinin kristal yapısı Hendrickson ve arkadaşları tarafından 1989' da çözülmüştür. 159 amino asit kalıntılı protein işlemlendikten sonra N- ve C- ucundan kırılır, kalan protein 13-139. kalıntılardan ibarettir. Streptavidin monomerinin ikincil yapısı sekiz antiparalel beta (β) yapraktan oluşur, bunlar katlanıp bir antiparalel beta fiçı üçüncül yapı oluşturur. Her bir β fiçısının bir ucunda bir biyotin bağlama yeri bulunur, bunların biyotin için hem yüksek spesifitesi hem de yüksek afinitesi vardır. Dört tane birbirinin aynı streptavidin monomeri (yani dört birbirinin aynı β -fiçı) bir araya gelip streptavidinin tetramerik dördüncül yapısını oluşturur. Her fiçıdaki biyotin bağlanıcı yer, fiçı içindeki kalıntılar ile, komşu bir altbirime ait bir Trp120' den oluşur. Böylece, her altbirim komşu altbirimin bağlanmasına katkıda bulunur. Dolayısıyla tetramerin aslında iki tane işlevsel dimerden oluştuğu düşünülebilir.

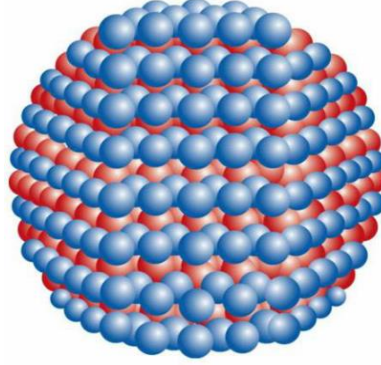
Streptavidin, biyotine yüksek afinite ile bağlanan tek protein değildir. Biyotine bağlanıcı proteinler arasında en kayda değer olanı avidindir. Bu protein evrimsel olarak streptavidinle ilişkili olmasa da çok benzer özelliklere sahiptir. Yumurta beyazından elde edilmiş olan avidinin streptavidin ile % 30 dizi benzerliği vardır ama ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları neredeyse aynıdır. Biyotine olan afinitesi daha yüksektir ($K_d \sim 10^{-15}$ M) ama streptavidinden farklı olarak glikoziledir, pozitif yüklüdür, psödo-katalitik aktivitesi vardır (biotin ile birnitrofenil grubu arasındaki bir ester bağının alkalik hidrolizini hızlandırabilir) ve öbikleşme (agregasyon) eğilimi daha yüksektir.

Streptavidinin izoelektrik noktası (pI) ~ 5 ile hafif asidiktir ama yaklaşık nötr pI' ye sahip bir rekombinant biçimi ticari olarak elde edilebilir. Streptavidinde bir karbonhidrat modifikasyonu olmaması ve neredeyse nötr bir pI' ye sahip olması nedeniyle avidine kıyasla çok daha düşük nonspesifik bağlanma gösterir. Deglikosile edilmiş avidin, büyüklüğü, pI ve nonspesifik özellikleri ile streptavidine benzer [65-67].

1.6. Kuantum Nanokristaller (QD)

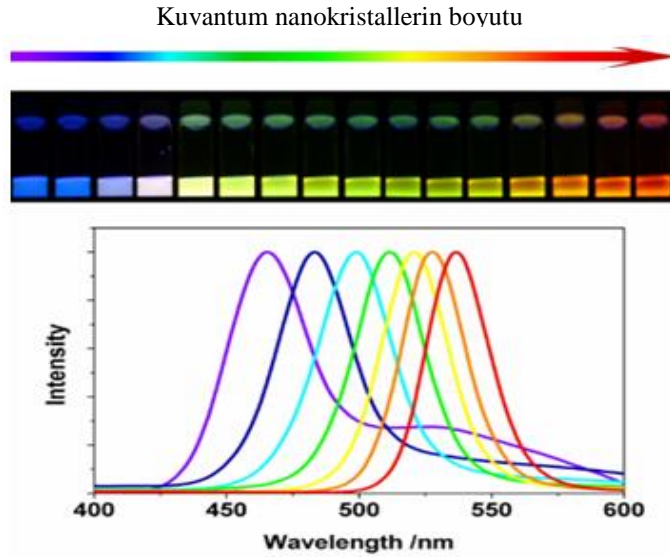
Kuantum noktacıları ya da nanokristaller, kristal çapları 1-10 nm arasında olan ve optik özellikleri kristal çapına göre değişen parçacıklardır. Kuantum nanokristalleri yarı iletkenler olarak bilinen malzeme sınıfının çok özel

ve benzersiz bir alt sınıfını oluşturular. Atomik yapıları nedeniyle bilinen klasik yığın haldeki yarı iletkenler ve klasik atom veya moleküller arasında bir yerde bulunurlar (Şekil 1.15) [68].



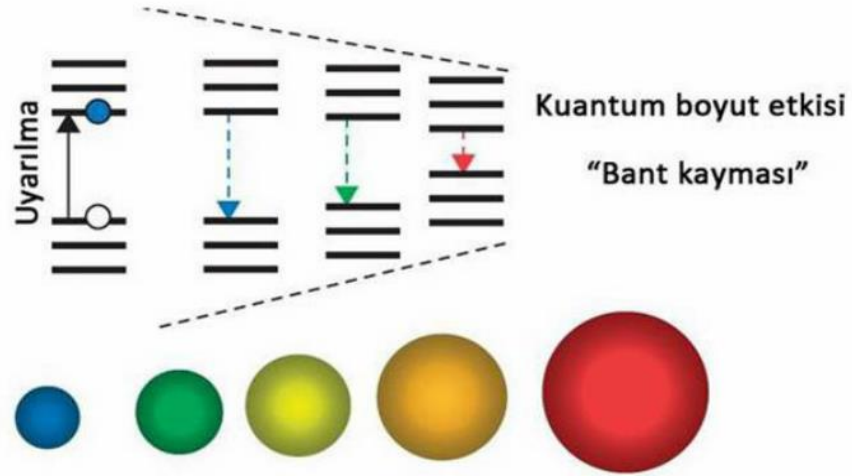
Şekil 1.15. Atomik yapıya sahip kuantum nanokristaller

Bu maddelerin optik özellikleri kristal büyüklüğüne bağlı olarak değişim gösterir. Şekil 1.16' de parçacık büyüklüğündeki değişime bağlı olarak CdSe kristallerinin farklı floresans ışınimleri verilmiştir. Yarı iletken nanokristallerin yüksek absorpsiyon katsayılarıyla birlikte boyutlarının ayarlanabilirliği gibi avantajlar bu maddelerin kullanımının artmasını sağlamıştır [69].



Şekil 1.16. Üstte küçük (mavi) parçacıklardan büyük (kırmızı) parçacıklara kadar dizilmiş CdSe nanokristallerin (boyutları 1-10 nm arasında) yakın-ultraviyole lamba altındaki emisyon renkleri. Altta; CdSe nanokristallerinin fotoluminesans spektrumları

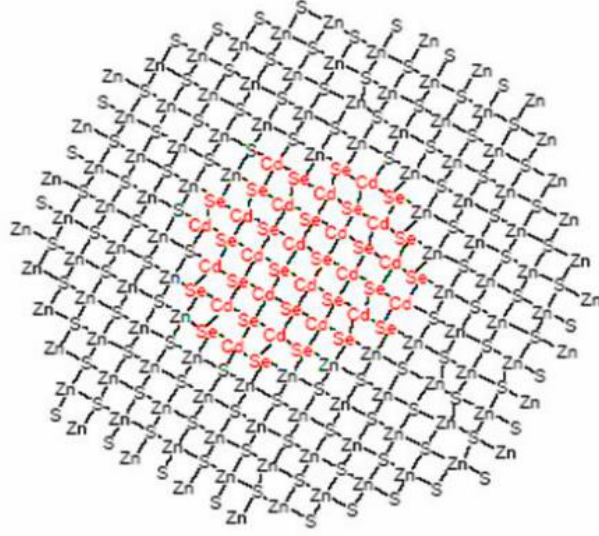
Kuantum nanokristallerin kristal çapları arttıkça enerji bantları birbirine yaklaşır ve bant boşluğu daralır. Böylece uyarılmış elektronun temel hale dönerken aldığı yol azalır. Dolayısıyla daha az enerjili yani daha uzun dalga boylu ışığa yayarlar (Şekil 1.17). Büyük noktalar, kırmızımsı (düşük enerjili) floresans emisyonu verirken, küçük noktalar mavimsi (daha yüksek enerjili) ışık yayarlar [70,71].



Şekil 1.17. Kuantum nanokristallerin boyut etkisi

Kuantum nanokristallerin yüzeyi çevresel etkiler nedeni ile kolaylıkla bozulabildiğinden dış yüzeyleri korumaya alınır. Bu olay 2 şekilde yapılabilir. Birincisi parçacık yüzeyi bir yüzey aktif malzeme ile kaplanır. Bu yüzey aktif malzemeler kristal yüzeyini dış etkenlere karşı koruduğu gibi doğal yapılarına göre parçacıkların su veya organik çözücülerde çözünmesini de sağlar [71].

Nanokristallerin yüzeylerinin korunmasında uygulanan 2. yol ise çekirdek/kabuk yapısının oluşturulmasıdır (Şekil 1.18). Burada optik özellikler çekirdekte bulunan kristalinkinden kaynaklanmaktadır. Kabuk kısmındaki kristal ise hem çekirdeğin yüzeyindeki atom boşluklarını doldurarak optik özelliklerini geliştirmekte hem de koruyucu görev yapmaktadır [72].



Şekil 1.18. CdSe/ZnS yapısına ait kristal şekli

Kuantum nanokristallerin çok küçük boyutları sayesinde, insanlara zarar vermeden vücudumuzdaki mikropları tespit edebilirler. Ancak erken teşhiste çığır açabilecek bu gelişmenin önünde bir engel vardır. Kadmiyum, selenyum, kükürt, kurşun ve diğer zehirli elementlerden sentezlenen kuantum noktalar, özellikle morötesi ışınlarla maruz kaldıklarında parçalanabilir ve zehirli içeriklerini vücudumuza yayabilirler. Kuantum nanokristaller insan vücuduna enjekte edilmeleri halinde uzun süre orada kalabilir ve bu da uzun dönemde sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Bilim insanları, kuantum noktalarının etrafının inorganik maddelerle kaplanması gibi zehir etkilerini ortadan kaldıracak çözümler üzerinde çalışmalarına devam etmektedirler [72].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kriyojel kolon sentezi için DNA ligaz, 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA), Amonyum per sülfat (APS) Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. N, N'- Metilen bisakrilamid (MBAAm) ve N, N, N', N'- Tetrametiletildiamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından temin edilmiştir. Kırım-Konga Kanamalı Ateşi hastalığına sahip primerler Sentromer DNA Teknolojileri firmasından temin edilmiştir. Çalışmaların kalan kısmında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup farklı firmalardan alınmıştır. Asetik asit (CH₃COOH) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen firmasından, Metanol (CH₃OH), Etanol (C₂H₅OH) , Sodyum fosfat monobasic, Potasyum fosfat dibasic, Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Sigma (St Louis, USA) firmasından, Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan firmasından alınarak uygun koşullarda saklanmıştır. PCR çalışmaları için wide range DNA marker, Agaroz, Jel yükleme tamponu, PCR tüpleri, 25 mM Magnezyum klorür çözeltisi, 10X PCR tamponu, Taq DNA Polimeraz, 100 mM dNTP seti Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Kuantum nanokristal olarak Lumidot CdSe 480 nm 5 mg/mL Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Saf su Thermo Scientific firmasından alınan saf su cihazından elde edilmiş olup iletkenliği 18 megaohm/cm' dir. Çalışmalar esnasında yüksek saflıkta azot gazı kullanılmıştır.

Ayrıca cam malzemeler (beher, balon joje v.b.), 96 kuyulu polisitren mikro plaka, quartz floresans küveti Hellma Analytics firmasından temin edilerek, mikro pipet ve pipet uçları gibi malzemeler de çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyon çalışmalarında Shimadzu 8000 model FT-IR, JEOL- JEM 1220EX model (Tokyo, Japan) yüzey morfolojisinin incelenmesinde Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM),

ve polimerlerin yüzey alanının belirlenmesinde Quontachrome, Nova 2200e model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır.

Çözeltilerin pH değerlerine WTW Series pH 730 Inolab- pH-metresi ile bakılmıştır. Primerlerin biyotinlenme çalışmalarındaki UV absorbans ölçümleri için BioTek Synergy H1 hybrid reader model mikroparka okuyucu ve GEN5 v2.00 yazılımı kullanılmıştır. Biyotinenen primerlerin çözeltileri ise Labconco Freezone 2.5 model liyofilizatör ile uzaklaştırılmıştır. Sürekli sistem çalışmaları Heidolph Pumpdrive 5101 model peristaltik pompa ile yapılmıştır.

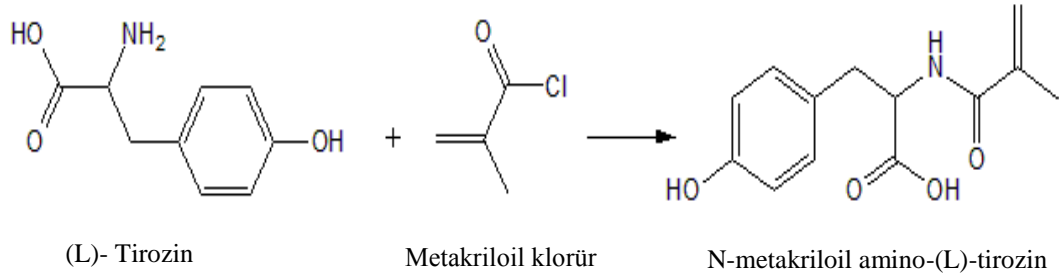
Hibridizasyon çalışmaları sırasındaki kuvantum nanokristallerin floresans ölçümleri için Varian Cary Eclipse marka floresans cihazı kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları çalışmalarında ise Applied Biosystems Veriti cihazı kullanılmıştır. Enzim ve proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının analizi için Chirascan marka CD spektrometre cihazı kullanılmıştır.

Ayrıca cam malzemeler (beher, balon joje vb.), 96 kuyulu polisitren mikro plaka, quartz floresans ve UV küveti, mikro pipet ve pipet uçları gibi malzemeler çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2. Metot

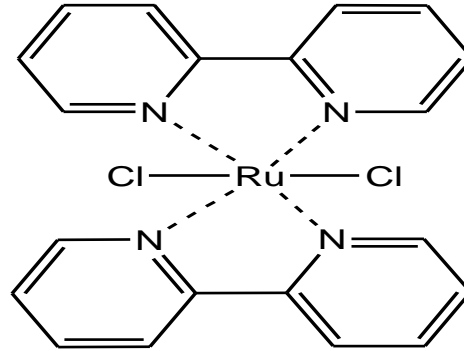
2.2.1. Fotosensitif Monomer Sentezi

N-metakriloil amino-(L)- tirozin (MATyr) sentezi: 3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-metakriloil) amino] propanoik asit (metakriloil amino tirozin, (MATyr)) sentezi için uygulanan yöntemde, 0,5 g L-tirozin metilester ve 0.2 g hidrokinon, 100 ml diklorometan çözücüsü içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0 °C a soğutulmuş ve 12,7 g trietilamin çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti üzerine 5 ml metakriloil klorür yavaşça eklenmiş ve çözelti azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, hidrokinon ve reaksiyona girmeyen metakriloilin fazlası %10' luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra su fazı döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MATyr), eter-sikloheksan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır (Şekil 2.1) [30].



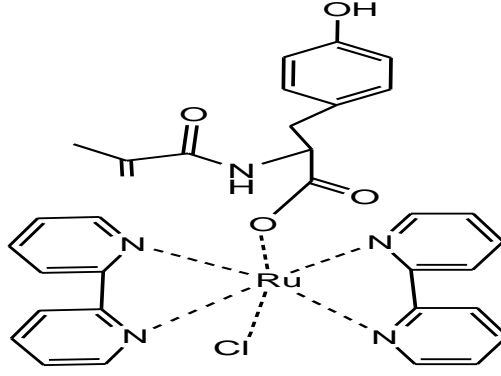
Şekil 2.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin sentezi

Diklorobis(2-2'-bipiridil) Rutenyum (II) sentezi: $\text{RuCl}_2(\text{MeSO})_4$ (1 mmol) ve 2-2'-bipyridyl (2 mmol) kloroform (30 mL) içerisinde 1 saat reflaks edilmiştir. Reaksiyon bitiminde çözücü döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Kalıntı aseton içirişine alınmıştır. Asetondaki çözeltiye dietiler eklenerek turuncu renkli madde çöktürülmüştür. Çökelti süzülerek ayrılmış ve eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuş ve eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur (Şekil 2.2) [30].



Şekil 2.2. Diklorobis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

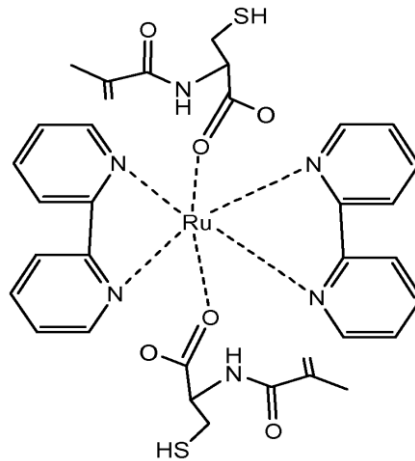
Klorobis(2-2'-bipiridil)- MATyr Rutenyum (II) sentezi: Diklorobis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) aminoasit-monomeri (1 eq) metanolde çözülmüştür. Oluşan çözelti 0 °C' ye soğutulmuştur. Üzerine NEt_3 eklenmiştir. Oda sıcaklığına getirilen çözelti üzerine metanol içerisinde çözülmüş MATyr çözeltisi (1.2 eq) damla damla ilave edilmiş ve ardından 55 °C' de 2 gün reflaks edilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda çözücü uzaklaştırılmıştır. Kalıntı diklorometan içerisinde çözülmüş ve 3 kez su ile ekstrakte edilmiştir. Organik fazlar toplanarak MgSO_4 ile kurutulmuştur. Çözücü döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla eter ile yıkama ve vakum altında kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3)[30].



Şekil 2.3. Klorobis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

2.2.2. MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys Sentezi

Diklorobis(2-2'-bipiridil)(MACys)₂-Rutenyum (II) aminoasit-monomeri (1 eq) etanolde çözülmüştür. Oluşan çözelti 0 °C' ye soğutulmuştur. Üzerine NEt₃ eklenmiştir. Oda sıcaklığına getirilen çözelti üzerine metanol içerisinde çözülmüş MACys çözeltisi (1.2 eq) damla damla ilave edilmiştir ve ardından 55 °C' de 2 gün reflaks edilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda çözücü uzaklaştırılmıştır. Kalıntı diklorometan içerisinde çözülmüştür ve 3 kez su ile ekstrakte edilmiştir. Organik fazlar toplanarak MgSO₄ ile kurutulmuştur. Çözücü döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla eter ile yıkama ve vakum altında kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.4) [30].



Şekil 2.4. MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys sentezinin molekül yapısının gösterimi

2.2.3. DNA Ligaz Çapraz Bağlı Fotosensitif Kriyojel Kolon Sentezi

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla 25 µL Rutenyum tabanlı fotoduyarlı monomer ve 100U DNA ligaz çözeltisi 2 saat süreyle azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Bu süre içerisinde 1 mL deiyonize suda çözünmüş, 56 mg MBAAM ve 740 µL deiyonize su ile karıştırılmış 260 µL HEMA monomeri hazırlanarak, monomer çapraz bağlayıcı karışımı oluşturmak üzere üç çözelti birleştirilmiştir. Polimerizasyonun başlaması için 1 mL su içerisinde çözünmüş 4 mg APS ve 5 µL TEMED alt ucu parafinle kapatılmış olan 5 mL' lik 0.8 cm çaplı enjektöre doldurulmuş monomer çapraz bağlayıcı karışımına eklenmiş ve önce 2 saat süreyle -12 °C' de daha sonra da 16 saat süreyle -20 °C' de dondurulmuştur. Reaksiyona girmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan kriyojel kolon sırasıyla % 75' lik, % 50' lik ve %25' lik 5 mL NaCl çözeltisiyle daha sonra deiyonize suyla yıkanmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

2.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.4.1. Şişme Testi

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve boş poli(HEMA) kriyojel kolonun denge şişme oranının belirlenmesi için; kuru kriyojel ± 0.0001 duyarlılıkla tartılmış ve 50 mL saf su içeren kaba konulmuştur. Daha sonra kriyojel kolonlar belirli sürelerde sudan alınmış, süzgeç kâğıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kaydedilen kuru ve ıslak ağırlıklar kriyojel kolonların şişme oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Kolonların şişme oranları aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte; W_0 : Kriyojellerin şişmeden önceki ağırlığı

W_s : Kriyojellerin şişmeden sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

2.2.4.2. FT-IR Analizi

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve poli(HEMA) kriyojel kolon oda sıcaklığında kurutulularak, FT-IR spektrumu alınması için ATR modu kullanılmıştır.

2.2.4.3. BET Yöntemiyle Yüzey Alanı Analizi

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel ve poli(HEMA) kriyojel kolondan birer gram tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan cihaza (Quantachrome Nova 2200E) yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırılmış ve yapının fiksasyonu yapılmıştır. Cihazda 10 noktaya göre analiz yapılarak kriyojellerin 1 gramının yüzey alanı bulunmuştur.

2.2.4.4. Yüzey Morfolojisi Analizi

p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve poli(HEMA) kriyojel kolonun yüzey morfolojisi SEM cihazı (Zeiss Ultra Plus) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojellerden alınan numuneler analiz edilmeden önce oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuru kriyojeller örnek haznesine yerleştirilmiş ve yerleştirildikten sonra vakum altında yaklaşık 100 Å kalınlığında altın ile kaplanmış ve sonra SEM ile görüntüleri alınmıştır.

2.2.4.5. Sıkıştırma Testi

p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve poli(HEMA) kriyojel kolon etüv yardımıyla kurutulmuştur. Kurutulmuş kriyojel tartılmış ve daha sonra kolonlar enjektöre alınarak doyuruluncaya kadar su ilave edilmiştir. Kriyojellerin gram başına tuttuğu su miktarı hesaplanmıştır.

2.2.5. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi

Kriyojel kolon içerisine çapraz bağlanan DNA ligazın ve floresans çalışmaları sırasında kullanılan streptavidinin ikincil ve üçüncül yapılarının analizi CD Spektroskopisi cihazı kullanılarak belirlenmiştir. 50 U DNA ligazın ve

1000 ppm streptavidinin deiyonize su içerisinde hazırlanan çözeltileri 500 µL' lik UV küveti içerisinde alınarak spektrum taraması yapılmıştır.

2.2.6. Primerlerin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan primerler aşağıda verilmiştir;

KKKA-F: (5' TGG ACA CCT TCA CAA ACT C 3')

KKKA-R: (5' GAC AAA TTC CCT GCA CCA 3')

Primerleri temin ettiğimiz firmanın belirlemiş olduğu prosedüre göre belirtilen miktarlarda deiyonize su eklenerek 100 µM stok olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.2.7. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler buz içerisinde çözülmüş ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1) 10x PCR tamponu	2,5 µL
2) 25 mM MgCl ₂	2 µL
3) 10 mM dNTP	2,5 µL
4) Forward primer (KKKA-F)	2,5 µL
5) Reverse primer (KKKA-R)	2,5 µL
6) cDNA (Kafkas Üniversitesi)	2 µL
7) Taq DNA polymerase (5u/µL)	0,5 µL
8) dH ₂ O	10,5 µL
	<hr/>
	25 µL

Hazırlanan örnekler içerisindeki tüm materyallerin homojen dağılması amacıyla santrifüjle 9000 rpm' de 1 dakika süre ile spin edilmiştir.

Uygulanan PCR şartları; 94 °C' de 2 dakika ön denatürasyon, 94 °C' de 1 dakika, 53 °C' de 1 dakika, 72 °C' de 1 dakika (40 siklus) ve 72 °C' de 5 dakika son uzama aşamalarından oluşmuştur.

2.2.8. Agaroz Jelde Görüntüleme

Agaroz jel PCR' dan elde edilen ürünleri görüntülemek için kullanılır. Agaroz jel hazırlamak için kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtilmiştir.

0,5 M EDTA Solüsyonu

16.81 g EDTA 90 mL saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar karıştırıldı. pH: 8.0' e ayarlandıktan sonra hacim 100 mL' ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C' de 20 dk. steril edilip +4 °C' deki buz dolabında saklandı.

50X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris, 57,1 mL Glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Hazırlanan çözeltinin pH' ı Glasiyal asetik asit ile 8.5' e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı. Otoklavda steril edilip +4 °C' deki buz dolabında saklandı.

10X TE Tamponu

10 mL 1 M Tris HCl (pH: 8.0), 2 mL 0.5 M EDTA (pH: 8.0) homojenize edilip, hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı. Hazırlanan tampon otoklavlanıp +4 °C' deki buz dolabında saklandı.

1X TE Tamponu

1 mL 1 M Tris HCl (pH: 8.0), 0.2 mL 0.5 M EDTA (pH: 8.0) homojenize edilip, hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı. Hazırlanan tampon otoklavlanıp +4 °C' deki buz dolabında saklandı.

Ethidium Bromür

10 mg Ethidium Bromür, 10 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı ve +4 °C' deki buz dolabında saklandı.

2.2.8.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Elektroforez tanklarını doldurmak ve jel hazırlamak için pH' ı 7.5-8.5 olan yaklaşık 50 mM konsantrasyonda tris-asetik asit-EDTA (TAE) tamponu kullanılmıştır. Steril ve kuru bir erlene, 100 mL TAE tamponu, 1 g agaroz ilave edilmiştir. Tampon içerisindeki agaroz tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında

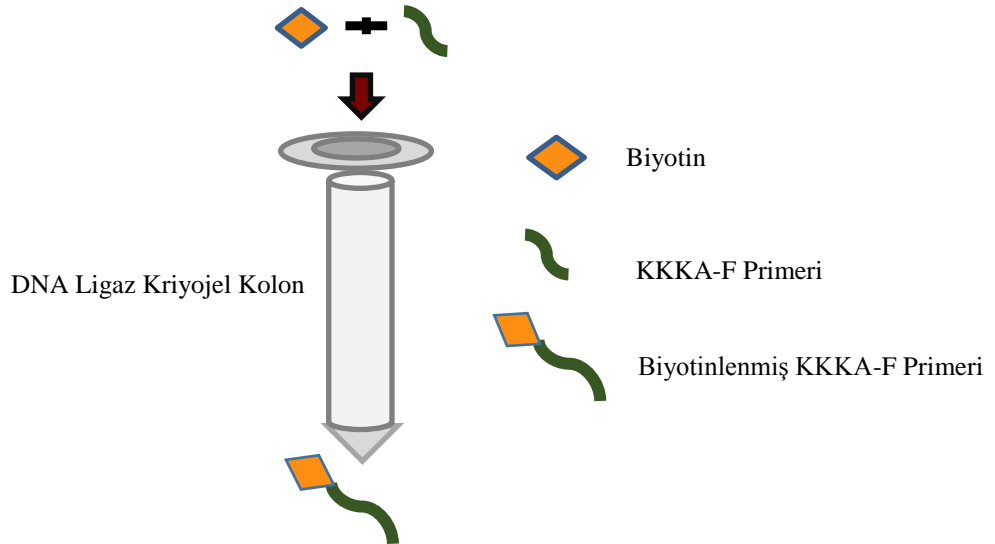
tutuldu. Erlen düzenli olarak karıştırılarak agarozun tamamen erimesi sağlanır. Ardından erimiş agarozu 5 µL ethidium bromür eklenmiş ve jel elektroforez tankına dökülmüştür. Yaklaşık 45 dakika sonra jel katılaştığı zaman üzerine TAE tamponu dökülmüş ve taraklar çıkarılmıştır.

2.2.8.2. Örneklerin Yürütülmesi

Örneklerin sayısı kadar tüp alınmıştır. Her bir tüpe 2 µL yükleme boyası eklenerek kısa süreli spin yapılmıştır. İlk kuyucuğa marker diğerlerine de numuneler konuldu. Güç kaynağı 90 volta ayarlanarak 50 dakika yürütülmüştür.

2.2.9. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Sahip Primerin 5' Ucundan Biyotinlenmesi

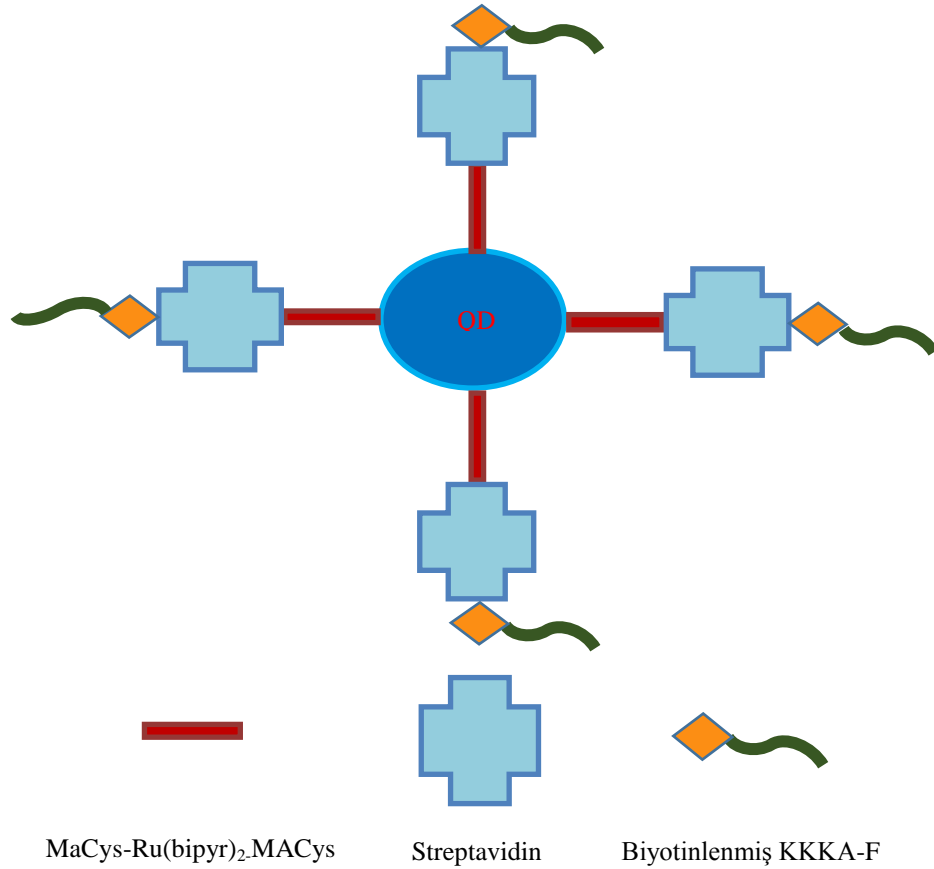
Şekil 2.5' te gösterildiği gibi DNA ligaz çapraz bağlı kriyojel kolon kullanılarak hazırlanan biyotin ve KKKA-F primerinden oluşan çözelti 5 rpm akış hızı ile 60 dakika süre boyunca sürekli sistemden geçirilmiştir. 3' er dakika arayla toplanan numunelerin mikropilaka okuyucu ile 354 nm' deki absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 2.5). Biyotinlenen primerlerin çözeltileri liyofilizatör ile ayrılmıştır.



Şekil 2.5. DNA Ligaz çapraz bağlı kriyojel kolon ile KKKA-F primerinin biyotinlenmesi

2.2.10. Kuantum Nanokristallerle Floresans Ölçümleri

Kuantum nanokristallerin floresans özelliklerinden yararlanma amacıyla hazırlanan 1 ppm toluende çözülmüş kuantum nanokristalin floresans spektrumu 480 nm' de uyarılarak ölçülmüştür. 200 ppm 0,5 mL etanolde çözülmüş MACys-Ru(bipy₂)-MACys ilave edilip, 2 saat karıştırıldıktan sonra 480 nm' de uyarılarak floresans spektrumu ölçülmüştür. Daha sonra 5 ppm 100 µL streptavidin çözeltisi eklenmiştir. Oluşan çözelti 12 saat karıştırıldıktan sonra her aşamada olduğu gibi yine 480 nm' de uyarılarak floresans spektrumu ölçülmüştür. QD-MACys-Ru(bipy₂)-MACys-streptavidin' den oluşan çözeltinin üzerine floresans kuvetinin içerisindeyken, biyotinlenmiş Kıırım-Kongo Kanamalı Ateşi forward primerinden hazırlanan 0,01, 0,05, 1, 2,5 ve 5 ppm' lik çözeltilerden 50' şer µL eklenerek 480 nm' de floresanstaki değişiklikler yaklaşık 1 saat boyunca izlenmiştir. Son olarak elde 50 µL reverse KKKA primeri eklenerek 480 nm' de floresanstaki düşme gözlenmiştir (Şekil 2.6).



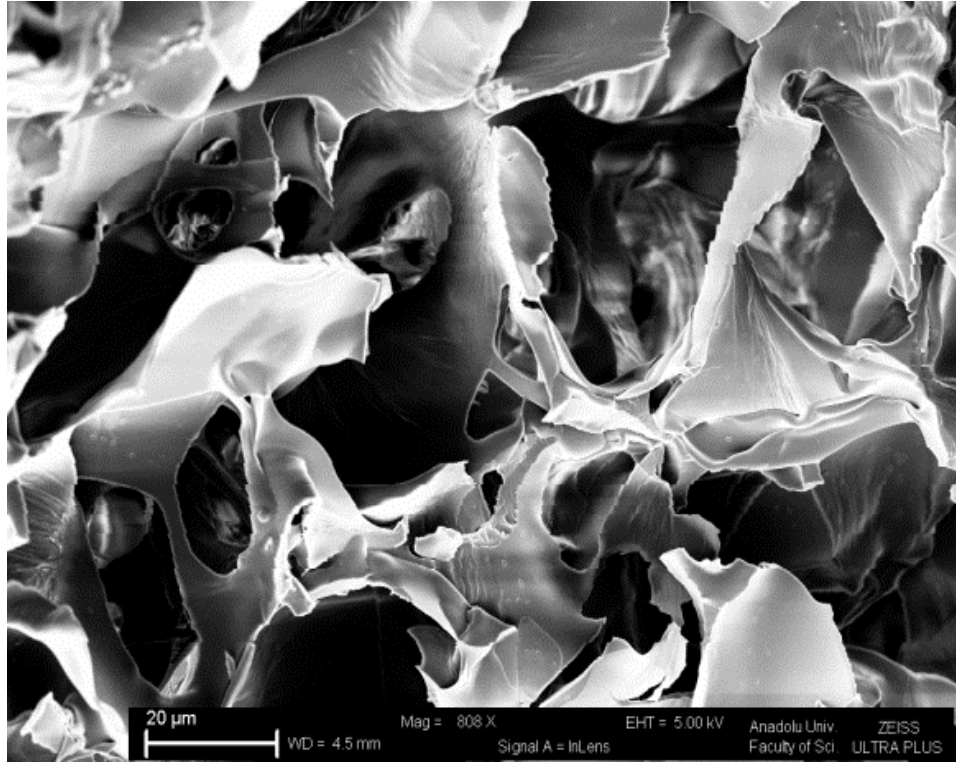
Şekil 2.6. Kuantum nanokristal-[MACys-Ru(bipy₂)-MACys]-Streptavidin-Biyotinlenmiş KKKA-F yapısı

3. BULGULAR

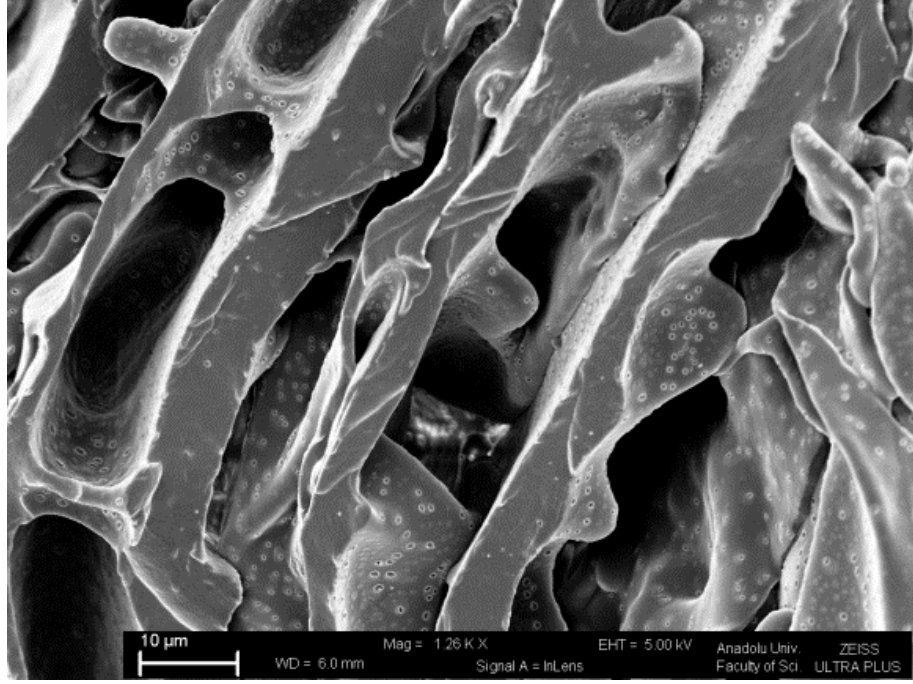
3.1. DNA Ligaz apraz Bağlı Fotosensitif Kriyojel Kolon Materyalinin p(HEMA-ko-DNA ligaz) ve poli(HEMA) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu

3.1.1. Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA) kriyojel kolon (Şekil 3.1) ve DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon p(HEMA-ko-DNA ligaz) (Şekil 3.2) materyallerinin yüzey morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.2’ de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojellerin gözenek boyutu enzimin çapraz bağlanmasına imkan verecek kadar büyüktür ve heterojen bir gözenek dağılımına sahiptir. Geniş akış kanallarına ve süpermakro gözeneklere sahiptir. Kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir.



Şekil 3.1. Boş poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü



Şekil 3.2. DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun SEM görüntüsü

3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon materyalinin spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle ölçülmüştür. BET metoduna göre yapılan analizlerle $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' deki sıvı azot ortamında azot (N_2) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m^2/g olarak yüzey alanları ölçülebilmektedir.

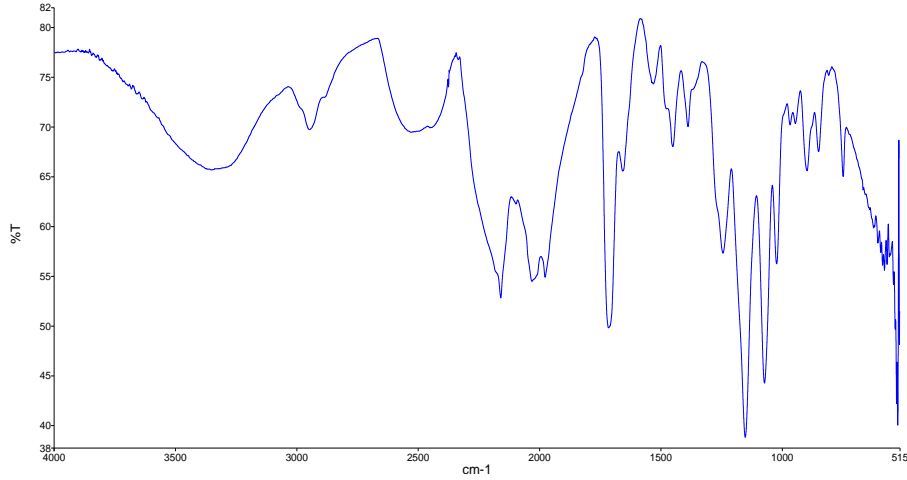
Kriyojel kolon tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan cihaza yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırılmış ve yapının fiksasyonu yapılmıştır. DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı $84,733\text{ m}^2/\text{g}$ polimer olarak bulunmuştur.

3.1.3. Şişme Testi

DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon polimerik yapıda, büyük gözenek boyutuna sahip, çapraz bağlı, hidrofilik bir matrikstir. Kriyojeller polimerik yapıda olması nedeniyle çapraz bağ derecesi ile hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alır ve şişme özelliği gösterir. Bu çalışmada çapraz bağlanan DNA ligaz kriyojelin denge şişme oranı % 780 olarak bulunmuştur.

3.1.4. FT-IR Analizleri

Kriyojelerin FT-IR spektrumları ATR modunda alınmıştır. Kriyojelin karakteristik pikleri olan 1656 cm^{-1} (karbonil bandı), 1600 cm^{-1} (N-H bandı eğilmesi; akrilamitteki karakteristik $-\text{CO-NH}_2$ grubuna ait pik), 3185 cm^{-1} (N-H gerilmesi), 1450 cm^{-1} (C-H eğilme bandı) pikler görülmektedir (Şekil 3.3). Ayrıca 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 3000 cm^{-1} 'de N-H bandı, 2400 cm^{-1} 'de C-H gerilmesine ait pik, 1700 cm^{-1} 'de C=O piki, $1190\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$ 'de C-O pikleri görülmektedir. DNA ligaz çapraz bağlı kriyojel kolonun $515\text{-}800\text{ nm}$ aralığında fotosensitif monomerin Ru-N titreşim bandları görülmektedir (Şekil 3.3).



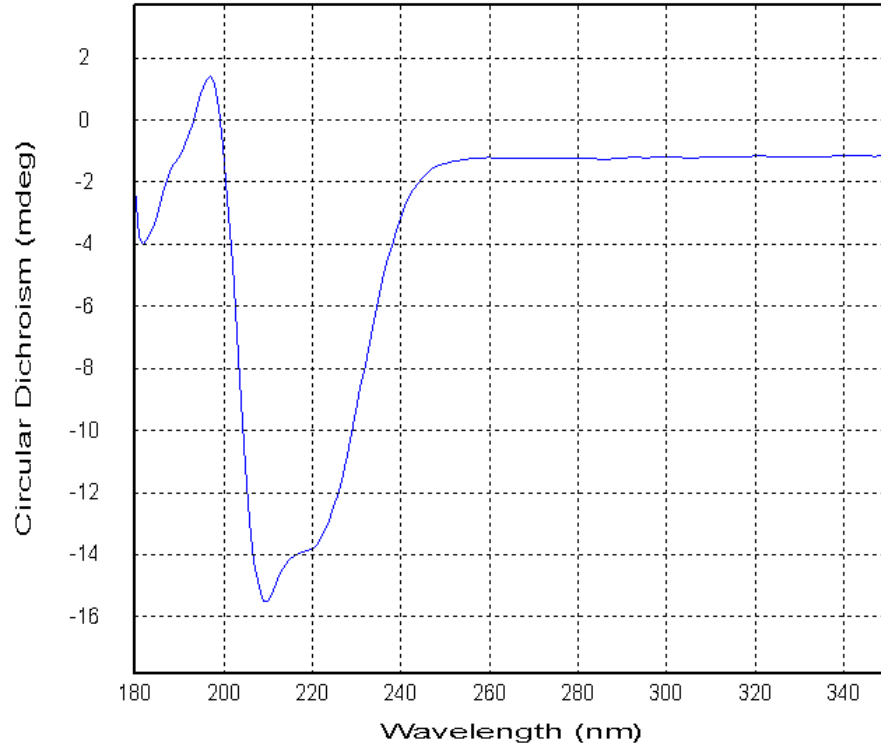
Şekil 3.3. DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolonun FT-IR spektrumu

3.1.5. Sıkıştırma Testi

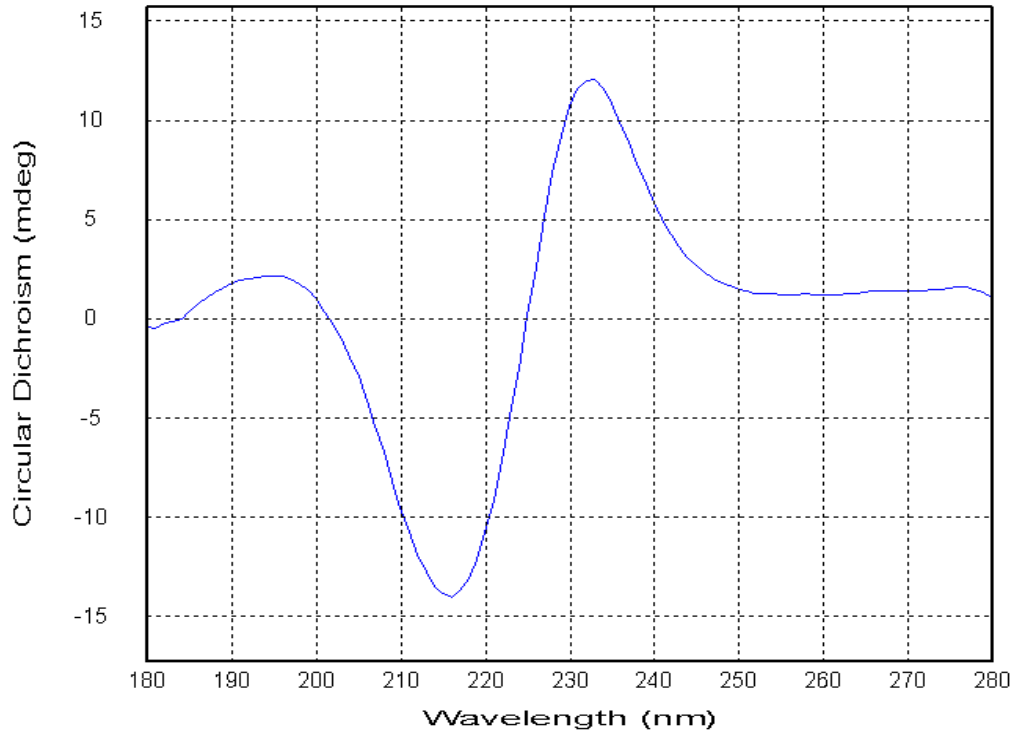
Yapılan çalışmada 1 g kriyojelin su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. 1 g kriyojel örneğinin 10,463 g su tuttuğu bulunmuştur. Kriyojeller hidrofilik karakterde olduklarından ve reaksiyonlar sulu ortamlarda meydana geldiğinden dolayı su tutma kapasitesi kriyojeller için oldukça önemlidir.

3.1.6. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi Analizi

50 U DNA ligaz ve 1000 ppm streptavidin çözeltilerinin CD spektrumları Şekil 3.4 ve Şekil 3.5' de verilmiştir.



Şekil 3.4. DNA ligazın CD spektrumu

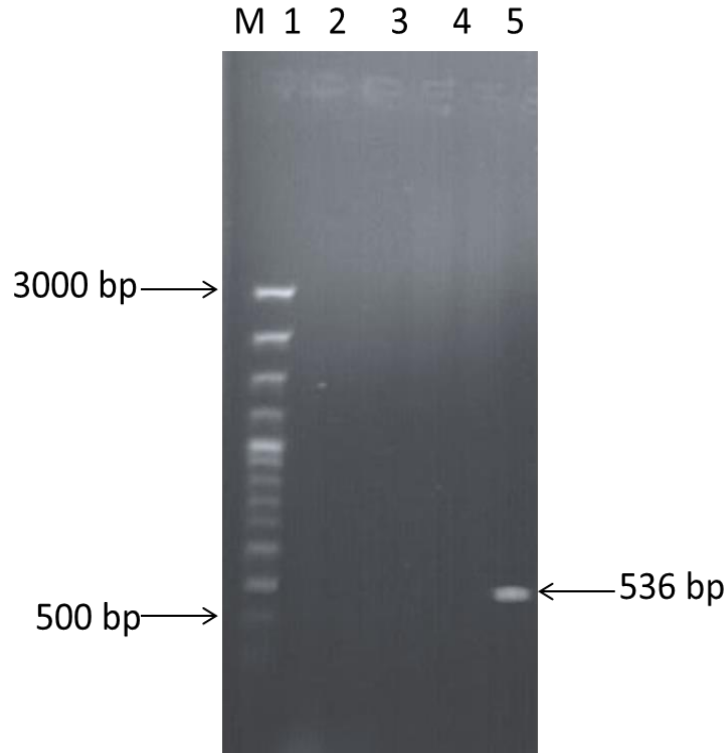


Şekil 3.5. Streptavidinin CD spektrumu

Elde edilen CD spektrumlarından yola çıkılarak DNA ligazın ikincil yapısının alfa heliks yapıda, streptavidinin ise beta tabaka yapısında olduğu görülmektedir.

3.1.7. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Sonucu Elde Edilen Agaroz Jel Görüntüsü

Bölüm 2.2.7, 2.2.8, 2.2.8.1 ve 2.2.8.2' deki prosedüre göre elde edilen PCR ürünlerinin % 1' lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.6).



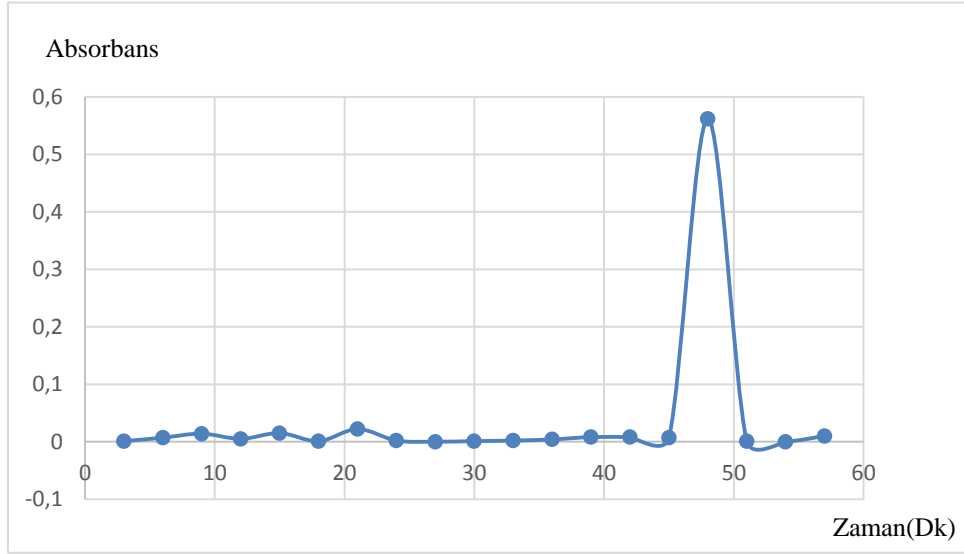
Şekil 3.6. RT-PCR sonrasında elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Marker (Guangzhou Geneshun Biotech Ltd, 100bp Ladder plus, 1, 2 ,3, 4 farklı primerler ile 5 tasarladığımız primerler ile KKKA cDNA' sı kullanılarak hazırlanan PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü)

Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonuna göre elde edilen jel görüntüsünde kullanılan markera göre elde edilen bandın büyüklüğünden yola çıkılarak çoğaltılan KKKA primerinin yaklaşık 536 baz çifti arasında olduğu bulunmuştur.

3.1.8. Kırım Kongo-Kanamalı Ateşi Teşhisi

3.1.8.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Sahip Primerlerin 5' Ucundan Biyotinlenmesi

Bölüm 2.2.9' da anlatıldığı gibi DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon kullanılarak KKKA-F primerine biyotinin 5' ucundan takılmasının 354 nm' deki belirgin absorbands artışıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).

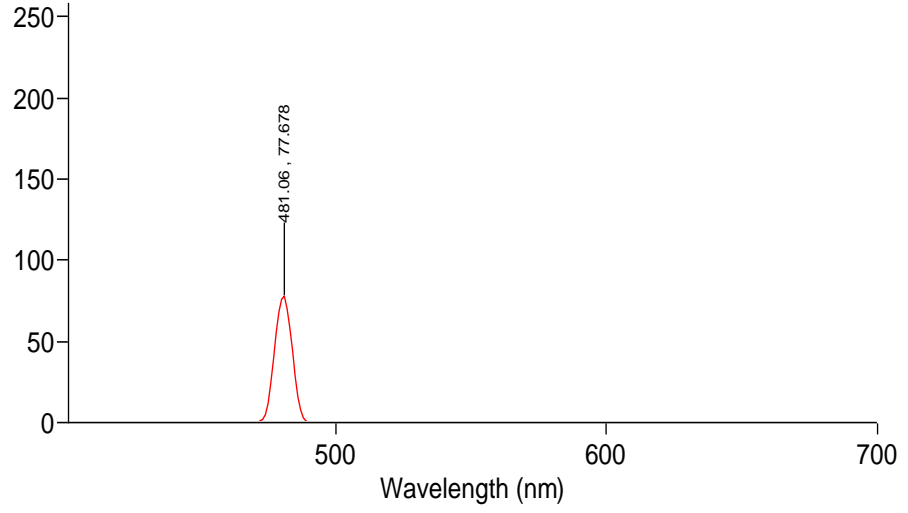


Şekil 3.7. KKKA-F primerine biyotinin 5' ucundan takılmasının 354 nm' deki absorbands değerlerinin grafiği

Çizilen zamana karşı absorbands grafiğinden de anlaşılacağı üzere mikrolaka okuyucu ile elde edilen absorbands değerlerinden faydalanarak bağlanmanın gerçekleştiği noktalar 48-51 dakikalar arasında olduğu görülmektedir. Bu dakikalardaki numunelerin çözeltileri liyofilizatör ile katı hale getirilerek 0,01, 0,05, 1, 2,5 ve 5 ppm' lik farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

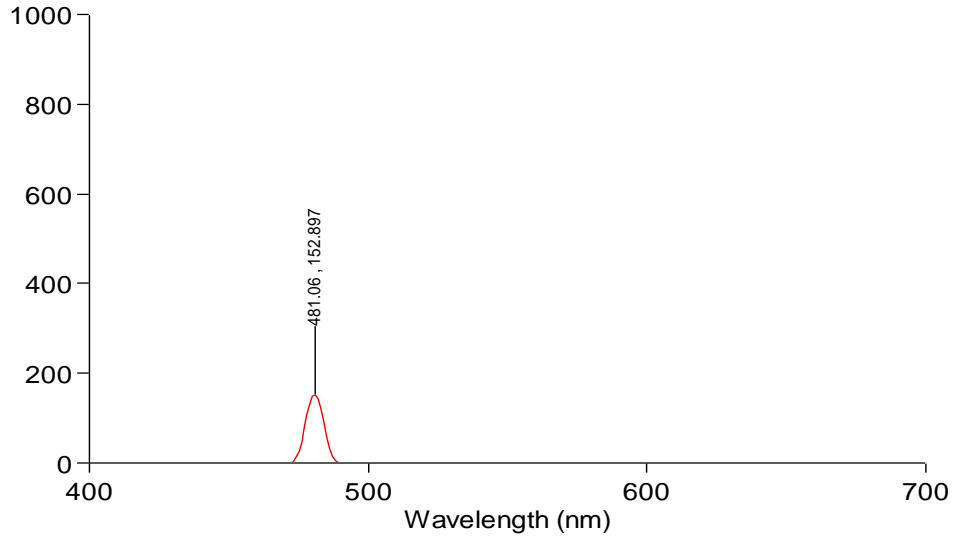
3.1.8.2. Kuantum Nanokristallerle Floresans Ölçümleri

Bölüm 2.2.10' da anlatıldığı üzere Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sahip primerlerin teşhisinde kullanılan kuantum nonokristallerin 480 nm' deki floresans spektrumu aşağıda verilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. 1 ppm Kuantum nanokristalin floresans spektrumu Ex:480 nm

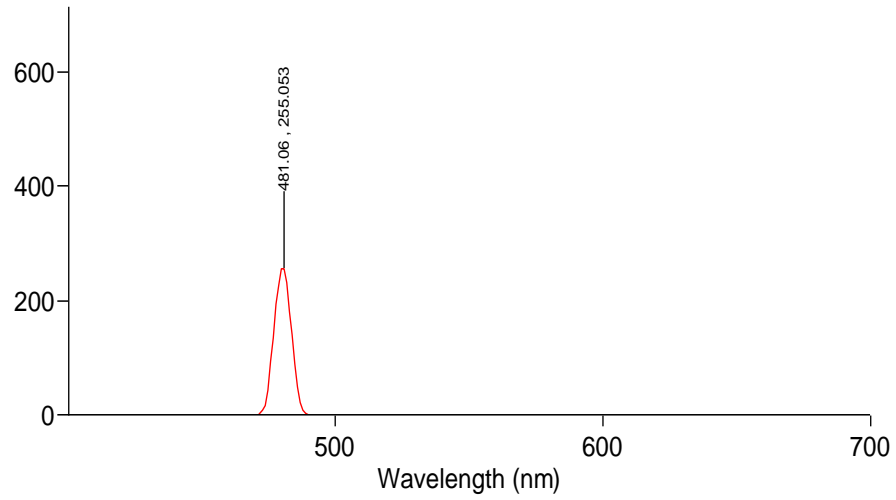
Kuantum nanokristal üzerine MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys eklendikten sonra 480 nm’deki floresans spektrumu Şekil 3.9’de verilmiştir.



Şekil 3.9. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] floresans spektrumu Ex:480 nm

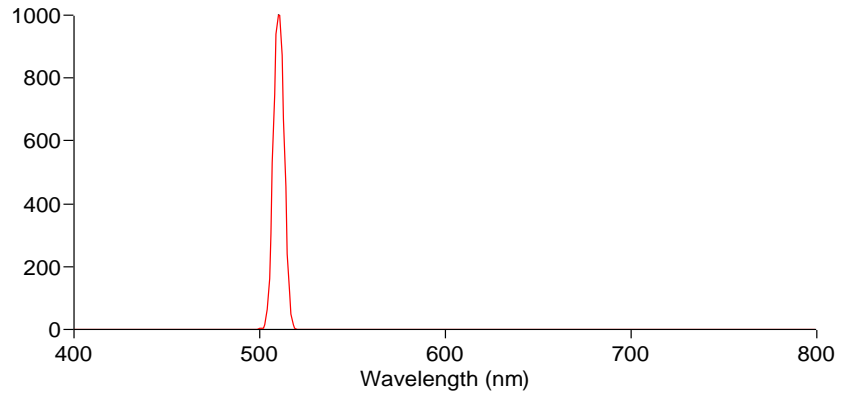
Kuantum nanokristalin floresans şiddeti 77.678 iken MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys ile etkileştikten sonra şiddetin 152.897’ye çıktığı görüldü.

Elde edilen floresans yapı üzerine streptavidin ilave edildiği zaman floresans spektrumunda 255.053’ye kadar pik şiddetinde artış gözlenmiştir (Şekil 3.10).



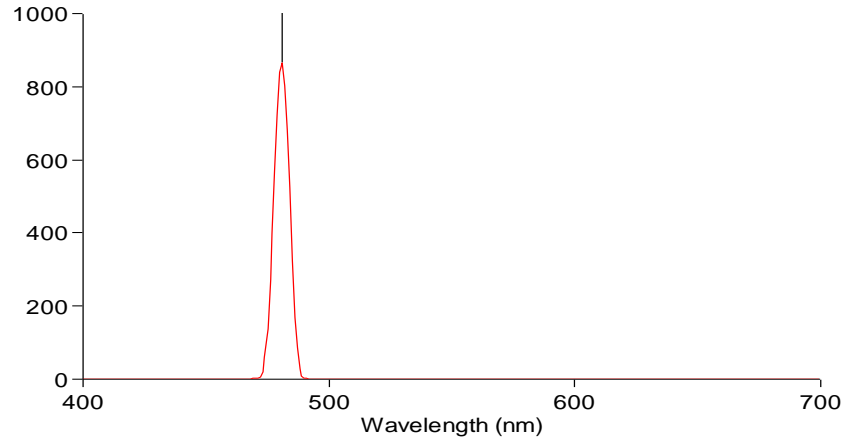
Şekil 3.10. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin floresans spektrumu Ex:480 nm

Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin üzerine floresans kuveti içerisinde 5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primerinden eklendiği anda 480 nm' deki floresans şiddetinde yüksek bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.11).



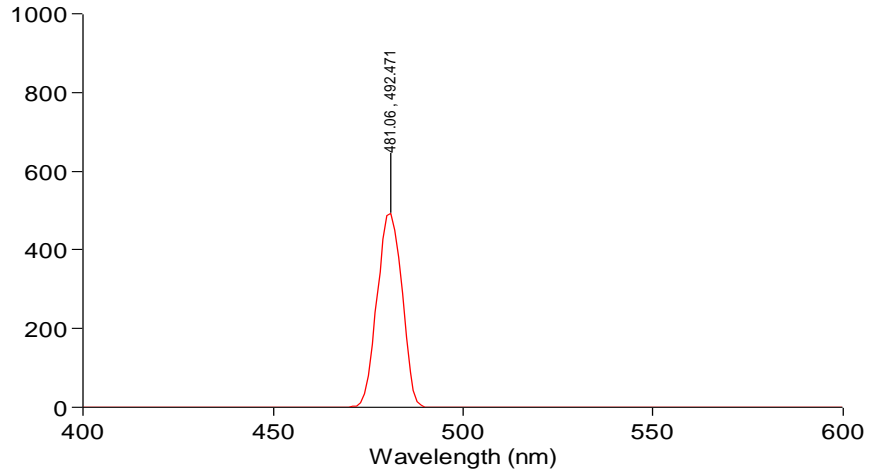
Şekil 3.11. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] – streptavidin 5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin üzerine floresans kuveti içerisinde 2,5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primerinden eklendiği anda 480 nm' deki floresans şiddetinde yüksek bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.12).



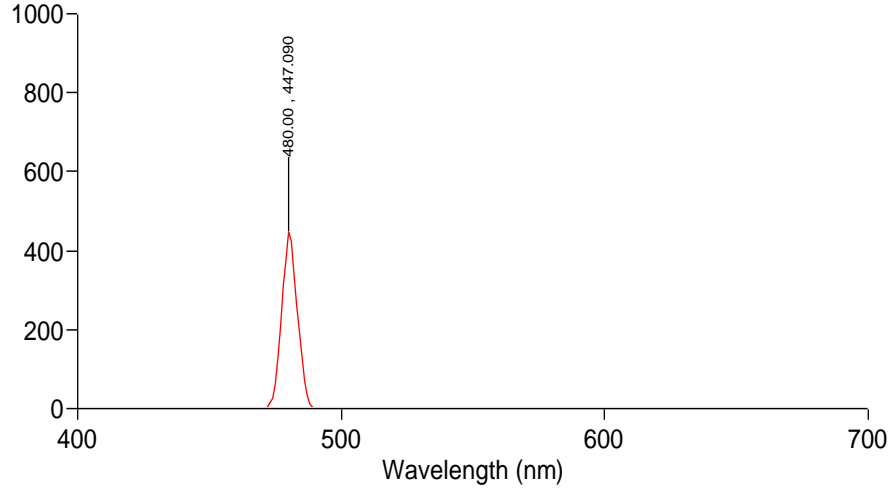
Şekil 3.12. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] – streptavidin 2,5 ppm biyotinlenmiş KKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin üzerine floresans küveti içerisinde 1 ppm biyotinlenmiş KKA-F primerinden eklendiği anda 480 nm’deki floresans şiddetinde yüksek bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.13).



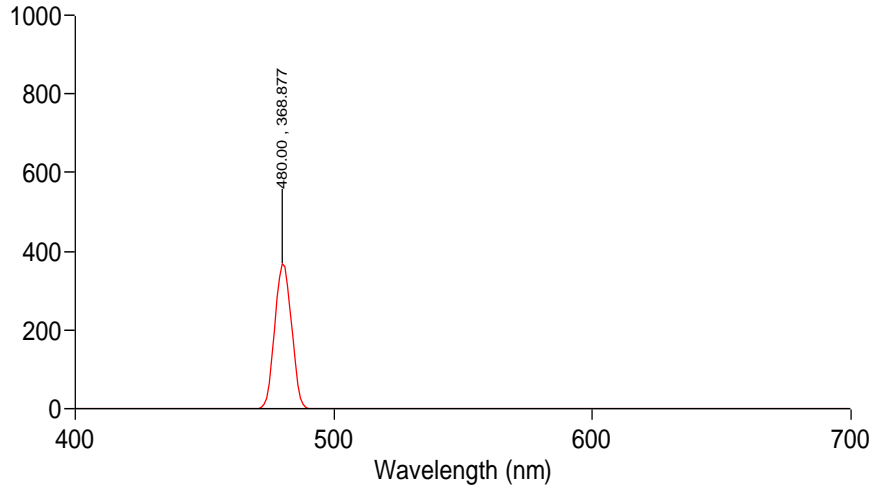
Şekil 3.13. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] – streptavidin 1 ppm biyotinlenmiş KKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin üzerine floresans küveti içerisinde 0,05 ppm biyotinlenmiş KKA-F primerinden eklendiği anda 480 nm’deki floresans şiddetinde yüksek bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] – streptavidin 0,05 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

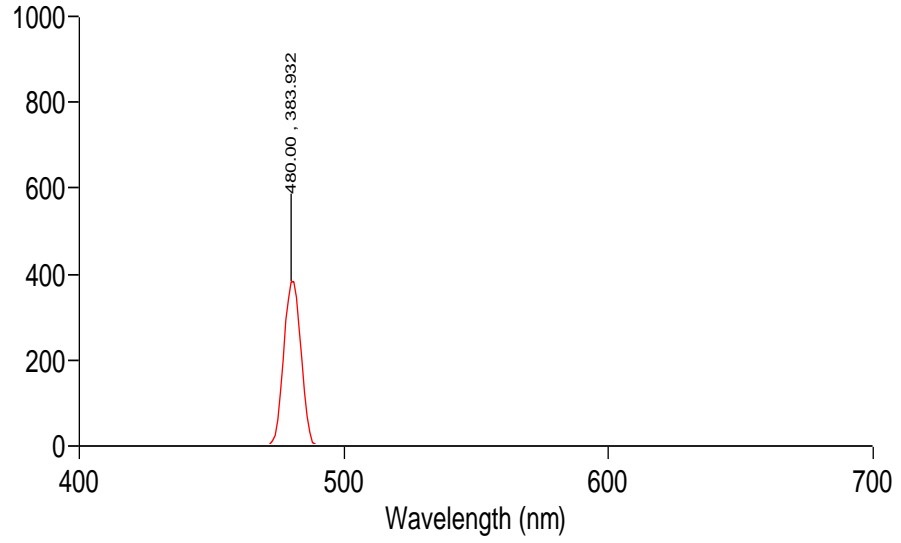
Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin üzerine floresans kuveti içerisinde 0,01 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primerinden eklendiği anda 480 nm’deki floresans şiddetinde yüksek bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.15).



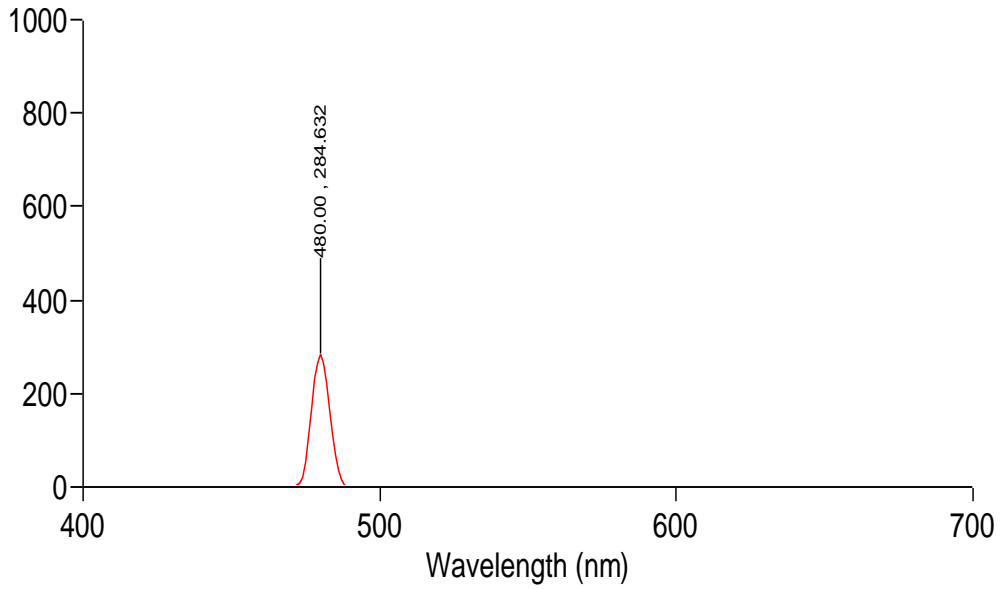
Şekil 3.15. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] – streptavidin 0,01 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

Yaklaşık 1 saat süre ile floresans piklerin şiddetinde meydana gelen artışın düşmediği not edilmiştir. Ancak KKKA-R primerini yani ssDNA’ nın eşleniğini ayrı ayrı 5 ppm’ lik (Şekil 3.16), 2,5 ppm’ lik (Şekil 3.17), 1 ppm’ lik (Şekil 3.18), 0,05 ppm’ lik (Şekil 3.19) ve 0,01 ppm’ lik (Şekil 3.20) biyotinlenmiş KKKA-F

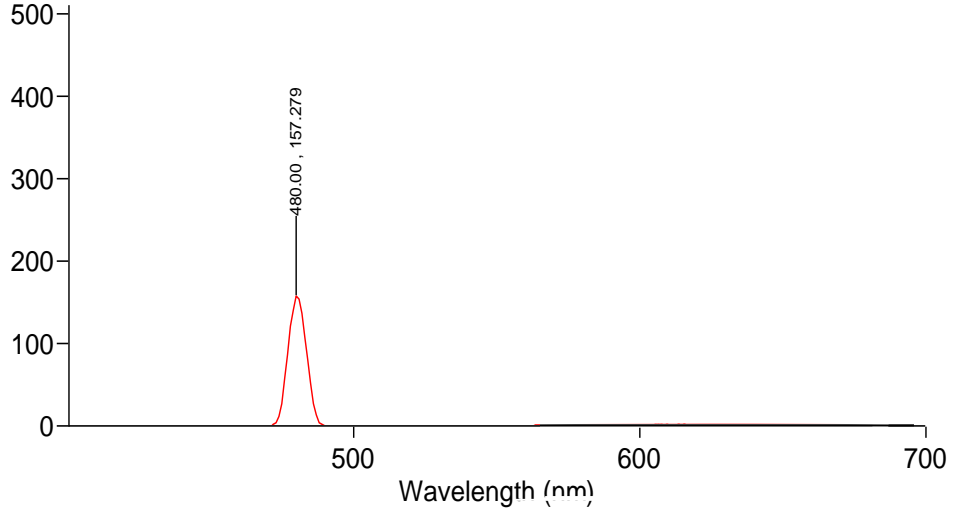
pirmerinin eklendiği çözeltilerin ortamına eklediğimiz zaman tüm çözeltilerin pik şiddetlerinde kayda değer bir azalış meydana geldiği gözlenmiştir.



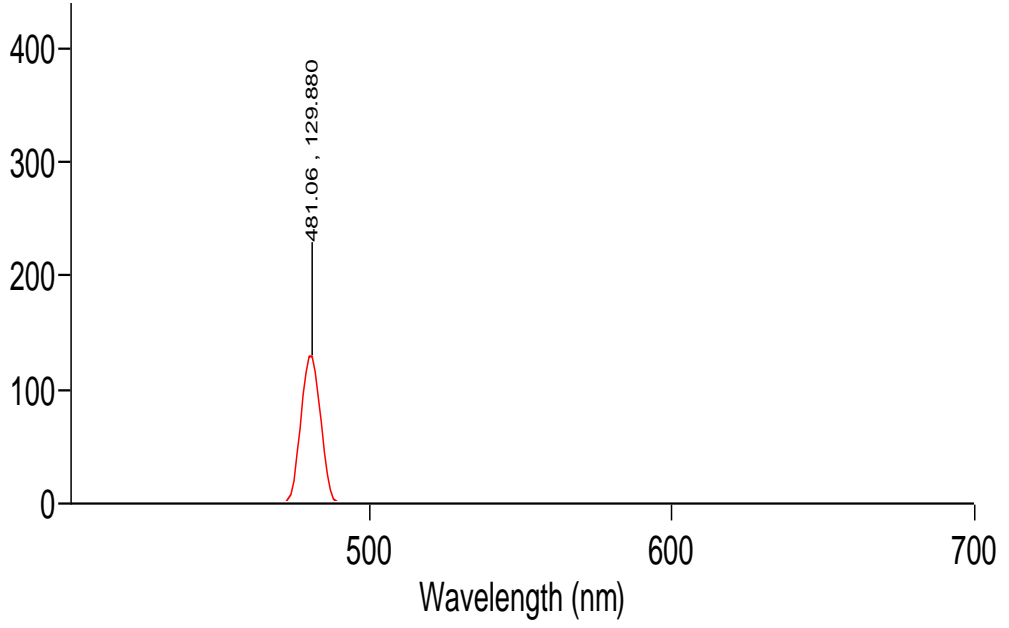
Şekil 3.16. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin 5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm



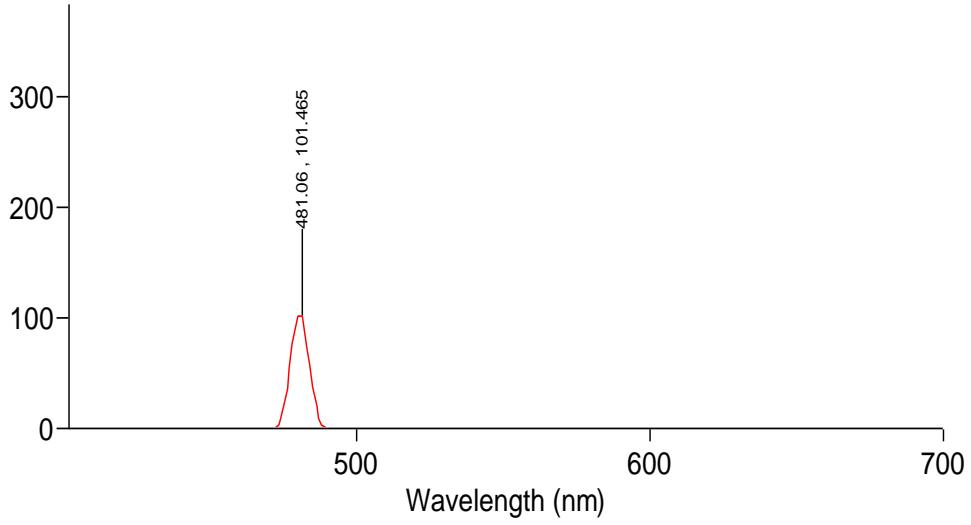
Şekil 3.17. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin 2,5 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm



Şekil 3.18. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin 1 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm



Şekil 3.19. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin 0,05 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm



Şekil 3.20. Kuantum nanokristal - [MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys] - streptavidin 0,01 ppm biyotinlenmiş KKKA-F primeri- KKKA-R primeri floresans spektrumu Ex:480 nm

Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’ de meydana gelen düşüştürme yolu çıkılarak KKKA hastalığına sahip primerin eşlenişini ortama ilave ettiğimiz anda bağlanmanın gerçekleşmesiyle beraber floresans pik şiddetinde sönümlenme meydana geldiği görülmektedir.

Özetle, kuantum nanokristallerin fotosensitif monomer haptin(MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys) eklenmesiyle fotostabilitelerinin ve floresans şiddetinin arttığı, APS eşliğinde streptavidin ilavesiyle nanokristallerin çekirdeğinin dış etkileşimlerden daha da fazla korunarak fotostabil hale getirildiği ve biyotin uçlarında bu korumayı avidite etkileşimiyle daha da fazlalaştırdığı not edilmelidir. Diğer taraftan, komplementer ssDNA ile etkileşim sonrası sönümlenme gözlemlendiği ve bu etkileşimin derişimle orantılı azaldığı izlenmiştir.

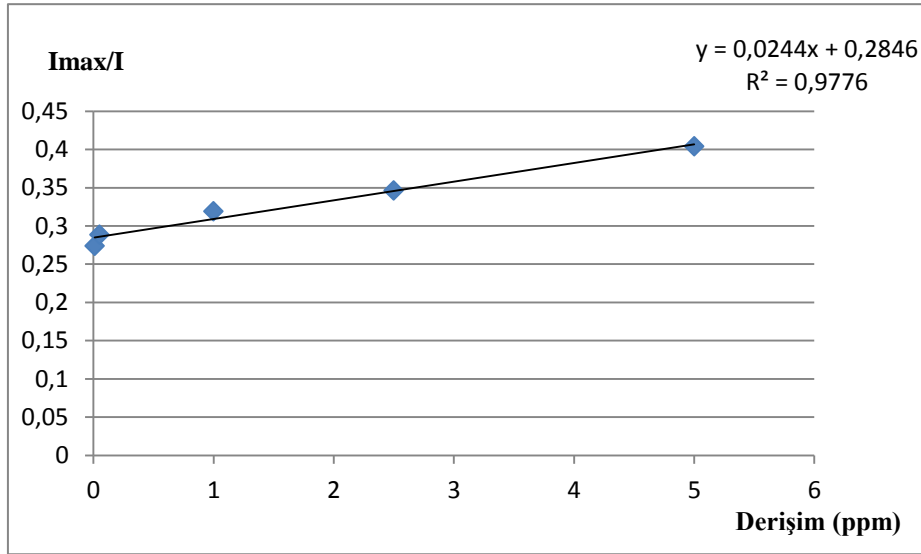
3.1.9. Nanokristallerle Yapılan KKKA Hastalığının Teşhisi

Farklı derişimlerde eklenen biyotinlenmiş ssDNA’ ların eklenmesinin sonrasında eşlenişinin ilave edilmesiyle birlikte sönümlenme meydana gelmiştir. Stern-volmer gerçekleşen bu sönümlenmeyi floresans şiddetlerinden yararlanarak grafiğe dönüştürmüştür (Tablo 3-1).

Tablo 3-1. Stern-Volmer grafiği verileri

Derişim (ppm)	I _{max}	I	I _{max} /I
0,002	81	320	0,25
0,01	101	369	0,27
0,05	129	447	0,29
1	157	492	0,32
2,5	284	820	0,35
5	384	950	0,40

Yukarıdaki verilere göre elde edilen Stern-Volmer grafiği aşağıda verilmiştir (şekil 3.21). Her bir ölçüm değeri 3 bağımsız ölçümün tekrarının ortalamasına göre hesaplanmış olup, kalibrasyon grafiğine geğirilmiştir.



şekil 3.21. Stern-Volmer grafiği

Elde edilen verilere ve hesaplamalara göre Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının tayin sınırı 0,028 nM (28 pM) olarak bulunmuştur. Literatür bilgilerine göre kuvantum nanokristallerle hibridizasyona dayalı tayin sınırlarının en düşük değerleri 5 nM [73], 6,7 nM [74], 25 nM [75], 66,4 nM [76] iken geliştirilen yöntemle 28 pM (0,028 nM)' a kadar düşük tayin sınırlarına inilebilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) metoduna göre sentezlenen kriyojel kolon aracılığıyla primerlerin 5' ucundan biyotinlenmesi tek basamakta gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle metakriloil amino tirozin monomeri sentezlenmiştir. Sentezlenen monomer rutenyum ile kompleks oluşturarak fotosensitif özellik kazandırılmıştır. Elde edilen fotosensitif monomer ile çapraz bağlı hidroksietilmetakrilat (HEMA) tabanlı monolitik kriyojel kolon yapısına komonomer olarak DNA ligaz eklenerek kriyojel kolon p(hema-ko-DNA ligaz) sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda sentezlenen kriyojel kolonun 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı 84,733 m²/g polimer, denge şişme oranı % 780 ve 1 g kriyojel örneğinin 10.463 g su tuttuğu bulunmuştur. Sentezlenen DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon SEM ile incelenmiş ve Şekil 3.2' de görüldüğü gibi gözenek boyutu büyük, heterojen dağılıma sahip kriyojeller elde edilmiştir. DNA ligazın çalışması için ortama ATP sağlanmıştır. Ayrıca enzim ve proteinlerin ikincil yapılarını incelemek amacıyla alınan CD spektrumuna göre DNA ligazın elde edilen ikincil yapısının alfa heliks yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 3.4).

Çalışmanın ikinci aşamasında, sentezlenen enzim tabanlı kriyojel kolon sistemi ile Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığına sahip olan primerin 5' ucuna biyotin bağlanarak avidite etkinliği oluşturulmuştur. Bu etkileşimin ispatı, numunelerin mikropilaka okuyucu ile 354 nm' de elde edilen absorbans değerlerinde görülen artış ile yapılmıştır. Sürekli sistemde DNA ligaz kriyojel kolondan geçirilen numunelerin başlangıç dakikalarında yaklaşık aynı değerlerde olan absorbans değeri 48-51 dakikalar arasında anlık olarak maksimum değere ulaşmıştır. Absorbanstaki belirgin artışın olduğu dakikalardaki numunelerin çözücüleri liyofilizatör ile uzaklaştırılmıştır. Böylece derişimi bilinen çözeltiler ile Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi teşhisinin düşük tayin sınırları bulunmuştur.

Tasarlanan KKKA hastalığına sahip olan primerlerin etkinliği ise reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile kanıtlanmıştır. RT-PCR işlemi tek aşamalı bir reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Farklı ortam koşullarında

yapılan denemeler sonucunda uygun sıcaklıklar ve oranlar belirlenmiştir. Primerlerin DNA' daki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek annealing sıcaklığı (T_m) 53 °C olarak bulunmuştur. Şekil 3.6' da görüldüğü üzere agaroz jel görüntüsünde elde edilen bandın yaklaşık olarak 536 baz çifti içerdiği görülmektedir [77].

Çalışmanın son aşamasında, floresans özelliği gösteren streptavidin çapraz bağlı ve fotostabil Kuantum nanokristal (QD) platformlar yardımıyla biyotinlenmiş 5'-ssDNA problemlerinin kovalent bağlanması ve hastalık tanısı sağlayacak 3'-ssDNA komplementlerinin hibridizasyonuna dayalı floresans değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan Kuantum nanokristal çözeltilerine fotosensitif monomer olarak MACys-Ru(bipyridil)₂-MACys ilave edilerek sistein ayağı oluşturulmuştur. Başlangıçta floresans şiddeti 77.678 olan kuantum nanokristalin floresans MACys-Ru(bipyridil)₂-MACys ile etkileştirildikten sonra floresans şiddeti 152.897 olarak gözlenmiştir. Floresans şiddetindeki değişimden yararlanarak etkileşimin tamamlandığına karar verilmiştir. Elde edilen çözelti üzerine biyotinle yüksek afiniteye sahip olan streptavidin eklendiği zaman ise floresans şiddeti 255.053' e yükselmiştir. Böylece kuantum nanokristallerin fotosensitif monomer hapten(MACys-Ru(bipiridil)₂-MACys) eklenmesiyle fotostabiliteilerinin ve floresans şiddetinin arttığı, APS eşliğinde streptavidin ilavesiyle nanokristallerin çekirdeğinin dış etkileşimlerden daha da fazla korunarak fotostabil hale getirildiği ve biyotin uçlarında bu korumayı avidite etkileşimiyle daha da fazlalaştırdığı not edilmelidir. Diğer taraftan, komplementer ssDNA ile etkileşim sonrası sönümlenme gözlendiği ve bu etkileşimin derişimle orantılı azaldığı izlenmiştir. Karışım içerisine eklenen streptavidinin CD spektrumuna bakıldığında ikincil yapısının beta tabaka yapısına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3.5). DNA ligaz çapraz bağlı fotosensitif kriyojel kolon yardımıyla biyotinlenen 5'-ssDNA probunun eklenmesiyle floresans rezonans enerji transferi (FRET) gerçekleşerek floresans şiddetinde tayin sınırlarının da dışında olacak şekilde şiddetli artış gözlenmiştir. Bu artış Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sahip olan primerden yola çıkılarak teşhis edilmiştir. Bu olayın sönümlenmesi yalnızca ortama 5'-ssDNA' nın eşleniğinin yani 3'-ssDNA komplementlerinin eklenmesiyle hibridizasyona dayalı bir sönümlenme meydana

gelmiştir. Aynı tayinler farklı derişimlerdeki biyotinlenmiş 5'-ssDNA problemleri ile yapılmıştır. 5 ppm' lik biyotinlenmiş 5'-ssDNA' nın ortama eklenmesiyle çok yüksek olan floresans şiddeti tayin sınırları arasına girmiştir (950.812).

Floresans şiddetlerindeki sönümlemeden yararlanarak elde edilen verilere ve hesaplamalara göre her bir ölçüm değeri 3 bağımsız ölçümün tekrarının ortalamasına göre hesaplanmış olup Stern-Volmer kalibrasyon grafiğine geçirilmiştir (Şekil 3.21). Çizilen grafikten elde edilen verilere göre Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının tayin sınırı 0,028 nM (28 pM) olarak bulunmuştur. Literatür bilgilerine göre ise kuvantum nanokristallerle hibridizasyona dayalı tayin sınırlarının en düşük değerleri 5 nM [73], 6,7 nM [74], 25 nM [75], 66,4 nM [76] iken geliştirilen yöntemle 28 pM (0,028 nM)' a kadar düşük tayin sınırlarına inilebilmiştir.

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sahip olan bir insanın DNA' sı 5' ucundan uyguladığımız yöntemle biyotinlenerek çok düşük derişim varlığında bile (0,028 nM) tayin sağlayabilecek streptavidin tabanlı fotostabil, floresans özellikli, raf ömrü uzun nanokristaller sentezlenmiş ve ilk kez bu amaçla kullanılabilecekleri ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] O. Ergonül, «Crimean-Congo Hemorrhagic Fever,» *Lancet Infect Dis*, cilt 6, no. 4, pp. 203-214, 2006.
- [2] L. Yashina, O. Vyshemirskii, S. Seregin, L. Petrova, E. Samokhvalov, D. Lvov, V. Gutorov, I. Kuzina, G. Tvunnikov, Y. W. Tang, S. Netesov ve V. Petrov, «Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia,» *J Clin Microbiol*, cilt 41, no. 2, pp. 860-862, 2003.
- [3] H. Hoogstraal, «The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa,» *J Med Entomol*, cilt 15, pp. 307-417, 1979.
- [4] S. T. Nichol, «Bunyaviruses. Ed: Knipe, D.M., Howley, P.M. Fields Virology, vol. 1, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins,» *Philadelphia*, pp. 1603-1633, 2001.
- [5] P. Bossi, A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Maidhoff ve G. Gouvras, «Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public,» *Euro Surveill*, cilt 9, no. 12, pp. E11-E12, 2004.
- [6] F. J. Burt ve R. Swanepoel, «Molecular Epidemiology of African and Asian Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Isolates,» *Epidemiol Infect*, cilt 133, no. 4, pp. 659-666, 2005.
- [7] B. Le Guenno, «Emerging viruses,» *Sci Am*, cilt 273, pp. 56-64, 1995.
- [8] R. M. Eliot, M. Bouloy, C. M. Calisher, R. Goldbach, J. T. Moyer, S. Nichol, R. Pettersson, A. Plyusnin ve C. Schmalijohn, «Family Bunyaviridae. Virus taxonomy. Seventh report international committee for the taxonomy of viruses. Ed: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeorgh, D., Pringle, C,» *Academic Pres*, pp. 599-621, 2000.
- [9] j. p. Clerx, j. Casals ve D. H. Bishop, «Structural characteristics of nairoviruses (Genus Nairovirus, Bunyaviridae),» *Gen Viral*, cilt 55, pp. 165-178, 1981.

- [10] M. V. Van Regenmorte, C. M. Fauguet, D. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estek, S. M. Lemon, J. Manilaff, M. A. Mago, D. J. McGeach, C. R. Pringle ve R. B. Wicknen, «7th report of the international committee of taxonomy of viruses,» *Virus Taxonomy*, pp. 599-621, 2000.
- [11] S. Haferkamp, L. Fernando, T. F. Schwarz, H. Feldmann ve R. Flick, «Intracellular localization of Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus glycoproteins,» *Virology Journal*, cilt 2, no. 42, pp. doi: 10,1186/ 1743-422X-2-42, 2005.
- [12] C. A. Whitehouse, «Crimean-Congo hemorrhagic fever,» *Antiviral Res*, cilt 64, no. 3, p. 145 – 160, 2004.
- [13] B. D. Lindenbach, C. M. Rice ve R. M. Chanock, «Flaviviridae: the viruses and their replication. In Fields virology. 4th edition. Edited by: Knippe DM, Howley PM, et al.. Philadelphia, PA:Lippincot,» *Williamd & Willkins*, pp. 991-1041, 2001.
- [14] S. Chinikar, F. Ahmadnejad, A. Fayaz, N. Hosseini, N. Afzali, M. Gooya, M. Zeinali ve C. A. Whitehouse, «Crimean-Congo Hemorrhagic Fever,» *Antiviral Res*, cilt 64, no. 3, pp. 145 - 160, 2004.
- [15] M. Mardani, M. Goya, M. Zanalı ve M. K. Jahromi, «Clinico-Epidemiologic Feature and Outcome Analysis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Iran,» *europen society of clinical microbiology and infectious diseases*, pp. 1999-2006, 2006.
- [16] Anonim, «http://www.saglik.gov.tr/saglik_bakanligi/Keneler,» 2007a. [Çevrimiçi].
- [17] B. W. Van De Wal, J. R. Joubert, P. J. Van Eeden ve J. B. King, «A Nosocomial Outbreak of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever at Tygerberg Hospital. Part IV. Preventive and Prophylactic Measures,» *S Afr Med J.*, cilt 68, no. 10, p. 729 – 732, 1985.
- [18] A. Papa, B. Bozovi, V. Pavlidou, E. Papadimitriou, M. Pelemis ve A. Antoniadis, «Genetic Detection and Isolation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus,Kosovo, Yugoslavia,» *Emerg Infect Dis*, cilt 8, no. 8, pp. 852 - 854, 2002b.

- [19] Z. Ozkurt, I. Kiki, S. Erol, F. Erdem, N. Yılmaz, M. Parlak, M. Gundogdu ve M. A. Tasyaran, «Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Eastern Turkey: Clinical Features Risk Factors and Efficacy of Ribavirin Therapy,» *J Infect*, cilt 52, no. 3, pp. 207 - 215, 2006.
- [20] M. Bakır, M. Ugurlu, B. Dokuzoguz, H. Bodur, M. A. Tasyaran ve H. Vahaboglu, «Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Outbreak in Middle Anatolia: A Multicentre Study of Clinical Features and Outcome Measures,» *J Med Microbiol*, cilt 54, no. Pt4, pp. 385-389, 2005.
- [21] S. Garcia, S. Chinikar, D. Coudrier, A. Billecocq, B. Hooshmand, J. M. Crance, D. Garin ve M. Bouloy, «Evaluation of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Recombinant Antigen Expressed by Semliki Forest Suicide Virus for IgM and IgG Antibody Detection in Human and Animal Sera Collected in Iran,» *Journal of Clinical Virology*, cilt 35, pp. 154-159, 2006.
- [22] S. S. Karti, Z. Odabasi, V. Kortten ve et al, «Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey,» *Emerg Infect Dis*, cilt 19, pp. 1379-1384, 2004.
- [23] F. A. Murphy, A. K. Harrison ve T. Tzianabos, «Electron microscopic observations of mouse brain infected with Bunyamwera group arboviruses,» *J Virol*, cilt 2, pp. 1315-1325, 1968.
- [24] M. Bakir, «Kırım Kongo Hemorajik Ateşi,» *ANKEM*, cilt 18, no. EK-2, pp. 90-93, 2004.
- [25] C. S. Schmaljohn ve J. W. Hooper, «Bunyaviridae: the viruses and their replication,» *Fields Virology. Ed: Knipe, D.M., Howley, P.M., Philadelphia*, pp. 1581-1602, 2001.
- [26] R. M. Eliot, C. S. Schmaljohn ve M. S. Collet, «Bunyaviridae genom structure and gene expression,» *Curr Top Microbiol Immunol*, cilt 169, p. 91-141, 1991.
- [27] S. Morikawa, T. Qing, Z. Xinqin, M. Saijo ve I. Kurane, «Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China,» *Virology*, cilt 296, no. 1, p. 159 - 164, 2002.
- [28] A. Papa, B. Ma, S. Kouidou, Q. Tang, C. Hang ve A. Antoniadis, «Genetic

- characterization of the M RNA segment of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains, China,» *Emerg Infect Dis*, cilt 8, no. 1, pp. 50-53, 2002.
- [29] T. C. Mettenleiter, «Herpesvirus assembly and egress,» *J Virol*, cilt 76, no. 4, pp. 1537-1547, 2002.
- [30] R. Say, A. Ersöz, D. Hür, F. Yılmaz, A. Denizli, A. Atılır Özcan, S. Emir Diltemiz, S. Yazar, Ö. Biçen , S. Büyüktiryaki, R. Keçili, G. Saka ve T. Fındık, «Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage And Bioconjugation Applications in Life Sciences And Biotechnology». ABD Patent Patent: WO/2011/070402, 16 06 2011.
- [31] E. Keha ve İ. Kührevioğlu, *Biyokimya*, Erzurum: Aktif Yayınevi, 2004.
- [32] G. Bingöl, %1 içinde *Biyokimya*, Ankara: Güven Matbaası, 1983.
- [33] E. Zıyan, *Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (Pyrus communis)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*, Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD,, 1998.
- [34] H. Ako ve W. K. Nip, «Enzyme Classification and Nomenclature,» *Food Biochemistry and Food Processing*, p. 135–154, 2007.
- [35] A. Özler, *Malatya kayısısından (prunus armeniaca l.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [36] S. Dumitriu, M. Popa ve M. Dumitriu, «Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers,» *J. Bioact. Compat. Pol*, cilt 3, pp. 243-312, 1988.
- [37] E. S. John, «Biotechnology Principle,» *I. Van Nostran Reinhold Co. Ltd., U.K.*, cilt 18, p. 1465–1473, 1985.
- [38] B. Mattiasson ve R. Kaul, «Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology». In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications,» (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY. , p. 161–179, 1991.*
- [39] C. A. White ve J. F. Kennedy, «Popular matrices for enzyme and other immobilizations,» *Enzyme Microb. Technol*, cilt 2, p. 82–90, 1990.

- [40] R. F. Taylor, «Commercially available supports for protein immobilization. In: Protein immobilization,» *Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY*, p. 139–160, 1991.
- [41] G. Sanjay ve S. Sugunan, «Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10,» *Food Chem*, cilt 94, pp. 573- 579, 2006.
- [42] A. Telefoncu, «Immobilize Enzimler,» *Enzimoloji (Yaz Okulu)*, Ed. A. Telefoncu, 1997.
- [43] O. Zaborsky, «Adsorption Immobilized Enzyme,» Ed. by Weast, R. C., *CRC Press, Ohio*, 1973.
- [44] P. W. Carr ve L. D. Bowers, «Support considerations in chemical analysis,» *Enzymes, Academic Press, New York*, cilt 56, pp. 167-170, 1980.
- [45] Y. M. Arica ve V. N. Hasırcı, «Immobilization for the production of membranes,» *Biomaterials*, pp. 8: 489-495 60:507-514, 1987.
- [46] R. İnam, T. Çaykara ve C. Özyürek, «Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels,» *Sep Sci Technol*, cilt 36, no. 7, pp. 1451-1461, 2001.
- [47] H. Karadag, *Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu*, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2001.
- [48] D. T. Michael, *Immobilized Enzyme*, New York: John Wiley and Sons, 1980.
- [49] F. Saburo ve T. Atsuo, *Application of Biocatalyst Immobilized by Polymer Methods, Enzyme Engineering*, New York: Plenum Press, 1985.
- [50] M. Andac, I. Y. Galaev ve A. Denizli, «Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, cilt 109, pp. 259-25, 2013.
- [51] S. Sun, Y. Tang, Q. Fu, X. Liu, L. Guo, Y. Zhao ve C. Chang, «Monolithic cryogels made of agarose-chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G,» *International Journal of Biological Macromolecules*, cilt 50, no. 4, p. 1002–1007, 2012.

- [52] P. Hughes, C. R. Lowe ve R. F. Sherwood, «Metal-ion promoted binding of triazine dyes to proteins: the interaction of Cibacron Blue F3GA with yeast hexokinase,» *Biochem. J.*, cilt 205, pp. 453-460, 1982.
- [53] A. Çavuş, Z. Baysal ve H. Alkan, «Preparation of poly(hydroxyethylmethacrylate) cryogels containing l-histidine for insulin recognition,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, cilt 107, pp. 84-89, 2013.
- [54] Ö. Biçen, *Moleküler Baskılanmış Polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [55] R. Üzek, L. Uzun, S. Şenel ve A. Denizli, «Nanospines incorporation into the structure of the hydrophobic cryogels via novel cryogelation method: An alternative sorbent for plasmid DNA purification,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, cilt 102, pp. 243-250, 2013.
- [56] M. B. Dainiak, A. Kumar, F. M. Plieva, L. Y. Galaev ve B. Mattiasson, «Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels,» *Journal of Chromatography A*, cilt 1045, no. 1-2, pp. 93-98, 2004.
- [57] I. R. Lehman, «DNA ligase: structure, mechanism, and function,» *Science*, cilt 186, pp. 790-797, 1974.
- [58] T. Tom Ellenberger ve A. E. Tomkinson, «Eukaryotic DNA Ligases: Structural and Functional Insights,» *Ann. Review of Biochemistry*, cilt 77, pp. 313-338, 2008.
- [59] C. W. Fuller, B. B. Beauchamp, M. J. Engler ve R. L. Lec, «Mechanisms for the Initiation of Bacteriophage T7 DNA Replication,» *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, cilt 47, pp. 669-679, 1983.
- [60] J. Moser, H. Kool, I. Giakzidis ve K. Caldecott, «Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III-alpha in a cell-cycle-specific manner,» *Molec. Cell*, cilt 27, pp. 311-323, 2007.
- [61] J. Hen, A. E. Tomkinson, W. Ramos ve Z. B. Mackey, «Mammalian DNA

ligase III: molecular cloning, chromosomal localization, and expression in spermatocytes undergoing meiotic recombination,» *Molec. Cell Biol.*, cilt 15, pp. 5412-5422, 1995.

- [62] N. I. o. Healts, Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Washington D.C: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 1998, pp. 374-389.
- [63] A. Chapman-Smith ve J. J. Cronan, «Molecular biology of biotin attachment to proteins,» *J Nutr*, cilt 129, no. 2S Suppl, pp. 477S-484S, 1999.
- [64] W. A. Hendrickson, A. Pahler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merrit ve R. P. Phizackerley, «Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation,» *PNAS*, cilt 86, no. 7, pp. 2190-2194, 1989.
- [65] X. Xu ve G. Screaton, «MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function,» *J Immunol Methods*, cilt 268, no. 1, pp. 21-28, 2002.
- [66] M. Howarth, D. Chinnapen, K. Gerrow ve P. Dorrestein, «A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site,» *Nat Methods*, cilt 3, no. 4, pp. 267-273, 2006.
- [67] S. Wu ve S. Wong, «Engineering soluble monomeric streptavidin with reversible biotin binding capability,» *J Biol Chem*, cilt 280, no. 24, pp. 23225-23231, 2005.
- [68] L. Rossetti, S. Nakahara ve L. Brus, «Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution,» *Journal of Chemical Physics*, cilt 79, no. 2, pp. 1086-1102, 1983.
- [69] D. J. Norris, *Measurement and Assignment of the Size-Dependent Optical Spectrum in Cadmium Selenide (CdSe) Quantum Dots*, MIT, 1995.
- [70] C. B. Murray, C. R. Kagan ve M. G. Bawendi, «Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies,» *Annual Review of Materials Research*, cilt 30, no. 1, pp. 545-610, 2000.

- [71] A. Ekimov ve A. Onushchenko, «Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor micro-crystals,» *Soviet Physics Semiconductors-USSR*, cilt 16, no. 7, pp. 775-778, 1982.
- [72] A. Khare, A. W. Wills, L. M. Ammerman, D. J. Norris ve E. S. Aydil, «Size control and quantum confinement in Cu₂ZnSnS₄ nanocrystals,» *Chem. Commun*, cilt 47, no. 42, pp. 11721-11723, 2011.
- [73] G. Jiang, A. S. Susha, A. A. Lutich, F. D. Stefani, . J. Feldmann ve A. L. Rogach, «Cascaded FRET in Conjugated Polymer/Quantum Dot/Dye-Labeled DNA Complexes for DNA Hybridization Detection,» *ACS Nano*, cilt 12, no. 3, p. 4127–4131, 2009.
- [74] H. Peng, L. Zhang, T. H. M. Kja'llman, S. Christian ve J. Travas-Sejdic, «DNA Hybridization Detection with Blue Luminescent Quantum Dots and Dye-Labeled Single-Stranded DNA,» *JACS Communications*, cilt 129, pp. 3048-3049, 2007.
- [75] D. Zhou, L. Ying, X. Hong, E. A. Hall, C. Abell ve D. Klenerman, «A Compact Functional Quantum Dot-DNA Conjugate: Preparation, Hybridization, and Specific Label-Free DNA Detection,» *Langmuir*, cilt 24, pp. 1659-1664, 2008.
- [76] D. Zhang, *Towards On-site Detection of Nucleic Acids for Pathogen Monitoring*, Miami: University of Miami Scholarly Repository, 2013.
- [77] F. J. Burta, P. A. Lemana, J. F. Smithb ve R. Swanepoela, «The use of a reverse transcription–polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean–Congo haemorrhagic fever,» *Elsevier*, cilt 70, no. 2, p. 129–137, 1998.