

**YAPISINDA BİRDEN FAZLA FONKSİYONU
BARINDIRAN HETERO NANO-ENZİM
YAPILAR VE ELISA UYGULAMALARI**

Ender KÖSE
Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı
Ocak 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ender KÖSE' nin “**Yapısında birden fazla fonksiyonu barındıran hetero nano-enzim yapılar ve ELISA uygulamaları**” başlıklı Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 30/01/2015 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. Lütfi GENÇ | |
| Üye : Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ | |

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YAPISINDA BİRDEN FAZLA FONKSİYONU BARINDIRAN HETERO NANO-ENZİM YAPILAR VE ELISA UYGULAMALARI

Ender KÖSE

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2015, 51 sayfa

Bu çalışmada rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) yöntemi kullanılarak, yapısında birden fazla enzim barındıran nano yapılar sentezlenmiş ve sentezlenen bu nano-enzimlerin ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) uygulamalarında kullanımları incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak horseradish peroksidaz (HRP) ve alkalin fosfataz (ALP) enzimleri, bis (2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ rutenyum (II) fotosensitif monomeri ile çapraz bağlı nano yapılar mikro emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile gün ışığında, azot atmosferinde ve oda sıcaklığında sentezlenmiş ve bu nano yapılar geçirgenlik elektron mikroskobu (TEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), zetametre ile boyut ve potansiyel analizi ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, HRP ve ALP'nin çapraz bağlandığı hetero nano-enzim ile kinetik çalışmalar yapılmıştır. Kinetik çalışmalar sonucunda hetero nano-enzimin tetrametilbenzidin substratına karşı optimum pH' ı 5, $K_m= 26$ mM, $V_{mak}=1,24 \times 10^{-2}$ U ve p-nitrofenilfosfat substratına karşı optimum pH' ı 10, $K_m=0,516$ mM, $V_{mak}= 1,70 \times 10^{-4}$ U olarak bulunmuştur. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler denatüre olurken sentezlenen hetero nano-enzim yapı aktivitesini kaybetmemiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları, metil alkol ile yıkanan nano yapının aktivitesinde on beşinci tekrarda bile önemli bir düşüş olmadığını göstermiştir.

Çalışmanın son aşamasında nano enzim yapısı antikor ile konjuge edilerek ELISA uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Nanoenzim, HRP, ALP, Fotosensitif Monomer, ELISA

ABSTRACT

Master of Science Thesis

HETERO NANO-ENZYME STRUCTURES HAVING MULTIPLE FUNCTIONS AND THEIR ELISA APPLICATIONS

Ender KÖSE

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program

Supervisor: Prof. Dr. Ridvan SAY

2015, 51 pages

In this study, nanoparticles having multiple functions were synthesized using ruthenium based photosensitive amino acid monomers by cross-linking technique (ANADOLUCA) and the use of synthesized nanoparticles in ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) applications was investigated. For this purpose, firstly, cross-linked nano structures were prepared by microemulsion polymerization technique at room temperature under daylight and nitrogen atmosphere using horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (ALP) enzymes and bis (2-2'-bipyridyl) (MATyr)₂ ruthenium (II) photosensitive monomers. Then, these structures were characterized by transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), zeta potential measurements.

In the second part of the study, kinetic studies of the nanoenzymes were carried out. The obtained results showed that hetero nano-enzyme exhibited maximum activity towards tetramethylbenzidine (TMB) and paranitrophenyl phosphate (p-NPP) as substrates at pH 5 and pH 10, respectively. The kinetic parameters K_m and V_{max} values were 26 mM and $1,24 \times 10^{-2}$ U for TMB and 0,516 mM, $1,70 \times 10^{-4}$ U for p-NPP. The free enzymes denature at high temperatures. However, hetero nano-enzyme structure has not loss its activity. The reusability studies showed that there is no significant loss of activity of the nanostructure washed with ethanol even after 15 cycle.

In the final step of the study, nano enzyme structure was conjugated with antibody and ELISA applications were carried out.

Keywords: Nano Enzyme, HRP, ALP, Photosensitive Monomer, ELISA

TEŞEKKÜR

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, Arş. Gör. Özlem Biçen ÜNLÜER' e

Enzim Kinetiği konusundaki bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi dekan yardımcısı Prof. Dr. Sinan AKGÖL' e ve sevgili öğrencilerine,

Çalışmalarım boyunca her zaman destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarıma,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, saygı ve sevgilerini hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım Rasim YORKUN' a, Osman AYDIN' a ve Adem YEŞİLKAYA' ya, Rüstem KEÇİLİYE' ye,

Hayatımın en güzel anılarını yaşatan sevgili eşim Semra Özgün KÖSE' ye,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, ilgilerini, sevgilerini, desteklerini benden hiç esirgemeyen, her zaman bana sonsuz güvenen çok değerli Ailem' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ender KÖSE
Ocak 2015

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------------|
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI | i |
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | x |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Nanoteknoloji | 1 |
| 1.1.1. Nanopartiküller | 4 |
| 1.1.2. Nanopartiküllerin üretim yöntemleri..... | 5 |
| 1.1.3. Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çağraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi | 7 |
| 1.2. Enzimler | 8 |
| 1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması | 10 |
| 1.2.2. Enzim aktiflik birimleri..... | 11 |
| 1.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler | 13 |
| 1.2.4. Horseradish Peroksidaz | 15 |
| 1.2.5. Alkalen Fosfataz..... | 18 |
| | |
| 2. MATERYAL VE METOT | 21 |
| 2.1. Materyal..... | 21 |
| 2.1.1. Kullanılan kimyasallar | 21 |
| 2.1.2. Kullanılan cihazlar | 21 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2. | Metot | 22 |
| 2.2.1. | N-metakriloil-(L)-tirozin (MATyr) sentezi..... | 22 |
| 2.2.2. | bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) ₂ Rutenyum (II) sentezi..... | 23 |
| 2.2.3. | HRP-ALP hetero nano-enzim sentezi | 23 |
| 2.2.4. | HRP-ALP hetero nano-enzim karakterizasyon çalışmaları | 24 |
| 2.2.5. | Hetero nano-enzim yapıda protein miktarı tayini | 24 |
| 2.2.6. | Enzim kinetiği çalışmaları..... | 25 |
| 2.2.7. | Hetero nano-enzim yapının tekrar kullanılabilirliği..... | 28 |
| 2.2.8. | Radyo Frekans Plazma yöntemi kullanılarak mikroplakaların fotosensitif monomerlerle modifikasyonu | 29 |
| 2.2.9. | Mikroplaka kuyularına TNF- α antikoru çapraz bağlanması ve mikroplakanın heteroenzim ile sandviç ELISA yönteminde kullanılması..... | 29 |
| 3. | BULGULAR | 31 |
| 3.1. | Hetero nano-enzim Nanoyapıların Karakterizasyonu | 31 |
| 3.1.1. | Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizi..... | 31 |
| 3.1.2. | Boyut analizi | 31 |
| 3.1.3. | Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) analizi | 32 |
| 3.1.4. | Hetero nano-enzim yapının zeta potansiyeli | 32 |
| 3.1.5. | Hetero nano-enzim yapının Bradford metodu ile protein miktarı tayini | 33 |
| 3.1.6. | Kinetik çalışmalar | 34 |
| 3.1.7. | Hetero nano-enzim yapının tekrar kullanılabilirliği..... | 40 |
| 3.1.8. | Hetero nano-enzimin ELISA uygulaması | 41 |
| 4. | TARTIŞMA VE SONUÇ | 44 |
| | KAYNAKLAR | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Farklı yapıların boyut skalasında gösterimi..... | 1 |
| Şekil 1.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar | 6 |
| Şekil 1.3. Nanopartikül üretim yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi..... | 6 |
| Şekil 1.4. Enzimlerin genel çalışma prensibi..... | 9 |
| Şekil 1.5. Anahtar-kilit modeli | 10 |
| Şekil 1.6. HRP ve ALP enzimlerinin kodlandırılması..... | 11 |
| Şekil 1.7. Enzim derişiminin enzimatik tepkimenin hızına etkisi | 13 |
| Şekil 1.8. Substrat derişiminin enzimatik tepkimenin hızına etkisi..... | 14 |
| Şekil 1.9. Horseradish (bayır turpu, <i>Armoracia rusticana</i>) bitkisi ve kökü | 16 |
| Şekil 1.10. X-ışını kristalografisi ile HRP'nin üç boyutlu molekül yapısı..... | 17 |
| Şekil 1.11. HRP çalışma mekanizması | 17 |
| Şekil 1.12. Alkalen fosfatazın genel mekanizması | 18 |
| Şekil 1.13. Alkalen fosfatazın kristal yapısı | 19 |
| Şekil 1.14. Alkalen fosfatazın fosfat monoesterlerinin hidrolizi..... | 20 |
| Şekil 2.1. N-metakriloil-(L)-tirozin sentezi | 22 |
| Şekil 2.2. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr) ₂ -Rutenyum (II) molekül yapısı..... | 23 |
| Şekil 2.3. Hetero nano-enzim yapısı | 24 |
| Şekil 2.4. Plazma yöntemi ile plaka kaplama işlemi | 29 |
| Şekil 2.5. Yüzeye anti TNF- α antikoruna bağlanılan ELISA yöntemi..... | 30 |
| Şekil 3.1. Heteroenzim NanoHRP-ALP nano yapının TEM görüntüsü | 31 |
| Şekil 3.2. Nano HRP-ALP yapısının boyut analizi | 31 |
| Şekil 3.3. NanoHRP-ALP yapılarının AFM görüntüleri | 32 |
| Şekil 3.4. NanoHRP-ALP yapısının zeta potansiyeli | 33 |
| Şekil 3.5. Nano HRP-ALP yapısının protein miktarını belirlemek için oluşturulan kalibrasyon grafiği | 34 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.6. Substrat olarak TMB kullanıldığında, serbest HRP ve Nano HRP-ALP yapısının aktivitelerinin pH ile değişimi | 35 |
| Şekil 3.7. Substrat olarak 4-NPP kullanıldığında, serbest ALP ve Nano HRP-ALP yapısının aktivitelerinin pH ile değişimi | 35 |
| Şekil 3.8. Farklı derişimlerdeki TMB substratı ve pH 5 tamponu kullanılarak serbest HRP ve NanoHRP-ALP ile oluşturulan Lineweaver - Burk eğrisi..... | 36 |
| Şekil 3.9. Farklı derişimlerdeki 4-NPP substratı ve pH 10 tamponu kullanılarak serbest ALP ve NanoHRP-ALP ile oluşturulan Lineweaver - Burk eğrisi..... | 37 |
| Şekil 3.10. Substrat olarak TMB kullanıldığında sıcaklığın serbest HRP ve Nano HRP-ALP aktiviteleri üzerine etkisi | 38 |
| Şekil 3.11. Substrat olarak 4-NPP kullanıldığında sıcaklığın, serbest ALP ve Nano HRP-ALP aktiviteleri üzerine etkisi..... | 39 |
| Şekil 3.12. Enzim derişimin aktivite üzerine etkisi (substrat : TMB ; pH5) | 40 |
| Şekil 3.13. Enzim derişimin aktivite üzerine etkisi (substrat: 4-NPP; pH10) | 40 |
| Şekil 3.14. Substrat olarak TMB kullanılan aktivite işlemlerinde nano yapıların tekrar kullanılabilirliği | 41 |
| Şekil 3.15. i) A-F: TNF- α standartları, G: kör, H: TNF- α numunesi; ii) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin birinci dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); iii) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin üçüncü dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); iv) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin beşinci dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); v) 0,5 M H ₂ SO ₄ ve 0,5 M NaOH ilavesiyle enzim reaksiyonlarının sonlandırılması..... | 42 |
| Şekil 3.16. A) NanoHRP-ALP heteroenzimi ve TMB substratı kullanılarak oluşturulan TNF- α kalibrasyon grafiği; B) NanoHRP-ALP heteroenzimi ve 4-NPP substratı kullanılarak oluşturulan TNF- α kalibrasyon grafiği. | 43 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Nanomalzeme örnekleri..... | 2 |
| Çizelge 1.2. Alkalen fosfatazın farklı fosfat esterleri üzerine reaksiyon hızları..... | 20 |
| Çizelge 3.1. Literatürdeki ve hesaplanan NanoHRP-ALP ve Serbest HRP enzimlerinin Michaelis sabitleri ve maksimum reaksiyon hızları..... | 36 |
| Çizelge 3.2. Literatürdeki ve hesaplanan NanoHRP-ALP ve Serbest ALP enzimlerinin Michaelis sabitleri ve maksimum reaksiyon hızları..... | 37 |
| Çizelge 3.3. NanoHRP-ALP heteroenzim ile gerçekleştirilen ELISA uygulamasının verileri..... | 42 |

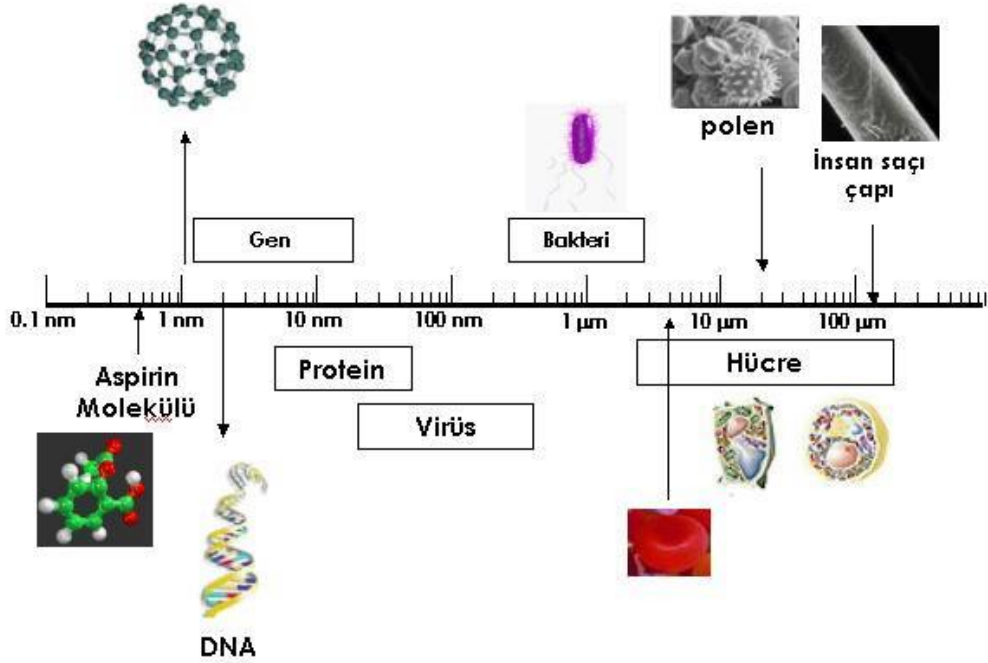
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| 4-NP | : | 4-Nitrofenol |
| 4-NPP | : | 4-Nitrofenil fosfat |
| AFM | : | Atomik Kuvvet Mikroskobu |
| ALP | : | Alkalen Fosfataz |
| APS | : | Amonyum Persülfat |
| EDC | : | 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid |
| ELISA | : | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| HRP | : | Horseradish (Bayır Turbu) Peroksidaz |
| K_m | : | Michealis sabiti |
| MATyr | : | Metakriloil amido tirozin |
| NHS | : | N-Hidroksisüksinimid |
| PVA | : | Poli(vinil alkol) |
| TEM | : | Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| TMB | : | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin |
| TNF-α | : | Tümör nekroz faktör alfa |
| U | : | Unit aktivite |
| V_{mak} | : | Maksimum reaksiyon hızı |

1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji

Latince cüce anlamına gelen “Nano” kelimesi teknik olarak herhangi bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri demektir. Nanometre olarak tanımlanan uzunluk birimi ise metrenin milyarda biri veya milimetrenin milyonda biri olarak ifade edilmektedir. 20000-50000 nm aralığında bulunan insan saç telini, 2500 nm olan insan alyuvarlarını ve DNA boyutu gibi çıplak gözle göremediğimiz farklı yapıları Şekil 1.1’deki boyut skalası incelendiğinde nanometre ölçüsü daha net anlaşılmaktadır [1].



Şekil 1.1. Farklı yapıların boyut skalasında gösterimi [1].

Boyutları 100 nm ve altında olan tozlara nanotozlar ve/veya nanopartiküller denmektedir. Küçük boyutları sayesinde nano-yapıların beklenmeyen özelliklerini fizikçiler, kimyacılar, metalurjistler, biyologlar ve mühendisler disiplinler arası çalışmalarla anlamaya ve bunları insanlığın ihtiyaçları doğrultusunda kullanmaya çalışmaktadırlar [2].

Nanoteknoloji terimi; yapısal özellikleri atomlar ile hacimsel malzemeler arasında kalan, en az bir boyutunun nanometre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) skalasında olan üstün özellikli malzemelerin tasarlanması ve üretimlerini tanımlamakla birlikte, nano-yapılara yeni olağanüstü özellikler kazandırmayı ve nano-yapılı malzemelerin işlevsel olarak kullanımlarını kapsamaktadır [3]. Farklı boyutlardaki tipik nanomalzemelerin listesi Çizelge 1.1’ de verilmektedir.

Çizelge 1.1. Nanomalzeme örnekleri [2].

| Yapı | Yaklaşık Boyut | Malzeme |
|---|--|--|
| Nano-kristaller ve kümeler (kuvantum noktaları) | Çap, 1 - 10 nm | Metaller, yarı iletkenler, manyetik |
| Nano-partiküller | Çap, 1 - 100 nm | Seramik oksitler |
| Nano-teller | Çap, 1 - 100 nm | Metaller, yarıiletkenler, oksitler, sülfürler, nitratlar |
| Nano-tüpler | Çap, 1 - 100 nm | Karbon |
| Nano-poroziteli katılar | Porozite çapı 0,5 – 10 nm | Zeolitler, fosfatlar |
| 2 boyutlu sıralanışlar (nanopartiküllerin) | Birkaç nm^2 - μm^2 | Metaller, yarıiletkenler, manyetik malzemeler |
| İnce filmler | Kalınlık, 1 - 1000 nm | Farklı malzemeler |
| 3 boyutlu yapılar (süperlatişler) | Her üç boyutta da birkaç nm | Metaller, yarıiletkenler, manyetik malzemeler |

Nanoteknolojiye gittikçe artan ilginin sebebi, malzemenin büyüklüğü nanometre ölçeğine indikçe klasik mekanik teorilerin geçerliğini kaybetmesi ve kuantum etkilerinin belirgin bir şekilde gözükmesi sonucunda nano-yapılı malzemelerde hiç beklenmeyen farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerin ortaya çıkmasıdır. Örneğin karbon hacimsel yapıda düşük mukavemete sahipken, karbon nano-tüplerin aynı boyutlu çelikten 100 kat daha mukavemetli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karbon atomlarından oluşan elmas iyi bir yalıtkan olduğu halde,

bir boyutlu karbon atom zincirinin altın ve gümüş zincirlerinden daha iyi iletken olduğu ve istenildiğinde karbon nanotüplere yarıiletken özelliği kazandırılabilceği görülmüştür. Malzemelerin davranışlarındaki değişimle ilgili bu tür örnekleri uzatmak mümkün olup, kazanılan yeni özellikleri nanobilim açıklamaya çalışmaktadır.

Günümüzde yoğun ilginin bulunduğu nanoteknoloji konusunun aslında bir buçuk asır öncede aynı terim kullanılsa da ilgi çektiği Michael Faraday' ın "Philosophical Transactions of the Royal Society" de 1857 yılında yayınlanan makalesinden anlaşılmaktadır. Makalede 19. yüzyılın ortasında birçok kişinin maddelerin boyutu küçültüldükçe özelliklerinin ne olduğunu anlamaya çalıştığı ortaya çıkmaktadır. Faraday' ın araştırdığı malzemeler arasında altın koloidal çözeltileri en ünlüsü olup, bu renklerden bir tanesi olan yakut kırmızısı, 100 nm' nin altında partiküller içermektedir. Bu sebeple Faraday' ı nanomalzemeler üzerinde sistematik çalışmalar yapan ilk bilim adamı olarak tanımlamak uygun olacaktır. Bununla birlikte nano-yapıların kullanımının en önemli göstergesi Mayaların mavi boyasının rengini bir organik pigmentin, oksit süperlatıslarının ve metal nanopartiküllerinin bir araya gelmesiyle, parlak ve kimyasal olarak kararlı bir pigment oluşturmasıyla meydana geldiğine inanılmasıdır. Ayrıca altın kolloidleri, cam boyalarında ve altın tuzlarının kalay klorür kullanılarak indirgenmesiyle elde edilen Cassius' un nanoparçacıklı mor pigmentinde geniş olarak bulunmaktadır.

Günümüzdeki nanoteknoloji akımını fikir olarak 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'na konuşma yapan ve daha sonra Nobel ödülü kazanan Richard P. Feynman başlattı ya da en azından bu düşünceyi somut hale getirdi. "En altta biraz yer var" başlıklı konuşmasında tüm Britannica Ansiklopedisini toplu iğnenin basına yazılabileceği örneğini verdi. Aynı zamanda tekil atomların hareket ettirilmesi, bilgisayarların küçültülmesi ve bu küçücük ayrıntıları görmek için daha iyi teknikler ve makineler geliştirilmesinden bahsetti. Dr. Feynman'ın konuşması tamamen teorikti ve fantastik görünüyordu. Fizik kurallarının tekil atomları ya da molekülleri hareket ettirmenin ve işlemenin engel olmadığını tarif etti. Atomların tam olarak işlenebileceği zamanın önlenemez olarak geleceğini doğru tahmin etti. Feynman'ın konuşması sadece ABD'de değil diğer ülkelerde de

etkili olmuş ve bu konu üzerinde çalışmalar başlamıştır. Bu düşünce akımının etkisinde Japonya, Tokyo Bilim Üniversitesinde çalışmalarını sürdüren Norio Taniguchi 1974 yılındaki bildirisinde ilk defa nanoteknoloji terimini kullanarak literatüre bu terimi sokan kişi olarak bilim tarihine geçmiştir. Aynı tarihte tek atom katmanından oluşan ince filmlerin üretimi Finlandiya’da Dr. Tuomo Suntola ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. 1981 yılında taramalı tünel mikroskopunun (STM) icadı ve bundan birkaç yıl sonra 1984’de atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) geliştirilmesiyle nano boyutta ölçüm yapmak mümkün olduğundan nano-teknoloji alanındaki çalışmaların artışı ve hızlı ilerlemeler bu tarihlerden sonra başlamıştır [4-7].

1.1.1. Nanopartiküller

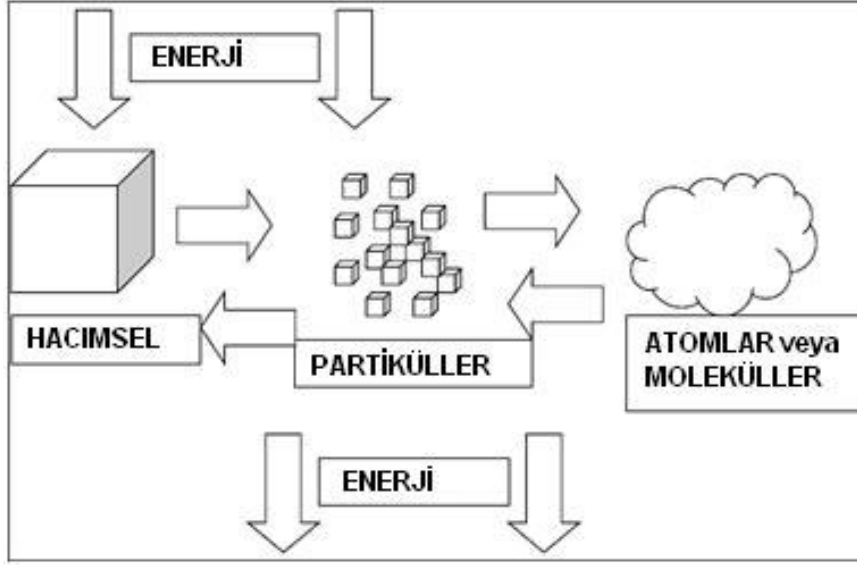
Seçilmiş fizikokimyasal özelliklere sahip malzemelerin üretimi, yeni teknolojilerin gelişmesi için çok önemlidir. Bu amaçla kimya ve malzeme bilimciler yeni molekülleri sentezleyerek veya bilinen malzemeleri karıştırarak günümüze kadar plastikler, patlayıcılar, ilaçlar, yüzey aktif maddeler, metaller, metal alaşımları ve seramikler gibi farklı sınıflarda hayatımızın vazgeçilmezleri arasında bulunan birçok malzeme üretmişler ve üretmeye devam etmektedirler. Fakat son yıllardaki strateji; maddelerin nanopartikül haline indirgenmesini, istenilen şekilde kimyasal bileşimini ve özelliklerinin değiştirilmesini temel almaktadır. Bu konu üzerine ilginin yoğunlaşmasının temel sebebi maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılardan farklı olarak olağandışı özellikler ve işlevsellik sergilemeleridir. Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey / hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır. Sözü edilen etkilerin varlığı partikül boyutunu malzemenin fizikokimyasal özellikleri için kritik öneme sahip duruma getirmektedir. Olağandışı özelliklerin sonucu olarak nano-partikül sentezi yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeleri, süperiletkenler, aşınmaya karşı etkili katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bunların yanı sıra, malzemelerin nano-boyut

seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine izin vermektedir. Ayrıca muazzam sayıda nanoparçacığın birleştirilmesi ile kompleks, insan boyutlu makinaların yapımı gerçekleştirilebilir. Açıkça görülmektedir ki, nanoteknolojik yeni gelişmeler için vazgeçilemez ilk adım nanopartiküllerin üretimidir.

Nanoteknolojik malzemelerin çıkış noktasını oluşturan nanopartiküller geniş bir kimyasal aralık ve morfolojide üretilebilirler. Günümüzde çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilere sahip metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bunların karışımından istenilen özelliklere sahip nanopartiküller hazırlanabilir [8].

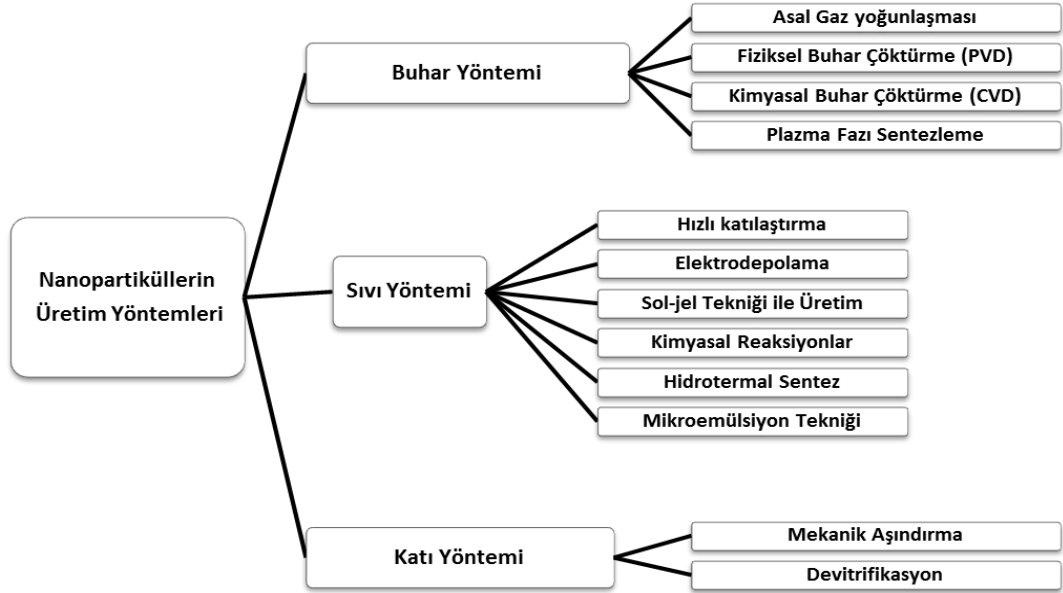
1.1.2. Nanopartiküllerin üretim yöntemleri

Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan yöntemler; aşağıdan yukarı “bottom up” ve yukarıdan aşağı “top down” olarak adlandırılan iki ana yaklaşım altında incelenmektedir (Şekil 1.2). Yukarıdan aşağıya yaklaşımına dahil olan yöntemlerde hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile çalışan yöntemlere verilebilecek en genel örnekler; mekanik öğütme ve aşındırma olabilir. Bu tekniklerde klasik öğütme işlemlerinden çok daha fazla enerji tüketimi gerçekleştiğinden yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Aşağıdan yukarıya yaklaşımına dahil yöntemler ise; atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanokristalin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan ilk yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir [9].



Şekil 1.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar [9].

Nanopartikül üretiminde kullanılan yöntemlerin yukarıda açıklanan ayırım dışında buhar, sıvı ve katı yöntemler temelli olarak da üç ayrı sınıflandırılması mümkündür. Mekanik enerjinin kullanıldığı gibi fiziksel özelliklerin ön plana çıktığı yöntemler fiziksel ve kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yöntemler ise kimyasal temelli olarak kabul edilmektedir.



Şekil 1.3. Nanopartikül üretim yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi

Şekil 1.3' de nanopartiküllerin üretim yöntemleri şematize edilmiştir. Bu tezin çalışmaları doğrultusunda sentezlenen nano yapılar, R. Say ve arkadaşları

tarafından patenti alınmış ‘‘Rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA konsept yöntemi’’ ile sentezlenmiştir.

1.1.3. 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, bir çok 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 nanobiyokonjugantların oluşturulduğu bir yöntemdir.

Bu yöntem ile multifonksiyonel, biyoyumlu, stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugasyon işlemleri sağladığı gibi kataliz ve tayin amalıda kullanılabilir. Oluşan nano-biyokonjugantlarda proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonları etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsız bir yöntemdir [10].

Say ve arkadaşlarının Process Chemistry dergisinde yayınlanan çalışmasında lipaz enzimi taşıyıcı nanoprotein partiküller, rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çağraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve zeta boyut analizi ile belirlenerek ortalama partikül boyutu yaklaşık 100 nm olarak bulunmuştur.

Serbest lipaz ve sentezlenen lipaz nanopartiküllerin aktiviteleri p-nitrofenilpalmitat (pNPP) hidrolizi sonucunda absorpsiyon artışının spektrofotometrik olarak 405 nm` de takibiyle ölçülerek, hidrolitik aktivite üzerine pH, sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında lipaz nanopartiküllerin kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini göstermek için, aynı nanopartiküller ardı ardına 10 kez kullanılmıştır. Sterilizasyon için her döngü sonrasında nanopartiküller önce etanol ile daha sonra su ile yıkanmıştır. 10 döngü sonrasında lipaz nanopartiküllerin enzimatik aktivitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir [11].

Say ve grubunun yaptığı bir diğer çalışmada ise TNF- α tayini için reflektometrik interferans spektroskopisine dayalı sensör sistemleri hazırlanmıştır. Bu amaçla fotosensitif nanoyapılı TNF- α ANADOLUCA konsept yöntemine göre MATyr-Ru-MATyr aminoasit monomeri kullanılarak sentezlenmiştir. Hazırlanan TNF- α nanopartiküller TNF- α tayininde sensör olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan nanosensörün TNF- α nın seçici olarak tayininde etkin şekilde kullanılabilirliğini göstermiştir [12].

1.2. ENZİMLER

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 [13].

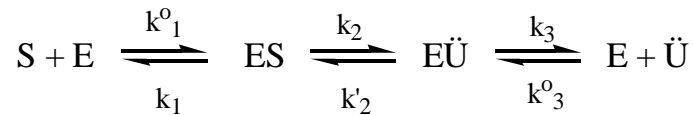
Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını yaklaşık 10^{20} ye kadar arttırırken, diğer katalizörler 10^2 - 10^4 kadar arttırabilmektedir.

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 [13,14].

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 özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar [15].

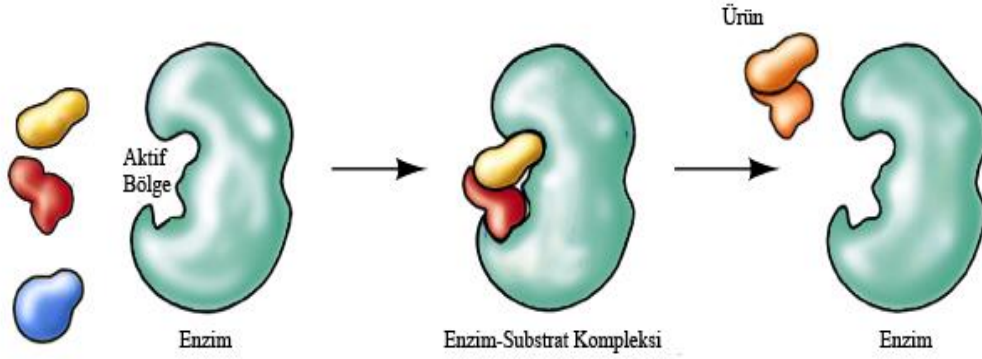
Enzimler sadece canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada faaliyet gösterir. Bu tip enzimlere “intraselüler” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da “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 1.4. 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.

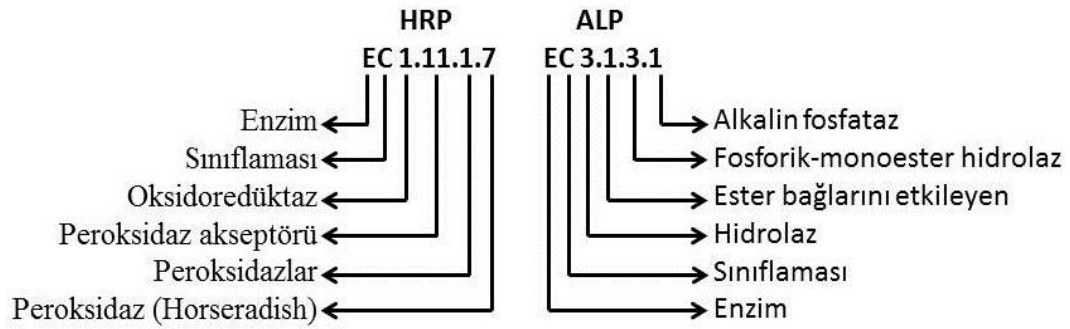


Şekil 1.5. Anahtar-kilit modeli

1.2.1. 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.

Yeni sınıflamada enzimlere 4 numara verilmektedir. İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir. Şekil 1.6' de horseradish peroksidaz ve alkalın fosfataz enzimlerinin kodlandırılması gösterilmiştir.



Şekil 1.6. HRP ve ALP enzimlerinin kodlandırılması

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, tirosinaz 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.

1.2.2. 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 μ mol substratın dönüşümünü (veya 1 μ mol 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 çözeltideki 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.

1.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

1.2.3.1. pH' ın enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi

Enzimlerin ve substratların aktif uçları asidik ve bazik gruplar içerdiğinden enzimlerin aktiviteleri pH değişiminden etkilenir. pH değişimi, enzimin aktif merkezinin iyonizasyonunu bozar ya da substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştirerek enzim-substrat arasındaki etkileşimini değiştirir. Ayrıca katalitik olarak aktif olan enzimin aminoasit zincirindeki iyonik karakter değiştiği için enzim denatüre olabilir ve katalitik aktivitesini kaybedebilir. Enzimatik reaksiyon hızının maksimum olduğu ve her enzim için farklı bir optimum pH değeri vardır [16].

1.2.3.2. Enzim derişiminin enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi

Bir enzimatik tepkimenin hızı, tüm substrat konsantrasyonlarında enzim konsantrasyonu ile orantılı olarak değişir. Tepkime ortamda yeterli miktarda substrat derişimi bulunması halinde tepkime hızı, enzim derişimi ile artmaktadır. Enzimler hıza etki etmekle birlikte hız sabitlerini ve denge sabitlerini değiştirmezler. Denge halinde enzim konsantrasyonunun denge sabiti üzerine etkisi yoktur [16].



Şekil 1.7. Enzim derişiminin enzimatik tepkimenin hızına etkisi

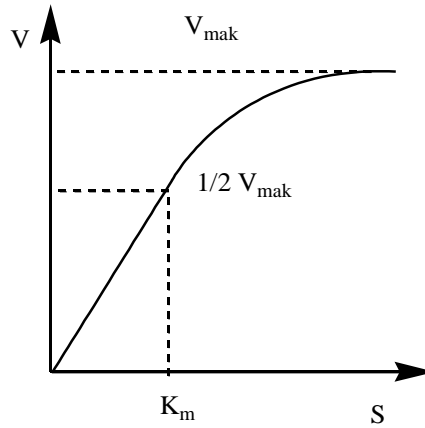
1.2.3.3. Sıcaklığın enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi

Enzimatik reaksiyonların hızı, sıcaklık değişmelerinden etkilenir. Genel olarak sıcaklıkta her 1°C artış %10 daha yüksek bir enzim aktivitesi sağlar.

Sıcaklık artışıyla enzimatik reaksiyonun hızındaki artış sıcaklık belli bir değere yükselinceye kadar devam eder. Maksimum hıza ulaşıldığındaki sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Daha yüksek sıcaklıklarda enzim protein yapısında olduğundan denatüre olarak aktivitesini kaybeder ve reaksiyon hızı azalır [16].

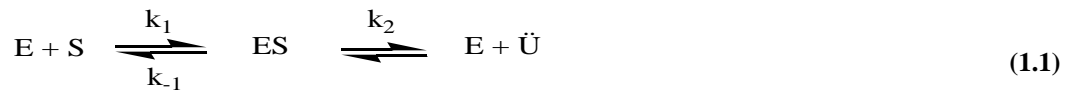
1.2.3.4. Substrat derişiminin enzimatik reaksiyonların hızına etkisi

Enzim derişimi ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış düzeyinde sabit kalır. Substrat derişimi artsa bile tepkime hızı değişmez [16].



Şekil 1.8. Substrat derişimin enzimatik tepkimenin hızına etkisi

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait tepkime,



Bu eşitlikte; E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi, Ü = ürünü gösterir.

Enzim tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten eşitliği} \quad (1.2)$$

Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{mak}} \quad \text{Lineweaver-Burk eşitliği} \quad (1.3)$$

Bu eşitlikte; V = başlangıç hızı, V_{mak} = maksimum hız, K_m = Michaelis sabiti, S = substrat derişimi olarak belirtilir. Eşitlik (1.3)'de 1/V ile 1/[S] arasında grafik çizildiğinde elde edilen doğrunun eğim ve kesim noktasından V_{mak} ve K_m değerleri hesaplanabilir.

1.2.4. Horseradish Peroksidaz

Peroksidazlar biyoteknoloji alanında ün sahibi olmuş ve enzimoloji, biyokimya, tıp, genetik, fizyoloji gibi araştırma dallarının çeşitli konularında çalışılmaktadır. 19. yüzyıldan günümüze kadar literatür olarak oldukça geniş bir yer alan ve çalışılan bir enzimdir. Peroksidazlar ile ilgili olarak 2000'den fazla çalışma mevcuttur ve ağırlıklı olarak 2000'li yılların başında basılmıştır. Peroksidazların önemi, organizmalardaki dağılımından ve çoklu fizyolojik rolleri dolaydır. Etkileri ve kaynakları göz önüne alındığında 3 ana sınıfta toplanabilir; bitki peroksidazları, hayvan peroksidazları ve katalazlar [17].

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), oksitleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksit veya organik peroksitleri kullanan oksidoredüktazlardır. Peroksidazların çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar, başlıca tıbbi diagnostik kitlerinin hazırlanmasında, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri ve radikaller için indikatör olarak ve ticari amaçlı fenolik reçinelerin sentezinde katalizör olarak kullanılmaktadır [18].

Yapısında "Hem" grubu bulunduran peroksidazlar, amino asit dizilimleri dikkate alınarak üç gruba ayrılmaktadır.

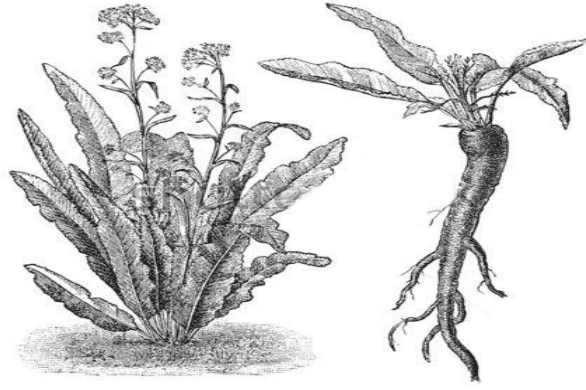
I. Grup; sitokrom c peroksidaz (CcP), askorbat peroksidaz (APX), ve bakteriyel katalaz peroksidazları içeren hücre içi peroksidazlardır.

II. Grup; manganaz peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi salgılanan "fungal enzimleri" kapsamaktadır.

III. Grup; bitki peroksidazlarını bulundurmaktadır. Kararlı olması ve yabancı turp (horseradish) köklerinden (Şekil 1.9) kolayca izole edilmesi nedeniyle birçok

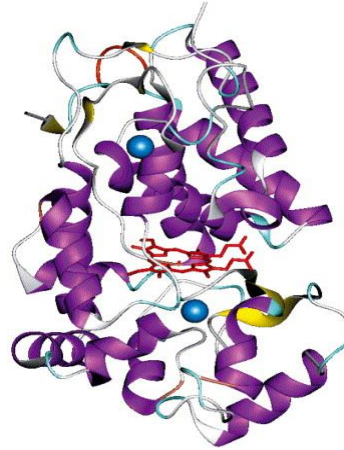
uygulamada yer alan “horseradish peroksidaz” izoenzim C (HRP) III. Grup” ta yer almaktadır. Peroksidaz ailesinin yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili çalışmaların çoğu, III. grup’un temsilcisi olan HRP ile gerçekleştirilmiştir [19].

Bayır turbu (yaban turbu, Horseradish, *Armoracia rusticana*) bitkisi, köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü, dayanıklı bir bitkidir ve zengin bir peroksidaz kaynağıdır. İmmunotestler için diagnostik kitlerinin üretilmesinde bayır turpu köklerinden peroksidazın büyük ölçekte üretimi ortaya çıkmıştır. HRP izoenzim C bitki köklerinden elde edilen peroksidazlar içinde en verimlisidir.



Şekil 1.9. Horseradish (bayır turpu, *Armoracia rusticana*) bitkisi ve kökü

HRP izoenzim C, 308 amino asit içeren tek bir polipeptit bulundurmaktadır. HRP C iki tip metal merkezi içerir. Bunlardan biri hem grubu olarak adlandırılan demir (III) protoporfirin IX, diğeri iki kalsiyum atomudur. Her ikisi de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için önemlidir [20].

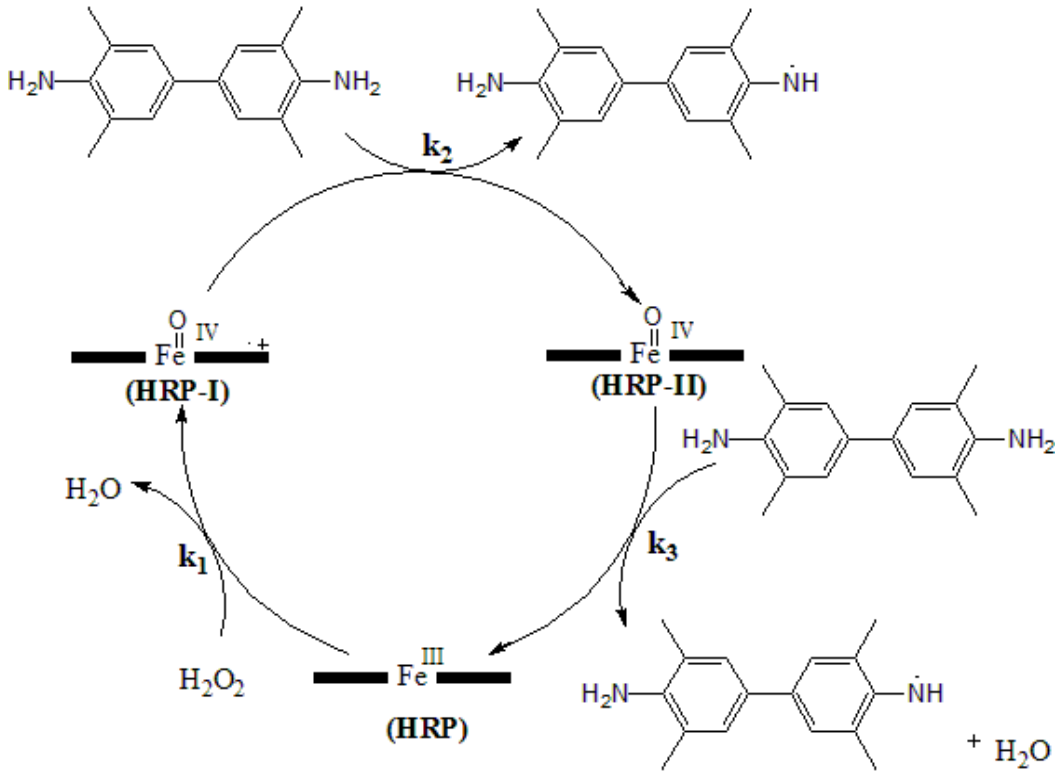


Şekil 1.10. X-ışını kristalografisi ile HRP' nin üç boyutlu molekül yapısı [21].

Şekil 1.10'de görülen her bir hem grubu (kırmızı), kalsiyum atomları (mavi küreler) içeren distal ve proksimal bölgeler (domains) arasında yer almaktadır. Enzimin sarmal (mor) ve katlanmış yaprak (sarı) bölgeleri gösterilmektedir [21].

Horseradish Peroksidaz, başlıca tıbbi diagnostik kitlerde kullanılmaktadır. Fenoller, bifenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin ve azo boyalarının giderilmesinde etkili olduğu da bilinmektedir [22].

Horseradish Peroksidaz, molekülünde ferriprotoporfirin (protohemin) içeren bir haloenzimdir. Peroksidazlar H_2O_2 ile HRP, HRP-I ve HRP-II olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP' nin genel çalışma mekanizması Şekil 1.11'de verildiği gibidir.



Şekil 1.11. HRP çalışma mekanizması

HRP' nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Son zamanlarda HRP' nin aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda da kullanıldığı bilinmektedir [23,24].

1.2.5. Alkalen Fosfataz

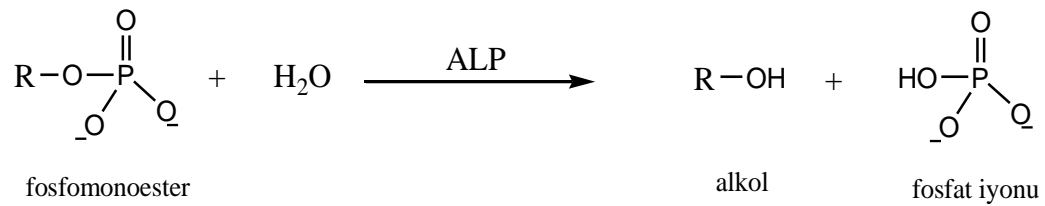
Alkalen fosfataz (ALP) [ortofosforik monoester fosfohidrolaz, alkali optimum, (E.C.3.1.3.1)], hidrolazlar enzim sınıfından fosfatazlar enzim grubuna girer. Fosfatazlar fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Birçok primer fosfat esterinin hidrolizini katalizleyebilmelerinden dolayı seçiciliği düşüktür. Bir alkol ve bir fosfat iyonu meydana getirmek üzere organik fosfat esterlerini hidroliz ederler [25]. Fosfatazlar optimal aktivite gösterdikleri pH değerlerine göre üç gruba ayrılırlar.

Asit fosfatazlar ; bitki ve mantarlarda pH: 3-4 arasında, ciğer, dalak ve böbrek gidi hayvan dokularında pH: 4,5-5,5 arasında optimum aktivite gösteren fosfatazlar [26,27].

Nötral fosfatazlar : Eritrositlerde bulunan ve pH: 6-7 arasında optimum aktivite gösteren fosfatazlar [28].

Alkalen fosfatazlar : Kemik, böbrek, bağırsak mukozası ve sütte bulunup pH: 9-10 arasında optimum aktivite gösteren fosfotazlar [29-32].

Alkalen fosfatazlar çeşitli fosfat monoesterlerinin, fosfat grubunu bir alıcı moleküle transfer ederek hidrolizini katalizleyen, alkali pH' da maksimum aktivite gösteren glikoprotein yapısında fosfomonoesterazlardır. Genel reaksiyonu Şekil 1.12' de görülmektedir [33].

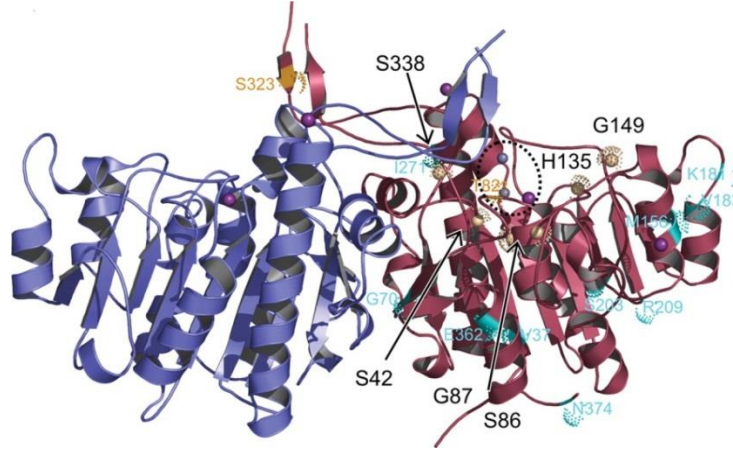


Şekil 1.12. Alkalen fosfatazın genel mekanizması

Alkalen fosfataz doğada prokaryotlardan ökaryotlara birçok canlı türünde bulunmaktadır. Memeli türlerinin büyük çoğunluğunun doku ve kanlarında ALP varlığı gözlenmiştir. Etkin taşımanın olduğu böbrek proksimal tübülleri, bağırsak epiteli, karaciğer ve plasentada yüksek aktivitenin görüldüğü dokulardır. Osteoblastlar, safra kanallıkları ve meme bezleride ALP' ca zengindir. Mide,

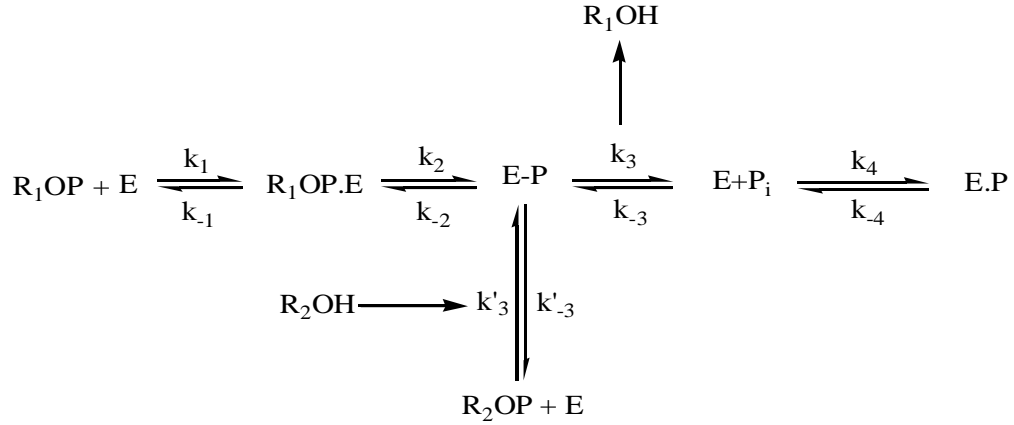
endokrin bezler ve granüler lökositler ise ALP' in az bulunduğu dokulardır. Enzimin doku içi dağılımının homojen olmadığı böbrek ve intestinal mukozada yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır [34-36].

Alkalin fosfatazın hücre içi yerleşimi yüksek devirli santrifüj ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda ALP' in en fazla hücre membranında, daha az olarak çekirdek ve golgi aparatında yer aldığı saptanmıştır. ALP hücre yüzeyinde özellikle hücre dışı membranının hemen altında yer alır. İnce bağırsak epitelyum hücrelerindeki mikrovillüslerin plazma membranında ve lateral hücre membranında enzim aktivitesinin yüksek olduğunu, ayrıca apikal veziküller, golgi kompleksi, lizozomlar ve endoplazmik retikulumda (ER) az da olsa ALP aktivitesi bulunduğunu saptamışlardır [35,36].



Şekil 1.13. Alkalin fosfatazın kristal yapısı

ALP grubu enzimler, alkali pH da maksimum aktivite gösteren, fosfat monoesterlerinden inorganik fosfat ayrılmasını katalize eden ve her bir monomerinin aktif merkezinde iki Zn^{+2} ve bir Mg^{+2} iyonu bulunduran dimerik metaloproteinlerdir. Çinko ve magnezyum iyonlarının oluşturduğu bu yapı içerisinde metallerin birbirine uzaklıkları 3.94, 4.88 ve 7.09 Å'dur. Dimerik yapılanma ve divalen kationların uygun oranda varlığı enzimin aktivitesi için gereklidir. Zn^{+2} iyonu enzimin prostetik grubunu oluşturur, katalitik aktivite için önemlidir ve substrat bağlanmasında rol alır [37].



Şekil 1.14. Alkelen fosfatazın fosfat monoesterlerinin hidrolizi

Alkelen fosfataz R'nin kimyasal doğası ve büyüklüğü ne olursa olsun, ROP. fosfatmonoesterlerini benzer oranlarda hidrolizler ve Şekil 1.14' de hidroliz mekanizması gösterilmiştir. Substratın alkolik veya fenolik kısmı için spesifik bir bağlanma bölgesi yoktur. Keza, ayrılan grubun pK_a' sı birbirinden farklı olan altı substratla (örneğin; metil fosfattan p-nitrofenilfosfata kadar) yapılan deneylerde, enzimatik hidroliz oranında çok az bir değişim olduğu görülmüştür. Yavaş basamak alkol veya fenolün kopmasını takip eden basamak olduğu tespit edilmiştir. Asidik pH' da farklı pK_a değerlerine sahip ayrılan gruplar için ölçümler yapılarak, fosforilasyonun pK_a değerine bağımlı olduğu gözlenmiştir. Ayrılan grubun pK_a' sındaki çok küçük bir değişme bile, örneğin 2, 4- dinitrofenilfosfattan p-nitrofenilfosfata, fosforilasyon oranında (k₂) önemli bir değişme meydana getirmiştir [38].

Çizelge 1.2. Alkelen fosfatazın farklı fosfat esterleri üzerine reaksiyon hızları

| Fosfat esterleri | Reaksiyon hızları |
|-----------------------|-------------------|
| p-Nitrofenilfosfat | 1,0 |
| Na-P-gliserolfosfat | 0,9 |
| Glukoz-1-fosfat | 0,9 |
| Adenozin-3'-fosfat | 1,0 |
| Adenozin-3'-fosfat | 0,8 |
| Sitidin fosfat | 1,2 |
| Güanozin fosfat | 1,0 |
| Uridin fosfat | 1,3 |
| Riboflavin-5'- fosfat | 0,7 |
| L-Histidinol fosfat | 0,9 |
| Kreatin fosfat | 0 |
| Adenozin trifosfat | 0 |
| Na pirofosfat | 0 |

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Nanoenzim sentezi için; Alkalın fosfataz (ALP, from bovine intestinal mucosa), Horseradish peroksidaz (HRP), fotosensitif monomer (MATyr)₂Ru(bipyr)₂, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), amonyum persülfat (APS), saf su ve azot gazı kullanılmıştır.

Tampon çözeltiler için; tartarik asit (pH : 3), asetik asit (pH : 4-5), potasyum fosfat mono bazik ve potasyum fosfat di bazik (pH : 6-7-8), glisin (pH : 9-10), saf su, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılmıştır.

Substratların hazırlanması için; 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, hidrojen peroksit, 4-nitrofenil fosfat disodyum tuzu heksahidrat ve saf su kullanılmıştır.

ELISA uygulaması ve antikor-enzim konjugasyonu için yukarıda belirtilen kimyasalların dışında; bovin serum albümin (BSA), fosfat tamponlu salin (PBS), sülfürik asit, antijen olarak TNF- α ve antikor olarak anti-TNF- α antikor kullanılmıştır. Tez çalışmalarında kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından tedarik edilmiştir.

Ayrıca cam malzemeler (beher, balon joje v.b.), 96 kuyulu polisitren mikro plaka, mikro pipet ve pipet uçları gibi malzemeler çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Nano-enzim sentezinde ve çözeltilerin karıştırılması işlemlerinde JEIO TECH MS-52M manyetik karıştırıcı, nano partikülleri buldukları ortamdan ayırmak için MPW-251 santrifüj, pH ölçümleri için Hanna Instruments HI 2211 pH metre, kinetik ölçümler ve ELISA okumaları için BioTek Synergy H1 mikro plaka okuyucu ve GEN5 v2.00 yazılımı, kinetik ölçümlerde 45°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda Shimadzu UV-2450 UV-VİS spektrofotometre ve Shimadzu TCC-240A sıcaklık kontrollü hücre tutucu, ELISA işleminde mikrolakaları kaplamak için RF Plazma cihazı kullanılmıştır. Ayrıca cam malzemeler (beher, balon joje

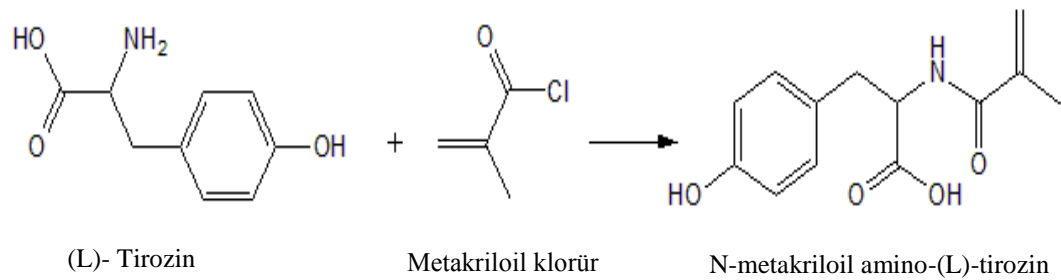
vb.), 96 kuyulu polisitren mikro plaka, mikro pipet ve pipet uçları gibi malzemeler çalışmalarda kullanılmıştır.

Nano-enzim yapının karakterizasyonu, Malvern Instruments Nano ZS zetasiser, FEI Company-Tecnaï™ G2 Spirit/Biotwin Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), QUESANT Q-Scope 350 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile gerçekleştirilmiştir. Mikro plaka modifikasyonu için plazma cihazı kullanılmıştır.

2.2. METOT

2.2.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) sentezi

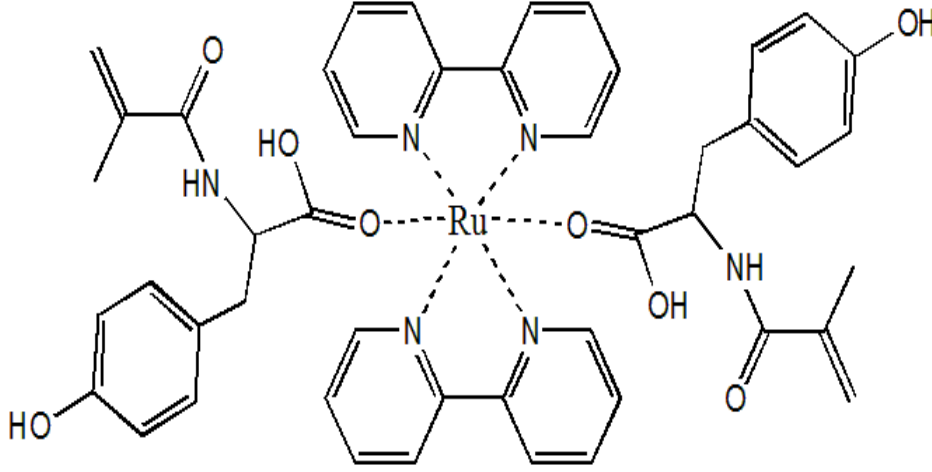
3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-metakriloil) amino] propanoik asit (metakriloil amino tirozin, (MATyr)) sentezi için uygulanan yöntemde, 0.5 g L-tirozin metilester ve 0.2 g hidrokinon, 100 ml diklorometan çözücüsü içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0 °C a soğutulmuş ve 12.7 g trietilamin çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti üzerine 5 ml metakriloil klorür yavaşça eklenmiştir 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 [10].



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

2.2.2. bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)₂ Rutenyum (II) sentezi

Işığa duyarlı rutenyum merkezli bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂ Rutenyum(II) aminoasit-monomerin kimyasal sentezi için uygulanan yöntemde, 1g diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum(II) (RuCl₂(bipy)₂) saf su içinde çözülmüş ve çözelti 0 °C' a soğutulmuştur. Daha sonra trietilamin ve 1g MATyr sulu çözeltisi damla damla RuCl₂(bipy)₂ çözeltisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım 80 °C' da 24 saat reflaks edilmiştir. Oluşan kahverengi kompleks süzölmüş, eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur [10].

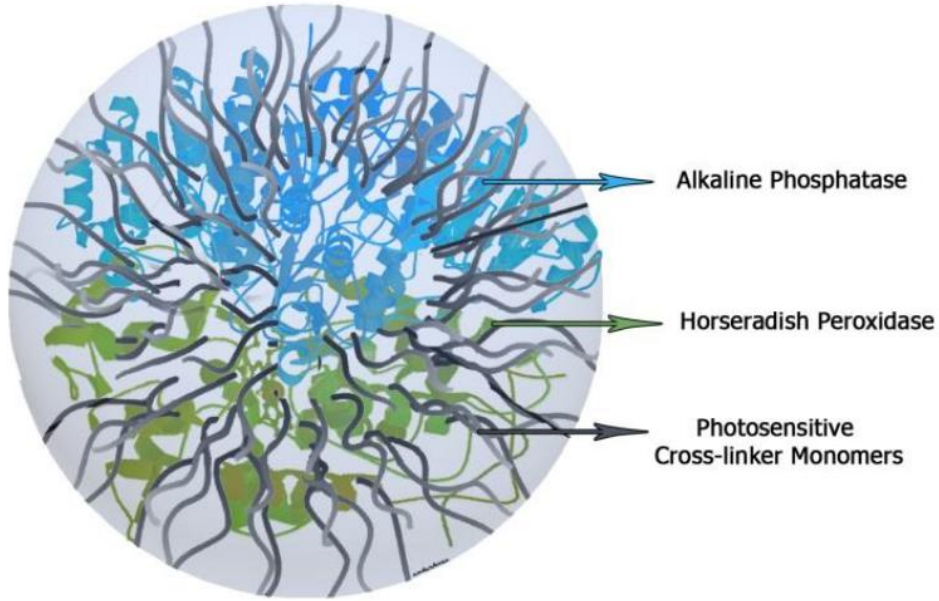


Şekil 2.2. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

2.2.3. HRP-ALP hetero nano-enzim sentezi

HRP-ALP nanopartiküller ANADOLUCA metodu esas alınarak ve mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğine göre sentezlenmiştir. Mikroemülsiyon sistemi, 0,5 g poli(vinilalkol)' ün (PVA) 45 ml distile su içerisinde dispers edilmesiyle hazırlanmıştır. Diğer bir tarafta 200 ppm 1 ml ALP çözeltisi ile 200 ppm 1 ml HRP çözeltisi oksijen atmosferinde 0 °C' da 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım üzerine ışığa duyarlı rutenyum merkezli (MATyr)₂Ru(bipy)₂ kompleksinden 50 µl ilave edilmiş ve karışım 1 saat karıştırılmıştır. Bu karışımı disper edilmiş PVA çözeltisinde 10 ml eklemiştir. Son olarak 45 ml distile su içerisinde 0,02 g APS nin çözümlenmesiyle hazırlanan polimerizasyon başlatıcı çözeltisinden karışıma 2 ml eklenmiş ve karışım azot atmosferi altında, oda sıcaklığı ve gün ışığında 48 saat karıştırılmıştır. HRP-ALP nanopartikülleri

reaksiyon ortamından 14000 rpm ve 10 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır ve reaksiyona girmeyen maddeleri uzaklaştırmak için distile suyla yıkanmıştır.



Şekil 2.3. Hetero nano-enzim yapısı

2.2.4. HRP-ALP hetero nano-enzim karakterizasyon çalışmaları

Partiküllerin ortalama boyutu ve boyut dağılımı zetametre, transmiyon elektron mikroskopu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskopu ile belirlenmiştir. Zeta pontasiyometri cihazı ile nano yapının izoelektrik noktası tespit edilmiştir.

2.2.5. Hetero nano-enzim yapıda protein miktarı tayini

Nano partiküllerin toplam protein tayinini gerçekleştirmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde farklı derişimlerdeki protein çözeltilerine Bradford çözeltisi eklenmiş ve 5 dakida bekletildikten sonra 595 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. 5,00; 10,0; 25,0 ve 50,0 ppm' lik standart protein çözeltisi kullanılarak protein derişimine karşı absorbans grafiği çizilmiş ve hetero enzim nano yapının toplam protein miktarı kalibrasyon grafiği yardımıyla tayin edilmiştir.

2.2.6. Enzim kinetiği çalışmaları

2.2.6.1. Horseradish peroksidaz enziminin aktivite tayini

Horseradish peroksidaz enziminin aktivite tayini, tetrametilbenzidin (TMB) kromojenik substratının oksidasyonla mavi renkli ürüne dönüşümü, spektroskopik olarak zamana karşı absorbans değerlerindeki değişimin 620 nm' de izlenmesiyle tespit edilmiştir. Aktivite hesaplarında molar uyarılma katsayısı (ϵ_{620}) $3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınmıştır [39]. Aktivite tayini farklı pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonları göz önüne alınarak incelenmiştir. Ölçümlerde 10mM TMB ve 2mM H_2O_2 içeren substrat çözeltisi kullanılmıştır. Aktivitede kullanılan toplam hacim mikropolanın her bir kuyusu için 150 μl olarak çalışılmıştır.

Horseradish peroksidaz enziminin aktivitesinin hesaplanmasında türetilen aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$U = \frac{\Delta A}{t \times \epsilon_{620} \times l} \times V \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ L}}{10^6 \mu\text{l}} \quad (2.1)$$

Bu denklemde U ($\mu\text{mol/dak}$) unit aktiviteyi, ΔA mutlak absorpsiyonu, ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 620 nm'deki TMB' in molar absorpsiyon katsayısını, V (μl) çözeltinin toplam hacmini ifade etmektedir.

2.2.6.2. Alkalin fosfataz enziminin aktivite tayini

Alkalin fosfataz enziminin aktivite tayini, 4-nitrofenil fosfat (4-NPP) kromojenik substratının hidroliziyle sarı renkli ürüne dönüşümü, spektroskopik olarak zamana karşı absorbans değerlerindeki değişimin 405 nm'de izlenmesiyle tespit edilmiştir. Aktivite hesaplarında molar ekstinsiyon katsayısı (ϵ_{405}) $1,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınmıştır [40]. Aktivite tayini farklı pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonları göz önüne alınarak incelenmiştir. Ölçümlerde 10 mM 4-NPP substrat çözeltisi kullanılmıştır. Aktivitede kullanılan toplam hacim mikropolanın her bir kuyusu için 150 μl olarak çalışılmıştır.

Alkalin fosfataz enziminin aktivitesinin hesaplanmasında türetilen aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$U = \frac{\Delta A}{t \times \varepsilon_{405} \times l} \times V \times \frac{10^6 \mu mol}{1 mol} \times \frac{1 L}{10^6 \mu l} \quad (2.2)$$

Bu denklemde U (μmol/dak) unit aktiviteyi, ΔA mutlak absorpsiyonu, ε (M⁻¹cm⁻¹) 405 nm' deki 4-NPP' in molar absorpsiyon katsayısını, V (μl) çözeltinin toplam hacmini ifade etmektedir.

2.2.6.3. HRP-ALP hetero nano-enzimlerin aktivite tayini

NanoHRP-ALP aktivite tayini, serbest enzimlerle aynı yöntemler izlenerek çalışılmıştır. Nano yapıda HRP enzimi için 10mM TMB ve 2mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisi kullanılmış ve 620 nm' de absorbans değerlerindeki değişim izlenmiştir. Nano yapının ALP enzimi içinse 10 mM 4-NPP substrat çözeltisi kullanılarak 405 nm' de absorbans değerlerindeki değişim izlenmiştir.

2.2.6.4. Horseradish peroksidaz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine pH'ın etkisi

Serbest horseradish peroksidaz ve nanoHRP-ALP aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 3 tartarat; 4 sitrat tamponu; 5 ve 6 asetat; 7 fosfat tamponu) 125 mM'lık derişimlerde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Serbest HRP ve nanoHRP-ALP için unit aktivite değerleri denklem (2.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

En yüksek unit aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktivite değerleri bulunmuştur. pH değerlerine karşılık bağıl aktivite grafikleri çizilerek serbest HRP ve nanoHRP-ALP için optimum pH değerleri belirlenmiştir.

2.2.6.5. Alkalen fosfataz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine pH'ın etkisi

Serbest alkalen fosfataz ve nanoHRP-ALP aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 7 ve 8 fosfat; 9 ve 10 glisin-NaOH; 11 tetraborat tamponu) 125 mM'lık derişimlerde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Serbest ALP ve nanoHRP-ALP için unit aktivite değerleri denklem (2.4) kullanılarak hesaplanmıştır.

En yüksek unit aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktivite değerleri bulunmuştur. pH değerlerine karşılık bağıl aktivite grafikleri çizilerek serbest HRP ve nanoHRP-ALP için optimum pH değerleri belirlenmiştir.

2.2.6.6. Horseradish peroksidaz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest HRP ve nanoHRP-ALP için farklı sıcaklıklarda (25, 37, 45, 60 ve 70°C'de) aktivite ölçümleri yapılmıştır. Mikroplaka okuyucunun sıcaklığı 45 °C 'a kadar çıkarılabildiğinden 60 ve 70 °C' daki ölçümler sıcaklık kontrollü küvet tutucu entegre edilmiş UV spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Serbest HRP ve nanoHRP-ALP için sıcaklıklara karşı bağıl aktivite grafikleri çizilmiş ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

2.2.6.7. Alkalen fosfataz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest ALP ve nanoHRP-ALP için farklı sıcaklıklarda (25, 37, 45, 60 ve 70°C'de) aktivite ölçümleri yapılmıştır. Mikroplaka okuyucunun sıcaklığı 45 °C 'a kadar çıkarılabildiğinden 60 ve 70 °C' daki ölçümler sıcaklık kontrollü küvet tutucu entegre edilmiş UV spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Serbest ALP ve nanoHRP-ALP için sıcaklıklara karşı bağıl aktivite grafikleri çizilmiş ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

2.2.6.8. Horseradish peroksidaz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine substrat derişiminin etkisi

Serbest HRP ve nanoHRP-ALP aktivitesine substrat derişiminin etkisinin araştırılması için farklı derişimlerde (1,00; 1,33; 2,00; 2,67; 3,33 mM) TMB hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki substratların enzimle etkileşimi 620 nm' de takip edilmiş ve her derişim için reaksiyon hızları saptanmıştır. Aktivite hesapları yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanarak serbest HRP ve nanoHRP-ALP için K_m ve V_{mak} kinetik sabitleri bulunmuştur.

2.2.6.9. Alkalen fosfataz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine substrat derişiminin etkisi

Serbest ALP ve nanoHRP-ALP aktivitesine substrat derişiminin etkisinin araştırılması için farklı derişimlerde (1,00; 1,33; 2,00; 2,67; 3,33 mM) 4-NPP hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki substratların enzimle etkileşimi 405 nm' de takip edilmiş ve her derişim için reaksiyon hızları saptanmıştır. Aktivite hesapları yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanarak serbest HRP ve nanoHRP-ALP için K_m ve V_{mak} kinetik sabitleri bulunmuştur.

2.2.6.10. Horseradish peroksidaz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine enzim derişiminin etkisi

Enzim kinetiğine, enzimlerin başlangıç derişimlerinin etkisinin incelenmesi için derişimler 1,00; 2,00; 3,00 ppm HRP ve 5,00; 10,0; 15,0 ppm nanoHRP-ALP çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir derişim için enzim aktivitesi hesaplanmış ve en yüksek aktiviteye %100 kabul edilerek enzim miktarlarına karşı bağıl aktiviteler bulunmuştur.

2.2.6.11. Alkalen fosfataz ve nanoHRP-ALP aktiviteleri üzerine enzim derişiminin etkisi

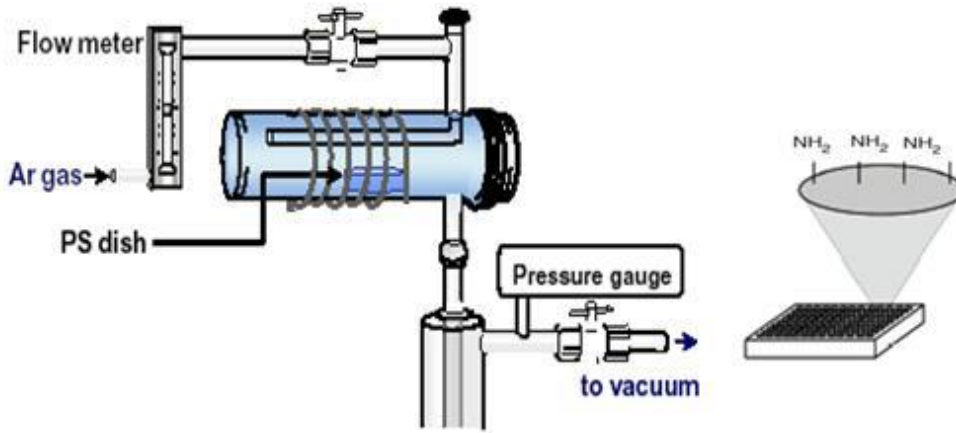
Enzim kinetiğine, enzimlerin başlangıç derişimlerinin etkisinin incelenmesi için derişimleri 0,15; 0,30; 0,45 ppm olan ALP ve 40,0; 80,0; 120 ppm nanoHRP-ALP çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir derişim için enzim aktivitesi hesaplanmış ve en yüksek aktiviteye %100 kabul edilerek enzim miktarlarına karşı bağıl aktiviteler bulunmuştur.

2.2.7. Hetero nano-enzim yapının tekrar kullanılabilirliği

Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları 200 µl enzim çözeltisi 100 µl substrat ve 700 µl tampon çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivite ölçümlerinden sonra reaksiyon çözeltileri santrifüjlenerek nano yapılar çöktürülmüştür. Daha sonra nano yapılar metil alkol, etil alkol ve saf su ile yıkanarak tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Hesaplamalarda en yüksek aktivite % 100 kabul edilerek tekrar sayısına karşı bağıl aktiviteler bulunmuştur.

2.2.8. Radyo Frekans Plazma yöntemi kullanılarak mikropalakaların fotosensitif monomerlerle modifikasyonu

Şekil 2.4’de gösterildiği gibi polistiren malzemeden yapılmış mikropalakaların modifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, mikropalakalar plazma cihazı içerisine yerleştirilmiş ve plazma polimerizasyonu öncesi 20 mTorr başlangıç basıncı sağlanmıştır. Çalışma için amin kaplı plakalar elde edilmiştir. Amin kaplı kuyular elde etmek için hidrazin RF plazma yöntemi kullanılarak 10 dakika süre ile sistemden geçirilmiş ve plakaların kuyularına kaplanmıştır.



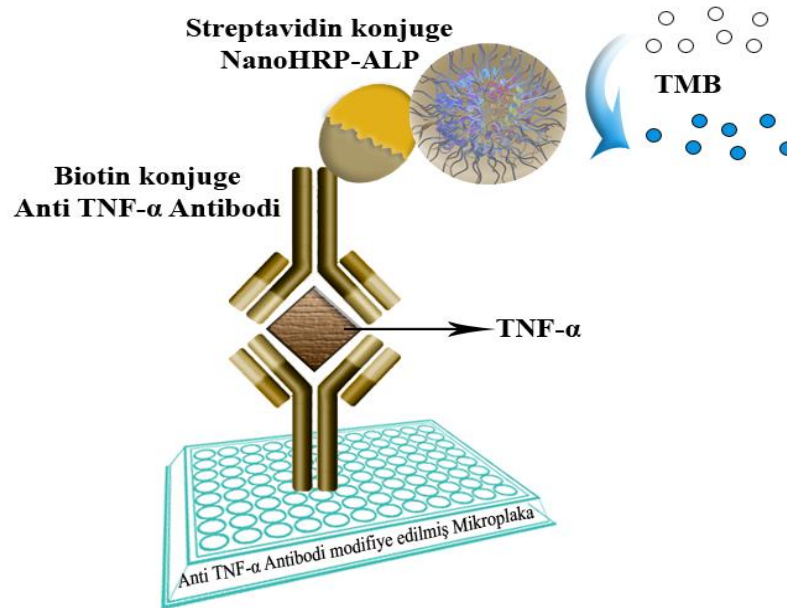
Şekil 2.4. Plazma yöntemi ile plaka kaplama işlemi

2.2.9. Mikropalaka kuyularına TNF- α antikoruna çapraz bağlanması ve mikropalakaların heteroenzim ile sandviç ELISA yönteminde kullanılması

ELISA sistemleri içerisinde en sık kullanılan yöntem sandviç ELISA yöntemidir. Bu yöntemin temel mantığı tespit edilmek istenen analitin spesifik iki antikor arasında kalması ve analite bağlanan ikinci antikora konjuge edilmiş enzim ile substratın etkileşimiyle ölçüm yapılmasıdır.

Plazma yöntemi ile amin grupların bağlandığı mikropalaka kuyularına antikor kaplaması yapmak için 20 μ L NHS, 20 μ L EDC, 20 μ L fotosensitif monomer (MATyr-Ru(bipyridyl)₂-MATyr) ve 100 μ L 5 μ g/mL olarak hazırlanmış anti- TNF- α antikoruna eklenmiştir. Ardından APS çözeltisinden eklenerek kaplama işlemi tamamlanmış ve 1 mg/mL PBS içerisinde hazırlanan BSA ile bloklama yapılmıştır.

Anti- TNF- α antikoruna kaplanarak hazırlanmış olan mikropılaka kuyularda Şekil 2.5’ de gösterildiği gibi sandiviç ELISA sistemi uygulanmıştır. Hazırlanan 8 farklı konsantrasyondaki TNF- α standartları (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL ve 31,5 pg/mL) kuyulara eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yüzeydeki antikorlara bağlanamayan antijenlerin ortamdaki uzaklaştırılması için yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Biotinlenmiş Anti- TNF- α antikoruna 5 μ g/mL olarak 100 μ L kuyulara eklenmiştir ve 1 saat oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile yıkamalar yapılmıştır. Sentezlenmiş olan nano-HRP-ALP konjuge streptavidin 5 μ g/mL olarak 100 μ L kuyulara eklenmiştir ve 1 saat oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile yıkamalar yapılmıştır ve 100 μ L pH=5 tampon ve 50 μ L TMB substrat çözeltisi kuyulara eklenmiştir. Karanlık ortamda 10 dakika bekletildikten sonra sıvıların renklerinin mavi olduğu görülmüştür. 1,0 M olarak hazırlanan H₂SO₄ 25 μ L olarak kuyulara eklenmiştir. Sıvıların renkleri sarıya dönmüştür ve 450 nm’de mikropılaka okuyucuda absorbanans değeri alınmıştır. Aynı anda 100 μ L pH=10 tampon ve 50 μ L 4-NPP substrat çözeltisi kuyulara eklenmiştir. Karanlık ortamda 10 dakika bekletildikten sonra sıvıların renklerinin sarı olduğu görülmüştür. 1,0 M olarak hazırlanan NaOH 25 μ L olarak kuyulara eklenmiştir 405 nm’de mikropılaka okuyucuda absorbanans değeri alınmıştır.



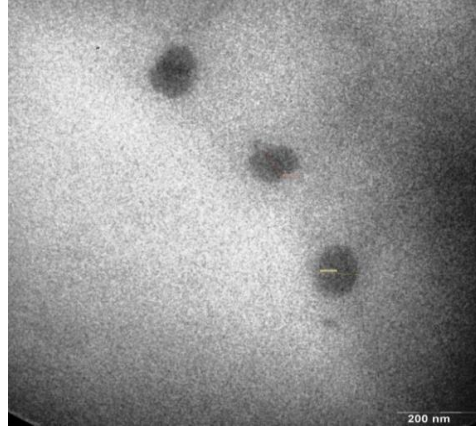
Şekil 2.5. Yüzeye anti TNF- α antikoruna bağlanılan ELISA yöntemi

3. BULGULAR

3.1. Hetero nano-enzim Nanoyapıların Karakterizasyonu

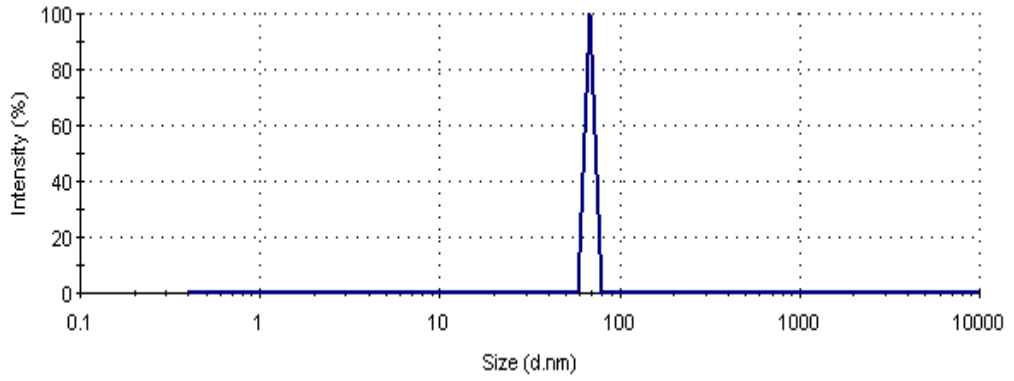
3.1.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizi

Nano HRP-ALP yapıları TEM ile analiz edilmiştir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi elde edilen hetero nano-enzim yapının boyutları 90 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 3.1. Heteroenzim NanoHRP-ALP nano yapının TEM görüntüsü

3.1.2. Boyut analizi

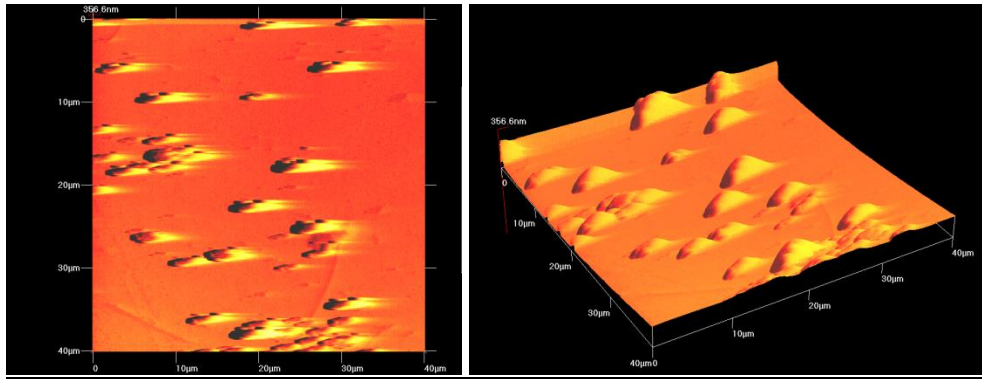


Şekil 3.2. Nano HRP-ALP yapısının boyut analizi

Sentezlenen NanoHRP-ALP' in ortalama partikül boyut dağılımı yaklaşık 90 nm olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM) analizi

Sentezlenen NanoHRP-ALP yapılar sulu ortamda dispers edilerek, spin coater ile cam lamaların üzerine 2000 rpm de kaplanmıştır. Şekil 3.3 a ve b’de verilen AFM sonuçlarından görüldüğü gibi NanoHRP-ALP yapılar heterojen bir dağılım ile yaklaşık 356 nm boyutlarında yüzeye kaplanmıştır. Boyut analizlerinden yaklaşık 90 nm boyuta sahip olduğu bulunan NanoHRP-ALP yapılar top wiew görüntüsünden de görüldüğü gibi kümelenme göstermiş ve tam boyutları tespit edilememiştir.



(a)

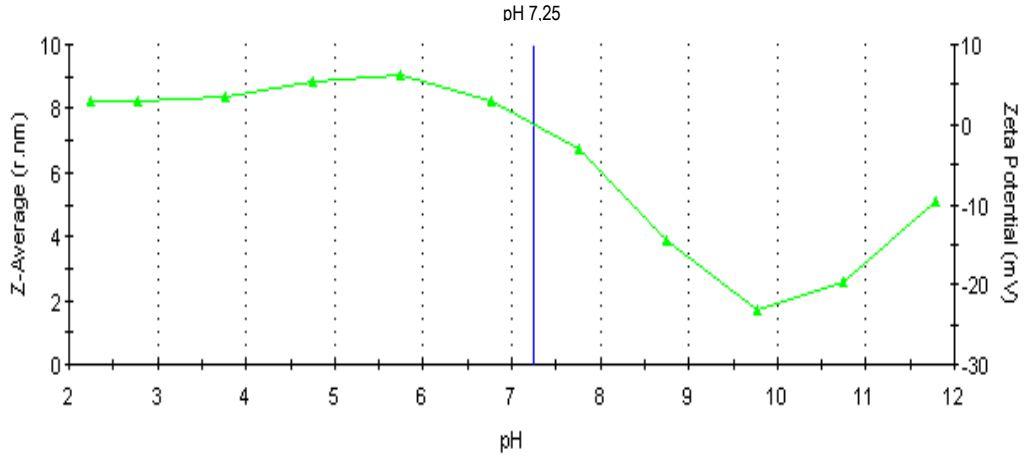
(b)

Şekil 3.3. (a) NanoHRP-ALP yapılarının top wiew AFM görüntüsü

(b) NanoHRP-ALP yapılarının 3D AFM görüntüsü

3.1.4. Hetero nano-enzim yapının zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli yüzey yük yoğunluğu ile alakalıdır. Yük yoğunluğu belirleyici iyonların derişimine bağlıdır. Çoğu sistemde belirleyici iyon H^+ olduğu için zeta potansiyeli pH ile değişim gösterir. Alkali pH’ da pozitif asidik pH’ da negatif değer alır. Zeta potansiyelinin sıfır olduğu pH nano enzimin izoelektrik noktası olarak adlandırılır. Zeta potansiyeli partikülün kararlılığını etkiler. Aynı elektrik yüküne sahip tanecikler arasındaki elektrostatik itme partiküllerin bir araya gelmesini engeller. Yüksek zeta potansiyeline sahip moleküller elektriksel olarak kararlıdır.



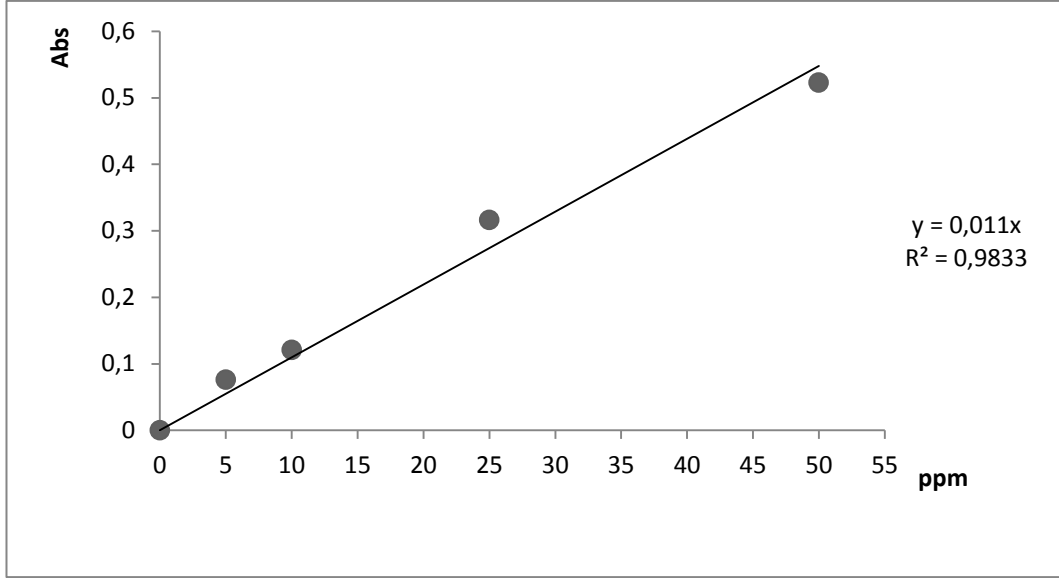
Şekil 3.4. NanoHRP-ALP yapısının zeta potansiyeli

Şekil 3.4' de sentezlenen heteroenzim nanoHRP-ALP yapısının zeta potansiyel ölçümünün sonucu yer almaktadır. Bu şekil incelendiğinde sentezlenen nano yapının izoelektrik noktası pH 7,25 olarak bulunmuştur.

Literatürde serbest HRP ve ALP 'ın izoelektrik noktaları sırasıyla pH 8,8 ve pH 4,3 olarak verilmiştir [41,42]. Elde ettiğimiz heteroenzim nano yapının izoelektrik noktasının serbest enzimlerden farklı bir değerde olması nano yapı içinde iki enzimin birden muhafaza edildiğini göstermektedir.

3.1.5. Hetero nano-enzim yapının Bradford metodu ile protein miktarı tayini

Bradford metodu herhangi bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde boya olarak, proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Commassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Asidik çözeltilerde bu boyanın proteinlere bağlanması, boyanın maksimum absorpsiyonunun 465 nm (kırmızı) den 595 nm (mavi)' ye kaymasına neden olmaktadır. Boya belirteci eklendikten 2 dakika sonra renk oluşumu tamamlanır ve oluşan renk 1 saat kararlıdır.



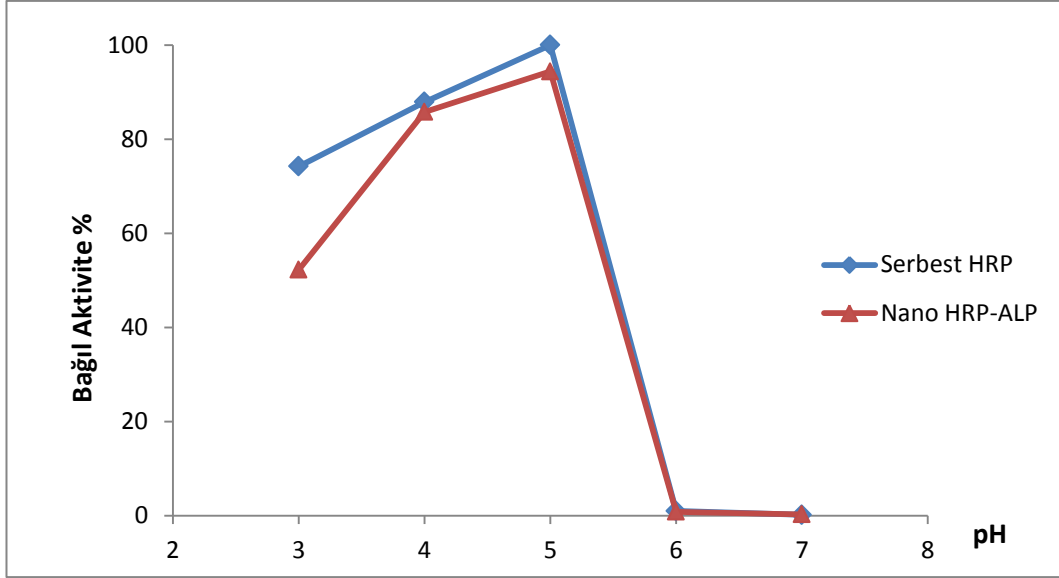
Şekil 3.5. Nano HRP-ALP yapısının protein miktarını belirlemek için oluşturulan kalibrasyon grafiği

Bradford metodunda, farklı konsantrasyonlarda standart protein (bovin-serum albumin) içeren örnekler hazırlanmıştır ve Bradford belirteçleri ile reaksiyona sokularak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda (595nm) absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu veriler kullanılarak standart eğri (Şekil 3.5) oluşturulmuş ve nanoHRP-ALP yapısının protein konsantrasyonu bu eğri grafiği kullanılarak tespit edilmiştir. Nano yapı için 595 nm’deki okunan absorbans değeri 0,398 olarak ölçülmüştür ve standart eğri yardımı ile nano yapının protein miktarı 40 ppm olarak bulunmuştur.

3.1.6. Kinetik çalışmalar

3.1.6.1. pH etkisi

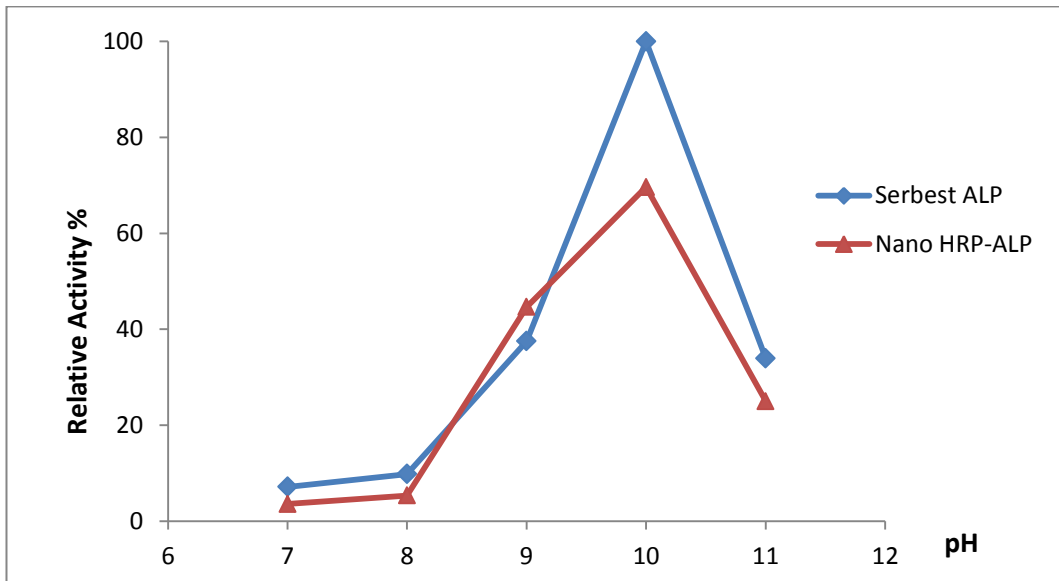
25°C’de farklı pH aralığında (3-7) yapılan ölçümler sonucunda 1 ppm serbest HRP ve 1 ppm nano HRP-ALP enzimlerinin aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Aktivite işlemlerinde 10 mM TMB ve 2 mM H₂O₂ substrat çözeltisi kullanılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçları Şekil 3.6’de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Substrat olarak TMB kullanıldığında, serbest HRP ve Nano HRP-ALP yapısının aktivitelerinin pH ile değişimi

Yukarıdaki şekilde görüldüğü üzere nano yapı ile serbest enzimin aktiviteleri birlerine yakın olarak gözlenmiştir ve bu iki yapı için de optimum pH 5 olarak bulunmuştur.

Sentezlenen nano yapıda bulunan enzimlerden ALP kısmı için yapılan pH taraması 25°C’ de farklı pH aralığında (7-11) ve 10mM 4-NPP substrat çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Serbest ALP ve nano HRP-ALP enzimlerinin farklı pH’lardaki aktivitelerinin karşılaştırılması Şekil 3.7’ de gösterilmektedir.

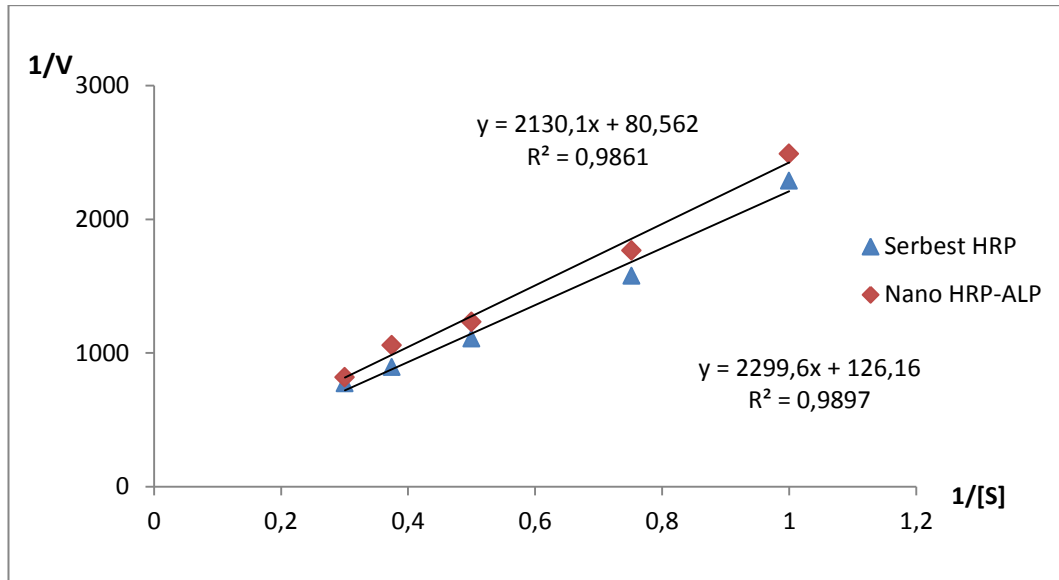


Şekil 3.7. Substrat olarak 4-NPP kullanıldığında, serbest ALP ve Nano HRP-ALP yapısının aktivitelerinin pH ile değişimi

Şekil 3.7 göz önüne alındığında farklı pH' lardaki enzim aktivite değişiminin benzer olduğu görülmektedir. Her iki yapı içinde optimum pH 10 olsa da nano yapının pH 9' daki aktivitesi serbest enzimden fazladır.

3.1.6.2. Substrat derişimi etkisi

Serbest HRP ve sentezlenen hetero nanoHRP-ALP enzim yapısının kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{mak}) belirlenebilmesi için TMB ve H_2O_2 substratları varlığında Lineweaver-Burk denklemi kullanılmıştır. Bu denklemden elde edilen grafik Şekil 3.8' de verilmiştir.



Şekil 3.8. Farklı derişimlerdeki TMB substratı ve pH 5 tamponu kullanılarak serbest HRP ve NanoHRP-ALP ile oluşturulan Lineweaver - Burk eğrisi

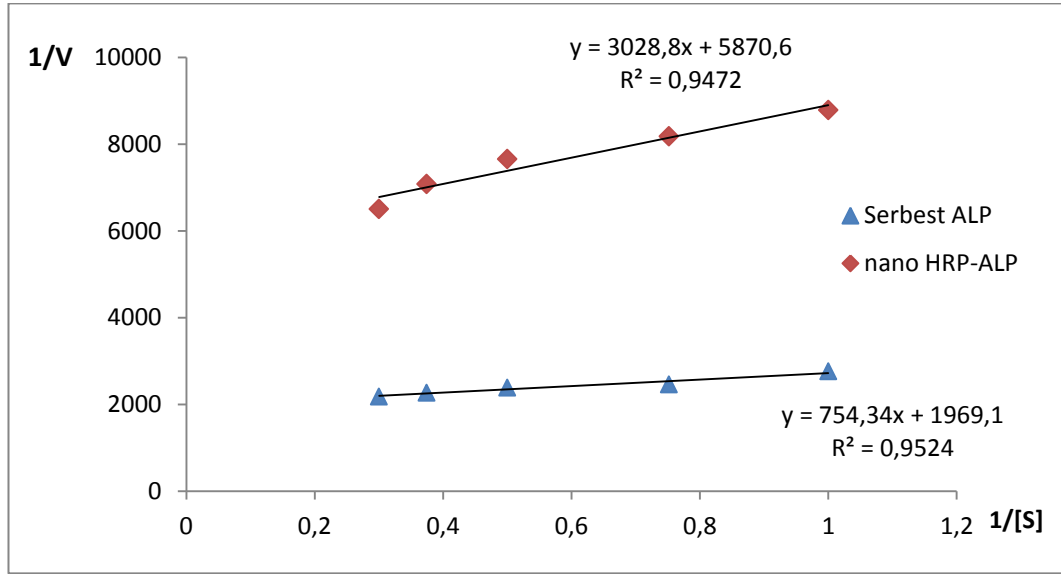
Çizilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla serbest HRP eziminin K_m ve V_{mak} sırasıyla 18 mM ve $7,92 \times 10^{-3}$ U; nanoHRP-ALP yapısının K_m ve V_{mak} sırasıyla 26 mM ve $1,24 \times 10^{-2}$ U olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. Literatürdeki ve hesaplanan NanoHRP-ALP ve Serbest HRP enzimlerinin Michaelis sabitleri ve maksimum reaksiyon hızları

| | K_M | V_{mak} | Referans |
|--------------|----------|---------------------------|----------|
| nano HRP-ALP | 26 mM | $1,24 \times 10^{-2}$ U | |
| Serbest HRP | 18 mM | $7,92 \times 10^{-3}$ U | |
| Serbest HRP | 0.61mM | 0.29 mM/min | [43] |
| Serbest HRP | 0.06 mM | 15×10^{-8} M/s | [44] |
| Serbest HRP | 0.048 mM | 1.65×10^{-8} M/s | [45] |

Serbest HRP ve nanoHRP-ALP enzimleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1’ de gösterilmektedir. Sentezlenen nanoHRP-ALP yapısının K_m ve V_{mak} değerleri literatürdeki serbest HRP K_m ve V_{mak} değerleri ile kıyaslanmıştır.

Serbest ALP ve sentezlenen hetero nanoHRP-ALP enzim yapısının kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{mak}) belirlenebilmesi için 4-NPP substratı varlığında Lineweaver-Burk denklemi kullanılmıştır. Bu denklemden elde edilen grafik Şekil 3.9’ da verilmiştir.



Şekil 3.9. Farklı derişimlerdeki 4-NPP substratı ve pH 10 tamponu kullanılarak serbest ALP ve NanoHRP-ALP ile oluşturulan Lineweaver - Burk eğrisi

Çizilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla serbest ALP enziminin K_m ve V_{mak} sırasıyla 0,383 mM ve $5,07 \times 10^{-4}$ U; nanoHRP-ALP yapısının K_m ve V_{mak} sırasıyla 0,516 mM ve $1,70 \times 10^{-4}$ U olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. Literatürdeki ve hesaplanan NanoHRP-ALP ve Serbest ALP enzimlerinin Michaelis sabitleri ve maksimum reaksiyon hızları

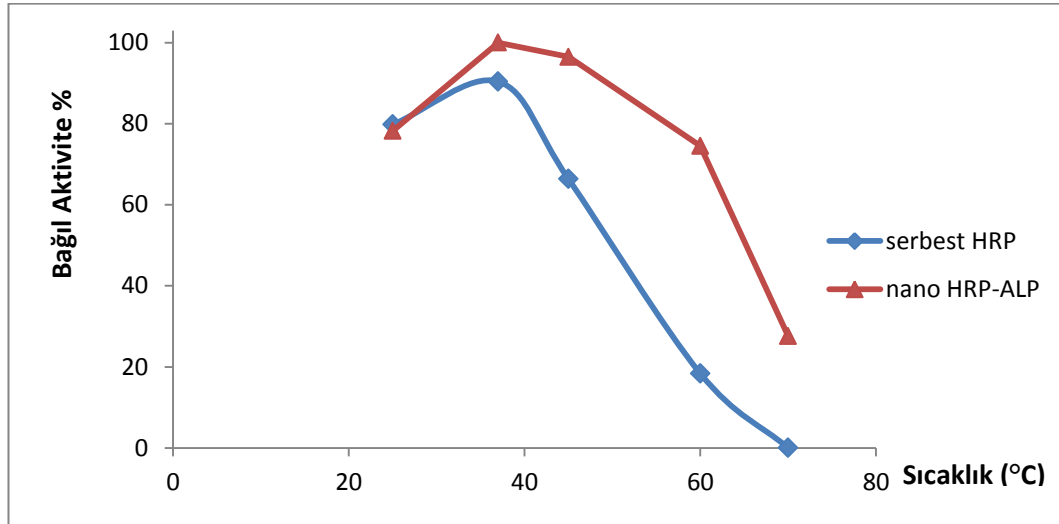
| | K_M | V_{mak} | Referans |
|--------------|----------|-------------------------|----------|
| nano HRP-ALP | 0,516 mM | $1,70 \times 10^{-4}$ U | |
| Serbest ALP | 0,383 mM | $5,07 \times 10^{-4}$ U | |
| Serbest ALP | 0,5 mM | 20 μ M/min | [46] |

Serbest ALP ve nanoHRP-ALP enzimleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2' de gösterilmektedir. Sentezlenen nanoHRP-ALP yapısının K_m ve V_{mak} değerleri literatürdeki serbest HRP K_m ve V_{mak} değerleri ile kıyaslanmıştır.

3.1.6.3. Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın, enzim aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmaların sonucu Şekil 3.10 ve Şekil 3.11' de gösterilmektedir. Her iki çalışmada da enzim aktivitesi ölçümleri 25, 37, 45, 60 ve 75°C' de gerçekleştirilmiştir.

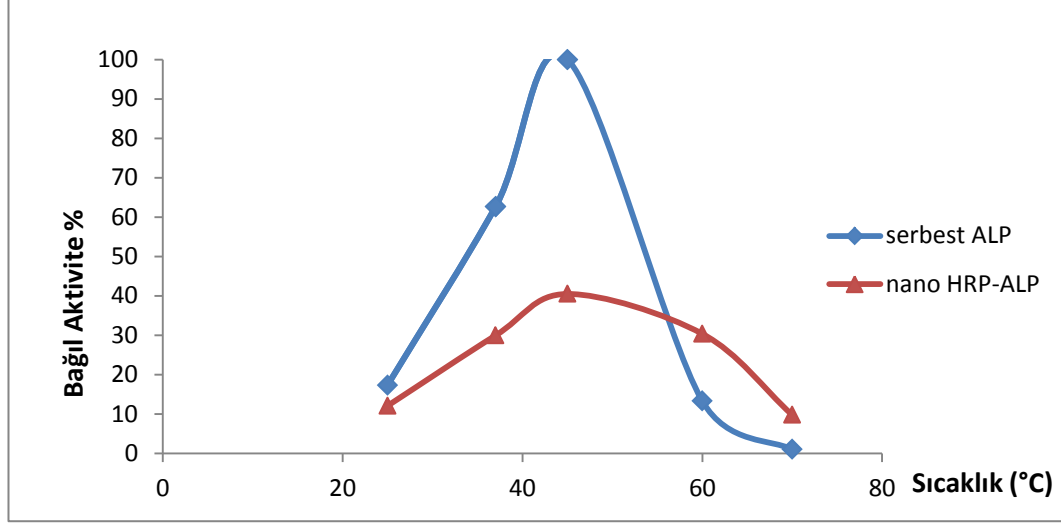
Sıcaklığın, serbest HRP ve nano HRP-ALP enzim aktivitelerine etkisinin gözlemlemek için pH 5 tamponu ve 10 mM TMB ve 2 mM H₂O₂ substrat çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 3.10. Substrat olarak TMB kullanıldığında sıcaklığın serbest HRP ve Nano HRP-ALP aktiviteleri üzerine etkisi

Şekil 3.10' de görüldüğü üzere sıcaklığın her iki yapı üzerindeki etkisinin benzer olduğu görülmektedir. 25°C' de kısmen düşük olan nano HRP-ALP aktivitesi sıcaklık artışı ile 37°C' de serbest enzimden daha yüksek aktivite göstermiştir. Sıcaklığın 45°C' ye çıkartılmasıyla her iki yapının aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. 60°C' ye gelindiğinde serbest enzimin aktivitesi yaklaşık %70 azalırken hetero nano-enzim yapının aktivitesinde %25' lik bir azalma söz konusudur. 70°C' de serbest enzim denatüre olup aktifliğini tamamen yitirirken hetero enzim nano yapı aktivitesini korumaktadır.

Sıcaklığın, serbest ALP ve nano HRP-ALP enzim aktivitelerine etkisini gözlemlemek için pH 10 tamponu ve 10mM 4-NPP substrat çözeltisi kullanılmıştır.

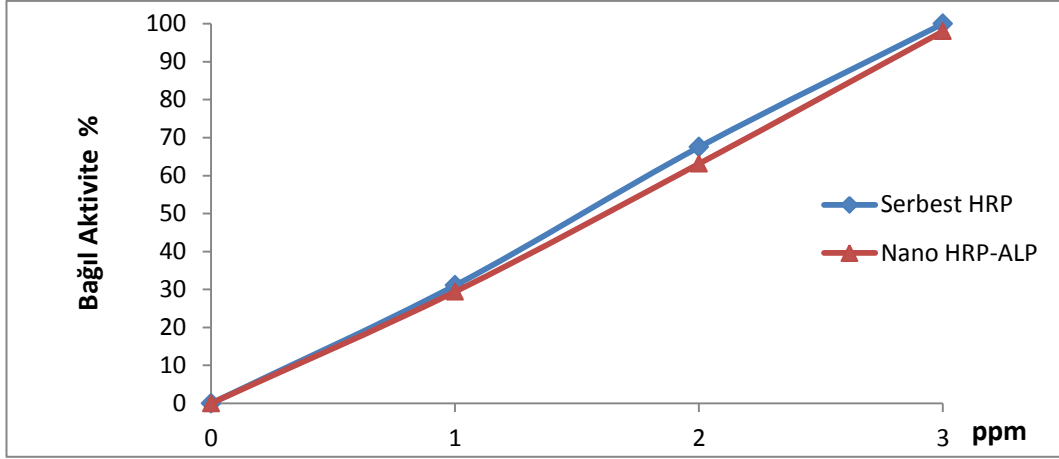


Şekil 3.11. Substrat olarak 4-NPP kullanıldığında sıcaklığın, serbest ALP ve Nano HRP-ALP aktiviteleri üzerine etkisi

Şekil 3.11' de sıcaklığın serbest ALP ve nano HRP-ALP aktiviteleri üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Her iki yapı içinde aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık 45°C olarak bulunmuştur. Ancak bu sıcaklıkta serbest enzimin aktivitesi hetero nano-enzim yapıdan daha fazla artış göstermiştir. 60°C' de serbest enzim denatüre olmaya başlamış aktivitesi büyük oranda azalmıştır. Bu sıcaklıkta nano yapı serbest enzim kadar etkilenmeyerek aktivitesinde fazla bir azalma gözlenmemiştir. 70°C'de serbest enzim tamamen denatüre olmuş ve aktifliğini yitirirken nano yapı aktivite göstermeye devam etmektedir.

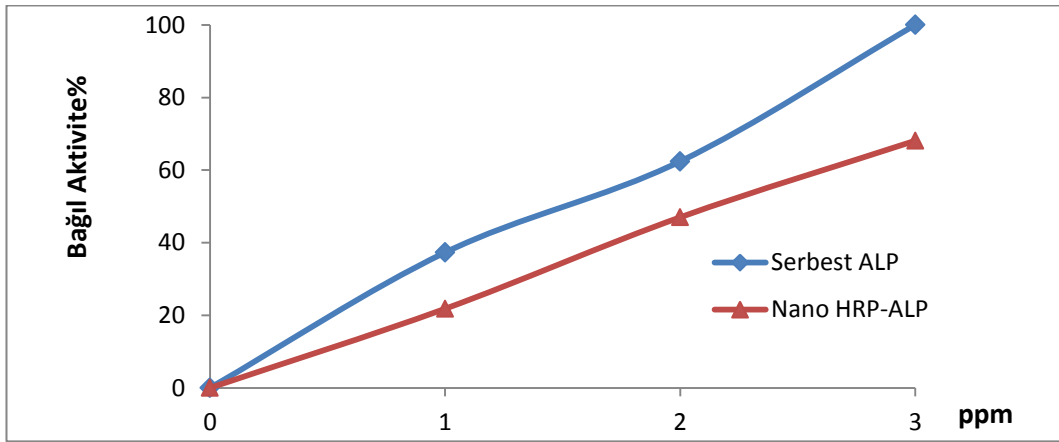
3.1.6.4. Enzim derişiminin etkisi

Şekil 3.12' de serbest HRP ve nano HRP-ALP yapısının derişimlerinin artmasıyla enzim aktivitesinin nasıl değiştiği gösterilmektedir. pH 5 tamponu ve 10 mM TMB 2 mM H₂O₂ substrat çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite işlemlerinde, enzim derişimin artmasıyla aktivitenin doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.



Şekil 3.12. Enzim derişimin aktivite üzerine etkisi (substrat : TMB ; pH5)

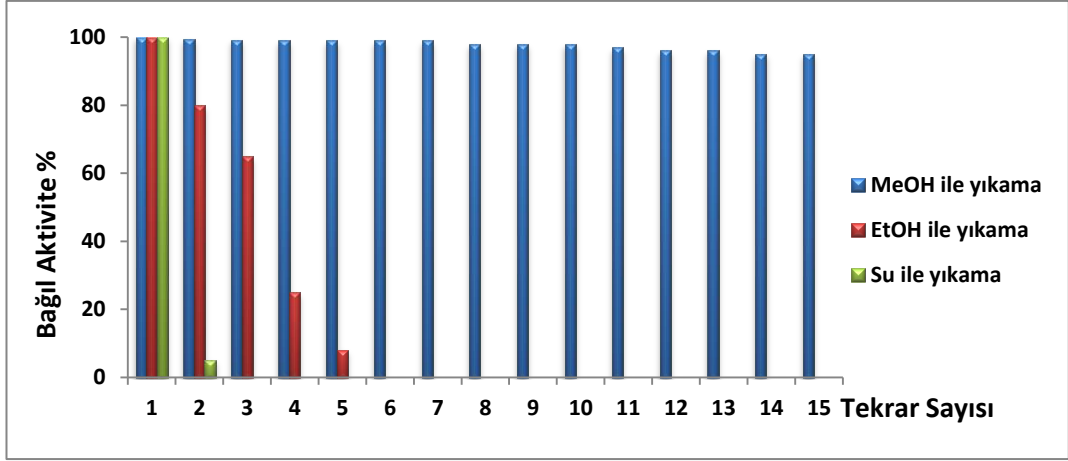
Şekil 3.13' de serbest HRP ve nano HRP-ALP yapısının derişimlerinin artmasıyla enzim aktivitesinin nasıl değiştii gösterilmektedir. pH 10 tamponu ve 10 mM 4-NPP substrat çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite işlemlerinde, enzim derişimin artmasıyla aktivitenin doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.



Şekil 3.13. Enzim derişimin aktivite üzerine etkisi (substrat: 4-NPP; pH10)

3.1.7. Hetero nano-enzim yapının tekrar kullanılabilirliği

Tekrar kullanılabilirlik çalışlarında nano yapılar kinetik işlemlerinden sonra santrifüj ile çöktürülmüştür. Çöktürülen nano HRP-ALP yapıları önce etil alkol, metil alkol ve saf su ile ve daha sonra tekrar saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan nano yapılar su içerisinde dispers edilerek tekrar kinetik işlemlere tabi tutulmuşlardır.

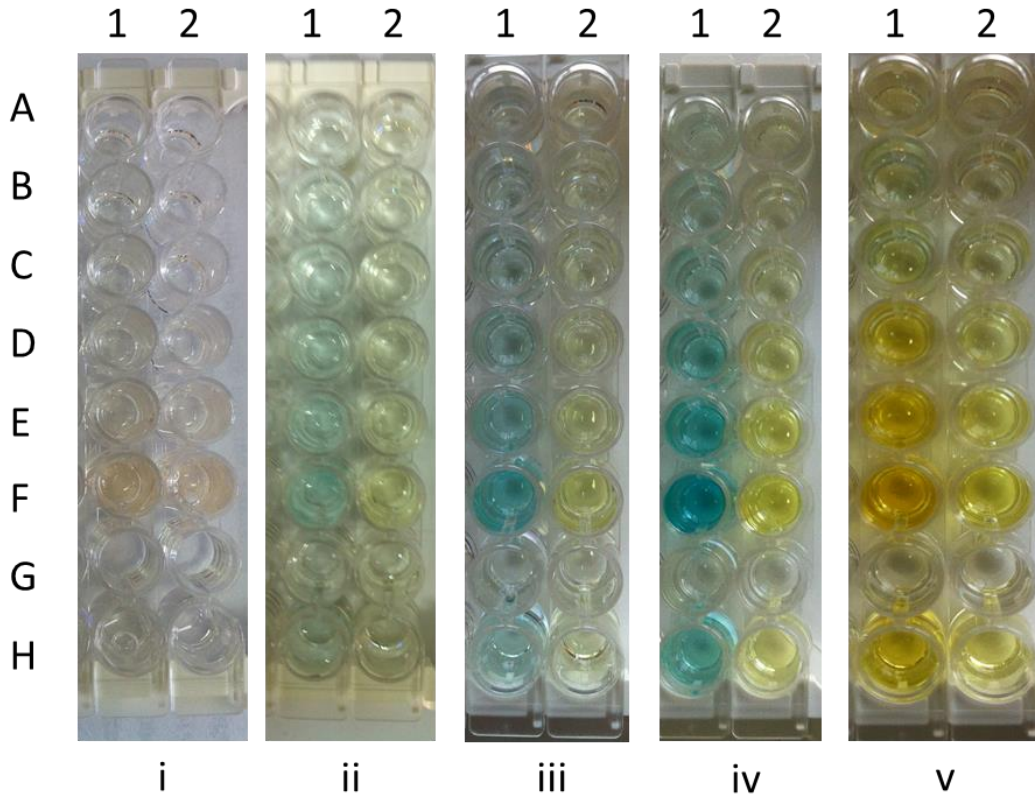


Şekil 3.14. Substrat olarak TMB kullanılan aktivite işlemlerinde nano yapıların tekrar kullanılabilirliği

Yapılan yıkama işlemlerinin sonuçları Şekil 3.14’ de gösterilmektedir. Kinetik işlemlerden sonra metil alkol ile yıkanan hetero nano-enzim yapıların 15. Tekrarda bile aktivitesinde önemli bir azalma olmazken etil alkol ile yıkama sonucunda aktivite 6. tekrarda aktivitesini yitirmiştir. Saf su enzim substrat arasındaki bağı kopartamadığı için su ile yıkanan nano yapılar ilk kullanımdan sonra çok düşük bir aktivite gösterirken aktivite gösterirken diğer tekrarlarda aktivite gösterememiştir.

3.1.8. Hetero nano-enzimin ELISA uygulaması

Sentezlenen hetero nano-enzim yapısı ile gerçekleştirilen ELISA testlerinde hetero nano-enzimin sahip olduğu iki farklı enzimde etkin bir şekilde aktivite göstermiş ve bu enzimlerin yüksek aktivite gösterdikleri optimum pH değerleri baz alınarak ELISA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.15’ de enzim aktivitesinin t=0. dak., 1. dak., 3. dak., 5. dak. ve reaksiyonların sonlandırıldığı anlardaki renk değişimleri gösterilmektedir. A-F kuyucuklarında artan konsantrasyonlarda TNF- α antijeni, G kuyucukları kör ve H kuyucukları numuler için kullanılmıştır. 1 numaralı sırasında hetero nano-enzim yapısı için pH 5 ortamında TMB substratı, 2 numaralı sırada pH 10 ortamında hetero nano-enzim yapısı için p-NPP substratı kullanılmıştır.



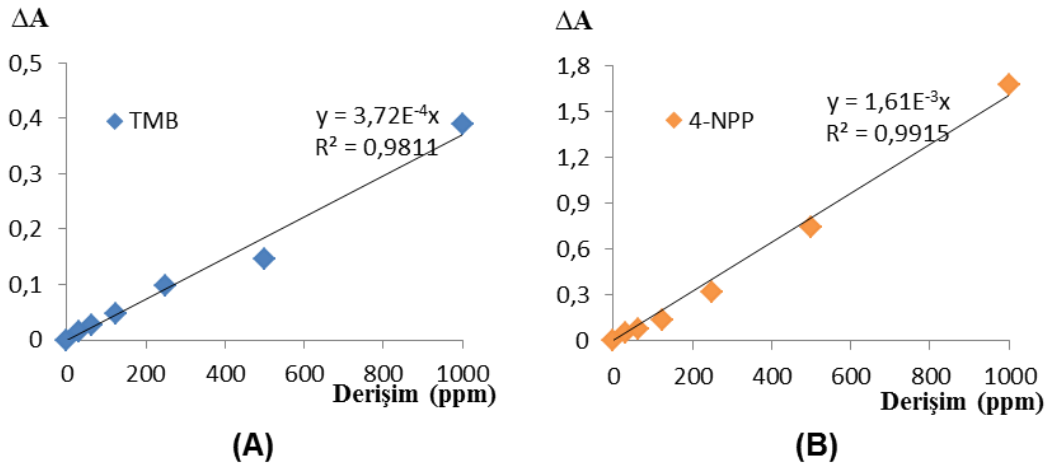
Şekil 3.15. i) A-F: TNF- α standartları, G: kör, H: TNF- α numunesi; ii) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin birinci dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); iii) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin üçüncü dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); iv) NanoHRP-ALP heteroenzim ilavesinin beşinci dakikası (TMB ve 4-NPP substratları); v) 0,5 M H₂SO₄ ve 0,5 M NaOH ilavesiyle enzim reaksiyonlarının sonlandırılması.

Çizelge 3.3’ de gerçekleştirilen ELISA uygulamasının sonuçları gösterilmektedir. Elde edilen bulgular sonucunda kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve numunenin derişimi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. NanoHRP-ALP heteroenzim ile gerçekleştirilen ELISA uygulamasının verileri.

| | | Derişim | 1 (TMB) | 2 (4-NPP) |
|---|-------------------------------|------------|------------|--------------|
| A | TNF- α Standartları | 31,25 ppm | 0,067 | 0,222 |
| B | | 62,5 ppm | 0,079 | 0,246 |
| C | | 125 ppm | 0,1 | 0,306 |
| D | | 250 ppm | 0,15 | 0,482 |
| E | | 500 ppm | 0,2 | 0,912 |
| F | | 1000 ppm | 0,443 | 1,836 |
| G | Kör | 0 ppm | 0,053 | 0,166 |
| H | Numune | Bilinmeyen | 0,14 | 0,565 |

Elde edilen sonuçlardan çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 3.16' da gösterilmektedir. Kalibrasyon grafiklerin sayesinde oluşturulan denklemlerden yararlanarak TMB substratı kullanılarak hetero nano-enzim yapısında HRP enziminin aktivitesi sayesinde numunedeki TNF- α derişimi 376 ppm ve p-NPP substratı kullanılarak hetero nano-enzim yapısında ALP enziminin aktivitesi sayesinde aynı numunedeki TNF- α derişimi 351 ppm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.16. A) NanoHRP-ALP heteroenzimi ve TMB substratı kullanılarak oluşturulan TNF- α kalibrasyon grafiği; B) NanoHRP-ALP heteroenzimi ve 4-NPP substratı kullanılarak oluşturulan TNF- α kalibrasyon grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada yapısında birden fazla fonksiyonu barındıran hetero nano-enzim yapıları sentezlenmiş, sentezlenen ürün karakterize edilmiş ve böylece alternatif bir nano yapı geliştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle metakriloil amino tirozin monomeri sentezlenmiştir. Sentezlenen monomer rutenyum ile kompleks oluşturularak fotosensitif özellik kazandırılmıştır. R. Say ve arkadaşları tarafından geliştirilen ANADOLUCA yöntemi ile fotosensitif monomer, alkalin fosfataz ve horseradish peroksidaz enzimleri ile beraber hetero nano-enzim yapısı sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemleri doğrultusunda hetero nano-enzim yapının Bradford yöntemine göre toplam protein miktarı 40 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu doğrultuda reaksiyon ortamına eklenen enzimlerin birçoğu nano yapılara katılmadan santrifüjleme işlemi sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmaktadır.

Kinetik çalışmalarda pH, enzim derişimi, sıcaklık, substrat derişimi ve tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hetero nano-enzim yapısında bulunan HRP enziminin TMB substratına karşı optimum pH' ı 5 olarak bulunmuş ve çok yüksek olmasa da serbest HRP enzime nazaran daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Hetero nano-enzim yapısında bulunan ALP enziminin p-NPP substratına karşı optimum pH' ı 10 olarak bulunmuş ve düşük pH' larda nano yapının aktivitesi bir miktar yüksek olsa da optimum pH' da serbest enzimin bir miktar gerisinde kalmıştır. Böylece hetero nano-enzim yapısında HRP ve ALP' nin aynı oranda bulunmadığı anlaşılmıştır.

Substrat derişimi etkisi incelendiğinde hetero nano HRP-ALP enzim yapısının TMB substratına karşı $K_m = 26 \text{ mM}$ ve $V_{\text{mak}} = 1,24 \times 10^{-2} \text{ U}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların serbest HRP enziminin K_m ve V_{mak} değerlerinde çok farklı olmadığı ve literatür değerlerine yakın olduğu görülmüştür. Hetero nano HRP-ALP enzim yapısının p-NPP substratına karşı $K_m = 0,516 \text{ mM}$ ve $V_{\text{mak}} = 1,70 \times 10^{-4} \text{ U}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların serbest ALP enziminin K_m ve V_{mak} değerlerinde çok farklı olmadığı ve literatür değerlerine yakın olduğu görülmüştür.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde hetero nano enzim yapısının TMB substratına karşı HRP enzimine göre daha kararlı bir aktivite göstermiştir. Serbest HRP 70 °C’ de aktivitesini tamamen yitirirken hetero nano-enzim yapısı bu sıcaklıkta bile belirli bir aktiviteye sahiptir. Sıcaklık çalışmaları p-NPP substratı ile gerçekleştirildiğinde hetero nano-enzim yapısı içerisinde HRP enzimi kadar ALP bulunmamasından dolayı 55 °C’ ye kadar serbest ALP daha yüksek bir aktivite göstermektedir. Ancak 70 °C’ de serbest ALP enzimi aktivite gösteremezken hetero nano-enzim yapısında bulunan ALP enzimi etkin bir şekilde çalışmaktadır. Bu doğrultuda yüksek sıcaklıkta bile hetero nano-enzim yapısı aktiviteye sahip olarak serbest enzimlerden avantajlı duruma gelmektedirler.

Enzim derişiminin enzim kinetiği üzerine etkisi incelendiğinde hetero nano-enzim yapısının her iki substratta da serbest enzimlerde olduğu gibi enzim derişimin artmasıyla aktivitenin lineer olarak arttığı görülmektedir.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları, enzim aktivite çalışmalarının tamamlanmasının ardından hetero nano-enzim yapıların MeOH ile yıkanmasıyla 15 tekrara kadar aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan çalıştığını bize göstermektedir. EtOH ve su, enzim-substrat kompleksinin oluşturduğu nonkovalent bağları etkin bir şekilde koparamadığı için enzim-substrat ilişkisinde ki ikincil etkileşimleri bozmaktadır. Bu yüzden EtOH ve su ile gerçekleştirilen yıkama işlemleri hetero nano-enzimin sağlıklı bir aktiviteye sahip olmasına olanak tanımamaktadır. Endüstride birçok sektör enzim kullanmaktadır. Tekrar kullanılabilir hetero nano-enzim yapıları sayesinde bu çalışma ile geliştirilen enzimleri kullanan işletmeler üretim maliyetlerinde önemli bir azalmaya sahip olacaklardır.

Çalışmanın son aşamasında TNF- α antijenine yönelik ELISA mikro plakaları geliştirilmiştir. Bu doğrultu ilk olarak mikro plakalar hidrazin ile amin gruplarınca plazma cihazı ile modifiye edilmiştir. Amin kaplı mikro plakalara NHS, EDC ve metakriloil amino tirozin fotosensitif monomeri yardımıyla anti-TNF- α antikoru kaplanmış ve BSA ile bloklanarak mikro plakalar stabil hale getirilmişlerdir. Daha sonra standart bir sandviç ELISA yöntemi uygulanarak farklı derişimler deki TNF- α antijenleri mikro plaka kuyucuklarına enjekte

edilmiştir ve birer kuyucuk kör ve numune için kullanılmıştır. Belirli bir inkübasyon süresi sonrasında yıkanan kuyucukların üzerine biotin konjuge anti TNF- α antikoru ilave edilmiştir. Yıkanan kuyucuklara tez çalışmaları doğrultusunda elde edilen streptavidin konjuge HRP ve ALP enzimlerine sahip hetero nano-enzim yapısı ilave edilerek kuyucuklar tekrar yıkanmıştır. Son olarak farklı sıralara TMB ve p-NPP substratları eklenerek kinetik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Mikroplaka okuyucu yardımıyla elde edilen sonuçlar doğrultusunda aynı numune içerisinde bulunan TNF- α derişimi TMB substratı kullanılarak 376 ppm ve p-NPP substratı kullanılarak 351 ppm olarak hesaplanmıştır. Bu doğrultuda sentezlenen hetero nano-enzim yapısının ELISA uygulamalarında kullanılabilir olduğu ve aynı zamanda farklı pH değerlerinde, farklı substratlarla çalıştığı görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hetero nano-enzim yapıların serbest enzimler kadar ve hatta daha yüksek aktiviteye sahip olduğu, serbest enzimler tek kullanımlık olurken hetero nano-enzim yapıların tekrar tekrar kullanılabilir olduğu, hetero nano-enzim yapıların sıcaklığa karşı daha dirençli olduğu görülmektedir. Ayrıca ELISA gibi uygulamalarda da serbest enzimler kadar etkin bir şekilde çalıştığı gibi farklı pH ve substrat kullanımlarına olanak tanımaktadır.

Enzim immobilize teknolojisinde yaşanan aktivitenin düşük olması, denetürasyonun daha fazla olması gibi sorunlara ve tekrar kullanılabilirlik çalışmalarındaki yaşanan sıkıntılara karşı sentezlenen nano hetero-enzim yapısı daha stabil ve yüksek bir aktiviteye sahiptir.

KAYNAKLAR

- [1] J. C. Miller, R. Serrato, J. M. Represas-Cardenas ve G. Kundahl, The Handbook of Nanotechnology, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [2] C. Rao, A. R. Müller ve A. K. Cheetham, The Chemistry of Nanomaterials Volume 1, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005.
- [3] M. Bayındır ve Ö. Köylü, «Türkiye’de Nanoteknoloji,» *Bilim ve Teknik Dergisi - Yeni Ufuklar*, no. 469, pp. 1-23, 2006.
- [4] F. N. Institute, «A Short History of Nanotechnology,» [Çevrimiçi]. Available: <http://www.foresight.org/nano/history.html>. [20 Kasım 2012 tarihinde erişilmiştir].
- [5] B. Bhushan, Handbook of nanotechnology, Germany: Springer, 2004.
- [6] L. Steve, «A Brief History of Nanotechnology,» [Çevrimiçi]. Available: <http://www.nanoword.net/pages/history.htm>. [20 Kasım 2012 tarihinde erişilmiştir].
- [7] «History of Nanotechnology,» [Çevrimiçi]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_nanotechnology. [20 Kasım 2012 tarihinde erişilmiştir].
- [8] V. T. Liveri, Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006.
- [9] B. E. Sergeev, Nanochemistry, Amsterdam: Elsevier B. V., 2006.
- [10] R. Say, A. Ersoz, D. Hur, 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 WO/2011/070402 , 16 06 2011.
- [11] R. Say, R. Keçili, Ö. Biçen, F. Yılmaz Şişman, D. Hür, A. Denizli ve A. Ersöz, «A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase,» *Process Biochemistry*, cilt 46, p. 1688–1692, 2011.
- [12] R. Say, S. Emir Diltemiz, S. Çelik ve A. Ersöz, «Nanolabel for TNF- α

- determination» *Applied Surface Science*, cilt 275 p. 233-238, 2013.
- [13] E. Keha ve İ. Kührevioğlu, *Biyokimya, Aktif Yayınevi: Erzurum*, 2004.
- [14] G. Bingöl, %1 içinde *Biyokimya*, Ankara, Güven Matbaası, 1983, pp. 169-174.
- [15] 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.
- [16] A. M, «Enzimler,» <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>, 1999.
- [17] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinovi, J. M. S. Cabral ve L. P. Fonseca, «Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology,» *Biotechnology Annual Review*, cilt 9, pp. 199-247, 2003.
- [18] M. V. Miranda, M. L. Magrı, R. B. Cabrera, L. Fernandez ve O. Cascone, «Optimisation of Peroxidase Adsorption on Concanavalin A-Agarose,» *Cascone, O., Optimisation*, cilt 33, pp. 67-71, 2003.
- [19] J. N. Rodrigez-Lopez, A. T. Smith ve R. N. Thormeley, «Role of Arginine 38 in Horseradish Peroxidase,» *The Journal of Biological Chemistry*, cilt 271, no. 8, pp. 4023-4030, 1996.
- [20] S. S. Desphande, *Enzyme Immunoassays Chapter 5*, New York: Chapman & Hall, 1996.
- [21] C. Nigel ve N. C. Veitch, «Molecules of interest Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme,» *Phytochemistry*, cilt 65, pp. 249-259, 2009.
- [22] J. Dec ve J. M. Bollag, «Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols,» *Biotechnol Bioeng*, cilt 44, pp. 1131-1139, 1994.
- [23] R. S. Önder, M. Çelebi, M. Altıkatoğlu ve H. Kuzu, «The Effect Of Horseradish Peroxidase (Hrp)-Dextran Conjugate On Naphtol Blue Black,» *Journal Of Engineering And Natural Sciences*, cilt 27, pp. 18-25, 2009.
- [24] A. S. L. Carvalho, M. T. Neves-Petersen ve S. B. Peterson, «Formation of a

- misfolded conformation during refolding of HSPA1 in the presence of calcium,» *Biochim. Et Biophys. Acta.*, no. 1747, pp. 99-107, 2005.
- [25] T. Özgüven ve M. Üstdal, *Hekimlikte Biyokimya: Hangi test istenmeli?*, İstanbul: Barış Kitapevi, 1997.
- [26] D. R. DAVIES, «THE PHOSPHATASE ACTIVITY OF SPLEEN EXTRACTS,» *Biochem Journal*, cilt 2, no. 28, pp. 529-536, 1934.
- [27] O. Schales Ve K. Arai, «Preparation and properties of highly purified alkaline kidney phosphatase,» *Arch Biochem Biophys*, cilt 1, no. 83, pp. 152-160, 1959.
- [28] . M. Marjorie, S. H. Frank ve R. Robert, «The Phosphoric-Esterase of Blood,» *Biochem Journal*, cilt 5, no. 18, pp. 1152-1160, 1924.
- [29] P. A. Levene ve R. T. Dillon, «Intestinal Nucleotidase,» *J. Biol. Chem.*, no. 88, pp. 753-769, 1930.
- [30] W. Graham ve H. Kay, «Phosphorus Compounds of Milk. V. The Phosphorus Partition in Milk, with Preliminary Observations on Milk Phosphatase,» *Journal of Dairy Research*, cilt 1, no. 5, pp. 54-62, 1933.
- [31] R. Robison, «The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification,» *Biochem J*, cilt 2, no. 17, pp. 286-293, 1923.
- [32] R. Robert ve M. S. Katharine , «The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification Part II,» *Biochem J*, cilt 3, no. 18, pp. 740-754, 1924.
- [33] J. B. Henry, *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 19.Edition, WB Saunders Company, 1996.
- [34] D. Moss, «Perspectives in Alkaline Phosphatase Research,» *Clinical Chemistry*, cilt 12, no. 38, pp. 2486-2492, 1992.
- [35] W. Fishman, «Perspectives on Alkaline Phosphatase Isoenzymes,» *Am J Med*, cilt 5, no. 56, pp. 617-50, 1974.
- [36] E. Sandborn ve T. Makita, «The Effect of Dimethyl Sulfoxide on Aldehyde Fixation and the Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Tissues.,» *J Cell Biol*, no. 43, p. 121, 1969.

- [37] J. Murphy, . X. Xu ve E. R. Kantrowitz, «Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by single aminoacid substitution in Escherichia coli alkaline phosphatase,» *J Biol Chem*, cilt 268, pp. 21497-500, 1993.
- [38] J. Mildred ve H. R. George, «Magnetic Resonance Studies of Active Sites in Enzymic Complexes,» *Annual Review of Biochemistry*, cilt 51, pp. 364-394, 1982.
- [39] H. Akon, S. Yi-Di , Y. Siou-Ting , . H. Pei-Vin, . F. Hisashi, . C. Yung, . R. Ruoh-Chyu ve C. Wen-Yih , «Preparation of a DNA Aptamer-Pt Complex and Its Use in the Colorimetric Sensing of Thrombin and Anti-Thrombin Antibodies,» *Analytical Chemistry*, cilt 80, no. 17, p. 6580–6586, 2008.
- [40] A. B. Roy, . O. E. Petrova ve . K. Sauer, «The Phosphodiesterase DipA (PA5017) Is Essential for Pseudomonas aeruginosa Biofilm Dispersion,» *Journal of Bacteriology*, cilt 194, no. 11, p. 2904–2915, 2012.
- [41] C. B. Lavery, M. C. Macinnis, M. M. Jason, J. B. Williams, C. A. Spencer, A. A. Burke, D. J. G. Irwin Ve G. B. D’cunha, «Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots,» *J. Agric. Food Chem.*, cilt 58, p. 8471–8476, 2010.
- [42] P. J. Greene Ve H. H. Sussman, «Structural Comparison of Ectopic and Normal Placental Alkaline Phosphatase,» *Proc. Nat. Acad. Sci.*, cilt 70, no. 10, pp. 2936-2940, 1973.
- [43] H. Jun Kim ve H. S. Kim, «Removal of phenol using horseradish peroxidase immobilized in the nano-scale porous structural material,» *International Conference on Biology, Environment and Chemistry*, no. 1, pp. 105-108, 2011.
- [44] X. Zuo, C. Peng, Q. Huang ve S. Song, «Design of a Carbon Nanotube/Magnetic Nanoparticle-Based Peroxidase-Like Nanocomplex and Its Application for Highly Efficient Catalytic Oxidation of Phenols,» *Nano Res*, no. 2, pp. 617-623, 2009.
- [45] F. F. Guo, W. Yang ve W. Jiang, «Magnetosomes eliminate intracellular reactive oxygen species in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1,»

Environmental Microbiology, pp. 1-7, 2012.

- [46] V. O. Njoku, P. C. Chikezie ve A. M. Kaoje, «Kinetic studies of alkaline phosphatase extracted from rabbit (*Lepus townsendii*) liver,» *African Journal of Biotechnology*, cilt 16, no. 10, pp. 3157-3162, 2011.