



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**Fe³⁺ TAKILI NANOFLOWER'LARIN SENTEZİ VE DNA'YA KARŞI
ÖZGÜLLÜĞÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayça SERİNBAŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2020

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 172305405 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Ayça SERİNBAŞ tarafından hazırlanan "**Fe³⁺ TAKILI NANOFLÖWER'LARIN SENTEZİ VE DNA'YA KARŞI ÖZGÜLLÜĞÜNÜN ARAŞTIRILMASI**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

M. Odabaşı

Üye: Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Erciyes Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

N. Özdemir

Üye: Tülden İNANAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

T. İnanan

Tez Savunma Tarihi: 02/07/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Ayça SERİNBAŞ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam sürecinde engin bilgi ve deneyimleri ışığında bana sürekli yol göstererek bu alanda ilerlemem için beni cesaretlendiren her zaman destek olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na sonsuz teşekkür ederim. Tüm deneysel çalışmalarım sürecinde ve yaptığımız çalışmalar sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Ömür ACET'e, çalışmamın her anında desteğini ve yardımını esirgemeyen hem üniversite hem de laboratuvar arkadaşım yüksek kimyager Burcu ÖNAL'a, hayatım boyunca sürekli ilerlemem ve kendime bir şeyler katmam için beni her zaman motive eden, gayret ve başarılarını örnek aldığım canım anneme, babama ve kardeşlerime, çalışmalarımı devam ettirebilmem için bana her türlü imkan ve olanağı sağlayarak yürüdüğüm bu yolda da elimi tutan sevgili eşime, hayatımıza bu sene katılan ve ilerde gözlerime baktığında benimle gurur duymasını istediğim henüz farkında olmasa da uykularını düzenli uyuyarak tezimi bitirmem de yardımcı olduğu için canım oğluma, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tezin gerçekleşmesinde katkı sağlayan, Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (ASUBTAM) sağladığı hizmet ve olanaklarından dolayı teşekkür ediyorum. Bu çalışma, Türkiye Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Hibe Numarası: 118Z037) ve Beyaz Rusya Cumhuriyet Temel Araştırma Vakfı (Hibe Numarası: B18TUB-001) tarafından desteklenmiştir.

Ayça SERİNBAŞ

AKSARAY, 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Kromatografi	1
1.1.1 Afinite kromatografisi	2
1.1.2 Matriks seçimi	4
1.1.3 Ligand seçimi	5
1.1.4 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi	5
1.2 DNA	6
1.2.1 Genomik DNA	6
1.3 Nanoflower	7
1.3.1 İnorganik nanoflowerlar	7
1.3.2 Nanoflower yapılarının kullanım alanları	8
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	9
3. MALZEME VE YÖNTEM	11
3.1 Malzemeler	11
3.2 Yöntem	11
3.2.1 Bakır fosfat nanoflowerların (CP-NF'ler) hazırlanması	11
3.2.2 Fe^{3+} iyonlarının bakır fosfat nanoflowerlara (Fe^{3+} -CP-NF) bağlanması.....	12
3.2.3 Sulu çözeltilerden Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyon deneyleri	12
3.2.4 Fe^{3+} -CP-NF'lerin Karakterizasyonu	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	14
4.1 Fe^{3+} Takılı CP-NF'lerin Hazırlanması	14
4.2 CP-NF'ler İçin Karakterizasyon Çalışmaları	15
4.2.1 CP-NF'lerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile inceleme	15
4.2.2 CP-NF'lerin EDX ile analizleri	16
4.2.3 CP-NF'lerin SEM-EDX ile analizleri	17
4.2.4 CP-NF'lerin FTIR ile analizleri	18
4.2.5 CP-NF'lerin XRD analizleri	18
4.3 Fe^{3+} -CP-NF'lere Sulu Ortamdan DNA Adsorpsiyon Çalışmaları	19
4.3.1 Fe^{3+} -CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi	19
4.3.2 Fe^{3+} -CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi	20
4.3.3 Fe^{3+} -CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	21
4.3.4 Fe^{3+} -CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	21
4.4 Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonunun literatürle karşılaştırılması.....	22
4.5 Yeniden kullanılabilirlik çalışmaları	23
4.6 Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonu için izoterm modelleri	23
5. SONUÇLAR	26

KAYNAKLAR	27
ÖZGEÇMİŞ	31



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fe³⁺ TAKILI NANOFLLOWER'LARIN SENTEZİ VE DNA'YA KARŞI ÖZGÜLLÜĞÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Ayça SERİNBAŞ

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

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ÖZET

Saflaştırma yönteminin ve adsorban tipinin seçimi, deoksiribonükleik asit (DNA) gibi bir biyomolekülün saflaştırılması için yüksek öneme sahiptir. Nanoflower'lar yeni geliştirilmiş bir adsorban sınıfıdır. Bitki çiçeklerine yapısal olarak çok benzerlik gösterdikleri için, nano çiçekler olarak adlandırılırlar. Burada, bakır fosfat nanoflower'lar [(Cu₃(PO₄)₂·3H₂O), CP-NF'ler] sentezlendikten sonra, yüzeylerine Fe³⁺ iyonları takılmıştır. Elde edilen Fe³⁺-CP-NF'lerin, DNA için bazı adsorpsiyon parametrelerinin incelenmesinden önce, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), enerji dağıtıcı X-ışını (EDX), X-ışını kırınımı (XRD) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) karakterizasyonları yapılmıştır. Elde edilen adsorpsiyon deneylerinin sonuçlarından bazıları, aşağıdaki verilmiştir: Fe³⁺-CP-NF'ler üzerinde maksimum DNA adsorpsiyonu, pH 7 ve 25 °C'de 1.5 mg/mL DNA başlangıç konsantrasyonunda 845.8 mg/g gibi mükemmel bir değer olarak bulunmuştur. Hangi adsorpsiyon modelinin uygun olduğunu belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon denklemleri uygulanmış ve 0.9885'lik bir R² ile Langmuir modelinin uyumlu olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: DNA, İMAK, Adsorpsiyon, Nanoflower, Saflaştırma.

Haziran, 2020; 31 sayfa

M.Sc. THESIS

SYNTHESIS OF Fe³⁺ ATTACHED NANOFLOWERS AND INVESTIGATION OF SPECIFICITY OF THEM FOR DNA

Ayça SERİNBAŞ

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ABSTRACT

Selection of purification method and type of adsorbent has high significance for separation of a biomolecule like deoxyribo nucleic acid (DNA). Nanoflowers are a newly improved class of adsorbent. Due to showing very structural similarity to plant flowers, they are named as nanoflowers. Herein, after synthesizing copper phosphate three hydrate nanoflowers [(Cu₃(PO₄)₂·3H₂O), CP-NFs], Fe³⁺ ions were attached to their surfaces. Obtained Fe³⁺-CP-NFs, before investigation of some adsorption parameters for DNA, they were characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray (EDX), X-ray diffraction (XRD) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Some attained data from the results of adsorption experiments as follows: maximum DNA adsorption on Fe³⁺-CP-NFs was found as an excellent value like 845.8 mg/g with an initial concentration of 1.5 mg/mL DNA, at pH 7 and 25 °C. Langmuir and Freundlich adsorption equations were applied to determine which adsorption model was appropriate, and it was seen that Langmuir model was fit with a R^2 of 0.9885.

Keywords: DNA, IMAC, Adsorption, Nanoflower, Separation.

June, 2020; 31 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kromatografik yöntemlerin alt başlıkları.	1
Şekil 1.2. Afinite kromatografisinin mekanizması.	3
Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin anahtar-kilit modeli.....	3
Şekil 1.4. Afinite kromatografisinin uygulama alanları.....	4
Şekil 1.5. DNA'nın yapısı.	6
Şekil 3.1. Bakır fosfat nanoflowerlerin sentezinin şematik gösterimi.	11
Şekil 4.1. Bakır fosfat nanoflowerların (CP-NF'ler) oluşumu: nano kristallerin çekirdeklenmesi ve oluşumu (I); nano kristallerin büyümesi (II); CP-NF'lerin tamamlanması (III).	14
Şekil 4.2. CP-NF'lerin farklı büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri.....	16
Şekil 4.3. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin EDX ile incelenmesi.	17
Şekil 4.4. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin SEM-EDX ile incelenmesi	17
Şekil 4.5. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin FTIR ile incelenmesi.	18
Şekil 4.6. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin XRD ile incelenmesi.	18
Şekil 4.7. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna ortam pH'sının etkisi: CDNA: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C).	19
Şekil 4.8. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi: pH 6.0, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C.	20
Şekil 4.9. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna iyonik kuvvet etkisi: pH 6.0, CDNA: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C.	21
Şekil 4.10. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi: pH 6.0, CDNA: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika.	22
Şekil 4.11. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonu için Langmuir izoterm modelleri.....	24
Şekil 4.12. Fe ³⁺ -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonu için Freundlich izoterm modelleri.	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Fizikokimyasal özelliklere göre uygulanacak kromatografi metotları.....	2
Çizelge 1.2. Bazı ligantların kromatografide kullanımları.	5
Çizelge 4.1. Literatürde bildirilen bazı adsorbanların DNA adsorpsiyon miktarının karşılaştırılması.....	23
Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlichizotermelerinden elde edilen sonuçlar ve bazı öne çıkan özellikleri.....	25



SİMGELER VE KISALTMALAR

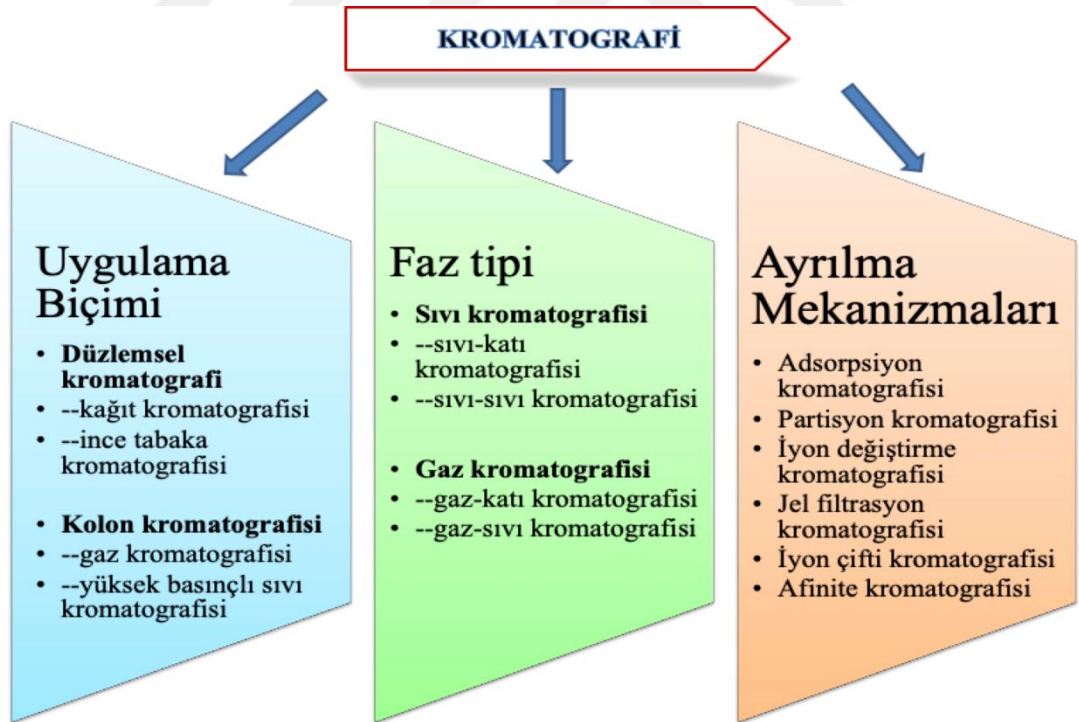
cm	Santimetre
CP-NF	Bakır fosfat nanoflower
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDX	Enerji dağıtıcı X-ışını
Fe³⁺-CP-NF	Demir bağlı bakır fosfat nanoflower
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
ICP-OES	İndüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi
İMAK	İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	3- (N-morfolino) propanesülfonik asit
nm	Nanometre
PBS	Phosphatebufferedsaline
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
XRD	X-ışını kırınımı
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ

1.1 Kromatografi

Kromatografi; kimya, biyoteknoloji, gıda ve tıp analizinde ayırma ve saflaştırma işlemlerinde en yaygın kullanılan ayırma tekniğidir. Ortak ve uygun bir çözücü ortamında bir karışımı meydana getiren maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı ayırma işlemidir [1]. İlk olarak 1906 yılında Rus bir botanikçi tarafından bitkilerin renk pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine çok yakın bileşikleri ayırmak çok zordur fakat kromatografik metotlarla bunları kısa sürede kolayca ayırmak mümkündür.

Kromatografi, birbiriyle karışmayan iki fazdan oluşmaktadır. Bunlar sabit ve hareketli fazlardır. Sabit faz gözenekli bir tabaka veya film şekline iken diğeri ise sabit faz boyunca tabaka üzerinde olan hareketli fazdır [2]. Kromatografi kendi arasında üç gruba ayrılmaktadır bunlar uygulama biçimi, faz tipi ve ayrılma mekanizmalarıdır. Aşağıdaki şekilde alt başlıkları ile birlikte verilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Kromatografik yöntemlerin alt başlıkları.

Çizelge 1.1. Fizikokimyasal özelliklere göre uygulanacak kromatografi metotları.

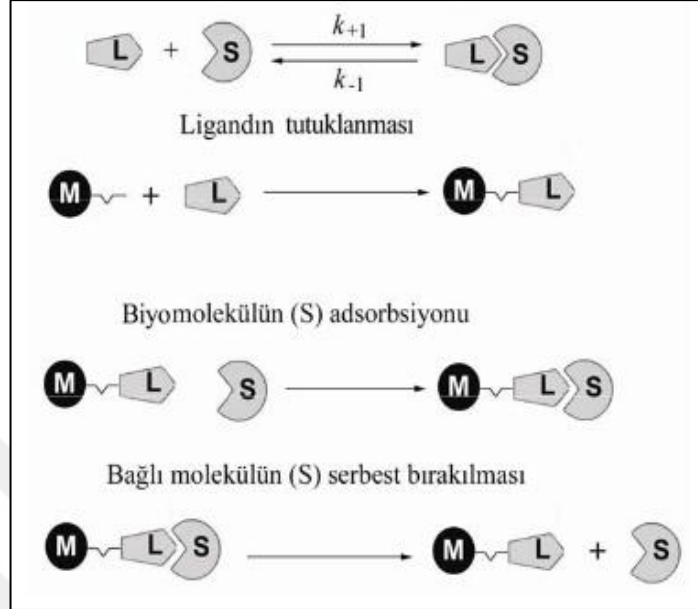
KROMATOĞRAFİK METOD ÖZELLİKLERİ					
Protein Özelliği	Ayırma Metodu	Çalışma Prensipleri	Çözünürlük	Hız	Kapasite
Moleküler büyüklük ve şekil	Jel filtrasyon	Boyut dışlama	Fraksiyonda orta	Fraksiyon için düşük, tuzsuzlaştırmada yüksek hız	Numune hacmine bağlı
Yüzey yükü	İyon değişim	İyonik bağlanma	Genellikle yüksek	Yüksek hızlı	
Hidrofobisite	Hidrofobik etkileşim	Hidrofobik kompleks formasyonu	İyi	Hızlı	Yüksek
	Ters faz kromatografisi		Çok iyi	Çok hızlı	Yüksek
Moleküler yapı	Afinite kromatografisi	Biyospesifik adsorpsiyon-desorpsiyon	Mükemmel	Çok hızlı	Çok yüksek

1.1.1 Afinite kromatografisi

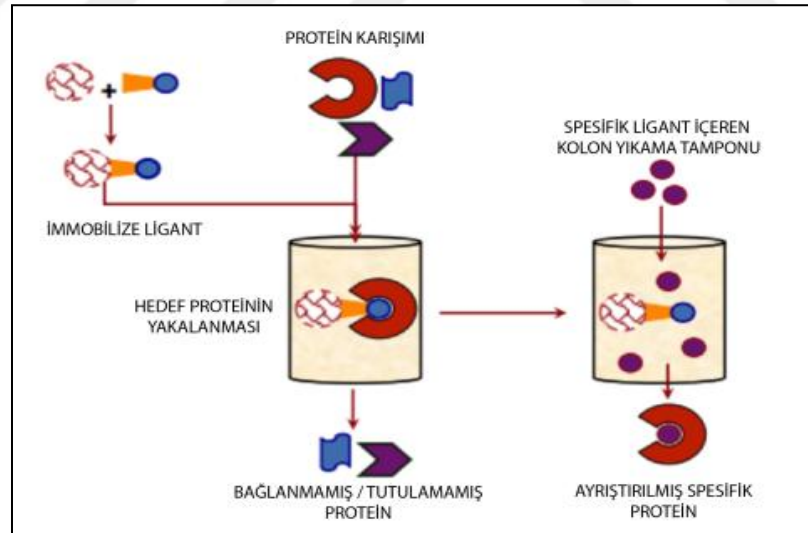
Afinite kromatografisi bir saflaştırma yöntemidir, bunun sayesinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılabilir. Bu yöntemde saflaştırılacak olan biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarından, kendilerine özgü kimyasal yapılarından yararlanılmaktadır (Çizelge 1.1). Bunun sayesinde homojen saflıktaki materyaller elde edilmektedir [3]. Metodun yüksek seçicilik özelliğine sahip olması, hızlı ve kullanımının kolay olması açısından diğer yöntemlere göre bazı ayrıcalıkları vardır [4]. Kullanım alanları şekil 1.4'te verilmiştir. En büyük avantajı ise uygun şartlar altında istenilen proteinin tek basamakta saflaştırılabilmesidir. Fakat bu yöntemde kullanılacak olan kolon matriksi önemli bir adımdır. İyi bir kolon matriksi seçerken bazı özellikleri taşımasına dikkat edilmektedir. Bunlar; kolon matriksinin suyu seven yapıda olması, büyük gözenekliliği, sert, inert ve ayırma işleminde kullanılan diğer kimyasallarla reaksiyon vermemesi gibi özelliklerdir [5].

Afinite kromatografi yönteminde ayrıştırılacak olan molekül kolona yani matrikse kovalent bağlanarak tutuklanmış, bir bağlanma materyaline yani liganda özgül ve geri dönüşümlü bir şekilde adsorbe edilmiştir. Saflaştırmada ise saflaştırılacak maddenin geri kazanımı yüksek verimlilikte olmaktadır [3].

Afinite kromatografisinin mekanizması anahtar-kilit modeline benzerdir (Şekil 1.2). Bu yöntem biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarına göre saflaştırma sağlayan önemli bir yöntemdir. Anahtar-kilit modeli Şekil 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.2. Afinite kromatografisinin mekanizması.

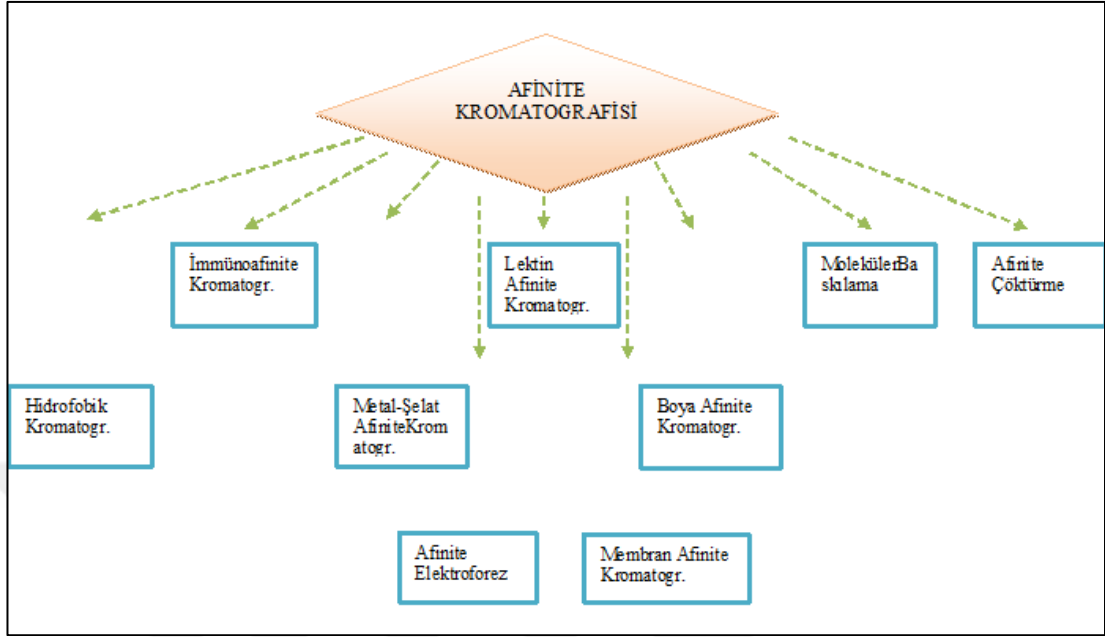


Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin anahtar-kilit modeli.

Bir afinite kromatografisi genel olarak şu kuralları içerir.

1. Uygun ligand seçimi
2. Matris üzerine ligand immobilizasyonu
3. Protein karışımının kolona yüklenmesi

4. Safsızlıkların uzaklaştırılması
5. İstenilen proteinin saf olarak elüsyonu



Şekil 1.4. Afinite kromatografisinin uygulama alanları.

1.1.2 Matriks seçimi

Afinite kromatografisinde kullanılan birçok organik ve inorganik matriksler vardır. Kromatografide, matriks seçimi önemli bir adımdır. Proteinlere afinite gösteren metal immobilize olmuş son yapının yüksek verimlilik gösterebilmesi için kullanılan matriksin bir takım özelliklere sahip olması gerekiyor. Sahip olması gereken bu özellikler:

1. Aktivitesi kolay olmalıdır.
2. Akışkan olmalıdır.
3. Karıştırılması durumunda kırılmaması için rijit yapıda olmalıdır.
4. Belirli bir pH ve sıcaklık aralığında dayanıklı olmalıdır.
5. Gözenekli olmalı, porozite içermelidir.
6. İç yüzey alanı geniş olmalıdır.
7. Ligand dışındaki hiçbir maddeyle etkileşime girmemelidir [6].

1.1.3 Ligand seçimi

Ligandlar matriksin yüzeyini kaplayarak metallerin immobilizasyonu için kompleks oluştururlar. Ligandın taşıyıcıya bağlanabilmesi için bazı fonksiyonel grupları içermesi gerekmektedir. Bunlar genellikle elektron verici olan oksijen, azot ve kükürt gibi elementler olabilir. Çok uçlu ligandlar en çok tercih edilenlerdir [7]. Bazı ligantların kromatografide kullanım alanları Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı ligantların kromatografide kullanımları.

Saflaştırılması istenilen madde	Etkileşime Girecek Olan Ligant Türü
Vitamin-Hormon	Reseptör, taşıyıcı protein
Lektin	Glikoprotein, polisakkarid, hücre yüzeyi reseptörü
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Hücre	Lektin, hücre yüzeyine özgün protein
Nükleik Asit	Tamamlayıcı baz, polimeraz
Antikor	Hücre, virüs, antijen

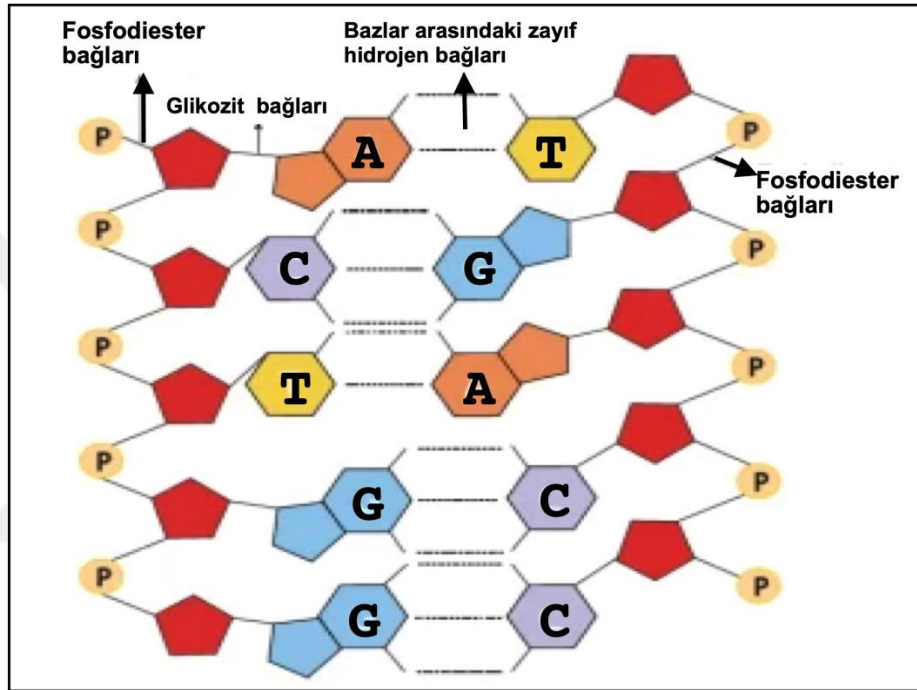
1.1.4 İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi

Enzimler birçok alanda kullanılan önemli materyallerdir. Maliyet bakımından oldukça yüksek olan enzimlerin geri kazanılması ve yeniden kullanılmasını kolaylaştıran immobilize sistemler vardır. Katalitik tepkimelerde enzimler için şartlar uygun olsa da yüksek veya düşük pH, sıcaklık ve çözücüler varlığında enzimler aktifliklerini kolayca kaybedebilirler. İmmobilizasyon işlemi ile birlikte enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini sağlamak mümkündür [8].

İmmobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) ilk olarak Poarth ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. İMAK teknik olarak çözeltideki biyolojik polimerler ile metal iyonları arasındaki ara yüzey etkileşimine dayanan ayırma yöntemidir bu yöntem geçiş metali olan Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının sulu çözeltilerdeki afinitesi ile alakalıdır [9]. İmmobilize metal afinite kromatografisi çözeltilerdeki proteinleri saflaştırmak amacıyla matrikse immobilize edilmiş metal iyonlarının kullanılması dizayn edilerek geliştirilmiştir. Ayrıca proteinlerin yapısal konfigürasyonları da bulundukları ortamdan ayrıştırılmalarında büyük öneme sahip olmaktadır [6].

1.2 DNA

Kimyasal olarak DNA, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur. Bu polimerlerin omurgaları ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından meydana gelir. Bu iki iplik birbirlerine ters yönde uzanırlar. Her bir şeker grubuna baz olarak adlandırılan dört tip molekülden biri bağlıdır. DNA'nın omurgası boyunca bu bazların oluşturduğu dizi genetik bilgiyi kodlar (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. DNA'nın yapısı.

1.2.1 Genomik DNA

Terim olarak genomik, bir organizmanın bazı fonksiyonlarını (yapısal ve işlevsel) kodlayan tüm genleri tanımlar. Genomik DNA, organizmanın genetik bilgisinin tamamıdır. Organizmaların kromozomları, büyüklükleri ve sayıları ile farklılaşmaktadır. Prokaryot ve ökaryot hücrelerin genetik olarak yapılarının anlaşılması birçok moleküler düzeyde çalışma gerektirir. Genomik sayesinde birbirinden bağımsız organizmalara sahip genetik bilgiler kıyaslanabiliyor. Organizmalar arası benzerlikler evrimsel seviyede araştırılabilir. Organizmaların oluşturdukları protein çeşitleri, sayıları, fonksiyonları hakkında fikir sahibi olunabilmektedir [10].

Prokaryot ve ökaryot hücrelerden DNA'nın saflaştırılması için birçok farklı yöntem ve protokol geliştirilmiştir. Bu yöntemler kromatografik ayırmaya dayanmaktadır. Yöntemin seçilmesinde analizi yapılacak olan genomik DNA'nın gerekli olan saflık derecesi rol oynamaktadır. Kullanılan kromatografik yöntemlerden iyon değişim ve afinite kromatografisi yüksek derecede saflaştırılmış makromoleküllerin üretilmesini sağlamıştır. Makromoleküllerin başarılı bir şekilde ayrılması için en önemli faktör büyük gözeneklerdir [10].

1.3 Nanoflower

Son yıllarda ayırma, biyotanıma, enzim mimetikler, kataliz, kaplama enerji depolama gibi pek çok farklı ve zorlayıcı uygulamaları nedeniyle çiçek benzeri şekillere sahip nano malzemelere olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bu nanomalzemeler arasında 'nanoflower' terimi mikroskopik görünümde çiçeklerle benzerlik gösteren üç boyutlu yapıları ifade etmektedir.

Bir ve iki boyutlu muadilleriyle karşılaştırıldığında elde edilen bu üç boyutlu nanomalzemeler üstün katalitik aktivite gösterir. Mekanik yapısı, bol gözenekleri ve reaktifleri sayesinde kolaylıkla geri kazanımı mevcuttur [11,12].

Doğal biyokatalizörlerdir. En dikkat çekici özellikleri katalitik aktivite, kararlılık, seçicilik, düşük toksisite ve sudaki çözünürlüğüdür. Bu nedenle çeşitli bilimsel ve teknik alanlarda kullanılmaktadır. Fakat sulu çözeltideki enzim uygulamaları sınırlıdır. Bu problemi çözmek enzimin aktivitesini ve kararlılığını arttırmak için iki yöntem vardır. Bunlar kimyasal modifikasyon ve immobilizasyondur. İmmobilize edilmiş enzim gelişmiş kararlılık gösterir verimi artar ve tekrar kullanılabilir hale gelir [13].

1.3.1 İnorganik nanoflowerlar

Nanomalzemeler üzerinde yapılan çalışmalar hızlı bir şekilde gelişmektedir. Bu sayede oluşturulan organik ve inorganik nanoflowerlar kimya biliminin gelişmesine büyük ölçüde fayda sağlamıştır. Nanoflowerlar, nanomalzemeler arasında özel bir sınıf olarak ayrılmıştır. Klasik nanoparçacıklara göre oluşturulan nano çiçekler yüzey alanı genişliğinden dolayı reaksiyonların verimini arttırmıştır. Enzimlerin bazı

dezavantajları ve sınırlılıklarını çözebilmek için inorganik nanomalzemelerin sentezi önerilmiştir [11].

İnorganik nanoflower oluşturmak için bakır iyonları kullanılabilir. Cu^{2+} iyonları içeren nanoflower elde edebilmek için çeşitli proteinler kullanılmaktadır. Protein molekülleri Cu^{2+} iyonları ile $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ kristallerini oluşturur. Protein ile Cu^{2+} iyonları arasında oluşan etkileşim nanoflower yapısındaki yapraklar gibi büyümeye neden olur. Protein yerine bir enzim kullanılırsa nanofloweryapılar, bu enzimin katalitik gücünü artırır. Yüksek kararlılık ve aktivite gösterir [11].

1.3.2 Nanoflower yapılarının kullanım alanları

- Biyokataliz
- Proteoliz
- Hidroksit ve fenol tespiti
- Enzim yapısının stabilizasyonu
- DNA bağlanması
- Nano yapıli kapsüller
- Biyodizel üretimi
- Kirleticilerin ve biyolojik moleküllerin tespiti

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Yapılan çalışmada CuO nano yapılarının elektrokatalitik aktivitesi enzimsiz ortamda amperometrik olarak H_2O_2 uygulaması denenmiştir. Enzimatik olmayan elektrokimyasal sensörlerin alkali ortamda hidrotermal koşullar altında bakırın kimyasal oksidasyonu ile CuO nanoflower oluşmuştur. CuO nanoflowerlar geniş yüzey hacim oranları, yüksek elektron taşıma özelliği sayesinde elektokatalitik olarak mükemmel yüksek hassasiyetli bir performans göstermiştir [14].

Yapılan çalışmada çinkooksit nanoflowerların yapılarının morfolojik özelliklerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda XRD ve SEM, TEM çalışmaları kapsamında çiçek benzeri yapıların fotokatalitik aktivitelerinin yüksek ve istenen derecede olduğunu saptamışlardır [15].

Yapılan çalışmada buradaki çalışmada basit bir reaksiyon ile kalsinasyon ile Fe_2O_3 nanoflower yapıları herhangi bir kalıp kullanılmadan sentezlenmiştir. BET testleri yapılarak porlu, geniş yüzey alan yapısına sahip olduğu kanıtlanmıştır. Burada üretilen nanoflowerların lityum-ion pillerinde manyetik fotokatalitik özellikleri için umut verici olduğu gözlenmiştir [16].

Diğer bir çalışmada altın nanoflowerların sentezi sırasında aynı zincir uzunluğundaki farklı DNA türlerinin üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıntılı çalışmalara bakıldığında, altın nano partiküllerinin, DNA'ya olan afinitisinin, farklı morfolojik yapıya sahip olmasından kaynaklandığı görülmüştür [17].

Diğer bir çalışmada hibrit nanoflower yapısı sentezleyerek iki enzimin reaksiyonunu bir adımda gerçekleştirmişlerdir. İki enzimin bileşimi tek bir nanoflower ile yakınlığı göz önünde bulundurularak glikoz saptama hassasiyetini bulmuşlardır. Bu nedenle elde edilen multienzimli organik-inorganik hibritnano yapılar sayesinde glikozun saptanması için yüksek hassasiyetli kolorimetrik bir sensörün tartışmasız olarak kullanabileceğini saptamışlardır. Burada çok aşamalı enzimatik reaksiyonların eş zamanlı katalizini mümkün kılar. Büyük bir potansiyele sahip olan bu uygulama biyoteknoloji, biyomedikal ve çevre kimyası için eşsiz bir örnektir [18].

Yapılan diğ er çalışmada günümüzün en büyük sorunlarından biri olan atık sudaki boyalarda renk giderimi üzerine peroksidaz Cu²⁺ hibrit nanoflowerların Victoria blue boyasının bir saatte %90'dan fazla renk giderimini sağladığı kanıtlanmıştır [19].



3. MALZEME VE YÖNTEM

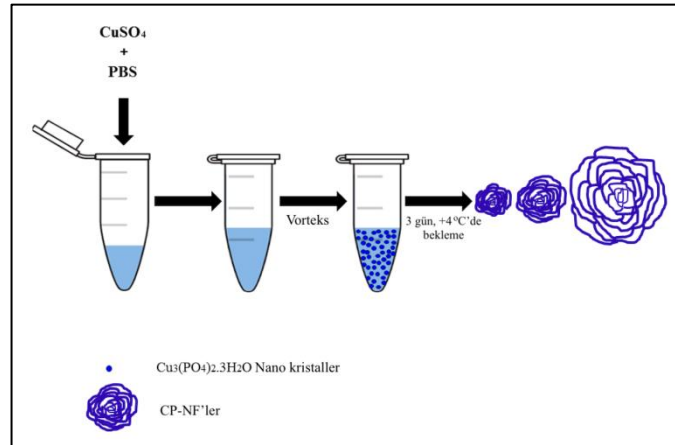
3.1 Malzemeler

Deneylerde kullanılan tüm inorganik kimyasallar Sigma'dan temin edilmiştir (St. Louis, USA). Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan Deoksiribonükleik asit (DNA) Aldrich (Munich, Germany)'den temin edilmiştir. Araştırma süresince kullanılan saf su (Barnstead D2731) Barnstead 3804 NANOPURE® sisteminden elde edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakır fosfat nanoflowerların (CP-NF'ler) hazırlanması

CP-NF'ler, modifiye edilmiş bir yöntem kullanılarak hazırlandı [12, 20]. İlk olarak, 120 mM sulu CuSO_4 stok çözeltisi ve 10 mM PBS çözeltisi (Phosphatebufferedsaline) (pH 7.4) hazırlandı. Daha sonra belirli miktarlarda CuSO_4 ve PBS çözeltileri karıştırıldı. Çözeltideki son CuSO_4 konsantrasyonu 0.8 mM oldu. Bu karışım, 1 dakika boyunca homojen bir çözelti elde etmek için vorteksleildi ve +4 °C'de 3 gün inkübe edildi (Şekil 3.1). İnkübasyon döneminden sonra mavi renkli çökelti $[\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ oluştu. Oluşan çökelti santrifüjlendi (Nüve NF800R), reaksiyona girmemiş bileşenleri çıkarmak için en az üç kez su ile yıkandı. Elde edilen çökelti bakır fosfat nanoflowerleri (CP-NF'ler) olarak adlandırıldı.



Şekil 3.1. Bakır fosfat nanoflowerlerin sentezinin şematik gösterimi.

3.2.2 Fe³⁺ iyonlarının bakır fosfat nanoflowerlara (Fe³⁺-CP-NF) bağlanması

Fe³⁺ iyonlarının CP-NF'lara bağlanması, oda sıcaklığında 150 ppm Fe³⁺ çözeltisi içinde pH 4.7'de (0.01 M HCl ile ayarlandı) gerçekleştirildi. Bağlanma prosedürü 1 saat süreyle gerçekleştirildi. Ortamdaki Fe³⁺ iyonlarının konsantrasyonunu, ICP-OES ile belirlendi. CP-NF'lara bağlanan Fe³⁺ iyonları Denklem 1 ile hesaplandı.

$$Q = (C_i - C_f)V/m \quad (3.1)$$

- Burada, C_i ve C_f , bağlanma öncesinde ve sonrasında çözeltideki Fe³⁺ iyonlarının konsantrasyonlarını (mg/mL) gösteriyor; Q , CP-NF'lara (mg/g) bağlı Fe³⁺ miktarını sembolize ediyorken; V , çözelti hacmini (mL) ve m , CP-NF (g) miktarıdır. Fe³⁺ iyonlarının bağlanmasından sonra, meydana gelen örnek Fe³⁺-CP-NF olarak adlandırıldı.

Fe³⁺-CP-NF'lerden çözeltiye Fe³⁺ sızıp sızmadığını görmek için bir dizi deney yapıldı. Sızıntı deneyleri ayrıca 1.0 M NaCl içeren pH (4.0-7.0) aralığında çeşitli tamponlarda incelendi. Bu amaçla Fe³⁺-CP-NF'ler, açıklanan ortam içerisinde oda sıcaklığında 1 gün karıştırıldı. Çalışma çözeltileri ICP-OES ile incelendi.

3.2.3 Sulu çözeltilerden Fe³⁺-CP-NF'lere DNA adsorpsiyon deneyleri

Tüm adsorpsiyon ve elüsyon deneyleri için bir rotatör sistemi (Stuart® SB3) kullanıldı. Fe³⁺-CP-NF'ler üzerinde DNA adsorpsiyon deneyleri, farklı tampon sistemleri ile 30 dakika boyunca 20 rpm'de hafif bir döndürme ile gerçekleştirildi. PH 5.0-6.0 için 0.05 M asetat tamponu ve pH 7.0-8.0 için 0.05 M MOPS (3- (N-morfolino) propanesülfonik asit) tamponu kullanıldı. Fe³⁺-CP-NF'ler üzerine DNA adsorpsiyon çalışmaları 260 nm'de izlendi. DNA adsorpsiyon çalışmaları için optimum koşullar, başlangıç konsantrasyonu (0.2-2 mg/mL), pH (5.0-8.0), sıcaklık (5-35 °C) ve tuz konsantrasyonu etkileri (0-1 M NaCl) gibi bazı parametrelerle test edildi. DNA adsorbe olmuş Fe³⁺-CP-NF'ler, elüsyon işlemi için 30 dakika boyunca 20 rpm'lik bir dönüş hızında 1 M NaCl çözeltisi içinde test edildi. Adsorbe ve elüe edilen DNA miktarları hesaplanarak, Fe³⁺-CP-NF'lere tutunan DNA yüzdesi hesaplandı.

3.2.4. Fe³⁺-CP-NF'lerin karakterizasyonu

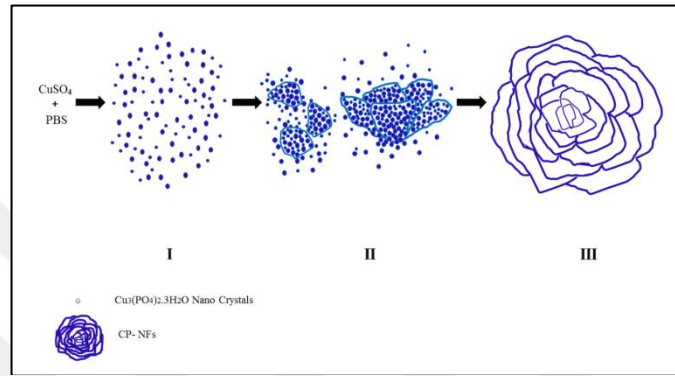
Hazırlanan CP-NF'lerin morfolojisi, bir taramalı elektron mikroskopisi (Bilgisayar kontrollü dijital SEM, Leo 440) ile karakterize edildi. CP-NF'lerin elementel bileşimi, enerji dağıtıcı X-ışını (Bilgisayar kontrollü dijital EDX, Leo 440) kullanılarak analiz edildi. CP-NF'lerin kristali ve kimyasal yapısı, sırasıyla X-ışını kırınımı (XRD, Bruker eksenleri d8 ilerleme modeli) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Perkin Elmer 400, FTIR spektrometre spotlight 400 görüntüleme sistemi) kullanılarak analiz edildi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Fe³⁺ Takılı CP-NF'lerin Hazırlanması

Bu tez kapsamında, inorganik nanoflowerler (Bakır fosfat nanoflowers; CP-NF'ler) sentezlendi bazı teknikler (SEM, EDX, XRD ve FTIR) kullanılarak ve sistematik olarak karakterize edildi. CP-NF'lerin oluşum süreci üç aşamada açıklanmaktadır; çökeltme, dönüşüm ve üç boyutlu yapının kurulumu için birikim [12, 20]. CP-NF'lerin oluşumu Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Bakır fosfat nanoflowerların (CP-NF'ler) oluşumu: nano kristallerin çekirdeklenmesi ve oluşumu (I); nano kristallerin büyümesi (II); CP-NF'lerin tamamlanması (III).

Birinci aşamada nano kristallerin çekirdeklenmesi ve oluşumu basamağı için, PBS çözeltisine CuSO_4 çözeltisi eklenmesiyle, çok sayıda $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nano kristallerinin bir araya toplanmasıyla yığın benzeri agregatlar oluşur. İkinci aşamada (nano kristallerin büyümesi), inkübasyon süresinin arttırılmasıyla, birincil nano kristaller, büyük lameller agregatları üretmek için sürekli olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nano kristalleri ile beslenir. Son adımda (CP-NF'lerin tamamlanması), 2-3 günlük inkübasyon sonrası, hiyerarşik ve kinetik olarak büyüyen $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nano kristalleri, kendi kendine bir araya getirme işlemini tamamlamak için doyma seviyesine ulaşır. Anizotropik büyüme sürecinin sonunda, hemen hemen tüm tabakalı agregatlar CP-NF'lere dönüşür ve CP-NF'lerin oluşumu tamamlanır.

Yapılan bir çalışmada organik küçük moleküller (amino asitler gibi) veya makromoleküller (proteinler veya enzimler gibi) olmadan bakır fosfat nanoflowerların oluşumunu tarif ettiler [12]. Ayrıca bakır fosfat nanoflowerların büyüme mekanizması üzerinde bazı önemli parametreler (öncü çözeltinin bileşeni, pH seviyesi, sıcaklık ve zaman gibi) rapor ettiler. Bu çalışmada CP-NF'leri pH 7.4'te

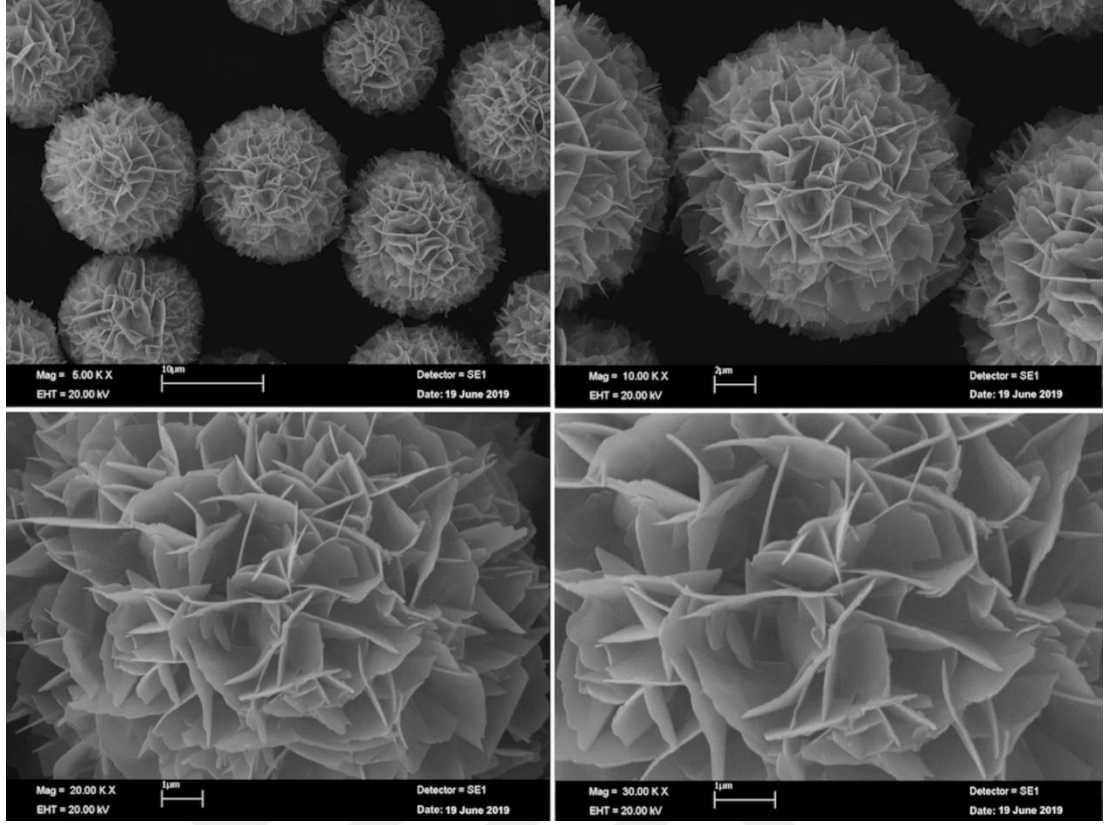
hazırlandı. Yukarıda verilen çalışmadan farklı olan bakır fosfat nanoflowerların uygulanma alanlarını genişletmek için Fe^{3+} iyonları CP-NF'ler üzerine takıldı. Bir sonraki aşamada ise Fe^{3+} takılmış bakır fosfat nanoflowerlar (Fe^{3+} -CP-NF'ler), DNA saflaştırılması için kullanıldı.

CP-NF'ler üzerindeki takılan Fe^{3+} iyonlarının miktarı 23 mg/g CP-NF olarak hesaplandı ve yıkamadan sonra yapılan deneyler, CP-NF'lerden herhangi bir şekilde Fe^{3+} iyonu sızıntısı olmadığını gösterdi.

4.2 CP-NF'ler İçin Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1 CP-NF'lerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile inceleme

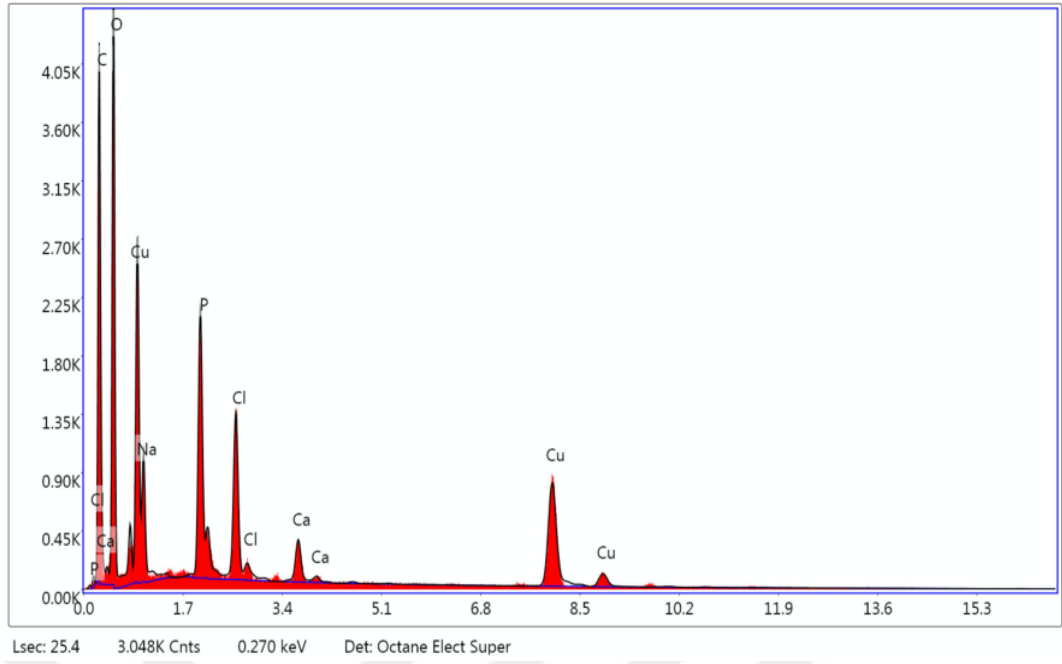
Sentezlenen CP-NF'lerin morfolojisi, farklı büyütme yoluyla SEM (Şekil 4.2) ile karakterize edildi. Bu resimler, CP-NF'nin birbirine bağlı nano yapraklardan oluştuğunu göstermektedir. Şekil 4.2' de CP-NF'lerin küresel şekle ve çiçek benzeri morfolojiye sahip olduğu açıkça görülmektedir. SEM görüntüleri ayrıca CP-NF'lerin yüksek gözenekli morfolojisini doğrulamaktadır. Gözenekli yapıları nedeniyle, CP-NF'ler geniş yüzey alanına sahiptir. Yüzey-hacim oranı yüksek olduğundan, CP-NF'ler biyomolekül immobilizasyonu için oldukça uygundur. Son zamanlarda, çiçek şeklindeki bu malzemeler (nanoflowers), büyüleyici yapısal özelliklerinden dolayı gittikçe artan bir ilgi görmektedirler.



Şekil 4.2. CP-NF'lerin farklı büyötmeler ile elde edilmiş SEM göröüntüleri.

4.2.2 CP-NF'lerin EDX ile analizleri

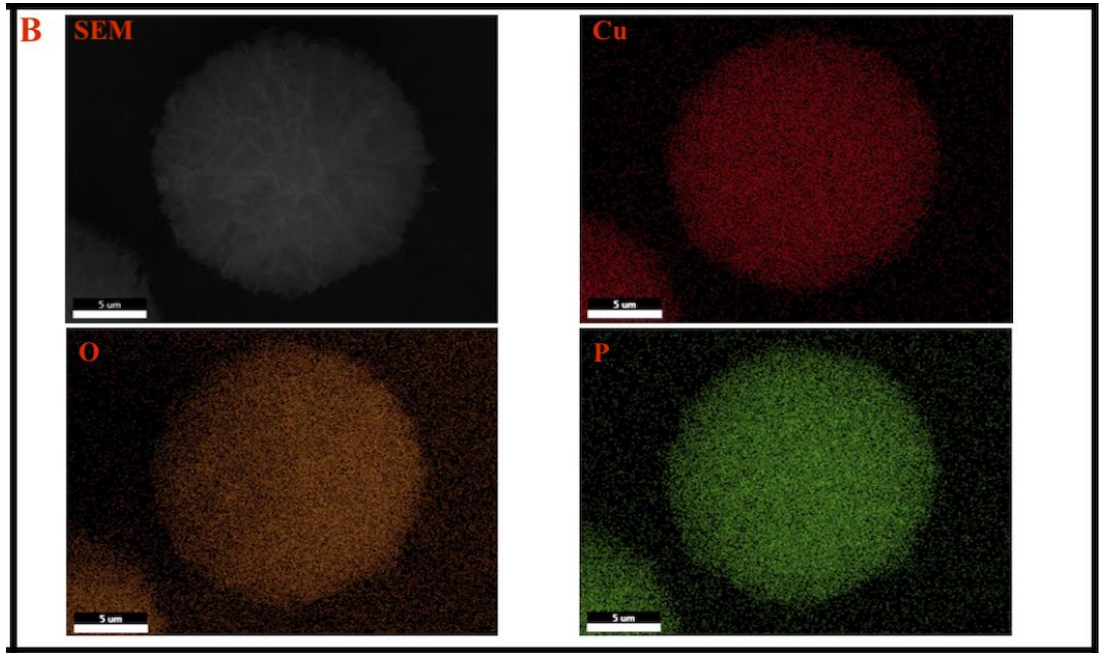
CP-NF'lerin kimyasal ve elementel kompozisyonunun incelenmesi için yapılan enerji dağıtıcı X-ışını (EDX) analizinin grafiğı Şekil 4.3' te verilmiştir. Grafikte sentezlenen CP-NF'lerdeki bakır (Cu), oksijen (O) ve fosfor (P) elementlerinin varlığını gösterilmiştir. Element haritalama sonuçları Cu, O ve P elementlerinin CP-NF'lerin içine homojen olarak dağıldığını gösterdi.



Şekil 4.3. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin EDX ile incelenmesi.

4.2.3 CP-NF'lerin SEM-EDX ile analizleri

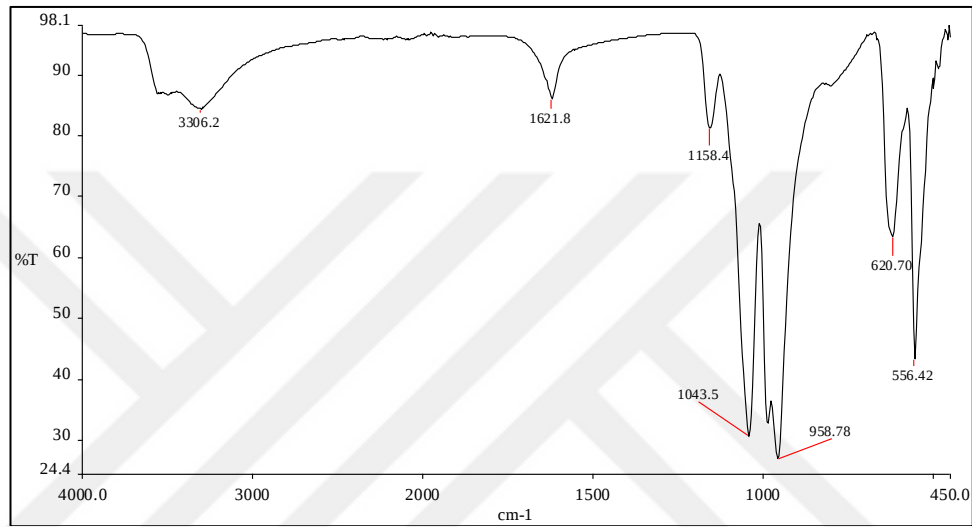
SEM ve EDX analizlerinin entegreli alındığı ve sonuçların Şekil 4.4'te verildiği bu analizde, element haritalama sonuçları Cu, O ve P elementlerinin CP-NF'lerin içine homojen olarak dağıldığını göstermektedir.



Şekil 4.4. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin SEM-EDX ile incelenmesi.

4.2.4 CP-NF'lerin FTIR ile analizleri

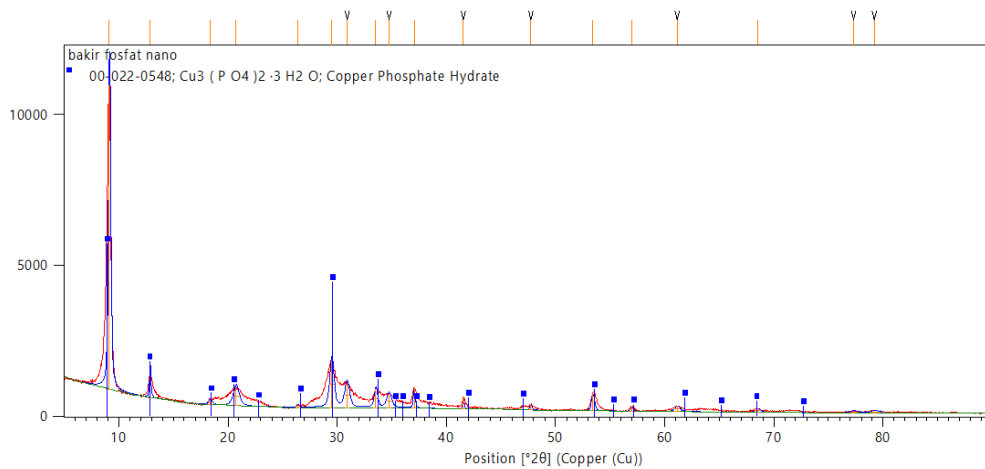
CP-NF'lerin yapısal analizleri için alınan grafiklerden biride FTIR spektrumudur ve sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir. FTIR spektrumunda, 1621 cm^{-1} 'deki zirve, bakır fosfat üç hidrat nanoflower [$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CP-NF'ler] içerisindeki kristal sudan gelmekteyken, ~ 1158 ve $\sim 1043\text{ cm}^{-1}$ deki pikler P=O ve P-O titreşimlerine atfedilmiştir. Ayrıca, ~ 620 ve $\sim 566\text{ cm}^{-1}$ 'deki karakteristik pikler de fosfat gruplarının varlığını gösteren O=P-O bükülme titreşimlerine atfedildi.



Şekil 4.5. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin FTIR ile incelenmesi.

4.2.5 CP-NF'lerin XRD analizleri

CP-NF'lerin XRD paternleri (Şekil 4.6) $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ için uluslararası katalog paternleri(JPSCD00-022-0548) ile uyum içindedir.

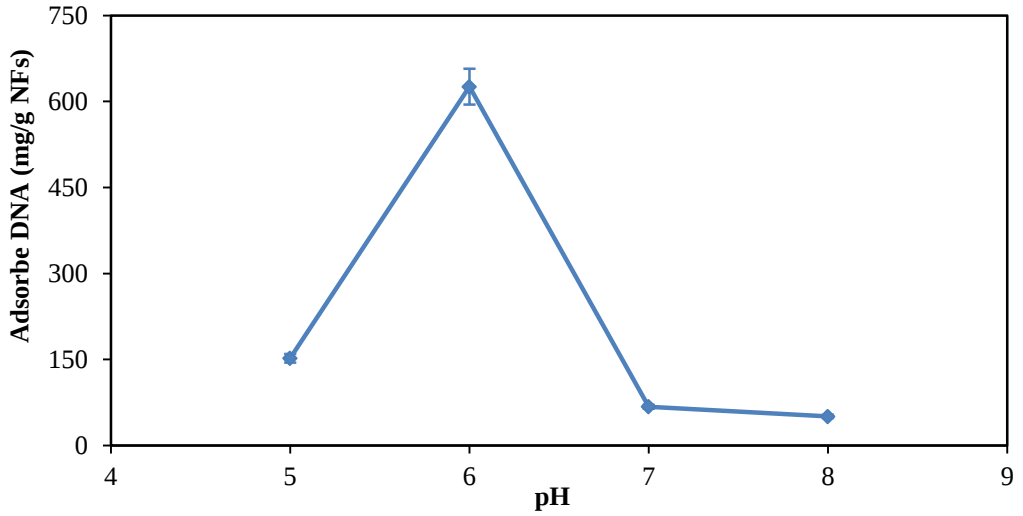


Şekil 4.6. CP-NF'lerin yapısal ve elementel analizlerinin XRD ile incelenmesi.

4.3 Fe³⁺-CP-NF'lere Sulu Ortamdan DNA Adsorpsiyon Çalışmaları

4.3.1 Fe³⁺-CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi

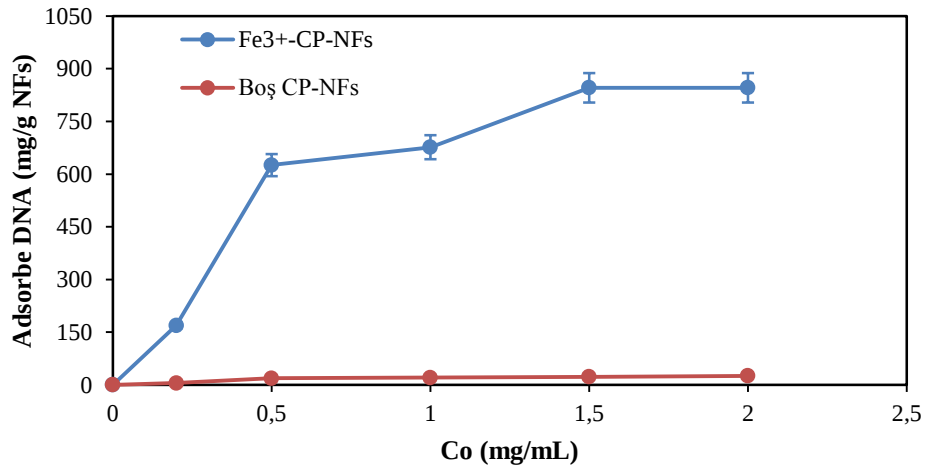
Tez çalışmalarının bu bölümünde, adsorpsiyon işleminde önem taşıyan başlangıç konsantrasyonu, pH, iyonik güç ve sıcaklık etkileri gibi bazı parametreler incelenmiştir. DNA yapısında fosfat grupları üzerindeki oksijen türleri, CP-NF'ler üzerinde Fe³⁺ iyonları ile etkileşimde temel sorumluluğa sahiptir. Fe³⁺, Ga²⁺, Al³⁺, Ca²⁺ gibi bazı iyonlar, fosfat gruplarına içerdikleri oksijen yapılarından dolayı daha fazla afinite göstermektedirler [21]. Bu iyonlar arasında Fe³⁺, fosfat grupları için çok daha fazla afiniteye sahiptir [22]. Bu çalışmada, Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, maksimum DNA adsorpsiyonu, pH 6, 0.05 M asetat tamponunun meydana geldi. Bilindiği gibi, DNA molekülleri üzerindeki net yük pH 5'te sıfırdır (DNA'nın izoelektrik noktası) [23]. CP-NF'ler üzerindeki ligandların (yani Fe³⁺ iyonlarının) hidroksilasyonu ve protonlama olasılıkları nedeniyle, bu pH'nın üzerinde ve altında, yüzey ile DNA molekülleri arasında meydana gelebilecek olan olası itmelerden dolayı adsorpsiyonda düşüş olabilir [24, 25].



Şekil 4.7. Fe³⁺-CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna ortam pH'sının etkisi: C_{DNA}: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C.

4.3.2 Fe³⁺-CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişimin etkisi

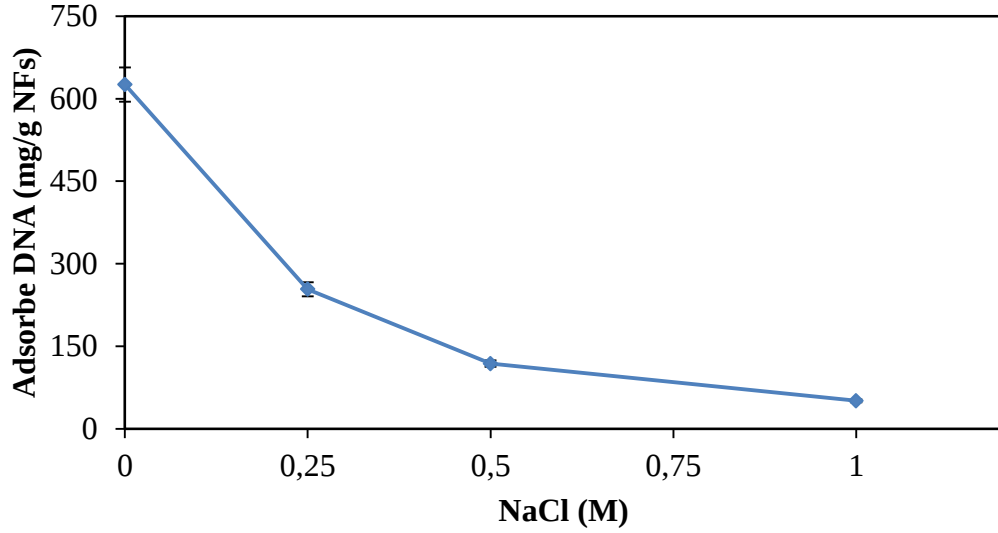
Fe³⁺-CP-NF'lere DNA adsorpsiyon üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisine çalışmaları 0.25-2 mg DNA/mL aralığında yapıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de verildi. Şekilde görüldüğü gibi, adsorpsiyon, 1.5 mg/mL DNA konsantrasyonu ile bir plato derecesine ulaşmaktadır. Maksimum adsorpsiyon 845.7 mg/g Fe³⁺-CP-NF olarak bulunurken, Fe³⁺ bağılı olmayan CP-NF 'ler için spesifik olmayan DNA adsorpsiyonu 25.4 mg/g olarak elde edildi. Fe³⁺ iyonlarının eklenmesi CP-NF'lerin adsorpsiyon kapasitesini önemli ölçüde arttırdı. Metal iyonları ve biyomoleküller arasında elektrostatik/iyonik, hidrofobik ve koordinasyon etkileşimleri gibi farklı etkileşim türlerinde bahsedilebilir [26, 27]. Metal iyonlarının koordinasyon sayısı ve boş koordinasyon bölgeleri ile ortamın pH ve iyonik şiddeti bu etkileşimde önemli rol oynarlar [28]. Afinite kromatografisinde metal iyonları ligand olarak kullanıldığında, adsorban ve biyomoleküller arasında itmeye neden olan yüzey yükünün dengelenmesi ve itmenin azaltılması adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olur [29, 30]. Fe³⁺ iyonlarının, oksijen gruplarının bulunduğu fosfat yapılarından dolayı DNA'ya afinitesinin yüksek olduğu bilinmektedir [22]. Bu çalışmada 845.7 mg/g Fe³⁺-CP-NF'nin yüksek adsorpsiyon miktarı hem Fe³⁺ -CP-NF'ler ile DNA molekülleri arasındaki yüzey itme etkisinin azaltılmasına ve CP-NF'lerin nano plakalarının yüksek yüzey alanına bağlanabilir.



Şekil 4.8. Fe³⁺-CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi: pH 6.0, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C.

4.3.3 Fe³⁺-CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

İMAK matrisi, ortamdaki iyonik şiddete bağlı olarak bir iyon değişim kromatografi materyali gibi davranabilir [31]. Dolayısıyla, bir adsorpsiyon işleminde moleküllerin afinitesini yönetmek için ortamın iyonik gücü kullanılabilir. Bu çalışmada, ortamın iyonik gücü, 0-1.0 M aralığında NaCl iyonları ile test edildi ve sonuçlar Şekil 4.9'da verildi. Burada görüldüğü gibi, ortamın iyonik şiddeti arttıkça adsorpsiyon azalmaktadır. Ortamdaki çözülmüş anyonik ve katyonik iyonlar, yüzey ve adsorbeolan moleküllerin karşılıklı zıt yüklü grupları üzerine çökelmiş olabilirler. Böylece biyomoleküllerin adsorpsiyon kapasitesi azalmış olabilir [32].

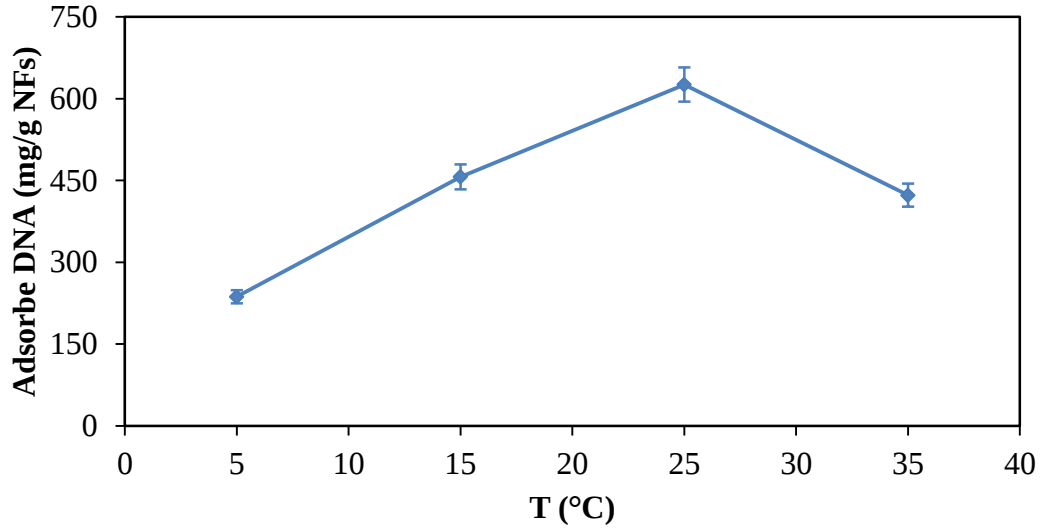


Şekil 4.9. Fe³⁺-CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna iyonik kuvvet etkisi: pH 6.0, CDNA: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika, T: 25 °C.

4.3.4 Fe³⁺-CP-NF'lere sulu ortamdan DNA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Bir adsorpsiyon işleminde, sıcaklık aktivitesinin araştırılması da önemli parametrelerden biridir. İMAK adsorpsiyon mekanizmasında, immobilize metal iyonları ile adsorbe olacak biyomoleküller üzerinde dışarıya dönük olan fonksiyonel gruplar (karboksil, sülfhidril, amin vb.) gruplar arasında farklı etkileşim türlerinden (hidrofobik, elektrostatik ve/veya koordinasyon bağları gibi) bahsedilir. Bu nedenle, hangi etkileşimin baskınlık olduğunu ortaya koymak genellikle kolay değildir [31, 33]. Bu çalışmada, adsorpsiyon üzerindeki sıcaklık etkisi 5-35 °C aralığında araştırılmış ve en yüksek DNA etkileşimi 25 °C'de görülmüştür (Şekil 4.10). Bu sıcaklığın altında ve üzerinde, DNA moleküllerinin Fe³⁺-CP-NF'lere olan

adsorpsiyonu düşüktür. Bu davranış, 25 °C'de iyonik etkileşimin baskın etkisi ile açıklanabilir.



Şekil 4.10. Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi: pH 6.0, CDNA: 1 mg/mL, akış hızı: 1 mL/dakika.

4.4 Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA Adsorpsiyonunun Literatürle Karşılaştırılması

Biyomoleküllerin saflaştırılması için yeni adsorbanların geliştirilmesi, kromatografi alanında önem arz etmektedir. Şimdiye kadar ayırma bilimine kriyojeller [34], partiküller [35,36], biyomateryaller [37] parçacık gömülü sistemler (embedding) [38] gibi adsorbentler sunulmuştur. Özellikle, parçacıkların yüksek yüzey alanı ve kriyojellerin iyi akış hızı gibi iki önemli özelliği bir arada sunan parçacık gömülü sistemler oldukça dikkat çekmiştir [39]. Nanoflowers da yüksek yüzey alanı, nano plakaları arasında yüksek difüzyon hızı, yüksek adsorpsiyon kapasitesi gibi birçok özelliğe sahiptir. DNA üzerin adsorpsiyon kapasitesi ile ilgili literatürden alınan bazı karşılaştırmalar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Burada görüldüğü gibi Fe^{3+} -CP-NF'lerin çok önemli bir adsorpsiyon kapasitesi vardır.

Çizelge 4.1. Literatürde bildirilen bazı adsorbanların DNA adsorpsiyon miktarının karşılaştırılması.

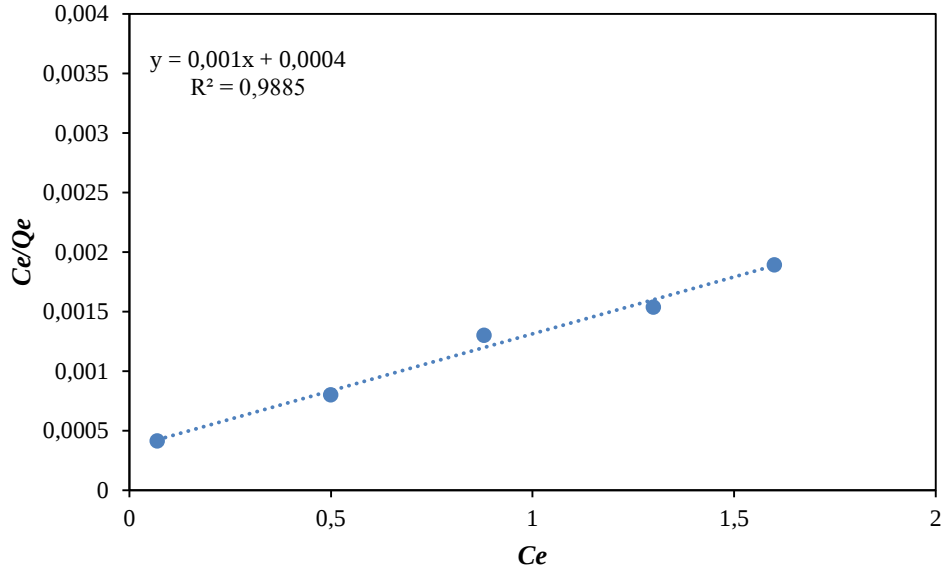
Adsorbentler	Kapasite (mg/g)	Ref.
Sporopolenin partiküllerin IMAK uygulamaları	109	[38]
Fe ³⁺ takılı SBA-15 nanopartikül gömülü kolon	751.5	[35]
Poli(hidroksietilmetakrilat) bazlı afinite kriyojel	13.35	[34]
Zirkonyum bazlımagnetiknanokompozit	53.5	[35]
Cibacron Blue 3GA bağlı kriyojel	32.5	[40]
Cu ²⁺ -takılı magnetitnanopartikül	19.97	[41]
Faklı kil mineralleri üzerine DNA adsorpsiyonu	54.3	[42]
Ag ⁺ -dekore edilmişpoli(glisidilmetakrilat) micropartiküller	11.48	[43]
Silanize polimeriknanopartikül	672.41	[44]
Zn ²⁺ -şelatlıpoli(HEMA- MAH)] kriyojel kolon	32.93	[28]
Poli(N,N-dimetilakrilamid)-aşılı kitosanhidrojenler	4.62	[45]
Bu çalışmada	845.7	

4.5 Yeniden Kullanılabilirlik Çalışmaları

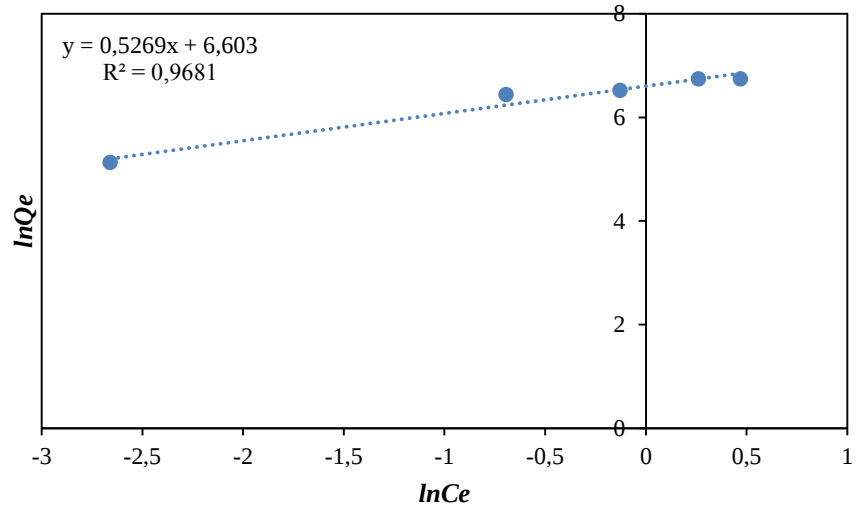
Saf suda hazırlanan 1 M NaCl çözeltisi, Fe³⁺-CP-NF'lerden DNA moleküllerinin elüsyon ortamı olarak kullanıldı. Aynı adsorbent, adsorpsiyon performansından kayda değer bir kayıp olmadan yaklaşık 35 kez kullanılmıştır. Tüm deneylerin sonunda adsorpsiyon kapasitesinde sadece %3'lük bir kayıp görülmüştür. Önceki çalışmamızda 1 M NaCl içeren pH 8 fosfat tamponu, Fe³⁺ iyonu bağlı matrisden DNA için elüsyonu için kullanılmışken [46]; burada, 1 M NaCl iyonları içeren saf su, DNA moleküllerini elüe etmek için yeterli olmuştur.

4.6 Fe³⁺-CP-NF'lere DNA Adsorpsiyonu İçin İzoterm Modelleri

Fe³⁺-CP-NF 'lerin yüzeyine denge durumunda adsorbe olmuş DNA moleküllerinin dağılımını araştırmak için, özellikle biyomoleküllerin adsorpsiyonu için çokça kullanılan Langmuir izotermi [45] (Şekil 4.11) ve Freundlich izotermi [46] (Şekil 4.12) gibi iki adsorpsiyon modeli istatistiksel olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar ve bu modellerin bazı dikkate değer özellikleri Çizelge 4.2'de verilmektedir. Denklemlerden çıkarılan korelasyon katsayılarından (R^2) görüldüğü gibi, Langmuir modeli R^2 açısından Freundlich'e oranla daha uygundur. Dolayısıyla, Fe³⁺-CP-NF 'lerin DNA molekülleri için tek tabakalı adsorpsiyon özelliğine sahip olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.11. Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonu için Langmuir izoterm modelleri.



Şekil 4.12. Fe^{3+} -CP-NF'lere DNA adsorpsiyonu için Freundlich izoterm modelleri.

Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich izotermlerinden elde edilen sonuçlar ve bazı öne çıkan özellikleri.

İzoterm modeli	İlgili formül ve linearize denklemler	Ordinatlar	Adsorpsiyon parametreleri	Izoterm değerleri	Öne çıkan Özellikler
Langmuirisotermi	$Q_e = \frac{Q_m C_e}{K_d + C_e}$	$C_e/Q_e -C_e$	Q_m	1000 (mg/g)	• Adsorbat ile tek tabakalı ve enerjisel olarak homojen adsorpsiyon fazının meydana gelmesi. • Adsorbe edilmiş moleküller birbirini etkilemez. • Q_m: Teorik maksimum adsorpsiyon. • Q_e: Denge adsorpsiyon miktarı • K_d: Ayrılma sabiti
Langmuir izotermi (linearize denklemi)	$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{C_e}{Q_m} + \frac{K_d}{Q_m}$		K_d	0.4 (mg/mL)	
			R^2	0.9885	
			$Eşitlik$	$0.001x+4.10^{-4}$	
Freundlichisotermi	$Q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$	$lnQ_e -lnC_e$	K_F	737.3 (mg/g)	• Yüzey heterojenliği ve adsorbe molekülüne ilişkin tek tabakalı ve çok tabakalı adsorpsiyon olasılıklarından bahsedilebilir. • n: Adsorptiyon yoğunluğu • $n<1$:C_eartarsaQ_eartar; • $n>1$: C_eartsabileQ_eduraklar
Freundlichisoterm (linearize denklem)	$lnQ_e = \frac{1}{n} lnC_e + lnK_F$		n	1.9	
			R^2	0.9681	
			$Eşitlik$	$0.5269x+6.603$	

5. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında, herhangi bir organik bileşen içermeyen, nano-yapraklardan meydana gelen bakır fosfat bazlı nanoflowerlar (nano-çiçekler) (-CP-NF'ler) sentezlenerek, Fe^{3+} iyonları takılarak Fe^{3+} -CP-NF'ler oluşturuldu ve bunların DNA saflaştırılmasındaki davranışları, ortam pH'sı, başlangıç konsantrasyonu, iyonik güç ve sıcaklığın etkileri gibi bazı etkileşim parametreleri ile incelendi. Bildiğimiz kadarıyla, Fe^{3+} -CP-NF'ler DNA moleküllerini ayırmak için ilk kez kullanılmıştır. Çiçek benzeri matris benzeri nano-yapraklar arasında difüzyon sınırlaması olmadığından, pH 6 ve 25 °C bir sıcaklıkta 1.5 mg/mL'lik bir başlangıç DNA derişiminde 845.7 mg/g Fe^{3+} -CP-NF'nin gibi yüksek adsorpsiyon değerine ulaşıldı. Çalışmada bazı kinetik adsorpsiyon işlemlerini kontrol etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi değerlendirildiğinde, korelasyon katsayısı (R^2) 0.9885 olan Langmuir modelinin bu sistem için daha uygun olduğu görölmüştür. Fe^{3+} bağlı CP-NF'lerin yanı sıra Fe^{3+} takılı olmayan CP-NF'ler de DNA saflaştırılması açısından test edildi ve ihmal edilebilir miktarda DNA molekülünün spesifik olmayan adsorpsiyon olarak CP-NF yüzeylerinde adsorbe olduğu göröldü. Fe^{3+} -CP-NF'lerin 35 döngü sonunda bile %97 gibi bir adsorpsiyon performansı olduğu göröldü. Yapılan tüm çalışmaların ışığında, Fe^{3+} bağlı bakır fosfat nanoflowerların (Fe^{3+} -CP-NF'ler) biyoteknoloji ve DNA moleküllerinin yüksek miktarda ayrılması ile biyotıp alanında başarıyla uygulanabileceği umulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Yildiz, A., Genc, O. ve Bektas, S., 1997. Enstrümental analiz yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
2. Poole, C.F., 2000. Progress in packed column supercritical fluid chromatography: materials and methods, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 43, 1-3, 3-23.
3. Tuncer, M., 2008. Protein saflaştırma 1: Kromatografik teknikler, Mersin Üniversitesi Yayınları.
4. Wilchek, M. ve Chaiken, I., 2000. An overview of affinity chromatography, in *Affinity Chromatography*, 1-6.
5. Hage, D.S. ve Clarke, W. 2004. Affinity Chromatography: An Overview. In: *Encyclopedia of Chromatography*, Cazes, J., (Ed). Encyclopedia of Chromatography 2004 Update Supplement, Crc Press.
6. Kagedal, L., 2011. Immobilized metal ion affinity chromatography, Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 183-201.
7. Chaga, G.S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 49, 313-334.
8. Yetim, N.K., Özkan, E.H. ve Sarı, N., 2019. Polimerik nanoküreler üzerine enzim immobilizasyonu ve optimizasyonu, Suleyman Demirel University Journal of Science, 14, 1, 97-104.
9. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. ve Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, Nature, 258, 5536, 598-599.
10. Forcic, D., Branovic-Cakanic, K., Ivancic, J., Jug, R., Barut, M. ve Strancar, A., 2005. Purification of genomic DNA by short monolithic columns, Journal of Chromatography A, 1065, 1, 115-120.
11. Ge, J., Lei, J. ve Zare, R.N., 2012. Protein-inorganic hybrid nanoflowers, Nature Nanotechnology, 7, 7, 428-432.
12. Luo, Y.K., Song, F., Wang, X.L. ve Wang, Y.Z., 2017. Pure copper phosphate nanostructures with controlled growth: a versatile support for enzyme immobilization, CrystEngComm, 19, 22, 2996-3002.
13. Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I. ve Özdemir, N., 2015. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability, Dalton Transactions, 44, 31, 13845-13852.

14. Song, M.J., Hwang, S.W. ve Whang, D., 2010. Non-enzymatic electrochemical CuO nanoflowers sensor for hydrogen peroxide detection, *Talanta*, 80, 5, 1648-1652.
15. Wang, Y., Li, X., Wang, N., Quan, X. ve Chen, Y., 2008. Controllable synthesis of ZnO nanoflowers and their morphology-dependent photocatalytic activities, *Separation and Purification Technology*, 62, 3, 727-732.
16. Zeng, S., Tang, K., Li, T., Liang, Z., Wang, D., Wang, Y., Qi, Y. ve Zhou, W., 2008. Facile route for the fabrication of porous hematite nanoflowers: its synthesis, growth mechanism, application in the lithium ion battery, and magnetic and photocatalytic properties, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112, 13, 4836-4843.
17. Wang, Z., Zhang, J., Ekman, J.M., Kenis, P.J. ve Lu, Y., 2010. DNA-mediated control of metal nanoparticle shape: one-pot synthesis and cellular uptake of highly stable and functional gold nanoflowers, *Nano Letters*, 10, 5, 1886-1891.
18. Sun, J., Ge, J., Liu, W., Lan, M., Zhang, H., Wang, P., Wang, Y. ve Niu, Z., 2014. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor, *Nanoscale*, 6, 1, 255-262.
19. Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Kalin, R., Sadeghian, N., Ozdemir, H., Ocsoy, I. ve Özdemir, N., 2017. A hierarchical assembly of flower-like hybrid Turkish black radish peroxidase-Cu²⁺ nanobiocatalyst and its effective use in dye decolorization, *Chemosphere*, 182, 122-128.
20. Gulmez, C., Altinkaynak, C., Özdemir, N. ve Atakisi, O., 2018. Proteinase K hybrid nanoflowers (P-hNFs) as a novel nanobiocatalytic detergent additive, *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 803-810.
21. Gaberc-Porekar, V. ve Menart, V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 1-3, 335-360.
22. Muszyńska, G., Dobrowolska, G., Medin, A., Ekman, P. ve Porath, J.O., 1992. Model studies on iron (III) ion affinity chromatography: II. Interaction of immobilized iron (III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins, *Journal of Chromatography A*, 604, 1, 19-28.
23. Stotzky, G., 2000. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids, *Journal of Environmental Quality*, 29, 3, 691-705.
24. Porath, J., 1990. Amino acid side chain interaction with chelate- liganded crosslinked dextran, agarose and TSK gel, A mini review of recent work, *Journal of Molecular Recognition*, 3, 3, 123-127.

25. Sosa-Acosta, J.R., Silva, J., Fernández-Izquierdo, L., Díaz-Castañón, S., Ortiz, M., Zuaznabar-Gardona, J. ve Díaz-García, A., 2018. Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 545, 167-178.
26. Melzak, K.A., Sherwood, C.S., Turner, R.F. ve Haynes, C.A., 1996. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 181, 2, 635-644.
27. Gurbuz, F., Ceylan, Ş., Odabaşı, M. ve Codd, G.A., 2016. Hepatotoxic microcystin removal using pumice embedded monolithic composite cryogel as an alternative water treatment method, *Water Research*, 90, 337-343.
28. Önal, B., Acet, Ö., Sanz, R., Sanz-Pérez, E.S., Erdönmez, D. ve Odabaşı, M., 2019. Co-evaluation of interaction parameters of genomic and plasmid DNA for a new chromatographic medium, *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1183-1190.
29. Nguyen, T.H. ve Elimelech, M., 2007. Plasmid DNA adsorption on silica: kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts, *Biomacromolecules*, 8, 1, 24-32.
30. Acet, Ö., Aksoy, N.H., Erdönmez, D. ve Odabaşı, M., 2018. Determination of some adsorption and kinetic parameters of α -amylase onto Cu⁺ 2-PHEMA beads embedded column, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46, 538-545.
31. Baran, N.Y., Acet, Ö. ve Odabaşı, M., 2017. Efficient adsorption of hemoglobin from aqueous solutions by hybrid monolithic cryogel column, *Materials Science and Engineering: C*, 73, 15-20.
32. Sharma, S. ve Agarwal, G.P., 2001. Interactions of proteins with immobilized metal ions: a comparative analysis using various isotherm models, *Analytical Biochemistry*, 288, 2, 126-140.
33. Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E. ve Denizli, A., 2011. Poly (hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, *International journal of biological macromolecules*, 48, 4, 577-582.
34. Saraji, M., Yousefi, S. ve Talebi, M., 2017. Plasmid DNA purification by zirconia magnetic nanocomposite, *Analytical Biochemistry*, 539, 33-38.
35. Yavuz, H., Odabaşı, M., Akgöl, S. ve Denizli, A., 2005. Immobilized metal affinity beads for ferritin adsorption, *Journal of Biomaterials Science*, 16, 5, 673-684.

36. Kaya, M., Odabasi, M., Mujtaba, M., Sen, M., Bulut, E. ve Akyuz, B., 2016. Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of Astragalus gummifer (Fabaceae) tested for protein adsorption performance, *Materials Science and Engineering: C.*, 62, 144-151.
37. Acet, Ö., Baran, T., Erdönmez, D., Aksoy, N.H., Alacabey, İ., Menteş, A. ve Odabaşı, M., 2018. O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes as affinity ligands for immobilized metal-ion affinity chromatography of lysozyme, *Journal of Chromatography A.*, 1550, 21-27.
38. Acet, Ö., Önal, B., Sanz, R., Sanz-Perez, E.S., Erdönmez, D. ve Odabaşı, M., 2019. Preparation of a new chromatographic media and assessment of some kinetic and interaction parameters for lysozyme, *Journal of Molecular Liquids*, 276, 480-487.
39. Bereli, N., Türkmen, D., Köse, K. ve Denizli, A., 2012. Glutamic acid containing supermacroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel disks for UO₂²⁺ removal, *Materials Science and Engineering: C.*, 32, 7, 2052-2059.
40. Cai, P., Huang, Q., Zhang, X. ve Chen, H., 2006. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol, *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 3, 471-476.
41. Erol, K., Uzunoglu, A., Köse, K., Sarıca, B., Avcı, E. ve Köse, D.A., 2018. Synthesis and characterization of Ag⁺-decorated poly (glycidyl methacrylate) microparticle design for the adsorption of nucleic acids, *Journal of Chromatography B.*, 1081, 1-7.
42. Türkcan, C., Akgöl, S. ve Denizli, A., 2013. Silanized polymeric nanoparticles for DNA isolation, *Materials Science and Engineering: C.*, 33, 8, 4498-4503.
43. Odabaşı, M., Baydemir, G., Karataş, M. ve Derazshamshir, A., 2010. Preparation and characterization of metal- chelated poly (HEMA- MAH) monolithic cryogels and their use for DNA adsorption, *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 3, 1306-1312.
44. Başer, B., Demirel, G.B. ve Caykara, T., 2011. DNA adsorption on poly (N, N- dimethylacrylamide)- grafted chitosan hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 3, 1420-1425.
45. Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical Society*, 40, 9, 1361-1403.
46. Freundlich, H., 1906. Over the adsorption in solution, *The Journal of Physical Chemistry*, 57, 385471, 1100-1107.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ayça SERİNBAŞ
Adres : Sofular Mahallesi 1105 Sokak Akyıl Apt. Kat:2No:7
Merkez/AKSARAY
E-posta adresi : aycaserinbas@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2010-2016
Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı,
2017-2020

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. TURKTIPSAN / Yaz Stajı
2. Aksaray Selçuklu Temel Lisesi (2016-2017)
3. Özel Artı Metropol Koleji (2016-2019)

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. **Serinbaş, A.**, Önal, B., Acet, Ö., Özdemir, N., Dzmitruk, V., Halets-Bui, I., Shcharbin, D. ve Odabaşı, M., 2020. A new application of inorganic sorbent for biomolecules: IMAC practice of Fe³⁺-nano flowers for DNA separation, Materials Science and Engineering: C, 113, 111020-111026.