

**MANYETİK VE MANYETİK OLMAYAN TiO<sub>2</sub> BAZLI SABİT  
FAZLAR İLE GENOMİK DNA İZOLASYONU**

**GENOMIC DNA ISOLATION WITH MAGNETIC AND NON-  
MAGNETIC TiO<sub>2</sub> BASED STATIONARY PHASES**

**MERVE DURMAZ**

**PROF. DR. S. ALİ TUNCEL**

**Tez Danışmanı**

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

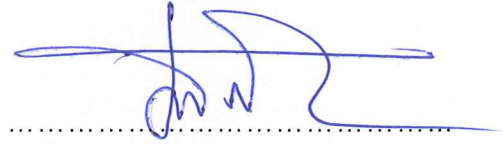
2017

**MERVE DURMAZ** 'ın hazırladığı "**Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Bazlı Sabit Fazlar ile Genomik DNA İzolasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

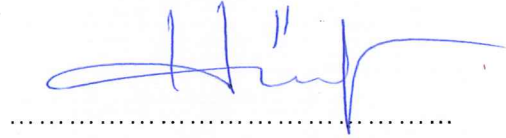
Prof. Dr. Nuray Otkar  
Başkan




Prof. Dr. S. Ali Tuncel  
Danışman



Prof. Dr. Hülya Yavuz Ersan  
Üye



Prof. Dr. Yeşim Sağ Açikel  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Eda Çelik Akdur  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

- Tezimin/Raporumun 04.07.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

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

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

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

04/07/2017



Merve Durmaz

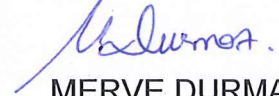
## ETİK

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

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

beyan ederim.

12/06/2017



MERVE DURMAZ

## ÖZET

# MANYETİK VE MANYETİK OLMAYAN TiO<sub>2</sub> BAZLI SABİT FAZLAR İLE GENOMİK DNA İZOLASYONU

**Merve Durmaz**

**Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali Tuncel**

**Haziran 2017, 67 sayfa**

Bu tez çalışmasının amacı yüksek genomik DNA izolasyon yeteneğine sahip monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin sentezlenmesi ve sentezlenen mikrokürelerin kesikli sistemdeki genomik DNA izolasyon performanslarının incelenmesidir.

İlk aşamada sol-jel metodu kullanılarak monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikroküreler sentezlenmiştir. Manyetik olmayan titanyum dioksit sentezi için poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller sodyum bisüfit ile türevlendirilmiş ve ardından titanyum klorür öncülü varlığında kalıp olarak kullanılmıştır. Manyetik titanyum dioksit sentezi için öncelikle etilen diamin ile türevlendirme ve sonrasında demir tuzları ile ikili çöktürme metodu ile manyetikleştirme yapılmıştır. Manyetik poli (HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler kalıp olarak ve titanyum klorür öncül olarak kullanılmıştır.

İkinci aşamada buzağı ve insan genomik DNA'sı kullanılarak monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin genomik

DNA izolasyon performansları incelenmiştir. Bu amaçla kesikli sistemde desorpsiyon ortam türü, adsorpsiyon ortam pH'ı, başlangıç DNA konsantrasyonu ve sorbent miktarının DNA izolasyonuna etkisi incelenmiştir.

Optimize edilen parametreler dikkate alınarak kesikli sistemde manyetik olmayan titanyum dioksit mikroküreler kullanılarak tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının etkisi incelenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri kullanılarak izole edilen insan genomik DNA'sının karakterizasyonu yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin genel olarak kullanılan sorbentlerle kıyaslandığında tatmin edici bir genomik DNA izolasyon performansına sahip olduğunu ve kesikli sistemde katı fazlı DNA izolasyonu için alternatif bir katı faz olarak sunulabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** sol-jel metodu, titanyum dioksit mikroküreler, genomik DNA, tam kan.

## **ABSTRACT**

### **GENOMIC DNA ISOLATION WITH MAGNETIC AND NON-MAGNETIC TiO<sub>2</sub> BASED STATIONARY PHASES**

**Merve Durmaz**

**Graduate Degree, Department of Chemical Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. S. Ali Tuncel**

**June 2017, 67 pages**

The aim of this thesis is the synthesis of monodisperse porous magnetic and non-magnetic titania (titanium dioxide) microspheres with high genomic DNA isolation ability and investigation of genomic DNA isolation performance in batch fashion.

At the first stage, monodisperse porous non-magnetic and magnetic titania microspheres were synthesized using the sol-gel method. For synthesis of non-magnetic titania particles, poly (HPMA-Cl-co-EDMA) particles were derivatized by sodium bisulfite and subsequently were utilized as a template in the presence of titanium chloride precursor. Magnetic titania microspheres were synthesized by primarily derivatization using ethylene diamine and subsequently were magnetized by the binary precipitation method using iron salts. The magnetic poly (HPMA-Cl-co-EDMA) microspheres were used as a template and titanium chloride as a precursor.

In the second stage, genomic DNA isolation performances of monodisperse porous magnetic and non-magnetic titania microspheres were investigated using

calf thymus and human genomic DNA. The effect of type of desorption medium, pH of adsorption medium, initial DNA concentration and amount of sorbent on DNA isolation were performed in batch fashion.

By considering the above optimized parameters, the effect of sorbent amount on DNA isolation from whole blood was investigated using non-magnetic titania microspheres. Isolated human genomic DNA was characterized using polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis methods.

The obtained results showed that monodisperse porous magnetic and non-magnetic titania microspheres exhibited satisfactory genomic DNA isolation performance compared to the conventionally available sorbents and could be offered as an alternative solid phase for solid phase DNA isolation in batch fashion.

**Keywords:** sol-gel method, titanium dioxide microspheres, genomic DNA, whole blood.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardım, destek, sabrını ve bilgisini esirgemeyen, çalışma azmi ve disiplinini örnek aldığım danışmanım Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e;

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım sorunlarda bilgi birikimi, tecrübeleri ve sabrı ile beni çözüme götüren Dr. Kourosh Salimi, Arş. Gör. Duygu Deniz Usta ve Arş. Gör. Dr. Çiğdem Kip'e;

Çalışmalarım sırasında tüm pozitifliği ile desteğini benden esirgemeyip, çıkmaza girdiğim anlarda beni telkin ederek sorunları çözebileceğim konusunda yüreklendiren çalışma arkadaşım Gjulten Nedjip'e;

Güler yüzü, bitmeyen enerjisi ve neşesiyle yüzümü güldüren ve desteğini hep hissettiren çalışma arkadaşım Fatma Çambay'a;

Güler yüzleri ile beni motive eden çalışma arkadaşlarım Mustafa Cihan Demir, Arş. Gör. Anıl Kuban ve Ebru Sağ'a;

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı ve destek olan Ayfer Koyuncu'ya;

Hayatım boyunca bana güvenip destekleyerek bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme;

İçtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. DNA .....	2
2.1.1. DNA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.1.2. DNA'nın Spektroskopik ve Termal Özellikleri .....	4
2.2. İnsan Tam Kanından DNA İzolasyonunda Kullanılan Temel Yöntemler .....	5
2.2.1. Çözeltiye Dayalı DNA İzolasyon Yöntemleri.....	7
2.2.1.1. Tuz ile Çöktürme Yöntemi Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu .....	7
2.2.1.2. Organik Çözücüler Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu .....	7
2.2.2. Katı Fazların Kullanıldığı DNA İzolasyon Yöntemleri.....	8
2.2.2.1. Silika Partiküller Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu.....	8
2.2.2.2. Anyon Değişimi Yöntemi Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu .....	9
2.2.2.3. Manyetik Partiküller Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu .....	9
2.3. Titanyum Dioksit.....	10
2.3.1. Titanyum Dioksit Sentezi .....	10
2.3.1.1. Sol-jel metodu .....	11
2.3.1.2. Sol-Jel Yöntemi ile TiO <sub>2</sub> Sentezi.....	12
2.3.1.2.1. Alkol Bazlı Sol-Jel Yöntemi ile TiO <sub>2</sub> Sentezi .....	13

2.3.1.2.2. Su Bazlı Sol-Jel Yöntemi ile TiO <sub>2</sub> Sentezi .....	13
2.4. Dispersiyon Polimerizasyonu .....	13
2.5. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu .....	16
2.6. Titanyum Dioksit ile DNA İzolasyonu.....	18
2.7. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu).....	19
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	22
3.1. Kalıp Materyali Olarak Manyetik ve Manyetik Olmayan Monodispers Gözenekli poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Sentezi .....	22
3.1.1. Materyal.....	22
3.1.2. Dispersiyon Polimerizasyonu ile Çıkış Lateksi Poli(GMA) Sentezi .....	23
3.1.3. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu ile Monodispers Gözenekli Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Sentezi.....	24
3.1.4. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerinin Sodyum Bisülfid ile Türevlendirilmesi .....	25
3.1.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerinin Etilen Diamin ile Türevlendirilmesi.....	25
3.1.6. Amin Bağlı Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerin Manyetikleştirilmesi.....	25
3.2. Sol-Jel Kalıplama Metodu ile Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi.....	26
3.2.1. Materyal.....	26
3.2.2. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan Titanyum Mikrokürelerin Sentezi .....	26
3.3. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	27
3.4. Kesikli Sistemde DNA İzolasyonu.....	28
3.4.1. Materyal.....	28
3.4.2. Kesikli Sistemde Buzağı Genomik DNA'sının İzolasyonu.....	28

3.4.3. Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA' sının İzolasyonu .....	30
3.4.4. Kesikli Sistemde Tam Kandan DNA İzolasyonu .....	31
3.4.4.1. İnsan Tam Kan Örneğinden Lizat Hazırlanması .....	31
3.4.4.2. İnsan Tam Kan Örneğinden DNA İzolasyonu .....	31
3.5. İzole Edilen İnsan Genomik DNA'sının Karakterizasyonu .....	32
3.5.1. Materyal.....	32
3.5.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	32
3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu .....	36
4.2. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Buzağı Genomik DNA'sının İzolasyonu .....	38
4.2.1. Desorpsiyon Tampon Çözeltisinin Belirlenmesi .....	38
4.2.2. Adsorpsiyon Tampon pH'ının DNA İzolasyonuna Etkisi .....	43
4.2.3. DNA Başlangıç Konsantrasyonunun DNA İzolasyonuna Etkisi .....	44
4.2.4. Sorbent Miktarının DNA İzolasyonuna Etkisi .....	47
4.3. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikroküreler ile Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA'sının İzolasyonu .....	50
4.3.1. DNA Başlangıç Konsantrasyonunun DNA İzolasyonuna Etkisi .....	50
4.3.2. Sorbent Miktarının DNA İzolasyonuna Etkisi .....	53
4.4. Monodispers Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Tam Kandan DNA İzolasyonu .....	55
4.4.1. Sorbent Miktarının Tam Kandan DNA İzolasyonuna Etkisi.....	55
4.5. İzole Edilen İnsan Genomik DNA'sının Karakterizasyonu .....	57
5. GENEL SONUÇLAR.....	59
KAYNAKLAR.....	61

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1 Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonunda Kullanılan Başlıca Metodlar .....	6
Çizelge 3.1. PCR Bileşenleri ve Miktarları .....	33
Çizelge 3.2 PCR Döngü Koşulları .....	33
Çizelge 4.1. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Boyutu ve Yüzey Alanı .....	37
Çizelge 4.2. Desorpsiyon Tampon Çözeltileri.....	39
Çizelge 4.3. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Desorpsiyon Tampon Çözeltisi İçin Hazırlanan Konsantrasyonlar .....	41

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1 DNA içeriğindeki azotlu bazların yapısı .....	2
Şekil 2.2 Bir trinükleotidin yapısı.....	3
Şekil 2.3 DNA'nın çift sarmal yapısı .....	3
Şekil 2.4 Sol-jel metodu kullanılarak elde edilen ürünler .....	11
Şekil 2.5 Dispersiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi .....	14
Şekil 2.6 Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi .....	17
Şekil 2.7 PCR cihazı (BİO-RAD T-100 Thermal Cycler).....	20
Şekil 2.8 BİO-RAD Nükleik Asit Elektroferez Cihazı.....	21
Şekil 4.1. (A) ve (B) Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> , (C) ve (D) Manyetik TiO <sub>2</sub> için SEM fotoğrafları Büyütme Oranı: (A) 25000X, (B) 50000X, (C) 18000X, (D) 40000X. ..	36
Şekil 4.2. Monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için yüzey potansiyel ölçümü .....	37
Şekil 4.3. Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının desorplanan DNA miktarına etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.2 de yer almaktadır .....	40
Şekil 4.4. Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının DNA izolasyon ve desorpsiyon verimine etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.2'de yer almaktadır. ....	40
Şekil 4.5. Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının toplam desorplanan DNA miktarına etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.3'de yer almaktadır. ....	42
Şekil 4.6. Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının DNA izolasyon ve desorpsiyon verimine etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.3 de yer almaktadır .....	42

Şekil 4.7. Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda adsorpsiyon tampon pH'nın denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi. ....	43
Şekil 4.8. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.....	44
Şekil 4.9. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin desorplanan DNA miktarına etkisi.....	45
Şekil 4.10. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % desorpsiyon verimine etkisi. ....	46
Şekil 4.11. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % izolasyon verimine etkisi.....	46
Şekil 4.12. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsopsiyonuna (Q) etkisi.....	47
Şekil 4.13. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi. ....	48
Şekil 4.14. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % desorpsiyon verimine etkisi. ....	49
Şekil 4.15. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % izolasyon verimine etkisi.....	49
Şekil 4.16. Monodispers TiO <sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.....	50

Şekil 4.17. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin desoplanan DNA miktarına etkisi.....	51
Şekil 4.18. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % desorpsiyon verimine etkisi. ....	52
Şekil 4.19. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % izolasyon verimine etkisi.....	52
Şekil 4.20. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsorpsiyonuna etkisi (Q) etkisi.....	53
Şekil 4.21. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi .....	54
Şekil 4.22. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % desorpsiyon verimine etkisi .....	54
Şekil 4.23. Monodispers $TiO_2$ mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % izolasyon verimine etkisi. ....	55
Şekil 4.24. Monodispers gözenekli manyetik olmayan $TiO_2$ mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.....	56
Şekil 4.25. Monodispers gözenekli manyetik olmayan $TiO_2$ mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi .....	56
Şekil 4.26. Monodispers gözenekli manyetik olmayan $TiO_2$ mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının verimine etkisi.....	57



Şekil 4.27.  $TiO_2$ 'in farklı formları kullanılarak izole edilen genomik DNA örneklerinin PCR'da GAPDH primer çiftinin kullanımıyla çoğaltılan DNA bölgesinin (280 bp) agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1. DNA Ladder, 2. Manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler ile izole edilen insan genomik DNA, 3. Manyetik  $TiO_2$  mikroküreler ile izole edilen insan genomik DNA, 4. Manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler ile tam kandan izole edilen genomik DNA, 5. Negatif kontrol (distile su) .....58



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

cpm	Dakikadaki çalkalama hızı (circulation per minute)
$C_v$	Boy dağılımı için değişim katsayısı
$D_i$	Partikül çap değeri
$D_n$	Sayica ortalama çap değeri
$N_i$	$D_i$ çap değerine sahip partiküllerin sayısı
$N_T$	Toplam partikül sayısı
Q	Denge DNA adsorpsiyonu (ng DNA/mg sorbent)
rpm	Dakikadaki dönme hızı (rate per minute)
$\eta_i$	DNA izolasyon verimi (%)
$\eta_D$	DNA desorpsiyon verimi (%)

### Kısaltmalar

AIBN	2,2'-Azobisizobütironitril
BET	Brunauer-Emmett-Teller
bp	Base pair (baz çifti)
BPO	Benzoil peroksit
CTAB	Hekzadesiltrimetilamonyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleosidtrifosfat

ds(DNA)	Double Stranded Deoxyribonucleic acid (Çift sarmallı deoksiribonükleik asit)
EB	Etil benzen
EDA	Etilendiamin
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
EtOH	Etanol
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GMA	Glisidil metakrilat
Gu-HCl	Guanidyum Hidroklorür
HCl	Hidroklorik asit
HPMA-Cl	3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat
NaHSO <sub>3</sub>	Sodyum bisülfid
NaOH	Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> OH	Amonyum hidroksit
Poli(HPMA-Cl-co-EDMA)	poli(3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PVA	Poli(vinil alkol)
PVP K-30	poli(vinil pirolidon)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SO <sub>3</sub> Na	Sodyum sülfonat

SSA	Spesifik yüzey alanı (specific surface area (m <sup>2</sup> /g))
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
THF	Tetrahidrofuran
TiCl <sub>4</sub>	Titanyum klorür
TiO <sub>2</sub>	Titanyum dioksit, titania



# 1. GİRİŞ

DNA izolasyonu moleküler biyolojide downstream uygulamaların ilk basamağını oluşturmaktadır. Parmak izi (fingerprint) analizi, DNA-protein etkileşimlerinin incelenmesi, RFLP (Restriction Fragment Length Polymerism), genomik kütüphane hazırlanması, araştırma laboratuvarları ve endüstride PCR analizlerinde kullanılması sebebiyle DNA'nın yüksek saflıkta izolasyonu oldukça önemlidir [1].

DNA izolasyonu için birçok metod bulunmaktadır. DNA izolasyonu için seçilecek metod hassas, tekrarlanabilir, hızlı ve kullanımı kolay olmalıdır. Seçilen yöntemde kullanılan kimyasal maddeler sağlığa zararlı veya örnekte kontaminasyona neden olabilecek özelliklerde olmamalıdır. Bunların yanında en önemlisi izole edilen DNA saf olmalı ve izolasyon sonrasında downstream moleküler uygulamalarda kullanılacak kaliteye sahip olmalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında tam kandan genomik DNA izolasyonu için literatürde çözelti fazlı ve katı fazlı olmak üzere geliştirilen başlıca iki yöntem bulunmaktadır [2]. Bu yöntemlerden katı fazlı DNA izolasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Katı fazlı DNA izolasyon yöntemlerinde sabit katı faz olarak genellikle silika ve silika matrisler, anyon değiştirici reçineler ve manyetik partiküller kullanılmaktadır. Bu katı fazlar sayesinde DNA yüksek saflıkta izole edilebilmektedir.

Bu tez çalışmasında sol-jel metodu kullanılarak monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu partiküllerin tam kandan DNA izolasyonu çalışmalarına ışık tutması amacıyla buzağı ve insan genomik DNA'sının izolasyon verimlerinin incelenmesi ve elde edilen veriler doğrultusunda üretilen partiküllerin tam kandan DNA izolasyonunda kullanılarak literatürde katı fazlarla DNA izolasyonu metoduna alternatif katı faz olarak sunulması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DNA

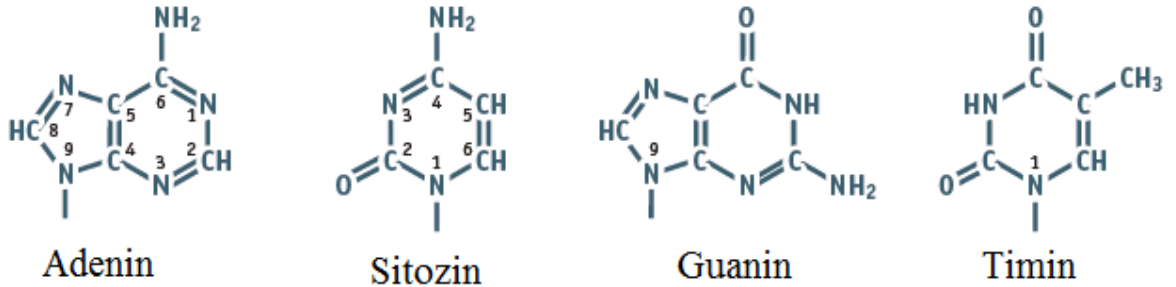
DNA (deoksiribonükleik asit) nükleotit adı verilen monomerlerden oluşan uzun zincirli bir polimerdir.

Nükleotitler azotlu baz, şeker ve fosfat grubundan oluşur. Yapıdaki şeker 5 karbonlu pentozdur. DNA'daki pentoz şeker 2'-deoksiriboz adını alır. Burada 2' numaralı karbon atomuna bağlı hidroksil grubunun (-OH) bir hidrojen (-H) grubuyla yer değiştirmesi sonucu standart riboz yapısı değişir [3].

Pentoz şekeri ile azotlu baz arasında glikozidik bağ ve pentoz ile fosfat arasında fosfodiester bağ bulunur. DNA molekülünün dışını negatif yüklü hidrofilik şeker-fosfat omurgası oluştururken iç kısmını hidrofobik bazlar oluşturur [4].

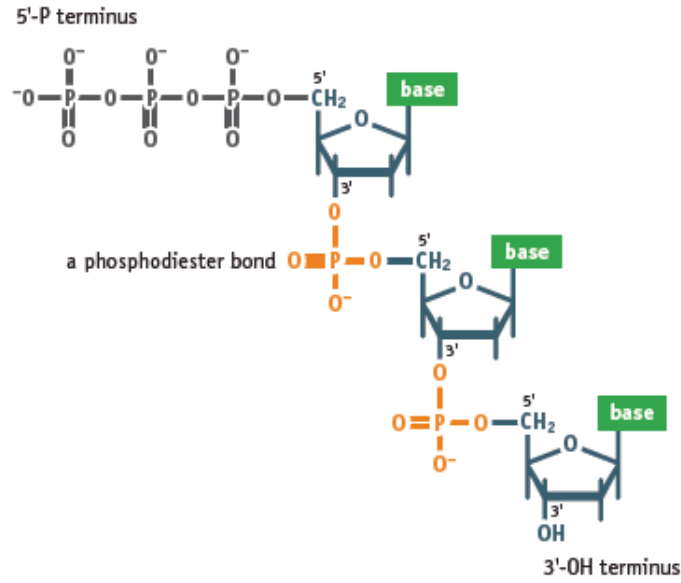
Nükleotitler içerdiği baz türüne göre adlandırılır. Azotlu bazlar tek veya çift halkalı yapıda olup şekerin 1' nolu karbonundan bağlanırlar. DNA iki tür baz içerir. Bunlar pürinler (Adenin (A) ve Guanin (G)) ve pirimidinler (Timin (T) ve Sitozin (S)) olup yapıları Şekil 2.1 de gösterilmiştir. Pürinler tek halkalı iken pirimidinler çift halkalı yapıdadır [3].

DNA sarmalını oluşturan nükleotitler karşılıklı olarak birbirine hidrojen bağı ile bağlanırlar. Bağlanma halkasal yapıdan dolayı pürin karşısına pirimidin gelecek şekilde ve guanin-sitozin ve adenin-timin şeklinde gerçekleşir. Adenin-timin arasında 2 hidrojen bağı, guanin-sitozin arasında 3 hidrojen bağı bulunur [4].

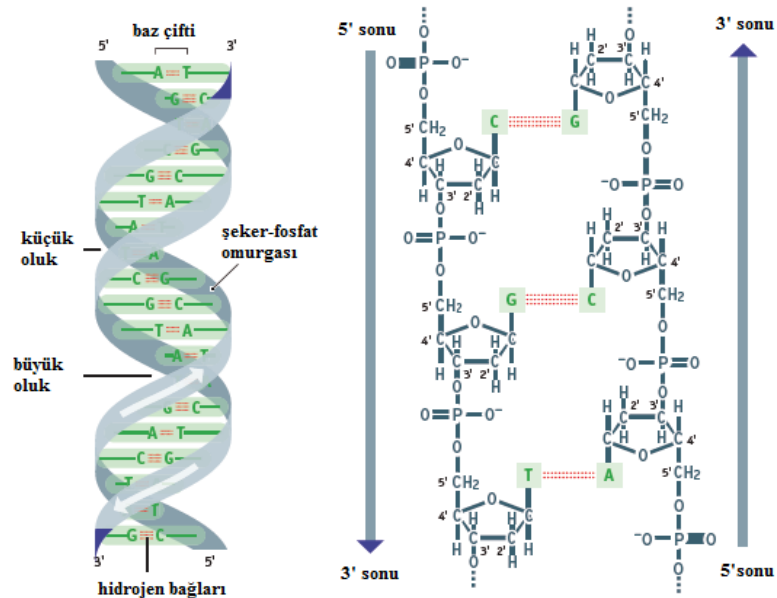


Şekil 2.1 DNA içeriğindeki azotlu bazların yapısı [3].

Nükleotit monomerleri birbirlerine fosfodiester bağ ile bağlanarak polinükleotit yapısını oluştururlar. Şekil 2.2'de 3 nükleotitin bir araya geldiği yapı gösterilmektedir. Burada bir fosfat grubu, bir nükleotidin 3'-hidroksil grubunu bir sonraki nükleotidin 5'-fosfat grubuna bağlar ve böylece polinükleotit zincirinde yönelim meydana gelir. DNA sarmalındaki iki polinükleotit şeker-fosfat omurgası dışarıda bazlar içeride kalacak şekilde konumlanır. Bu konumlama Şekil 2.3'de gösterilmiştir [3].



Şekil 2.2 Bir trinükleotidin yapısı [3].



Şekil 2.3 DNA'nın çift sarmal yapısı [3].

### 2.1.1. DNA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

**Kararlılık:** DNA sarmalı yapısındaki baz çiftleri arasındaki kümeleşme etkileşimleri (dipol-dipol etkileşimler) dolayısıyla bazlar birbiri üzerine yığılma eğilimindedir. Bu da hidrofobik etkiyi artırarak DNA sarmalına kararlı bir yapı kazandırır [5].

**Asitlerin etkisi:** Kuvvetli asitlerde ve yüksek sıcaklıklarda DNA hidrolize olarak kendisini oluşturan yapı birimlerine ayrılır. Nispeten seyreltik asitlerde (pH 3-4) ise en zayıf bağ olan glikozidik bağlar kırılır ve DNA apürinik hale gelir [5].

**Alkali etkisi:** Fizyolojik pH'dan daha yüksek pH'larda DNA yapısında bulunan azotlu bazların formu değişebilir. Enol-keto tautomerisi oluşur ve kaymalar olur. Bu kaymalar bazlar arasındaki (-H) bağlarını etkileyerek DNA'nın denatürasyonuna sebep olur [5].

**Viskozite:** DNA çözeltisinin viskozitesi yüksektir. Ancak DNA üzerine sonikasyon gibi kuvvetler uygulandığı takdirde kırılabilir. Buradaki kırılmada DNA sadece küçük parçalara ayrılmakta olup sarmal yapısını muhafaza etmektedir. Bu kırılmalar fazla olursa viskozitede düşüş meydana gelir [5].

### 2.1.2. DNA'nın Spektroskopik ve Termal Özellikleri

**UV absorpsiyonu:** Nükleik asitlerde UV ışığının absorbansı azotlu bazların yapısına bağlıdır. DNA için maksimum absorbansın olduğu dalga boyu 260 nm'dir. Proteinler için UV absorbansı maksimum 280 nm'dir. DNA'nın miktar ve saflığının belirlenmesinde UV absorpsiyon özelliği kullanılmaktadır [6].

**Saflık:** ds(DNA)'nın saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile belirlenebilmektedir.  $A_{260}/A_{280}$  oranı saf ds(DNA) için 1.8, saf RNA için 2.0, protein için 1.0'den küçüktür. Dolayısıyla elde edilen DNA'nın absorbans oranı 1.8'den büyük çıkıyorsa ortamda RNA safsızlığı, 1.8'den küçük çıkıyorsa protein safsızlığı vardır yorumu yapılabilir. pH'da meydana gelen değişimler  $A_{260}/A_{280}$  oranını değiştirebilir. Asidik çözeltilerde bu oran normal değerden 0.2-0.3 daha düşük iken bazik çözeltilerde 0.2-0.3 fazladır. Ayrıca 230 nm'deki absorbans da diğer safsızlıklar için kullanılır.  $A_{260}/A_{230}$  değeri saf nükleik asitler için 2.0-2.2 aralığındadır [6].



**Termal denatürasyon:** DNA ısıtıldığında sarmal yapı bozulur. Çift iplikli yapı tek iplikli yapıya dönüşür. Bu durumda absorbansta artış meydana gelir. ds(DNA)'da erime ve termal denatürasyon aynı anda olmaktadır. Termal denatürasyon nispeten daha hareketli olan A-T bölgesinde başlar. Erime noktası DNA'nın uzunluğuna ve G+C miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir [5].

## 2.2. İnsan Tam Kanından DNA İzolasyonunda Kullanılan Temel Yöntemler

1869'un sonlarında çalışılmaya başlanan DNA izolasyonu günümüzde önemli ölçüde gelişmiştir. DNA izolasyonu moleküler biyoloji alanındaki downstream uygulamaların çoğunda ilk basamağını oluşturmaktadır. Tam kan örnekleri genomik DNA (gDNA) eldesinde ana kaynaklardan birisidir. Bu tür örneklerden nükleik asit izolasyonunu gerçekleştirmek için birçok protokol bulunmaktadır [2]. Bu metodların bazıları Çizelge 2.1 de verilmiştir.

İzolasyon yöntemlerinin çoğu, benzer temel adımları takip eden organik ve inorganik reaktiflerin ve santrifüj yöntemlerinin kullanımını içerir [2].

Lizat hazırlama basamağı, çoğu DNA izolasyon protokolünde ortak bir adımdır ve genelde yüzey aktif maddeler ve enzimlerin kullanımı yoluyla elde edilir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve Triton™ X-100 hücre zarlarının çözünmesinde yaygın olarak kullanılan yüzey aktif maddelerdir [2].

Hücre yüzeyini veya sitozolik bileşenleri hedeflemek için yüzey aktif maddeler ile enzimler birlikte kullanılır. Proteinaz K glikoproteinleri parçalamak ve RNazları ve DNazları inaktive etmek için yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Üre, guanidinyum tuzları ve kimyasal kaotroplar gibi diğer denatürantlar hücreleri bozmak ve hücrel enzimleri inaktive etmek için kullanılmaktadır [2].

DNA çöktürme işlemi, DNA içeren çözeltilere yüksek konsantrasyonlarda tuz eklenerek gerçekleştirilir. Fosfat omurgasının negatif yükü, tuzlardaki amonyum asetat gibi katyonların karşı direncine neden olur. DNA-tuz karışımındaki nükleik asitlerin çökmesi için etanol veya izopropanol kullanılır. Bazı protokollerde, DNA'dan fazla miktarda tuzu uzaklaştırmak için %70'lik etanol ile yıkama yapılır. Son olarak nükleik asitler, su ya da TE tamponu içinde yeniden süspansiyon haline getirilir [2].

TE tamponu DNA'nın nükleazlar, yetersiz pH, ağır metaller ve serbest radikallerin oksidasyonu ile hasar görmesini önlemesi sayesinde uzun süreli DNA depolamada sıklıkla kullanılır. Tris, 7-8'lik güvenli bir pH sağlar. EDTA, nükleaz aktivitesinde kullanılan iki değerlikli iyonları kenetler ve ağır metallerin oksidatif hasarına karşı DNA'yı korur [2].

**Çizelge 2.1** Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonunda Kullanılan Başlıca Metodlar [2].

DNA izolasyon metodu (ana kategori)	DNA izolasyon metodu (alt kategori)	DNA izolasyon protokol aşamaları			
		Hücre Lizisi	Çekirdek proteinlerin denatürasyonu /hücrel enzimlerin inaktivasyonu	Kirleticilerin giderilmesi	DNA çöktürme
Çözeltiyeye dayalı DNA izolasyon yöntemleri	Tuz ile Çöktürme yöntemi	SDS SDS/proteinaz K Triton X-100	Proteinaz K Çamaşır deterjanı	Potasyum asetat Sodyum asetat Sodyum klorür	Etanol İzopropanol
	Organik çözücüler/kaotroplar yöntemleri	SDS SDS/proteinaz K	Guanidin tiyosiyanat Fenol	Fenol Fenol-kloroform Fenol-kloroform izoamil alkol	Sodyum asetat/etanol Sodyum asetat/izopropanol
Katı faz DNA izolasyon yöntemleri	Glass milk/silika reçine yöntemleri	SDS Triton X-100	Guanidin tiyosiyanat	Glass milk(kaotropik tampon içinde silika) Silika matriks Silisli toprak	Etanol izopropanol
	Anyon değişimi yöntemleri	Isı	Chelex Chelex/proteinaz K	Chelex	Uygulanamaz
	Manyetik partikül yöntemleri	SDS	Uygulanamaz	Sodyum klorür/polietilen glikol	Manyetik partiküller

### **2.2.1. Çözeltiye Dayalı DNA İzolasyon Yöntemleri**

Tuz ile çöktürme ve organik çözücülerin kullanıldığı metod olmak üzere iki çeşittir [2].

#### **2.2.1.1. Tuz ile Çöktürme Yöntemi Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu**

Hazırlanan lizattan yola çıkarak uygulanan tuz ile çöktürme metodunda proteinler ve kirleticiler potasyum asetat ve amonyum asetat gibi yüksek tuz konsantrasyonu varlığında çöktürülür. Çökelti santrifüj kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra DNA alkol varlığında çöktürülerek geri kazanılır. Bu yöntem kullanılarak proteinlerin ve safsızlıkların uzaklaştırılması verimsiz olabilmektedir ve DNA'nın downstream uygulamalarda kullanılmadan önce RNaz işlemi, diyaliz ve/veya tekrarlanan alkol ile çöktürme gibi işlemlerden geçirilmesini gerektirebilmektedir. Bu yöntem kullanılarak elde edilen DNA'nın saflık ve verimi değişkenlik göstermektedir [7].

#### **2.2.1.2. Organik Çözücüler Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu**

Bu yöntemde genellikle lizat hazırlanır ve hücresel artıklar santrifüj yoluyla ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra proteinler proteinaz-K kullanılarak denatüre edilir. Daha sonra fenol veya 1:1 oranında fenol-kloroform karışımı içeren organik çözücüler kullanılarak çöktürülür. Çöken proteinler santrifüj yardımı ile ortamdan uzaklaştırılır. Saflaştırılan DNA ortamdan etanol veya izopronol kullanılarak çökeltme ile geri kazanılır. Na<sup>+</sup> gibi tek değerlikli katyonların varlığında ve -20 °C de ortama eklenen etanol polimerik nükleik asitleri etkili bir şekilde çöktürür. Geriye kısa zincirli ve monomerik nükleik asit bileşenleri kalır. Bu methodda zararlı organik çözücüler kullanılması, zaman alması ve ortamda fenol ve kloroform artığı kalması sebebiyle izole edilen DNA, PCR gibi downstream uygulamalarda kullanılamamaktadır [8].

## 2.2.2. Katı Fazların Kullanıldığı DNA İzolasyon Yöntemleri

Günümüze kadar geliştirilen sıvı/katı DNA izolasyon prosedürleri ile belirli pH ve tuz içeriği koşullarında aşağıdaki prensiplerden herhangi birine göre DNA adsorbe edilir.

- ✓ Bir kaotropik ajan varlığında bir hidrofilik matrise hidrojen bağlanması
- ✓ Sulu ortamda bir anyon değiştirici kullanılarak iyonik değişim
- ✓ Afinite ve boyut ayırma mekanizması [2].

### 2.2.2.1. Silika Partiküller Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu

DNA belirli bir pH'da ve tuz varlığında silika yapıya adsorplanır. Hücrel kirleticiler yıkama basamakları ile ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra DNA düşük tuz içeren bir tampon çözelti yardımı ile desorbe edilir. Protein denatürasyonu ve DNA izolasyonu için kaotropik tuz kullanılmaktadır. Bu metod spin kolonlar ve mikroçiplerde kullanılan maliyet açısından pahalı olmasına rağmen organik izolasyon yöntemine göre daha hızlı ve basit bir yöntemdir [8].

Günel ve arkadaşları 5.1 µm boyutunda monodispers gözenekli silika mikroküreler sentezlemişlerdir. Sentezlenen silika mikroküreleri insan genomik DNA'sının (hgDNA) mikroakış sisteminde izolasyonu için sorbent olarak kullanmışlardır. Çalışmanın tam kan kullanılarak DNA izolasyonunun yapıldığı basamakta 75 µL tam kan, 150 µl 6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu ve %10 Triton-X 100 ile karıştırılmıştır. Ardından 15 µl 20 mg/mL proteinaz K eklenmiştir. Sonuç çözelti 1 dakika vortekslenmiş ve 56 °C de 30 dakika bekletilerek lizat hazırlanmıştır. Hazırlanan lizat adsorpsiyon tampon çözeltisi ile değişik oranlarda karıştırılarak 3 µl/dk akış hızında silika dolgulu mikroizolasyon kolonundan geçirilmiştir. Kolon 5 µl/dk akış hızında 40 dakika 4:1(v/v) oranında etanol/su çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra kolondan 20 dakika süreyle 5 µl/dk akış hızında desorpsiyon tampon çözeltisi geçirilerek DNA izolasyonu sağlanmıştır. Çalışma sonucunda 10 µL tam kan lizatından 14 ng hgDNA izole edilerek %64'lük bir izolasyon verimi elde edilmiştir [9].

Günel ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada 5.1 µm boyutunda monodispers gözenekli silika mikroküreler ve polimer bazlı mikrokürelerin kesikli sistemde buzağı (calf thymus) DNA'sı ile adsorpsiyon-desorpsiyon performansını incelemişlerdir. Silika mikrokürelerin kesikli sistemde polimer bazlı mikrokürelere kıyasla daha iyi DNA izolasyon performansına sahip olduğunu göstermişlerdir [10].

#### **2.2.2.2. Anyon Değişimi Yöntemi Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu**

Anyon değiştirici reçinelerin DNA izolasyonundaki çalışma prensibi reçine üzerindeki pozitif yüklü dietilaminoetil selüloz (DEAE) gruplarının DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası ile etkileşimine dayanır. Anyon değiştirici reçineler geniş por boyutuna sahip hidrofilik bir yüzeyle kaplanmış ve yüksek yük yoğunluğuna sahip silika partiküllerden oluşur. Reçinenin sahip olduğu geniş yüzey alanı DEAE gruplarının yoğun bir şekilde bağlanmasını sağlar. Reçineler geniş bir pH (pH 6-9) ve tuz konsantrasyonu (0.1-1.6 M) aralığında çalışırlar. Bu yüzden nükleik asitin bağlanacağı ve desorbe edileceği tampon çözeltinin pH ve tuz konsantrasyon koşulları önemlidir. DNA, DEAE gruplarına geniş bir tuz konsantrasyon aralığında bağlanır. Protein ve RNA gibi kirlilikler orta dereceli tuz içeren bir tampon çözelti ile yıkama yapılarak uzaklaştırılır. Bağlanan DNA yüksek tuz içeren tampon çözelti ile desorbe edilerek kazanılır [11].

Chelex® 100 genel olarak DNA izolasyonu için kullanılan nükleazlar gibi polivalent metal iyonlarını bağlayan şelatlayıcı iyon değiştirici reçinedir. Chelex® 100 reçine iminodiasetat iyon çiftlerinden oluşan stiren divinilbenzen kopolimeridir [2]. Ortamdaki safsızlıkların DNA'dan uzaklaştırılmasında çok değerlikli metal iyonları içeren Chelex reçineler kullanılır. Çözelti içerisinde bulunan safsızlıklar Chelex reçineye bağlanırken DNA çözeltide kalır. Santrifüj yardımı ile reçine bir pelet haline getirilir ve ortamdaki safsızlıklar uzaklaştırılır [12].

#### **2.2.2.3. Manyetik Partiküller Kullanılarak Yapılan DNA İzolasyonu**

Bu yöntem DNA'nın bağlanabileceği bir antibody veya fonksiyonel grup içeren manyetik katı bir yüzey ile geri dönüşümlü olarak etkileşimine dayanır [8].

Duarte ve arkadaşları, dinamik katı faz izolasyon tekniğini kullanarak manyetik silika ile tam kandan DNA izolasyonu yapmışlardır. Öncelikle 6 µl tam kan, 50 µl proteinaz K (20 mg/mL), pH 7.6 veya pH 6.1 de %1 Triton X-100 içeren 8 M Gu-HCl karıştırarak 56 °C de 10 dakika inkübasyona tabi tutmuştur. Hazırlanan lizatin 2 µl'si izolasyon için kullanılmıştır. Adsorpsiyon tamponu olarak 8 M Gu-HCl (pH 7.6) kullanılmıştır. Adsorpsiyon sonrasında %80'lik izopropil alkol ile yıkama yapıldıktan sonra desorpsiyon buffer olarak 0.1X TE tamponu pH 8.0 kullanılarak DNA desorpsiyonu sağlanmıştır [13].

İdeal DNA izolasyon metodu seçilirken hassasiyet, tutarlılık, hız ve kullanımda kolaylık gibi parametreler ön plana çıkmaktadır. Aynı zamanda kullanıcılar için asgari risk oluşturmalı, ayrıca örneklerin çapraz kontaminasyonunu önlemelidir. Sonunda ve en önemlisi, seçilen DNA izolasyon tekniği, downstream moleküler uygulamalar için kullanılmaya hazır saf DNA örnekleri sunabilmelidir [2].

### **2.3. Titanyum Dioksit**

Titanyum dioksit en iyi beyaz pigment olarak da bilinen çok çeşitli uygulamalarda kullanılan önemli bir endüstriyel materyaldir [14].

TiO<sub>2</sub> genellikle fotokataliz, lityum bataryalar, sensör malzemeleri, boya degregasyonu, kozmetikler ve diğer teknik alanlarda kullanılmaktadır [15-21].

TiO<sub>2</sub> mükemmel bir biyouyumluluk göstermektedir. Yapılan testlerde TiO<sub>2</sub>'in yüksek konsantrasyonlarında (örneğin; 2 mg/mL) bile hayvanlar üzerinde belirgin bir toksisiteye neden olmadığı görülmüştür [22]. Bu özellik TiO<sub>2</sub>'i ilaç salınımında kullanışlı bir malzeme yapmaktadır [23].

Titanyum dioksit, son derece iyi mekanik ve pH (pH 1-14) stabilitesine sahiptir. Bu özellik titanyum dioksiti alkali maddelerin, özellikle biyolojik makromoleküllerin ayrılması için uygun bir malzeme haline getirmektedir [15].

#### **2.3.1. Titanyum Dioksit Sentezi**

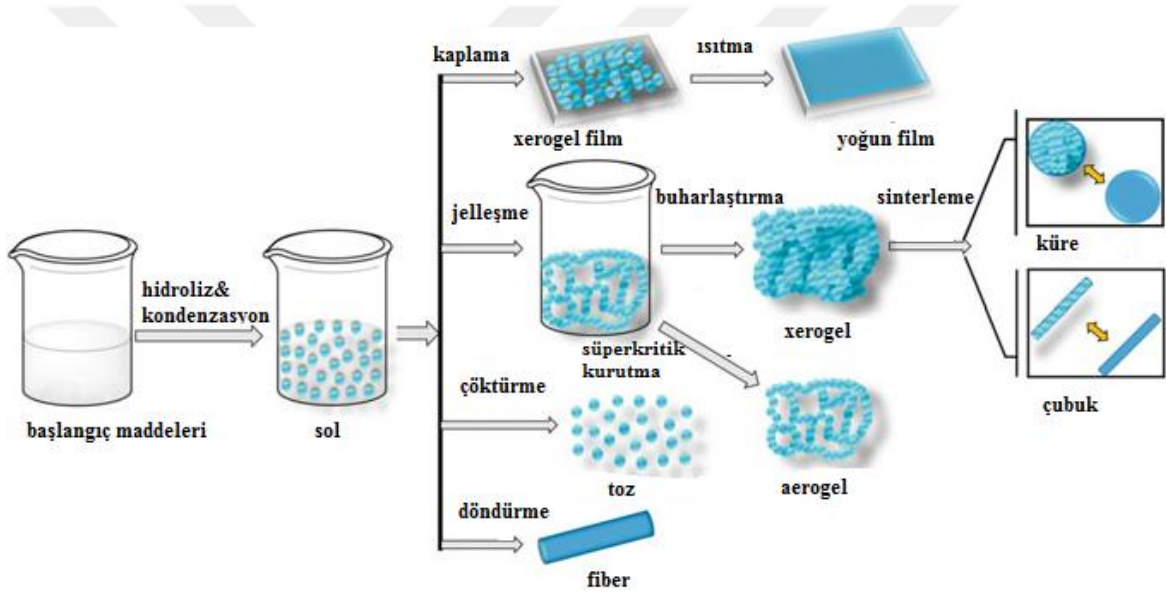
Son yıllarda TiO<sub>2</sub> sentezi için kullanılan metodlar; sol-jel, hidrotermal metod, polimerizasyon-indükleme kolloid agregasyonu (PICA), Sulu olmayan emülsiyonlar

birlikte çöktürme şeklinde sıralanabilir [24-29]. Son üç yöntem çok ayrıntılı süreçler içermesi ve pahalı olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmamaktadır [15].

Sol-jel metodu diğer metodlar ile karşılaştırıldığında avantajlarının daha fazla olması sebebiyle titanyum dioksit sentezinde kullanılan en yaygın methoddur [30].

### 2.3.1.1. Sol-jel metodu

Sol-jel metodunda katı ürün farklı kristalizasyon veya çöktürme yöntemlerinden jelleştirme yoluyla oluşturulur. "Sol" sıvı içerisinde katı partiküllerin dağılması ile oluşan koloidal, stabil bir süspansiyondur. "Jel" ise koloidal katı partiküllerin bir araya gelmesi ile oluşan ağ yapısıdır [30].



**Şekil 2.4** Sol-jel metodu kullanılarak elde edilen ürünler [31].

Sol-jel metodu laboratuvar koşullarında rahatlıkla uygulanabilen bir prosestir. Bu sayede Şekil 2.4 de gösterildiği gibi değişik boyutlarda filmler, fiberler, monolitler ve partiküller elde etmek mümkündür. Sol-jel yönteminin avantaj ve dezavantajları genel olarak şöyle sıralanabilir;

- Bu yöntem ile yüksek poroziteli ve kristalin malzemeler üretilebilir.
- Hidroliz ve kondenzasyon hızı, partikül boyutu, gözenek boyutu ve gözenek yüzey kimyası kontrol edilebilir.

- Oda koşulları deney şartları için uygundur. Yüksek sıcaklıklar gerektirmez. Böylece termal bozunma minimize edilir ve yüksek saflıkta ve miktarda ürün elde edilebilir.
- Zaman alıcı bir prosestir [32].
- Kullanılan öncüller pahalıdır.
- Proses esnasında büzülmeler meydana gelir.
- Katı aglomer oluşum olasılığı yüksektir [31].

Malzeme özelliklerinin geliştirilmesinde morfolojik kontrol önemli bir parametredir. Bu amaçla sol-jel metodun bir türü olan sol-jel kalıplama metodu kullanılmaktadır. Kalıplama genellikle üç aşamadan oluşur. İlk olarak kalıp çeşidi seçilir ve hazırlanır. Daha sonra kalıp ve son ürünün kompoziti oluşturulur. Son olarak kalıp uzaklaştırılarak morfolojik olarak kontrolü sağlanan son ürün elde edilir. Kalıp malzemenin sahip olması gereken özellikler;

- İstenen son ürünün yapısına uygun olmalıdır.
- Kalıp oluşum prosesi boyunca yapısını koruyabilmelidir.
- Son ürün kalıp materyal olmadan kullanılacak ise istenmeyen kalıp materyal son ürünün yapısını bozmadan uzaklaştırılabilmelidir.

Polimerik materyaller bu uygulama için idealdir. Polimerin şartlarına bağlı olarak çok çeşitli morfolojik yapılar elde edilebilmektedir. Polimer çözücü kullanılarak, plazma uygulaması veya sıcaklığa maruz bırakılarak uzaklaştırılabilmektedir.

Sol-jel prosesi öncü materyalin hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonlarını içermektedir. Bu reaksiyonlar sırasında bir metal oksit polimer ve düşük moleküler ağırlıktaki (su ve alkol) türler oluşur [33].

### **2.3.1.2. Sol-Jel Yöntemi ile TiO<sub>2</sub> Sentezi**

Titanyum dioksit sentezlemek için kullanılan titanyum metal öncülünün türüne göre öncül olarak metal alkoksit kullanıldığı alkol bazlı proses ve öncül olarak inorganik metal tuzların kullanıldığı su bazlı proses olmak üzere iki tür sol-jel prosesi vardır [31].



### **2.3.1.2.1. Alkol Bazlı Sol-Jel Yöntemi ile TiO<sub>2</sub> Sentezi**

Bu sentez yönteminde kullanılan başlıca metal alkoksit öncülleri Ti(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>, Ti(OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>4</sub> and Ti(OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub> tür. Bu alkoksitler metal-oksijen bağından oluşur. Ti ile O arasındaki elektronegatiflik farkı fazla olduğu için bağlar oldukça polar ve reaktiftir. Ortama su ilave edilmesiyle eş zamanlı hidroliz ve kodenzasyon reaksiyonları gerçekleşerek jel oluşturur [31].

Meyer ve arkadaşları, poli (S-co-DVB) mikroküreler kalıp, titanyum (IV) izopropoksit (TIP) öncül olarak kullanarak sol-jel metodu ile gözenekli titanyum dioksit mikroküreler sentezlemişlerdir [34].

Dwivedi ve arkadaşları, kalsiyum aljinatı kalıp, titanyum(IV) izopropoksit (TIP) titanyum öncülü olarak kullanarak mezopor titanyum küreler sentezlemişlerdir [35].

### **2.3.1.2.2. Su Bazlı Sol-Jel Yöntemi ile TiO<sub>2</sub> Sentezi**

Bu sentez yönteminde kullanılan başlıca metal tuzları TiOSO<sub>4</sub> ve TiCl<sub>4</sub> dür. Temelde hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonlarına dayanır. Çökelme ve peptizasyon işlemlerinden oluşur. Çökelme inorganik metal tuzun hidrolizi ile olur. Ortama baz eklenmesiyle inorganik metal tuzu jelleşerek çöker. Bunu takiben fazla elektrolitin ortamdaki uzaklaştırılması için yıkama yapılır. Peptizasyon basamağında koagülasyonu önleyici ajan eklenerek kolloid partiküller dağıtılır [31].

Zhu ve arkadaşları, TiCl<sub>4</sub>-etanol karışımını öncül olarak kullanarak sol-jel metodu ile anataz yapıda nano boyutta toz TiO<sub>2</sub> sentezlemişlerdir [36].

Shchukin ve Caruso sol-jel kalıplama yöntemini kullanarak TiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlemişlerdir. Bu çalışmada gözenekli poli (S-co-DVB) mikroküreler kalıp, TiCl<sub>4</sub> öncül olarak kullanılmıştır. Kalıp materyalinin uzaklaştırılması ile gözenekli ve homojen metal oksit küreler elde edilmiştir [37].

## **2.4. Dispersiyon Polimerizasyonu**

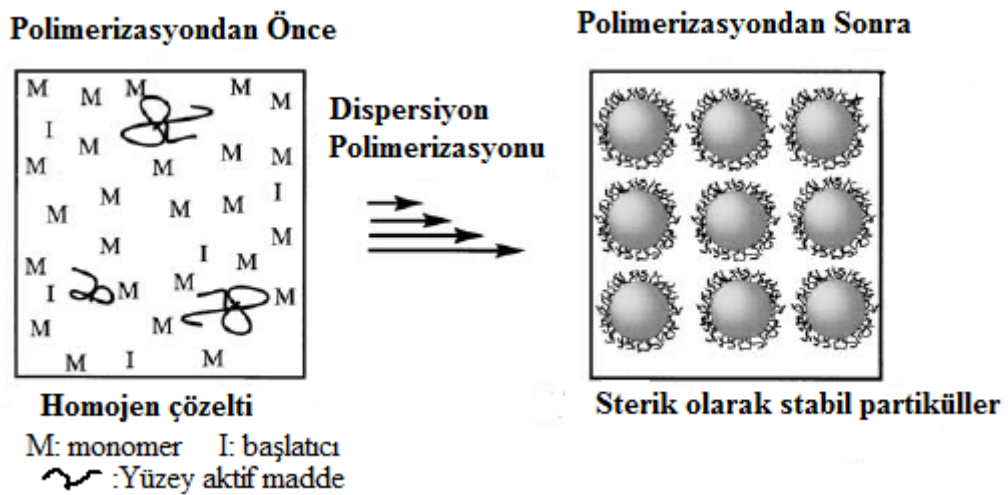
Son yıllarda biyosensör, gözenekli materyallerin eldesi için kalıp olarak ve kolloidal kristaller gibi uygulama alanlarında kullanılmak üzere araştırmacılar polimerik lateks partiküllerin (beads) sentez yöntemleri üzerine çalışmaktadırlar [38].

Latex kolloid üretim yöntemleri emülsiyon, süspansiyon veya yığın polimerizasyon gibi çeşitli polimerizasyon metodları kullanılarak geliştirilmektedir. Lateks partiküllerin boyut ve boyut dağılımındaki kontrolün sağlanması için uygun sentez koşullarının oluşturulması önemlidir. Bu amaçla çok basamaklı polimerizasyon olarak bilinen çıkış lateks partiküllerinden ardışık polimerizasyonun yapılması gibi özel teknikler geliştirilmiştir. Ayrıca polimerik partiküllerin morfolojisi, çıkış lateksinin şişirilmesi ve polimerizasyonu ile kontrol edilmektedir [38].

Monodispers partiküller, enstrümantal kalibrasyon standartları, filtrelerin verim ve gözenek boyutunun belirlenmesi için kullanılan standartlar, kromatografik ayırma için kolon dolgu materyali, biyokimyasallar için destek materyali gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bu uygulamalarda partikül boyutu ve dağılımı, partikül morfolojisi ve yüzey karakteristiği önemli parametrelerdir [39].

Mikron veya mikrometre altı boyutlardaki belli bir aralıkta boyut dağılımına sahip polimer partikül sentezi bu partiküllerin kaplama, kromatografi, protein sentezi, biyomedikal analizler ve medikal teşhisler gibi çok çeşitli alanlarda kullanılması sebebiyle önemlidir [40-42].

Mikron boyutlu partiküllerin hazırlanmasında dispersiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen son ürün boyut ve şekil bakımından monodispers olup verim yüksektir [39,43,44]. Dispersiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi Şekil 2.5 da verilmiştir.



**Şekil 2.5** Dispersiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi [43].

Dispersiyon polimerizasyonu bir radikal polimerizasyon reaksiyonu olarak tanımlanabilir. Monomer çözünebilirken elde edilen polimer çözünmemektedir. Dispersiyon polimerizasyon sisteminin başlangıç reaksiyon karışımı tek fazlı bir çözeltidir. Polimer oluştuğunda çökmektedir. Bu reaksiyon çekirdek oluşumu (nucleation) ve büyüme olmak üzere iki temel basamaktan oluşmaktadır. Çekirdek oluşum (nucleation) basamağında stabilizör, monomer, çözücü, başlatıcı ve diğer bileşenlerden (co-monomer gibi) oluşan karışım belli bir sıcaklıktadır. Başlatıcı bozunur ve oluşan serbest radikaller monomerler ile etkileşerek oligomer radikalleri oluşturur. Oligomerler yeterli uzunluğa ulaştığında çökerek stabilizör tarafından kontrol edilen çekirdekleri oluştururlar. İkinci aşamada monomer ve başlatıcı, partiküller içine absorbe edilerek partiküller şişirilir. Her bir partikül küçük birer reaktör gibi işlev yapar. Tüm monomerler harcandıktan sonra polimerizasyon biter. Çekirdek oluşum aşaması partiküllerin boyut dağılımını ve sayısını belirler. Şişirme basamağında ise reaksiyon koşulları değişmediği müddetçe yeni bir partikül oluşmaz ve sadece şişer. Genel olarak dispersiyon polimerizasyonu, tüm reaktiflerin karıştırıldığı ve ısıtıldığı basit bir sentez protokolünden oluşan tek aşamalı bir reaksiyondur ve genellikle dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip partiküller elde edilir. Dispersiyon polimerizasyonunda monomer, co-monomer, stabilizör, çözücü ve başlatıcı gibi reaktiflerin türü ve konsantrasyonu elde edilecek partiküllerin morfolojisini, boyutunu ve boyut dağılımını etkileyen en önemli parametrelerdendir [40].

Literatürde yapılan bazı çalışmalar şu şekilde özetlenebilir; Lok ve arkadaşları sterik stabilizör olarak iyonik olmayan selüloz türevlerini (hidroksi propil selüloz (HPC), etil selüloz, selüloz propionat) kullanarak değişik çözücü ortamlarında (dimetoksietan (DME), tetrahidrofuran (THF), metilcellosolve, etanol, t-butanol, izopropanol, etanol, metanol, su) stiren monomerinin dispersiyon polimerizasyonu ile farklı boyutlarda polistiren polimerik partiküller elde etmişlerdir [39].

Cho ve arkadaşları alkol çözücü ortamında dispersiyon polimerizasyonu yöntemini kullanarak 200 nm - 1 µm boyut aralığında monodispers polistiren nanopartiküller sentezlenmişlerdir. Partikül boyutunu reaksiyon sıcaklığı ve reaktant miktarlarını ayarlayarak kontrol etmişlerdir [38].

Horak ve Shapoval farklı çözücü ortamlarında (N,N-dimetilformamid (DMF)-metanol karışımı, saf metanol, etanol, propan-1-ol, butan-1-ol veya bu alkollerin su

ile karışımları) farklı stabilizörler (selüloz asetat bütrat (CAB), hidrokispropil selüloz (HPC), polivinilprolidon (PVP)) kullanarak ve kullanılan reaktantların konsantrasyonlarına ve türüne bağlı olarak sentezlenen poli(GMA) partiküllerinin boyut ve boyut dağılımı üzerine çalışmışlardır. Değişen reaksiyon karışımına bağlı olarak 0.5-4 µm aralığında polimer partiküller sentezlemişlerdir [45].

## **2.5. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu**

Fonksiyonel monodispers partiküllerin sentezlenmesinde genel olarak çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Fonksiyonel grupların hidrofobik polimer partikül yapılarına katılması için genellikle hidrofilik akrilat veya metakrilat bazlı monomerler (AAc/MAAc, akrilamid (AAm), HEMA, AEM ve DMAEM vb.) tercih edilmektedir. Bu hidrofilik monomerlerin direk dispersiyon polimerizasyonundaki hidrofobik monomerler içine atılması durumunda stabil olmayan lateksler oluşur. Bu yüzden fonksiyonel polimerik partikül sentezlenmesinde kullanılan çıkış lateksi hidrofobik monomerlerin polar çözücü içinde (su veya alkol-su çözeltisi) klasik emülsiyon veya dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilir [46]. Elde edilen çıkış lateksi organik ajan (etilbenzen vb) ile şişirilir. Sonraki aşamada şişirilen çıkış lateksi fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıdan oluşan organik karışım ile tekrar şişirilir. Son aşamada şişirilen çıkış lateksinin içerisindeki monomerin polimerizasyonu ile gözenekli ve monodispers polimerik partiküller oluşur [30]. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu aşamaları ile Şekil 2.6 de gösterilmiştir.



**Şekil 2.6** Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi [47]

Çamlı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanan polistiren (PS) çıkış lateksi çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak önce düşük molekül ağırlığına sahip bir organik bir ajanla şişirilmiştir. Daha sonra stiren-divinilbenzen (S-DVB) ve farklı akrilik komonomerler (metil metakrilat (MMA), bütül metakrilat (BMA), epoksi propil metakrilat (EPMA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), ve metakrilik asit (MAA)) içeren monomer faz ile şişirilmiştir. Polimerleşme basamağının da tamamlanması ile 6.2 µm boyutundaki PS çıkış lateksinden sentez sonunda 10 µm boyutunda makrogözenekli partiküller elde edilmiştir [47].

Kip ve arkadaşları bir başka çalışmada dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen 2.1 µm boyutundaki poli(GMA) polimer partikülleri çıkış lateksi olarak kullanmış ve çok basamaklı mikrosüspansiyon metodu ile çıkış lateksine iki aşamalı şişirme ve polimerizasyon protokolü uygulanarak 4 - 7 µm boyutunda monodispers gözenekli poli (HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller elde edilmiştir [48].

## 2.6. Titanyum Dioksit ile DNA İzolasyonu

Titanyum dioksitin moleküler tanımlama fonksiyonunun belirlenmesinde TiO<sub>2</sub> ile biyomoleküller arasındaki arayüzey etkileşimlerinin anlaşılması önemlidir. Bu sebeple DNA bağlanması önemli bir konudur [14].

Bu konuda yapılan bazı çalışmalar şu şekilde özetlenebilir. Zhang ve arkadaşları floresan işaretli DNA oligonükleotitlerin TiO<sub>2</sub> nanopartiküller üzerindeki adsorpsiyonu kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan çalışmada farklı tampon çözeltilerin DNA adsorpsiyon ve desorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Bazıların bir miktar katkısı olsada DNA adsorpsiyonu temel olarak fosfat üzerinden gerçekleştiğini görmüşlerdir. Çalışmada DNA adsorpsiyonu tuz eklenerek ya da pH düşürülerek artırılabilirliği savunulmuştur [14].

Levina ve arkadaşları DNA fragmanları kovalent yolla polilisin bağlayıcısına bağlamışlardır. Bu yapı pozitif yüklüdür. Daha sonra bu yapıyı elektrostatik kuvvetler sayesinde negatif yüklü TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri üzerine immobilize etmişlerdir. Elde edilen TiO<sub>2</sub>•PL-DNA nanokompozitleri enfekte olmuş MDCK hücrelerinde insan influenza A (H3N2) virüs replikasyonunun inhibisyonu için kullanmışlardır. Nanokompozitler düşük toksisite ve yüksek antiviral aktivite göstermiştir. TiO<sub>2</sub>•PL-DNA nanokompozitlerin influenza A virüsü üzerindeki yüksek inhibisyonu bu kompozitlerin antisens ilaç olarak kullanılabilir potansiyelini göstermiştir. Hücrelerdeki nükleik asitler üzerindeki spesifik etki için önerilen yüksek performanslı metod sadece viral değil diğer nükleik asit bazlı hastalıkların tedavisinde de DNA ile hücre içi nükleik asit hedeflerinin etkili ve seçici etkileşiminin gerektiği durumlarda kullanılabilirliği önerilmiştir [49].

Zhu ve arkadaşları buzağı (calf thymus) DNA'sının TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri ile adsorpsiyonunu incelemişlerdir. Yapılan çalışmada DNA bağlanma oranının konsantrasyon ve süreye bağlı olduğu, bağlanma mekanizmasını ise DNA üzerindeki fosfat grupları ile ilgili olduğu sonucuna varmışlardır [50].

Suzuki ve arkadaşları salmon testis DNA'yı TiO<sub>2</sub> partikülleri üzerine sonikasyon kullanarak adsorplamışlardır. Bu partikülleri DNA'nın çeşitli kimyasallarla olan etkileşim özelliğini kullanarak kimyasal kirliliklerin uzaklaştırılmasında kullanmışlardır. DNA'nın TiO<sub>2</sub> partikülleri üzerine çok iyi şekilde adsorplandığı (400 µg DNA/20 mgTiO<sub>2</sub>) hatta 56 °C de bile desorbe olmadığı görülmüştür.

Desorpsiyon ancak 98 °C'de ve pH 14.0'deki çözelti içinde gerçekleştirilebilmiştir. DNA'nın TiO<sub>2</sub> partikülleri üzerine bağlanmasında elektriksel adsorpsiyon, karşı iyon paylaşımı veya fosfat gruplarının etkisi olabileceğini düşünmüşlerdir [51].

Tayoka ve arkadaşları nano boyutlu (60-500 nm) TiO<sub>2</sub> partiküllerinin çöktürülerek uzaklaştırılmasında DNA (sodium salt) kullanmıştır. Bu çalışmada TiO<sub>2</sub> ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşim sayesinde DNA'nın TiO<sub>2</sub> üzerine adsorbe olduğu düşünülmüştür. Çalışmada 20 mg TiO<sub>2</sub> üzerine maksimum 100 ng DNA bağlanmıştır [52].

Amano ve arkadaşları DNA-TiO<sub>2</sub> kompleksi kullanılarak uzaklaştırılabilecek kimyasal kirlilik miktarını TiO<sub>2</sub> üzerine adsorplanan DNA miktarına bağlı olduğunu bulmuşlar ve adsorplanan DNA miktarını artırmak için kullanılan tampon pH değerini 2.0'ye düşürmüşlerdir. Yapılan çalışmada pH 2.0 tamponunda pH 4-10 değerlerinde adsorplanan miktarın 4 katı kadar DNA TiO<sub>2</sub> üzerine adsorplanmıştır. Bu durumu asidik ortamda TiO<sub>2</sub> nin yüzeyindeki negatif potansiyelin azalmasıyla elektrostatik itmenin bastırılması ve bunun yanı sıra TiO<sub>2</sub> üzerindeki hidroksil grupları ile DNA arasındaki etkileşim ile açıklamışlardır [53].

## 2.7. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Ekstrakte edilen DNA'nın bütünlüğünü koruyup korumadığını belirleyebilmek amacıyla ekstrakte edilen DNA çoğaltılır ve görüntülenir. Bunun için PCR ve Agaroz Jel Elektforezi yapılır.

PCR, hedef DNA sekansının uygun primerler çifti, termokararlı DNA polimeraz, tampon, MgCl<sub>2</sub> ve dNTP yardımıyla çoğaltılması işlemidir. Şekil 2.7'deki PCR cihazı ile yapılmaktadır. 3 temel aşamadan oluşur;

**Denatürasyon:** Çift iplikli sarmal DNA (çoğaltılmak istenen) 90-95 °C de tekli ipliklere ayrılır.

**Bağlanma:** Primerler 45-55 °C de DNA'nın her bir iplikçığının 3' uçlarına bağlanır.

**Uzama:** Mg<sup>+2</sup> yardımıyla aktive edilen DNA polimeraz enzimi dNTP leri kullanarak 70-75 °C de polimerizasyon işlemi ile 5' → 3' yönünde hedef DNA bölgesi kopyalanır.

PCR da kullanılan en yaygın termokararlı DNA polimeraz Taq DNA polimerazdır. 95 °C ye kadar dayanır. *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilir. 70-75 °C de 5'→3' yönünde polimerizasyon aktivitesine sahiptir [4, 5].

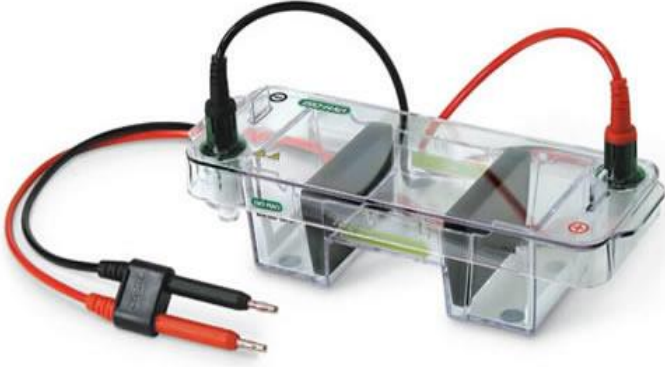


**Şekil 2.7** PCR cihazı (BİO-RAD T-100 Thermal Cycler) [54].

## 2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın görüntülenmesi ve izolasyonunda kullanılır. Kullanılan agar jeli Agar, Gelidium, Gracillaria gibi deniz yosunu türlerinden elde edilir. İşlemden önce DNA örnekleri tarak dişlileri ile oluşturulan yuvalara koyulur. Molekül büyüklüğü bilinen bir marker DNA referans olarak bir yuvaya yerleştirilir. Güç kaynağından Şekil 2.8'de gösterilen elektroforez cihazına uygun bir akım verilir. DNA içerdiği fosfat grubu dolayısıyla pH 5-7 arasındadır ve negatif yüklüdür. Verilen akımın etkisi ile DNA molekülleri anoda doğru hareket eder. İşlem sırasında kullanılan etidyum bromür DNA'ya UV ışınlarında floresans özelliği kazandırarak DNA'nın jel içerisinde görülmesini sağlar. İşlem bittikten sonra jel UV ışığı kullanılarak aydınlatılır. 667 (3000 ASA) film ile poloroid kamera kullanılarak DNA bantları fotoğraflanır. Molekül büyüklüğü bilinen marker DNA sayesinde bilinmeyen DNA örneğinin büyüklüğü belirlenir [4].





**Şekil 2.8** BIO-RAD Nükleik Asit Elektroforez Cihazı [55].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmanın ilk basamağında sabit faz olarak kullanılan monodispers-gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlenmiştir. Bu amaçla öncelikle kalıp olarak kullanılacak olan manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için –SO<sub>3</sub>Na ile türevlendirilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve manyetik TiO<sub>2</sub> mikroküreler için manyetik poli(HPMA-Cl-co-EDMA) sentezlenmiştir. Daha sonra öncül olarak TiCl<sub>4</sub> kullanılarak sol-jel kalıplama metodu ile manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin karakterizasyonu için ortalama boy ve boy dağılımı ile yüzey morfolojisinin belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscope) ve özgül yüzey alanının belirlenmesi amacıyla BET (Brunauer-Emmett-Teller) Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı kullanılmıştır. İkinci aşamada sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin DNA izolasyon veriminin belirlenmesi amacıyla buzağı genomik DNA'sı kullanılarak desorpsiyon tampon türünün, adsorpsiyon tampon pH'ının, başlangıç DNA derişiminin ve sorbent miktarının DNA izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Daha sonra buzağı (calf thymus) genomik DNA'sı ile belirlenen adsorpsiyon ve desorpsiyon koşullarında insan genomik DNA'sının izolasyonu için DNA derişimi ve sorbent miktarının etkisi incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında saf DNA kullanılarak yapılan izolasyonlarda belirlenen şartlar uygulanarak tam kandan DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'nın bütünlük ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla PCR ve Agaroz Jel Elektroforezi yapılmıştır.

#### 3.1. Kalıp Materyali Olarak Manyetik ve Manyetik Olmayan Monodispers Gözenekli poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Sentezi

##### 3.1.1. Materyal

Monodispers gözenekli poli(3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-co-etilen glikol dimetakrilat) [poli(HPMA-Cl-co-EDMA)] mikrokürelerin sentezi için kullanılan monomerler, glisidil metakrilat (GMA) ile 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl), çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen dimetakrilat (EDMA) ve

gözenek yapıcı etil benzen (EB) Aldrich, ABD firmasından temin edilmiştir. Başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO), stabilizör olarak kullanılan polivinil alkol (PVA, % 87-89 hidrolize edilmiş, Mw= 85,000-146,000 Da) ve polivinilprolidon (PVP K-30, Sigma, Mw= 40,000 Da), yüzey aktif madde olarak kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) Aldrich firmasından temin edilmiştir. Başlatıcı olarak kullanılan BPO kullanılmadan önce vakum altında 30 °C de kurutulmuştur. Across Organics, ABD firmasından temin edilen başlatıcı olarak kullanılan 2,2-azobisisobütironitril (AIBN) kullanılmadan önce metanol ile kristalize edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan etanol (EtOH) ve tetrahidrofuran (THF) Merck Darmstadt, Germany firmasından temin edilmiştir. Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> sentezi için kullanılacak poli (HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerini türevlendirmek için kullanılan sodyum bisülfat (NaHSO<sub>3</sub>) ve manyetik TiO<sub>2</sub> sentezi için gerekli olan poli (HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerini türevlendirmek için kullanılan etilen diamin (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) (EDA) Sigma, ABD firmasından temin edilmiştir. Demir tuzu olarak kullanılan FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ve FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O Sigma, ABD firmasından temin edilmiştir. Demir tuzlarının indirgenmesi için kullanılan amonyum hidroksit çözeltisi (NH<sub>4</sub>OH, % 26 w/w) Sigma, ABD firmasından alınmıştır. Hidroklorik asit (HCl, % 37 w/w) Sigma, ABD firmasından temin edilmiştir. Sentezlerde distile su (Direct-Q 3 UV (Type 1), Millipore, ABD) kullanılmıştır.

### **3.1.2. Dispersiyon Polimerizasyonu ile Çıkış Lateksi Poli(GMA) Sentezi**

Cam Pyrex reaktör içerisinde 30 mL absolute etanol (EtOH) ile 0.45 g PVP K-30 sonikasyon yapılarak çözülmüştür. Daha sonra ortama 3 mL GMA ve 0.24 g AIBN eklenmiştir. Tam çözünmenin sağlanması için ultrasonik su banyosunda (ISOLAB) soniklenmiştir. Reaktör sıcaklık kontrollü su banyosunda (NÜVE ST 402) 120 cpm çalkalama hızında 70 °C de 24 saat karıştırılmıştır. Polimerizasyon bitince su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Oda koşullarına ulaşan reaktör içerisindeki polimer poli(GMA) 2000 rpm de 3 dakika santrifüjlenerek sıvı faz atılmıştır. Geriye kalan polimer lateks sırasıyla 2 kez etanol, 2 kez saf su ile 2000 rpm de 3 dakika santrifüj-dekantasyon ile yıkanmıştır. Yıkanan polimer partiküller saf su içerisinde dağıtılmış ve gravimetrik analiz yapılarak polimer partikül miktarı bulunmuştur [30].

### 3.1.3. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu ile Monodispers Gözenekli Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Sentezi

Bu sentez 3 basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta daha önce sentezlenmiş olan poli(GMA) lateksi organik bir seyreltici (EB) ile şişirilmiştir. Bunun için önce 50 mL saf suda 0.125 g SDS ultrasonik su banyosunda soniklenerek çözülmüştür. Daha sonra üzerine seyreltici olarak 2.5 mL EB eklenmiştir. EB' nin mikron boyutlu partiküller içine dispersiyonunu sağlamak için 8 dakika sonikatörde (Bandelin Sonopuls) soniklenmiştir. Daha sonra üzerine 0.3 g poli(GMA) lateksi eklenerek 4 dakika daha soniklenmiştir. Hazırlanan çözelti 24 saat boyunca 300 rpm karışma hızında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu basamakta ayrıca üçüncü basamakta kullanılacak olan PVA çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 10 mL saf suya 0.8 g PVA eklenerek manyetik karıştırıcıda üçüncü basamakta kullanılmak üzere 300 rpm karışma hızında karışmaya bırakılmıştır. İkinci basamakta 50 mL saf suda 0.125 g SDS çözülmüştür. Ayrı bir şişede 3.5 mL HPMA-Cl, 1.5 mL EDMA ve 0.3 g BPO ultrasonik su banyosunda soniklenerek monomer faz hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer faz SDS çözeltisine eklenerek 12 dakika sonikatörde (Bandelin Sonopuls) soniklenmiştir. Hazırlanan emülsiyon birinci basamakta şişirilen poli(GMA) çıkış lateksine eklenmiştir. Sonuç dispersiyon monomer fazın lateks tarafından adsorpsiyonunun tamamlanması için 24 saat 300 rpm karışma hızında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Son olarak üçüncü basamakta ise ilk basamakta hazırlanan PVA çözeltisi ikinci basamakta hazırlanan sonuç dispersiyona eklenerek sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda 80 °C de 120 cpm karışma hızında 24 saat polimerizasyon gerçekleştirilmiştir [30].

Polimerizasyon bitince elde edilen monodispers gözenekli poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikrokürelerin santrifüj kullanılarak sıvı kısmı atılmıştır. Toplanan partiküller sırasıyla 2 kez EtOH, 2 kez THF, 2 kez EtOH ve 2 kez saf su ile yıkanmıştır. Santrifüj yardımı ile farklı rpm değerlerinde belirli süreler ile ayırım yapılarak istenmeyen boyutlardaki partiküller uzaklaştırılmıştır. Böylece monodispers partiküller elde edilmiştir. Yıkanan ve partikül ayırımı yapılan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri distile su kullanılarak dağıtılmış ve gravimetrik analiz yapılarak elde edilen partikül miktarı tayin edilmiştir [30].

### **3.1.4. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerinin Sodyum Bisüfit ile Türevlendirilmesi**

Sentezlenen monodispers gözenekli poli (HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreleri sodyum bisüfit ile etkileştirilerek sulu ortamda aktif olan -Cl uçları yerine -SO<sub>3</sub>Na takılmıştır. 1.5 g poli (HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküre cam pyrex reaktörde 20 mL NaHSO<sub>3</sub> (%5 w/v) ile sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda 120 cpm karışma hızında 80 °C de 24 saat etkileştirilmiştir. Türevlendirme sonrası -SO<sub>3</sub>Na bağlı poli (HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler 2000 rpm de 3 dakika santrifüjlenerek distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan mikroküreler yine distile su içinde dağıtılmıştır [30].

### **3.1.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerinin Etilen Diamin ile Türevlendirilmesi**

Demir iyonlarının partiküller üzerine bağlanması için poli(HPMA-Cl-co-EDMA) etilen diamin ile türevlendirilmiştir. 2 g poli (HPMA-Cl-co-EDMA) 12.5 mL EDA çözeltisi (%60 v/v) ile cam pyrex reaktörde sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda 80 °C de 120 cpm de 24 saat etkileştirilmiştir. Türevlendirme sonrası amin bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreleri distile su ile 5000 rpm de 3 dakika yıkanmıştır. Son olarak EDA ile türevlendirilen partiküller distile su içerisinde dağıtılarak gravimetrisi alınmıştır [30].

### **3.1.6. Amin Bağlı Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Mikrokürelerin Manyetikleştirilmesi**

Manyetikleştirme işlemi demir tuzları kullanılarak yapılmıştır. Daha önceden amin bağlanmış olan 0.7 g poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreler 100 mL saf su içerisine eklenerek su banyosunda N<sub>2</sub> gazı altında soğutulmuştur. FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (3 mmol, 0.8 g) ve FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (2.7 mmol, 0.536 g) 20 mL su içerisinde çözülerek demir iyonları çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra demir iyonları çözeltisi amin bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) çözeltisi üzerine eklenerek açık kahverengi bir karışım elde edilmiştir. Karışım 85 °C deki yağ banyosuna koyularak üzerine 25 mL NH<sub>4</sub>OH eklenmiştir. Karışımın rengi siyaha dönmüştür. Karışım 85 °C de 1 saat süresince karıştırılmıştır ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Soğuyan çözültideki manyetik partiküller mıknatıs yardımı ile tutularak sıvı fazı atılmıştır. Elde edilen manyetik mikroküreler sırasıyla 2 kez su ve 2 kez 0.1 M HCl ile yıkanmıştır. Daha sonra sıvı faz berraklaşana kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan partiküller 70 °C deki etüvde kurutulmuştur [30].

### **3.2. Sol-Jel Kalıplama Metodu ile Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi**

#### **3.2.1. Materyal**

Titanyum klorür (TiCl<sub>4</sub>), amonyum hidroksit çözültisi (NH<sub>4</sub>OH, %26 w/w) ve hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) Sigma, ABD firmasından temin edilmiştir. Sentezlerde distile su (Direct-Q 3 UV (Type 1), Millipore, ABD) kullanılmıştır.

#### **3.2.2. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan Titanyum Mikrokürelerin Sentezi**

Kalıp olarak -SO<sub>3</sub>Na bağlı olan ve manyetikleştirilmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreleri kullanılmıştır. İlk olarak 0.4 g partikül 60 mL, 0.1 M TiCl<sub>4</sub> çözültisi (TiO<sub>2</sub>.nH<sub>2</sub>O) içerisinde dağıtılmıştır ve 300 rpm de oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Adsorplanmayan TiO<sub>2</sub>.nH<sub>2</sub>O nanopartikülleri santrifüj-dekantasyon yöntemi ile distile su kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. İkinci aşamada partiküller 60 mL, 1 M amonyum hidroksit çözültisi ve 0.3 g CTAB ile manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 300 rpm de 6 saat etkileştirilmiştir. Böylece TiO<sub>2</sub>.nH<sub>2</sub>O nanopartiküllerin manyetik ve manyetik olmayan poli(HPMA-Cl-co-EDMA)'nın porlarına girerek manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit-polimer kompozit mikroküreler oluşturması sağlanmıştır. Ortamdaki fazla klorür iyonlarını uzaklaştırmak için santrifüj-dekantasyon yöntemi ile birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Tüm porların dolduğundan emin olmak için bu işlemler sırasıyla iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak partiküller distile su yardımı ile kroze aktararak 70 °C de etüvde suyun uzaklaşması sağlanmıştır. Suyu uzaklaşıp kuruyan partiküller 450 °C de 2 saat kalsinasyona tabi tutulmuştur. Burada polimer

yakılarak ortamda sadece manyetik olmayan ya da manyetik titanyum dioksit partiküllerin kalması sağlanmıştır [30].

### 3.3. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Sentezlenen monodispers-gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve boyut dağılımının belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM; FEI, Quanta 200 FEG, ABD) kullanılmıştır. Analiz öncesi örnekler analize uygun formda hazırlanmıştır. Bunun için bir miktar kuru mikroküre saf su içinde SDS eklenerek birkaç dakika soniklenerek dağıtılmıştır. Dağıtılan çözeltiden karbon bant üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Görüntüsü alınan partiküllerin boy ve boy dağılım değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

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

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

$D_n$  : Sayıca ortalama çap değeri ( $\mu\text{m}$ ),

$N_i$  :  $D_i$  ( $\mu\text{m}$ ) çap değerine sahip partiküllerin sayısı

$N_T$  : Toplam partikül sayısı

$C_v$ : Boy dağılımı için değişim katsayısı

Sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin spesifik yüzey alanının belirlenmesi amacıyla Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (Brunauer-Emmett-Teller, BET, Quantochrome, Nova 2200e) kullanılmıştır. 0.1 g manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partiküllerine adsorpsiyon analizörü kısmında 150 °C de 6 saat vakum altında gazdan arındırma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra analiz 77 K sıcaklıkta yapılmıştır. Azot (N<sub>2</sub>) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak yüzey alanı ve gözeneklilik ölçümü yapılmıştır.

Sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin alkali ve asidik ortamlardaki davranışının belirlenmesi amacıyla yüzey potansiyel ölçümü yapılmıştır. Farklı pH değerlerinde (pH 3 - 9) 6

M Gu-HCl içeren 1X TE tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı pH değerlerinde hazırlanan bu çözeltilerden 2 mL çözelti içinde 1 mg partikül dağıtılarak pH metre cihazının (İSTEK) potansiyel ölçüm modu ile manyetik ve manyetik olmayan titanyum dioksit mikrokürelerin elektrostatik davranışları incelenmiştir.

### **3.4. Kesikli Sistemde DNA İzolasyonu**

#### **3.4.1. Materyal**

Deneysel çalışmalarda kullanılan buzağı genomik DNA'sı (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus), insan genomik DNA örneği (Deoxyribonucleic acid sodium salt from human placenta, Type XIII, D7011), insan tam kan örneği (BCR 634), adsorpsiyon tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılan guanidyum hidroklorür (Gu-HCl) ve 100X TE (Tris-EDTA) Sigma-Aldrich, ABD firmasından temin edilmiştir. Desorpsiyon tampon çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH), %85 lik orto-fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, puriss. p.a. for HPLC, 85-90% (T)) Fluka Sigma-Aldrich, İsviçre firmasından, borik asit (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) ve potasyum fosfat dibazik (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, puriss. p.a., ACS reagent anhydrous ≥ 99.0 % (T)) Sigma-Aldrich, ABD firmasından, sodyum klorür (NaCl) Riedel-de Haën, Almanya firmasından, sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ve sodyum bikarbonat (Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>) Merck Darmtadt, Almanya firmasından temin edilmiştir. Lizat hazırlamak için kullanılan proteinaz-K (20 mg/mL) Qiagen firmasından ve Triton-X Sigma-Aldrich, ABD firmasından temin edilmiştir.

#### **3.4.2. Kesikli Sistemde Buzağı Genomik DNA'sının İzolasyonu**

Bu kısımda sentezlenen TiO<sub>2</sub> partiküllerinin DNA izolasyon kapasitesini belirlemek amacıyla bir dizi deneysel çalışma yürütülmüştür. İlk olarak yapılan literatür araştırmasına göre adsorpsiyon tampon çözeltisi 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tamponu seçilmiştir [9, 10, 56-58].

Uygun desorpsiyon tampon çözeltisinin tespiti için aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır;



1. BR tamponu (pH 10.0) [59].
2. 0.1 M  $K_2HPO_4$  tamponu (pH 9.0)
3. TE+ 1.5 M NaCl tamponu (pH 9.0)
4. TE tamponu (pH 8.5)
5. 0.3 M  $K_2HPO_4$  tamponu (pH 10.0)
6. 0.05 M  $Na_2CO_3$  + 0.05 M  $Na_2HCO_3$  tamponu (pH 10.0)

Kesikli sistem deneylerinde en uygun desorpsiyon tampon çözeltisini belirlemek amacıyla yapılan deneyde manyetik olmayan  $TiO_2$  partikül miktarı (10 mg), DNA konsantrasyonu (400 ng/ $\mu$ L) ve adsorpsiyon tamponu (6 M Gu-HCl içeren 1X TE pH 6.0) sabit tutulmuştur. Değişken parametre sadece desorpsiyon tampon türüdür. Tartılan partiküller sırasıyla 3 kez distile su, 3 kez adsorpsiyon tamponu ile santrifüj-dekantasyon (5000 rpm 5 dakika) yöntemi ile yıkanarak üst faz atılmıştır. Yıkanan partiküllerin üzerine adsorpsiyon tamponunda hazırlanan buzağı genomik DNA çözeltisi (400 ng/ $\mu$ L) 500  $\mu$ L eklenmiştir. 2 saat süre ile rotatorde (30 rpm) karışan karışımların adsorpsiyon sonrası adsorplanmadan kalan DNA'nın derişimi florometrik ölçüm kitinde (Qubit 2.0 Fluorometer) okumak üzere partiküller üzerindeki sıvı faz santrifüj-dekantasyon (5000 rpm, 5 dakika) yoluyla alınmıştır. Adsorpsiyon sıvısı alınan partiküllerin üzerine 500  $\mu$ L desorpsiyon tampon çözeltilerinden eklenmiştir. Rotatorde (30 rpm) 30 dakika süreyle karıştırılmıştır. Sıvı faz santrifüj-dekantasyon (5000 rpm, 5 dakika) yoluyla alınarak derişim değerleri florometrik ölçüm kitinde (Qubit 2.0 Fluorometer) okunmuştur [10, 60]. Desorpsiyon işlemi her bir tampon çözelti için 5 kere yapılmıştır. Desorpsiyon sıvılarının okunan konsantrasyon değerlerinin hesaplamalarda kullanılabilmesi için her bir tampon için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Her bir desorpsiyon tamponu için okunan desorpsiyon konsantrasyonları grafiklerin eğim değerlerine bölünerek gerçek desorpsiyon miktarı (ng/ $\mu$ L) hesaplanmıştır. Sonuçlara göre seçilen desorpsiyon tamponu için uygun konsantrasyonun tespiti amacıyla farklı konsantrasyonları hazırlanıp aynı prosedür izlenerek adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüştür.

Uygun konsantrasyondaki desorpsiyon tamponu belirlendikten sonra kullanılan adsorpsiyon tamponu için uygun pH'ın belirlenmesi amacıyla pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0 ve pH 9.0 değerlerinde 6 M Gu-HCl içeren 1X TE adsorpsiyon tamponları hazırlanmıştır. 10 mg manyetik olmayan  $TiO_2$ , 400 ng/ $\mu$ L

DNA konsantrasyonu, farklı pH değerlerinde hazırlanan 6 M Gu-HCl içeren 1X TE adsorpsiyon tamponu, bir önceki basamakta uygun konsantrasyonda belirlenen desorpsiyon tamponu kullanılarak 500 µL ortam hacminde aynı adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürü uygulanmış ve hesaplamalar yapılmıştır.

Uygun DNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 100-1000 ng/µL aralığında farklı DNA konsantrasyonlarında 10 mg manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküre miktarı kullanılarak belirlenen adsorpsiyon ve desorpsiyon tamponlarında 500 µL ortam hacminde adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri aynı prosedür uygulanarak yapılmıştır.

Uygun sorbent miktarının belirlenmesi amacıyla 1-50 mg aralığında farklı manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> miktarı içeren ortamlarda belirlenen DNA konsantrasyonu, adsorpsiyon ve desorpsiyon tamponlarında 500 µL ortam hacminde adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri aynı prosedür uygulanarak yürütülmüştür.

### **3.4.3. Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA' sının İzolasyonu**

Tez çalışmasının bu kısmında kesikli sistemde buzağı (calf thymus) genomik DNA'sı ile yapılan deneylerde belirlenen adsorpsiyon (6 M Gu-HCl içeren 1X TE pH 6.0) ve desorpsiyon (0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10.0) tampon ortamlarında monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin insan genomik DNA izolasyon verimi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle 10 mg partikül ile insan genomik DNA'sı kullanılarak hazırlanan 100-1000 ng/µL aralığında farklı DNA konsantrasyonlarında deneyler yürütülmüştür. Daha sonra belirlenen DNA konsantrasyonu ile 1-50 mg aralığında farklı sorbent miktarları çalışılmıştır. Buzağı DNA'sının izolasyonunda kullanılan adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürü uygulanmıştır. Desorpsiyon işlemi 5 kez uygulanmıştır.

### 3.4.4. Kesikli Sistemde Tam Kandan DNA İzolasyonu

#### 3.4.4.1. İnsan Tam Kan Örneğinden Lizat Hazırlanması

İnsan tam kan örneğinden lizat hazırlanması amacıyla öncelikle 100 µL Triton-X (%10 v/v) ile 900 µL adsorpsiyon tampon çözeltisi (6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu, pH 6.0) içerisinde vorteks yardımıyla çözündürülerek 1 saat süreyle rotatör ile 40 rpm'de karıştırmaya tabi tutulmuştur. Daha sonra 150 µL hazırlanan lizat ortamı (Triton-X çözeltisi), 15 µL proteinaz-K (20 mg/mL) ve 75 µL insan tam kan örneği (BCR 634) karıştırılıp 1 dakika süreyle vortekslenmiştir. Hazırlanan lizat 56 °C de 30 dakika su banyosunda bekletilerek inkübasyon sağlanmıştır [9, 61].

#### 3.4.4.2. İnsan Tam Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

Hazırlanan lizat ile adsorpsiyon tampon çözeltisi (6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu, pH 6.0) ortam hacmi 500 µL olacak şekilde ¼ oranında karıştırılmıştır. 1-50 mg aralığında farklı miktardaki monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler üzerine hazırlanan adsorpsiyon ortamı eklenerek 2 saat süreyle adsorpsiyona tabi tutulmuştur. Adsorpsiyon sonrasında santrifüj-dekantasyon (5000 rpm, 5 dakika) yoluyla alınan sıvı faz florometrik ölçüm kitinde (Qubit 2.0 Fluorometer) okunarak adsorplanmayan DNA miktarı tespit edilmiştir. Adsorpsiyon sonrası ortamdaki proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla partiküller 30 rpm de 15 dakika süreyle %80 lik (v/v) etanol-su çözeltisi ile etkileştirilip yıkanarak sıvı faz atılmıştır. Etanol yıkaması sonrasında partiküller adsorpsiyon tampon çözeltisi (6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu, pH 6.0) ile 1 kez yıkanarak sıvı faz atılmıştır. Yıkanan partiküller 500 µL desorpsiyon tampon çözeltisi (0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 10.0) ile 30 rpm'de 30 dakika süreyle etkileştirilmiştir [9, 61]. Desorpsiyon işlemi 5 kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon sonrası santrifüj-dekantasyon (5000 rpm, 5 dakika) yoluyla alınan sıvı faz florometrik ölçüm kitinde (Qubit 2.0 Fluorometer) okunarak desorplanan DNA miktarı tespit edilmiştir.

Kesikli sistemde buzağı (calf thymus), insan genomik DNA ve tam-kan örnekleri ile yapılan DNA izolasyonu çalışmalarında, DNA desorpsiyon verimi ( $\eta_D$ ) ve DNA izolasyon verimi ( $\eta_I$ ) aşağıdaki ifadeler ile hesaplanmıştır. Bu ifadelerde kullanılan

adsorplanan ve desorplanan DNA miktarları ise florometrik ölçüm kiti (Qubit 2.0 Fluorometer) kullanılarak bulunmuştur.

$$\eta_D = \frac{\text{desorplanan DNA miktarı (ng DNA)}}{\text{adsorplanan DNA miktarı (ng DNA)}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\eta_i = \frac{\text{desorplanan DNA miktarı}}{\text{yüklenen DNA miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.5. İzole Edilen İnsan Genomik DNA'sının Karakterizasyonu

#### 3.5.1. Materyal

Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan Taq DNA polimeraz, 10X standart Taq reaksiyon tamponu, MgCl<sub>2</sub>, deoksinükleotid (dNTP), N3231S Ladder (100 bp) ve jelde yürütülen DNA'nın gözle görülmesini sağlayan boya (Gel Loading Dye Purple (6X)) New England Biolabs firmasından temin edilmiştir. Çoğaltılmak istenen gen bölgesine göre tasarlanmış forward primer (5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3') Alpha DNA, Kanada firmasından ve reverse primer (5'-GGCATGGACTGTGGTCTGC-3') Oligomer, Finlandiya firmasından temin edilmiştir. Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan Agaroz Sigma, ABD firmasından, 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılan EDTA ve Tris-base Sigma, ABD firmasından, borik asit Merck Darmstadt, Almanya firmasından temin edilmiştir. DNA'nın UV ışık altında görülmesini sağlayan etidyum bromür (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) Sigma, ABD firmasından temin edilmiştir.

#### 3.5.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Monodispers gözenekli TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile izole edilen insan genomik DNA'nın belirlenen bir gen bölgesinin (280 bp) çoğaltılması amacıyla BİO-RAD T-100 termal döngü cihazı kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu PCR (polimeraz chain reaction) yapılmıştır. Bu reaksiyon için kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.1'de ve PCR döngü koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** PCR Bileşenleri ve Miktarları

PCR Bileşenleri	Miktar (Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> kullanılarak tam kandan izole edilen insan genomik DNA)	Miktar (Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> kullanılarak çözültiden izole edilen insan genomik DNA)	Miktar (Manyetik TiO <sub>2</sub> kullanılarak çözültiden izole edilen insan genomik DNA)
Distile Su	36.5 µL	37 µL	37 µL
10X Buffer	5 µL	5 µL	5 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL	3 µL	3 µL
10 mM dNTPs	1 µL	1 µL	1 µL
10 mM Primer (Forward & Reverse)	1 µL & 1 µL	1 µL & 1 µL	1 µL & 1 µL
Saflaştırılmış DNA	1 µL	1.5 µL	1.5 µL
Taq DNA Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
<b>TOPLAM</b>	50 µL	50 µL	50 µL

**Çizelge 3.2** PCR Döngü Koşulları

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

### 3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

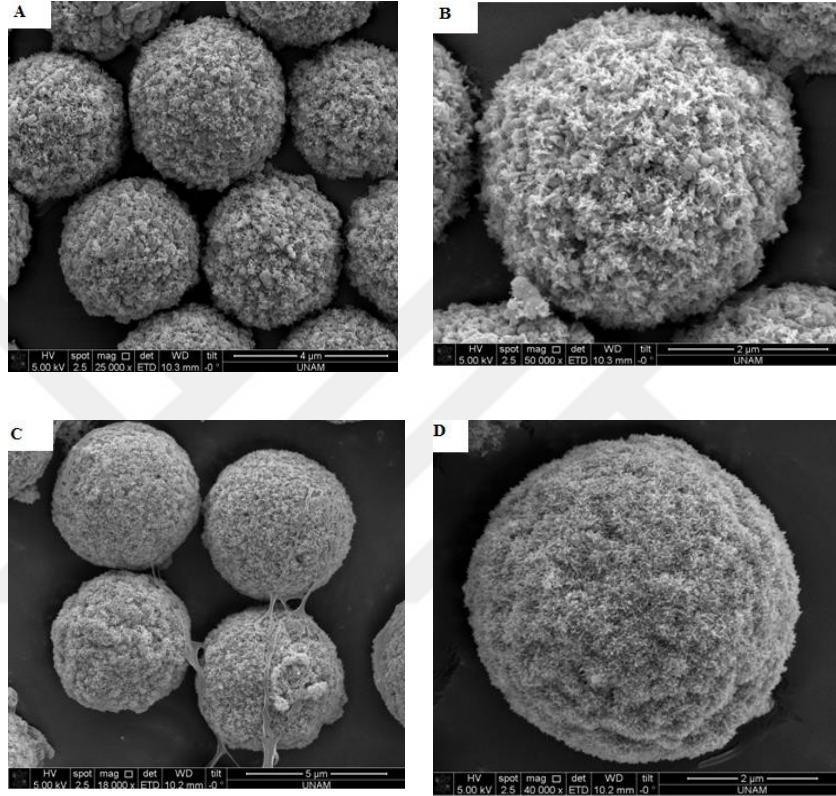
Tez kapsamında yapılan agaroz jel elektroforezi, PCR yapılarak çoğaltılan DNA bölgesinin görüntülenmesi amacıyla yapılan bir işlemdir. Bu işlemde öncelikle 10.8 g Tris-base, 5.5 g borik asit, 4 mL 0.5 M EDTA saf suda çözülerek 1 L'ye tamamlanarak 1X TBE tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 1 gr agaroz tartılmış ve hazırlanan 1X TBE tampon çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Mikrodalgada ısı verilip çözülerek %1 lik agaroz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan agaroz çözeltisinin 35 mL'si jel tablasına dökülmüştür. Üzerine 1 µL etidyum bromür eklenip homojen şekilde dağıtılmıştır. Tarak geçirilerek sabitlenmiştir. Polimerleşme tamamlanınca (yaklaşık 30 dakika) tarak çıkarılmış ve bu sayede PCR'da çoğaltılan DNA bölgesinin yükleneceği kuyular oluşturulmuştur. Elektroforez (BIO-RAD) tankı 1X TBE ile doldurulmuştur. Polimerleşen agaroz jel tanka yerleştirilmiştir. Öncelikle ilk kuyuya 1 µL ladder, 1 µL boya (gel loading dye purple (6X)) ve 4 µL saf su karıştırılarak yüklenmiştir. Daha sonra kuyulara sırasıyla 20'şer µL manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partikülleri kullanılarak izole edilen insan genomik DNA örneği ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partikülleri kullanılarak tam kandan izole edilen insan genomik DNA'sının PCR'da GAPDH primer çiftinin kullanımıyla çoğaltılan DNA bölgesi (280 bp) 4 µL boya (Gel Loading Dye Purple (6X)) ile karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. 100 Watt'lık akımda 40 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel tanktan çıkarılarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada öncelikle sol-jel yöntemi kullanılarak monodispers manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlenmiştir. Sentezlenen mikrokürelerin DNA izolasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle buzağı DNA'sı kullanılarak kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüştür. Literatürde genel olarak kullanılan adsorpsiyon ortamı 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tamponu kullanılmıştır. Desorpsiyon tamponunun belirlenmesi için farklı desorpsiyon tamponlarında adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüş olup uygun desorpsiyon tamponu belirlendikten sonra bu tampon için uygun konsantrasyonun tespiti amacıyla aynı prosedür uygulanarak adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüştür. Adsorpsiyon tamponu 6 M Gu-HCl içeren 1X TE için pH taraması yapılarak uygun pH belirlenmiştir. Uygun tampon ortamlarını belirlenmesinin ardından DNA konsantrasyonu ve sorbent miktarının DNA izolasyonuna etkisi incelenmiştir. Daha sonra monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerle kesikli sistemde buzağı (calf thymus) DNA'sı ile yapılan deneylerde belirlenen tampon ortamları ile insan genomik DNA'sı için uygun DNA konsantrasyonu ve sorbent miktarının belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yapılmıştır. DNA izolasyonu için uygun koşulların belirlenmesinin ardından tam kandan DNA izolasyonu için öncelikle kan hücreleri içerisindeki DNA'nın açığa çıkmasını sağlamak amacıyla liziz hazırlanmıştır. Monodispers manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerle kesikli sistemde buzağı (calf thymus) ve insan genomik DNA'sı ile yapılan deneylerde belirlenen tampon ortamlarında manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler kullanılarak tam kandan DNA izolasyonu için adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüştür. İzole edilen DNA, PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülenmiştir.

#### 4.1. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu

-SO<sub>3</sub>Na takılı ve manyetik poli(HPMA-Cl-co-EDMA) mikroküreleri kullanılarak sol-jel kalıplama metodu ile sentezlenen monodispers manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin ortalama boy, boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** (A) ve (B) Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub>, (C) ve (D) Manyetik TiO<sub>2</sub> için SEM fotoğrafları Büyütme Oranı: (A) 25000X, (B) 50000X, (C) 18000X, (D) 40000X.

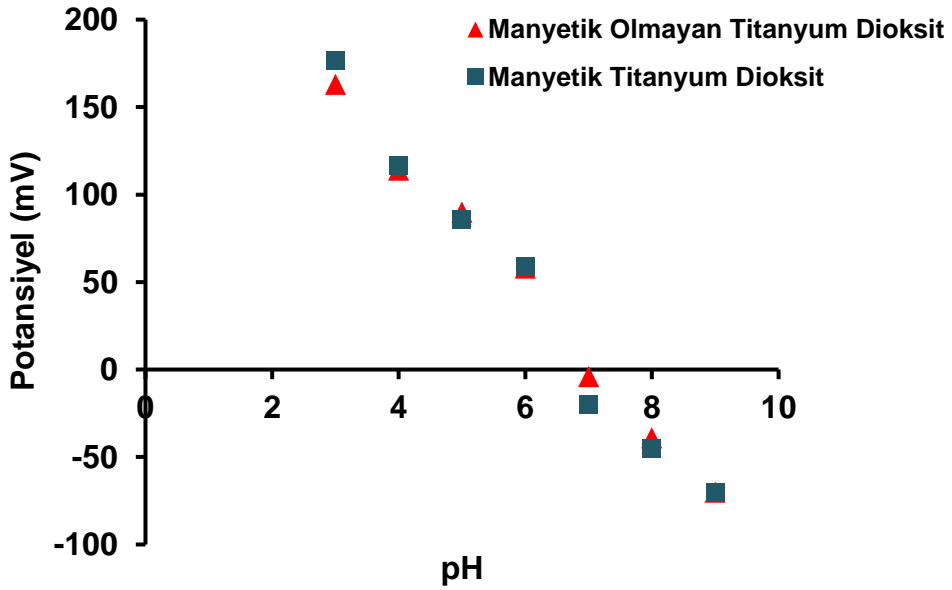
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzey morfolojileri benzerdir. Monodispersite için  $C_v \leq \%5$  olmalıdır [60, 62]. Hesaplanan  $C_v$  değerleri Çizelge 4.1 de yer almaktadır.  $C_v$  değerlerine göre sentezlenen mikrokürelerin monodispers olduğu görülmektedir. Boyut ve spesifik yüzey alanı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan BET analiz sonuçları Çizelge 4.1 de verilmiştir.



**Çizelge 4.1.** Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Boyutu ve Yüzey Alanı

Mikroküre	Ortalama çap (µm)	C <sub>v</sub> (%)	Spesifik yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g)
Manyetik olmayan TiO <sub>2</sub> mikroküreler	3.8	4.2	60.5
Manyetik TiO <sub>2</sub> mikroküreler	5.2	5.0	60.5

Manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı pH'da hazırlanan 6 M Gu-HCl içeren 1X TE çözeltileri içindeki elektrostatik davranışının incelenmesi amacıyla yapılan yüzey potansiyel ölçümü grafiği Şekil 4.2 de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreleri için yüzey potansiyel ölçümü

DNA'nın negatif yüklü bir polimer olması sebebiyle DNA adsorpsiyon ve desorpsiyon deneylerinde elektrostatik etkileşimler önemlidir. Yapılan potansiyel ölçümlerinde manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin pH 6.0 ve altındaki değerler için pozitif yüklü iken pH 6.0'nın üzerindeki değerler için negatif yüklü olduğu görülmüştür. Veriler literatürde elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. [14, 52]. Buna göre pH≤6 ortamında pozitif yüklenen TiO<sub>2</sub>

mikroküreler negatif yüklü DNA moleküllerini elektrostatik etkileşim ile tutmakta böylece adsorpsiyon artmaktadır.  $pH > 6.0$  ortamında negatif yüklenen  $TiO_2$  mikroküreler DNA moleküllerini bırakmaktadır. Böylece potansiyel değerlerine göre DNA adsorpsiyonu için uygun bölge  $pH \leq 6.0$  iken desorpsiyon için  $pH > 6.0$  ortamlarının uygun olabileceği anlaşılmaktadır.

#### **4.2. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan $TiO_2$ Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Buzağı Genomik DNA'sının İzolasyonu**

Sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan  $TiO_2$  mikrokürelerin DNA adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla buzağı genomik DNA'sı ile hazırlanan çözeltiden kesikli sistemde DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu deneylerde öncelikle monodispers manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler ile uygun desorpsiyon tamponu ve derişimi, adsorpsiyon tampon pH'ı, DNA derişimi, sorbent miktarı tespit edilmiştir. Monodispers gözenekli manyetik  $TiO_2$  mikroküreler ile yapılan deneylerde monodispers manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler için tespit edilen adsorpsiyon ve desorpsiyon tamponları kullanılarak sadece uygun DNA derişimi ve sorbent miktarı taraması yapılmıştır.

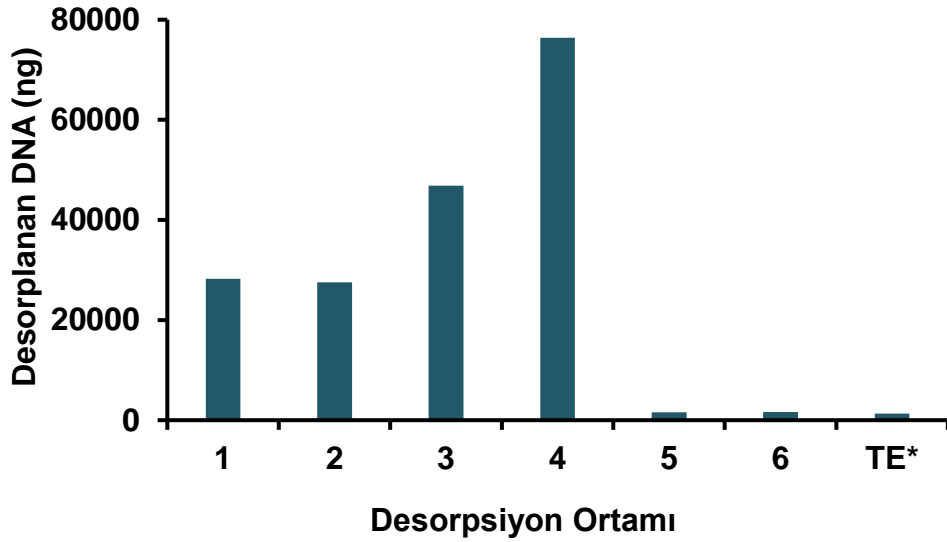
##### **4.2.1. Desorpsiyon Tampon Çözeltisinin Belirlenmesi**

Çalışmada öncelikle uygun desorpsiyon tampon çözeltisinin belirlenmesi amacıyla literatürde DNA izolasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan adsorpsiyon tamponu 6M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) sabit tutularak 400 ng/ $\mu$ L DNA başlangıç derişimi, 10 mg  $TiO_2$  miktarı ile Çizelge 4.2'de verilen desorpsiyon tamponlarının DNA desorpsiyonundaki performansları incelenmiştir. Deneysel çalışma 500  $\mu$ L ortam hacminde, adsorpsiyon süresinin 2 saat, desorpsiyon süresinin 30 dakika, karıştırma hızının 30 rpm olduğu şartlarda gerçekleştirilmiştir. Tüm desorpsiyon ortam türlerine 5 kez desorpsiyon işlemi uygulanmıştır.

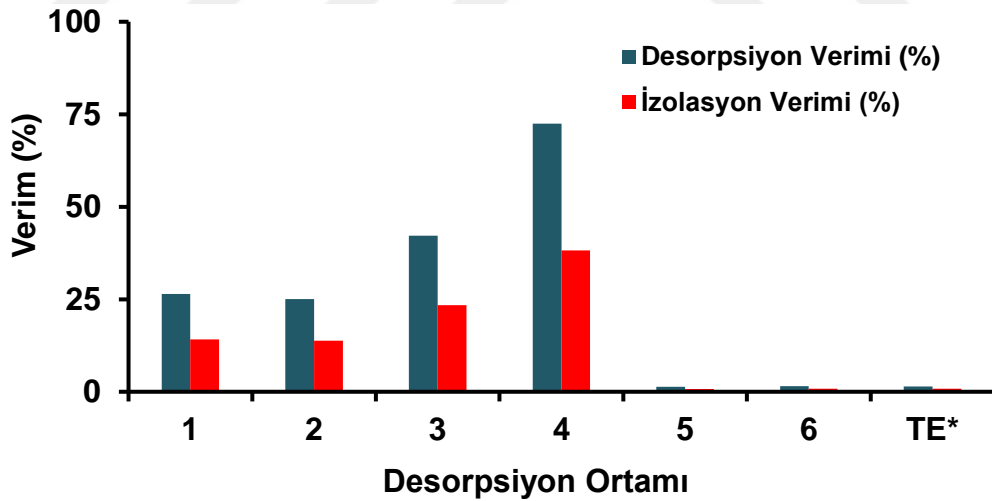
**Çizelge 4.2.** Desorpsiyon Tampon Çözeltileri

No	Desorpsiyon Tampon İçeriği	pH
1	0.05 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 0.05 M Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	10.0
2	BR (Britton-Robinson)	10.0
3	0.1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.0
4	0.3 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0
5	TE+ 1.5 M NaCl	9.0
6	TE (Tris-EDTA)	8.5

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 de verilen sonuçlara göre en uygun desorpsiyon tamponu desorplanan DNA miktarı ve % verim olarak diğer tampon çözeltilerden üstün olan 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) seçilmiştir. Sorbentler ile DNA çözeltisinin etkileşimi öncesinde yapılan yıkamalarda tüm tamponlar için sırasıyla 3 kez saf su, 3 kez adsorpsiyon tamponu (6 M Gu-HCl+1X TE pH 6.0) kullanılmıştır. Desorpsiyon ortamı ile yıkama yapılmasının verime olan etkisini tespit etmek amacıyla partikülleri DNA çözeltisi ile etkileştirmeden önce TE tamponu (TE\*) için ayrıca bir desorpsiyon yıkaması yapılmıştır. Ancak desorpsiyon tampon çözeltisi ile yıkama yapmanın DNA izolasyon veriminde bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.3.** Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının desorplanan DNA miktarına etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.2 de yer almaktadır.



**Şekil 4.4.** Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının DNA izolasyon ve desorpsiyon verimine etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.2'de yer almaktadır.

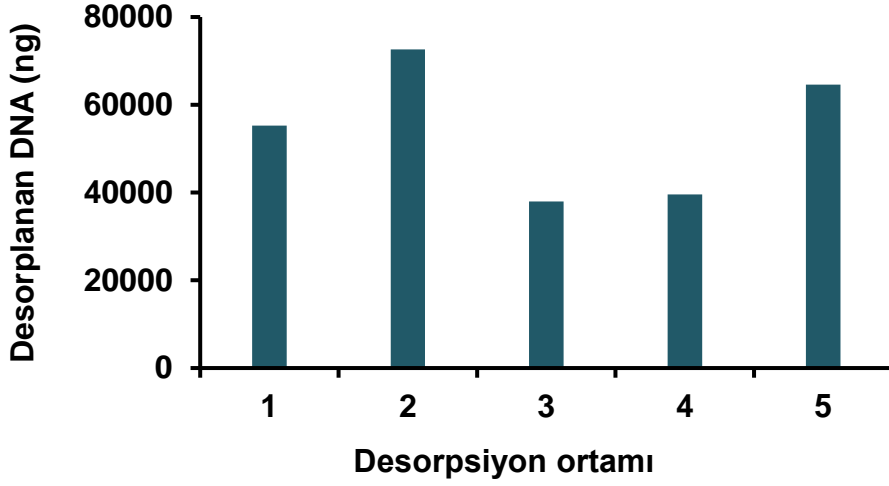
Desorpsiyon tampon çözeltisinin 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10.0 olarak belirlenmesinin ardından bu tampon için uygun derişimin belirlenmesi amacıyla konsantrasyon

taraması yapılmıştır. Deney için belirlenen desorpsiyon tampon çözeltisi konsantrasyonları ve içerikleri Çizelge 4.3'deki gibidir. Kullanılan DNA başlangıç derişimi 400 ng/ $\mu$ L, sorbent miktarı 10 mg, 500  $\mu$ L ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, desorpsiyon süresi 30 dakika, karıştırma hızı 30 rpm dir. Tüm desorpsiyon ortam türlerine 5 kez desorpsiyon işlemi uygulanmıştır.

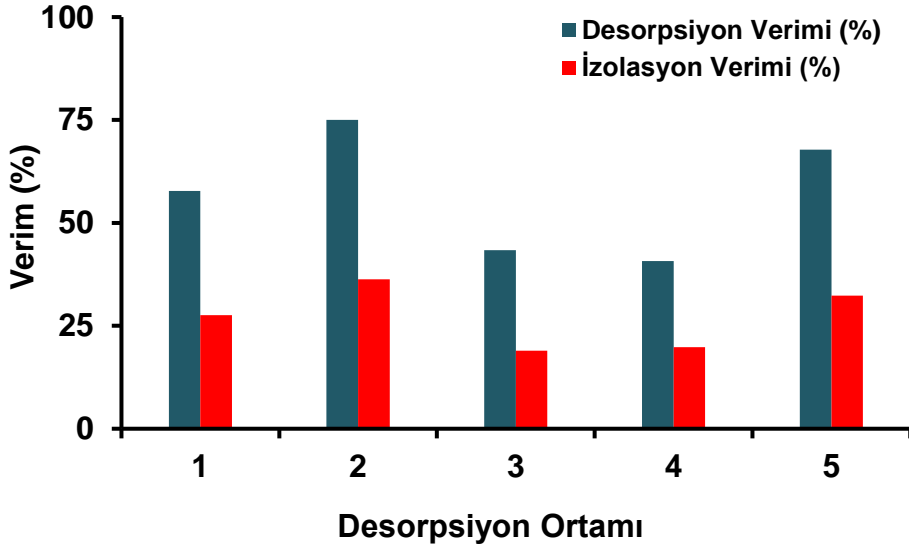
**Çizelge 4.3.**  $K_2HPO_4$  Desorpsiyon Tampon Çözeltisi İçin Hazırlanan Konsantrasyonlar

No	Desorpsiyon Tampon İçeriği	pH
1	0.1 M $K_2HPO_4$	10.0
2	0.3 M $K_2HPO_4$	10.0
3	0.5 M $K_2HPO_4$	10.0
4	1.0 M $K_2HPO_4$	10.0
5	0.3 M $K_2HPO_4$ + 0.5 M NaCl	10.0

Şekil 4.5 ve şekil 4.6'daki grafiklerde elde edilen verilere göre monodispers manyetik olmayan  $TiO_2$  mikrokürelerle DNA izolasyonu için en yüksek DNA desorpsiyon miktarı (ng), desorpsiyon verimi ve izolasyon verimi 0.3 M  $K_2HPO_4$  desorpsiyon tamponunda elde edilmiştir. Bu sebeple uygun desorpsiyon tampon çözeltisi olarak 0.3 M  $K_2HPO_4$  (pH 10.0) seçilmiştir.



**Şekil 4.5.** Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının desorplanan DNA miktarına etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.3'de yer almaktadır.

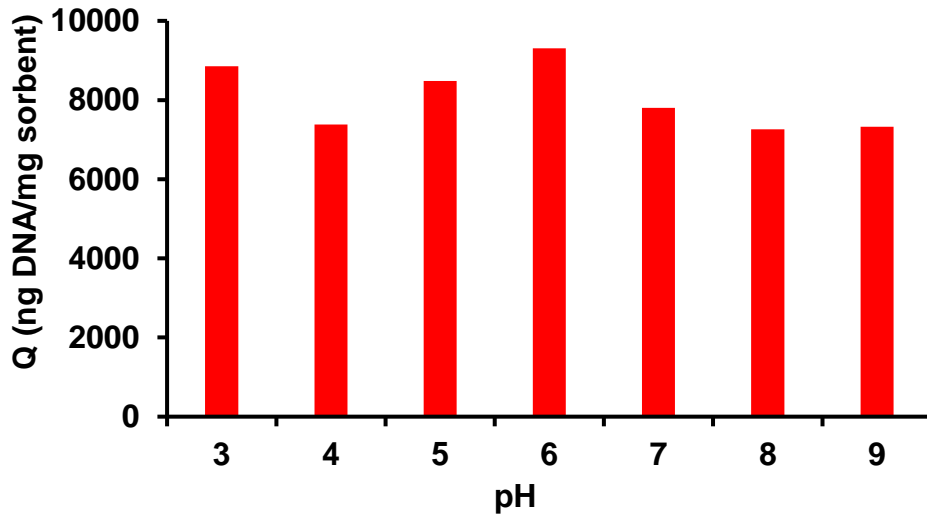


**Şekil 4.6.** Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda desorpsiyon ortamının DNA izolasyon ve desorpsiyon verimine etkisi. Numaralandırma yapılarak belirtilen desorpsiyon ortamlarının içeriği Çizelge 4.3 de yer almaktadır.

#### 4.2.2. Adsorpsiyon Tampon pH'nın DNA İzolasyonuna Etkisi

Adsorpsiyon tampon çözeltisinin pH'nın DNA izolasyonundaki etkisinin incelenmesi amacıyla 6 M Gu-HCl içeren 1X TE adsorpsiyon tampon çözeltisinin farklı pH değerlerinde çözeltileri hazırlanmıştır. Desorpsiyon tampon çözeltisi olarak 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) kullanılmıştır. Kullanılan DNA başlangıç derişimi 400 ng/ $\mu$ L, sorbent miktarı 10 mg, 500  $\mu$ L ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, desorpsiyon süresi 30 dakika, karıştırma hızı 30 rpm dir. Desorpsiyon işlemleri 5 kez uygulanmıştır.

Şekil 4.7'ye göre en yüksek denge DNA adsorpsiyonunun pH 6.0 değerinde elde edilmesi ve bu pH değerinin insan vücudu ile uyumlu bir pH değeri olması nedeniyle pH 6.0'daki adsorpsiyon tamponu en uygun tampon çözelti seçilmiştir. Şekil 4.7 ye göre asidik bölgede (pH 3.0) alkali bölgeye göre yüksek adsorpsiyon miktarlarının elde edilmesinin sebebi pH 6.0 ve altındaki değerlerde TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin pozitif yüklenerek DNA'yı tutma oranının artmasıdır.

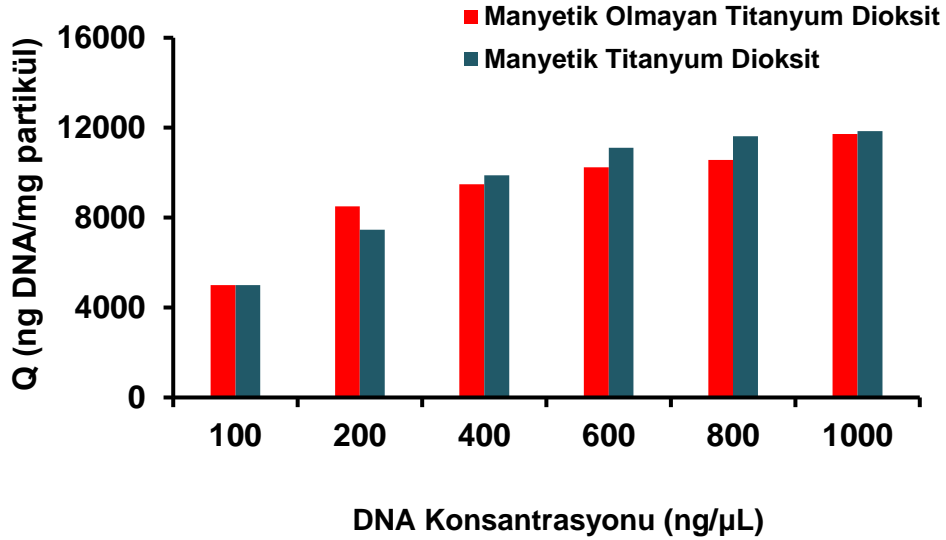


**Şekil 4.7.** Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda adsorpsiyon tampon pH'nın denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.

#### 4.2.3. DNA Başlangıç Konsantrasyonunun DNA İzolasyonuna Etkisi

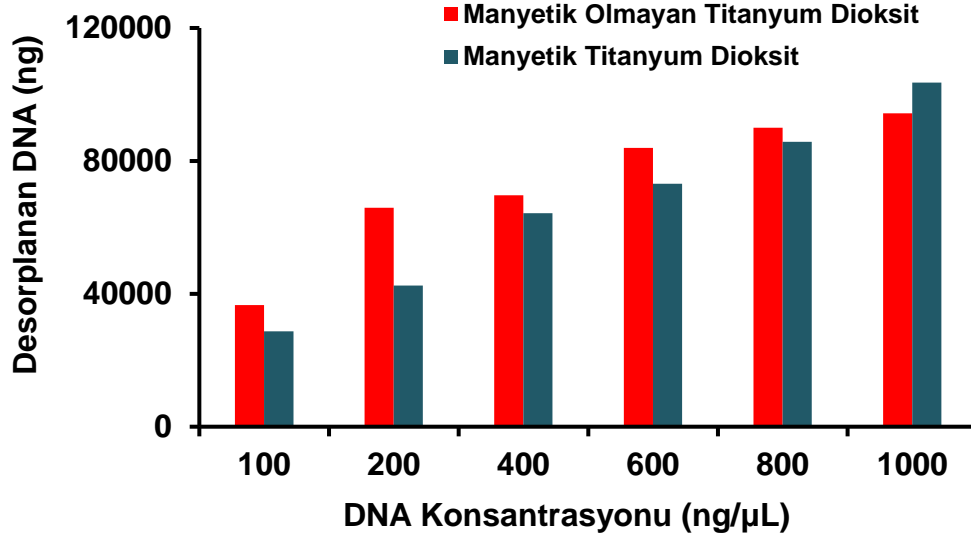
DNA başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 100-1000 ng/μL konsantrasyon aralığında DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Deney koşulları; 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tampon çözeltisi adsorpsiyon tamponu, 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) desorpsiyon tamponu, sorbent miktarı 10 mg, 500 μL ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, karıştırma hızı 30 rpm dir. Tüm desorpsiyon türleri için desorpsiyon işlemi 5 kez uygulanmıştır.

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 da verilen grafiklerde beklendiği gibi sabit partikül miktarında (10 mg) denge DNA adsorpsiyonu (Q) ve desorplanan DNA miktarı DNA derişimi arttığı sürece artmaktadır. Şekil 4.8'e göre 600 ng/μL DNA başlangıç konsantrasyonundan sonra her iki partikül türü için de grafik bir plato oluşturmaktadır.



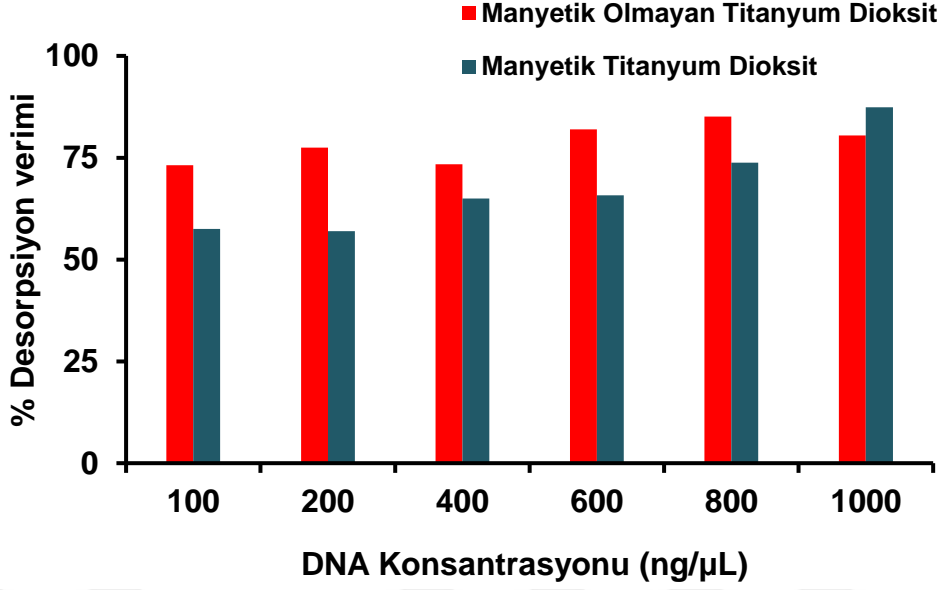
**Şekil 4.8.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.



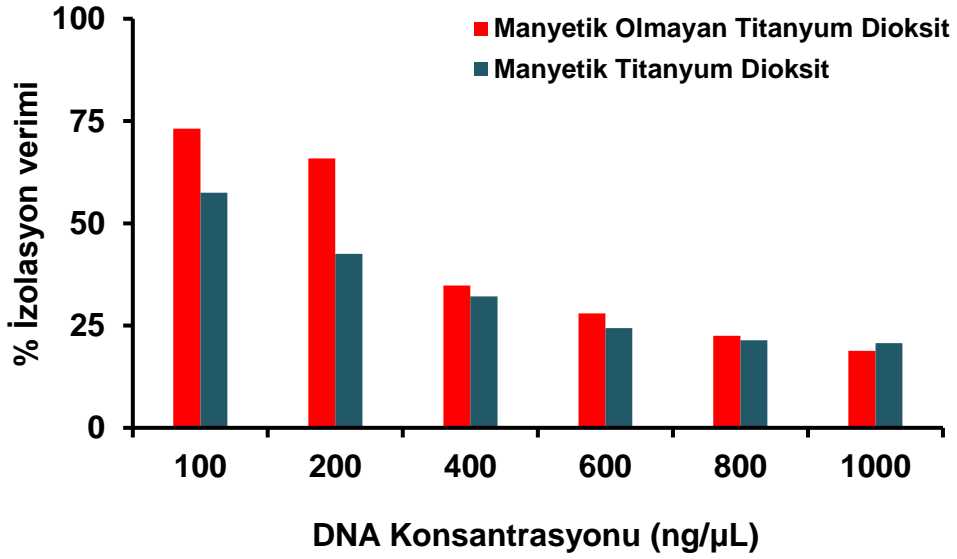


**Şekil 4.9.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin desorplanan DNA miktarına etkisi.

Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin manyetik ve manyetik olmayan formları için yapılan DNA konsantrasyon taramasında elde edilen sonuçlar arasında çok büyük farklar olmadığı görülmektedir. Her iki partikül çeşidi için de konsantrasyonun artmasıyla izolasyon veriminde azalma olduğu görülmüştür. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 de verilen izolasyon ve desorpsiyon verimlerine bakıldığında manyetik olmayan  $TiO_2$  mikrokürelerin manyetik  $TiO_2$  mikrokürelerden bir miktar daha iyi verime sahip olduğu ancak yine de değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.10.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % desorpsiyon verimine etkisi.



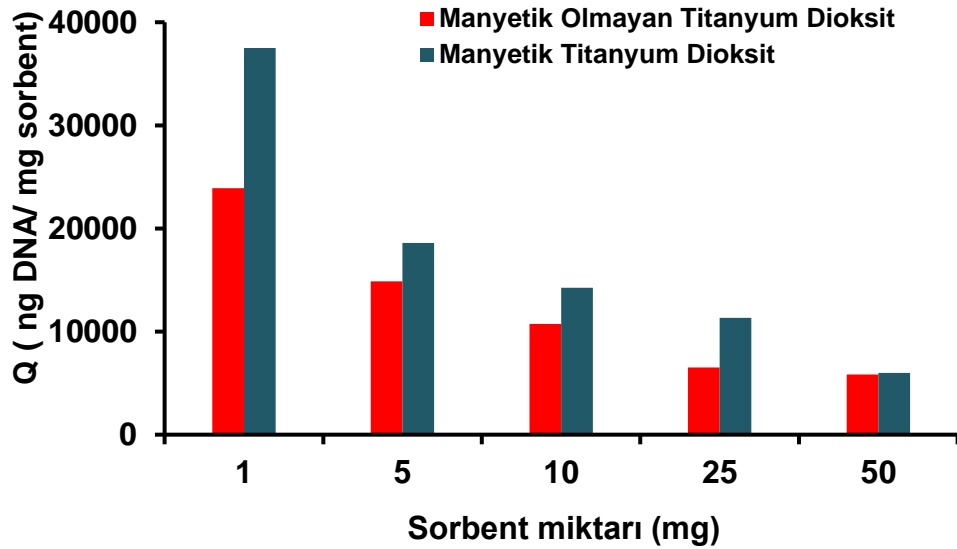
**Şekil 4.11.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % izolasyon verimine etkisi.

Tüm veriler incelendiğinde en uygun DNA başlangıç derişimi olarak 600 ng/μL belirlenmiştir.

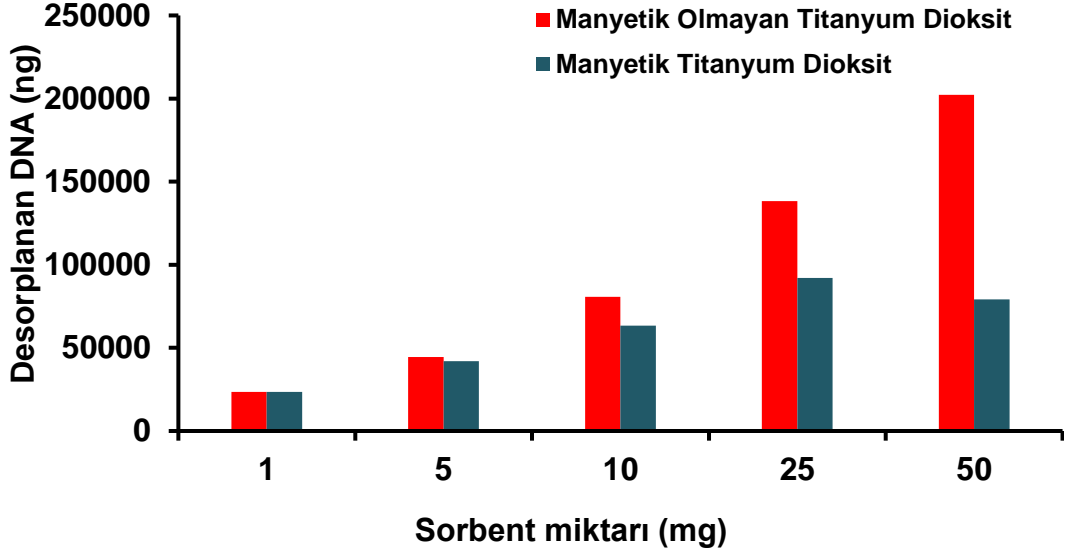
#### 4.2.4. Sorbent Miktarının DNA İzolasyonuna Etkisi

Sorbent miktarının etkisini incelemek amacıyla 1-50 mg partikül miktarı aralığında manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partikülleri kullanılarak deneysel çalışma yürütülmüştür. Sabit deney koşulları; 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tampon çözeltisi adsorpsiyon tamponu, 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) desorpsiyon tamponu, 600 ng/μl DNA başlangıç konsantrasyonu, 500 μL ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, karıştırma hızı 30 rpm dir. Tüm sorbent miktarları için desorpsiyon işlemi 5 kez uygulanmıştır.

Eşit konsantrasyonlarda DNA yüklendiği koşullarda Şekil 4.1' de olduğu gibi partikül miktarının artmasıyla denge DNA adsorpsiyonunun azalması beklenen bir durumdur. Manyetik TiO<sub>2</sub> partikülleri için denge DNA adsorpsiyonu (Q) manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partiküllere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Şekil 4.13'e göre beklendiği gibi partikül miktarı arttıkça adsorplanan DNA miktarındaki artışa bağlı olarak beklendiği gibi desorplanan DNA miktarı (ng) artmaktadır.

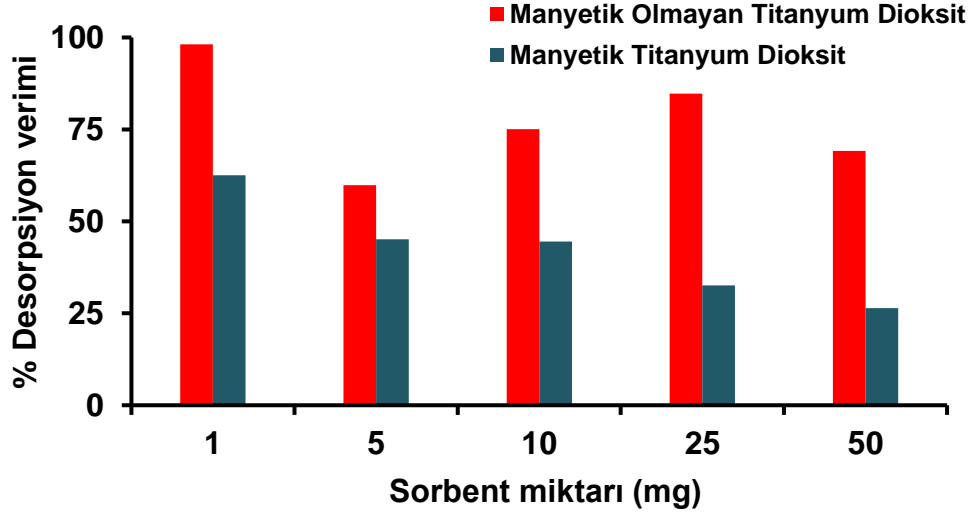


**Şekil 4.12.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.

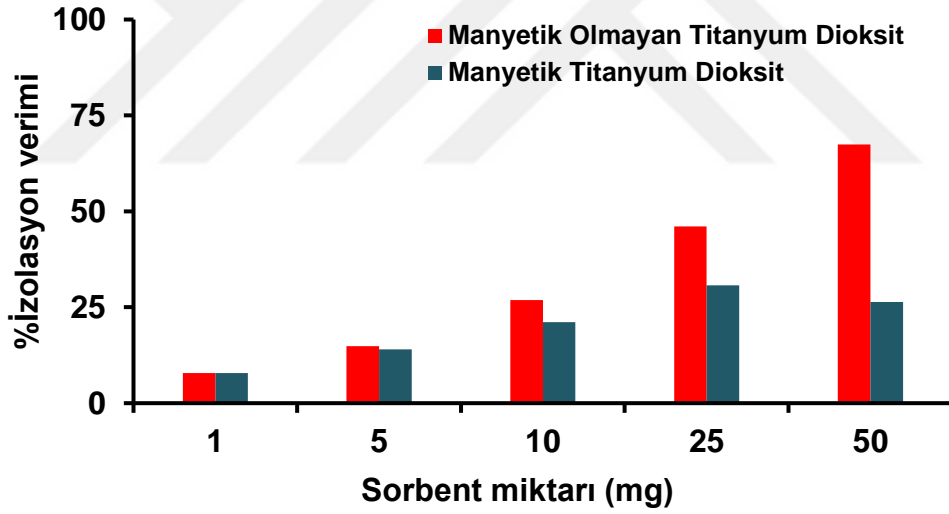


**Şekil 4.13.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi.

% izolasyon ve desorpsiyon verimleri Şekil 4.14 ve şekil 4.15'de verilmiştir. Düşük sorbent miktarlarında adsorplanan DNA miktarı daha azdır. Her miktar için 5 desorpsiyon uygulanması sebebiyle düşük miktarlarda adsorplanan DNA daha kolay desorbe olmaktadır. Şekil 4.15'e göre her iki partikül türü için de sorbent miktarını artmasıyla % izolasyon veriminin arttığı görülmüştür. Tüm veriler incelendiğinde en uygun sorbent miktarı 10 mg seçilmiştir.



**Şekil 4.14.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % desorpsiyon verimine etkisi.



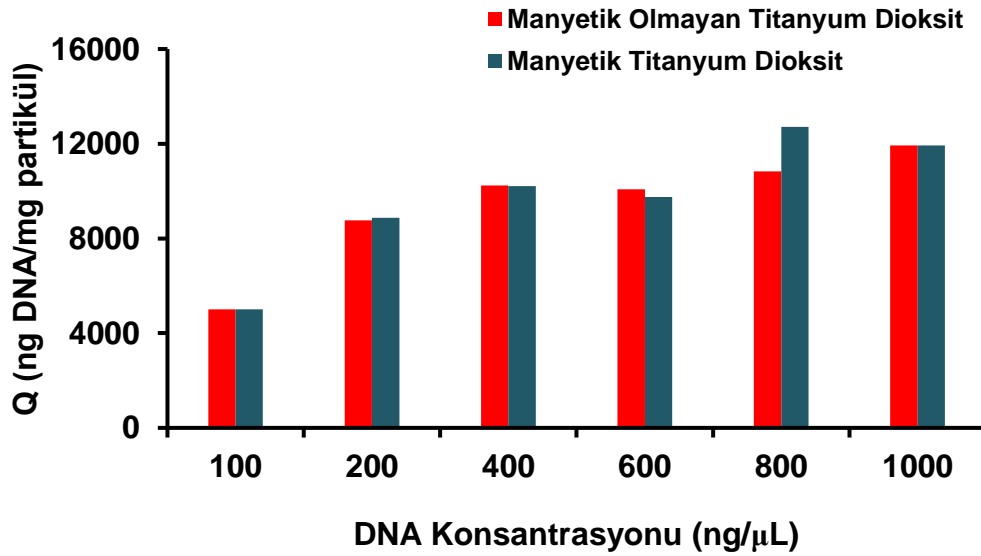
**Şekil 4.15.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % izolasyon verimine etkisi.

### 4.3. Monodispers Gözenekli Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile Kesikli Sistemde İnsan Genomik DNA'sının İzolasyonu

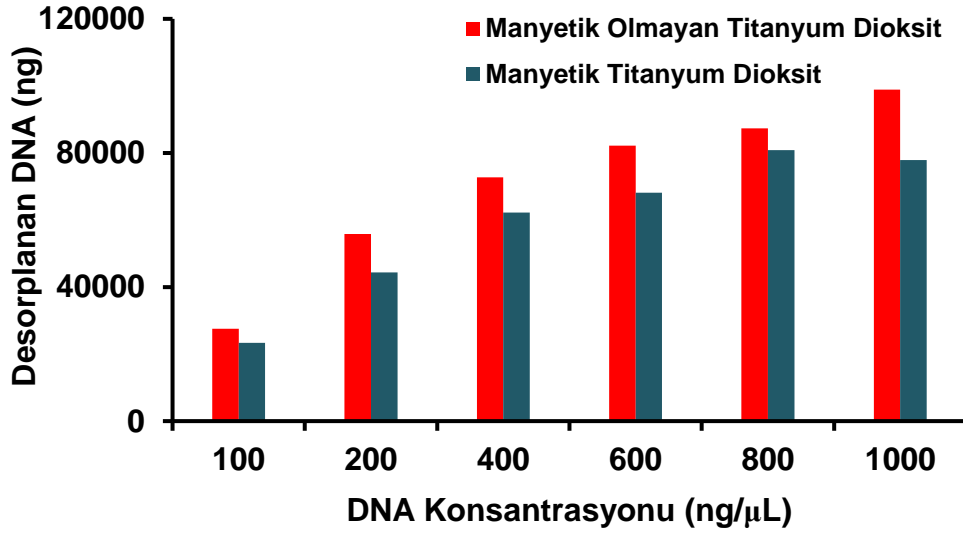
#### 4.3.1. DNA Başlangıç Konsantrasyonunun DNA İzolasyonuna Etkisi

DNA başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 100-1000 ng/μL konsantrasyon aralığında DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Deney koşulları; 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tampon çözeltisi adsorpsiyon tamponu, 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) desorpsiyon tamponu, sorbent miktarı 10 mg, 500 μL ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, desorpsiyon süresi 30 dakika, karıştırma hızı 30 rpm dir.

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 de verilen grafiklerde beklendiği gibi sabit partikül miktarında (10 mg) denge DNA adsorpsiyonu ve toplam desorpsiyon miktarı DNA derişimi arttığı sürece artmaktadır.



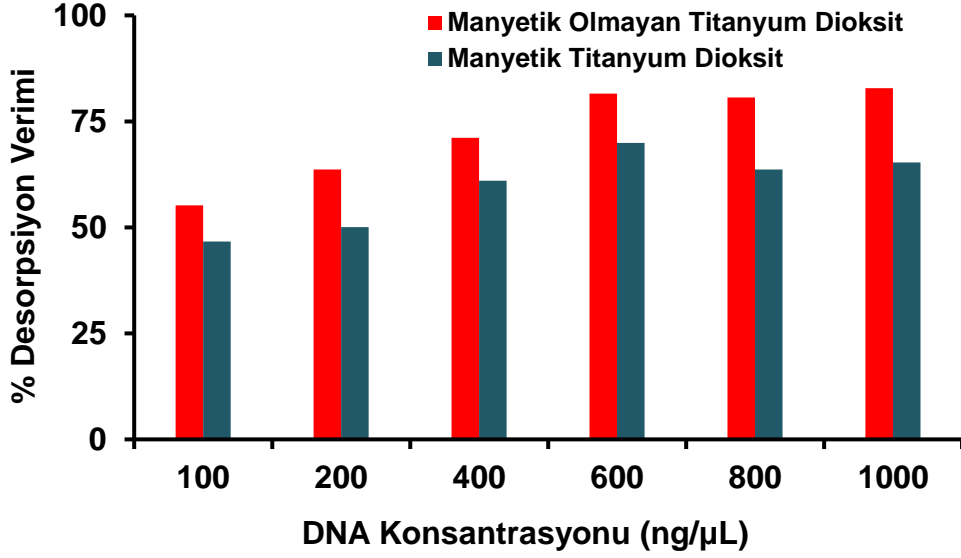
**Şekil 4.16.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.



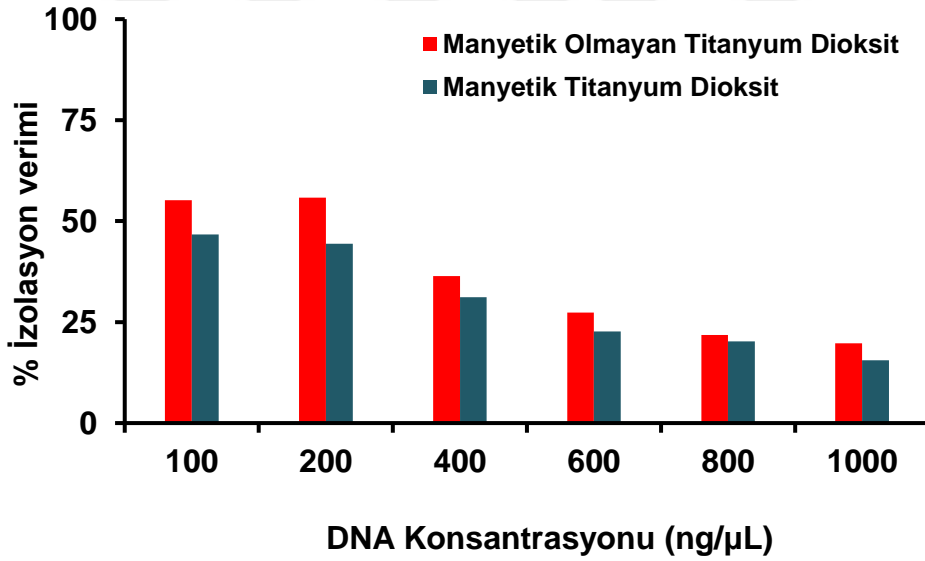
**Şekil 4.17.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin desorplanan DNA miktarına (Q) etkisi.

Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin manyetik ve manyetik olmayan formlarında için yapılan DNA konsantrasyon taramasında elde edilen sonuçlar arasında çok büyük farklar olmadığı görülmektedir. Her iki sorbent çeşidi için de konsantrasyonun artmasıyla izolasyon veriminde azalma olduğu görülmüştür. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19 da verilen izolasyon ve desorpsiyon verimlerine bakıldığında manyetik olmayan  $TiO_2$  mikrokürelerin manyetik  $TiO_2$  mikrokürelerden bir miktar daha iyi verime sahip olduğu ancak yine de değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Tüm veriler incelendiğinde en uygun DNA başlangıç derişimi olarak 600 ng/μL belirlenmiştir.



**Şekil 4.18.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % desorpsiyon verimine etkisi.



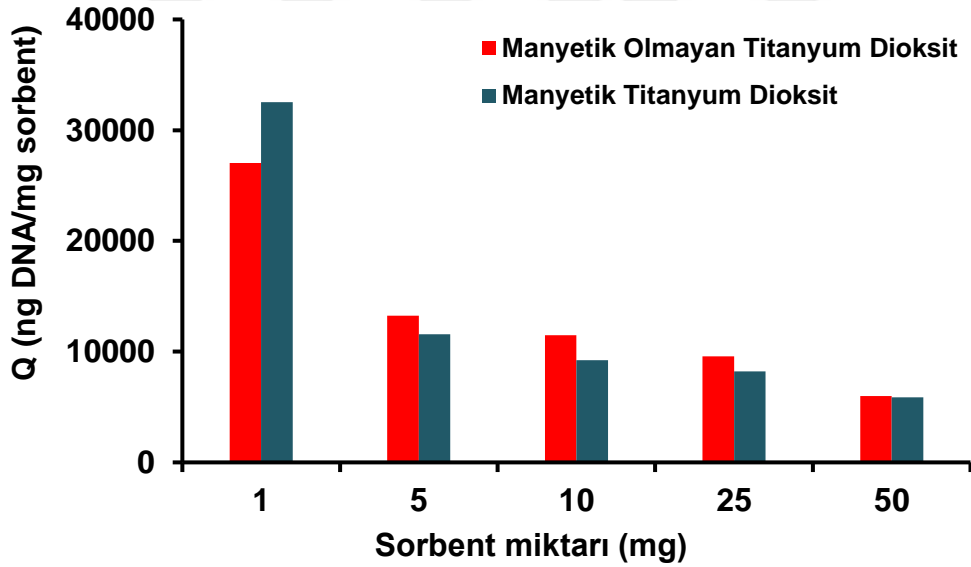
**Şekil 4.19.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda DNA başlangıç derişiminin % izolasyon verimine etkisi.



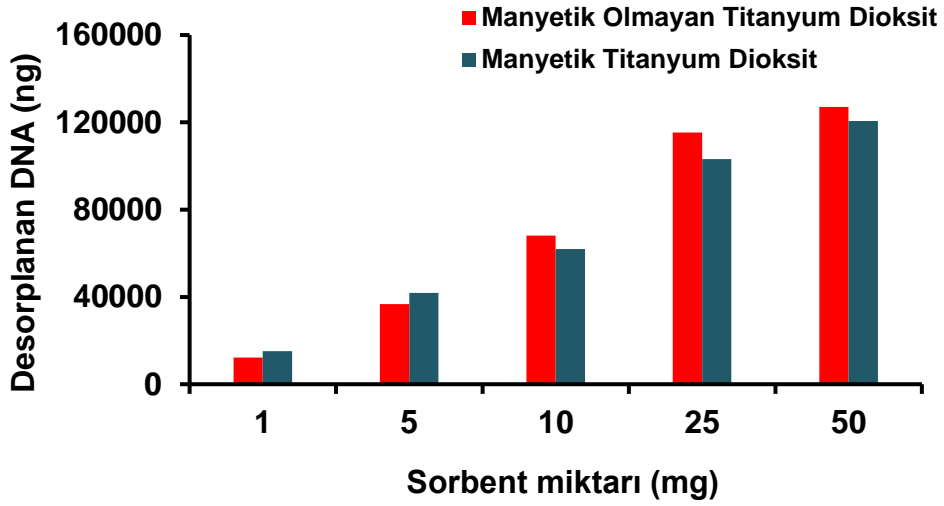
#### 4.3.2. Sorbent Miktarının DNA İzolasyonuna Etkisi

Sorbent miktarının etkisini incelemek amacıyla 1-50 mg partikül miktarı aralığında manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partikülleri kullanılarak deneysel çalışma yürütülmüştür. Sabit deney koşulları; 6 M Gu-HCl içeren 1X TE (pH 6.0) tampon çözeltisi adsorpsiyon tamponu, 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 10.0) desorpsiyon tamponu, 600 ng/μl DNA başlangıç konsantrasyonu, 500 μL ortam, adsorpsiyon süresi 2 saat, karıştırma hızı 30 rpm dir. Tüm sorbent miktarları için desorpsiyon işlemi 5 kez uygulanmıştır.

Eşit konsantrasyonlarda DNA yüklendiği koşullarda Şekil 4.20'de olduğu gibi partikül miktarının artmasıyla denge DNA adsorpsiyonunun azalması beklenen bir durumdur. Şekil 4.21'e göre partikül miktarı arttıkça toplam adsorplanan DNA miktarındaki artışa bağlı olarak desorplanan DNA miktarı da partikül miktarı ile artmıştır.

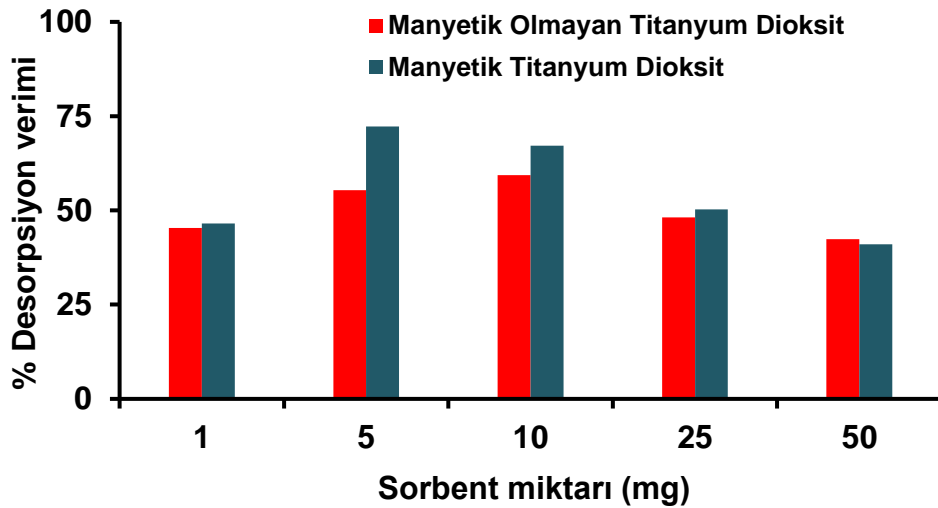


**Şekil 4.20.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsorpsiyonuna (Q) etkisi.

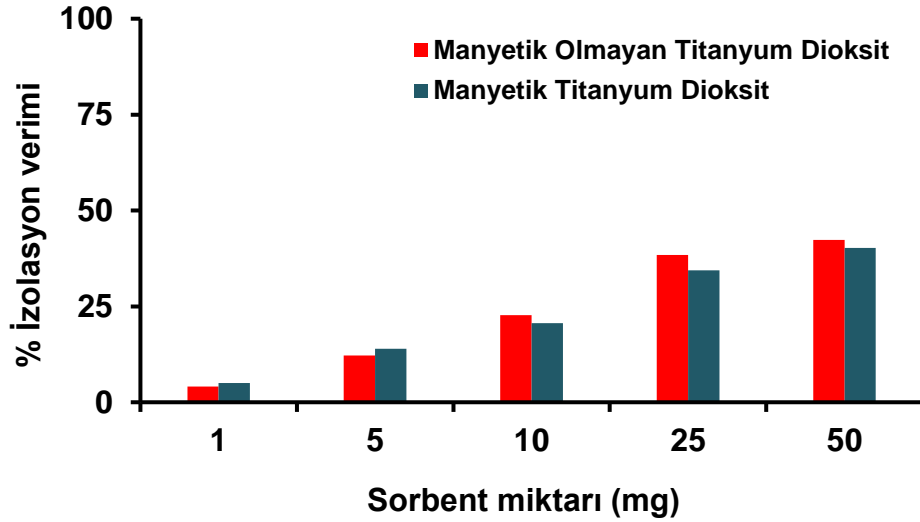


**Şekil 4.21.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi.

Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te desorpsiyon ve izolasyon verimlerine ait bilgiler verilmiştir. Şekil 4.23'e göre her iki sorbent türü için de beklendiği gibi sorbent miktarı arttıkça izolasyon veriminin arttığı görülmüştür. Tüm veriler incelendiğinde optimum partikül miktarının 10 mg olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 4.22.** Monodispers TiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % desorpsiyon verimine etkisi.



**Şekil 4.23.** Monodispers  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı formları için kesikli sistemde insan genomik DNA'sının izolasyonunda sorbent miktarının % izolasyon verimine etkisi.

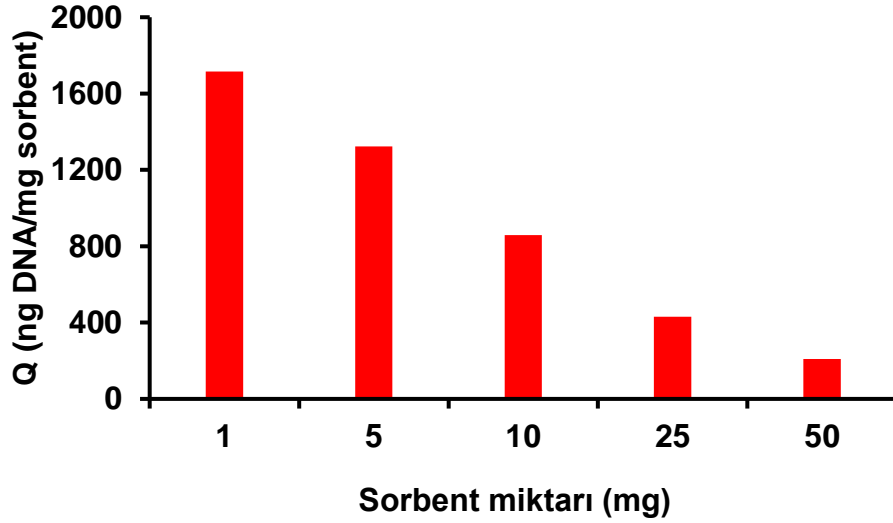
#### 4.4. Monodispers Manyetik Olmayan $TiO_2$ Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Tam Kandan DNA İzolasyonu

Sentezlenen monodispers manyetik olmayan  $TiO_2$  mikrokürelerin farklı miktarları ile tam kandan DNA izolasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla insan tam kan örneği (BCR 634) ve adsorpsiyon tamponu (6 M GuHCl içeren 1X TE pH 6.0) ile hazırlanan  $\frac{1}{4}$  oranındaki lizat/adsorpsiyon tamponu çözeltisi ile kesikli sistemde DNA izolasyonu yapılmıştır. Desorpsiyon tamponu olarak daha önce kesikli sistemde buzağı genomik DNA'sı ile yürütülen deneylerde belirlenen 0.3 M  $K_2HPO_4$  pH 10.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Deney 500  $\mu$ L ortamda, adsorpsiyon süresi 2 saat, desorpsiyon süresi 30 dakika, karıştırma hızı 30 rpm olduğu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Tüm sorbent miktarları için desorpsiyon işlemi 5 kez uygulanmıştır.

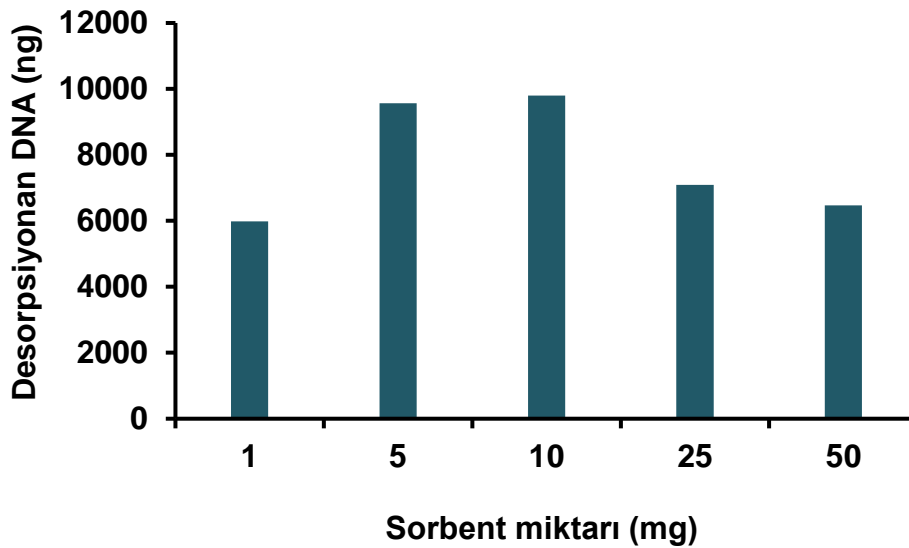
##### 4.4.1. Sorbent Miktarının Tam Kandan DNA İzolasyonuna Etkisi

Şekil 4.24 incelendiğinde elde edilen sonuçlara göre tam kandan DNA izolasyonunda denge DNA adsorpsiyonu beklendiği gibi partikül miktarı arttıkça azalmaktadır. Şekil 4.25'e göre en iyi desorpsiyon performansı 10 mg sorbent miktarı için elde edilmiştir. Şekil 4.26 ya göre yine en iyi izolasyon verimi 10 mg

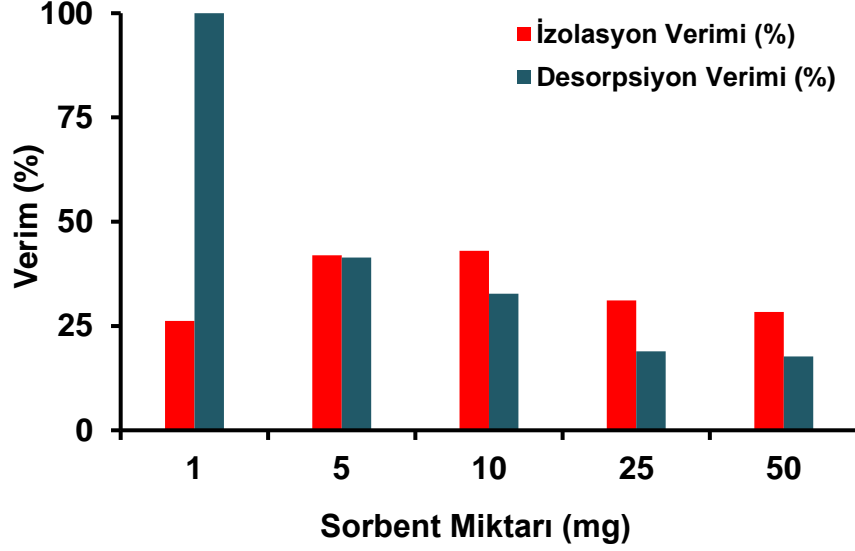
sorbent miktarı için %42.9 elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında sol-jel kalıplama yöntemi kullanılarak sentezlenen monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda katı fazlara alternatif olarak sunulabileceği görülmüştür.



**Şekil 4.24.** Monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının denge DNA adsorpsiyonuna etkisi.



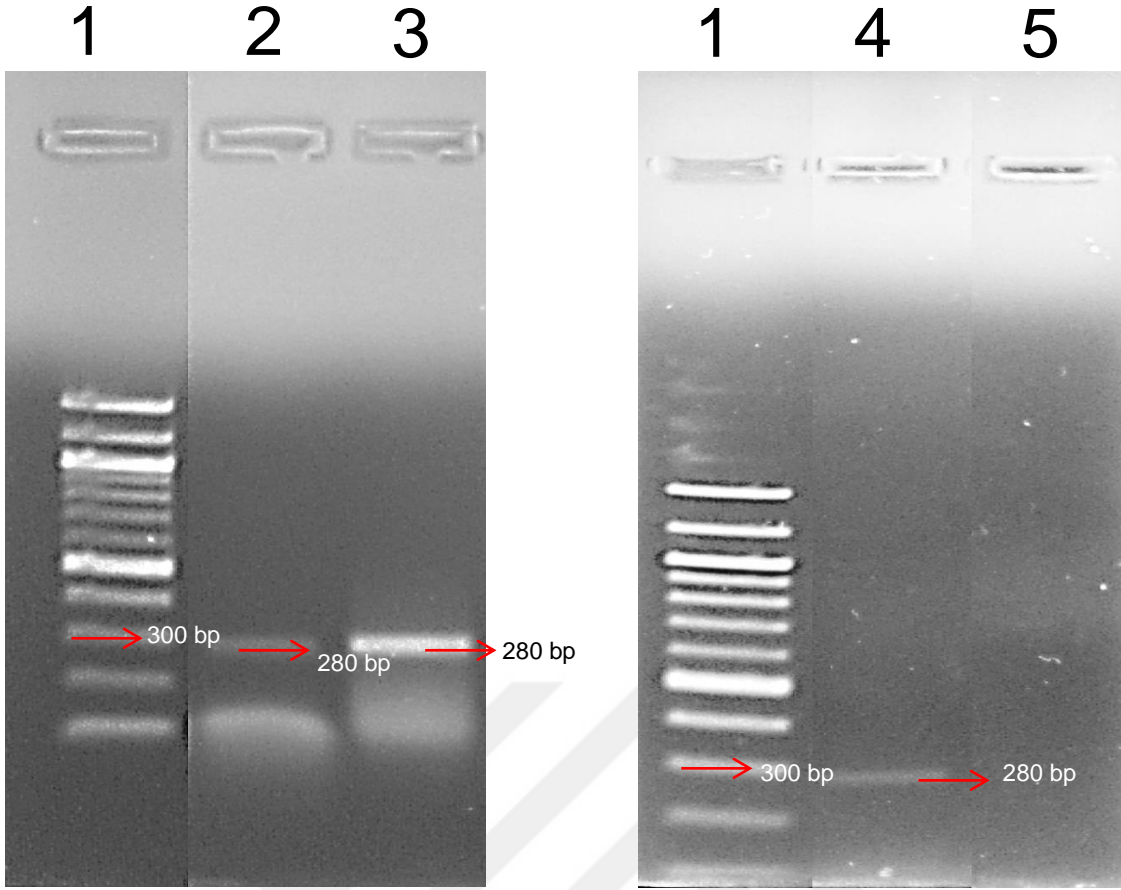
**Şekil 4.25.** Monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının desorplanan DNA miktarına etkisi.



**Şekil 4.26.** Monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için kesikli sistemde tam kandan DNA izolasyonunda sorbent miktarının izolasyon ve desorpsiyon verimine etkisi.

#### 4.5. İzole Edilen İnsan Genomik DNA'sının Karakterizasyonu

Sentezlenen manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile tam kan ve insan genomik DNA'sı (D7011) kullanılarak izole edilen genomik DNA'nın bütünlüğü ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.27'de verilmiştir. GAPDH primer çiftinin kullanımıyla hedeflenen 280 bp'lik bölgenin çoğaltımı gerçekleştirilmiş ve oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri elde edilmiştir. Hedeflenen bölgenin başarılı şekilde çoğaltıldığı alınan görüntülerle gösterilmiştir. Hem çözüldüğü izole edilen insan genomik DNA (D7011)'sı hem de tam kandan izole edilen insan genomik DNA örneklerinin PCR'da çoğaltılan bölgelerinin agaroz jel görüntüleri uyumludur. Negatif kontrol (5) grubunda beklendiği gibi herhangi bir bant elde edilmemiştir. Elde edilen sonuçlar monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> partikülleri kullanılarak yapılan DNA izolasyonlarının başarılı olduğunun göstergesidir.



**Şekil 4.27.**  $TiO_2$ 'in farklı formları kullanılarak izole edilen genomik DNA örneklerinin PCR'da GAPDH primer çiftinin kullanımıyla çoğaltılan DNA bölgesinin (280 bp) agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1. DNA Ladder, 2. Manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler ile çözültiden izole edilen insan genomik DNA örneği, 3. Manyetik  $TiO_2$  mikroküreler ile çözültiden izole edilen insan genomik DNA örneği, 4. Manyetik olmayan  $TiO_2$  mikroküreler ile tam kandan izole edilen insan genomik DNA örneği, 5. Negatif kontrol (distile su).

## 5. GENEL SONUÇLAR

Tez kapsamında öncelikle sol-jel kalıplama metodu kullanılarak monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin karakterizasyon özellikleri şu şekildedir:

- Sem görüntülerine göre sentezlenen manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler monodispers ve gözenekli formdadır. Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler 3.8 µm ve manyetik TiO<sub>2</sub> mikroküreler 5.2 µm boyutlarında sentezlenmiştir.
- Bet analizi sonuçlarına göre monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler 60.5 m<sup>2</sup>/g spesifik yüzey alanına sahiptir.
- Yapılan yüzey potansiyel ölçümü sonuçlarına göre sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler pH 6.0 ve altındaki değerler için pozitif yüklü iken pH 6.0'nın üzerindeki değerler için negatif yüklü olduğu görülmüştür.

Sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile yapılan genomik DNA izolasyonu deneylerinin sonuçları aşağıda verilmiştir:

- Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile buzağı (calf thymus) genomik DNA'sının izolasyonu çalışmalarında kullanılacak en uygun desorpsiyon tampon çözeltisinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla öncelikle farklı desorpsiyon buffer ortamları denenmiştir. Bu deneyler sonucunda 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10.0 ortamında en iyi desorpsiyon miktarı elde edilmiştir. Daha sonra 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10.0 desorpsiyon tampon çözeltisinin farklı konsantrasyonları çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarda yine en yüksek desorpsiyon miktarı 0.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10.0 tampon çözeltisi ortamında elde edilmiştir.
- Manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile buzağı (calf thymus) genomik DNA'sının izolasyonu çalışmalarında adsorpsiyon tampon çözeltisi olarak literatürde yaygın olarak kullanılan 6 M Gu-HCl içeren 1X TE tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözeltinin farklı pH değerlerinde gösterdiği performans incelenmiştir. pH 6.0 ortamında denge DNA adsorpsiyonu (Q) en yüksek değerde olduğu görülmüştür. Böylece yapılacak izolasyon

çalışmalarında adsorpsiyon tampon çözeltisi için en uygun pH değeri olarak 6.0 olarak seçilmiştir.

- Manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için farklı DNA konsantrasyonlarının buzağı ve insan genomik DNA örneklerinin izolasyonunda etkisi incelenmiş ve en uygun DNA derişimi her iki türdeki DNA için de 600 ng/μL olarak belirlenmiştir.
- Manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için farklı sorbent miktarlarının genomik DNA buzağı ve insan genomik DNA örneklerinin izolasyonunda etkisi incelenmiş ve en uygun sorbent miktarı her iki türdeki DNA için de 10 mg olarak belirlenmiştir.
- Tam kandan yapılan DNA izolasyonunda sorbent miktarının etkisi incelenmiştir. 10 mg monodispers gözenekli manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler için %42.9 izolasyon verimi ve %32.7 desorpsiyon verimi elde edilmiştir.
- İnsan genomik DNA'sı ve tam kandan izole edilen genomik DNA örneklerinin karakterizasyonu için yapılan PCR ve agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre izole edilen DNA örneklerinin bütünlüklerini koruduğu görülmüştür. Bu da elde izole edilen DNA'nın kalitesinin iyi düzeyde olduğunu ve kullanılan sorbent veya tampon çözeltiler nedeniyle herhangi bir deformasyona uğramadığının göstergesidir.

Yapılan tez çalışması sonucunda sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile farklı canlı türlerine ait genomik DNA örneklerinin izolasyon özellikleri incelenmiştir. Hem manyetik olmayan hem de manyetik TiO<sub>2</sub> mikroküreler için saf genomik DNA'dan yapılan izolasyon deneylerinde her iki TiO<sub>2</sub> formunun tatmin edici düzeyde DNA izolasyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu deneylerde belirlenen izolasyon şartlarında manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikroküreler ile tam kandan DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar sentezlenen monodispers gözenekli manyetik ve manyetik olmayan TiO<sub>2</sub> mikrokürelerin kesikli sistemde DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılan katı fazlara alternatif olarak sunulabileceğini göstermiştir.



## KAYNAKLAR

- [1] <https://prezi.com/dvk0hstox8fp/dna-izolasyonu/> (Mayıs, **2017**).
- [2] Chacon-Cortes, D., Griffiths, L.R., Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives, *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2, 1-9, **2014**.
- [3] Brown, T., *Introduction to Genetics: A Molecular Approach*, Garland Science, Taylor&Francis Group, USA, 11-29, **2012**.
- [4] Dilsiz, N., *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara, **2014**.
- [5] Turner, P.C, McLennan, A.G, Bates, A.D., White, M.R.H., *Moleküler Biyoloji*, (çev: Konuk, M.), Nobel Yayıncılık, **2004**.
- [6] Thermo Fisher Science, T042-Technical Bulletin Nanodrop spectrophotometers, Assessment of Nucleic Acid Purity, Wilmington, Delaware USA, <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (Nisan, **2017**).
- [7] samantha qiagin method (2). pdf, <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56cee1d564e9b228358b4574&assetKey=AS%3A332974873694218%401456398804997>
- [8] <https://www.labome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html> (Haziran, **2017**).
- [9] Günal, G., Kip, Ç., Öğüt, S.E., Usta D.D., Şenlik E., Kibar, G., Tuncel, A., Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica- and polymer-based stationary phases, *Materials Science and Engineering C*, 74, 10-20, **2017**.
- [10] Günal, G., Kip, Ç., Öğüt, S.E., İlhan, H., Kibar, G., Tuncel, A., Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-7, **2017**.
- [11] Tan, S.C., Yiap, B.C., DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 574398, **2009**.
- [12] <http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/dna-isolation-methods> (Haziran, **2017**).
- [13] Duarte, G.R.M., Price, C.W., Littlewood, J.L., Haverstick, D.M., Ferrance, J.P., Carrilhode, E., Landers, J.P., Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads, *The Royal Society of Chemistry*, 135, 531–537, **2010**.
- [14] Zhang, X., Wang, F., Liu, B., Kelly, E.Y., Servos, M.R., Liu, J., Adsorption of DNA Oligonucleotides by Titanium Dioxide Nanoparticles, *Langmuir*, 30, 830-845, **2014**.

- [15] Huang, H., Zhou, Y., Zhou, J., Feng, Y., Preparation and characterization TiO<sub>2</sub> microspheres for the liquid chromatography stationary phase, *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 5:4, **2014**.
- [16] Jiang Z.T, Zuo Y.M. Synthesis of porous titania microspheres for HPLC packings by polymerization-induced colloid aggregation, *Analytical Chemistry*, 73: 686- 688, **2001**.
- [17] Li Y.T., Li J., Wei Y.J., Wei Y., Hu Y.Z., Preparation and properties of Titania based supports for HPLC, *Chemical Research and Application*, 19: 882-885, **2007**.
- [18] Ellwanger, A., Matyska, M.T., Albert, K., Pesek, J.J., Comparison of octadecyl bonded titania phases, *Chromatographia*, 49: 424-430, **1999**.
- [19] Li Z.X., Kawashita M., Sol-gel synthesis and characterization of magnetic TiO<sub>2</sub> microspheres, *Journal of the Australian Ceramic Society*, 118: 467-473, **2010**.
- [20] Guo C.W., Cao Y., Xie S.H., Dai W.L., Fan K.N., Fabrication of mesoporous core-shell structured titania microspheres, *Chemical Communications*, 21: 700-701, **2003**.
- [21] Wu T.X., Liu G.M., Zhao J.C., Rhodamine B under Visible Light Irradiation in Aqueous TiO<sub>2</sub> Dispersions, *Journal of Physical Chemistry B*, 102: 5845-588-51, **1998**.
- [22] Mikkelsen, L.; Sheykhzade, M.; Jensen, K.; Saber, A.; Jacobsen, N.; Vogel, U.; Wallin, H.; Loft, S.; Moller, P. Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO<sub>2</sub>., *Particle and Fibre Toxicology*., 8, 32. **2011**.
- [23] Song, Y.Y., Schmidt-Stein, F., Bauer, S., Schmuki, P., Amphiphilic TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: An actively controllable drug delivery system. *Journal of American Chemical Society*, 131, 4230–4232, **2009**.
- [24] Auffan M., Pedeutour M., Rose J., Masion A., Ziarelli F., Borschneck D., Chaneac C., Botta C., Chaurand P., Labille J., Bottero J.Y., Structural Degradation at the surface of a TiO<sub>2</sub>-Based Nanomaterial Used in Cosmetics. *Environmental Science and Technology*, 44: 2689-2694, **2010**.
- [25] Winkler, J., Marme, S., Titania as a sorbent in normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 888: 51-62, **2000**.
- [26] Maier, N.,M, Franco, P., Lindner, W., Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *Journal of Chromatography A*, 906: 3-33, **2001**.
- [27] Zizkocsky, V., Kucera, R., Klimers, J., Dohnal, J., Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds, *Journal of Chromatography A*, 1189: 83-91, **2008**.
- [28] Xie, Y.B, Yuan, C.W, Li, X.Z., Photocatalytic degradation of X-3B dye by visible light using lanthanide ion modified titanium dioxide hydrosol system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 252: 87-94, **2005**.

- [29] Tani, K., Kubojima H., Separation of Inorganic Anions and Cations on Titania by Use of Acetic Acid-Sodium Acetate and Bicine-Sodium Hydroxide Buffers. *Chromatographia* 47: 655-658, **1998**.
- [30] Hamaloğlu K.Ö., *Synthesis And Catalytic Applications Of Metal Oxide Based Materials In Particulate Form*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [31] Ullattil, S.G., Periyat, P., Advances in Sol-Gel Derived Materials and Technologies, Sol-Gel Materials for Energy, Environment and Electronic Applications, Sol-Gel Synthesis of Titanium Dioxide 271-283, **2017**.
- [32] Toygun, Ş., Köneçoğlu G., Kalpaklı Y., General Principles of Sol – Gel, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 456-476, **2013**.
- [33] Caruso, R.A., Nanocasting and Nanocoating, *Topics in Colloid Chemistry I*, 226, 91-118, 2003.
- [34] Meyer, U., Larsson, A., Hentze, H.P., Caruso, R.A, Templating of porous polymeric beads to form porous silica and titania Spheres, *Advanced Materials*, 14, 1768-1772, 2002.
- [35] Dwivedi, C., Raje, N., Nuwad, J., Kumar, M., Bajaj, P.N., Synthesis and characterization of mesoporous titania microspheres and their applications, *Chemical Engineering Journal*, 193–194, 178–186, 2012.
- [36] Zhu, Y., Zhang, L., Gao, C., Cao, L., The synthesis of nanosized TiO<sub>2</sub> powder using a sol-gel method with TiCl<sub>4</sub> as a precursor, *Journal of Materials Science*, 35, 4049- 4054, 2000.
- [37] Shchukin, D.G., Caruso, R.A., Template Synthesis and Photocatalytic Properties of Porous Metal Oxide Spheres Formed by Nanoparticle Infiltration, *Chemistry of Materials*, 16, 2287-2292, 2004.
- [38] Cho Y.S., Shin, C.H., Han S., Dispersion Polymerization of Polystyrene Particles Using Alcohol as Reaction Medium, *Nanoscale Research Letters*, 11:46, 2016.
- [39] Lok, K.P., Ober, C.K., Particle size control in dispersion polymerization of polystyrene, *Canadian Journal of Chemistry*, 63(1): 209-216, **1985**.
- [40] Peng, B., Control over Colloidal Particle Morphology by Dispersion Polymerization, PhD Thesis, Utrecht University, the Netherlands, **2013**.
- [41] Xia, Y., Gates, B., Yin, Y., Lu, Y., Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications, *Advanced Materials*, 12, 693-713, **2000**.
- [42] Ugelstad, J., Soderberg, L., Berge, A., Bergstrom, J., Monodisperse polymer particles-a step forward for chromatography, *Nature*, 303, 95-96, **1983**.
- [43] Kawaguchi, S., Ito, K., Dispersiyon Polimerization, *Advanced in Polymer Science*, 175: 299-328, **2005**.
- [44] Tseng, C. M.; Lu, Y. Y.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W., Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerization in Alcohol, *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, 24, 2995-3007, **1986**.

- [45] Horak, D., Shapoval, P., Reactive Poly(Glycidyl Methacrylate) Microspheres Prepared by Dispersion Polymerization, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 38, 3855–3863, **2000**.
- [46] Elaissari, A., *Colloidal Polymers: Synthesis and Characterization*, Marcel Dekker, USA, **2003**.
- [47] Çamlı, T., Tuncel, M., Şenel, S., Tuncel A., Functional, Uniform, and Macroporous Latex Particles: Preparation, Electron Microscopic Characterization, and Nonspecific Protein Adsorption Properties, *Journal of Applied Polymer Science*, 84, 414–429, **2002**.
- [48] Kip, Ç., Maraş, B., Evirgen, O., Tuncel, A., A new type of monodisperse porous, hydrophilic microspheres with reactive chloroalkyl functionality: synthesis and derivatization properties, *Colloid&Polymer Science*, 292, 219–228, **2014**.
- [49] Levina, A. S., Repkova, M. N., Ismagilov, Z. R., Shikina, N. V., Malygin, E. G., Mazurkova, N. A., Zinov'ev, V. V., Evdokimov, A. A., Baiborodin, S. I., Zarytova, V. F., High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO<sub>2</sub>~DNA nanocomposites, *Scientific Reports*, 2, 756, **2012**.
- [50] Zhu, R.-R.; Wang, S.-L.; Zhang, R.; Sun, X.-Y.; Yao, S.-D., A novel toxicological evaluation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on DNA structure, *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 958–961, **2007**.
- [51] Suzuki, H., Amano, T., Toyooka, T., Ibuki, Y., Preparation of DNA-adsorbed TiO<sub>2</sub> particles with high performance for purification of chemical pollutants, *Environmental Science and Technology*, 42, 8076–8082, **2008**.
- [52] Toyooka, T., Amano, T., Suzuki, H., Ibuki, Y., DNA can sediment TiO<sub>2</sub> particles and decrease the uptake potential by mammalian cells, *Science of the Total Environment*, 407, 2143–2150, **2009**.
- [53] Amano, T.; Toyooka, T.; Ibuki, Y., Preparation of DNA adsorbed TiO<sub>2</sub> particles-Augmentation of performance for environmental purification by increasing DNA adsorption by external pH regulation, *Science of the Total Environment*, 408, 480–485, **2010**.
- [54] <http://www.bio-rad.com/en-us/product/t100-thermal-cycler> (Nisan, **2017**).
- [55] <http://www.gen-era.com.tr/elektroforez.html> (Nisan, **2017**).
- [56] Wang, J., Ali, Z., Wang, N., Liang, W., Liu, H., Li, F., Yang, H., He, L., Nie, L., He, N., Li, Z., Simultaneous extraction of DNA and RNA from *Escherichia coli* BL 21 based on silica-coated magnetic nanoparticles, *Science China Chemistry*, 58 (11), 1774–1778, **2015**.
- [57] Zhang, X., Wub, X., Peng, R., Li, D., Electromagnetically controlled microfluidic chip for DNA extraction, *Measurement*, 75, 23–28, **2015**
- [58] Jackson, K.R., Borba, J.C., Meija, M., Mills, D.L., Haverstick, D.M., Olson, K.E., Aranda, R., Garner, G.T., Carrilho, E., Landers, J.P., DNA purification using dynamic solid-phase extraction on a rotationally-driven polyethylene-terephthalate microdevice, *Analytica Chimica Acta*, 937, 1-10, **2016**.

- [59] Reynolds III, J.E., Josowicz, M., Vegh, R.B., Solntsev, K.M., Spectral and Redox Properties of the GFP Synthetic Chromophores as a Function of pH in buffered media, Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications, *The Royal Society of Chemistry*, 2013.
- [60] Günel G., *Silika ve Polimer Bazlı Mikrokürelerin DNA İzolasyon Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2016**.
- [61] Öğüt, S.E., *Manyetik ve Manyetik Olmayan Silika Bazlı Sabit Fazlar Kullanan DNA Mikroekstraksiyon Sistemlerinin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2017**.
- [62] Pohl, L., Marquard, K., Waitl, G., Reeh, U., Wipfelder E. Inorganic fillers and organic matrix materials whose refractive index is adapted, *Merck Patent GmbH*, WO, 93:25611, **1993**.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Merve Durmaz  
Doğum Yeri: Ankara  
Medeni Hali: Bekar  
E-posta: mervedurmaz@hacettepe.edu.tr  
Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü  
BEYTEPE/ANKARA

### Eğitim

Lise: Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi, Ankara  
Lisans: Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara  
Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

### Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce: İleri düzey

### İş Deneyimi

05/05/2017-devam ediyor Araştırma Görevlisi,  
Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya  
Mühendisliği Bölümü  
08/2013 – 09/2013 Baştaş Başkent Çimento Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
(Stajyer)  
07/2012 – 08/2012 TPAO, Ankara (Stajyer)

### Deneyim Alanları

- Polimer Bilimi ve Teknolojisi
- Mikro ve Nano Partikül Sentezi ve Karakterizasyonu
- DNA İzolasyonu

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

**Durmaz, Merve;** Usta, Duygu Deniz; Salimi, Kouroush; Kuban, Anıl; Tuncel, Ali; Monodisperse-porous titania microspheres with biomodal pore-size distribution as a new stationary phase for DNA microextraction, HPLC 2017, 45<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 18-22 June, **2017**.





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 29/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: Manyetik ve Manyetik Olmayan TiO<sub>2</sub> Bazlı Sabit Fazlar İle Genomik DNA İzolasyonu

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 61 sayfalık kısmına ilişkin, 29/06/2017 tarihinde şahsım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

29/06/2017  
Merve

**Adı Soyadı:** Merve Durmaz  
**Öğrenci No:** N14322935  
**Anabilim Dalı:** Kimya Mühendisliği  
**Programı:** Kimya Mühendisliği - Yüksek Lisans  
**Statüsü:**  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel

(Unvan, Ad Soyad, İmza)