

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜTÜN MOZAİK VİRÜSÜNÜN KALIP ETKİSİ İLE BİYOSENSÖR OLARAK
KULLANILABİLİR FULLEREN NANOKABLOLARIN HAZIRLANMASI

Çiğdem DÖNMEZ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Şubat

2007

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Çiğdem DÖNMEZ

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN danışmanlığında Çiğdem DÖNMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma 01.02.2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mehmet SAÇAK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Kezban ULUBAYRAM

İmza:

Üye: Prof. Dr. Figen ERKOÇ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Nejat AKAR

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜTÜN MOZAİK VİRÜSÜNÜN KALIP ETKİSİ İLE BİYOSENSÖR OLARAK KULLANILABİLİR FULLEREN NANOKABLOLARIN HAZIRLANMASI

Çiğdem DÖNMEZ

Ankara Üniversitesi
Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Nicotiana glutinosa bitkisi, Tütün Mozaik Virüsü (TMV) ile enfekte edildi. Ardından, enfekte tütün yapraklarından homojenizasyon, ardışık santrifüjleme/ultrasantrifüjleme sonrası saf virüs izole edildi.

İzole edilen TMV, fulleren ile çeşitli çözücüler varlığında etkileştirilerek virüsün protein kafesinin fulleren ile kaplanma düzeyleri geçirmeli elektron mikroskopisi yardımıyla incelendi.

Fullerenin, TMV yüzeyi ile etkileşim düzeyini arttırabilmek ve optimal kaplamayı temin etmek amacıyla, fullerenin karboksi türevi Bingel metodu yardımıyla sentezlendi. Karboksifullerenle sürdürülen araştırmalar sonucunda, fullerenin karboksilleme sonrasında tütün mozaik virüsüne olan affinitesinin arttığı ve daha iyi bir kaplanma gösterdiği belirlendi. Oluşturulan karboksifulleren-TMV nano yapılarında karboksifullerenin, virüsün dış yüzeyi boyunca düzenli bir dizilim göstererek “nanokablo” görünümü sergilediği belirlendi.

Çalışmanın son bölümünde, oluşturulan karboksifulleren nanokablolara piezoelektrik kuartz kristal yüzeylere kaplanarak, bir kristal mikrobalsan sisteminde glukoz sensörü olarak kullanılabilirliği test edildi.

2007, 66 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Biyonanokalıplama, Tütün Mozaik Virüsü, Fulleren, Karboksifulleren, Biyosensör, Kuartz Kristal Mikrobalsan, Nanobiyoteknoloji.

ABSTRACT

Master Thesis

FABRICATION OF FULLERENE NANOCABLES FOR BIOSENSOR APPLICATIONS USING TOBACCO MOSAIC VIRUS AS A TEMPLATE

Çiğdem DÖNMEZ

Ankara University
Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Nicotiana glutinosa plant was infected with Tobacco Mosaic Virus. Then, the pure virus was isolated from the infected leaves of tobacco with homogenisation followed by centrifugation/ultracentrifugation.

The isolated TMV was reacted with fullerene in the presence of different solvents in order to observe the coating behaviour of the virus cage with fullerene, via transmission electron microscopy.

In order to increase the affinity of fullerene to the TMV protein cage and obtain an optimal coating, the carboxy derivative of fullerene was synthesized by the Bingel method. Experiments performed with carboxyfullerene demonstrated that the affinity of fullerene to TMV increased after carboxylation; thus a better coating could be obtained. On the carboxyfullerene-TMV nano materials produced, carboxyfullerene was assembled in a more controlled manner through the virus protein cage forming a so called 'nano-cable' structure.

In the last part of the study, the produced carboxyfullerene nanocables were coated on piezoelectric quartz crystal surfaces and tested as a potential glucose biosensor using the quartz crystal microbalance system.

2007, 66 Pages

KEY WORDS: Bionanotemplating, Tobacco Mosaic Virus, Fullerene, Carboxyfullerene, Glucose Biosensor, Quartz Crystal Microbalance, Nanobiotechnology.

TEŞEKKÜR

Tezimi oluşturmam ve çalışmalarımı yürütmemde bana yön veren ve destek olan değerli hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Geçirmeli elektron mikroskobu görüntülerini almamda bana yardımcı olan Ankara niversitesi'nden Uzman Kadir TUNCEL'e, AB Erasmus ğrenci Değişimi programı çerçevesinde bulunduğum Albert-Ludwigs Üniversitesi (Freiburg, Almanya)'nden Dr.Thomas NANN ve Dr. Ralf THOMANN'a,

Katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Eser ELÇİN, Yrd. Doç. Dr. Selen BİLGE ve Arş. Gör. şükran şEKER'e,

Ve her zaman destekleriyle yanımda olan Aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Çiğdem DÖNMEZ

Ankara, şubat 2007

Bu tez alışması, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nün BİBAP 2005/169 numaralı lisansüstü tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET..	i
ABSTRACT.....	..ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1 GİRİŞ..	1
1.1 Çalışmanın Kapsamı	1
1.2 Kaynak Özetleri.....	2
1.2.1 Nanoteknoloji	2
1.2.2 Nanoteknoloji’de üretim yöntemleri.....	3
1.2.3 Biyolojik Kalıp Kullanma Yaklaşımı	4
1.2.4 Tütün Mozaik Virüsü (TMV)	7
1.2.5 TMV’nin Biyolojik Nanokalıp Olarak Kullanımı	12
2. KURAMSAL TEMELLER.....	21
2.1 Fullerenler ve Genel Özellikleri	21
2.2 TMV’nin Kalıp Etkisi ve Fullerenler	23
2.3 Fulleren Türevleri ve Biyolojik Uygulamaları.....	25
2.4 Fullerenler ve Biyosensör Uygulamaları	25
2.4.1 Kuartz Kristal Mikrobalems Sistemi	26
2.4.1.1 Piezoelektrisite.....	26

2.4.1.2 Piezoelektrik biyosensörler	27
2.4.1.3 Kuartz Kristal Mikrobalans sensör sistemi	27
2.4.1.4 Sauerbrey Eşitliği.....	28
2.4.1.5 Kuartz Kristal Mikrobalans Sistemi ile Glukoz tayini ve Fulleren	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Kimyasal ve Reaktifler	30
3.2 Yöntem.....	31
3.2.1 Tütün (<i>Nicotiana glutinosa</i>) Bitkisine Tütün Mozaik Virüsünün Aşılması.....	31
3.2.2 Tütün Mozaik Virüsünün (<i>Nicotiana glutinosa</i>) Bitkisinden Saflaştırılması	32
3.2.3 Fullerenin Karboksi Türevinin Sentezlenmesi	33
3.2.4 Fullerenin Geçirmeli Elektron Mikroskobuyla görüntülenmesi	35
3.2.5 Karboksifullerenin Geçirmeli Elektron Mikroskobuyla görüntülenmesi	35
3.2.6 TMV'nin Geçirmeli Elektron Mikroskobuyla görüntülenmesi.....	35
3.2.7 Farklı çözücüler içinde TMV'nin Fulleren ile etkileştirilmesi	35
3.2.7.1 TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	35
3.2.7.2 TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	36
3.2.7.3 TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	36
3.2.7.4 TMV'nin 11- Merkaptoundekanoik asit ve NaOH içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	36
3.2.7.5 TMV'nin Kloroform içinde Fullerenle etkileştirilmesi	36
3.2.7.6 TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	37
3.2.8 TMV'nin farklı pH'larda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi.....	37
3.2.8.1 TMV'nin saf su içinde Karboksifulleren ile etkileştirilmesi.....	37
3.2.8.2 TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi	37
3.2.9 Karboksifulleren ile kaplanmış TMV'nin QCM sisteminde uygulanması	37
3.2.9.1 Enzim İmmobilizasyonu	38

3.2.9.1.1 Elektrospin yöntemi	38
3.2.9.1.2 Kaplı tabakalar üzerine enzimin immobilizasyonu.....	39
3.2.9.1.3 Glukoz çözeltisinin hazırlanması.....	39
3.2.9.1.4 Glikonik asidin Karboksifulleren - TMV kaplı PZ- QCM kristali yardımıyla tayini	40
3.2.10 Glikonik asidin TMV olmaksızın Karboksifulleren ile kaplı kristal yardımıyla tayini	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1 Geçirmeli Elektron Mikroskop İncelemeleri	41
4.1.1 Fullerenin Geçirmeli Elektron Mikrografi	41
4.1.2 Karboksifullerenin Geçirmeli Elektron Mikrografi.....	41
4.1.3 TMV'nin Geçirmeli Elektron Mikrografi	42
4.1.4 Farklı çözücüler içinde TMV'nin C ₆₀ ile etkileştirilmesi sonucunda oluşan yapılar	43
4.1.4.1 TMV'nin 9- Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	43
4.1.4.2 TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	44
4.1.4.3 TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	45
4.1.4.4 TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit ve NaOH içinde C ₆₀ ile etkileştirilmesi.....	46
4.1.4.5 TMV'nin Kloroform içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	47
4.1.4.6 TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi	47
4.1.5 TMV'nin farklı pH'larda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi	48
4.1.5.1 TMV'nin saf su içinde Karboksifulleren ile etkileştirilmesi	48
4.1.5.2 TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi	49
4.2 Karboksifulleren ile kaplanmış TMV'nin QCM sistemine uygulanması.....	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
APTES	Aminopropiltrietoksisilan
C ₆₀	Buckminster fulleren
DMAB	Dimetilaminoboran
DMF	Dimetilformamid
EDTA	Etilendiamin-tetraasetik asit
GOx	Glukoz oksidaz; β -D-glukoz, oksijen-1-oksidoredüktaz
MUA	11-Merkaptoundekanoik asit
PEG	Poli(etilen glikol)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik) asit
PVC	Poli(vinil klorür)
QCM	Kuartz Kristal Mikrobals
TEM	(<i>Transmission</i>) Geçirmeli Elektron Mikroskobu
TEOS	Tetraetoksisilan
THF	Tetrahidrofuran
TMV	Tütün Mozaik Virüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.2.1 Nano ölçekte üretim yöntemleri	3
Şekil 1.2.2 Bakteriyel S tabakası kalıp olarak kullanılarak yapılan 5 nm boyutundaki altın nanoparçacıklar	4
Şekil 1.2.3 Kalıp olarak (a) <i>Aspergillus niger</i> hifi kullanılarak oluşturulan altın nanokablo (b) DNA kullanılarak oluşturulan gümüş nanokablolar	5
Şekil 1.2.4 Nanokalıp olarak kullanılan bazı bitki virüsleri	6
Şekil 1.2.5 TMV partiküllerinin geçirmeli elektron mikroskobu görüntüleri	7
Şekil 1.2.6 TMV'nin elektron mikroskobunda çekilmiş mikrografi ve şematik gösterimi.....	8
Şekil 1.2.7 (a) TMV'nin kendiliğinden bir araya gelen kılıf proteini ve RNA yapısı, (b) TMV'nin 40 Å çapındaki iç boşluğu ve 90 Å yarıçapındaki protein kılıfının yandan görüntüsü	9
Şekil 1.2.8 TMV geçirmeli elektron mikroskobu (TEM-400kV) görünümü: (a) 300 nm boyunda 18 nm genişliğinde bütün virüs partikülü (uranil asetatla boyalı), (b) 80 nm boyundaki virüs parçası ve sol üst köşede virüs parçasının enine kesiti.....	9
Şekil 1.2.9 TMV virüsü. (a) TMV bileşenlerinin model görünümleri: Protein iskeleti çizgi halinde, α -heliks ve RNA halkaları sarı, karboksil yan zincirler kırmızı, amino yan zincirler ise mavi ile gösterilmektedir. Tek bir protein alt biriminin modeli: 1-Kanalın içi, orta kısım, dış virüs yüzeyi-son dört amino asit, Gly(Ser)-Pro-Ala-	

Thr-COOH, kırmızı nokta ile gösterilmektedir. 2- 4 adet (rigid) α -heliks yapısı 3-esnek sarmal. (b) 130 helikal dönüşün 3üne karşılık gelen 49 protein alt biriminin modeli, (COOH ucundaki son dört amino asit gösterilmemiştir). (c) TMV kılıf proteini dış yüzeyi 1- Kılıf proteininin amino ve karboksil uçlarına yakın bölgedeki amino asitlerinden oluşmuştur. 2- Kılıf proteininin sıkıca paketlenmiş ana gövdesi. 3- Amino asit sarmallarından oluşan iç kanal yüzeyi. 4- Genellikle su ile dolu olan iç kanal boşluğu 10

Şekil 1.2.10 TMV amino asit artıkları (kırmızı), mavi renkteki bölgeler yüzeyi değiştirmeyen ve immünolojik olarak saptanamayan bölgeleri ve turuncu alan ise bir protein altbirimi ile temas eden RNA bölgesini göstermektedir 11

Şekil 1.2.11 (a) TMV'nin enfekte ettiği tütün bitkisi. (b) TMV'nin TEM görüntüsü 11

Şekil 1.2.12 TMV'nin dört alt biriminin elektrostatik yüzey potansiyelleri, virüs eksenine dik olarak içten görüntüsü. Negatif yüklü alanlar kırmızıyla, pozitif yüklü alanlar mavi ile işaretlenmiştir 13

Şekil 1.2.13 Yoğun bir şekilde mineralize olmuş PBS/TMV nanotüp kompozitini gösteren TEM mikrografı. İç mikrograf: TMV dış yüzeyine bağlı PBS nanokristalinin yüksek çözünürlükte tek bir alanda “kafes örgüsü” görüntüsü 14

Şekil 1.2.14 TMV sıvı kristal kalıpları kullanılarak düzenli mezoyapıdaki silika yapıların sentezinin şematik gösterimi.....15

Şekil 1.2.15 TMV–silika nanopartiküllerin TEM mikrografı.....16

Şekil 1.2.16 Radyal kanallı mezoyapılı silika nanopartiküllerin şematik oluşum mekanizması17

Şekil 1.2.17 Radyal olarak desenlendirilmiş silika -TMV nanopartiküllerin TEM görüntüsü17

Şekil 1.2.18 Tütün Mozaik Virüsü kılıf proteini üzerine yerleştirilen sistein kalıntıları 18

Şekil 1.2.19 Gümüş metal parçacıkları ile kaplanmış TMV2cys TEM mikrografları 19

Şekil 1.2.20 (a) Palladyum parçacıklarıyla kaplı TMV2cys'in TEM mikrografı. Alt görüntü: Daha yüksek büyütmedeki Pd ile kaplı TMV2cys mikrografı, (b) TMV2cys kalıbı üzerinde birikmiş palladyum parçacıklarının TEM mikrografı (ölçek çubuğu: 50 nm), (c) Modifiye edilmemiş yabani tip TMV'nin palladyum ile kaplanmış TEM mikrografı. Oklar, yaban tipteki TMV parçacıklarının etrafında ve aralarında biriken palladyumları işaret etmektedir. (d) Yaban tipte TMV parçacıklarının Pd ile muamele edildikten sonraki TEM mikrografı.....20

Şekil 2.1.1 Fullerenlerin yapıları: (a) C₆₀, (b) C₇₀, (c) Nanotüp 21

Şekil 2.1.2 (a) Kristal haldeki C₆₀ (b) C₆₀'ın boyutunu ve bağ uzunluklarını gösteren şema..21

Şekil 2.2.1 Fullerenin verebildiği reaksiyonları gösteren genelleştirilmiş şema 24

Şekil 2.3.1 Metanofullerenin yapısı 25

Şekil 3.3.1 *Nicotiana glutinosa* bitkisi, TMV'nin enfekte ettiği tütün yaprağı ve izole edilmiş TMV'nin TEM görüntüleri.....31

Şekil 3.4.1 Bingel reaksiyonu, (a) reaksiyon şeması (b) Fullerenin bir malonat esteri ve sodyum hidrür ile toluen içinde ve oda sıcaklığında verdiği reaksiyon.....33

Şekil 3.4.2 Karboksifullerenin şematik gösterimi 34

Şekil 3.4.3 C₆₀ küresi üzerindeki ikili karboksil gruplarını gösteren karboksifulleren yapıları 34

Şekil 3. 8.1 Elektrospin sisteminin şematik gösterimi	38
Şekil 4.1 Fullerenin TEM mikrografı, fulleren kümeleri	41
Şekil 4.2 Fullerenin TEM mikrografı, tek bir fulleren kümesi	41
Şekil 4.3 Kümeler halinde bir araya toplanmış karboksifullerenin TEM mikrografı	42
Şekil 4.4 Çıplak TMV'nin TEM mikrografı.....	42
Şekil 4.5 TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar TMV üzerindeki fulleren kümelerini göstermektedir.....	43
Şekil 4.6 TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda farklı büyütmelelerde alınan TEM mikrografı; oklar TMV üzerinde biriken fulleren kümelerini göstermektedir.....	44
Şekil 4.7 TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirildikten sonra alınan TEM mikrografı; oklar: TMV üzerinde biriken C ₆₀ kümeleri	44
Şekil 4.8 (a) TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı, (b) yüksek büyütmedeki görüntü (beyaz oklar: TMV partikülü, siyah oklar: TMV etrafında biriken C ₆₀ kümeleri)	45
Şekil 4.9 Fullerenin 11-Merkaptoundekanoik asit ile muamelesi ve ardından bazik ortamda TMV ile etkileştirilmesi sonrası alınan TEM mikrografı.....	46
Şekil 4.10 TMV'nin Kloroform içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar: TMV üzerinde biriken fulleren kümeleri	47
Şekil 4.11 TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı	48

Şekil 4.12	TMV'nin suda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar: TMV üzerinde birikmiş tipik karboksifulleren kümeleri.....	49
Şekil 4.13	TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı. İşaretli bölgeler, karboksifulleren ile kaplanmış TMV'leri göstermektedir	50
Şekil 4.14	TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı, beyaz oklar: Karboksifulleren ile kaplanmış TMV yapıları	50
Şekil 4.15	TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografları; oklar TMV üzerine kaplanmış karboksifulleren yığınlarını göstermektedir	51
Şekil 5.1	(a) TMV'nin kaplanmadan önceki çıplak hali, (b) 9-deken1-ol, (c) 3-merkaptopropiyonik asit, (d) 3-merkaptopropiyonik asit ve NaOH, (e) kloroform, (f) 11-merkaptoundekanoik asit ve (g) 1,5-pentanditiyol içinde fulleren ile etkileştirilmesi sonucu kaplanma düzeylerinin TEM mikrograflarından yararlanılarak hazırlanmış şematik gösterimi.....	56
Şekil 5.2	TMV'nin (a) pH 7'de, (b) pH 9'da karboksifulleren ile etkileştirilmesinin ardından elde edilen kaplanmanın şematik gösterimi.....	57
Şekil 5.3	Fulleren küresinin TMV protein kılıfı üzerinde bulunan bazı amino asit artıkları ile birlikte 'muhtemel' konumlarının gösterimi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. TMV'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri	8
Çizelge 2. C ₆₀ 'ın farklı çözücülerdeki çözünürlük değerleri	23
Çizelge 3. Saf TMV süspansiyonun elde edilmesinde izlenecek deneysel yolların şematik gösterimi	32
Çizelge 4. Karboksifulleren ile kaplı TMV'nin QCM sisteminde yüzey kaplama maddesi olarak uygulanması sonucunda elde edilen frekans değişimleri.....	52
Çizelge 5. Karboksifullerenin tek başına QCM sisteminde yüzey kaplama maddesi olarak uygulanması sonucunda elde edilen frekans değişimleri	53

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Kapsamı

Tanımlı boyut ve düzende “Nanomoleküler Desenleme” çalışmaları malzeme bilimi ve elektronikte giderek küçülen boyutlara ulaşma açısından son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Biyolojik moleküllerin ve supramoleküler türevlerinin elektrostatik ve topolojik yapıları, iyi tanımlanmış yüzey boyutları ve çeşitli kimyasal, biyolojik ve fiziksel özellikleri, nano yapıdaki organik ve inorganik bileşiklerin sentezinde kullanılmalarına olanak sağlamıştır. Bu yöndeki çalışmalar biyolojik moleküllerin nanoteknolojide kullanımını dikkat çekici bir araştırma ve teknoloji alanı haline getirmiştir. Çeşitli biyolojik moleküller, multifonksiyonel nanoyapıların geliştirilmesinde ya da farklı nano-mikro yapılar arasında bağlantı oluşturmada yapıtaşı olarak kullanılabilir. Nanomalzeme yapımında biyomoleküler yönlendirme ile nanopartikül organizasyonu, yani biyolojik kalıp kullanma tekniği, basitlik ve şekil kontrolü açısından alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir.

“Biyolojik Nanokalıp” kullanma yaklaşımında daha önce lipidler ve bakteriyel lifler üzerinde mineralizasyon ya da fotokimyasal polimerizasyon, DNA’ya dayalı nanokristal organizasyon metotları ve ferritin kullanılarak iki boyutlu array üretimi çalışmaları denenmiştir. Ayrıca bakteriyel hücre yüzeyi proteinleri, nano ve mikrometre boyutlu nükleik asit bileşenleri de nanopartiküllerin oluşturulmasında ve supramoleküler yapılanmada kullanılmıştır. Son zamanlarda da virüsler, aktin filamentleri ve bakteriyel flagella gibi kendiliğinden bir araya gelen supramoleküler protein birlikteliklerinin kullanıldığı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada; Tütün Mozaik Virüsü(TMV) nano-kalıp olarak kullanılarak fulleren ve karboksifulleren ile potansiyel nanoteknolojik uygulama alanlarına yönelik hibrit nanoyapılar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu nanoyapılar Kuartz Kristal Mikrobals sisteminde sensör yüzeyi olarak denenmiş ve biyosensör uygulamalarında biyosensör yüzey malzemesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Tütün Mozaik Virüsü; dış yüzeyindeki protein zincirinde fonksiyonel gruplar bulunması, iki ucu açık tüp şeklinde oluşu, yüksek en-boy oranı, kararlı yapısı, bitki materyalinden kolaylıkla

ve bol miktarda elde edilebilirliği ve iyi bilinen fiziksel - kimyasal özellikleri nedeniyle çalışmada biyolojik nano-kalıp olarak seçilmiştir.

Kaplama malzemesi olarak ise sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle fulleren (C_{60}) ve türevleri kullanılmıştır. Fullerenler, elektronları iyi delokelize edebildiği için ve sınır yüzey formüllerinde elektron boşluğu bulundurduğu için, nükleofilik özelliklerine bağlı olarak başka gruplarla reaksiyon verebilirler. Bu reaksiyonlar incelendiğinde, C_{60} 'ın TMV üzerindeki protein zincirinin sonlandırıcı fonksiyonel grupları (-OH, -COOH, -NH₂) ile reaksiyon verebileceği tahmin edilebilir .

Çalışma sonuncunda elde edilen fulleren-TMV hibrit nano yapıları da fullerenin glikonik asit ile spesifik olarak etkileşebilme özelliğinden yararlanılarak glukoz tayini için Kuartz Kristallerin yüzeyine uygulanmış ve Kuartz Kristal Mikrobalans biyosensör sisteminde yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır. TMV sayesinde fullerenler sensör yüzeyinde düzenli olarak yanyana dizilmiş ve glikonik asit ile kontrollü bir etkileşim sağlanmıştır.

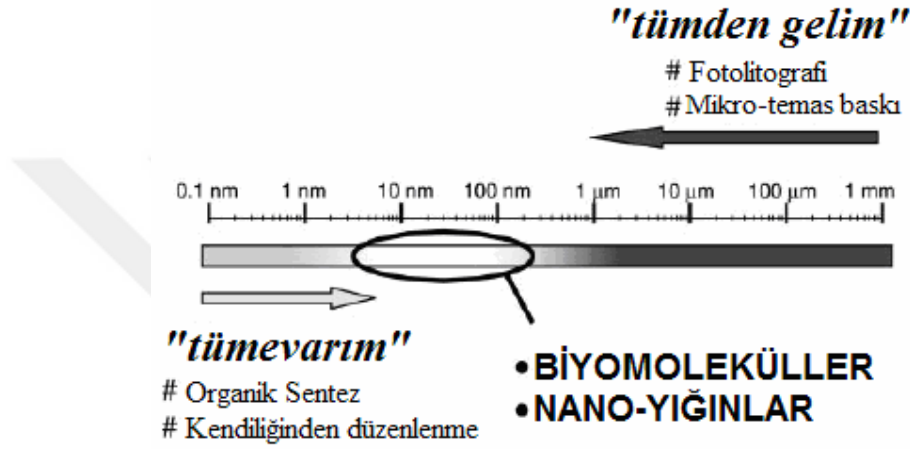
1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, malzemenin mümkün olan en küçük ölçekte (atomik ya da moleküler düzeyde) sentezlenmesi ve fonksiyonel hale getirilmesi olarak tanımlanabilir. Bir nanometrede ancak 3 veya 5 adet atom bulunabilir. Nano boyutta malzemeler (en az bir düzleminin boyutu 1-100 nm aralığında olan) genellikle normalde sahip oldukları alışılmış özelliklerinin dışında bir takım farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergiler. Bu yüzden nanoteknoloji, atom ya da molekülleri tek tek bir araya getirerek ya da düzenleyerek temelde farklı, yeni özellik ve fonksiyona sahip malzemelerin sentezini olanaklı kılar.

1.2.2. Nanoteknoloji’de üretim yöntemleri

Nano ölçekte malzeme sentezinde iki temel yöntem kullanılır. Bunlardan birincisi bottom-up (tek tek atomlardan yola çıkarak yeni bir yapı inşa etme-tümevarım), diğeri ise top-down (mevcut yapı üzerinden kontrollü eksiltmeler ve atomik boyutta düzenlemeler yaparak yeni yapıyı oluşturma-tümdengelim) üretim yöntemidir (Şekil 1.2.1).



Şekil 1.2.1. Nano-ölçekte üretim yöntemleri

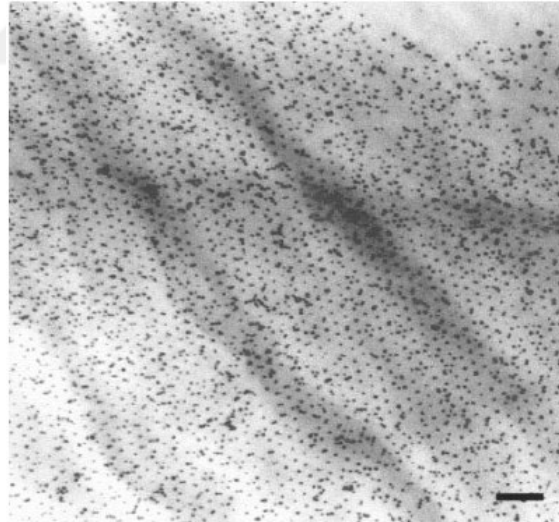
Şekil 1.2.1’de bahsedilen tekniklerden kendiliğinden düzenlenme (*self-assembly*) moleküler algıya dayanır. Moleküler algılama, iki molekül arasında kovalent bağlanma olmaksızın biyolojik sistemlerdeki supramoleküler düzenlenme bazında oluşan etkileşimler olarak tanımlanabilir (Lindoy vd. 2000). Elektrosatik etkileşim, hidrojen bağı, host-guest (konak - konuk) etkileşimleri ve π - π etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimler moleküler algılamada büyük önem taşımaktadır (Whitesides vd. 2002 ve Stupp vd. 1997). Nisbeten zayıf olmalarına karşın, bu multivalent ve yön bağımlı etkileşimler moleküllerin kendiliklerinden kompleks, hiyerarşik, tanımlı ve fonksiyonel yapılar halinde düzenlenmesine olanak tanır.

Kovalent olmayan etkileşimler, moleküler algılama grupları ile yüzey modifikasyonları oluşturmada, yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini dilediğimiz şekilde kontrol etmemizde yardımcı olan esnek ve kullanışlı bir araçtır. Böyle zayıf ve yöne bağımlı etkileşimler sadece yüzey modifikasyonunu değil, aynı zamanda fonksiyonel yüzeyler oluşturularak sensörlerden nano-ölçekli kataliz sistemlerine kadar bir çok nanoteknolojik uygulamayı mümkün kılmaktadır.

1.2.3. Biyolojik Kalıp Kullanma Yaklaşımı

Biyolojik sistemler, nanoskopik yapıtaşlarının çok çeşitli şekillerde ve oldukça kontrollü olarak yerleştirilmesine elverişli, gelişmiş mezoskopik ve makroskopik yapılar oluştururlar. Doğadan alınan kalıplar kullanılarak, kataliz, fotonik ve elektronik uygulamaları, istenilen boyutlarda inorganik materyallerin tasarlanması, nano boyutlarda düzenleme ve -kontrol gücüne rağmen- çeşitli biyomimetik çalışmalar yapılmaktadır.

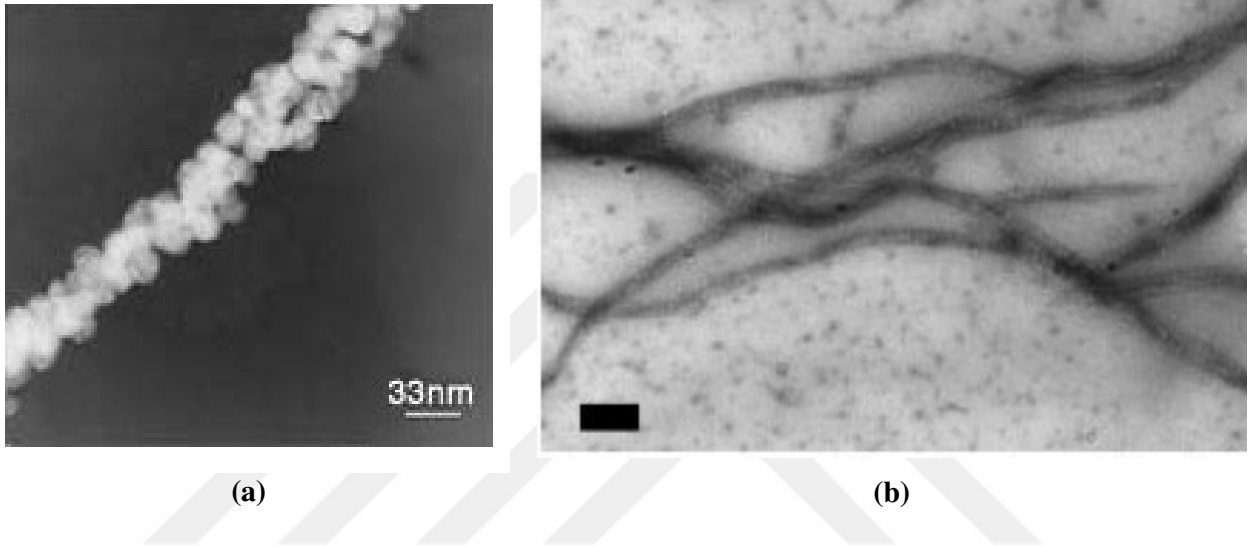
Mikroorganizmalar (virüsler, bakteriler ve mayalar), özgün ve ilginç yapısal motiflere sahip olmalarının yanı sıra, hızlı ve düşük maliyetle üretilibilmeleri nedeniyle materyal sentezinde kalıp olarak kullanılmaya oldukça elverişlidirler (Şekil 1.2.2) (Bittner 2004). Biyomoleküler yapıların diğer bir avantajı da mezoskopik düzenleri ve değişik simetrileri sayesinde sentetik kalıplarla oluşturulamayan gözenekli yapıların oluşturulmasına olanak tanımalarıdır (Davis vd. 2003).



Şekil 1.2.2. Bakteriye S tabakası kalıp olarak kullanılarak yapılan 5nm boyutundaki altın nanoparçacıklar. Ölçek çubuğu: 100 nm (Hall vd. 2001)

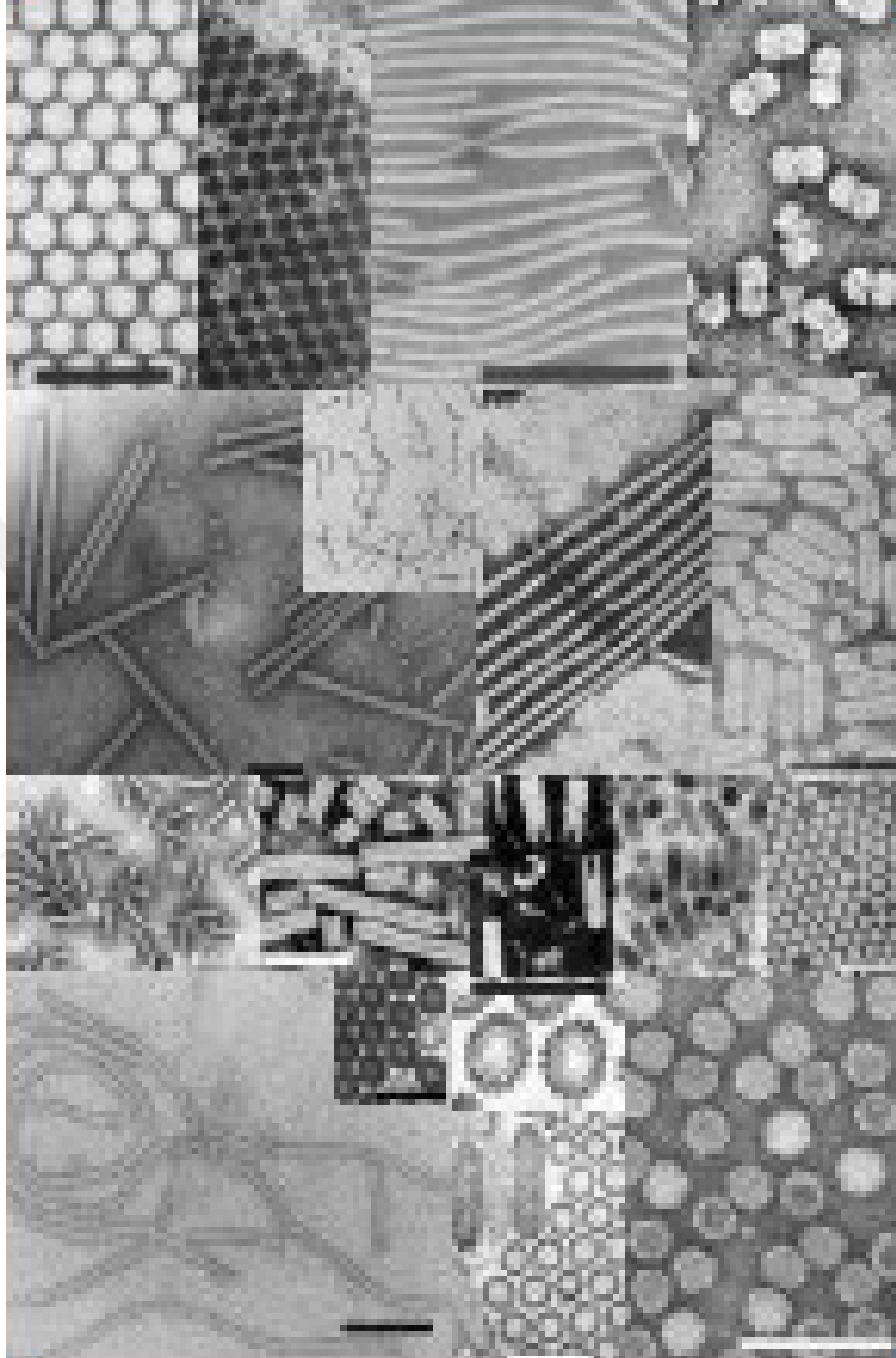
Mikroorganizmalar yardımıyla materyal sentezlemeye örnek olarak; bakteriler tarafından demir oksitlerin oluşumu, siyanobakterilerde kalsifikasyon, diatomelerde silika birikimi, bakteri, liken ve mantarlarda oluşturulan diğer biyojenik mineraller verilebilir (Şekil 1.2.3-a) (Bauerlein. 2003). Diğer örnekler ise, metal iyonlarının membran proteinlerine bağlanması,

DNA (Eichen vd. 1998) (Şekil 1.2.3-b), virüs protein iskeletleri (Flynn vd. 2003), ya da nanopartikül büyümesini sağlamak için nükleasyon bölgeleri oluşturmak üzere düzenli protein düzenlemelerinin ve bakteriyel, fungal ve viral (Li vd. 2003) türlerin iç yüzeyinde metal iyonlarının biyoindirgenmesi yoluyla metalik nanokristallerin sentezlenmesi olarak sayılabilir



Şekil 1.2.3 Kalıp olarak (a) *Aspergillus niger* hifi kullanılarak oluşturulan altın nanokablo (Li vd. 2003) (b) DNA kullanılarak oluşturulan gümüş nanokablolar Ölçek çubuğu: 100 nm (Liu vd. 2003).

Virüs protein iskeletleri, çok çeşitli boyut ve şekillere sahip olup, iskelet içine ulaşımı sağlayan yapısal geçişleri bulunur. Ayrıca, viral protein iskeleti üzerindeki yükün değiştirilmesiyle yeni ve farklı bir kimyasal aktivitenin temin edilebilirliği, virüs kullanımında esneklik sağlamaktadır. Bu da, virüslerin nano-sentez çalışmalarında daha geniş kullanımına imkân tanımaktadır (Şekil 1.2.4) (Douglas vd. 2002). Nanoteknolojik çalışmalarda kullanılan bazı virüsler; cowpea klorotik mottle virüsü (Douglas ve Young. 1998), brom mozaik virüsü (Dragnea vd. 2003) ve tütün mozaik virüsüdür (Dujardin vd. 2003, Knez vd. 2002, 2003, 2004, Yi vd.2005).



Şekil 1.2.4. Nanokalıp olarak kullanılan bazı bitki virüsleri

1.2.4. Tütün Mozaik Virüsü (TMV)

Tütün Mozaik Virüsü (TMV) çubuğa benzer şekli, sahip olduğu protein kapsidi, yüksek en-boy oranı ve gösterdiği kalıp etkisi nedeniyle kullanılan bir biyomalzemedir (Şekil 1.2.5).

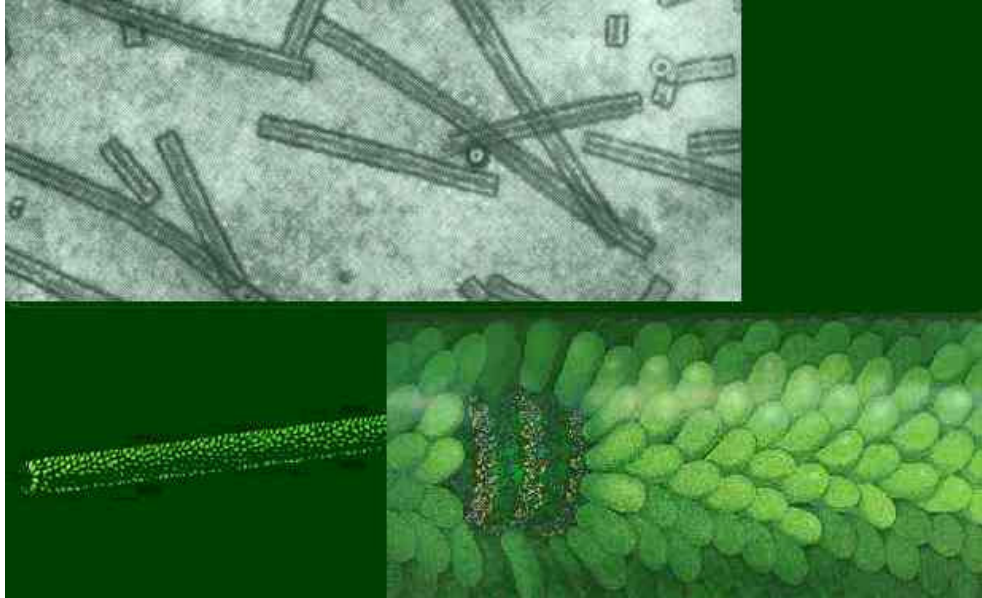


Şekil 1.2.5. TMV partiküllerinin TEM görüntüleri (büyütme mertebesi: X 300.000)

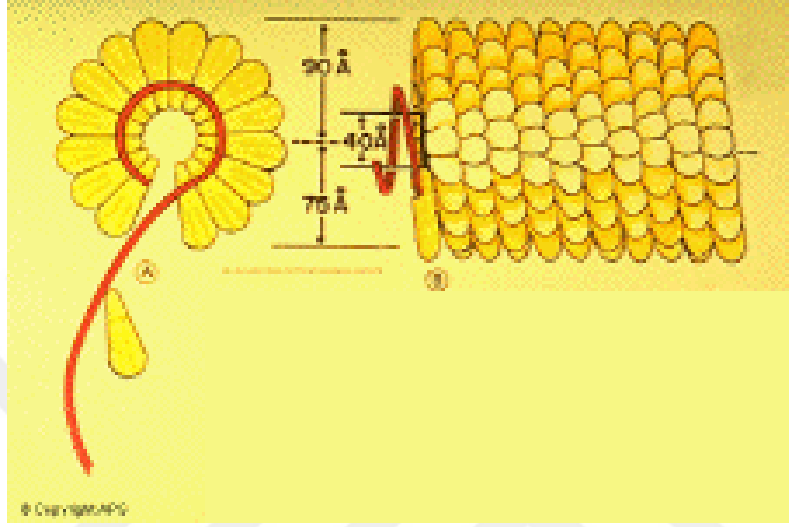
TMV, 6.5 kb boyutunda RNA genomuna sahip prototipik tobamovirüstür (Şekil 1.2.6) (Lauffer vd. 1963). Virüs, 18 nm çapında, 300 nm uzunluğunda ve 4 nm çaplı iç boşluğu bulunan sert bir çubuk şeklindedir (Şekil 1.2.7-8) (Namba vd. 1989). Supramoleküler protein topluluğundan oluşan virüsün iç ve dış yüzeyleri glutamat, aspartat, arjinin ve lizin gibi tekrarlanan yüklü amino asit kalıntılarından oluşur ve bu kalıntılar yüzey kontrollü biyomineralizasyon için çeşitli nükleasyon bölgeleri oluşturur (Şekil 1.2.9) (Sander 1995). Virüs alışılmadık biçimde kararlıdır ve çeşitli koşullar altında manipüle edilebilir. 17.5 kDa boyutundaki 2130 özdeş kılıf protein altbirimi sağ el sarmal biçiminde düzenlenmiştir ve dönüş başına $16 \frac{1}{3}$ alt birim içerir (Klug 1999, Stubbs 1999). Protomerik kılıf proteininin yapısı tanımlanmıştır ve virüsün dış yüzeyinde kimyasal modifikasyona yatkın üç potansiyel bölge olduğu bulunmuştur. Bunlar N ve C terminalleriyle 63-66 dönüş bölgesidir. Virüsün diğer kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 1’de verilmektedir.

Çizelge 1. TMV'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri .

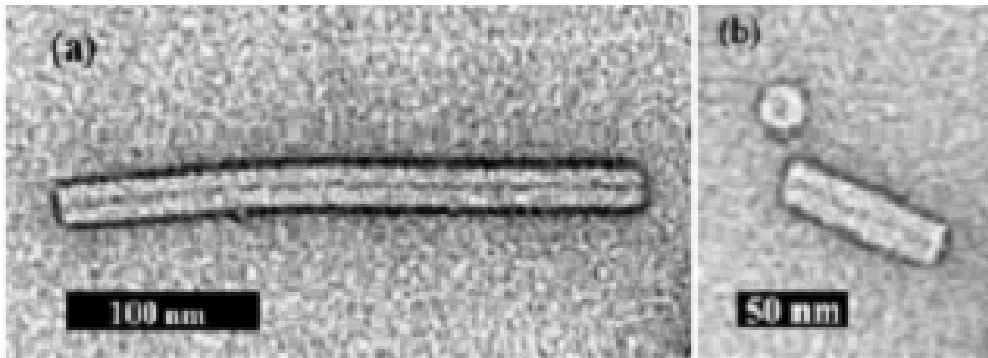
- Yoğunluk 1.325 g/cm^3 (CsCl içinde)
- Sedimentasyon katsayısı ($S_{20,w}$) (sonsuz seyrelmede)
- İzoelektrik pH= 3.5
- Molekül ağırlığı: 39.4×10^6 dalton.
- Diffüzyon katsayısı ($D_{20,w}$): $4.4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sn}$
- Kısmi spesifik hacim: $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$
- Ekstinksiyon katsayısı: ($A_{0.1,1\text{cm}}$) (260nm 'de ışık dağılımı için düzeltilmemiş) 2.7 - 3.5 arası
- Elektronik mobilite (iyonik şiddet 0.075 ve pH 6.5-7.9 arası): $-0.83 (\mu\text{m}/\text{sec})/(\text{V}/\text{cm})$
- A_{260}/A_{280} : 1.19
- Tek sarmallı RNA molekülü içerir
- Toplam genom uzunluğu 6395 nt



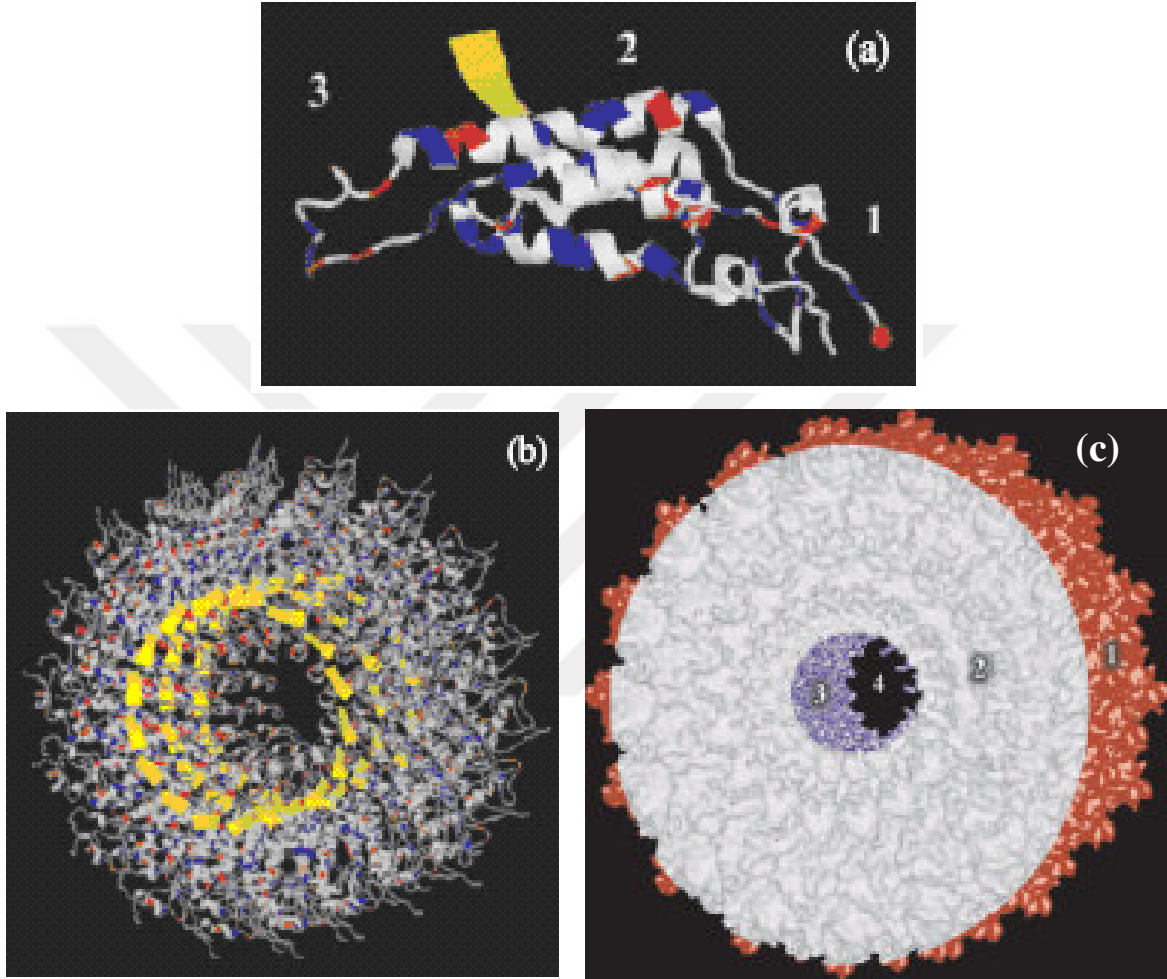
Şekil 1.2.6. TMV'nin elektron mikroskobunda çekilmiş mikrografı ve şematik gösterimi.



Şekil 1.2.7. (a)TMV'nin kendiliğinden bir araya gelen kılıf proteini ve RNA yapısı, (b) TMV'nin 40 Å çapındaki iç boşluğu ve 90 Å yarıçapındaki protein kılıfının yandan görüntüsü.

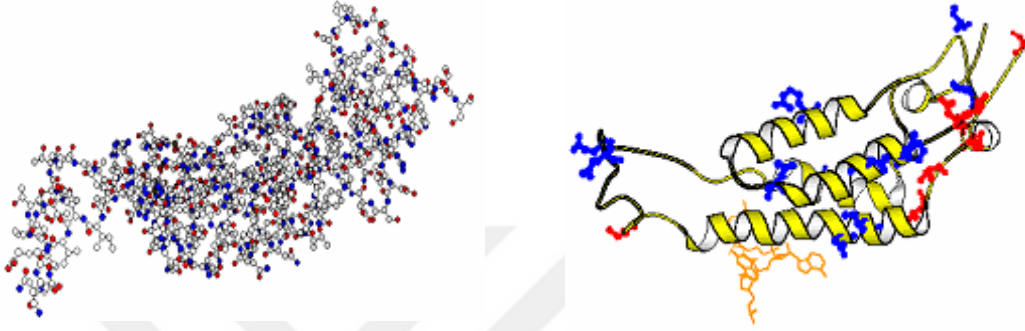


Şekil 1.2.8. TMV geçirmeli elektron mikroskobu (TEM-400kV) görünümü (a) 300 nm boyunda 18 nm genişliğinde bütün virüs partikülü, uranil asetatla boyanmış. İç kanal ve dış yüzey uranyumca zengin olduğundan koyu renkli görünmekte; (b) 80 nm boyundaki virüs parçası ve sol üst köşede virüs parçasının enine kesiti.



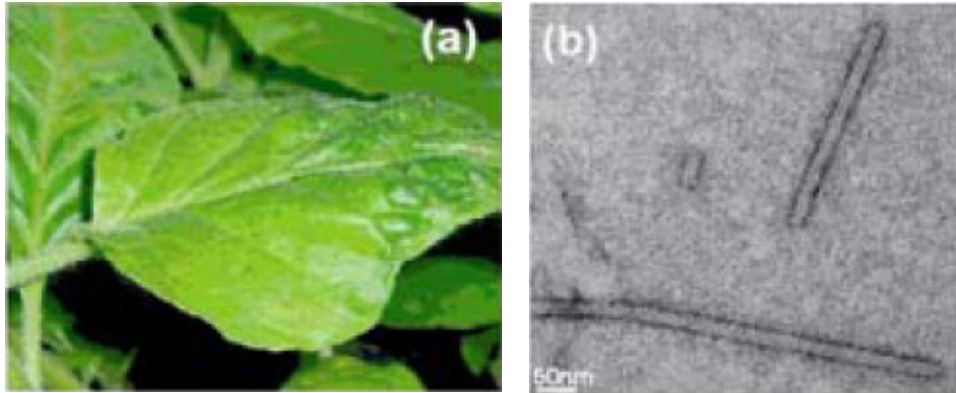
Şekil 1.2.9. TMV virüsü. (a) TMV bileşenlerinin model görünüşleri: Protein iskeleti çizgi halinde, α -heliks ve RNA halkaları sarı, karboksil yan zincirler kırmızı, amino yan zincirler ise mavi ile gösterilmiş. Tek bir protein alt biriminin modeli: 1- Kanalin içi, orta kısım, dış virüs yüzeyi-son dört amino asit, Gly(Ser)-Pro-Ala-Thr-COOH, kırmızı nokta ile gösterilmiştir 2- 4 adet (rigid) α -heliks yapısı 3- esnek sarmal. (b) 130 helikal dönüşün 3üne karşılık gelen 49 protein alt biriminin modeli, (COOH ucundaki son dört amino asit gösterilmemiştir) (c) TMV kılıf proteinini dış yüzeyi 1- Kılıf proteininin amino ve karboksil uçlarına yakın bölgedeki amino asitlerinden oluşmuştur. 2- Kılıf proteininin sıkıca paketlenmiş ana gövdesi. 3- Amino asit sarmallarından oluşan iç kanal yüzeyi 4- Genellikle su ile dolu olan iç kanal boşluğu

Protein içeriği %95 olup, 26.500 ve 17.500 Da'luk 2 adet yapısal virüs proteini bulundurur. Bunun yanısıra, 4 adet yapısal olmayan protein bulunur (18.300, 12.600, 54.000 ve 30.000 Da'luk). Virüs, %5 kadar nükleik asit, eser miktarda metal iyonu içerirken, lipid içermez. (Zaitlin 2002) (Şekil 1.2.10).



Şekil 1.2.10. TMV amino asit artıkları. Amino asit artıkları kırmızı ile işaretlenmiştir. Bu artıklardaki değişimin virüsün yüzey özelliklerini (antijenik özellikler) etkilediği düşünülmektedir. Mavi ile işaretlenmiş bölgeler yüzeyi değiştirmeyen ve immunolojik olarak saptanamayan bölgelerdir. Turuncu ile gösterilen bölge ise bir protein altbirimi ile temas eden RNA bölgesini göstermektedir.

TMV çap-uzunluk oranı ($R/L=e$), ($e=0.018...0.300$) arasındadır. Bu özellik farklı boyuttaki virüs popülasyonlarının dielektrik olarak ayrımında kullanılır (Zehe vd. 2003). TMV çok kararlı bir yapıya sahiptir, preparasyonlar asırlarca enfektif olma özelliğini korur (Şekil 1.2.11).



Şekil 1.2.11 (a) TMV'nin enfekte ettiği tütün bitkisi. (b) TMV TEM görüntüsü
Ölçek çubuğu: 50 nm.

Ayrıca yüksek sıcaklıklarda (90°C ve üzerinde 10 dakika boyunca) ve 2-10 pH değerlerinde kararlılığını kaybetmeden kalabilir. Yüksek kararlılığı sebebiyle TMV, ultrasantrifüjleme ya da tuz, izoelektrik veya solvent çöktürmesi gibi bir çok işlem kullanılarak saflaştırılabilir. Poli(etilen glikol) prosedürünü kullanarak tatmin edici preparasyonlar elde edilebilmiştir. Ayrıca, tamponlanmış %5 Triton X-100 modifikasyonu ile kloroplast fragmanları elimine edilebilir. Virüs “şelat-yapıcı” ajanlar ile inkübe edilerek renkli bileşenler de uzaklaştırılabilir. Çökelmiş virüsün etilendiamin-tetraasetik asit (EDTA) içinde süspanse edilmesi virüs agregasyonunu azaltır. Virüs partikülleri uzunluklarına göre agar kolonları ya da agaroz beadleri ile ayrılabilir. Verim 10mg/g taze ağırlığa ulaşabilir (Zaitlin vd. 2004).

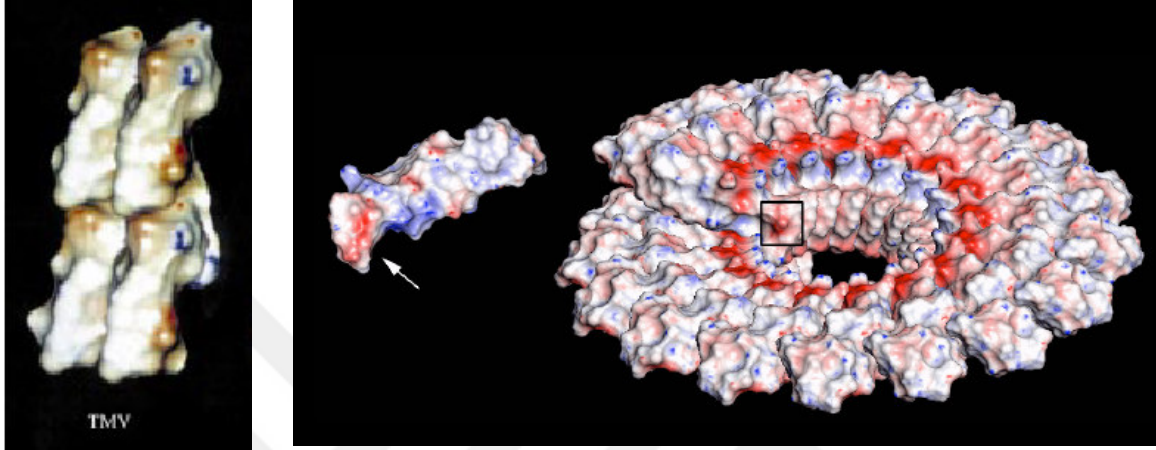
1.2.5. TMV’nin Biyolojik Nanokalıp Olarak Kullanımı

TMV’nin nano-kalıp olarak kullanıldığı araştırmalara son yıllarda literatürde daha sıkça rastlanmaktadır. TMV’nin uç uca eklenerek nano-kablo oluşturabilmesi, metaller, yarı iletkenler ve silika gibi çeşitli maddelerle kaplanabilmesi ve belirlenen bölgelere seçici olarak bağlanabilmesi gibi, nano çalışmalarda avantaj sağlayan özellikleri araştırmalara hız vermiştir.

Bu araştırmalardan birinde TMV, kimyasal olarak etkinleştirilerek metal iyonlarını bağlayabilecek bir kalıp olarak kullanılmıştır (Bittner vd. 2004). Bu çalışmada, kılıf proteininin farklı kimyasal grupları ligand ya da elektrostatik olarak metal iyonlarını bağlamak için kullanılmıştır. Bu aktivasyon aşamasından sonra kimyasal indirgeme ve “electroless” (dış akım kaynağı olmaksızın) kaplama sonucunda birkaç nanometre çapında metal yığınları oluşmuştur. Yığınlar virüse yapısını bozmadan bağlanmıştır. Asetik asit banyosu ile oluşturulan altın yığınları, virüsün dış yüzeyini kaplamanın yanı sıra boş olan iç kanalını da doldurmuştur. Pd(II) ve Pt(II) aktivasyonları fosfat ile ayarlanarak oldukça yüksek bir seçicilik elde edilmiştir (Knez vd. 2004).

Benzer bir başka çalışmada TMV’nin iç ve dış yüzeyleri kontrollü olarak metallerle kaplanmıştır. Düşük akımda gerçekleştirilen kaplama işlemi, metalizasyon koşullarının ayarlanmasıyla seçici olarak virüsün iç ya da dış yüzeyine uygulanabilmiştir. Virüs önce Pd²⁺ ile aktive edilmiş, ardından Ni(P) ile kaplanmıştır. Ni(P) virüsün yalnızca iç yüzeyine kaplanmıştır, bu sebeple proteinlerin değil RNA’nın Pd²⁺ ile kompleks oluşturduğu düşünülmüştür. Ag⁺ ise yalnızca virüsün dış yüzeyine bağlanmıştır. Virüsün bölgesel nanokimyasal özelliklerinin - *örneğin bazı amino asit grupları ve RNA gibi* - metallere

bağlanma kuvvetini belirlediği gözlenmiştir (Knez vd. 2002). Virüsün elektrostatik yüzey özellikleri, Şekil 1.2.12’de verilmiştir.

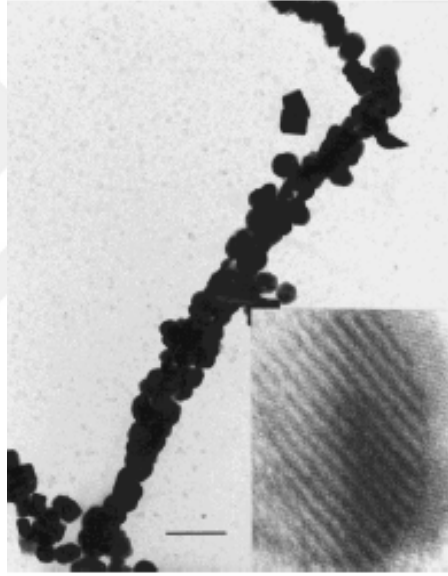


Şekil 1.2.12. TMV’nin dört alt biriminin elektrostatik yüzey potansiyelleri, virüs eksenine dik olarak içten görüntüsü. Negatif yüklü alanlar kırmızıyla, pozitif yüklü alanlar mavi ile işaretlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, TMV’nin metal ve yalıtkan yüzeylere adsorpsiyon davranışı ve yüzey kimyası araştırılmıştır. Araştırmada, substratın yüzey kimyası ile moleküler yüzeyin pH-bağımlı kimyası -örneğin hidrojen bağıyla -eşleştğinde kuvvetli bir adsorpsiyon meydana geldiği ve yanıl hareketin kısıtlandığı bulunmuştur. İmmobilizasyona da bağılı olarak virüs yüzeyi AFM ile incelenebilmiştir. Çalışmada, ayrıca kendiliğinden düzenlenen (*self-assembly*) tek tabakalar kullanılmıştır. Açıl klorür (3 R –CO- Cl) grubuna sahip tek tabakalar, ester bağı oluşumunu indükleyerek kovalent bağlanma sağlamak amacıyla kullanılmışlardır. “Non-kontakt” AFM çalışmaları, TMV’nin silindirik şeklini yalnızca zayıf adsorpsiyon koşullarında, yani hidrofobik yüzeylerde koruduğunu, hidrofilik substratlarda ise etkin kimyasal grup sayısının artışına bağılı olarak deforme olduğunu göstermektedir (Knez vd. 2004).

Shenton vd. (1999), TMV partiküllerini kalıp mineralizasyonu tekniği ile inorganik-organik nanotüp bileşimleri oluşturmak için kullanmışlardır. Bu çalışmada, TMV’nin mineralizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır: TEOS (tetraetoksilan) sol-jel kondenzasyonu TMV’nin 3 nm kalınlığında düzgün silika tabaka ile kaplanmasını sağlamış, böylece elektron absorplayan

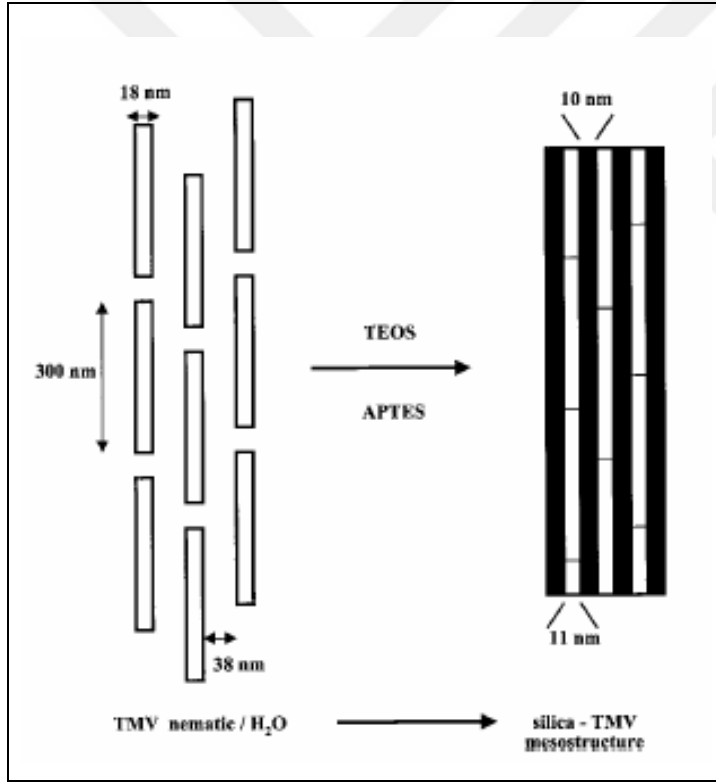
SiO₂ çubukları oluşturulmuştur. TMV'nin CdCl₂ ile, ya da Pb(NO₃)₂ ve H₂S beraberinde çöktürülmesi, düzensiz CdS (5 nm) ya da PbS (30 nm) yığınlarının TMV protein iskeletinin yüzeyine adsorplanmasını ve hibrit materyallerin oluşumunu sağlamıştır (Şekil 1.2.12). TMV partikülleri ayrıca virüs içeren asidik Fe(II)/Fe(III) dispersiyonuna NaOH eklenmesi ile demir oksit mineralizasyonuna tabi tutulmuştur. Bunun sonucunda protein kalıbın dış yüzeyinde zayıf bir şekilde kristalize olan demir oksit birikimi gerçekleşmiştir. TMV'nin anaerobik Fe(II) solüsyonu içinde oksidasyonu ise viral partiküllerin 2 nm kalınlığında demir oksit filmiyle kaplanmasını sağlamıştır (Şekil 1.2.13).



Şekil 1.2.13. Yoğun bir şekilde mineralize olmuş PBS/TMV nanotüp kompozitini gösteren TEM mikrografı. İç mikrograf: TMV dış yüzeyine bağlı PBS nanokristalinin yüksek çözünürlükte tek bir alanda “kafes örgüsü” görüntüsü. (Ölçek çubuğu: 50 nm)

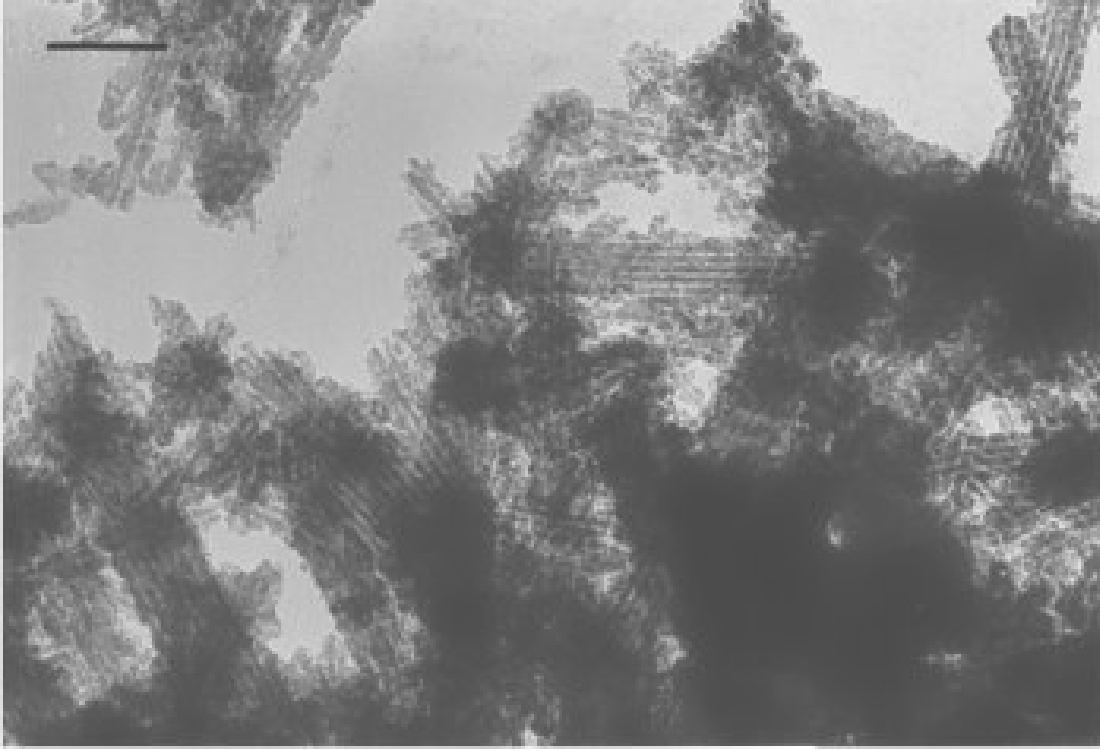
Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada, yine TMV kullanılarak çeşitli nanotüp ve nano çubuklar hazırlanmıştır. Bu çalışmada, silikon oksit ve altın partikülleri gibi inorganik materyaller ile TMV yüzeyi kaplanmıştır. Kaplamada sol-jel işlemi ve yüzey modifikasyon teknikleri gibi bazı metodlar kullanılmıştır. TMV yüzey özellikleri değiştirilerek partiküllerin virüs üzerine bağlanması kolaylaştırılmıştır. Bağlanma süresince oluşturulan deneysel koşulların kaplanmış partiküllerin son durumunu ve partikül bağlanma etkinliğini belirlediği görülmüştür (Lee vd. 2003).

Yüksek konsantrasyondaki TMV süspansiyonları kendiliğinden nematik sıvı kristali oluşturma eğilimindedirler. Bu özellikten faydalanan Shenton ve grubu, 20 nm aralıklı, gözenekli silika yapıların sentezini gerçekleştirmiştir (2001). Aynı çalışmada, 50 nm boyunda radyal olarak sıralanmış mineralize TMV partikülleri ile çevrili yoğun bir çekirdeğe sahip silika nanopartiküllerin üretimi de başarılmıştır. Çalışmada, tetraetoksilan (TEOS) ile aminopropiltrietoksilan (APTES) karışımının 38 nm aralıklı sıralanmış TMV partikülleri içeren sıvı-kristal jel içinde kontrollü hidrolizi ve kondenzasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.2.14-16).



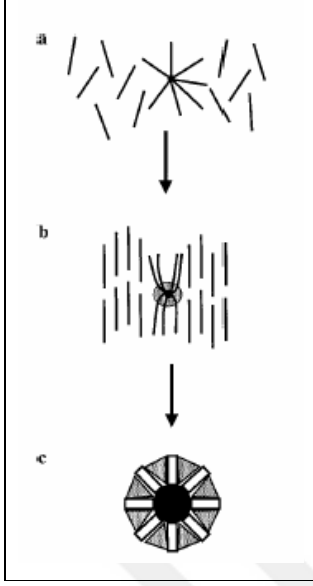
Şekil 1.2.14. TMV sıvı kristal kalıpları kullanılarak düzenli mezoyapıdaki silika yapıların sentezinin şematik gösterimi

Oluşan mineralize jel parçalanarak geçirmeli elektron mikroskopunda (TEM) incelendiğinde, yapının çoğunlukla birkaç mikrometreden oluşan mezoyapıda düzenli silika-TMV yapılarını içeren fragmanlardan oluştuğu görülmüştür (Şekil 1.2.15).



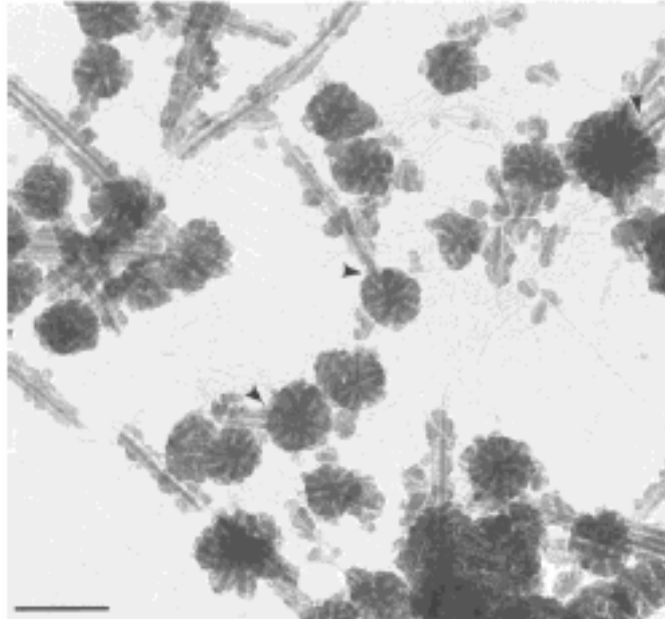
Şekil 1.2.15. TMV–silika nanopartiküllerin TEM mikrografı; Ölçek çubuğu: 200 nm

Yüksek çözünürlükte alınan görüntüler, TMV partiküllerinin uç uca eklenmiş biçimde, 18 nm aralıklı, kesintisiz bir amorf silika iskelet içine yerleşmiş olduğunu göstermektedir. Enkapsüle edilmiş TMV liflerin dış çapının (11 nm), normal virüsünkine (18 nm) göre azımsanmayacak derecede azalmış olması protein tübüllerinin mineralizasyon sırasında sıkışmakta olduğunu göstergesidir. TMV sıvı-kristal kalıbının termal degradasyonla uzaklaştırılması, mezoforik yapının düzeninde önemli bir değişime yol açmamıştır .



Şekil 1.2.16. Radyal kanallı mezoyapılı silika nanopartiküllerin şematik oluşum mekanizması

TEOS ve APTES miktarlarının %40 azaltılması, 100-150 nm çapında çok sayıda dairesel silika nanopartiküllerinin oluşmasını sağlamıştır (Şekil 1.2.17). TEM görüntüleri incelenen partiküllerin iç kısımlarının alışılmadık bir mezoyapıda oldukları gözlenmiştir

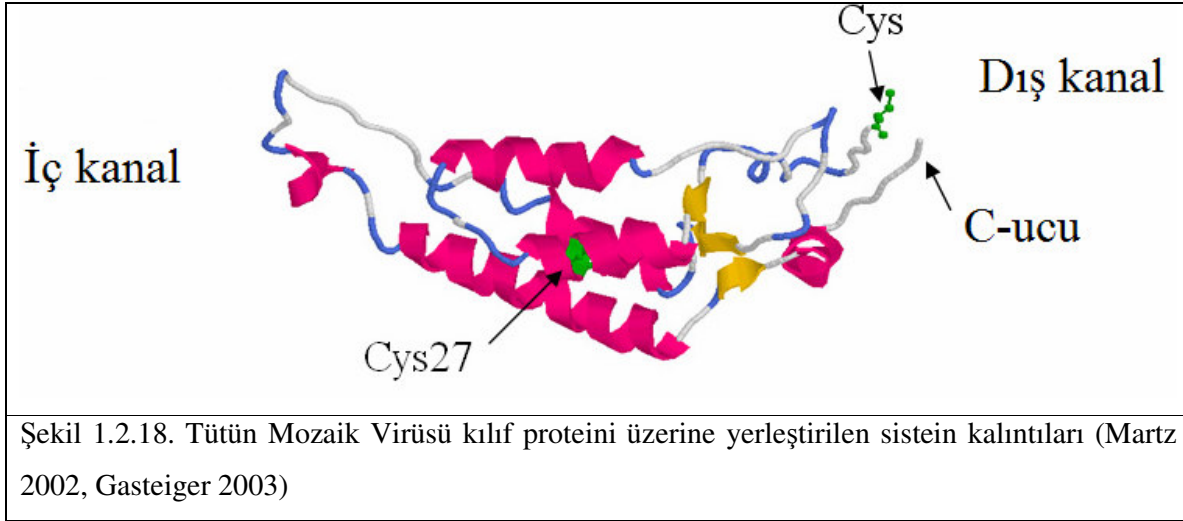


Şekil 1.2.17. Radyal olarak desenlendirilmiş silika-TMV nanopartiküllerin TEM görüntüsü, Ölçek çubuğu: 200 nm.

Tütün Mozaik Virüsünün kalıp olarak kullanılmasına elverişli olmasının bir nedeni de genetik olarak modifiye edilebilmesini mümkün kılan bazı faktörlerin bulunmasıdır. Bu faktörlerden bazıları,

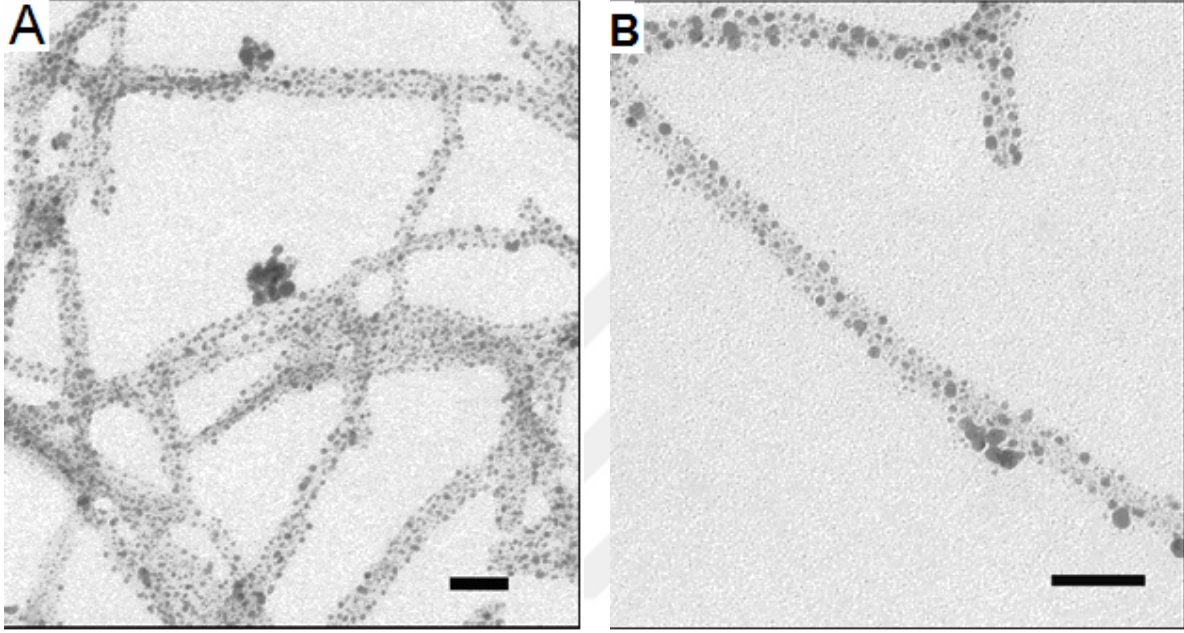
- TMV'nin iyi bilinen üç boyutlu yapısı, (Namba vd.1989)
- Virüsün kendiliğinden düzenlenme (*self-assembly*) mekanizması hakkında bilinen biyofiziksel veriler, (Durham vd. 1971)
- Virüsün, cDNA klonunun bütün olarak bulunması ve böylece moleküler teknikler kullanılarak farklı özellikte yüzey konformasyonuna sahip protein kapsid yapısının ve yeni virüs parçacıklarının sentezlenebilmesi, (Dawson vd. 1986, Lu vd. 1996)
- Enfekte bitki materyalinden yüksek miktar ve saflıkta virüs elde edilebilmesidir.

Virüsün bu özelliklerinden yararlanılarak 2005 yılında yapılan bir çalışmada Tütün Mozaik Virüsü genetik mühendisliği yöntemleri ile modifiye edilmiş ve yüzey fonsiyonel grupları değiştirilerek virüsün metalleri bağlama özelliği geliştirilmiş ve metal birikimi için kalıp olarak kullanılmıştır. Virüse metallerin bağlanmasını kolaylaştırmak için, viral kılıf proteininin amino ucuna iki adet sistein kalıntısı yerleştirilmiştir. (Şekil 1.2.18).



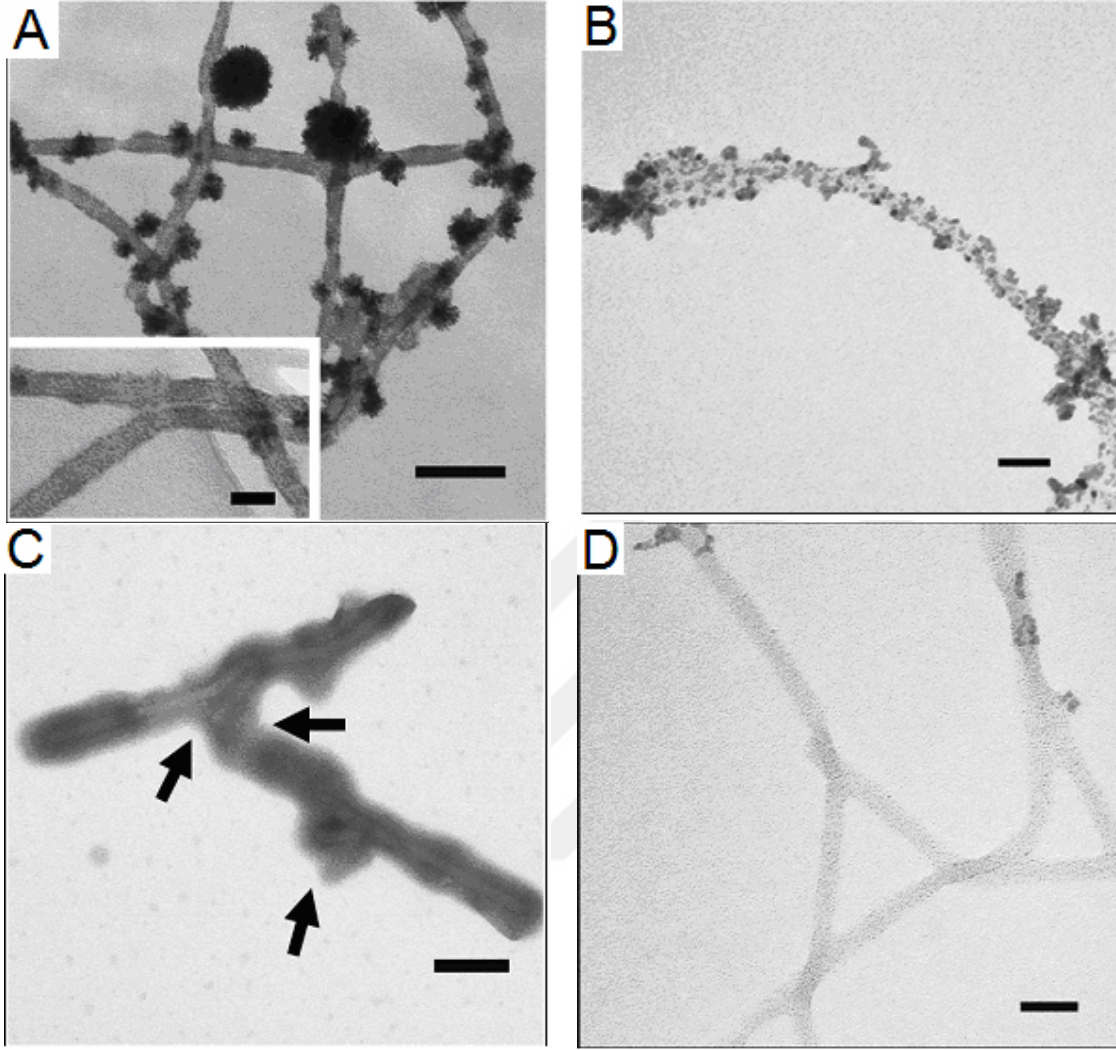
TMV2cys olarak adlandırılan modifiye edilmiş virüs yapısı, polimeraz zincir reaksiyonu temelli mutagenез tekniği ile oluşturulmuştur (Higuchi vd. 1988). Bu teknik yardımıyla yapılan dizayn sonucunda, iki sistein kalıntısı Şekil 1.2.18.'de görüldüğü gibi TMV kılıf proteininin açık okuma dizisindeki (*open reading frame*) 2. ve 3. pozisyonlarına yerleştirilmiştir.

Bu aşamadan sonra, metal yığını oluşumu TMVcys2 kalıpları varlığında metal prekürsörlerinin *in-situ* kimyasal indirgenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Metal iyonları, indirgen olarak dimetilamin boran (DMAB) ilavesi ile katı metal yığınlarına dönüştürülmüştür (Şekil 1.2.19 ve Şekil 1.2.20).



Şekil 1.2.19. Gümüş metal parçacıkları ile kaplanmış TMV2cys TEM mikrografı (ölçek çubukları: (a) 100 nm; (b) 50 nm).

Biyolojik kalıp olarak mutant TMV'yi kullanan diğer bir grup araştırmacı da, spesifik ve stokiyometrik olarak bir çok ligand-bağlayıcı gruplara bağlanabilecek bir nano-kalıp geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu yaklaşımla, spesifik ligandların virüse kimyasal olarak seçici bir şekilde bağlanmasını sağlayarak farklı nanomoleküler malzemeler üretmeyi denemişlerdir (Demir vd. 2002).



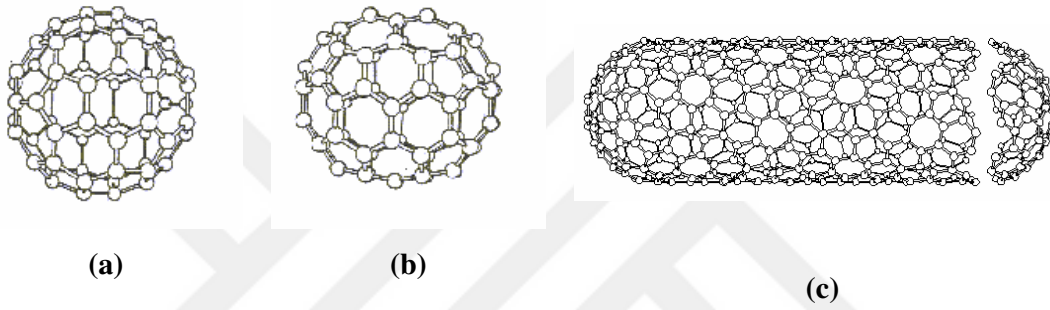
Şekil 1.2.20. (A) Palladyum parçacıklarıyla kaplı TMV2cys'in, TEM mikrografı (Ölçek çubuğu: 100 nm). Alt görüntü: Daha yüksek büyütmedeki palladyum ile kaplı TMV2cys mikrografı (Ölçek çubuğu: 25 nm). (B) TMV2cys kalıbı üzerinde birikmiş palladyum parçacıklarının TEM mikrografı (Ölçek çubuğu: 50 nm). (C) Modifiye edilmemiş yabani tip TMV'nin palladyum ile kaplanmış TEM mikrografı. Oklar, yabani tip TMV parçacıklarının etrafında ve aralarında biriken palladyumları işaret etmektedir. (Ölçek çubuğu: 100 nm). (D) Yaban tip TMV parçacıklarının palladyum ile muamele edildikten sonraki TEM mikrografı. (Ölçek çubuğu: 50 nm).

Bu çalışma ile, TMV protein kılıfı üzerine yerleştirilen sistein kaynaklı tiyol gruplarının yabani tip, modifiye edilmemiş TMV'ye göre metal bağlama kapasitesini ve bağlanma kararlılığını önemli ölçüde arttırdığı ortaya konmuştur (Şekil 1.2.20) (Lee vd. 2005). Bu da genetik mühendisliği yöntemleri ile TMV üzerinde yapılacak değişikliklerin kalıp kullanma yaklaşımında yeni uygulamaların ortaya çıkmasında büyük rolü olacağını göstermektedir. Bu nedenle, TMV kalıp olarak nanoyapıların oluşturulması ve dizaynında önemli bir yapı taşıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

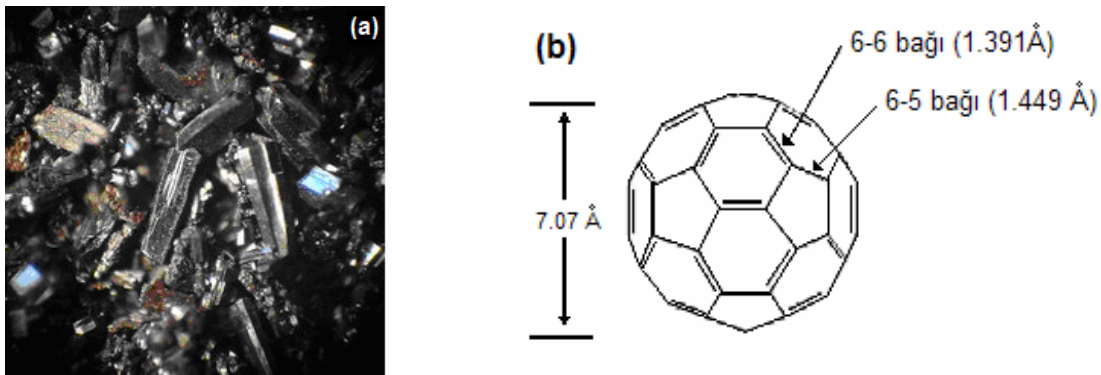
2.1. Fullerenler ve Genel Özellikleri

Karbonun bilinen iki allotropu olan *grafit* ve *elmas*'a ek olarak karbonun üçüncü allotropu Buckminster fullerene 1985 yılında keşfedilmiştir (Kroto vd. 1985). Sonraki çalışmalarda ise dördüncü allotrop, “*nano-tüpler*” keşfedilmiş ve tanımlanmıştır (Iijima 1991) (Şekil 2.1.1).



Şekil 2.1.1. Fullerenlerin yapıları: (a) C₆₀ (b) C₇₀ (c) Nanotüp

Fulleren tam olarak 60 adet karbon atomundan oluşmuş muntazam bir küre şeklindedir. Yapısal olarak oldukça düzenlidir ve nano boyuttadır. C₆₀ molekülü alışılmadık bazı özellikleri olan bir π –elektronu alıcısıdır. Küresel yüzeyi heksagonal ve pentagonal halkalardan oluşur (Şekil 2.1.2). Bu yüzden C₆₀'ın moleküler yapısı diğer π alıcılarından tamamen farklıdır. Elektron ilgisi nispeten küçüktür (Adyabatik EI: 2.1-2.2 eV). Diğer taraftan C₆₀ molekülü oldukça yüksek bir polarizasyon sergiler. Bu yüzden Van der Waals polarizasyon ilişkilerinin katılımı diğer π alıcılarından büyük oranda daha yüksektir (Graja 2002).



Şekil 2.1.2. (a) Kristal haldeki C₆₀ (b) C₆₀'in boyutunu ve bağ uzunluklarını gösteren şema

Fulleren son on yılın en fazla araştırılan moleküllerinden biridir. Fullerenlere olan bu yoğun ilgi; ilginç kimyasal ve fiziksel özellikleri, alışılmamış yapıları, ve potansiyel uygulama alanlarından kaynaklanmaktadır (Graja 2001). Fullerenler, biyolojik ve medikal kullanım alanına sahip olmaları nedeniyle nanoteknolojik araştırmalarda kullanılabilecek, oldukça umut verici yeni bir bileşik türüdür. Fullerenlerin çeşitli canlı sistemlerle oluşturduğu tepkimeler konusunda pek çok araştırma mevcuttur.

Fullerenlerin 1990 yılında izole edilmelerinin ardından (Krätschmer vd.) çalışılabilecek miktarlarda üretilibilmeleri ve türevlerinin sentezlenmesi kimya ve mühendislik proseslerinde ve bazı fotofiziksel elektrokimyasal çalışmalarda kullanılmalarına olanak sağlamıştır. Ne var ki fulleren ve biyoloji arasındaki bağlantı dikkate değer bulunmaya yeni başlanmıştır. Hidrofilik bileşenlerin kovalent bağlanmaları ve bu yolla biyolojik ortamdaki çözünürlüklerinin önemli miktarda artması oldukça hidrofobik olan C_{60} 'ın organik işlevselliliğinin artmasını sağlamıştır. Ayrıca fullerenin küresel şeklinin enzim ya da hücrelerin içindeki hidrofobik bölgelere uyum sağlamasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Bu durum konudaki araştırmalara da hız kazandırmıştır.

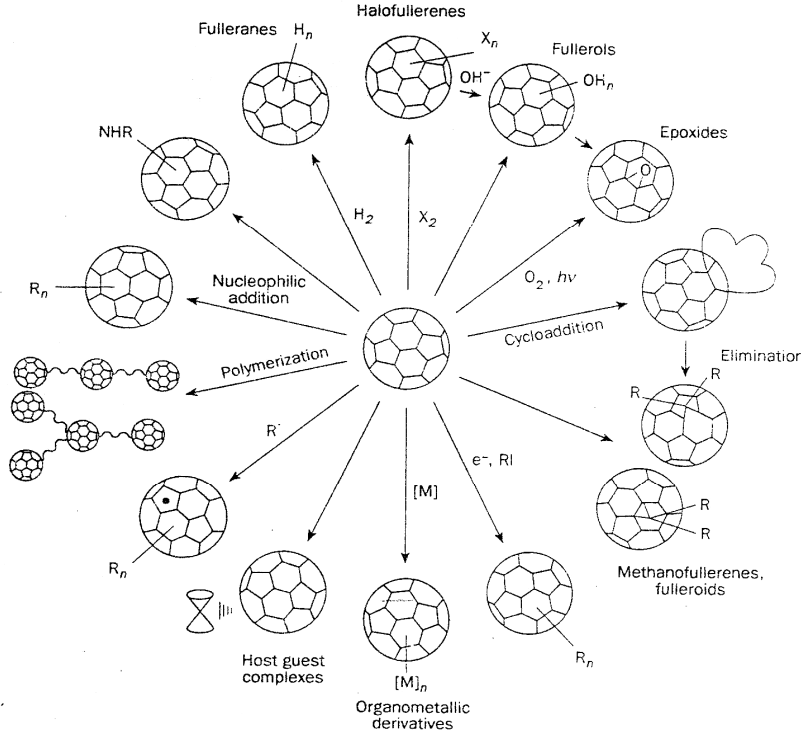
Fullerenlerin özgün yapısal özelliklerinin yanı sıra uygun şekilde çözündüklerinde sergiledikleri çok çeşitli biyolojik aktivite de ilgi çekmelerinde rol oynamıştır. Radikal süpürücü (*radical scavenging*) özelliklerinden dolayı nöro-dejeneratif hastalıklarda nöro-koruyucu olarak (Dugan vd. 1997), apoptozisin inhibisyonunda ve antiviral araştırma alanlarında (Schinazi vd. 1993) umut verici oldukları bulunmuştur. DNA'yı kesebilme özellikleri (Tokuyama vd. 1993) sayesinde genetik transkripsiyon çalışmalarında fotoproblar olarak kullanılabilecekleri gibi diyagnostik çalışmalarda da kullanışlı olmaları beklenmektedir. İlaç ya da çeşitli biyolojik moleküller için potansiyel taşıyıcı olarak fullerenlerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca fonksiyonlandırılmış fullerenlerin özgün geometrik şekilleri sayesinde fotodinamik terapide ya da HIV-1 proteazının inhibitörü olarak işe yaradıkları bulunmuştur (Friedman vd. 1993, Ros ve Prato 1999, Ros vd. 2001).

2.2. TMV'nin Kalıp Etkisi ve Fullerenler

Kalıp etkisi nedeniyle, TMV ile etkileştirilecek olan fulleren (C_{60}) Van der Waals kuvvetleri ile bir arada tutulan, kafes yapısı oldukça sert bir moleküler katıdır. Fulleren moleküllerinin serbest hale geçmesi için C-C kovalent bağlarının kırılması gerekmediğinden, çözünme ve buharlaştırma işlemleri daha ılıman koşullarda gerçekleşebilmektedir. Fullerenler, organik çözücülerde çözünebilir (Çizelge 2), elektronları iyi delokalize edebildiği için ve sınır yüzey formüllerinde elektron boşluğu bulundurduğu için, nükleofilik özelliklerine bağlı olarak başka gruplarla da reaksiyon verebilirler (Şekil 2.2.1). Bu reaksiyonlar incelendiğinde, C_{60} 'ın TMV üzerindeki protein zincirinin sonlandırıcı fonksiyonel grupları (-OH, -COOH, -NH₂) ile reaksiyon verebileceği tahmin edilebilir (Hirsch 1994).

Çizelge 2. C_{60} 'ın farklı çözücülerdeki çözünürlük değerleri.

Çözücü	C_{60} , mg/mL
<i>n</i> -Pentan	0,005
<i>n</i> -Hekzan	0,043
Sikloheksan	0,036
<i>n</i> -Dekan	0,071
Karbon disülfür	7,9
Diklorometan	0,26
Kloroform	0,16
Karbontetraklorür	0,32
Benzen	1,7
Toluen	2,8
Klorobenzen	7,0
Aseton	0,001
Metanol	0,000

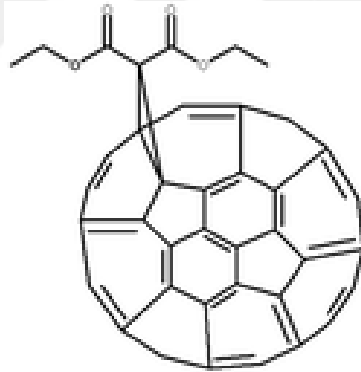


Şekil 2.2.1. Fullerenin verebildiği reaksiyonları gösteren genelleştirilmiş şema (Hirsch 1994).

Moleküler boyutta nanoelektronik, gelişmekte olan yeni bir teknolojidir ve moleküllerin elektriksel özellikleriyle doğrudan bağlantılıdır. Yarı iletken karbon nanotüpler de geleneksel mikroelettronik fabrikasyon teknolojisi (çoğunlukla nano-ölçekli litografi) ile geleceğin devre elemanlarının boyutsal gereksinimlerini karşılayacak teknolojiyi biraraya getiren yapısal elemanlardır. Ne var ki karbon nanotüpler yalnızca biyolojik sistemlerde bulunan kendiliğinden düzenlenme (*self-organisation*) özelliğine sahip değildir. Geometrik özellikler ve dayanıklılık bakımından TMV karbon nanotüplere benzerlik göstermektedir ve mikrobiyolojik bir obje olarak yapısal kendiliğinden düzenlenme özelliklerine sahiptir. Bu özelliklerin geleceğin nanobiyosistemlerinde ve biyoelektronik uygulamalarında gerekli ve son derece kullanışlı olacağı düşünülmektedir.

2.3. Fulleren Türevleri ve Biyolojik Uygulamaları

Fullerenin kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine yapılan çalışmalardan sonra, fullerenin biyolojik aktivitesi üzerinde de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Ancak fullerenin suda çözünürlüğünün çok zayıf olması, biyolojik madde ve hücrelerle fullerenin doğrudan etkileşimini engeller. Bu da biyolojik materyalle fullerenin etkileşimini oldukça zorlaştırır. Bu sorunu aşmak için yapılan araştırmalarda fullerenin suda çözünür türevlerinin sentezlenmesi üzerine çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmaların öncülerinden biri olan C. Bingel, fullerenin siklopropanlama reaksiyonunu bularak metano fulleren sentezlemeyi başarmıştır (Şekil 2.3.1) (1993). Böylece fulleren küresine fonksiyonel katılmaların gerçekleştirilmesine olanak sağlanmıştır. Bu katılmalar, fullerenin çözünürlük ve elektrokimyasal davranış gibi özelliklerini geliştirerek potansiyel uygulama alanını genişletmiştir.



Şekil 2.3.1. Metanofullerenin yapısı

2.4. Fullerenler ve Biyosensör Uygulamaları

Klâsik kimya ve biyokimya işlemleri büyük boyutlarda gerçekleşmektedir. Bu boyutlar küçültüldüğünde kimyasal analizlerin duyarlılığı artmakta ve otomasyon kolaylaşmaktadır. Bu amaçlara yönelik olarak tasarlanan biyosensörler, biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştürebilen bir transdüser ile, spesifik ve biyolojik olarak aktif bileşenlerden oluşturulmuş analitik cihazlardır. Biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin

birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler. Biyosensörlerde temel amaç, analizi yapılacak madde (analit) ile biyoaktif bir bileşenin spesifik olarak etkileşimi sonucu ortaya çıkan elektrik sinyallerinin bir transdüser sistemiyle belirlenmesidir. Sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilmektedir. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif bileşenler amaca göre iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri (örneğin; mitokondri), hücreler, doku kesitleri ve homojenatları olabilmektedir.

Biyosensörlerin yaygınlaşmasıyla, pek çok teşhis ve analizin daha kolay ve kısa sürede, hassas ve daha düşük maliyette gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur.

Genel kullanım alanları incelendiğinde biyosensörlerin,

- Klinik teşhisler ve tıbbi analizler,
- Tarım ve veterinerlik analizleri,
- Proses kontrolleri (fermentasyon kontrolleri ve analizi),
- Gıda analizleri,
- Mikrobiyoloji (bakteriyel ve viral analizler),
- Farmasötik ve ilaç analizleri,
- Çevresel analizler (kirlilik kontrolleri),
- Endüstriyel ve toksik gazların analizi,
- Askeri ve savunma faaliyetleri, gibi pek çok alanda uygulama bulduğu görülmektedir.

2.4.1. Kuartz Kristal Mikrobals Sistemi

2.4.1.1. Piezoelektrisite

Piezoelektrisite kavramı, ilk kez 1880 yılında Paul Jacques ve Pierre Curie tarafından tanımlanmıştır. Piezoelektrik olguyu bulan Pierre Curie ve Paul Jacques Curie, bazı kristal türlerinin, üzerine bir ağırlık konduğunda ya da eksenleri boyunca sıkıştırıldıklarında, kristalin yüzeyleri arasında bir gerilimin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. ‘Piezoelektrik etki’ adını verdikleri bu olayın keşfini bir yıl sonra da ters piezoelektrik etkinin açıklanması izlemiştir.

Yunancada ‘bastırmak’ anlamına gelen “piezein” ön ekinden türetilen ‘piezoelektrik’ kavramı basitçe, üzerine mekanik bir basınç uygulanan bazı kristal ve seramik malzemelerde bir

elektiriksel gerilimin oluşması olarak tanımlanabildiği gibi; bu ifadenin tam tersi olarak, yüzeyine gerilim uygulandığında kristalin şeklini hafifçe değiştirmesi olarak da tanımlanmaktadır. Bu şekil değişikliği kalıcı değildir. Uygulanan gerilim boyunca kristal, orijinal şekli etrafında titreşmektedir.

2.4.1.2. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, kimyasal ve biyolojik sıvılarda bulunan maddelerin analizleri için geliştirilen ve Kuartz Kristal Mikrobalans (Quartz Crystal Microbalance, QCM) olarak tanımlanan sistemlerdir. Piezoelektrik kuartz kristaller kullanılarak geliştirilen biyosensörler ilk kez 1964 yılında W. H. King tarafından, kimyasal örneklerin analizinde kullanılmıştır. Piezoelektrik biosensör uygulamalarında genellikle analizi yapılacak madde ile spesifik olarak etkileşen materyal PZ kristal yüzeyine immobilize edilir. Kristal üzerine immobilizasyondan dolayı kristalin yüzeyindeki kütle artışı nedeniyle kristalin titreşim frekansı düşer. Kristalin titreşim frekansı ölçölür ve kaydedilir. Kristal, analizi yapılacak maddeyi bulunduran ortama yerleştirilir. Analizi yapılacak madde affinite ve adsorpsiyon nedeniyle, kristal yüzeyinde birikir. Meydana gelen kütle artışı kristalin titreşim frekansını tekrar düşürür. Frekans sayıcıda okunan değer ile kristalin sahip olduğu temel frekans değerı arasındaki fark alınarak kristal yüzeyine adsorplanan madde miktarı Sauerbrey eşitliği yardımıyla hesaplanır.

2.4.1.3. Kuartz Kristal Mikrobalans sensör sistemi

QCM sensör sistemi genel olarak, piezoelektrik kuartz kristaller, kristal yüzeyleri arasına belirli voltta gerilim uygulayan bir güç kaynağı, uygulanan bu gerilim karşısında kristalin titreşmesini sağlayan geri dönüşümlü (*feedback*) bir osilatör ve frekans ölçümünü gerçekleştirecek bir frekansmetreden oluşmaktadır. Frekansmetre dışında, frekansı elektrik sinyaline dönüştürerek frekans ölçümlerinin bilgisayar ortamında alınmasını sağlayacak F/V dönüştürücüler de QCM sisteminde kullanılabilmektedir.

QCM sisteminde kuartz kristal, iki metal elektrod arasına yerleştirilmiştir. Bu elektrodlar arasına uygulanan gerilim karşısında kuartz kristal belirli bir frekansta titreşmektedir. Kristal yüzeyinde sadece bu elektrodlar arasında kalan bölge piezoelektrik olarak aktiftir. Bu sebeple titreşim elektrod tabakasının merkezinde maksimumdur. Kristal üzerinde o bölgeden uzaklařtıķça titreşim hızlı bir şekilde azalmaktadır.

Piezoelektrik kuartz kristallerin yüzeylerinde meydana gelen kütle artışı sonucu, belirli şiddette uygulanan gerilim karşısında sahip oldukları titreşim frekanslarında meydana gelen değişim, kristal yüzeyine adsorplanan analitin kütlesine bağlıdır. Analit çözeltisiyle muamele edilen kristalin titreşim frekansındaki değişimin belirlenmesiyle kalitatif analizler yapılabilirken; aynı şartlarda, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan analit çözeltileri ile muamele edilen kristalin frekans değişimleri belirlenerek, elde edilen verilerden çizilen, “frekans değişimi-analit konsantrasyonu” grafiğinden yararlanılarak, konsantrasyonu bilinmeyen analitin kantitatif analizi yapılabilir.

2.4.1.4. Sauerbrey Eşitliği

Piezoelektrik biyosensörlerde, QCM sisteminin kalbi olarak adlandırılan piezoelektrik kuartz kristallerin her iki yüzeyinde bulunan metal (Au, Ag, Al, Ni, vb.). elektrodlar, uygun bir membran ile kaplanarak analizi yapılacak olan madde ile spesifik olarak etkileşen ligand bu membran üzerine immobilize edilmektedir. Elektrod yüzeyindeki membrana immobilize edilen ligand ile spesifik olarak etkileşen analitin konsantrasyonu ile kristalin titreşim frekansı birbirleriyle ilişkilidir. Kristalin üzerine binen yük ne kadar fazla ise, titreşim frekansı o kadar azalmaktadır. Elektrod yüzeyleri arasındaki kütle artışı ile, ‘thickness shear’ modunda titreşen AT-kesim kuartz kristalin frekans değişimi arasındaki bağıntı, ilk kez 1959 yılında, Sauerbrey tarafından tanımlanmıştır (Sauerbrey 1959):

$$\Delta F = -2.26 \times 10^6 \times F_0^2 \times (\Delta M/A)$$

Bağıntıda,

ΔF , frekans farkı, Hz

ΔM , kristal yüzeyine kaplanan ve kristal yüzeyinde adsorblanan kütle, g

A, kristal yüzey alanı, cm²

F_0 , kristalin temel titreşim frekansı, MHz’dir.

2.4.1.5. Kuartz Kristal Mikrobalans Sistemi ile Glukoz Tayini ve Fulleren

Fullerenlerin (karbon top ve nanotüplerin), yeni biyosensör sistemlerinin geliştirilmesinde kullanımı son yıllarda gündeme gelmiştir. Fulleren C₆₀ yapısında bulunan 60 π -elektronu sebebiyle nükleofilik özelliğe sahiptir ve glikonik asit, gibi elektron yoğunluğu bulunduran çeşitli organik maddeler ile reaksiyona girebilmektedir (Chao ve Shih 1998). Bu çalışmalarda fulleren C₆₀'ın sahip olduğu 60 π -elektronu da dikkate alınarak piezoelektrik özellik gösteren kristallerde kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır.

Kan glukoz seviyesinin belirlenmesi diyabetin (*Diabetes mellitus*) teşhisinde büyük bir öneme sahiptir. Glukoz seviyesinin belirlenmesinde elektrokimyasal, spektrofotometrik, amperometrik, polarimetrik gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu, zaman alıcı ve maliyetlidir. Geliştirilen piezoelektrik glikonik asit biyosensörünün, bilinen immün teşhislere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Herhangi bir işaretleyici (flüoresans, kemilüminesans gibi) kullanılmadan ve numunenin çeşitli reaktiflerle muamelesine gerek duyulmadan, glukozun hızlı bir şekilde belirlenmesi mümkündür. Analiz için numunenin çok az miktarı yeterli olabilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal ve Reaktifler

Bu çalışmada analitik saflıkta (ACS) ya da yerine göre mikroskopi saflığında kimyasal ve reaktifler kullanıldı.

Nicotiana glutinosa bitkisinin yüzeyini aşındırmak amacıyla Celite® 545 (Sigma, St. Louis, MO, ABD) kullanıldı.

Tütün Mozaik Virüsünü izole etmek amacıyla merkaptoetanol, n-butanol, poli(etilenglikol) (PEG) ve NaCl, Sigma (ABD) firmasından temin edildi.

Tütün Mozaik Virüsünü kaplamak ve karboksifulleren sentezlemek amacıyla Buckminster fullerene (C_{60}) %99,5 (Aldrich, ABD) kullanıldı.

Fulleren ile Tütün Mozaik Virüsünü etkileştirmek amacıyla çözücü olarak kullanılan toluen, kloroform, metanol, aseton, 1,5 pentanditriol, 9-dekano-1-ol, 3-merkaptopropiyonik asit ve 11-merkaptoundekanoik asit, ACS saflığında Sigma (ABD) firmasından temin edildi.

Karboksifulleren sentezlemek amacıyla sodyum hidrür (Sigma, ABD), bromomalonik asit dietil esteri (Sigma, ABD), n-Hekzan (Merck, Almanya), SiO_2 (Sigma, ABD), H_2SO_4 (Sigma, ABD) kullanıldı.

Karboksifulleren ile kaplı TMV'nin Kuartz Kristal Mikrobalsan sistemine uygulanması için kaynağı *Aspergillus niger* olan Tip II sınıfındaki glukoz oksidaz enzimi (GOx; β -D-glukoz; oksijen-1-oksidoredüktaz; E.C.1.1.3.4) (Sigma, ABD) kullanıldı, ilave bir saflaştırma yapılmadı. Glikonik asit oluşumu için D-glukoz (Sigma, ABD) kullanıldı. Kaplama malzemesinin kuartz kristal yüzeyine tutunmasını temin etmek amacıyla poli(vinil klorür)-PVC (M_r : 30.000, Sigma, ABD) kullanıldı.

Enzim immobilizasyonu için elektrospin yöntemi ile plaka kaplama malzemesi olarak poli(laktik-ko-glikolik)asit (PLGA) (85:15, Aldrich, ABD), tetrahidrofuran (THF, Sigma, ABD), dimetilformamid (DMF, Sigma, ABD) ve diklorometan (Sigma, ABD) kullanıldı.

3.2. Yöntem

Çalışmada, Tütün Mozaik Virüsü nano-kalıp olarak kullanıldı. *Nicotiana glutinosa* bitkileri Tütün Mozaik Virüsü ile enfekte edildikten sonra homojenizasyon ve ultrasantrifüj ile virüs saflaştırılarak süspansiyon olarak elde edildi. Fullerenin karboksi türevi sentezlendi. Elde edilen virüs süspansiyonu, C₆₀ (fulleren) ve fullerenin karboksi türevi ile etkileştirilerek sonuçlar geçirmeli elektron mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.1. Tütün (*Nicotiana glutinosa*) Bitkisine Tütün Mozaik Virüsünün Aşılması

Nicotiana glutinosa bitkisine mekanik olarak aşılama yapıldı. Bu amaçla, Samsun sigarasından alınan tütün, 0.1M sodyum fosfat tamponu ile homojenize edilerek 1/5 oranında suyla seyreltildi ve süzüldü. Daha sonra, virüsün bitki dokusuna geçebilmesi için aşındırıcı madde olarak Celite 545 kullanıldı. Bitki yaprakları Celite 545 ile aşındırıldıktan sonra, TMV süspansiyonu yaprak yüzeyine sürülerek virüsün yaprak içine girmesi sağlandı. Bitki, 24-34°C sıcaklık aralığında ve doğal ışık alan serada tutuldu. Bir hafta içerisinde virüsün çoğalma belirtisi olarak lokal lekeler görüldü. Yaklaşık olarak 200 g yaprak materyalinden (20-30 bitki) 1 g Tütün Mozaik Virüsü elde edildi (Şekil 3.3.1).

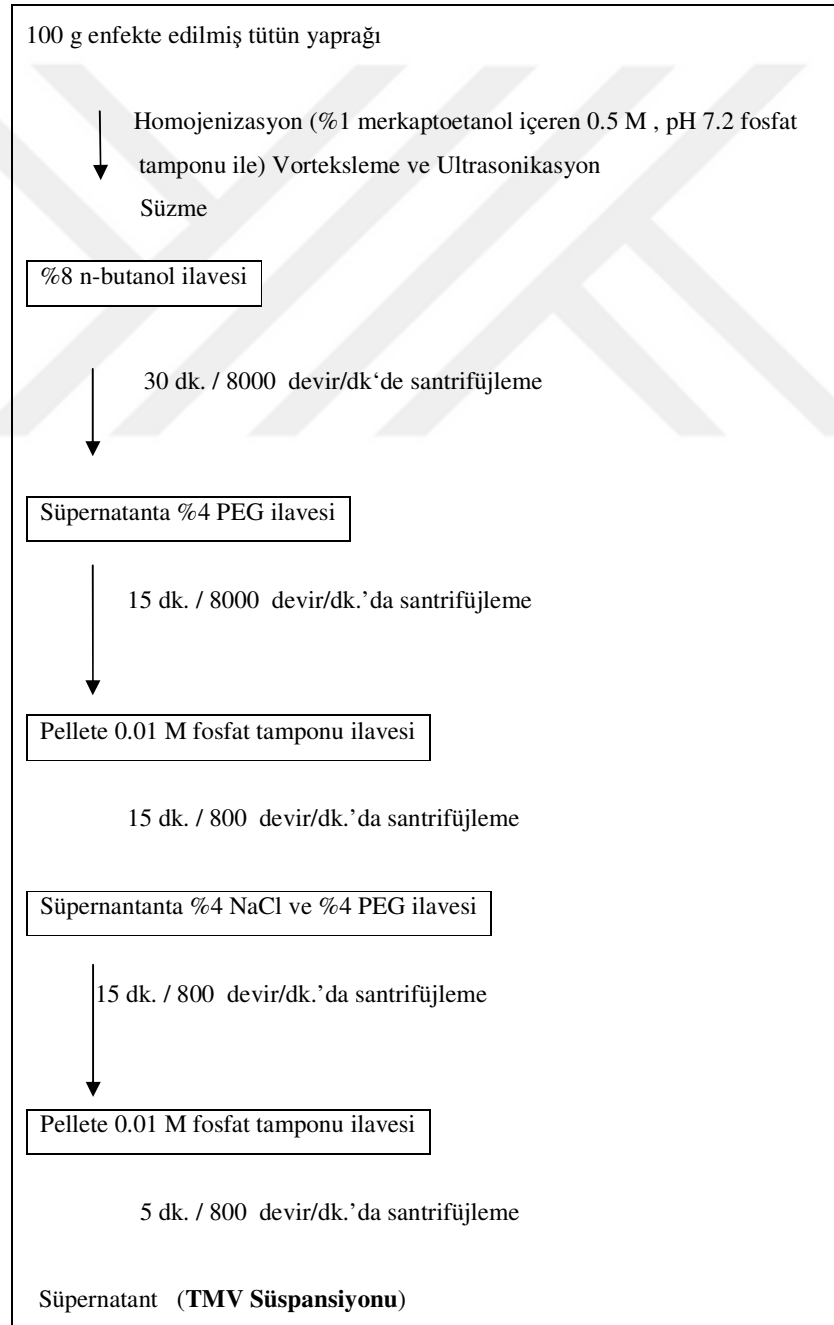


Şekil 3.3.1. *Nicotiana glutinosa* bitkisi, TMV'nin enfekte ettiği tütün yaprağı ve izole edilmiş TMV'nin TEM görüntüleri.

3.2.2. Tütün Mozaik Virüsünün *Nicotiana glutinosa* Bitkisinden Saflaştırılması

Tütün Mozaik Virüsü, Çizelge 3’de şematize edilmiş yolla (Gooding ve Hebert, 1967) saf süspansiyon (13 µg/ µl) olarak elde edildi. Saflaştırma aşamalarında yüksek devirli santrifüj adımlarında Beckman Optima L-100 XP ultrasantrifüj cihazı kullanıldı.

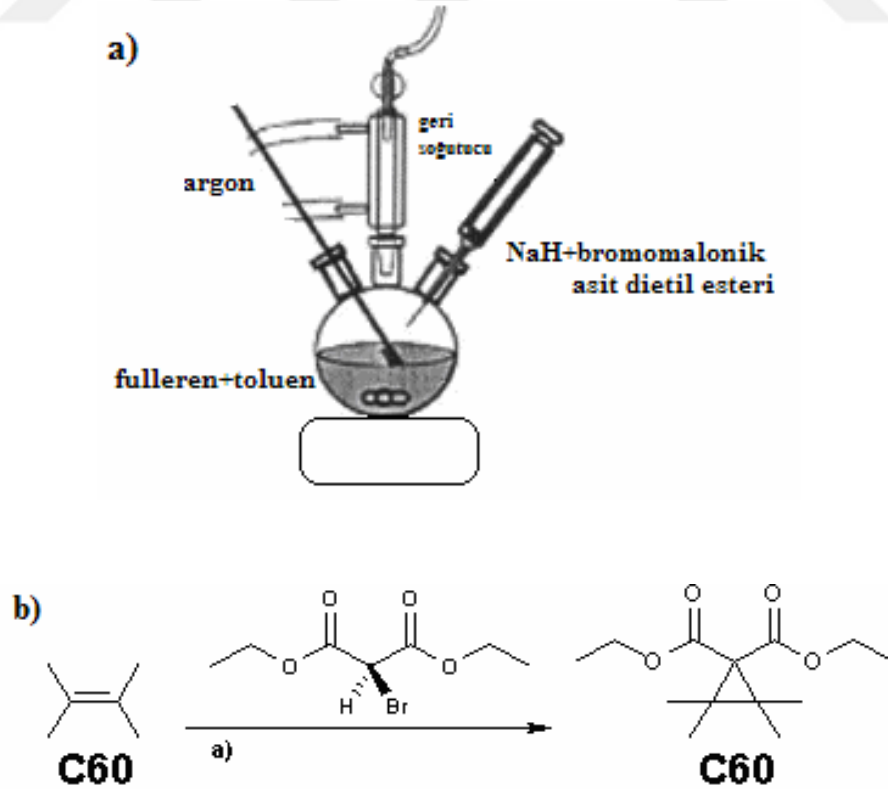
Çizelge 3. Saf TMV Süspansiyonun Elde Edilmesinde İzlenecek Deneysel Yolların Şematik Gösterimi.



Saflaştırma sonucunda elde edilen süspansiyondan 10 µl alınıp 100 µl (pH 7) Na/K tamponu ile seyreltildi ve stok TMV çözeltisi (1,3 µg/ µl) olarak kullanıldı.

3.2.3. Fullerenin Karboksi Türevinin Sentezlenmesi

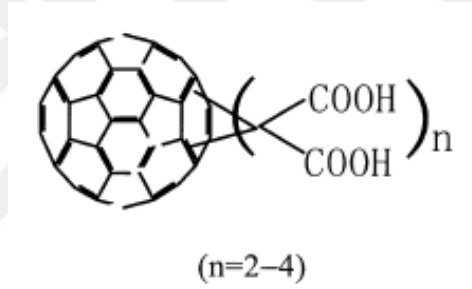
Bingel metoduna göre 200 mL toluen içinde 435 mg (0.6 mmol) fullerene çözöldü. İnert argon atmosferi altında 0,144 g (6 mmol) sodyum hidrür ve 0,216g (0,9 mmol) bromomalonik asit dietil esteri ilave edildi. Oda sıcaklığında 6,5 saat karıştırıldı. Ardından 8 damla 2 normal sülfürik asit ile hidrolizlendi ve magnezyum sülfat ile kurutuldu. Çözücü uzaklaştırılarak reaksiyon karışımı kolon kromatografisi yardımı ile ayrıldı (300 g SiO₂, toluen/n-hekzan, 1/1, toluen). Kolonda kullanılan çözücüler uzaklaştırıldıktan sonra mikrokristaller şeklinde koyu, parlak, katı bir halde siklopropanlanmış fullerene elde edildi (Şekil 3.4.1).



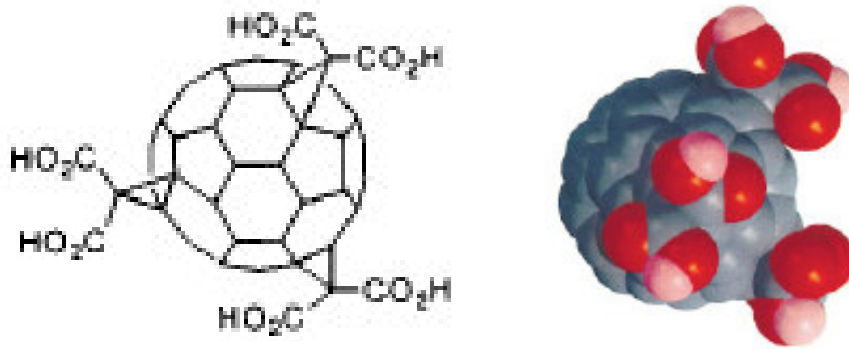
Şekil 3.4.1. Bingel reaksiyonu, (a) reaksiyon şeması (b) fullerenin malonat

esteri ve sodyum hidrür ile tolüen içinde ve oda sıcaklığında verdiği reaksiyon.

Elde edilen $C_{61}(CO_2Et)_2-C_{2v}$ -(siklopropanlanmış fullerene), Lamparth ve Hirsch (1994) metoduna göre karboksifulleren sentezi için başlangıç maddesi olarak kullanıldı. Bu prosedüre göre, 100 mg $C_{61}(CO_2Et)_2-C_{2v}$ argon atmosferi altında ve 20 kat molar NaH fazlası varlığında çözüldü. $60^\circ C$ 'de 3 saat karıştırıldıktan sonra 1 mL metanol ilavesi ile fullerene malonik asidin sodyum tuzu çöktürüldü. Karışım santrifüjlenerek sıvı faz uzaklaştırıldı. Pellet önce tolüenle , ardından $2 \text{ mol dm}^{-1} H_2SO_4$ ve son olarak su ile yıkandı. Vakum altında $6^\circ C$ 'da, 12 saat kurutuldu. Oluşan malonik asitler, THF, metanol ve su gibi çözücülerde çözünür özelliktedir. Suda çözünürlük, fullerene bağlanan malonik asit gruplarının sayısı arttıkça artar.



Şekil 3.4.2. Karboksifullerenin şematik gösterimi



Şekil 3.4.3. C_{60} küresi üzerindeki ikili karboksil gruplarını gösteren karboksifulleren yapıları

3.2.4. Fullerenin Geçirmeli Elektron Mikroskopuyla görüntülenmesi

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz görüntülerle karşılaştırmak üzere 0,50 mg Fulleren -C₆₀ , ortamda TMV olmaksızın 100 µl merkapto-undekanoik asit ile 10 dk. sonike edildi. Bakır TEM gridi üzerine karışımdan 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Ardından geçirmeli elektron mikroskopuyla görüntüsü çekildi (Zeiss CEM 902-LEO 902).

3.2.5. Karboksifullerenin Geçirmeli Elektron Mikroskopuyla görüntülenmesi

Karboksifulleren ise 5 µg tartılarak pH'ı 9'a ayarlanmış 50 µl H₂O içinde çözüldü ve 2 dk. sonike edildikten sonra bakır TEM gridi üzerine 10 µl damlatılarak kurumaya bırakıldı. Ardından nanoyapıların TEM görüntüsü çekildi.

3.2.6. TMV'nin Geçirmeli Elektron Mikroskopuyla görüntülenmesi

Yapılan çalışmalarla karşılaştırmalı olarak incelenmek üzere 10 µl stok TMV çözeltisi bakır TEM gridi üzerine damlatılarak kurumaya bırakıldı. Ardından TEM görüntüsü çekildi.

3.2.7. Farklı çözücüler içinde TMV'nin Fulleren ile etkileştirilmesi

Fullerenin TMV üzerine optimal kaplanma koşullarını araştırmak üzere fulleren ile TMV farklı çözücüler içinde etkileştirildi.

3.2.7.1. TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Çalışmada, 5 µg fulleren 100 µl 9-Deken-1-ol içinde süspanse edildi. Süspansiyon 10 dk. sonike edildi. Bu örnekten 10 µl alınarak 10 µl TMV stok ile karıştırıldı ve 75°C'da çalkalamalı inkübatörde yarım saat calkalandı. Bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl alınarak damlatıldı ve kurutulduktan sonra TEM görüntüsü çekildi (Zeiss CEM 902-LEO 902).

3.2.7.2. TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fulleren (5 µg) tartıldı ve 100 µl merkaptoundekanoik asit içinde kısmen çözülerek süspanse edildi. Süspansiyona 100 µl pH 8 PBS tamponu eklenerek 2 dk. sonike edildi. Bu örnekten 10 µl alınarak 10 µl stok TMV çözeltisi ile karıştırıldı ve 75 °C da çalkalamalı inkübatörde yarım saat çalkalandı. Bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Ardından TEM görüntüsü çekildi.

3.2.7.3. TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fulleren (5 µg), 100 µl 11-merkaptoundekanoik asit içinde süspanse edildi. Süspansiyon 10 dk. sonike edildi. Ardından yarım saat 50°C'daki çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. TEM görüntüsü çekildi.

3.2.7.4. TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit ve NaOH içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fulleren (5 µg), 100 µl 3-merkaptopropiyonik asit ile 1 dk. sonike edildikten sonra çalkamalı inkübatörde 30°C'da 2 saat bekletildi. Süspansiyon, 1400 devir/dk.'da 10 dk. santrifüjlendi. Pellet, 100 µl 0,1 M fosfat tamponunda (pH 8) süspanse edildikten sonra 10 µl NaOH eklenerek 5 dk. vortekslendi. Elde edilen süspansiyondan 10 µl alınarak 10 µl stok TMV çözeltisiyle karıştırıldı. 75°C'da 10 dk. bekletildikten sonra bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra, örneğin TEM görüntüsü çekildi.

3.2.7.5. TMV'nin Kloroform içinde Fullerenle etkileştirilmesi

Fulleren (5 µg), 100 µl kloroform içinde kısmen çözülüp süspanse edildi. Süspansiyon 2 dk. sonike edildi. Bu örnekten 10 µl alınarak 10 µl stok TMV çözeltisi ile karıştırıldı ve 75°C'da çalkalamalı inkübatörde yarım saat çalkalandı. Bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı . TEM görüntüsü çekildi.

3.2.7.6. TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fulleren (5 µg), 100 µl 1,5 Pentanditiyol içinde süspanse edildi. Süspansiyon 10 dk. ultrasonikasyona maruz bırakıldı. Bu örnekten 10 µl alınarak 10 µl stok TMV çözeltisi ile karıştırıldı ve 75°C'da çalkalamalı inkübatörde yarım saat çalkalandı. Bakır TEM gridi üzerine örnekten 10 µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. TEM görüntüsü çekildi.

3.2.8. TMV'nin farklı pH'larda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

3.2.8.1. TMV'nin saf su içinde Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

Karboksifulleren (5 µg), 100 µl bidestile H₂O içinde çözüldü ve 2 dk. sonike edildi. Çözeltiye 10 µl stok TMV çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekten 10 µl alınarak Bakır TEM gridi üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. TEM görüntüsü çekildi (Zeiss CEM 902-LEO 902).

3.2.8.2. TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

Karboksifulleren (5 µg), 100 µl 0.1 M karbonat tamponunda (pH 9) içinde çözüldü ve 2 dk. sonike edildi. Çözeltiye 10 µl stok TMV çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekten 10 µl alınarak Bakır TEM gridi üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. TEM görüntüsü çekildi.

3.2.9. Karboksifulleren ile kaplanmış TMV'nin Kuartz Kristal Mikrobalans sisteminde uygulanması

Kuartz Kristal Mikrobalans sisteminde karboksifulleren ile kaplı TMV'nin sensör yüzeyi kaplama maddesi olarak kullanılabilirliğini araştırmak üzere 10 MHz'lik 3,4 mm çapında gümüş elektrodlu AT-kesim kuartz kristaller kullanıldı.

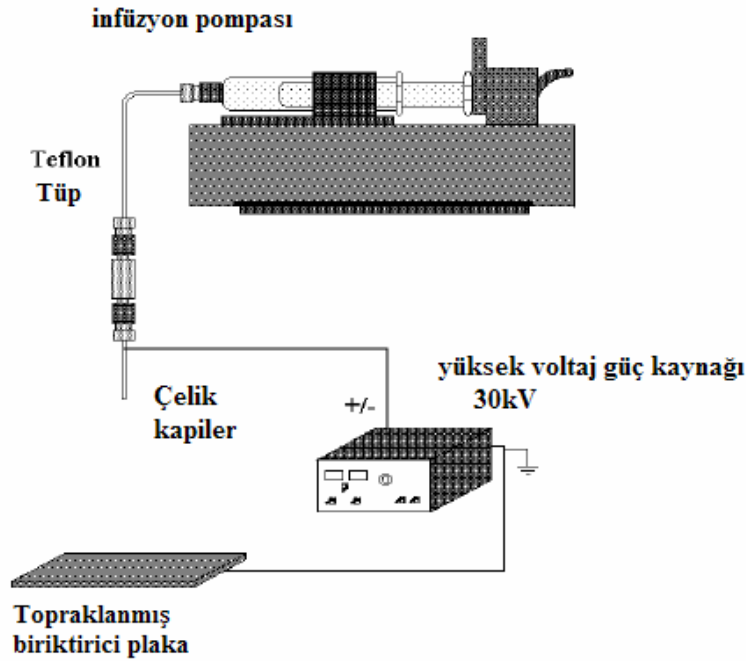
Çalışmada, karboksifulleren ile kaplanmış TMV'nin kristal yüzeyinde kalmasını sağlayabilmek amacıyla poli(vinil klorür) (PVC, 0,8 mg), 200 µl toluen içinde 5 dk. sonike edilerek çözüldü. Bu çözelti içine 1,6 µg karboksifulleren ile karıştırılmış 5 µl stok TMV çözeltisi eklenip karıştırıldı. Gümüş kaplı boş kuartz kristallerin ilk frekansları (F_0) ölçüldükten sonra, TMV-

karboksifulleren içeren PVC süspansiyonu ile kaplamaya geçildi. Hazırlanan çözeltilerin 2 mikrolitresi (1µl + 1µl) kristalin her iki elektrod yüzeyi üzerine mikropipet yardımıyla damlatılıp, kristaller oda sıcaklığında çözücünün buharlaşması için 15 dk. bekletildi; ardından kristallerin frekansı (F_1) kaydedildi.

3.2.9. 1. Enzim İmmobilizasyonu

3.2.9.1.1. Elektrosprin yöntemi

Elektrosprin yöntemi, nano boyutta lifler elde etmek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, genellikle yüklü bir sıvı bir polimer çözeltisinin elektrik alanına gönderilmesi prensibine dayanmaktadır. Yüklü polimer çözeltisi, ucuna yerleştirilmiş ve 10-60 kV aralığında voltaj uygulanmış bir metal iğne vasıtasıyla 10-30 cm uzaklıktaki iletken bir metal yüzey üzerine gönderilir. İğne ucundan enjekte edilen polimer çözeltisi, -elektriksel kuvvet yüzey gerilim kuvvetini aştığında-, kesintisiz olarak nanolifler oluşturmaya başlar (Şekil 3.8.1).



Şekil 3.8.1. Elektrosprin sisteminin şematik gösterimi (Antonio vd. 2001'den alınmıştır).

Bu çalışmada, enzim immobilizasyonu için kullanılan alüminyum tabakalar, elektro-spin yöntemi ile kaplandı. Bunun için, biyouyumlu bir polimer olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'ın $\text{CH}_2\text{Cl}_2(3)$: THF (1): DMF (1) içindeki % 20'lik çözeltisi hazırlanıp, 10 cm^3 hacmindeki cam bir enjektöre aktarıldı. Ardından, 30 kV'luk yüksek voltaj uygulanan alana polimer çözeltisi gönderildi ve alüminyum tabakaların yüzeyi polimer nanolifler ile kaplanarak kullanılan enzim çözeltisini hapsedecek özellikteki gözenekli bir lif yapısı elde edildi.

3.2.9.1.2. Kaplı tabakalar üzerine enzimin immobilizasyonu

Glukoz oksidaz enziminin, kuartz kristal yüzeyi üzerine kontrolsüz olarak adsorpsiyonunu engellemek amacıyla alüminyum yüzey üzerinde elektrospin yöntemiyle oluşturulmuş polimer nanoliflerde enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Asetat tamponu (pH 5,1; 0,05 M), 12,7 mL 0,2 M asetik asit ve 37,3 mL 0,2 M sodyum asetat çözeltilerinden karıştırılıp, bidestile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Glukoz oksidaz enzimi (20 mg) 10 mL pH 5,1 asetat tamponunda çözüldü. İmmobilizasyon için hazırlanmış polimer nanolif kaplı tabakalar, enzim çözeltisi içerisinde $+4^\circ\text{C}$ 'da 1 gece inkübe edildi.

3.2.9.1.3. Glukoz çözeltisinin hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere 0,465 g D-Glukoz, 10 mL bidestile H_2O içinde çözüldü. Çalışmada kullanılan GOx enzimi, D-Glukozun, sudaki üç farklı anomerik yapısından (α -anomeri; % 36,5), β -anomeri (% 63,5) ve aldehit formu (% 0,003) β -D-glukoza büyük ölçüde katalizlediği için, D-glukoz çözeltisi, mutarotasyonun tamamlanması için bir gün bekletildikten sonra kullanıldı.

3.2.9.1.4. Glikonik asidin Karboksifulleren-TMV kaplı PZ-QCM kristali yardımıyla tayini

Çalışmada 0,05 M asetat tamponu (pH 5,1) içerisine β -D-glukoz ilave edilerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında immobilize glukoz oksidaz reaksiyon ortamına ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun dördüncü dakikasinda, immobilize GOx ortamdan uzaklaştırılarak enzimatik reaksiyon durduruldu. Çalışmada kullanılan kristallerin kaplanmadan önceki ve kaplandıktan sonraki frekansları kaydedildi. Kaplı kristaller glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisi içerisine daldırılarak birer dakika bekletildi. Kristaller oda sıcaklığında 10-15 dk. bekletilerek kurutulduktan sonra frekans değişimleri belirlenerek glikonik asitin analizi gerçekleştirildi.

3.2.10. Glikonik asidin TMV olmaksızın Karboksifulleren ile kaplı PZ-QCM kristali yardımıyla tayini

Çalışmada poli(vinil klorür) (PVC, 0,8 mg), 200 μ l toluen içinde 5 dk. sonike edilerek çözüldü. Bu çözelti içine 1.6 μ g karboksifulleren eklenerek karıştırıldı. Gümüş kaplı boş kuartz kristallerin ilk frekansları (F_0) ölçüldükten sonra, karboksifulleren içeren PVC ile kaplamaya geçildi. Hazırlanan çözeltilerin 2 mikrolitresi (1 μ l + 1 μ l) kristalin her iki elektrod yüzeyi üzerine mikropipet yardımıyla damlatılıp, kristaller oda sıcaklığında çözücünün buharlaşması için 15 dk. bekletildi; ardından kristallerin frekansı (F_1) kaydedildi.

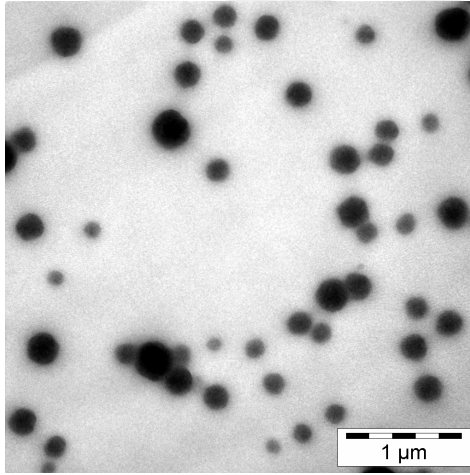
Ardından 0,05 M asetat tamponu (pH 5,1) içerisine β -D-glukoz ilave edilerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında immobilize glukoz oksidaz reaksiyon ortamına ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun dördüncü dakikasinda, immobilize GOx ortamdan uzaklaştırılarak enzimatik reaksiyon durduruldu. Çalışmada kullanılan kristallerin kaplanmadan önceki ve kaplandıktan sonraki frekansları kaydedildi. Kaplı kristaller glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisi içerisine daldırılarak birer dakika bekletildi. Kristaller oda sıcaklığında 10-15 dk. bekletilerek kurutulduktan sonra frekans değişimleri belirlenerek glikonik asitin analizi gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

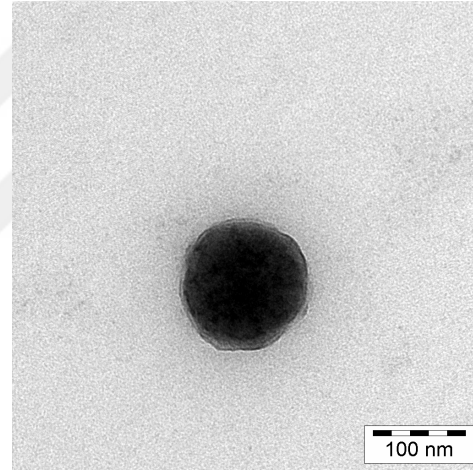
4.1. Geçirmeli Elektron Mikroskop İncelemeleri

4.1.1. Fullerenin Geçirmeli Elektron Mikrografı

Fulleren 11-merkaptoundekanoik asit ile etkileştirildikten sonra alınan görüntülerde fullerenin küresel yapıda yaklaşık 50-200 nm boyutlarında koloidal kümeler oluşturduğu görüldü (Şekil 4.1 ve 4.2).



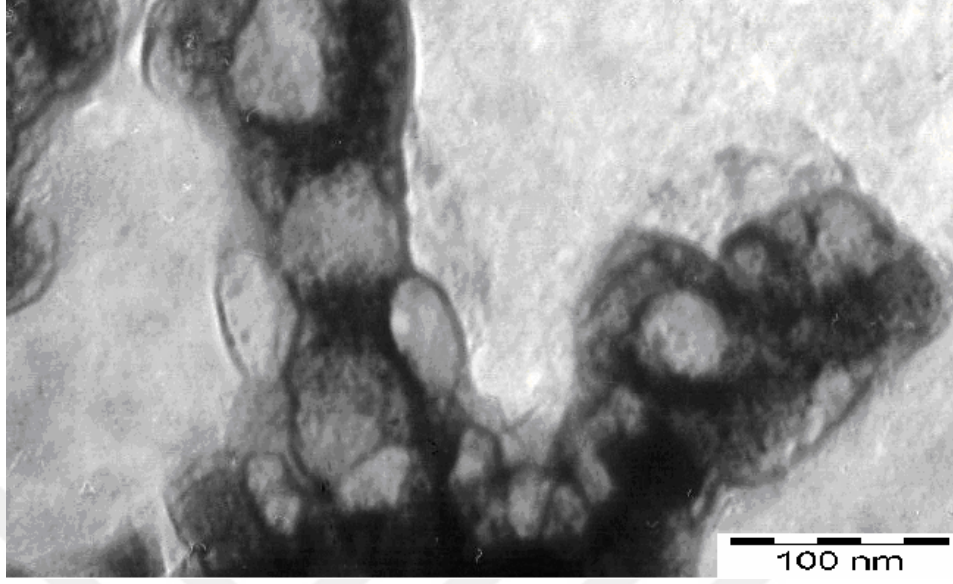
Şekil 4.1. Fullerenin TEM mikrografı, fulleren kümeleri.



Şekil 4.2. Fullerenin TEM mikrografı , tek bir fullerene kümesi.

4.1.2. Karboksifullerenin Geçirmeli Elektron Mikrografı

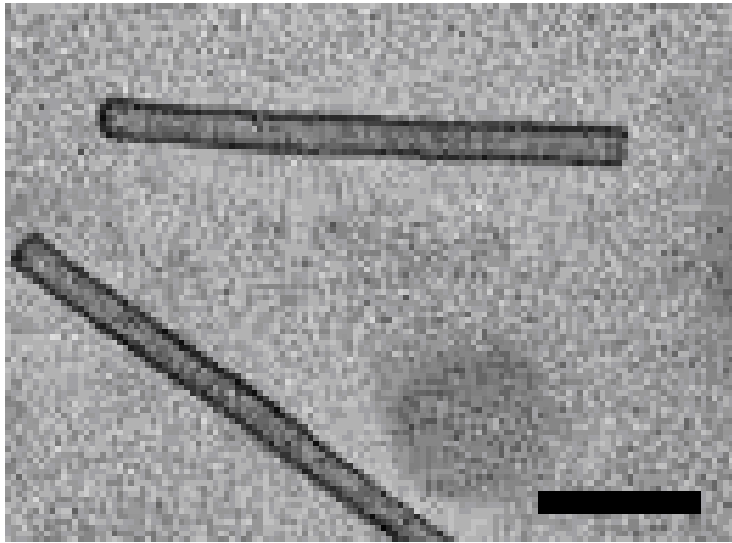
Karboksifullerenin pH'ı 9'a ayarlanmış su içerisinde alınan TEM görüntülerinde, karboksifullerenin çözelti içinde daha homojen ve yaygın bir dağılım gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kümeler halinde bir araya toplanmış Karboksifullerenin TEM mikrografı.

4.1.3. TMV'nin Geçirmeli Elektron Mikrografı

Kontrol olarak TMV saf halde geçirmeli elektron mikroskobu ile görüntüledi. (Şekil 4.4 Alınan görüntülerde çıplak haldeki tipik (çubuk şeklinde 300 nm uzunluğunda ve 18 nm çapında virüs yapıları gözlemlendi.



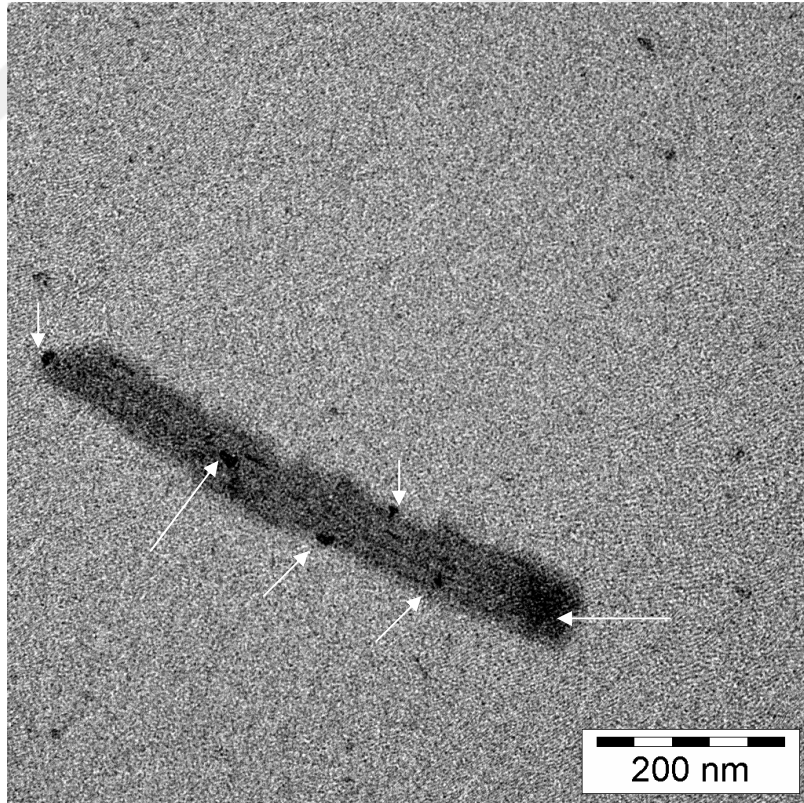
Şekil 4.4. Çıplak TMV'nin TEM mikrografı (Ölçek çubuğu: 100 nm).

4.1.4. Farklı çözücüler içinde TMV'nin Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda oluşan fulleren - virüs yapıları

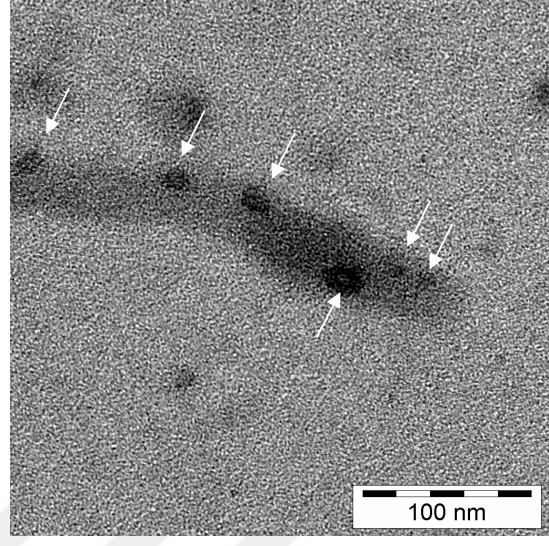
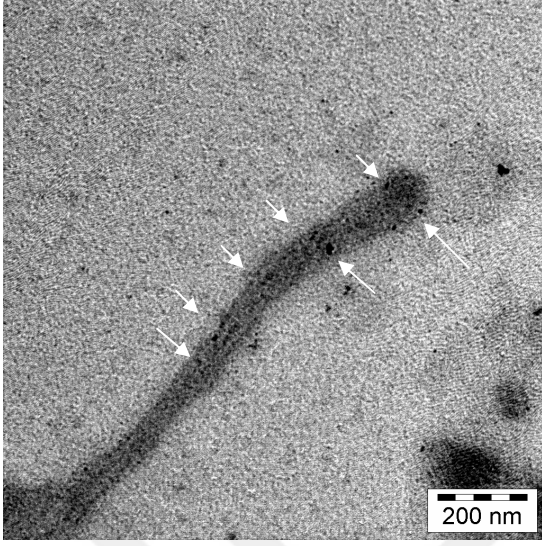
TMV ile fulleren, farklı çözücüler içinde etkileştirildikten sonra TEM mikrografları çekildi ve fullerenin TMV'yi kaplama düzeyleri incelendi.

4.1.4.1. TMV'nin 9- Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fullerenin 9-Deken-1-ol içinde TMV ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografında, fullerenin TMV üzerinde yer yer kümeler oluşturduğu, ancak homojen bir kaplama sağlamadığı gözlemlendi (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7).



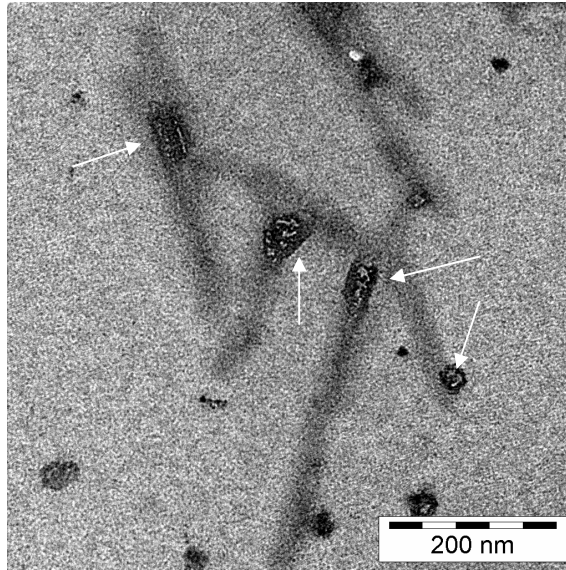
Şekil 4.5. TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar TMV üzerindeki fulleren kümelerini göstermektedir.



Şekil 4.6. TMV'nin 9-Deken-1-ol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda farklı büyütmelelerde alınan TEM mikrografları; oklar TMV üzerinde biriken fulleren kümelerini göstermektedir.

4.1.4.2. TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

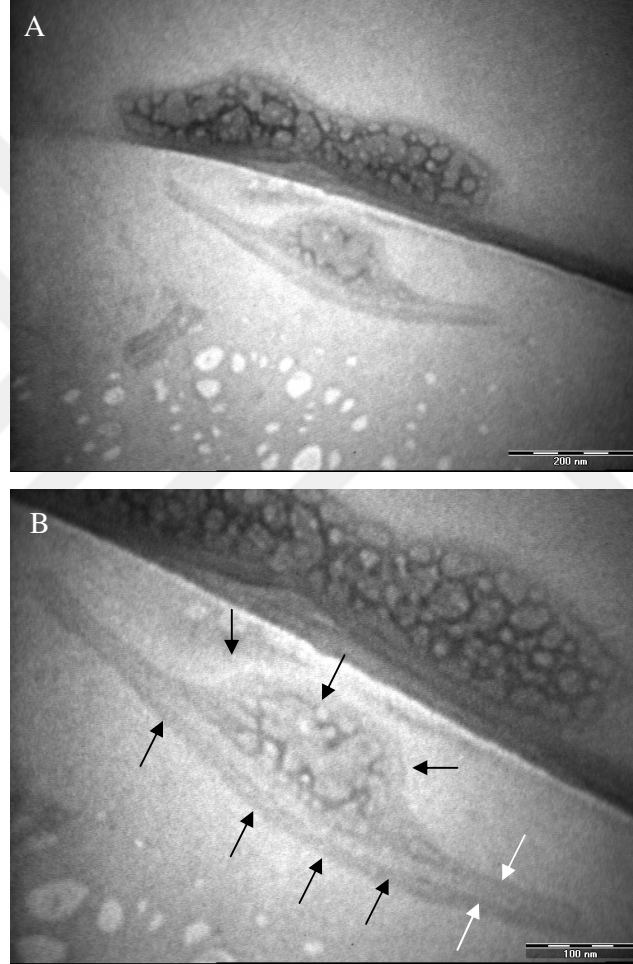
Fulleren 11-merkaptoundekanoik asit içinde TMV ile etkileştirildikten sonra alınan fotoğraflarda fullerenin TMV'nin uç kısımlarında ve yer yer virüs boyunca yoğun kümeler oluşturduğu görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. TMV'nin 3-Merkaptopropiyonik asit içinde Fulleren ile etkileştirildikten sonra alınan TEM mikrografı; oklar: TMV üzerinde biriken fulleren kümeleri.

4.1.4.3. TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

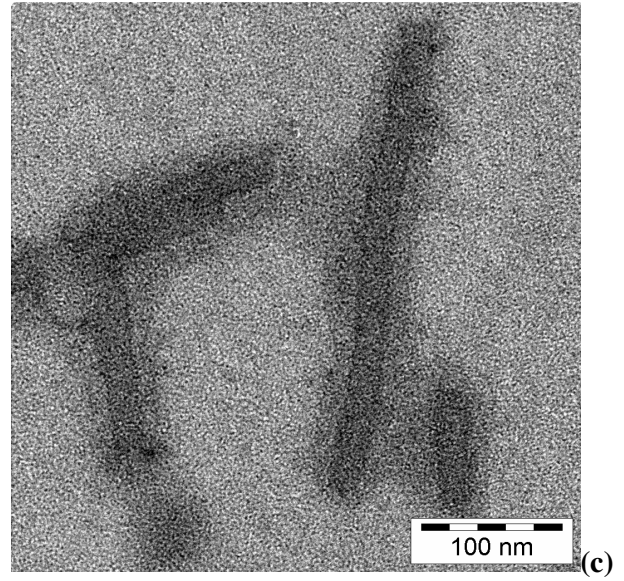
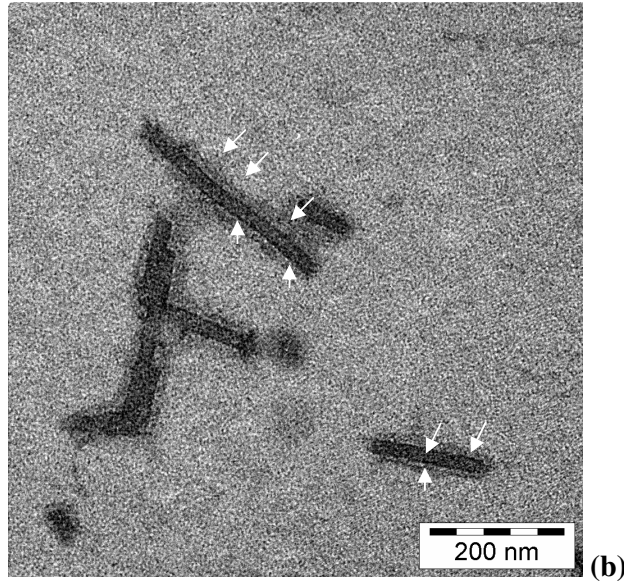
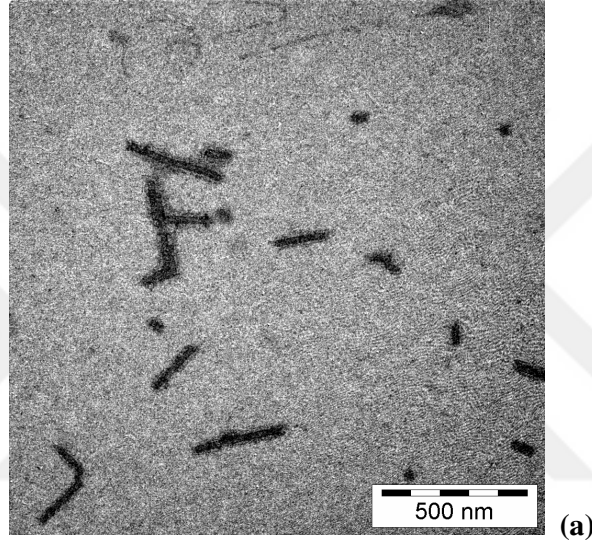
Fulleren 11-merkaptoundekanoik asit içinde TMV ile etkileştirildikten sonra alınan fotoğraflarda fullerenin TMV boyunca düzensiz yığınlar oluşturduğu görüldü.



Şekil 4.8. (a) TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı (Ölçek çubuğu: 200 nm) (b) yüksek büyütmedeki görüntüsü (beyaz oklar TMV partikülünü, siyah oklar ise TMV etrafında biriken fulleren kümelerini işaret etmektedir (Ölçek çubuğu: 100 nm).

4.1.4.4. TMV'nin 11-Merkaptoundekanoik asit ve NaOH içinde Fullerenle etkileştirilmesi

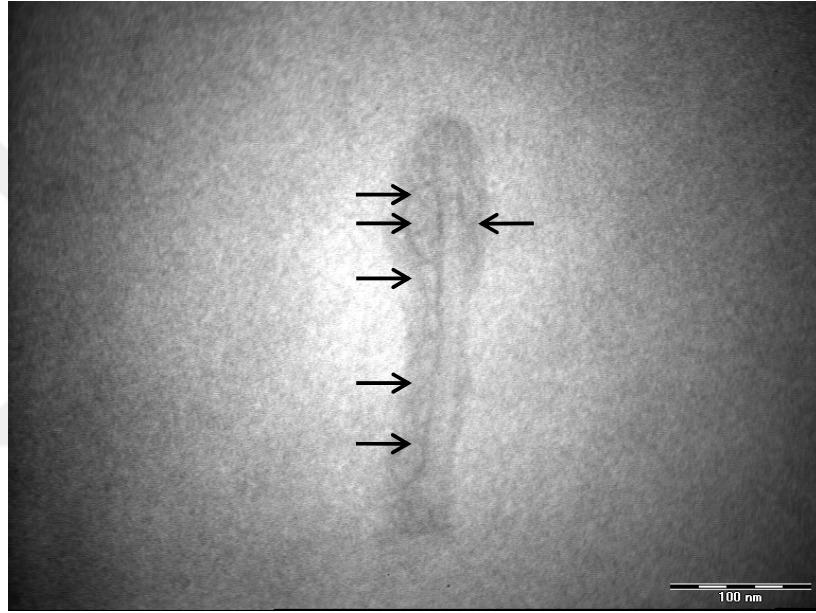
Fullerenin önce 11-Merkaptoundekanoik asit ile muamelesi ve ardından NaOH varlığında TMV ile etkileştirilmesi virüs etrafında daha homojen bir fullerene birikimine yol açmıştır. Fullerenin merkaptoundekanoik asit yardımıyla daha polar hale getirilmesi ve bazik ortamda TMV ile aynı faza alınması kaplanmanın etkinliğini arttırmış, ancak kaplanmanın virüs yüzeyinde homojen olarak gerçekleşmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 Fullerenin 11-Merkaptoundekanoik asit ile muamelesi ve ardından bazik ortamda TMV ile etkileştirilmesi sonrası alınan TEM mikrografları.

4.1.4.5. TMV'nin Kloroform içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

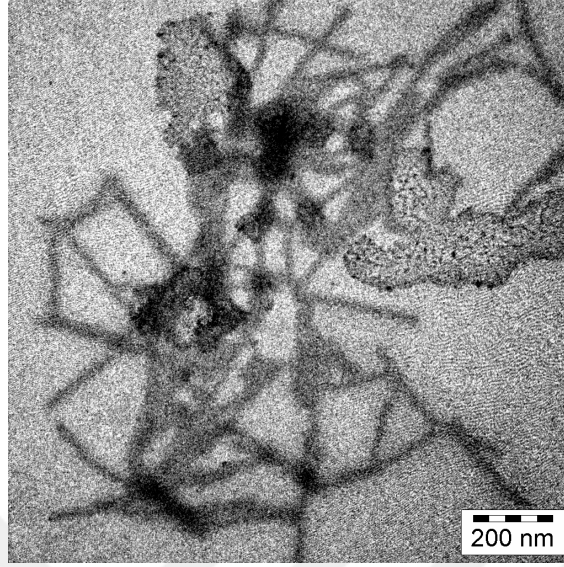
Fullerenin kloroform içinde TMV ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM görüntüsünde fullerenin kümeler oluşturmadığı, ancak TMV çevresinde homojen olmayan bir şekilde toplandığı gözlemlendi (Şekil 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.10 TMV'nin Kloroform içinde Fulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar: TMV üzerinde biriken fulleren kümeleri.

4.1.4.6. TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fulleren ile etkileştirilmesi

Fulleren 1,5-Pentanditiyol içinde TMV ile etkileştirildi. Etkileşim sonucunda fulleren ve TMV'nin dağınık kümeler oluşturduğu ve etkin bir kaplanmanın sağlanamadığı görüldü (Şekil 4.13).



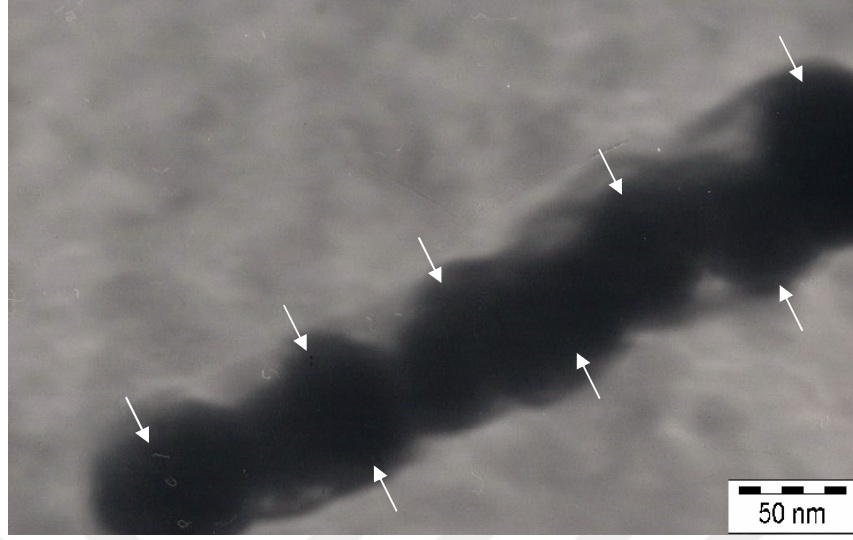
Şekil 4.11. TMV'nin 1,5-Pentanditiyol içinde Fullerene ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı.

4.1.5. TMV'nin farklı pH'larda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

4.1.5.1. TMV'nin pH 7'de Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

Karboksifulleren (0,45 μg), 50 μl bidestile H_2O içinde çözüldü ve 2 dk. sonike edildi. Çözeltiye 10 μl stok TMV çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekten 10 μl alınarak bakır TEM gridi üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Ardından, Zeiss CEM 902-LEO 902 marka TEM ile görüntüsü çekildi.

Alınan görüntülerde (Şekil 4.15) fullerenin TMV etrafında birikerek virüs protein kılıfını tamamen kapladığı görüldü; yer yer 50 ile 60 nm arasında incelen ve kalınlaşan bir kaplanma gözlemlendi.

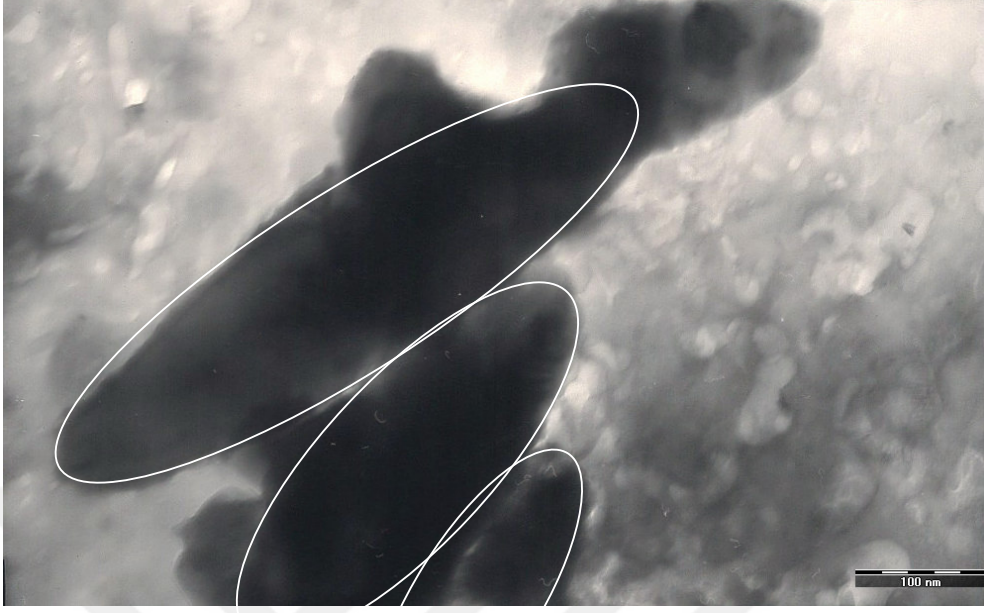


Şekil 4.12. TMV'nin suda Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı; oklar TMV üzerinde birikmiş tipik karboksifulleren kümelerini işaret etmektedir.

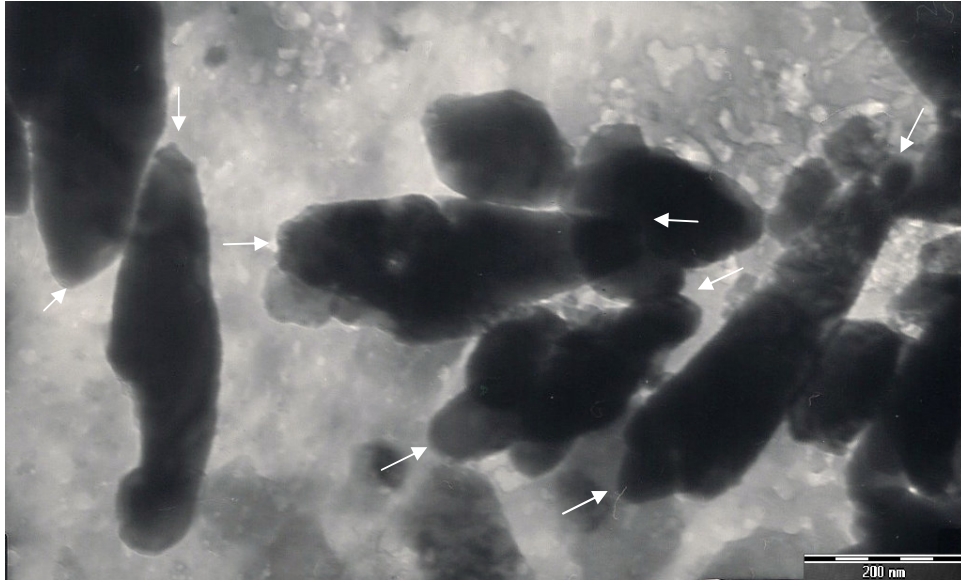
4.1.5.2. TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi

0,45 µg karboksifulleren 50 µl pH 9'a ayarlanmış H₂O içinde çözüldü ve 2dk. sonike edildi. Çözeltiye 10 µl stok TMV çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekten 10 µl alınarak Bakır TEM gridi üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. TEM görüntüsü çekildi (Zeiss CEM 902-LEO 902).

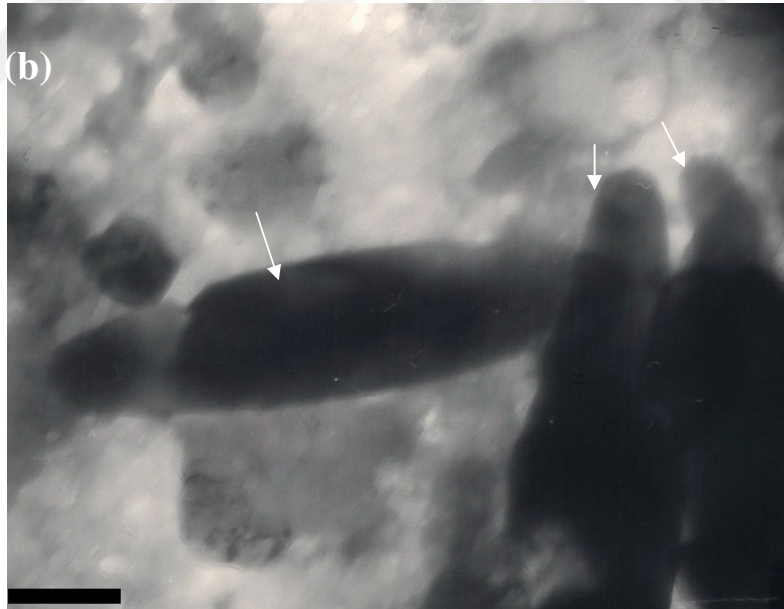
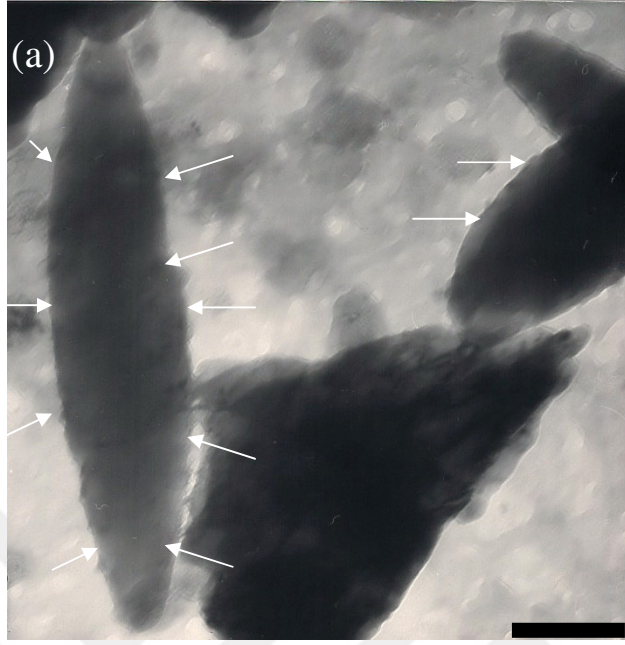
İncelenen mikroskop görüntülerinde karboksifullerenin yoğun olarak virüs boyunca toplandığı ve virüs protein kılıfının uçlarından ortalarına doğru kalınlaşarak düzenlendiği gözlemlendi. Virüs yüzeyinde pH 9'daki kaplanmanın saf su ortamında olduğundan daha yoğun olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.13. TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı. İşaretli bölgeler, karboksifulleren ile kaplanmış Tütün Mozaik Virüslerini göstermektedir.



Şekil 4.14. TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografı, beyaz oklar karboksifulleren ile kaplanmış TMV yapılarını göstermektedir.



Şekil 4.15. TMV'nin pH 9'da Karboksifulleren ile etkileştirilmesi sonucunda alınan TEM mikrografları; (a) oklar TMV üzerine kaplanmış karboksifulleren yığınlarını göstermektedir, (b)oklar karboksifulleren ile kaplanmış TMV partiküllerini göstermektedir (Ölçek çubuğu:50 nm)

4.2. Karboksifulleren ile kaplanmış TMV'nin Kuartz Kristal Mikrobalsans sistemine uygulanması

Çizelge 4'te, karboksifulleren-TMV kaplanmış kuartz kristallerin glikonik asitle etkileştirildiğinde gerçekleşen frekans düşüşleri verilmektedir. Kristal yüzeyine kaplanan 'TMV'nin kalıp etkisi ile düzenlenen karboksifulleren yapıları' glikonik asit ile etkileşime girdiğinde kristal frekanslarında 216 ile 510 Hz (ort. 381 Hz) arasında değişen frekans düşüşlerine neden olmakta ve böylece glikonik asitin tayinine olanak vermektedir.

Çizelge 4. Karboksifulleren ile kaplı TMV'nin QCM sisteminde yüzey kaplama maddesi olarak uygulanması sonucunda elde edilen frekans değişimleri

Kristal no.	F0 (MHz)	F1 (MHz)	F2 (MHz)	ΔF (Hz)
1	9.996867	9.995876	9.995475	401
2	9.996888	9.996180	9.995790	390
3	9.996258	9.995289	9.994884	405
4	9.996144	9.995466	9.995088	378
5	9.998016	9.995925	9.995709	216
6	9.996680	9.989208	9.988908	300
7	9.996598	9.995920	9.995470	450
8	9.996300	9.992218	9.991708	510

Çizelge 5. Karboksifullerenin tek başına QCM sisteminde yüzey kaplama maddesi olarak uygulanması sonucunda elde edilen frekans değişimleri

Kristal no.	F0 (MHz)	F1 (MHz)	F2 (MHz)	ΔF (Hz)
1	9.996871	9.996047	9.995877	170
2	9.996458	9.996201	9.995995	206
3	9.997255	9.997017	9.996697	320
4	9.996411	9.996206	9.996018	188
5	9.998698	9.998286	9.998044	242
6	9.996281	9.995810	9.995505	305
7	9.996428	9.995908	9.995660	248

Çizelge 5’de görüldüğü gibi, kristal yüzeyine karboksifulleren, TMV olmaksızın kaplandığında, glikonik asit ile yine etkileşime girmekte ve kuartz kristal frekanslarında 170 ile 320 Hz (ort. 240 Hz) arasında değişen düşüslere neden olmaktadır. Ancak, gözlenen bu frekans düşüşleri, karboksifulleren-TMV kaplamalarıyla elde edilen düşüşlerin (ort. 381 Hz) altındaki değerlerde kalmaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Tütün Mozaik Virüsü'nün uzaysal şekli ve protein yapısındaki fonksiyonel gruplardan yararlanılarak nanobiyoteknoloji çalışmalarında kullanılabilecek yeni bir nanomalzeme üretilmesi amacıyla denemeler yapıldı.

TMV'nin nano-kalıp olarak kullanıldığı çalışmada C₆₀-fulleren ve fullerenin karboksi-türevi kaplama malzemesi olarak seçildi. TMV'nin yüzey protein yapısı ile fullerenin etkileşmesi sonucu virüsün düzgün çubuk şeklini alarak düzenlenen bir fulleren malzemenin oluşturulması hedeflendi. Çalışma boyunca TMV, farklı çözücü ortamlarında fulleren ile etkileştirildi.

TMV'nin 9-deken-1-ol içinde etkileştirilmesi sonucunda fullerenin virüs yüzeyinde yer yer kümeler oluşturduğu ancak sürekli bir kaplanma yerine, kesikli ve bölgesel birikimlerin olduğu görüldü (Şekil 5.1-b). Bu durumun 9- Deken-1-ol'daki çift bağın fonksiyonel gruptan uzakta bulunması ve etkileşimin sterik engeller nedeniyle kısıtlanması nedeniyle gözlemlendiği düşünülmektedir.

TMV'nin 3-merkaptopropiyonik asit içinde fullerenle etkileştirilmesinin ardından çekilen görüntülerde ise fullerenin özellikle virüs protein kılıfının uç kısımlarında toplandığı ve bu bölgelerde yoğun kümeler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 5.1-c). 3-Merkaptopropiyonik asit üzerindeki -SH gruplarının muhtemelen virüsün uç kısımlarında bulunan sistein artıkları ile etkileşmesinin, fullerenin yalnızca uç noktalarda birikimine yol açtığı tahmin edilmektedir.

Fullerenin çözücülerinden biri olan kloroform içinde gerçekleştirilen etkileşim sonucunda, fullerenin çözelti içinde homojen dağılımı sonucu virüs etrafında fulleren birikimi görülmüştür ancak virüs fonksiyonel gruplarının hidrofilik yapısı kaplanmanın istenen yoğunlukta olmasını engellemiştir (Şekil 5.1-d). Fullerenin kloroform içinde çözünmesi, çözelti içinde homojen bir dağılım göstermesini sağlamış ve kümeler oluşturmasını engelleyerek dağınık bir şekilde TMV etrafında birikmesine yol açmıştır ancak, TMV protein kılıfı üzerindeki fonksiyonel grupların kloroform fazındaki fulleren ile etkileşimi yeterince kuvvetli olmamıştır. Amino ve karboksil gibi fonksiyonel gruplar hidrofilik yapıdadır. Organik fazdaki fullerenle hidrofilik özellikteki

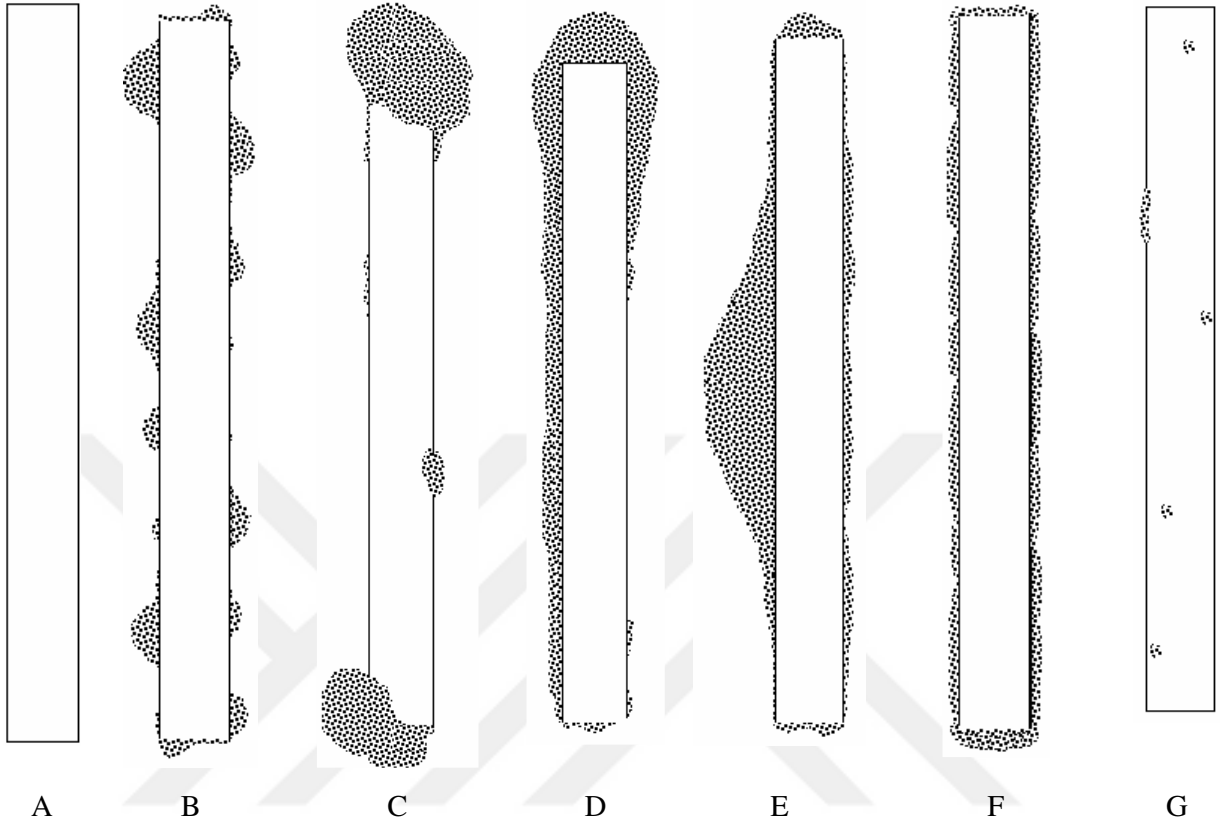
TMV arasında kuvvetli bir etkileşimin gerçekleşmesinin bu nedenle zorlaştığı ve bu yüzden daha zayıf bir kaplanmanın meydana geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada denenen diğer bir çözücü olan 11-merkaptoundekanoik asit, fullerenin virüs boyunca düzensiz ve homojen olmayan bir biçimde birikmesinde etkili olmuş, ancak istenen yoğunlukta bir kaplanmanın sağlanamadığı görülmüştür. 11-Merkaptoundekanoik asit molekülü üzerindeki uzun karbon zincirinin fullerenin TMV'ye yeterince yaklaşmasını engelleyerek etkileşimi zayıflattığı düşünülmektedir (Şekil 5.1-e).

11-Merkaptoundekanoik asite ilave olarak NaOH'ın ortama eklenmesi ile oluşturulan etkileşim sonucunda TMV boyunca kesiksiz ve homojen, ancak yoğun olmayan birikimler olduğu gözlemlendi (Şekil 5.1-f). Ortama NaOH eklenmesinin ardından oluşan pH değişikliğinin fonksiyonel gruplarda meydana getirdiği konformasyon değişimleri sonucunda sterik engellenmenin azaldığı ve homojen ancak yetersiz bir kaplanmanın gerçekleştiği gözlemlendi.

Son olarak denenen 1,5-pentanditiyol varlığındaki etkileştirmede ise virüs yüzeyinde hemen hemen hiç kaplanma gözlenememiş, TMV ve fulleren ayrı ayrı kümeler halinde görüntülenmiştir (Şekil 5.1-g). Bunun muhtemel sebebinin 1,5-pentanditiyol üzerindeki tiyol gruplarının virüs yüzeyindeki sistein artıkları ile etkileşerek sterik engel oluşturması ve fullerenin virüs yüzeyine yaklaşmasına olanak vermemesi olduğu düşünülmektedir.

Fulleren ile yapılan denemelerde sonuç olarak en etkin kaplanmanın 3-merkaptopropiyonik asit içinde sağlandığı, ancak fulleren ile virüs dış yüzeyi proteinleri arasındaki etkileşimin çok güçlü olmadığı ve dolayısıyla istenen yoğunlukta bir kaplanmanın elde edilemediği görüldü. Bunun muhtemel sebebi, fullerenin sudaki çözünürlüğünün çok düşük olması ve su fazındaki TMV ile organik faz içindeki TMV arasındaki etkileşimin yeterince olmamasıdır.

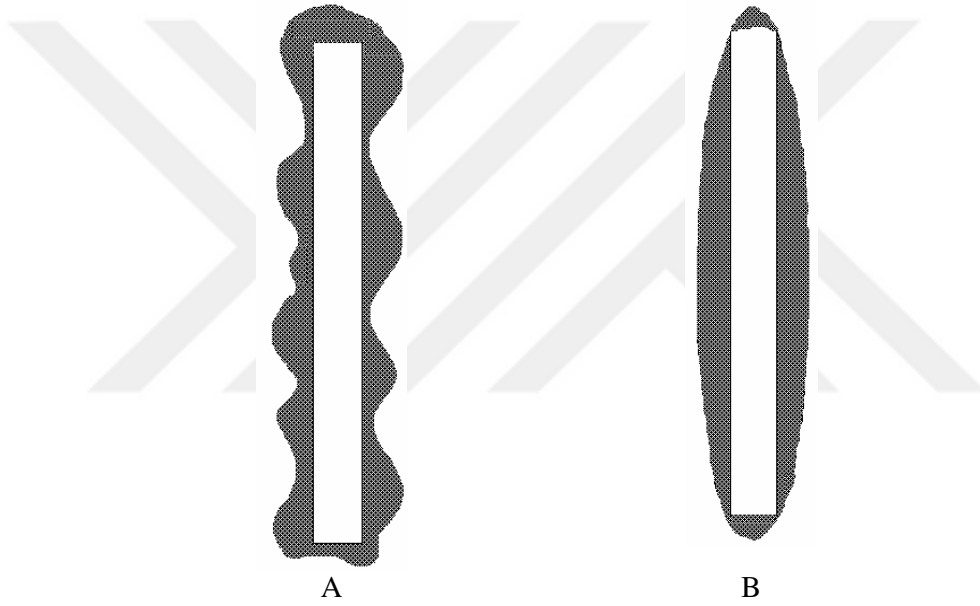


Şekil 5.1. (a) TMV'nin kaplanmadan önceki çıplak halinin, TMV'nin (b) 9-deken1-ol, (c) 3-merkaptopropiyonik asit, (d) kloroform, (e) 11-merkaptoundekanoik asit (f) 11-merkaptoundekanoik asit ve NaOH, ve (g) 1,5-pentanditiyol içinde fulleren ile etkileştirilmesi sonucu kaplanma düzeylerinin TEM mikrograflarından yararlanılarak hazırlanmış şematik gösterimi.

Fullerenin TMV'ye kaplanmasında karşılaşılan sorunu aşmak amacıyla fullerenin karboksi türevi sentezlendi. Öncelikle, başlangıç maddesi olarak Bingel yoluyla fullerenin di(etoksikarbonil)metilen türevi sentezlendi; ardından karboksifulleren elde edildi. Yapıya karboksi gruplarının eklenmesiyle suda çözünürlük sağlandı; böylece oluşan fulleren türevi suda çözülerek TMV ile aynı faza alınmış oldu.

TMV önce su ortamında karboksifulleren ile etkileştirildi. Alınan TEM görüntülerinde TMV yüzeyinde homojen olmayan ancak kesiksiz ince bir kaplanma sağlandığı görüldü (Şekil 5.2-a). Ancak su ortamında karboksifullerenin çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle TMV üzerinde istenilen düzeyde yoğun bir kaplanma sağlanamadı.

TMV'nin pH 9'da karboksifulleren ile etkileştirilmesi ise daha düzenli, homojen ve yoğun bir birikimin oluşmasını sağladı (Şekil 5.2-b). Virüsün ucundan ortalarına doğru kalınlaşan, tipik karboksifulleren-virüs yapıları TEM mikrograflarında gözlemlendi ve optimum kaplanma koşulunun pH 9 ortamında ve karboksifulleren ile olduğu anlaşıldı. En etkin kaplanmanın pH 9'da gerçekleşmesi, karboksifullerenin sudaki çözünürlüğünün pH 9'da en yüksek düzeyde olmasına bağlanmaktadır. Sonuç olarak, su fazına alınan fullerenin TMV ile daha etkin bir etkileşim içine girdiği anlaşıldı.

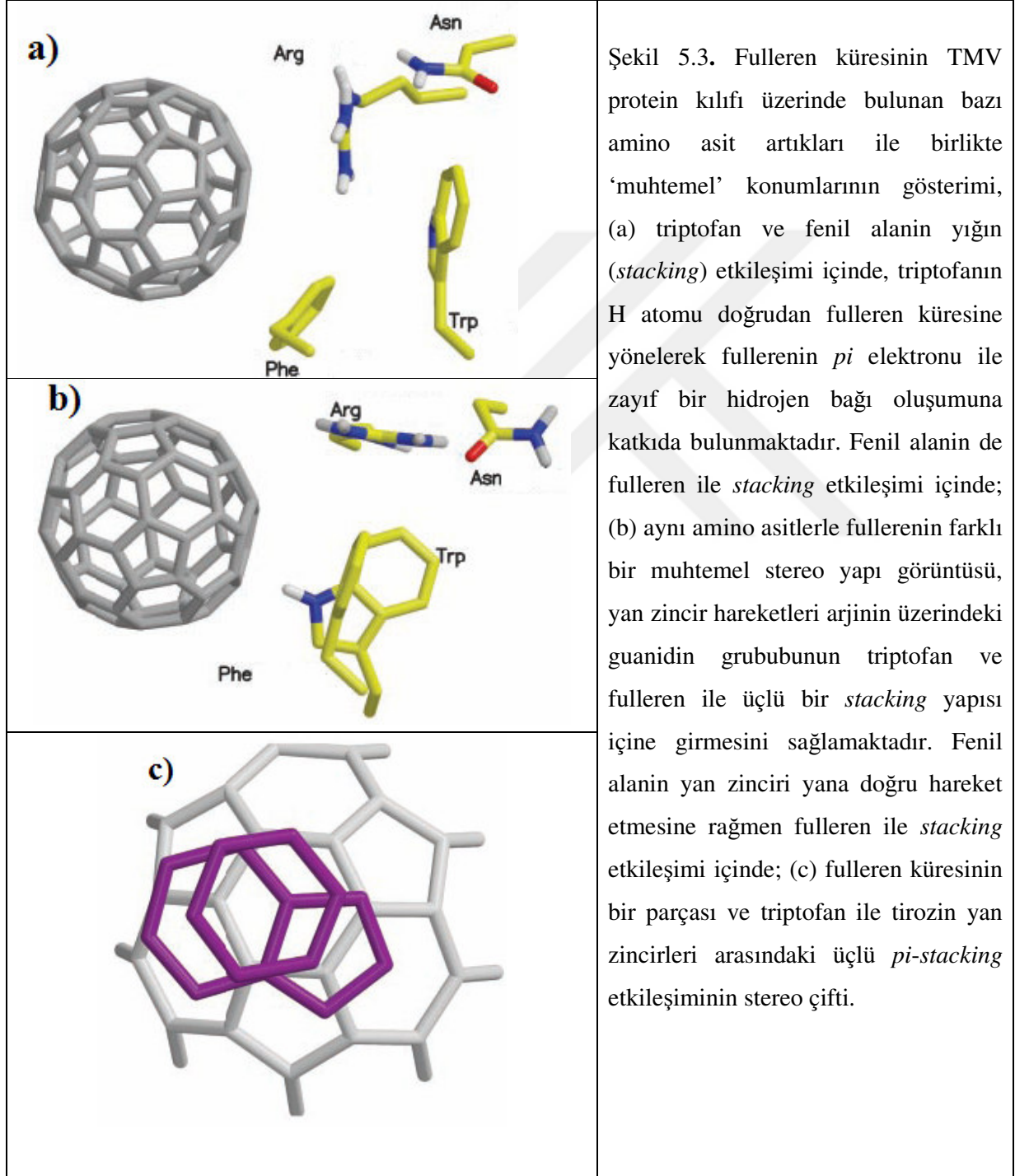


Şekil 5.2. TMV nin (a) pH 7'de, (b) pH 9'da karboksifulleren ile etkileştirilmesinin ardından elde edilen kaplanmanın şematik gösterimi.

Bu çalışma sonucunda, TMV yüzeyinde etkin kaplanmanın fullerenin karboksi türevi ile sağlandığı ve düzgün TMV-fulleren hibrit nano-yapıların oluşturulabildiği anlaşıldı. Böylece potansiyel nanoteknoloji uygulamaları için fulleren nanokablolar hazırlanmasının bu metodla mümkün olabileceği görüldü.

Yürütülen kaplama çalışmaları sonucunda bir karbon nanoparçacığı olan fulleren- C_{60} ve biyolojik bir molekül olan TMV ile biyo-nano kompleks oluşturuldu. Bu oluşumu tetikleyen bağlanma affinitesinin, şekilsel özellikler ve zengin π - π etkileşimlerini de içeren yan zincir

etkileşimleri sayesinde ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Elektronca zengin karbon nanoparçacıkların biyolojik olarak tanınmasında (dinamik moleküler tanıma), bu π - π yığın (*stacking*) etkileşiminin oldukça etkili olduğunu düşünülmektedir.



Dikkat edilmesi gereken bir nokta da virüs üzerine bağlanmaya ek olarak fulleren küresinin bir bölümünün çözücü ile temas halinde bulunduğudır. Çözücü ile temas eden bu kısım, ileride tasarlanacak olan yeni biyoyumlu karbon yapılarının oluşturulabilmesinde yeterli alan sağlayabilecektir. Özet olarak, bilinen protein bağlanma bölgelerine sahip olan TMV'nin, protein-ligand etkileşimlerinde olduğu gibi iyi bir affinite ve spesifikle bir karbon nanoparçacığı olan fullerene bağlanabildiği gözlemlenmiştir

Oluşturulan nano-malzemenin biyosensör uygulamalarında kullanılabilirliğini ve getirdiği avantajı araştırmak üzere Kuartz Kristal Mikrobalsan sistemi ile glikonik asit tayininde tek başına karboksifulleren ve TMV yüzeyine kaplanmış karboksifulleren kullanıldı. Yapılan deneyler sonucunda gerek karboksifullerenin ve gerekse karboksifulleren-TMV yapısının kristal yüzeyine kaplanması sonrasında kristal frekanslarında anlamlı düşüşlerin gözlenmesi, direkt glikonik asit (indirekt glukoz) tayininin mümkün olduğunu gösterdi. Her iki tip kaplama arasında, karboksifulleren-TMV'nin daha büyük frekans düşüşleriyle glikonik asit için daha yüksek duyarlılıkta olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu bulgu, karboksifullerenin TMV üzerine düzenli olarak kaplanmasının (bir ölçüde düzenli dizilmesinin), glikonik asitle etkileşimi arttırdığı görüşüne ağırlık kazandırmaktadır.

Bundan sonraki çalışmalarda, geliştirilen nanokaplamaların bu ve benzeri sensör uygulamalarında kullanım potansiyellerinin daha ayrıntılı olarak araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Antonio, E., Senador, Jr., Montgomery, T.S., and Patrick, T., Mather. 2001. Electrospinning of polymeric nanofibers: Analysis of jet formation. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 661: KK5.9.1-KK5.9.6 Materials Research Society.
- Bauerlein, E. 2003. Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. Angew. Chem. Int. Ed. 42(6):614-41.
- Bingel, C. 1993. Cyclopropanierung von fullerenen. Chem. Ber. 126: 1957-1959.
- Bittner, M.A. 2004. Biomolecular rods and tubes in nanotechnology. Naturwissenschaften. 92:51-64.
- Chao, Y.C. and Shih, J. S. 1998. Adsorption study of organic molecules on fullerene with piezoelectric crystal detection system. Analytica Chimica Acta. 374: 39-46.
- Davis, S.A., Dujardin, E. and Mann, S. 2003. Biomolecular inorganic materials chemistry. Elsevier. No. 9, DTD= 4.3.1
- Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A. and Grantham, G. 1986. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1832-1837.
- Demir, M., Stowell, M.H.B. 2002. A chemoselective biomolecular template for assembling diverse nanotubular materials. Nanotech. 13: 541-544.
- Douglas, T., Young, M. 1998. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. Nature 393: 152-155
- Douglas, T., Strable, E., Willits, D., Aitouchen, A., Libera, M. and Young, M. 2002. Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis. Adv Mater. 14(6): 415-418.

- Dragnea, B., Chen, C., Kwak, E-S., Stein, B. and Kao C.C. 2003. Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for in vitro studies on single viruses. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 6374–6375.
- Dujardin, E., Mann, S. 2002. Bio-inspired materials chemistry. *Adv. Mater.* 14(11):1-14
- Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J.N. and Mann, S. 2003. Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Lett.* 3: 413–417.
- Dugan, L.L., Turetsky, D.M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almli, C.R., Shen, C. K.-F., Luh, T-Y., Choi, D.W. and Lin, T-S. 1997. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Neurobiology*, 94: 9434–9439
- Durham, A.C.H. and Klug, A. 1971. Polymerization of tobacco mosaic virus protein and its control. *Nat. New Biol.* 229: 42-46.
- Eichen ,Y., Braun, E., Sivan, U. and Ben-Yoseph G. 1998. Self-assembly of nanoelectronic components and circuits using biological templates. *Acta Polym.* 49: 663–670.
- Flynn, C.E., Lee, S.W., Peelle, B.R. and Belcher, A.M. 2003. Viruses as vehicles for growth, organization and assembly of materials. *Acta Mater.* 51: 5867–5880.
- Foley, S., Crowley, C., Smaihi, M., Bonis, C., Erlanger, B.F., Seta, P. and Larroque, C., 2002. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 294: 116–119 .
- Shenton, W., Fowler, C., Stubbs, G. and Mann, S. 2001. Tobacco mosaic virus liquid crystals as templates for the interior design of silica mesophases and nanoparticles. *Adv. Mater* 13 (16): 1266-1269 .
- Friedman, S.H., DeCamp, D.L., Sijbesma, R.P., Srdanov, G., Wudl, F. and Kenyon, G.L. 1993. Inhibition of HIV-1 protease by fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 6506–6509.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3789.
- Gooding, G.V. and Hebert, T.T. 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathol.* 57: 1285-1289.
- Graja, A., 2002. Charge-transfer in fullerene complexes. *Polish J. Chem.* 76: 167–176.
- Hall, S.R., Shenton W., Engelhardt H. Mann, S. 2001. Site-specific organization of gold nanoparticles by biomolecular templating. *Chem. Phys. Chem.* 2: 184-190.
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16: 7351-7367
- Hirsch, A., 1994. The chemistry of fullerenes, George Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* 354, 56–58
- Klug, A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly *Phil. Trans. R. Soc. B* 354, 1383: 531-535.
- Knez, M., Sumser, M., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Hoffmann, D.M.P., Kuhnke, K., Kern, K. 2004. Binding the tobacco mosaic virus to inorganic surfaces. *Langmuir* 20 (2): 441- 447.
- Knez, M., Sumser, M., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Kooi, S., Burghard, M. and Kern, M. 2002. Electro-chemical modification of individual nano-objects. *J. Electroanal. Chem.* 522: 70–74 .
- Knez, M., Sumser, M., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Martin, T.P. and Kern, K. 2004. Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus. *Adv. Funct. Mat.* 14(2): 112-124 .

- Knez, M., Bittner, A.M., Boes, F., Wege, C., Jeske, H., Maiss, E. and Kern, K. 2003. Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires. *Nano Lett.* 3: 1079–1082.
- Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos K. and Huffman, D. R. 1990. Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature.* 347, 354-358.
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F. and Smalley, R.E. 1985 C₆₀ buckminsterfullerene. *Nature.* 318:162-163
- Lamparth, I. and Hirsch, A., 1994. Water-soluble malonic acid derivatives of C₆₀ with a defined three-dimensional structure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994: 1727-1728.
- Lauffer, M.A. and Stevens, C.L. 1963. Structure of the tobacco mosaic virus particle; polymerization of tobacco mosaic virus protein. *Adv. Virus Res.* 13: 1-63.
- Lee, S.Y., Culver, J.N. and Haris, M.T. 2003. Preparation of nanorods and nanotubes from tobacco mosaic virus templates. *AIChE Nanoscale Sci. Eng.* <http://www.engineering.purdue.2003/Template>
- Lee, S.Y., Royston, E., Culver, J.N. and Harris, M.T., 2005. Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template. *Nanotechnology* 16: 435-441.
- Li, Z., Chung, S.W., Nam, J.M., Ginger, D.S. and Mirkin, C.A., 2003. Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angew Chem.* 115: 2408-2411.
- Lindoy, I.F. and Atkinson, M.F. 2000. Self-assembly in supramolecular systems. RSC: Cambridge.
- Liu, D., Ha, P.S., Reif, J.H. and LaBean, T.H. 2003. DNA nanotubes self-assembled from triple crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101 (3): 717-722.

- Lu, B., Stubbs, G. and Culver, J. N. 1996. Carboxylate interactions involved in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* 225: 11-20.
- Martz, E. 2002. Protein Explorer: Easy yet powerful macromolecular visualization. *Trends Biochem. Sci.* 27: 107-112.
- Namba, K., Pattanayek, R. and Stubbs, G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. *J. Mol. Biol.* 208: 307-325.
- Ros, T.D. and Prato, M. 1999. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chem. Commun.* 8: 663–669.
- Ros, T.D., Prato, M. and Spalluto G. 2001. Biological applications of fullerene derivatives: A brief overview. *Croatica Chemica Acta.* 74 (4): 743-755 .
- Sander, D., 2002. The big picture book of viruses: Unassigned plant viruses. 151 http://www.virology.net/Big_Virology/BVHomePage.html
- Sauerbrey, G. 1959. The use of quartz oscillators for weighing thin layers and formicroweighing. *Z. Phys.* 155: 206-222.
- Schinazi, R. F., Sijbesma, R., Srdanovf, G., Hill, C. L. and Wudl, F. 1993. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C₆₀ fullerene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1707–1710.
- Shenton, W., Douglas, T., Young, M., Stubbs, G., and Mann, S. 1999. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Adv. Mater.* 11 (3): 253-256 .
- Stubbs, G. 1999. Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Phil Trans R Soc Lond B.* 354: 551-557.
- Stupp, S. I., LeBonheur, V., Walker, K., Li, L. S., Huggins, K. E., Keser, M. and Amstutz, A. 1997. Supramolecular materials: Self-organized nanostructures. *Science* 276: 384-389.

- Tokuyama, H., Yamago, S., Nakamura, E., Shiraki, T. and Sugiura, Y. 1993. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 115(17): 7918-7919.
- Whitesides, G. M. and Grzybowski, B. Self-assembly at all scales. 2002. *Science* 295: 2418-2421
- Yi, H., Nisar, S., Lee, S-Y. Powers, M.A., Bentley, W.E., Payne, G.F., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Harris, M.T., and Culver, J.N. 2005. Patterned assembly of genetically modified viral nanotemplates via nucleic acid hybridization. *Nano Lett.* 5(10):1931-1936
- Zaitlin, M., 2002. ICTV, June . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>
- Zaitlin, M. and Israel, H.W., 2004. Descriptions of plant viruses. CMI/AAB 151, 5
<http://www3.res.bbsrc.ac.uk/webdpv/web>.
- Zehe, A., Reynoso, E. and Ramírez, A., 2003. Size separation of Tobacco Mosaic Virus strands for a potential use in biomolecular electronics. 11th Foresight Conference on Molecular Nanotechnology
<http://www.foresight.org/Conference/MNT11/Abstracts/Zehe/SizeSeparation.doc>

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Burdur’da doğdu. İlk öğrenimini Ankara İltekin İlkokulu’nda, Orta ve Lise öğrenimini TED Ankara Koleji’nde tamamladı. 1998 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyoteknoloji Opsiyonundan 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Mart 2005-Nisan 2006 tarihleri arasında Erasmus programı ile 6 aylığına Almanya’nın Freiburg kentindeki Albert-Ludwigs Üniversitesi’ne bağlı Freiburg Materials Forschung Centrum-FMF’da nanobiyoteknoloji alanında proje asistanı olarak çalıştı ve yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümünü sürdürdü. 2007 yılında yüksek lisans çalışmasını tamamlayarak Bilim Uzmanı unvanı ile mezun oldu.