

**T. C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNFLUENZA A VİRÜSÜNÜN TANISINA YÖNELİK  
ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖR TASARIMI**

**Analitik Kimya (Eczacılık) Programı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Biyolog  
Buket MERİÇ**

**Danışman  
Prof. Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ**

**İZMİR  
2008**



## DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

<b>Başkan (Danışman) :</b> Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ	
<b>Üye :</b> Doç. Dr. Emrah KILINÇ	
<b>Üye :</b> Doç. Dr. Arzu SAYINER	

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: **11 Eylül 2008**

**ÖNSÖZ**

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında geniş bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek değerli katkılarda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ'e ve Anabilim Dalımızdaki diğer tüm öğretim üyelerine teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında her zaman desteklerini gördüğüm tüm değerli çalışma arkadaşlarıma ve maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İZMİR – 2008

Biyolog Buket MERİÇ

**İÇİNDEKİLER**

## BÖLÜM I

<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	7
1. Elektrokimya .....	7
1.1. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları .....	9
1.2. Voltametri .....	9
1.3. Voltametrik Cihazlar .....	11
1.3.1. Voltametrik Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar .....	11
1.3.1.1. Referans Elektrotlar ve Çeşitleri .....	11
1.3.1.2. Çalışma Elektrotları ve Çeşitleri.....	13
1.3.1.3. Yardımcı Elektrot .....	18
1.4. Voltametrik Yöntemler .....	19
1.4.1. Dönüşümlü Voltametri .....	19
1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi .....	22
1.4.3. Kare Dalga Voltametrisi.....	25
1.4.4. Doğrusal Taramalı Voltametri.....	26
1.5. Voltamogramlar .....	26
1.5.1. Kapasitif Akım .....	27
1.5.2. Faraday Yasası ve Faradaik Akım .....	27
1.6. Voltametrik Akımlar .....	28
1.6.1. Nernst Eşitliği .....	29
2. Biyosensör .....	30

2.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler.....	30
2.2.Çevirici Türüne Göre Biyosensör Çeşitleri.....	31
2.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler .....	31
2.2.1.1.Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	32
2.2.2. Optik Biyosensörler .....	37
2.2.3. Kütle Hassas Biyosensörler .....	37
2.3. DNA Biyosensörleri .....	37
2.3.1.Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları.....	37
2.3.1.1.Nükleik Asitler ve DNA .....	37
2.3.1.2. DNA ile İlgili Bazı Terimlerin Tanımları .....	42
2.3.2. DNA Biyosensörleri ile DNA Dizilerinin Tayini.....	43
3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	45
3.1. PCR'ın Temel Bileşenleri.....	45
3.1.1. Çoğaltılacak Olan Kalıp DNA .....	46
3.1.2. Taq DNA Polimerazlar.....	46
3.1.3. DNA Primerleri .....	46
3.1.4. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP).....	47
3.1.5. Tamponlar ve MgCl <sub>2</sub> .....	47
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi .....	47
3.2.1. Hedef DNA'nın Denatürasyonu .....	48
3.2.2. Primerlerin Bağlanması .....	48
3.2.3. Uzama.....	48

## BÖLÜM II

<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	50
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	50
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddelere .....	50
2.3. Kullanılan DNA Dizileri .....	51
2.3.1. Kullanılan Sentetik Prob ve Hedef Diziler.....	51
2.3.2.Kullanılan Sentetik Prob ve Hedef Dizilerin Hazırlanışı .....	51
2.3.3. Kullanılan PCR Ürünü Hedef Dizilerin Hazırlanışı.....	52
2.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	52
2.4.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanışı .....	52
2.5. Kullanılan Yöntem .....	54
2.5.1. İnfluenza A Virüsünün Diferansiyel Puls Voltametri(DPV) Tekniği Kullanılarak Elektrokimyasal Yoldan Saptanması .....	54
2.5.1.1. Elektrotların Hazırlanışı .....	56
2.5.1.2. Kalem Grafit Elektrodunun (PGE) Aktivasyonu.....	56
2.5.1.3. Elektrot Yüzeyine Prob DNA Tutturulması.....	56
2.5.1.4. Sentetik Hedef Dizi ile Hibridizasyon .....	56
2.5.1.5. Voltametrik Ölçüm .....	57
2.5.1.6. PCR Ürünü ile Hibridizasyon .....	57
2.5.1.7. Voltametrik Ölçüm .....	57

2.5.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile İnfluenza A Virüsünün Tayini.....	58
2.5.2.1. Elektrotların Hazırlanışı .....	60
2.5.2.2. Kalem Grafit Elektrodunun (PGE) Aktivasyonu.....	60
2.5.2.3. Elektrot Yüzeyine Prob DNA Tutturulması.....	60
2.5.2.4. Sentetik Hedef Dizi ile Hibridizasyon .....	60
2.5.2.5. Empedimetrik Ölçüm .....	61
2.6. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanmasında İncelenen Parametreler .....	61
2.6.1. Hibridizasyonun Saptandığı En Uygun Koşullar .....	61
2.6.1.1. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Çözelti Değişiminin Belirlenmesi.....	61
2.6.1.2. Prob Tuturma Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi .....	62
2.6.1.3. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi .....	62
2.6.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	63
2.6.2. PCR Ürünleri Kullanılarak İnfluenza A Virüsünün Tanısı .....	63

### BÖLÜM III

<b>BULGULAR</b> .....	64
3.1. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanması Çalışmasında Elde Edilen Bulgular .....	64
3.1.1. En Uygun Hibridizasyon Koşullarının Saptanmasına Ait Bulgular .....	64
3.1.1.1. Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayinine Ait Bulgular.....	64
3.1.1.2. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Çözelti Derişiminin Belirlenmesine Ait Bulgular.....	65
3.1.1.3. Prob Tutturma Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	66
3.1.1.4. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	68
3.1.1.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	69
3.1.2. PCR Ürünleri Kullanılarak İnfluenza A Virüsünün Tanısına Ait Bulgular .....	71
3.2. EIS İle İnfluenza A Virüsünün Tanısına Ait Bulgular.....	72

## **BÖLÜM IV**

<b>TARTIŞMA</b> .....	76
4.1. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanması	
Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi .....	76

## **BÖLÜM V**

<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	80
<b>ÖZET</b> .....	82
<b>ABSTRACT</b> .....	84
<b>YARARLANILAN KAYNAKLAR</b> .....	86
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	102

# I. BÖLÜM

## GİRİŞ ve AMAÇ

Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler), IUPAC tarafından; kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve derişimine bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar olarak tanımlanmıştır (19).

Elektrokimyasal sensörler yapılarına; enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. gibi biyolojik maddeler eklendiğinde biyosensör adını alırlar.

Biyosensörler, analizi yapılacak biyolojik örnekler içerisindeki kimyasal türlerin aktivitelerine veya derişimlerine seçici ve dönüşümlü olarak yanıt verebilen, elektroaktif özellikte biyolojik bir madde ile bu maddeye ait yanıtları elektriksel sinyallere çeviren bir çevirici sistem içeren analitik kompleks cihazlardır (18, 89). Biri biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal olmak üzere iki kısımdan oluşur. Biyokimyasal kısım, analizi hedeflenen biyolojik madde ile etkileşerek onunla birleşir, bu olayın sonucunda oluşan biyokimyasal ürün ise elektrokimyasal çevirici tarafından ölçülebilir bir analitik sinyale çevrilir (15, 16, 18, 22).

Analizi yapılacak maddeyle etkileşerek, onu tanıyacak olan biyokimyasal çevirici kısmında nükleik asitlerin (DNA) kullanıldığı biyosensörler, DNA biyosensörleri olarak adlandırılır. Son yıllarda DNA'nın kullanıldığı tanıma yüzeylerine sahip biyolojik sensörlerin tasarımı ve kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu tip biyosensörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (14, 15, 16, 20, 65, 70, 75, 80, 89, 90, 103, 112).

DNA biyosensörleri, bazı ilaç ya da maddelerin DNA' ya olan etkilerinin aydınlatılmasına, miktar tayinine, bu maddelerin etkileşim mekanizmalarının incelenerek belirlenmesine, nokta mutasyonların tayinine ya da genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı bir şekilde teşhis edilmesine yönelik olarak kullanılabilir (26, 27, 50, 56, 62, 70, 71, 73, 101, 105, 113, 114, 116). Analit ile DNA arasındaki etkileşimlerin sonucunda, DNA' daki elektroaktif bazlara ya da analizi yapılacak maddeye ait elektrokimyasal sinyaldeki değişikliklere bağlı olarak güvenilir tayinler yapılabilmektedir (39, 42, 60, 64, 74, 80, 86, 92, 93, 96, 107, 109, 115, 117).

Günümüzde yaygın kullanıma sahip olan DNA biyosensörleri, genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı bir şekilde teşhis edilmesine ve ayrıca DNA ile etkileşimi sonucunda ona hasar veren maddelerin saptanmasına olanak sağlamaktadır.

Yeni ilaç tasarımlarının gerçekleştirilmesinde; DNA' nın bazı ilaç molekülleriyle etkileşimi (özellikle antikanser özellikteki ilaç molekülleri) ve bu etkileşimin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi büyük önem taşımaktadır (38, 52, 54, 59). Bazı maddelerin (biyolojik ve kimyasal ajanlar, toksik moleküller, vb.) çift sarmal DNA ile interkalasyon (düzlemsel yapıya sahip maddenin DNA'nın çift sarmalı arasına girerek yerleşmesi), baz seçimli bağlanma vb. yollarla etkileşimi sonucunda meydana gelen bir ürün oluşumu, bu ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımını mümkün kılmıştır (53, 84, 85). Bir kimyasalın ya da metabolitinin DNA ile etkileşimi sonucunda DNA'da oluşabilecek yan ürünlerin kısa zamanda tespit edilmesi özellikle kanser araştırmalarında çok önemlidir (6, 21, 37).

Belirli bir hastalık ya da mutasyona ait DNA dizisinin saptanması ve bu örneklerden hastalık tayininin yapılması tıbbi analizler açısından oldukça önemlidir. Rutin klinik analiz metotlarına bir alternatif olarak geliştirilen nükleik asit tanıma yöntemlerine dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı, kolay ve ucuz olarak teşhis edilebilmesini mümkün kılar. Bazı bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklara ait, genomik DNA çiplerinin tasarımı geliştirilen nükleik asit hibridizasyonuna dayanmaktadır (57, 59, 82).

Bir hastalığı ya da bakteri ve virüse ait patojeniteyi temsil eden bir prob DNA dizisi ve bu diziye karşılık gelen hedef dizinin oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısı, tasarlanmış biyosensör tarafından tanınma olayını olası hale getirir (8). Yöntemde kullanılan yüksek duyarlılıktaki çevirici ile yüksek seçicilikteki hibridizasyon olayı bulaşıcı ve kalıtsal hastalık tayininde DNA biyosensörlerinin kullanılması gerekliliğini açıklamaktadır (30, 31, 35, 47, 48, 61, 63, 64, 68, 74, 77).

Elektrokimyasal biyosensör kullanımı, klasik tayin yöntemlerine kıyasla daha hızlı ve kolay analiz gerçekleştirme, ucuzluk, seçicilik, düşük tayin sınırına sahiplilik gibi yararlarla sahiptir (55, 81).

## **Araştırmanın Konusu ve Amacı**

İnfluenza virüsleri Orthomyxoviridae ailesinden olup, 80-120 nm çapında pleomorfik yapı gösteren, negatif polariteli, tek zincirli RNA virüslerdir. Genetik madde segmentli yapı gösterir. İnfluenza A sekiz segmentlidir. Sekiz segment 10 viral protein kodlamaktadır. Üç büyük RNA segmenti PB1, PB2 ve PA ile ifade edilen polimeraz proteinleri RNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumludur. Bu proteinler 700'den fazla aminoasit içeren büyük proteinlerdir. Diğer segmentlerden biri nükleoprotein(NP) diğerleri hemagglutinin(HA) ve nöraminidaz(NA) glikoproteinlerini kodlamaktadır. HA ve NA virüs zarfında yer alan peplomerlerdir. Virüs zarfının iç kısmında matriks proteinleri M1 ve M2 yer alır. M1 proteini virüse şekli verir ve RNA molekülüne bağlanarak genetik maddeyi korumakla görevlidir. M2 proteini virüsün zarfından soyunmada viral kapsidin açılarak genetik maddenin ortaya çıkmasında ve viriyon içine hidrojen iyonlarının girişini sağlayan bir iyon kanalı oluşturmada rol oynamaktadır. Bu işlem viral genetik maddenin çoğalmasında bir aşamadır. İnfluenza vrüslerinde yapısal olmayan iki protein NS1 ve NS2 bulunmaktadır. Ayrıca NB olarak adlandırılan ikinci bir matriks proteini ve BM2 olarak adlandırılan yapısal olmayan bir protein de mevcuttur. İnfluenza virüsleri nükleoprotein antijenlerine bağlı olarak A,B ve C diye adlandırılan 3 tip ve çok sayıda alt tiplere ayrılır. İnfluenza A virüsü insan, domuz, at, deniz memelileri ve kuşlarda enfeksiyon oluşturur, epidemilere ve pandemilere neden olur. İnfluenza A virüsleri HA ve NA yüzey proteinlerine göre alt tiplere ayrılır. Farklı antijenik yapıdaki İnfluenza A virüsleri, aynı konakta ve aynı

anda enfeksiyona yol açar ise farklı konaklardaki RNA segmentlerinde meydana gelen farklılaşma sonucu büyük antijenik değişiklikler oluşabilir.

İnfluenza virüs grip etkenidir ancak virüs belirtisiz enfeksiyondan pnömiye kadar değişebilen hastalık tabloları gösterebilir. Virüs solunum yolları aracılığıyla bulaşır. Semptomların başlangıcı anidir (88).

Tez çalışması kapsamında; İnfluenza avian virüsü tip A'nın sebep olduğu viral ve bulaşıcı bir hastalık olan kuş gribinin teşhisi amacıyla işaretli DNA hibridizasyonu yöntemine dayalı bir elektrokimyasal DNA biyosensörü ve empedimetrik DNA biyosensörü tasarımının yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmada; ucuz ve kullanımı kolay olan, tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) tercih edilecektir. Hastalığın DNA hibridizasyonuna bağlı teşhisinde elektrokimyasal tayin tekniklerinden diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılacaktır.

Çalışma sırasında; elektrot yüzeyine adsorpsiyon metoduyla tutturulacak olan prob DNA dizisi ile karşılığı olan hedef dizi ve ayrıca karşılığı olmayan rastgele seçilmiş bir başka dizi arasında gerçekleşen hibridizasyon basamağının prob ve hedef değişimindeki değişimlere bağlı yanıtı, hibridizasyon süresi, yıkama süresi ve tekrarlanabilirlik gibi birtakım deneysel parametreler incelenecektir.

Hedef DNA dizisi ve rastgele seçtiğimiz probun karşılığı olmayan DNA dizisi ile bunlarla etkileştireceğimiz ve ticari olarak sentezlettirmiş olduğumuz virüs DNA'sını temsil eden prob DNA dizisine ait olarak hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edeceğimiz, DNA'nın elektroaktif bazları olan guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen

değişiklikler, elektrot olarak PGE ve yöntem olarak hem DPV hem de EIS'nin kullanılmasıyla incelenecektir. Bunun sonucunda hedef dizi ile hibridizasyon sonucunda DPV yönteminde DNA'daki elektroaktif bazlara ait sinyallerde azalma saptanması, EIS yönteminde ise yüzey tabakasındaki artışa bağlı direnç artışı ile paralel olarak, sinyallerde artma saptanması beklenecektir. Elde edilen sonuçların tutarlılığı negatif kontrol olarak kullandığımız non-komplementer diziye ait hibridizasyon sonuçlarına bağlı olarak kanıtlanmış olacaktır.

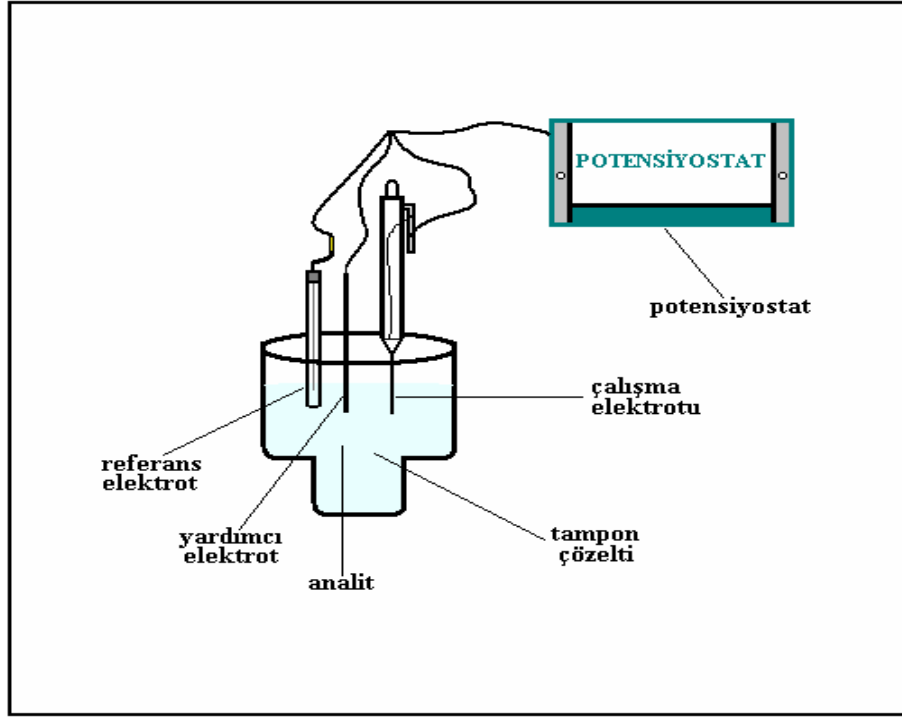
Sonuç olarak çalışmamızda, elektrokimyasal DNA biyosensörü kullanılarak, İnfluenza A virüsüne ait gen dizisinin tayini işaretli DNA hibridizasyon yöntemine dayalı olarak ve sentetik oligonükleotid dizileri kullanılarak gerçekleştirilecektir. Böyle bir yöntem zahmetli, uzun süreli ve oldukça pahalı klinik tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında umut vaat eden alternatif bir tanı yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

# GENEL BİLGİLER

## 1. ELEKTROKİMYA

Elektrokimya; maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini, bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine, elektrik enerjisinin de kimyasal enerjiye dönüşümünü inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimya redoks olayıyla ilgilenir, yani bu tip tepkimeler yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir. Bu tepkimeler, elektron transferinin gerçekleştiği ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir kap içerisinde yürütülen tepkimelerdir. Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi;

1. Analiz edilecek maddeyi içeren bir çözeltiyi (İletkenlik tampon çözelti kullanımıyla sağlanır)
2. Maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı genellikle üçlü olan bir elektrot sistemini
3. Elektrotları birbirine bağlayan bir çevrim sistemini gerektirir.



**Şekil 1:** Genel Elektrokimyasal Hücre Şeması

Analiz işlemlerinde, maddenin elektrokimyasal özelliklerinin kullanıldığı yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Elektroanalitik yöntemlerin kullanımı ile analizi yapılacak maddenin çok düşük tayin sınırlarına kadar ulaşılabilir. Ayrıca elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Öncelikle elektrokimyasal ölçümler bir elemente, moleküle ya da oluşan ürüne ait özel bir yükseltgenme basamağı için spesifiktir (2, 9, 12). Bunun yanı sıra, bu yöntemlerde kullanılan cihazlar diğerlerine oranla çok daha ucuzdur. Elektroanalitik yöntemler, kimyasal türlerin derişimlerinden çok aktiflikleri hakkında bilgi verirler (2, 12).

Çeşitli elektroanalitik yöntemleri kullanılarak, Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV) vb. uygulamalarla belirli potansiyel aralığında tarama yapılır ve meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Difüzyona bağlı olarak oluşan bir akım söz konusu olduğundan, burada

ölçülen difüzyon akımıdır. Akım, difüzyon hızı ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınında yer alan difüzyon tabakasında oluşur. (12)

Ölçüm sırasında elektrot yüzeyi ile analiz edilecek maddeyi içeren çözelti arasında heterojen tabakalar oluşur. Bu tabakalar; türbülent akış tabakası, laminar akış bölgesi, nernst difüzyon tabakası olarak adlandırılır.

### **Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları**

Bir maddenin elektrokimyasal hücre içerisinde analizi yapılırken tampon çözelti içinde bulunan analit elektrot yüzeyine üç farklı yolla aktarılmaktadır.

(16). Bunlar:

**a. Elektriksel göç (Migrasyon):** Elektriksel alan kuvveti ile yüklü parçacıkların hareket ettirilmesine dayalı bir aktarım yoludur.

**b. Karıştırma (konveksiyon):** Çözeltide yer alan indirgenibilme ya da yükseltgenibilme özelliğinde olan maddelerin, karıştırma veya titreşim gibi yöntemlerle çözeltide oluşturulan fiziksel hareketlere bağlı olarak elektrot yüzeyine aktarılmasıdır.

**c. Difüzyon:** Elektrot yüzeyindeki sıvı film tabakası ile çözelti arasında bulunan derişim farklılıklarına bağlı olarak, maddenin bu derişim farkını ortadan kaldırabilmek amacıyla çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçtiği bir kütle aktarım yoludur.

### **Voltametri**

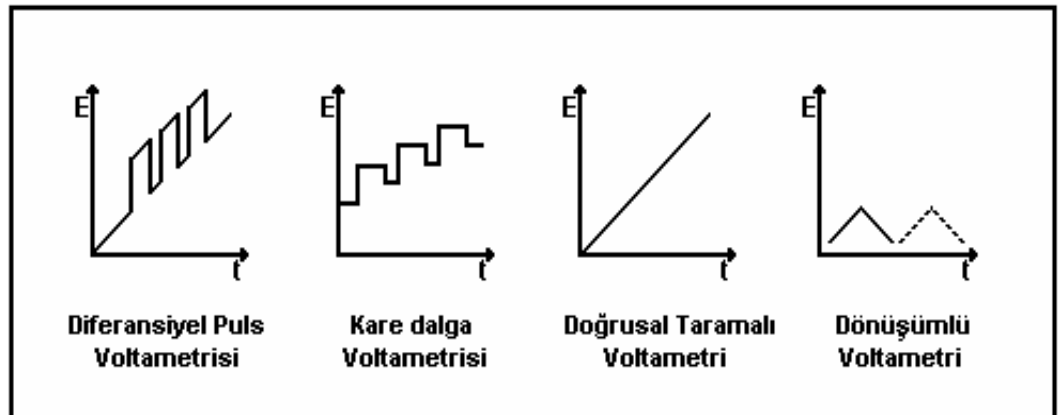
Çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü ve buna bağlı olarak analit hakkında bilgi edinildiği elektrokimyasal yöntem voltametri, uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine de voltamogram

denir. Voltametrizde çalışılacak gerilim aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektroduna, kullanılan çözücüye ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Voltametri, Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920 'lerin başında ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametrinin hala önemli bir kolu olan polarografinin diğer voltametrik tekniklerden en büyük farkı çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodun (DCE) kullanılmasıdır.

Voltametri, çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlarla da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyelde uygulanmaktadır. Bunun sonucunda, uyarma sinyallerinin çeşidine göre farklı akım cevapları elde edilmektedir. Voltametrik yöntemde kullanımı en çok tercih edilen uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalga sinyalleridir.



**Şekil 2:** Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri

## **Voltametrik Cihazlar**

Bir voltametrik analizde kullanılacak cihazlar; elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan meydana gelir.

Bu elektrotlar;

**a. Çalışma elektrodu;** Yüzeyinde, analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

**b. Referans elektrot;** Deney süresince potansiyeli sabit kalan bir elektrottur. Çalışmalarda özellikle Ag / AgCl referans elektrotlar sıklıkla kullanılmaktadır.

**c. Yardımcı elektrot;** Elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturmakta ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamamaktadır.

### **1.3.1 Voltametrik Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar**

#### **1.3.1.1 Referans Elektrotlar ve Çeşitleri ( 2, 17, 25, 33, 87, 89, 95)**

Çalışılan çözeltiye ait bileşenlere duyarsız olan, elektrokimyasal analiz uygulamaları sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen ve analiz süresince sabit kalan elektrotlardır.

İdeal bir referans elektrot kolay hazırlanabilmeli, tersinir davranmalı ve nernst eşitliğine uymalıdır.

#### **Standart Hidrojen Elektrot (SHE)**

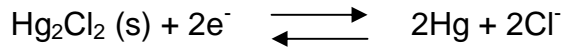
Elektrokimyada kullanılan ilk referans elektrot çeşitidir. Hazırlanması oldukça güç olduğundan, pratik çalışmayı zorlaştıran bu elektrot çeşiti uygulamada fazla tercih edilmemektedir.

### **Kalomel Referans Elektrot**

Kalomel ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) ve Hg'dan oluşmuş bir karışım olup, metalik civa ve KCl çözeltisinden meydana gelir. Hazırlanması oldukça kolaydır. Bu elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır.

Doygun kalomel elektrotun elektrot potansiyeli 25 °C' de standart hidrojen elektrotuna göre +0,244 V ' dur.

Oluşan elektrot tepkimesi;



### **Gümüş – Gümüş Klorür Referans Elektrot**

Gümüş – gümüş klorür referans elektrotları, en yaygın kullanım alanına sahip olan elektrotlardır.

Gümüş bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak  $\text{Cl}^-$  iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir.

Oluşan elektrot tepkimesi;

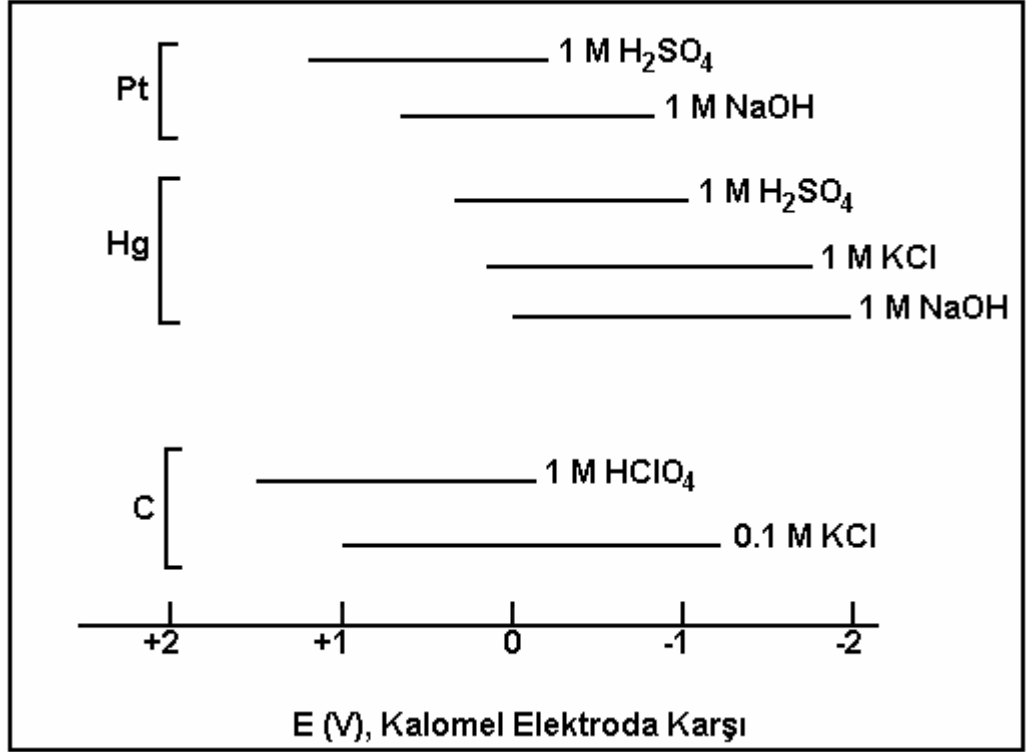


Doygun KCl çözeltisi kullanıldığında; 25 °C' de standart hidrojen elektrota göre potansiyeli +0,222 V' dur.

Doygun kalomel elektrottan üstün olarak, daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilir. Aynı zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girdiklerinden bu tip referans elektrotların kullanımı çalışma açısından daha avantajlıdır.

### **Civa – Civa (I) Sülfat Referans Elektrot**

Civa – civa (I) sülfat elektrodu, doygun kalomel elektrot ile benzerlikler içermektedir. Elektrot potansiyeli sülfat iyonlarının aktifliği ile bulunur.



**Şekil 3:** Çeşitli çalışma elektrotlarına ait çalışma potansiyeli aralıkları

### 1.3.1.2. Çalışma elektrotları ve çeşitleri

Çalışma elektrotları yüzeylerinde, analit maddenin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrotlardır. Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişir. Yapımında iletken malzemeler kullanılmaktadır. Bu iletken malzemeler örnek olarak; platin veya altın gibi inert bir metal, karbon, pirolitik grafit ya da camı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilmektedir. Kullanılacak elektrotlar, farklı şekil ve büyüklüklerde hazırlanarak, tasarımı yapılacak olan biyosensör sistemine en uygun şekilde geliştirilebilmektedirler.

Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde elektrot malzemesinin yanı sıra, daldırıldıkları çözeltinin bileşimine de bağlı olarak değişir. Pozitif potansiyel sınırları, suyun yükseltgenmesinden

meydana gelen moleküler oksijenden, negatif potansiyel sınırları ise suyun indirgenmesinden meydana gelen hidrojen kaynaklanır.

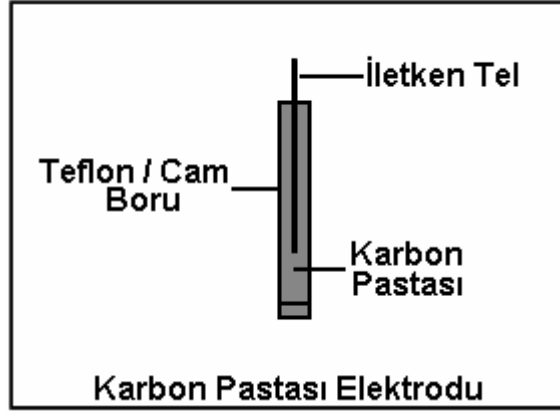
### **Karbon Elektrotlar ve Çeşitleri**

Bu tip elektrotlar, çok ucuz olmaları ve geniş potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlamaları açısından, elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedirler.

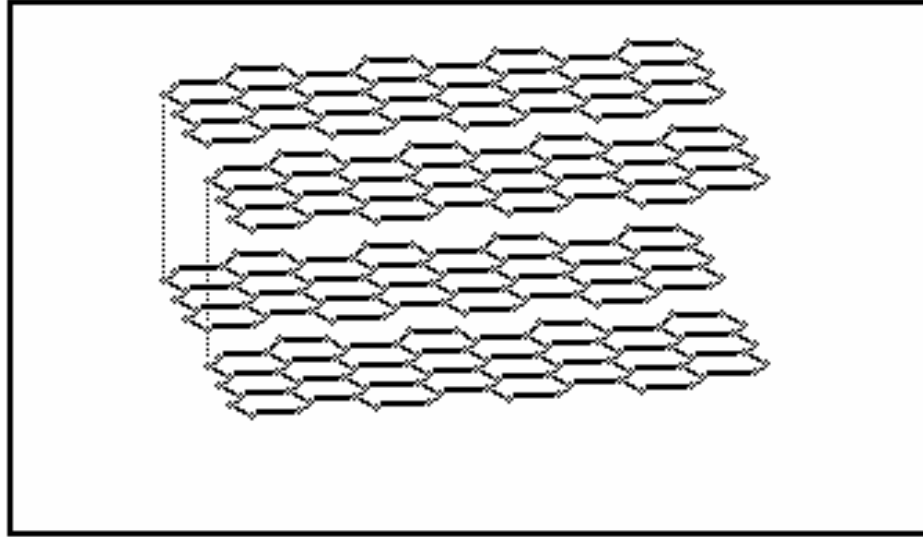
Hidrojen, hidroksil, karboksil grupları ve kinonlar ile karbon yüzey arasında kimyasal bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak karbon yüzeye çok sayıda değişik madde tutturulabilmektedir.

### **☑Karbon Pastası Elektrodu (CPE)**

Karbon pastası elektrotu; %70 grafit, %30 Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen gibi bir bağlayıcı maddenin homojen olarak karıştırılması ve karışımın 2–4 mm. çapındaki cam ya da teflon özellikteki borulara sıkıştırılmasıyla hazırlanır. Pasta bileşimi elektrot aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Elektriksel iletkenlik, bu borunun 2/3'üne kadar uzatılan iletken bir tel aracılığı ile sağlanmaktadır. Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri düzlemsel ve aromatik halkalar halinde birbirlerine zayıf  $\pi$  bağı ile bağlanırlar. Bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmekte ve böylece iletkenlik sağlanmaktadır. Elektron transfer hızı, bağlayıcı organik sıvı oranıyla ters orantılıdır. Ucuz olması, yüzey yenilenme işleminin kolay olması ve düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir.



**Şekil 4:** Karbon Pastası Elektrotunun Şematik Olarak Gösterimi

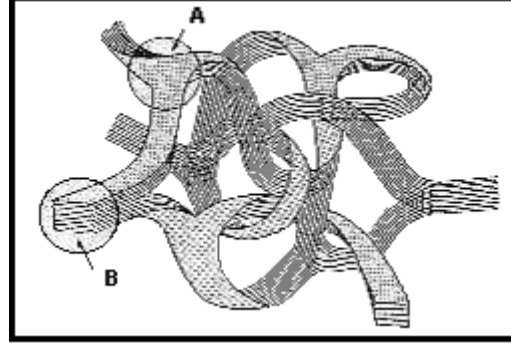


**Şekil 5:** Grafit Tozunda Bulunan Karbon Moleküllerinin Dizilimi.

#### **☑Camsı Karbon Elektrot**

Camsı karbon fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin, 1000-3000<sup>0</sup>C arasında, basınç altında, karbonizasyona uğratarak, inert malzemedan yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla elde edilir. Elde edilen yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olmasından ötürü bu tip elektrotlarla elde edilen elektrokimyasal yanıt, karbon pastası elektrotlarına göre daha iyi ve tekrarlanabilir. Hem yüksek fiziksel dayanıklılığa sahiptir

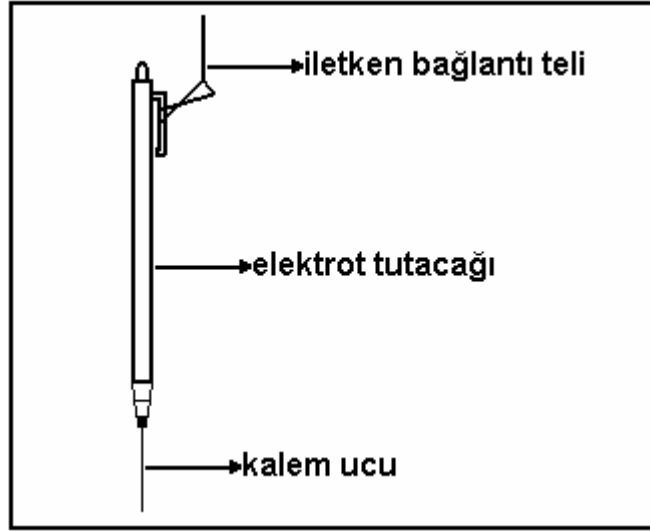
hem de kimyasal tepkimelere katılmaz. Ayrıca geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlamaktadır.



**Şekil 6:** GCE'nin amorf yapısı (A) Kuvvetli bağlar, (B) Zayıf bağlar

#### **☑Kalem Grafit Elektrot**

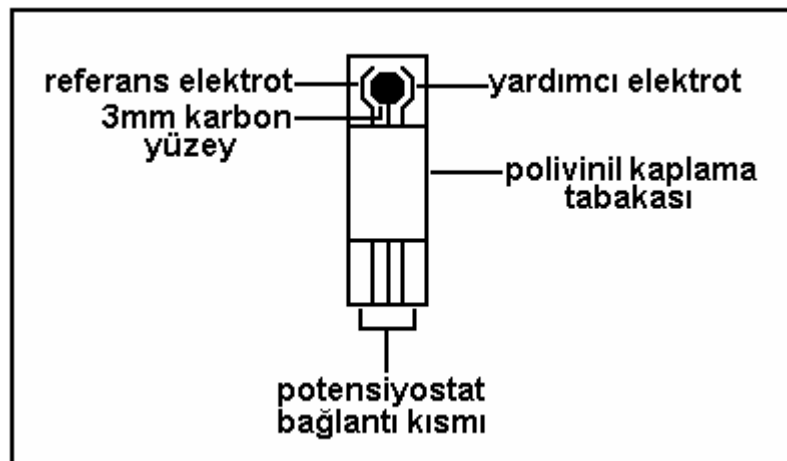
Çalışmalarda kullanılan kalem grafit elektrot grafitten oluşmuş olup, Tombo 0,5mm HB kalem uçlarınının 3cm'lik eşit iki parçaya kesilmesiyle hazırlanır (106). Bu elektrotların oldukça kolay hazırlanması, tek kullanımlık ve ucuz olması çalışmalar açısından avantajlıdır (49, 105). Yapılan çalışmalarda bu elektrotlarla alınan sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu ve daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabilirdiği gözlenmiştir. Ayrıca sahip olduğu geniş çalışma yüzeyi, bu elektrotun çalışmalarda tercih edilmesi açısından iyi bir sebeptir.



**Şekil 7:** Kalem grafit elektrodun şematik olarak gösterimi

#### ☑Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (45, 47)

DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren perde baskılı karbon elektrotlara olan ilgi hızla artmaktadır. Tek kullanımlık olmaları ve tekrarlanabilir sonuçlar vermeleri nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedirler.



**Şekil 8:** Perde baskılı karbon elektrotun şematik olarak gösterimi

## **Civa Elektrotlar**

Civa elektrotlarında, her ölçüm kolayca oluşturulan yeni bir civa damlasıyla meydana getirilen taze bir metalik yüzeyde gerçekleştirilir. Negatif potansiyel sınırlarının oldukça yüksek olmasından ötürü elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Birçok metal iyonu bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturarak, tersinir olarak indirgenebilir. Bunun yanında civa elektrotlarının en büyük dezavantajı, civanın toksik bir metal olması ve kolaylıkla yükseltgenmesi sonucu anot olarak kullanılabilirdiği potansiyel aralığının oldukça düşük olmasıdır (1).

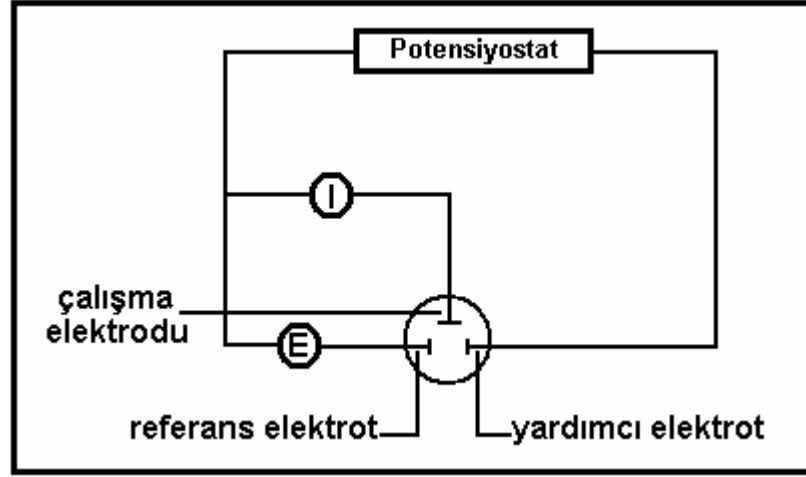
Civa elektrotunun; disk elektrot, asılı civa damla elektrot, damlayan civa elektrot, durgun civa damla elektrot gibi çeşitleri vardır.

## **Diğer Elektrotlar**

- Metal elektrotlar: En çok tercih edilen metal elektrotlar platin ve altın elektrotlardır.
- Ultramikroelektrotlar: Çapları 50 µm'den daha küçük olan elektrotlardır.
- Nano elektrotlar
- Karbon fiber elektrotlar

### **1.3.1.3. Yardımcı Elektrot**

Karşıt elektrot olarak da bilinir. Elektriğin çalışılan çözelti ortamından geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Tepkimeye katılmaz. Genellikle platin yardımcı elektrot olarak kullanılabilir.



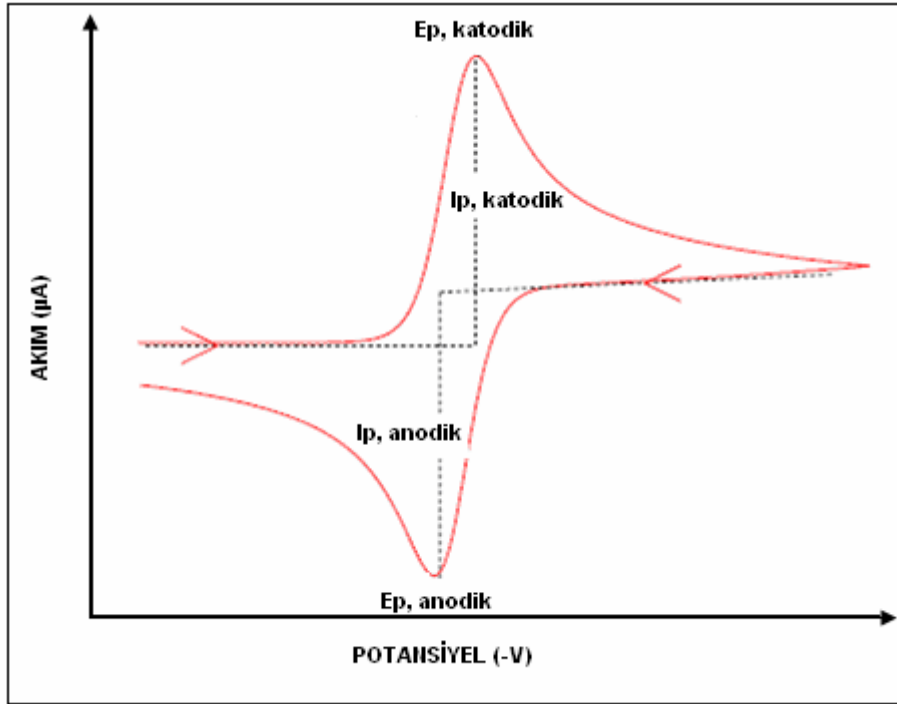
**Şekil 9:** Üçlü elektrot sisteminin potensiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi

## Voltametrik Yöntemler

### 1.4.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) (25, 67)

Dönüşümlü voltametri tekniği ile gerilimin bir fonksiyonuna karşı akım ölçülmektedir. Bu teknikte öncelikle başlangıç ve bitiş potansiyellerini içeren bir aralık belirlenir. Sonrasında başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru sabit bir hızda gerilim uygulanır. Gerilim yükseltgenme veya indirgenme yönünde olabilir. Uygulanan bu uyarma sinyali üçgen şekilli dalga hareketiyle bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar ardından aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Başlangıç taramasının yönü, analiz edilecek örneğe bağlı olarak negatif veya pozitif olabilir. Negatif potansiyel yönündeki taramalar ileri tarama, zıt yöndeki taramalar ise ters tarama olarak adlandırılır. Uygulanan gerilim aynı sabit hızda bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrarlanır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli aralıklarda, akımda meydana gelen değişim grafiğe geçirilerek "Dönüşümlü Voltamogram" elde edilir.

Dönüşümlü voltametri ile durgun sistemde, üçlü elektrot sistemi ile çalışılır. Burada hız difüzyon tarafından tayin edilir. Analite ait yükseltgenme ve indirgenme elde edilen voltamogramdan gözlenebilmektedir. Bu teknik çoğunlukla elektrokimyasal bir analizde kullanılacak olan maddelerin elektriksel davranışlarını saptamak için tercih edilir. Böylece elektroaktif türlerin yükseltgenme–indirgenme tepkimelerine ait mekanizmalar kolaylıkla aydınlatılabilir. Dönüşümlü voltametri miktar tayinine dayalı analizlerde tercih edilmemektedir.



**Şekil 10:** Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram

Dönüşümlü voltametri de kapasitif akımın en düşük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık  $10^{-5}$  ile sınırlıdır. Yapılan taramanın hızı değiştirilebilir.

Bunun sonucunda oluşan pik maksimumlarında, şekil değişikliği ve kaymalar olabilir. Voltamogramlarda gözlemlenen pik şekillerinden, çalışılacak maddenin hangi potansiyelde en uygun cevabı vereceği anlaşılır. Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanı sıra seçilen tarama hızı ile yapılan tarama sayısının da etkisi vardır.

Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme yükseltgenme arasındaki gerilim farkı  $\Delta E_p$  ile ifade edilir.

$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

$\Delta E_p$  bu değere yakın ise dönüşümlü (reversibl), uzak ise dönüşümsüz (irreversible) olarak adlandırılır.

Tersinir bir elektrokimyasal tepkimede analite ait pik akımı aşağıdaki eşitlikle bulunur.

$$I_p = 0,27 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

$I_p$  = analite ait pik akımı

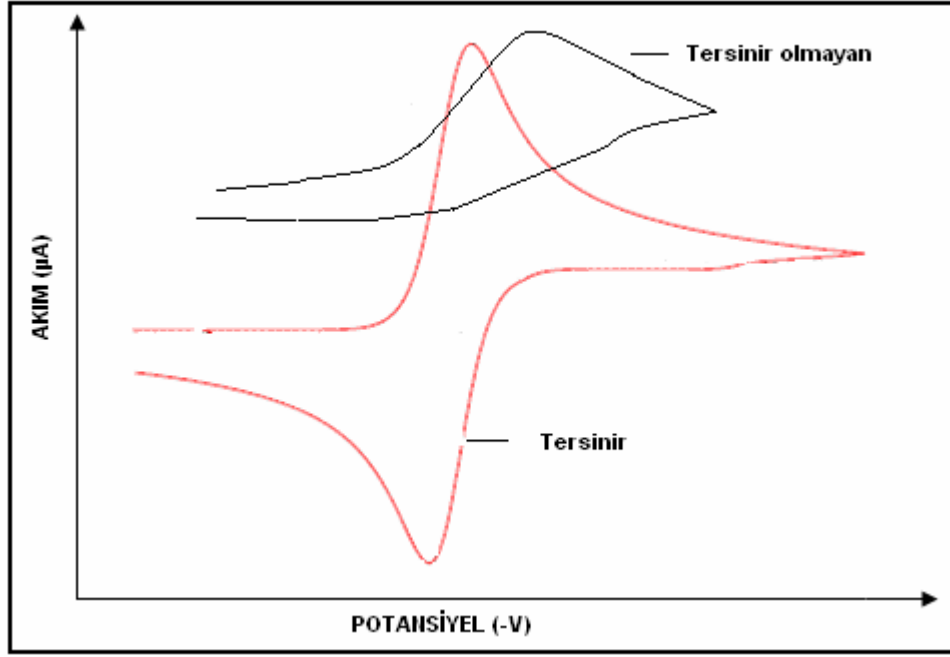
$n$  = Elektron sayısı

$A$  = Elektrot yüzey alanı ( $cm^2$ )

$D$  = Difüzyon katsayısı ( $cm^2/s$ )

$C$  = Analit derişimi (mM)

$v$  = Tarama hızı (V/s)



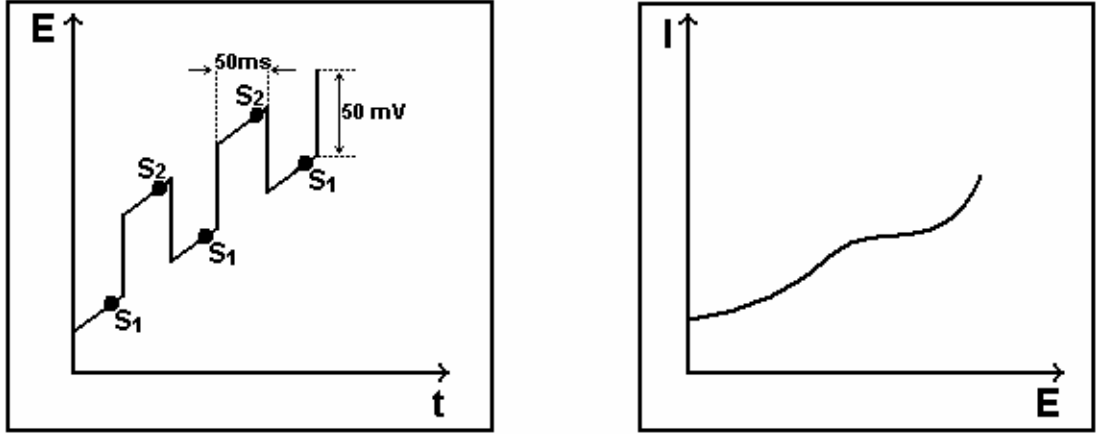
**Şekil 11:** Belirli bir potansiyel aralığında yapılan tarama sonucu oluşan, analite ait elektrokimyasal tepkimenin, tersinir olup olmadığını gösteren voltamogram

Bu teknikte, yükseltgenme/indirgenme olayları elektrot yüzeyinin hemen yakınındaki nernst difüzyon tabakasında gerçekleşir. Difüzyon tabakasındaki bu olaylar ana çözeltideki analit derişimine bağlıdır. Elektrot yüzeyi analit ile kaplandığında, yükseltgenme/indirgenme olayları analitin tamamını ifade etmektedir. Bu durumda tarama hızı oldukça yavaş olmalıdır.

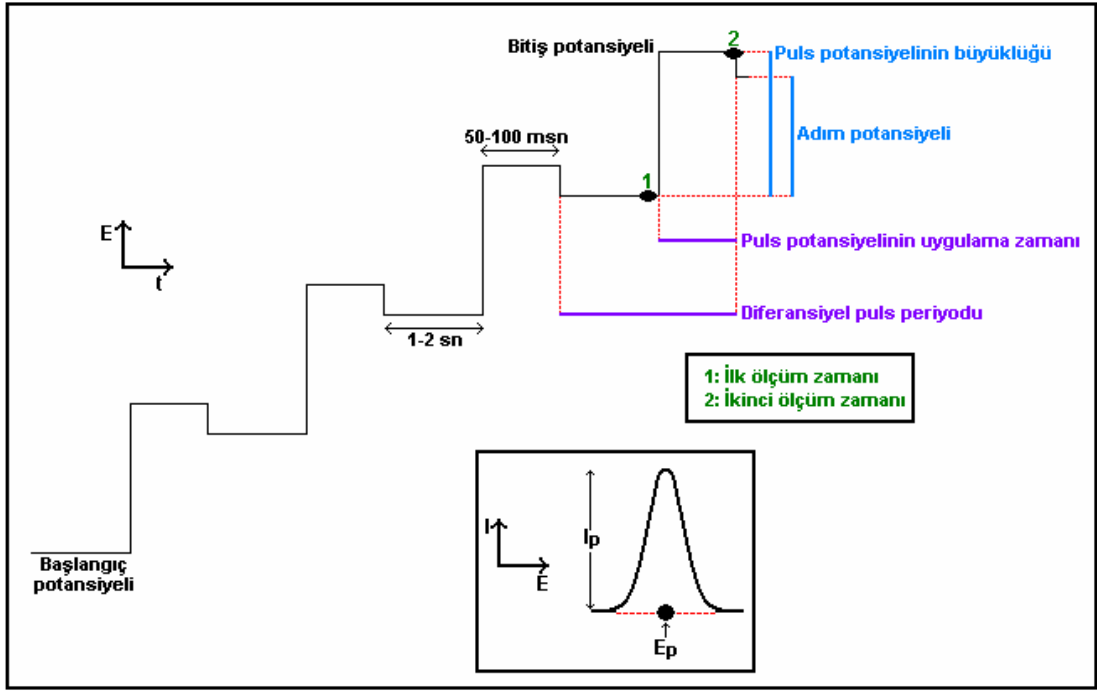
#### 1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

Bu yöntemde, doğrusal bir tarama yapılarak periyodik pulslar oluşturulmaktadır. Ölçümler faradayik akımın en yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu zamanda yapılır. Puls başına akım farkı ( $\Delta I_p$ ), doğrusal olarak artan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen diferansiyel eğri bir pik şeklindedir ve pik yüksekliği derişim ile doğru orantılıdır. Bu yöntemde tayin sınırı  $10^{-8}$  M'dir. Bu yüksek duyarlılığın sebebi faradayik

akımın artması, faradayik olmayan yükleme akımının ise azalmasıdır. Yöntemin en yararlı özelliği, yarı-dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,04V - 0,05V kadar fark olan maddelerin bile pik maksimumlarının elde edilmesine olanak sağlamasıdır.



**Şekil 12 A:** Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.



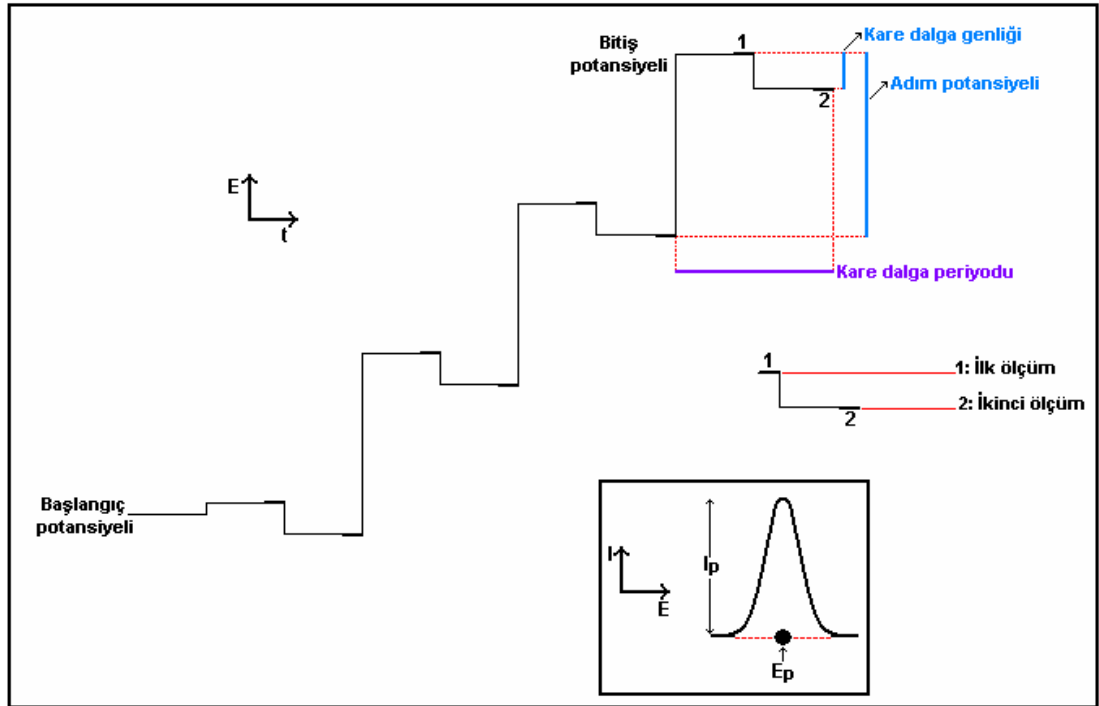
**Şekil 12 B:** Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali (4).

Potansiyel aniden artar. Elektrot yüzeyi etrafında bir analit tabakası mevcuttur. Elektrottaki yeni potansiyel, akım artışına sebep olur. Böylece bu akım artışı analit derişimini belirli bir seviyeye düşürür. Ancak bu potansiyel için gerekli denge derişimine erişilince, akım difüzyonu karşılayacak seviyeye gelir. Buna difüzyon kontrollü akım denir. Puls voltametrisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır.

Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark ( $\Delta i$ ), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği derişimle doğru orantılıdır.

### 1.4.3. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)

Kare dalga voltametrisi, son derece hızlı ve duyarlı bir voltametri tekniğidir. Voltamogramların tamamı 10 milisaniyeden daha az bir sürede elde edilir. Tayin sınırları  $10^{-7} - 10^{-8}$  M arasındadır. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda, ileri tarama sırasında oluşan ürünün, geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek büyüklükte bir puls oluşur. Bu yöntemde ölçüm oldukça hızlı alınabildiğinden, istenilen sayıda ölçümün ortalaması hesaplanarak analize ait sonucun kesinliğini arttırmak mümkündür.



**Şekil 13:** Dijital cihazlarda kare dalga voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali (4).

#### 1.4.4. Doğrusal Taramalı Voltametri

Bu yöntemde, doğru akım potansiyelinin zamanla doğrusal bir şekilde artırılmasıyla uyarma sinyalleri elde edilir. Bu uygulamanın sonrasında analizi yapılacak maddeye ait akım cevapları potansiyelin bir fonksiyonu olarak voltamogramlarda incelenir. Doğrusal taramalı voltametriye, iyi pik maksimumları elde edebilmek için yarı-dalga potansiyel farkı en az 0,2V civarında olmalıdır.

#### Voltamogramlar

Doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle sigmoidal eğriler (S şeklinde) verir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Keskin artıştan sonraki sabit akıma **sınır akımı**,  $i_s$ , denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde derişimiyle doğru orantılıdır ve bu nedenle;

$$i_s = k C_A$$

şeklinde yazılabilir. Burada  $C_A$  analit derişimi ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Yarı-dalga potansiyeli, akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele denir ve  $E_{1/2}$  ile gösterilir. Yarı-dalga potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilgilidir fakat genellikle ona eşit değildir.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye hidrodinamik voltametri adı verilir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye polarografi denir.

Elektrot sistemine gerilim uygulandığında kapasitif akım ve Faradayik akım olmak üzere 2 çeşit akım oluşur (2).

### 1.5.1. Kapasitif Akım ( $i_c$ )

Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılarak negatif yükle yüklenmesi sonucunda bu çözeltide bulunan pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Zıt işaretli yükler ara yüzeyin iki tarafında da birikir ve bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşumuna sebep olur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir, sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır.

### 1.5.2. Faraday Yasası ve Faradayik Akım ( $i_f$ )

Elektrokimyasal analiz sırasında, elektrokimyasal hücreye dışarıdan bir gerilim uygulanır. Bu gerilim sonucunda elektroaktif madde yükseltgenme veya indirgenmeye uğrar. Yükseltgenme/indirgenme tepkimeleri sonucu oluşan ürün miktarı ya da elektrolizlenen madde, tüketilen elektrik miktarıyla orantılıdır.

$$Q = I \cdot t$$

Bir devreden t saniyede I amper akım geçirildiğinde kulon cinsinden Q miktarda elektrik harcanır. Buna göre analiz edilecek tek bir türe ait tüm maddenin elektrolizlenebilmesi için gereken elektrik miktarı;

$$Q = n \cdot F \cdot C \cdot V$$

eşitliği ile bulunur. Burada n; molekül ya da iyon başına tüketilen elektron sayısını, V; hacmi (L), C; analit konsantasyonu (M), F; faraday sabitini (96485 kulon) gösterir. Bu eşitliğe faraday yasası denir. Faraday

yasası, devreden geçen akımın tek bir elektrokimyasal olay için tüketilmesi halinde geçerlidir.

Analiz edilecek maddenin uğradığı reaksiyonlardan kaynaklanan, maddenin kiyasal dönüşümü için harcanan ve yalnızca elektron alış verişine dayanan bu akıma faradayik akım,  $i_f$  denir.

$i = i_f + i_c$  olduğundan  $i_c$  azalırse duyarlılık artar.

Genellikle  $10^{-3}$  M ve üstünde;  $i_c < i_f$  'dir ve çalışılabilir.  $10^{-4}$  M'da kısmen iyi sonuç alınır.  $10^{-5}$  M ve üstünde;  $i_c > i_f$  olduğu için çalışılmaz.

### **Voltametrik Akımlar**

Bir elektroliz işleminde akım, analitin difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine taşınma hızına bağlı olarak değişir. Aktarımın difüzyonla sağlandığı durumlarda faradayik akım cottrel denklemi ile ifade edilir. Buna bağlı olarak; oluşan difüzyon akımının zamana karşı fonksiyonu COTTRELL denklemini verir. Analiz esnasında gerçekleşen tepkimelerin difüzyon kontrollü olup olmadığı Cottrell denklemini kullanılarak anlaşılır.

$$I = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Burada:

$I = t$  zamandaki akım

$n$  = elektrokimyasal tepkimeye giren elektron sayısı

$F$  = faraday sabiti

$A$  = elektrot yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ )

$D$  = difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{saniye}$ )

$C$  = analitin derişimi ( $\text{mol/L}$ )

t = zaman (saniye)

### 1.6.1. Nernst eşitliği

Elektrokimyasal hücrede analit içeren çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akım iletilir. Bu akım uygulanan gerilim sonucu oluşmakta olup iletimi sırasında elektrotlarda yükseltgenme veya indirgenme tepkimeleri meydana gelir.



O ve R sırasıyla redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şekillerini ifade eder.

Elektrotlardaki kimyasal madde miktarı geçen akımla doğru orantılıdır. Elektrot potansiyelleri kullanılarak elektroaktif yapıdaki kimyasal maddelerin elektrot yüzeyindeki derişimleri bulunabilir. Bu da Nernst Denklemini ile açıklanır.

Yukarıdaki tepkime temel alınarak Nernst denklemini yazılırsa;

$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{[O]}{[R]}$$

$E^0$  = standart elektrot potansiyeli

R = gaz sabiti ( $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

T = sıcaklık (Kelvin)

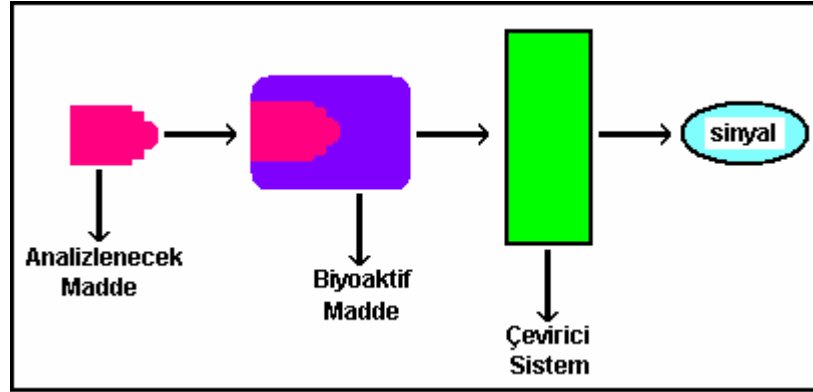
n = transfer edilen elektron sayısı

F = faraday sabiti

[O], [R] = tepkimedeki türlerin derişimi (mol/L)

## 2. BİYOSENSÖR

Biyosensörler, kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren, derişim ile orantılı elektriksel sinyaller oluşturan elektrokimyasal sensörlerin yaygın kullanım alanlarından biridir. Elektrokimyasal sensörlerin yapısına biyolojik maddelerin (enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb.) eklenmesiyle ortaya çıkmıştır. Biyokimyasal ve elektrokimyasal olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek biyokimyasal ürün oluşturmaktır. Elektrokimyasal kısmın görevi ise ortamda biyokimyasal kısım tarafından oluşturulan biyokimyasal üründen okunabilir bir sayısal değer oluşturmaktır (19).



**Şekil 14:** Biyosensörün yapısı ve bileşenleri.

### 2.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler: (22)

1. Seçicilik
2. Uzun kullanım ömrü
3. Minimum kalibrasyon gereksinimi

4. Tekrarlanabilirlik
5. Kararlılık
6. Yüksek duyarlılık
7. Yeterli düzeyde tayin sınırı
8. Geniş ölçüm aralığı
9. Hızlı yanıt zamanı
10. Hızlı geri dönme zamanı
11. Basitlik ve ucuzluk
12. Ufak boyuta indirgenebilmesi ve sterilize edilebilmesi

## **2.2. Çevirici Türüne Göre Biyosensör Çeşitleri**

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (tanıyan) ile tayini gerçekleşecek olan analit (tanınan) arasında, sensör yüzeyinde çok seçici özellikte bir etkileşme oluşur. Etkileşmenin sonucunda oluşan değişiklik ortaya çıkan bir kimyasal madde veya başlangıçta ortamda bulunan ve etkileşme ile kaybolan bir kimyasal madde olabilir. Bu durum bazı değişikliklere sebep olur ve çevirici kısım bu değişiklikleri algılayarak elektrik sinyaline çevirir.

### **2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler**

Etkileşim sonucu ortaya çıkan değişim elektrokimyasal bir değişim ise (elektriksel potansiyel, akım veya empedans değişimi gibi), çevirici bölümün bu elektrokimyasal değişimleri algıladığı biyosensörlere elektrokimyasal biyosensörler adı verilir. Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik, empedimetrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır.

### 2.2.2.1. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi farklı araştırma alanlarında geniş ölçüde kullanılan değerli bir tekniktir. Metot potansiyel ya da akımın küçük bir sarsımının uygulanmasını içerir. Bu sarsım tekli bir sinüs dalgası veya üst üste eklenmiş farklı frekanslardaki çok sayıda sinüs dalgasıdır. Uygulanan sarsımdan ve bunun ölçülmüş yanıtından, empedansın büyüklüğü ve faz kayması belirlenir. Bu teknik spektroskopi olarak adlandırıldığından, parametreler uygulanan sarsımın frekansının bir fonksiyonu olarak ölçülür.(4)

Elektriksel rezistans; bir devre elemanının, elektriksel akım deverenına karşı direnme yeteneğidir. Rezistans, potansiyel(E) ve akım(I) arasındaki orantıya dayanarak Ohm kuralları tarafından belirlenir. Buradan yola çıkılarak oldukça iyi bilinen şu bağıntı yazılabilir;

$$R(\text{Ohm})=E(\text{Volt})/I(\text{Amper})$$

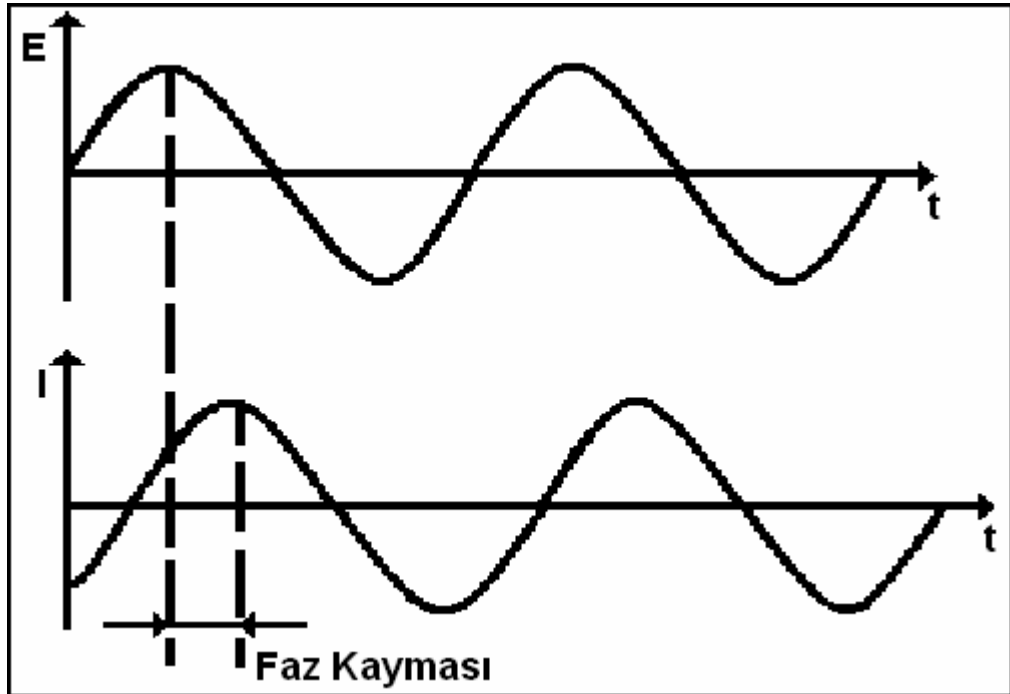
Ancak bu bağıntının kullanımı ideal rezistör olarak adlandırılan sadece bir devre elemanı ile sınırlandırılır. İdeal bir rezistör birtakım sadeleştirici özellikler(Ohm Kanunları) tarafından sınırlandırılmıştır. Bunlar;

- Tüm akım ve potansiyel düzeylerinde Ohm kurallarına bağlı kalır.
- Rezistansı, frekanstan bağımsızdır.
- Bir rezistöre bağlı AC akım ve voltaj sinyalleri birbirleriyle eş evrelidir.

Gerçek hayatta devre elemanları çok daha kompleks davranışlar sergilerler. Bu elemanlar bizi rezistansın basit konseptini terk etmek durumunda bırakırlar. İşte bu noktada rezistans yerine daha genel bir devre parametresi olan empedans kullanılmaktadır. Empedansta rezistans gibi bir devre elemanının, elektriksel akım deverenına karşı direnç gösterme

yeteneğinin ölçümüdür. Rezistanstan farklı olarak birtakım sadeleştirici özellikler tarafından sınırlandırılmamaktadır.

Elektrokimyasal empedans genellikle elektrokimyasal hücreye bir AC potansiyelin uygulanmasıyla ölçülür. Bu işlemde hücre içerisindeki akım ölçülmektedir. Bir sinüsoidal potansiyel sarsımı uygulanır ve bu potansiyele karşı alınan yanıt sarsım frekansı ile bunun oranlarını içeren bir AC akım sinyalidir. Bu akım sinyali, sinüsoyidal fonksiyonların bir toplamı olarak analiz edilebilir. Elektrokimyasal empedans normalde küçük bir uyarma sinyali kullanılarak ölçülür. Bunun nedeni lineer bir hücre yanıtı elde etmektir ve sistemden elde edilen hücre yanıtı psödo-lineardır. Linear bir sistemde bir sinüsoyidal potansiyele karşılık olan akım yanıtı, aynı frekansta bir sinüsoid olacaktır ancak bir faz kayması meydana gelecektir.



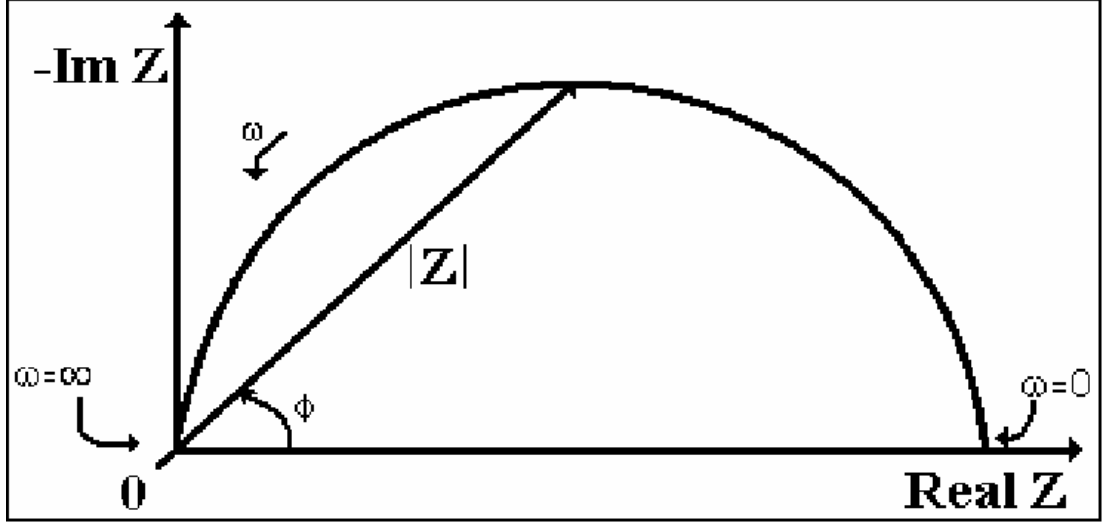
**Şekil 15:** Linear bir sistemde sinüsoyidal akım yanıtı

Ohm kanuna paralel olan bir ifade sistem empedansının Şu Şekilde hesaplanmasına olanak sağlar;

$$Z=E(t)/I(t)$$

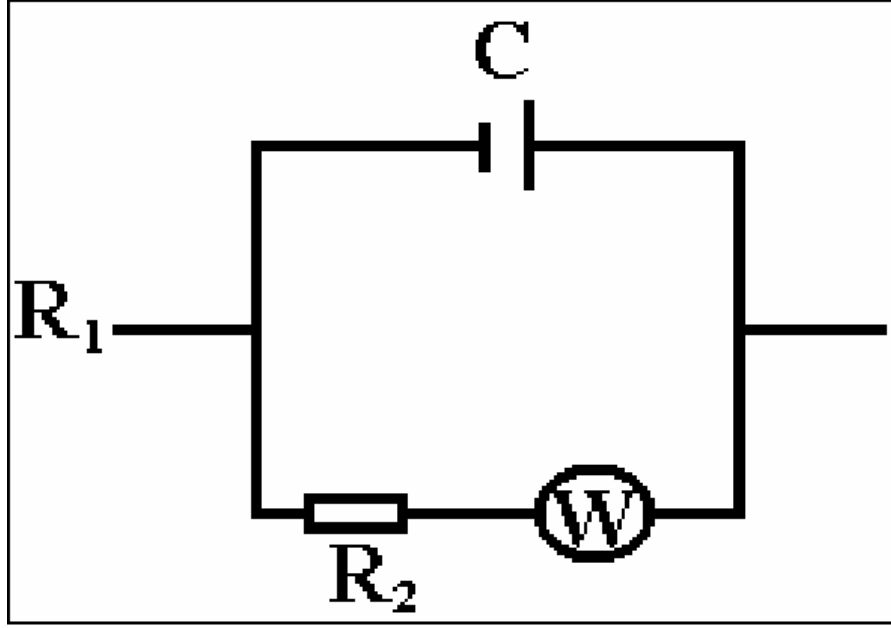
Burada; Z empedans değeri, E(t) k¼¼¼k uyarma sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak), I(t) yanıt sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak) olarak ifade edilmektedir.

Çalışmalarımızda kullanılan empedans diyagramı bir gerçek bir de hayali kısımdan oluşmaktadır. X ekseninde gerçek, y ekseninde ise hayali kısmın yer aldığı ve sinyal yanıtlarının bu Şekilde çizildiği diyagramlardan bir Nyquist eğrisi elde edilmektedir. Bu diyagramda y ekseninin negatif olduğu ve Nyquist eğrisindeki her bir noktanın farklı bir frekanstaki empedans değeri olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Nyquist eğrisinde empedans mesafenin (uzunluğun) bir vektörü olarak sunulabilir IZI. Bu vektör ile x eksenini arasındaki açı frekansı(f-Hertz) verir. Nyquist eğrilerinde diyagram üzerindeki veri noktalarına bakıldığında, o noktayı kaydetmek için hangi frekans değerinin kullanıldığı konusunda bir Őey söylemek mümkün değildir. Ölçüm sonucunda elde edilen sinyale ait sayısal analiz uydurma ve sim¼¼lasyon seğeneği kullanılarak okunabilir değerler elde edilir.



**Şekil 16:** Empedans vektörünün belirtildiği Nyquist Eğrisi

Şekil 16'da yer alan Nyquist eğrisi Şekil 17'de gösterilen elektriksel devreden çıkartılır. Yarım daire tek bir zaman sabitinin karakteristiğidir. Elektrokimyasal empedans çizimleri birkaç tane zaman sabiti içerirler ve buna bağlı olarak oluşan yarım dairelerden yalnızca bir parçası diyagram üzerinde görülebilir.



**Şekil 17:** Tek zaman sabitli, basit denklik devresi

Bir EIS spektrumunun ölçülmesi genellikle çok uzun zaman alır. Ölçülmekte olan sistem, EIS spektrumunun ölçülmesi için gereken süre boyunca sabit bir konumda olmalıdır. Pratikte sabit bir konum yakalamak zordur çünkü solüsyondaki safsızlıkların adsorbsiyonuyla, oksit tabakanın gelişimiyle, solüsyonda reaksiyona bağlı ürünlerin oluşumuyla, yüzey kaplamasının aşınmasıyla, ısı değişiklikleriyle ve benzeri bir takım nedenlerle elektrokimyasal hücrede değişiklikler meydana gelebilir. Standart EIS analiz cihazları sabit konumlu olmayan bir sistem için oldukça hatalı sonuçlar verebilir. Bu metotta elde edilen veriler farklı alanlarda sunulabilir. EIS'ta bu alanlardan zaman ve frekans alanları olmak üzere ikisi kullanılmaktadır. Zaman alanında sinyaller zamana karşı amplitüt sinyali olarak sunulur. Diğerinde ise veri frekansa karşı akım alanı olarak gösterilir.

## **2.2.2. Optik Biyosensörler**

Biyosensörün çevirici bölümünün optik değişimleri algıladığı ve elektrik sinyaline çevirdiği aygıtlara optik biyosensörler denir. Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekül immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir.

## **2.2.3. Kütle Hassas Biyosensörler**

Kütle hassas biyosensörlerde çevirici olarak piezoelektrik kristaller kullanılır. Rezonans frekansındaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimi ölçülür. Kütle hassas biyosensörlere Kuartz Kristal Mikrobals (Quartz Crystal Microbalance, QCM) örnek gösterilebilir.

## **2.3. DNA Biyosensörleri**

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (66, 70, 79, 90, 112). DNA biyosensörleri, dizisi bilinen hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (70, 106) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin tayininde kullanılabilir (11, 106).

### **2.3.1. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları:**

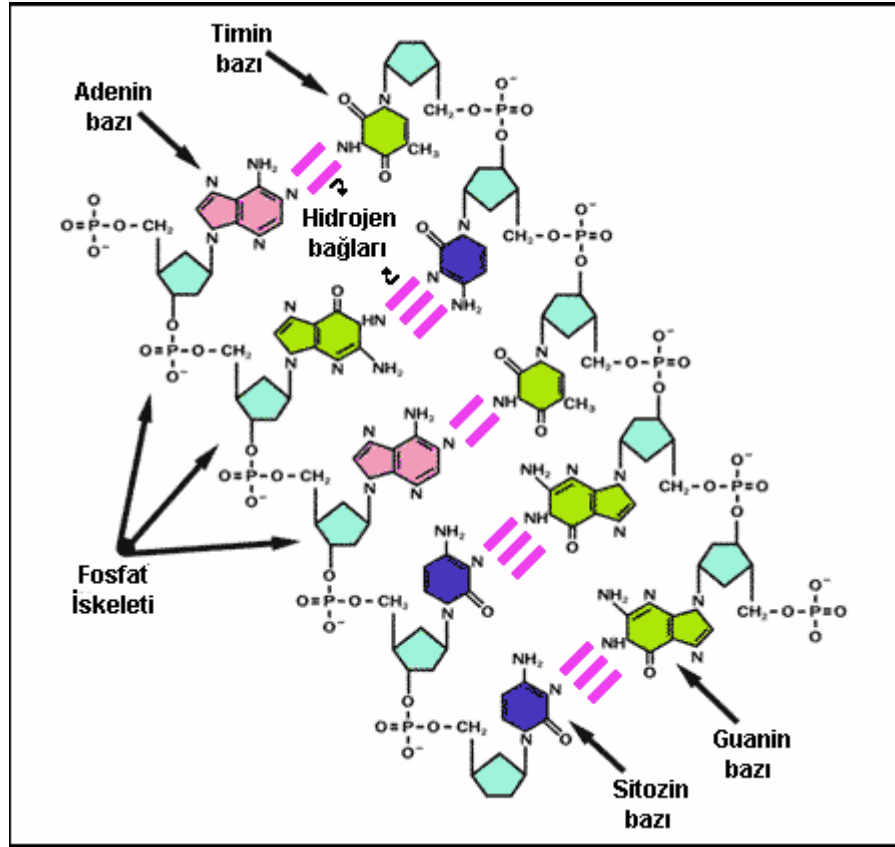
#### **2.3.1.1. Nükleik Asitler ve DNA : (31, 33)**

Nükleik Asitler; genetik bilginin kodlandığı, makromoleküllerdir. Yapılarında bulunan şekerin türüne bağlı olarak, deoksiribonükleik asit (DNA) ya da ribonükleik asit (RNA) adını alırlar.

DNA; genetik bilgiyi içeren ve birbirine benzer ünitelerin tekrarı ile oluşan çift zincirli sarmal bir makromoleküldür. DNA molekülünün nükleotid adı verilen her ünitesi; bir fosfat grubu, ona bağlanmış bir şeker molekülü (deoksiriboz) ve deoksiriboza bağlanmış bir azotlu baz molekülü içermektedir. DNA zincirinde, nükleotitlere girebilen azotlu bazlar 4 çeşittir. A, T, G, C ile gösterilen; Adenin, timin, guanin ve sitozin bazlarından A ve G pürin, C ve T pirimidin bazlarıdır. RNA molekülünün yapısında ise DNA molekülünden farklı olarak; şeker grubundaki değişikliğin yanı sıra, timin bazı yerine pirimidin bazlarına dahil edilen urasil bazı bulunmaktadır. Nükleotidler biraraya gelerek DNA tek zincirini oluşturur. Belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin belirli bir diziliş sırasına göre 3'–5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucunda nükleik asitlerin primer yapısı oluşur. Bu bağlanma şeker molekülünün 3' konumundaki karbonunun, kendinden sonra gelen nükleotitte yer alan şeker molekülünün 5' konumundaki karbonuna bağlanması ile gerçekleşir. Polinükleotidler, omurgada bulunan fosfat gruplarından dolayı asidik karakterlidir.

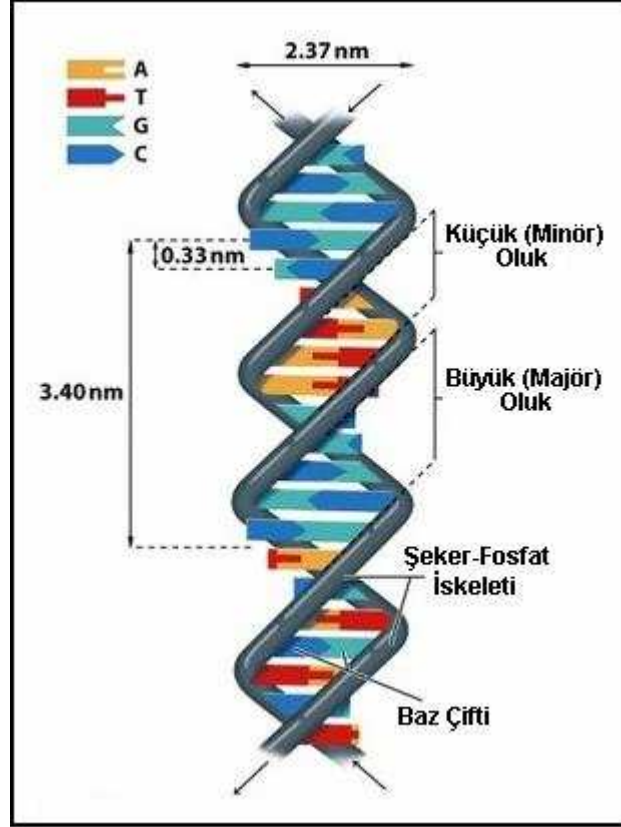
Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Buna dayanarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısının çift zincirli heliks şeklinde bir yapı olduğu ortaya koyulmuştur. Çift zincirli sarmal DNA molekülünün iki zinciri, mevcut pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından birarada tutulmaktadır. Pürin ve pirimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T, G karşısında C bulunduğu için son derece özgündür. G ile C arasında üç hidrojen bağı, A ile

T arasında iki hidrojen bağı bulunmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. DNA ısıtıldığında sarmal yapısının yarısının bozulduğu sıcaklık, erime sıcaklığı (Tm) olarak adlandırılır. DNA sarmal yapısının tamamen bozulmasına denatürasyon adı verilir. G-C baz çifti sayısı, T-A baz çifti sayısına göre daha fazla olan DNA dizileri, daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift sarmal DNA tekrar oluşabilir, bu işlem renatürasyon olarak adlandırılır. (24, 94).

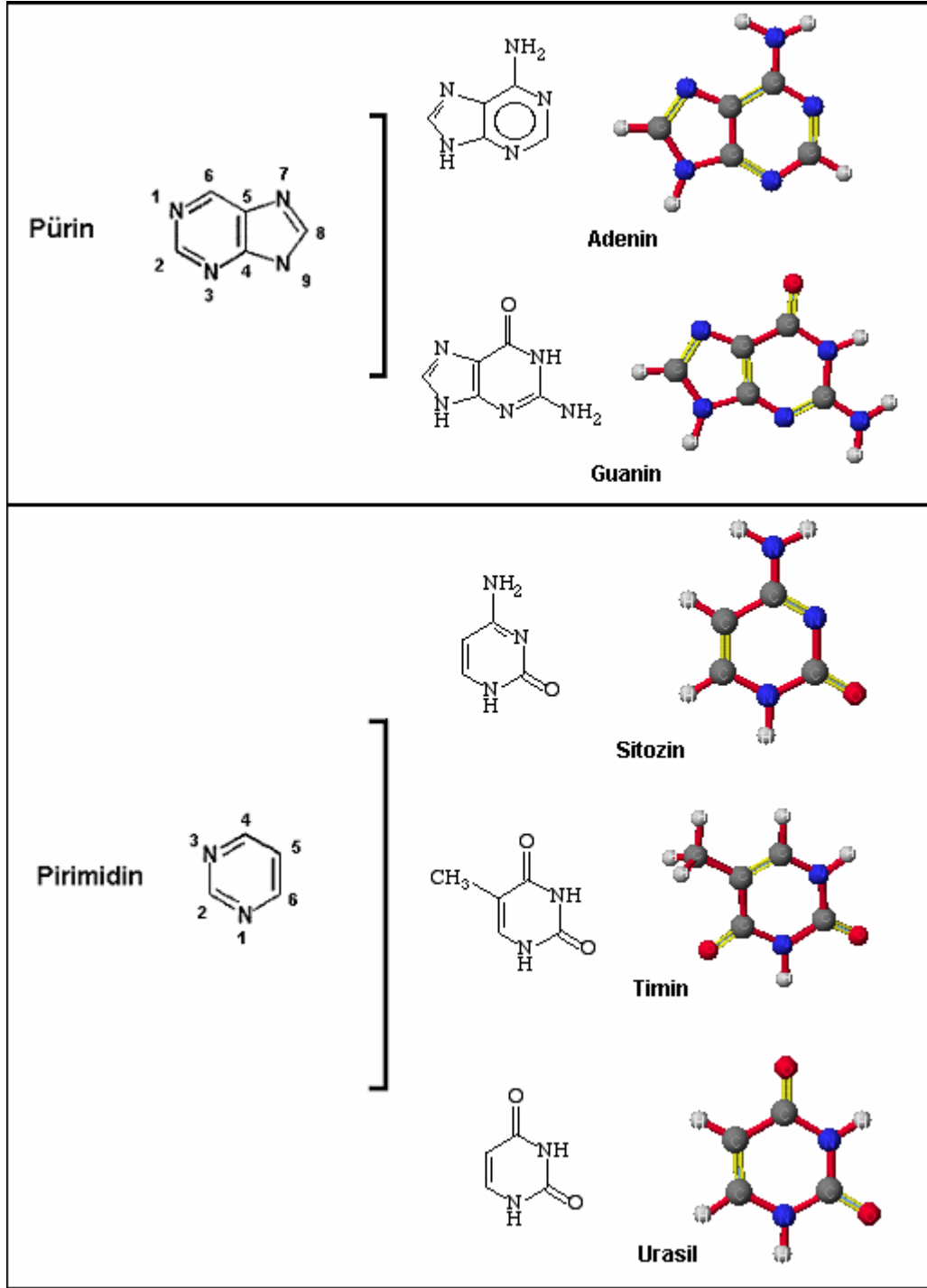


**Şekil 18:** DNA çift sarmalının kimyasal yapısı

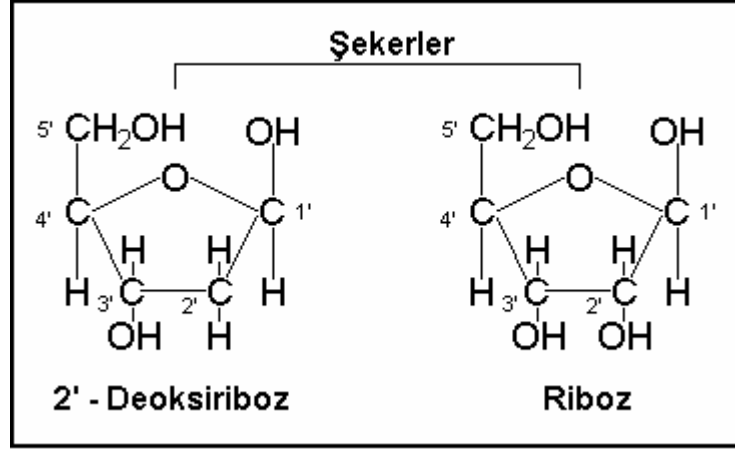
Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri 5' → 3' yönüne doğru, diğeri ise 5' → 3' yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir.



**Şekil 19:** DNA çift sarmalının major ve minör olukları.



**Şekil 20:** Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması



**Şekil 21:** Nükleik asitte bulunan şekerlerin kimyasal yapısı

### 2.3.1.1.1. DNA ile İlgili Bazı Terimlerin Tanımları:

**Baz çifti:** Birbirinin karşılığı olan iki bazı ifade eder ve gösterilirken nokta ile ayrılır. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

**Oligonükleotid:** Birden fazla bazın yan yana gelmesiyle oluşan yapıdır.

**Dinükleotid;** İki bazın yan yana gelmesiyle oluşan yapıdır.

**Trinükleotid;** üç bazın yan yana gelmesiyle oluşan yapıdır.

**Tekrarlayan oligonükleotidler:** Polimer içerisinde tekrarlanan tek bir baz, iki baz ve ya üç baz, tekrarlayan oligonükleotidleri ifade eder. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek verilebilir.

**Çift sarmal tekrarlayan polimerler:** Nokta ile ayrılarak ifade edilen baz çiftlerinden oluşan ve 5' → 3' polaritesine sahip polimerlerdir.

Örneğin mononükleotid gösterilişine, **poly(A).poly(T)** (veya **poly(Da).poly(Dt)** şeklinde gösterilebilir), dinükleotid'e **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotid'e **poly (GAT). Poly (ATC)** örnek verilebilir.

**Prob: Baz** dizisi belli olan oligonükleotid.

**Hedef dizi (Target) :** Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotid.

**Rastgele dizi:** Hedef diziden tamamen farklı baz dizilimine sahip oligonükleotid.

**DNA hibridizasyonu:** Baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dubleks molekülü oluşturmasıdır (8).

### 2.3.2. DNA Biyosensörleri ile DNA Dizilerinin Tayini

Hastalık nedeni olan patojenler, bakteriler ve virüsler, nükleik asit dizilerinin bilinmesinden dolayı tayin edilebilir. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojide, son yıllarda görülen gelişmeler, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin bu alanlardaki kullanımının ümit verici olduğunu göstermektedir (111). Antikor ve enzimlerden farklı olarak nükleik asit tanıma tabakası, çok kararlı, kolaylıkla hazırlanabilen ve tekrar kullanım için yenilenebilen bir tabakadır (70).

DNA dizilerinin tayininde kullanılan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, tayin süresini kısaltmakta, tayin yöntemini kolaylaştırmakta ve hibridizasyon olayının tayini ile dizilerin saptanmasını sağlamaktadır. DNA hibridizasyon biyosensörleri olarak da adlandırılan bu biyosensörler çeşitli çevrelerdeki bulaşıcı hastalıkların erken ve kesin tanısında kullanılmaktadır (22, 36). Diziye özgü hibridizasyon olaylarının tayini, ya doğrudan (78, 108) ya da DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) (7, 14, 15, 16, 40, 62, 63, 71, 110) veya DNA dizisindeki guaninlerle özgün olarak etkileşen (MB, Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir (27, 32, 34, 108). Elektrokimyasal çeviriciler, hibridizasyon

olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır (16, 18, 19, 20, 22, 58).

Hibridizasyona dayalı DNA biyosensörleri, aranan hedef baz dizilimine karşılık gelen 20–40 baz gibi kısa bir baz dizilimine sahip, sentetik tek sarmal oligonükleotidin (“Prob” olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine tutturulmasına dayanmaktadır. Tuturma işlemi, elektrostatik, adsorpsiyon ile ve kovalent bağlanma olmak üzere üç şekilde yapılabilir. Elektrostatik bağlanmada, elektroda tutturulacak oligonükleotidin yapısına zarar vermeyecek şekilde uygun bir pozitif potansiyel uygulanır. Oligonükleotitler yapılarında bulunan fosfat gruplarından dolayı negatif yüklüdür. Negatif yüklü oligonükleotitler, pozitif potansiyel uygulanan elektroda elektrostatik olarak kolaylıkla tutturulur. Adsorpsiyon ile bağlanmada, elektrotlar belirli bir süre için oligonükleotid çözeltisi içerisine daldırılarak, muamele edilirler bu işlemin sonucunda oligonükleotitler elektrot yüzeyine bağlanır. Fiziksel bir bağlanma yöntemidir. Kovalent bağlanmada ise, oligonükleotitler kimyasal maddeler (karbodiimit, süksinimit, vb.) aracılığıyla elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanır.

Prob tutturulan elektrodun (biyosensör) hedef diziyi içeren bir örnek çözeltisine daldırılması, elektrot yüzeyinde hibrit oluşumuna neden olur. Bu oluşumun elektrokimyasal veya optik ölçümü, bir çevirici sinyali ile gözlenmektedir. Elektrokimyasal olaylarda, elektrot yüzeyinde oluşan hibrite bağlı olarak elde edilen elektrokimyasal yanıt, hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (23, 70, 72, 101, 111).

### 3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Genetik bilgilerin depolandığı yer olan DNA, kendini replikasyon adı verilen bir olay sonucu eşler. Çift sarmal DNA, yapısındaki hidrojen bağlarının kopması sonucu birbirinden ayrılır ve ayrılan iplikler tamamlayıcıların sentezlenmesinde kalıp rolü oynar. Böylece bir DNA molekülünden dizilimi aynı olan ikinci bir DNA molekülü meydana gelir. Hücre bölünmesi sonucu yeni oluşan hücrelere tüm DNA bilgileri aynen geçer.

İstenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilebilmesi için, 1985 yılında Cetus firması araştırmacılarından Kary Mullis, DNA ve RNA baz sıralarının sayısal olarak arttırılmasına dayanan ‘**Polimeraz Zincir Reaksiyonu**’ (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) ‘nu geliştirmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu in vitro bir yöntem olup spesifik bir DNA parçasının kopyalarının, primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanır. Bu yöntem sayesinde az miktardaki DNA hızlı ve basit bir şekilde çoğaltılabilir.

PCR, yaklaşık 30 nesil sonra, seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar. Bu sebeple PCR’a, DNA çoğaltma yöntemi de denebilir.

#### 3.1. PCR’ın Temel Bileşenleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu’nun çalışma prensibi özetle, çeşitli materyallerden izole edilmiş çift sarmal DNA molekülünün denatürasyonu, iki oligonükleotid primerlerin hedef dizilere bağlanması ve uzaması esasına dayanır.

PCR'ın çalışma prensibini daha iyi anlayabilmek için, PCR'ın temel bileşenlerini bilmek daha yararlı olacaktır. PCR'ın temel bileşenleri şunlardır:

### **3.1.1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA**

PCR'da kullanılacak olan kalıp DNA, herhangi bir biyolojik kaynaktan elde edilmiş genomik DNA, plazmid, faj DNA'ları, çeşitli genler veya herhangi bir DNA parçası olabilir.

### **3.1.2. Taq DNA Polimerazlar**

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğın karşısına tamamlayıcı bir DNA ipliği oluşturmak üzere, dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan, uzun polinükleotid zincirin sentezini katalizler. Bu işlemi orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak gerçekleştirir. Sentezin başlaması için primerlere gereksinim vardır. Sentezin yönü 5'→3' şeklindedir. Ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, primerin serbest 3'-hidroksil ucuna fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Termostabil DNA polimeraz enziminin PCR'da kullanılması, rutin olarak yapılan deneylerde teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Thermus Aquaticus'dan elde edilen Taq DNA Polimeraz, termostabil enzimlerden ilki ve en yaygın kullanılanıdır.

### **3.1.3. DNA Primerleri**

DNA primerleri tek iplikli spesifik DNA segmentleridir. Kullanıldıkları yere göre 10-40 oligonükleotidden oluşmuşlardır. Hedef DNA üzerinde kendilerine komplementer olan baz sıralarını bulurlar ve onlara bağlanırlar. Daha sonra 3'-hidroksil ucundan DNA sentezinin ilerlemesini sağlarlar. Hedef DNA ile daha kuvvetli bağların oluşabilmesi için primerlerin yapısında %50–60 kadar G ve C bazları bulunmaktadır. Primerlerin 5' ucu, hedef DNA'nın 3'

ucu ile birleşerek, polimerizasyon için 5'→3' yönünde uygun bir ortam sağlamaktadır.

#### **3.1.4. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP)**

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek ya da dördü karışım halinde ticari olarak sağlanırlar. Taq DNA polimeraz kalıba uygun doğru bazları seçmede düşük dNTP derişimleri (10-100 µM) kullanarak daha başarılı olurlar. Normal koşullarda PCR 100 µM dNTP derişimi ile gerçekleştirilir.

#### **3.1.5. Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>**

PCR'da kullanılmak üzere genellikle önerilen tampon 20<sup>0</sup>C'de 10-50mM Tris-HCl'dir. Tris ısısal döngüsü esnasında pH'ı 6.8–7.8 arasında değişen dipolar iyonik bir tampondur. Mg<sup>2+</sup> iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, DNA çift sarmalının denatürasyon sıcaklığını artırır, polimeraz aktivitesini stimüle ederler. Magnezyum derişimi, primer eşleşmesini, oluşacak ürünün özelliğini, primer-dimer formasyonunu etkileyebilir. Mg<sup>2+</sup> iyonunun düşük derişimde olması ürün oluşumunun azalmasına, yüksek derişimde olması ise spesifik olmayan ürün birikimine sebep olur.

### **3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun İşleyişi**

Farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayan PCR aletlerinin kullanılmaya başlanması önemli gelişmelere yol açmıştır. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (Annealing) ve uzama (Extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur.

### 3.2.1. Hedef DNA'nın Denatürasyonu:

Denatürasyon, nükleik asitin iki iplikçığının birbirinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi işlemidir. Hedef DNA'nın denatürasyonu 95<sup>0</sup>C'de gerçekleştirilir. PCR için etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95<sup>0</sup>C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonu gerçekleştirilecek metaryelin türüne göre bu ısı işlemi 3–5 dakika kadar uygulanır.

### 3.2.2. Primerlerin Bağlanması (Annealing):

Bu basamakta sıcaklık 55-60<sup>0</sup>C'ye düşürülür. Primerler kendilerinin komplementeri olan tek iplik hedef DNA üzerindeki bölgelere spesifik olarak bağlanır. Primerler hedef DNA'nın 3' ucuna kendilerinin 5' ucundan bağlanırlar. Polimerizasyon için 5'→3' yönünde uygun bir ortam oluşur.

Eşleşme birkaç saniye sürer. Primerlerin derişim ve uzunlukları primer eşleşmesi için gereken ısı ve süreyi belirler. PCR'ın başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için  $T_m / T_a$  (Denatürasyon Sıcaklığı/Bağlanma Sıcaklığı) değerinin doğru bir şekilde hesaplanması gerekir. Bu hesaplama için kullanılan en yaygın formül;

$$T_m = [ ((A+T)'lerin sayısı) \times 2^0C + ((G+C)'lerin sayısı) \times 4^0C ]$$

$T_m$  değeri hesaplandıktan sonra bu sıcaklığın 5<sup>0</sup>C altı uygulanabilir eşleşme ısı olarak saptanır ve daha sonra en uygun sıcaklık değeri denemelerle saptanır.

### 3.2.3. Uzama:

Bu basamakta sıcaklık TaqDNA polimerazın çalıştığı sıcaklık olan 70-72<sup>0</sup>C'ye çıkarılır. Hedef DNA dizisinin kopyası TaqDNA polimerazın nükleotidleri primerlerin 3' ucuna yerleştirmesiyle gerçekleşir. Uzama, bağlanma gerçekleştikten sonra başlar. Sıcaklık 70<sup>0</sup>C'ye geldiğinde termal

DNA polimerazlar en aktif hale geçerler ve baz uzaması 100 baz/saniye'ye ulaşır.

Uzama aşamasında genellikle 72<sup>0</sup>C'de çalışılır. Bu sıcaklık Taq / Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesinin en uygun olduğu sıcaklıktır.

Yukarıda anlatılan üç aşama defalarca tekrarlanır ve böylece DNA fragmanları üssel olarak artar. Bir döngü sonucu meydana gelen ürün ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapar. Her PCR döngüsü sonucu DNA molekülü üzerinde istenilen bölge iki katına çıkmış olur.

Her döngünün %100 verimle gerçekleştiğini varsayarsak, örneğin 20 döngü sonucu 2<sup>20</sup> kat ürün meydana gelir.

## BÖLÜM II

### GEREÇ ve YÖNTEM

#### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Ölçümler ve deneyler sırasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar şunlardır;

- Terazi (Sartorius-Analytic A-200)
- pH-metre (Schott-Mainz CG 710)
- Manyetik karıştırıcı ( Elektro-mag ve ARE 2-Velp )
- Potansiyostat;  $\mu$ -AUTOLAB type III (GPES ve FRA Modülleri – Eco Chemie, Hollanda)
- Ag/AgCl referans elektrot
- Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

#### 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)
- Di potasyum mono hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) (Riedel-de Haen)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) (Riedel-de Haen)
- Trizma hidroklorik asit (Trizma-HCl) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
- tri – Sodyum sitrat dihidrat (Merck)
- EDTA

Tüm çalışmalarda Mili Q distile su (18 Mega-ohm' luk) kullanıldı.

Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ( $25,0 \pm 0,5$ ) °C' de gerçekleştirildi.

## 2.3. Kullanılan DNA Dizileri

Çalışmada kullanılan tüm sentetik diziler (AM-245 Probe-Hedef) liyofilize toz halinde TIB Molbiol (Almanya)'dan sağlandı.

### 2.3.1. Kullanılan Sentetik Prob ve Hedef Diziler

Seçilen prob AM-245 dizisi virüse ait matriks geninin (M) 245-272 koordinatlarındaki 28 baz çifti uzunluğundaki bölgedir (88).

**AM-245 Prob (Voltametrik ölçümlerde kullanılan dizi) :**

5' – CTI CAI CIT AIA CIC TTT ITC CAA AAT I – 3'

**AM-245 Prob (İmpedimetrik ölçümlerde kullanılan dizi) :**

5' – CTG CAG CGT AGA CGC TTT GTC CAA AAT G – 3'

**AM-245 Hedef :**

5' – CAT TTT GGA CAA AGC GTC TAC GCT GCA G – 3'

**Rastgele Seçilmiş Dizi :**

5' – TCA AAT CAG GTT GCT TA – 3'

### 2.3.2. Kullanılan Sentetik Prob ve Hedef Dizilerinin Hazırlanışı

Liyofilize DNA oligonükleotidlerin stok çözeltileri, derişimleri 1000 µg/mL (1000ppm) olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl ve 1 mmol/L EDTA içeren Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi (voltametrik teknik için pH 8.0, impedimetrik teknik için pH 7.4) ile hazırlandı, 50 µL'lik hacimlerde sterilize edilmiş plastik 0.2 mL'lik PCR tüplerine paylaştırılarak -20 °C'de saklandı. Bu oligonükleotidlere ait seyreltik çözeltiler çalışma sırasında duyulan gereksinimlere bağlı olarak ve bu aşamada kullanılmak üzere, proplar 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde, hedefler Hibridizasyon tampon çözeltisi (5X Sodyum Salin Sitrata) içerisinde hazırlandı.

µg/mL (ppm), molarite cinsinden hesaplanacak olursa;

$$n \text{ (mol)} = M \text{ (k\u00fctle) g} / MA \text{ (molek\u00fcl k\u00fctlesi) g/mol}$$

$$\text{Molar} = n \text{ (mol)} / V \text{ (hacim)} = \text{mol /L}$$

$$M \text{ (Molarite)} = M \text{ (k\u00fctle)} / [MA \text{ (molek\u00fcl k\u00fctlesi)} \times V \text{ (hacim)}] = \text{mol /L}$$

### **2.3.3. Kullanılan PCR \u00dcr\u00fcn\u00fc Hedef Dizilerin Hazırlanışı**

Dokuz Eyl\u00fcl \u00dcniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından yurt dı\u015fından getirilmi\u015f olan, hasta ve kontrol bireylerden izole edilmi\u015f DNA \u00f6rnekleri uygun primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Bu \u00fcr\u00fcnler hibridizasyon tamponu ile uygun deri\u015fime seyreltilip, hibridizasyondan \u00f6nce denat\u00fcre edilerek tek iplikli hale getirildi.

### **2.4. Kullanılan \u00c7\u00f6zeltilerin Hazırlanışı**

#### **2.4.1. Tampon \u00c7\u00f6zeltilerin Hazırlanışı:**

T\u00fcm tampon \u00c7\u00f6zeltilerin hazırlanışında Mili Q distile su kullandı. Tampon \u00c7\u00f6zeltiler hazırlandıktan sonra plastik \u015fi\u015felerde, buzdolabında saklandı. İyonik kuvveti sağlamak i\u00e7in TE tampon \u00c7\u00f6zeltisi hari\u00e7 t\u00fcm tampon \u00c7\u00f6zeltilerinin litresine deri\u015fimi 0.02 M olacak \u015fekilde 1.168 g NaCl eklendi.

#### **0.05 M Fosfat Tampon \u00c7\u00f6zeltisinin Hazırlanışı (pH 7.4):**

\u00d6l\u00e7\u00fcmlemler sırasında kullanılan 0.05 M fosfat tampon \u00c7\u00f6zeltisi litresinde 1.36 g (0.01 mol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 6.96 g (0.04 mol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i\u00e7ermektedir. Hazırlanan tampon \u00c7\u00f6zeltisinin pH değeri yaklaşık 7.4 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle pHmetre kullanılarak 7.4'e ayarlanır.

#### **0.50 M Asetat Tampon \u00c7\u00f6zeltisinin Hazırlanışı (pH 4.8):**

Kullanılan 0.50 M asetat tampon \u00c7\u00f6zeltisi litresinde 0.2722 g sodyum asetat trihidrat ve 0.1154 mL asetik asit i\u00e7ermektedir. \u00c7\u00f6zeltinin pH'sının 4.8

değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

#### **0.02 M Tris HCl Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7.0):**

Kullanılan 0.02 M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3.152 g Trizma HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7.0 değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

#### **0.01 M Tris HCl, 1 mM EDTA Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 8.0 ve pH 7.4):**

Kullanılan 0.01 M Tris HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1.576 g Trizma HCl ve 0.372g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8.0 değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

#### **İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanması Esnasında Kullanılan Hibridizasyon Tamponunun Hazırlanışı:**

Hibridizasyon tamponu litresinde 0.03M olacak şekilde 8.823g sodyum sitrat ve 0.3M olacak şekilde 17.532g NaCl içermekte olup ultra saf su kullanılarak hazırlandı (pH 7.4) (43, 44).

#### **Yıkama Tamponunun Hazırlanışı:**

Yıkama tamponu litresinde 15mM olacak şekilde 4.412g sodyum sitrat, 0.5M olacak şekilde 29.22g NaCl içermektedir. Tampon ultra saf su kullanılarak hazırlandı (pH 7.4).

## **2.5. Kullanılan Yöntem**

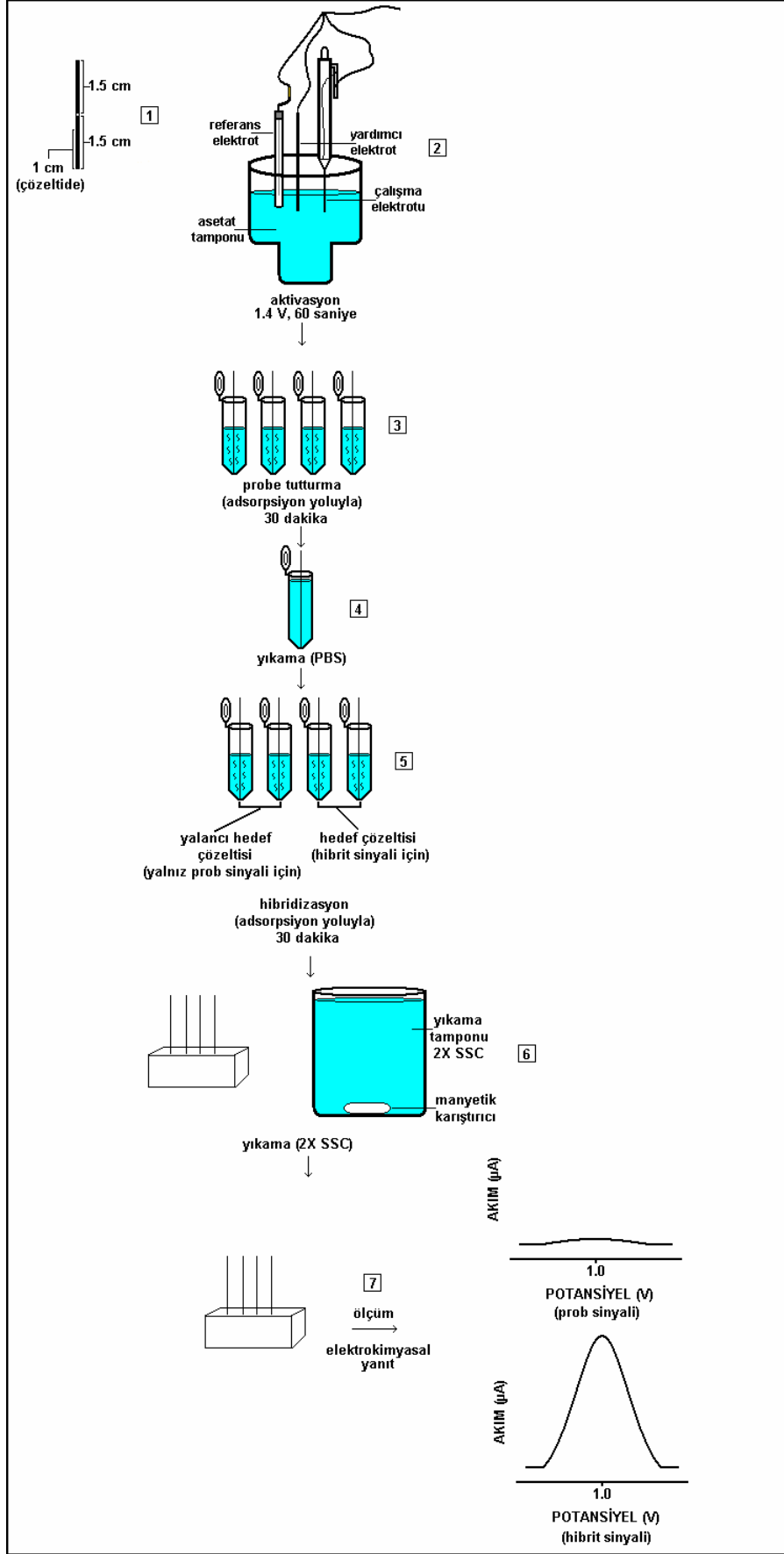
### **2.5.1. İnfluenza A Virüsünün Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)**

#### **Tekniği Kullanılarak Elektrokimyasal Yoldan Saptanması**

Tasarlamış olduğumuz biyosensör ile İnfluenza virüs tip A'nın saptanması için kullanılan yöntem basamakları sırasıyla Şekil 19'da şematize edilmiştir.

Tayin için belirtilen aşamaların uygulanması için gerekli süreler aşağıdaki gibidir:

- Elektrot yüzeyinin aktive edilmesi, 60 sn.
- Prob tutturulması, 30 dk.
- Elektrotların PBS ile yıkanması, 15 sn.
- Hibridizasyon, 30 dk.
- Elektrotların SSC ile yıkanması, 30 sn.
- Ölçüm, 1 dk.



**Şekil 22:** İnfluenza A Virüsünün Voltametrik Yöntem İle Tayini

### **2.5.1.1. Elektrotların Hazırlanışı**

Çalışmamızda çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (Tombo 0.5mm HB, kalem ucu) kullanıldı. Kalem uçları 0.5mm çapında ve 60mm uzunluğunda olup deneysel koşullara uygun olması açısından 30mm boyunda kesilerek hazırlandı. Bu 30mm'nin 10mm'lik kısmı, çözelti içine daldırılacak şekilde bir elektrot tutacağı (Noki kalem model 2000, Japonya) içine yerleştirildi (28, 30, 45, 46, 78, 103, 104). Her bir parametre için farklı grafit yüzeyler kullanılarak, tek kullanımlık elektrot sistemi sağlandı.

### **2.5.1.2. Kalem Grafit Elektrodunun (PGE) Aktivasyonu:**

PGE, 0.5M Asetat tamponu çözeltisine (pH: 4.8) daldırılarak, 60 saniye süreyle +1.4 V gerilim uygulandı. Buna bağlı olarak elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

### **2.5.1.3. Elektrot yüzeyine Prob DNA Tutturulması:**

Yüzeyi aktive edilmiş PGE, fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış olan 5µg/mL derişimde prob DNA çözeltisine 30 dakika süreyle daldırıldı ve adsorbsiyon yoluyla DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi fosfat tamponu ile yapıldı.

### **2.5.1.4. Sentetik Hedef Dizi ile Hibridizasyon**

Prob ile kaplı elektrot yüzeyleri, 7µg/mL derişimde sentetik hedef diziler ve rastgele seçilmiş diziler ile ıslak adsorbsiyon tekniği (29) kullanılarak 30 dakika süreyle etkileştirildi. Sonrasında istenmeyen bağlanmaları azaltmak amacıyla 2X'lik sodyum salin sitrat çözeltisiyle karışan ortamda 30 saniye süreyle yıkandı.

### **2.5.1.5. Voltametrik Ölçüm**

Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile 0.5M asetat tamponu içerisinde, +0.75 V dan +1.40 V a kadar, 15mV/sn tarama hızında, 50mV amplitütte ve 8mV adım potansiyeli uygulanarak hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. GPES yazılım sistemi ile okunabilir pikler haline dönüştürülen eğrilerden elde edilen pik yükseklikleri değerlendirildi.

### **2.5.1.6. PCR Ürünü ile Hibridizasyon**

1:10 oranında hibridizasyon tamponu(5X'lik sodyum salin sitrat tamponu-SSC) içerisinde seyreltilen 2 tanesi pozitif ve 2 tanesi negatif olan ürünler PCR tüplerine konuldu. 6dk. süreyle kaynar su banyosunda denatüre edildi. Grafit elektrotlar bu sıcak çözeltilere 30dk süreyle uygulandı ve adsorbsiyon yöntemiyle bağlanma sağlandı. 2X'lik sodyum salin sitrat tamponuyla 5sn. süreyle bağlanmayan oligonükleotitlerin uzaklaştırılması için yıkama yapıldı. İstenmeyen bağlanmaları azaltmak amacıyla 2X SSC tamponu içerisinde %0,01 oranında hazırlanmış sodyum dodesil sülfat (SDS) içinde uçlar 5dk. bekletilerek yıkandı. Sonrasında uçlar 30sn. Süreyle karışan ortamda 2X SSC tamponuyla tekrar yıkandı.

### **2.5.1. Voltametrik Ölçüm**

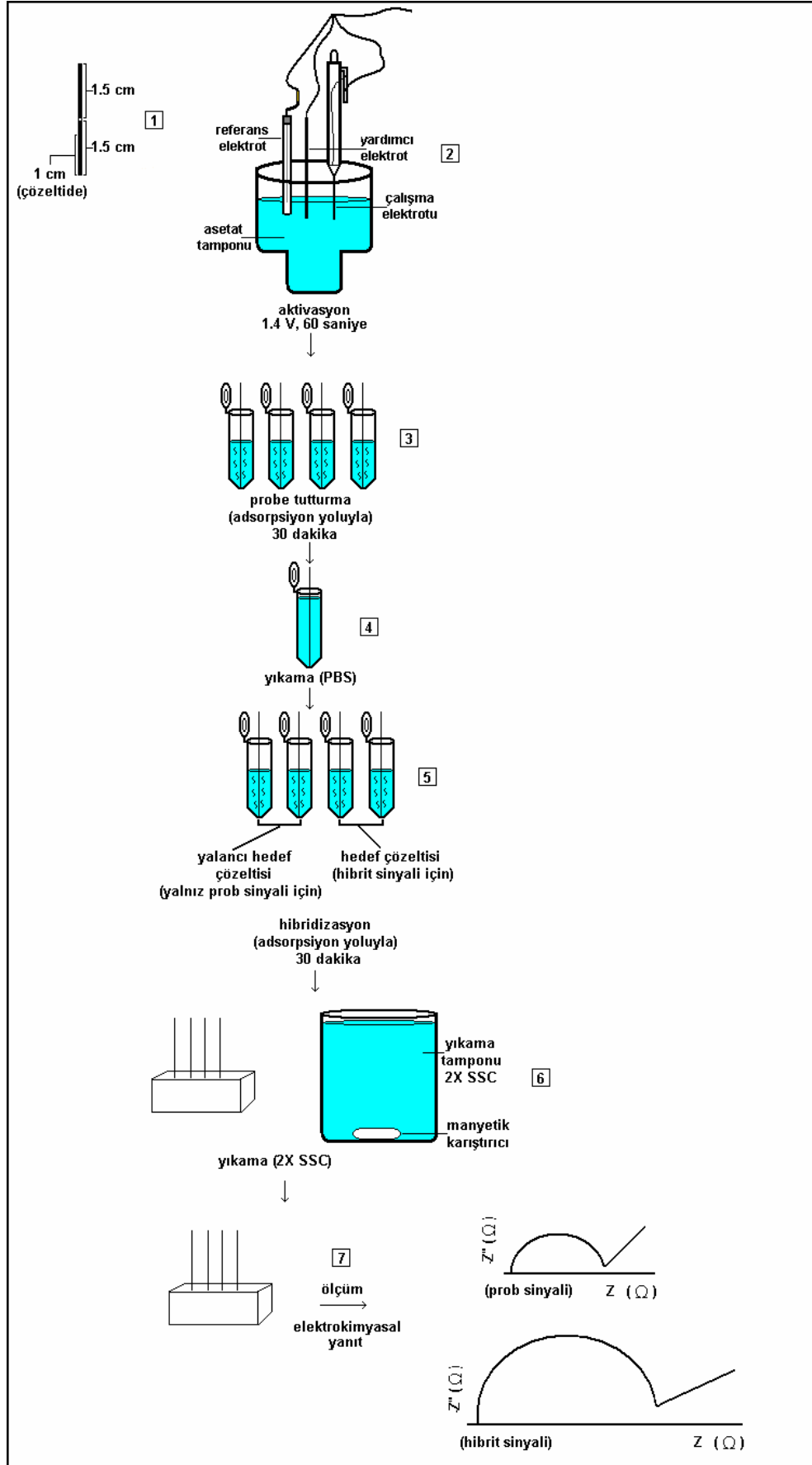
Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile 0.5M asetat tamponu içerisinde, +0.75 V dan +1.40 V a kadar, 15mV/sn tarama hızında, 50mV amplitütte ve 8mV adım potansiyeli uygulanarak hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. GPES yazılım sistemi ile okunabilir pikler haline dönüştürülen eğrilerden elde edilen pik yükseklikleri değerlendirildi.

## 2.5.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile İnfluenza

### A virüsünün tayini

Tasarlamış olduğumuz biyosensör ile İnfluenza virüs tip A'nın saptanması için kullanılan yöntem basamakları ve bu basamakların uygulanması için gerekli süreler aşağıdaki gibidir:

- Elektrot yüzeyinin aktive edilmesi, 60 sn.
- Prob tutturulması, 30 dk.
- Elektrotların PBS ile yıkanması, 15 sn.
- Hibridizasyon, 30 dk.
- Elektrotların PBS ile yıkanması, 30 sn.
- Ölçüm, 10 dk.



**Şekil 23:** İnfluenza A Virüsünün Epedimetrik teknik ile tayini

### **2.5.1.1. Elektrotların Hazırlanışı**

Çalışmamızda çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (Tombo 0.5mm HB, kalem ucu) kullanıldı. Kalem uçları 0.5mm çapında ve 60mm uzunluğunda olup deneysel koşullara uygun olması açısından 30mm boyunda kesilerek hazırlandı. Bu 30mm'nin 10mm'lik kısmı, çözelti içine daldırılacak şekilde bir elektrot tutacağı (Noki kalem model 2000, Japonya) içine yerleştirildi (28, 30, 45, 46, 78, 103, 104). Her bir parametre için farklı grafit yüzeyler kullanılarak, tek kullanımlık elektrot sistemi sağlandı.

### **2.5.1.2. Kalem Grafit Elektrodunun (PGE) Aktivasyonu**

PGE, 0.5M Asetat tamponu çözeltisine (pH: 4.8) daldırılarak, 60 saniye süreyle +1.4 V gerilim uygulandı. Buna bağlı olarak elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

### **2.5.1.3. Elektrot Yüzeyine Prob DNA Tutturulması**

Yüzeyi aktive edilmiş PGE, fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış olan 20µg/mL derişimde prob DNA çözeltisine 30 dakika süreyle daldırıldı ve adsorpsiyon yoluyla DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi fosfat tamponu ile yapıldı.

### **2.5.1.4. Sentetik Hedef Dizi ile Hibridizasyon**

Prob ile kaplı elektrot yüzeyleri, 20µg/mL derişimde sentetik hedef diziler ve rastgele seçilmiş diziler ile ıslak adsorbsiyon tekniği (29) kullanılarak 30 dakika süreyle etkileştirildi. Sonrasında istenmeyen bağlanmaları azaltmak amacıyla PBS tampon çözeltisiyle karışan ortamda 30 saniye süreyle yıkandı.

### **2.5.1.5. Empedimetrik Ölçüm**

Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile 5mM Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> çözeltisi içerisinde, 10kHz'den 90mHz'e kadar, 10mV amplitütte 0.24V sabit potansiyel uygulanarak, değişen frekans noktalarında hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen yüzey tabakasına bağlı direnç cevapları ölçüldü. FRA yazılım sistemi ile okunabilir pikler haline dönüştürülen eğrilerden elde edilen pik yükseklikleri değerlendirildi.

## **2.6. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanmasında İncelenen Parametreler**

### **2.6.1. Hibridizasyonun Saptandığı En Uygun Koşullar**

Yapılan çalışmaların tümü, influenza A virüsünün tayini için, en uygun hibridizasyon koşullarının saptanmasına yöneliktir.

Çalışma kapsamında prob diziler ile bu dizilere karşılık gelen sentetik hedef diziler ve tüm bazları hedeften farklı olan sentetik rastgele seçilmiş diziler hibridizasyona tabi tutulmuş ve alınan yanıtlar arasındaki farklanmadan yararlanılmıştır. Hibridizasyon sonrasında hedef dizi ile yüksek bir sinyal alınması beklenirken, rastgele seçilmiş dizi ile düşük bir sinyal alınması beklenir. Her iki dizi ile alınan yanıtların oranı biyosensörün seçimliliğinin göstergesidir.

### **2.6.1.1. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Çözelti Derişiminin Belirlenmesi**

Bu çalışmada, elektrot yüzeyine tutturulacak olan hedef ve rastgele seçilmiş dizi çözeltisinin artan derişimlerine karşı, sabit derişimdeki prob dizi ile hibridizasyonu sonrasında elde edilen guanin yanıtları diferansiyel puls voltametrisi tekniği kullanılarak belirtilen koşullarda incelendi. Artan hedef ve

rastgele dizi derişimleri olarak sırasıyla; 3–5–7–10µg/mL kullanıldı. Sabit probe derişimi 5µg/mL olarak tercih edildi. Hibridizasyon sonrasında alınan guanin yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle çalışmalar için en uygun hedef ve rastgele seçilmiş dizi derişimleri belirlendi.

#### **2.6.1.2. Prob Tutturma Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi**

Elektrot yüzeyinin prob dizi ile kaplanmasında tercih ettiğimiz uygulama süresi hibridizasyon işlemi üzerinde de etkili olmaktadır. Bu çalışmada elektrotlar, 5–10–15–20–30 dakika olmak üzere farklı sürelerde prob çözeltisi içerisinde etkileşime bırakıldı. Sentetik hedef ve rastgele diziler ile hibridizasyon sonrasında alınan guanin yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle çalışmalar için en uygun prob tutturma süresi belirlendi.

#### **2.6.1.3. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi**

Prob tutturulmuş elektrotlar, uygun hibridizasyon süresini tayin edebilmek için hibridizasyon basamağında, 5–10–15–20–30 dakikalık farklı sürelerde, sentetik hedef ve rastgele seçilmiş diziler ile hibridizasyona bırakıldı. Sonrasında alınan guanin yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle çalışmalar için en uygun hibridizasyon süresi belirlendi.

#### **2.6.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi**

Bu çalışmada prob tutturma ve hibridizasyon sonrasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen istem dışı bağlanma oranını en aza indirebilmek ve bu tip bağlanan dizileri ortamdan uzaklaştırabilmek için uygun yıkama süresini tayin etmek amacıyla 15–30–60–120–300 saniye olmak üzere farklı yıkama süreleri denendi. Bu basamağın sonucunda elde edilen en belirgin hedef–rastgele seçilmiş dizi ayırımının gerçekleştiği yıkama süresi belirlendi.

#### **2.6.1. PCR Ürünleri Kullanılarak İnfluenza A Virüsünün Tanısı**

PCR ile çoğaltılmış gerçek hedef diziler denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi. Herbiri prob dizi ile hibridizasyona tabi tutularak analizleri yapıldı. Negatif PCR ürünü içeren örneklerde, beklendiği gibi ilgili proba hibridizasyon sonucunda guanin yanıtı düşük olmuştur. Ortalama olarak 10nA'lık yanıt, örneğin negatif olduğunu ifade etmektedir. Bu değerin iki kat veya daha üstünde elde edilen guanin yanıtları örneklerin pozitif olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

## **BÖLÜM III**

### **BULGULAR**

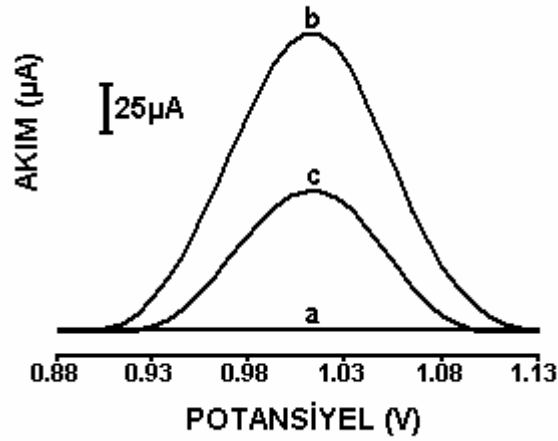
#### **3.1. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanması Çalışmasında Elde Edilen Bulgular**

##### **3.1.1. En Uygun Hibridizasyon Koşullarının Saptanmasına Ait Bulgular**

Bu çalışma kapsamında elde edilen her ölçüm sonucu, üç kez tekrarlanarak grafik ve voltamogramlara yansıtılmıştır.

##### **3.1.1.1. Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayini**

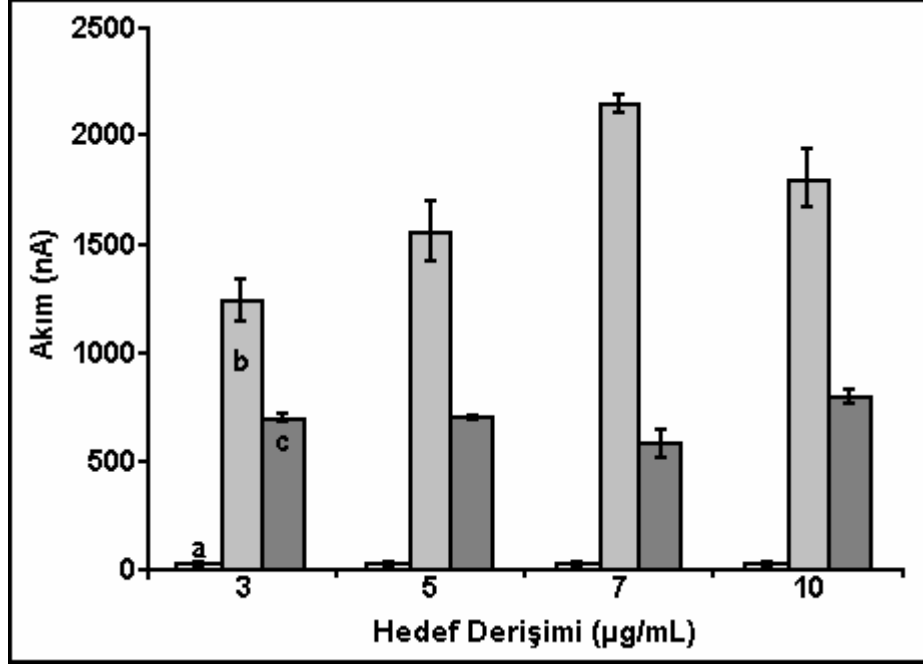
Geliştirilen biyosensör sistemiyle hibridizasyon tayinleri sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi. İnfluenza A Virüsünün tayini yapılacağından tek tip prob dizisi kullanıldı ve bu dizilerle gerekli hibridizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Tayinde prob ve ilgili hedef dizi arasında gerçekleşen hibridizasyon sonrasında elde edilen guanin yanıtları incelendi. Prob tutturulmuş biyosensör ile hedef dizinin yanı sıra, tüm bazları hedeften farklı olan rastgele seçilmiş diziler de etkileştirildi. Bu etkileşimlerin incelenmesi, biyosensör sisteminin seçimliliğinin araştırılması açısından gereklidir. Bu çalışmada, biyosensörün hedef diziyile en yüksek hibridizasyon yanıtlarını vermesi ve diğer dizi ile ise düşük yanıtlar vermesi beklendi.



**Şekil 24:** Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak prob tutturulmuş elektrot hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali.

### 3.1.1.2. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Çözelti Derişiminin Belirlenmesi

Bu çalışmada 5 µg/mL olan prob derişimi sabit tutularak hedef derişimi artırılmıştır. Prob, hedef ve rastgele dizilerle gerçekleştirilen bu deneylerde hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtlar şekil 25'de görülmektedir.



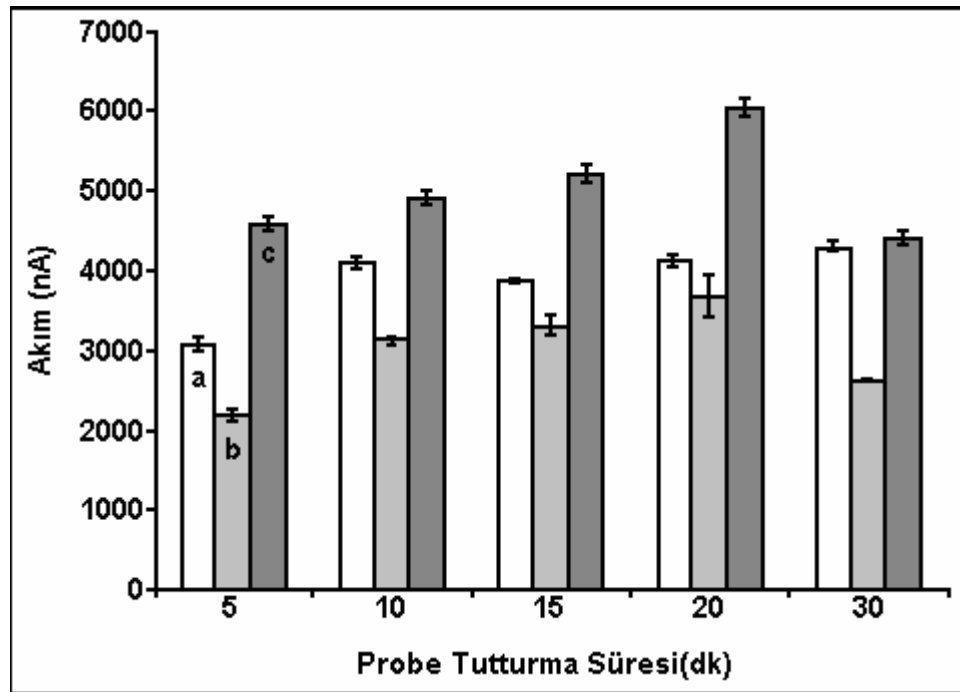
**Şekil 25:** Sabit derişimdeki (5µg/mL) prob dizisi ile artan derişimlerdeki hedefleri arasında gerçekleştirilen hibridizasyon sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile tüm bazları hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali.

Yapılan bu çalışmalarda tayinde kullanılabilecek en uygun hedef derişiminin bulunması amaçlanmıştır. Hibridizasyon için en uygun derişim 7µg/mL olduğu bulunmuştur.

### 3.1.1.3. Prob Tuturma Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Uygun prob tuturma süresinin saptanmasında prob ve ilgili hedefi arasındaki etkileşimin yanı sıra rastgele dizi ile olan etkileşimde incelenmiştir. Ayrıca uygunsuz bağlanmadan kaynaklanan bir guanin yanıtının alınıp alınmadığından emin olabilmek amacı ile guanin içermesinden ötürü hedef dizi prob dizi olarak kullanılmıştır. Buna bağlı

olarak bu çalışmada, biyosensörün hedef diziyle, yalnızca prob tutturulmuş olan ve yalancı hibridizasyona tabi tutulmuş olan elektrotlardan elde edilen yanıt oranla, en düşük hibridizasyon yanıtlarını vermesi ve diğer rastgele diziyle ise, yalnızca prob tutturulmuş olan ve yalancı hibridizasyona tabi tutulmuş olan elektrotlardan elde edilen yanıt ile aynı yükseklikte yanıtlar vermesi beklendi.

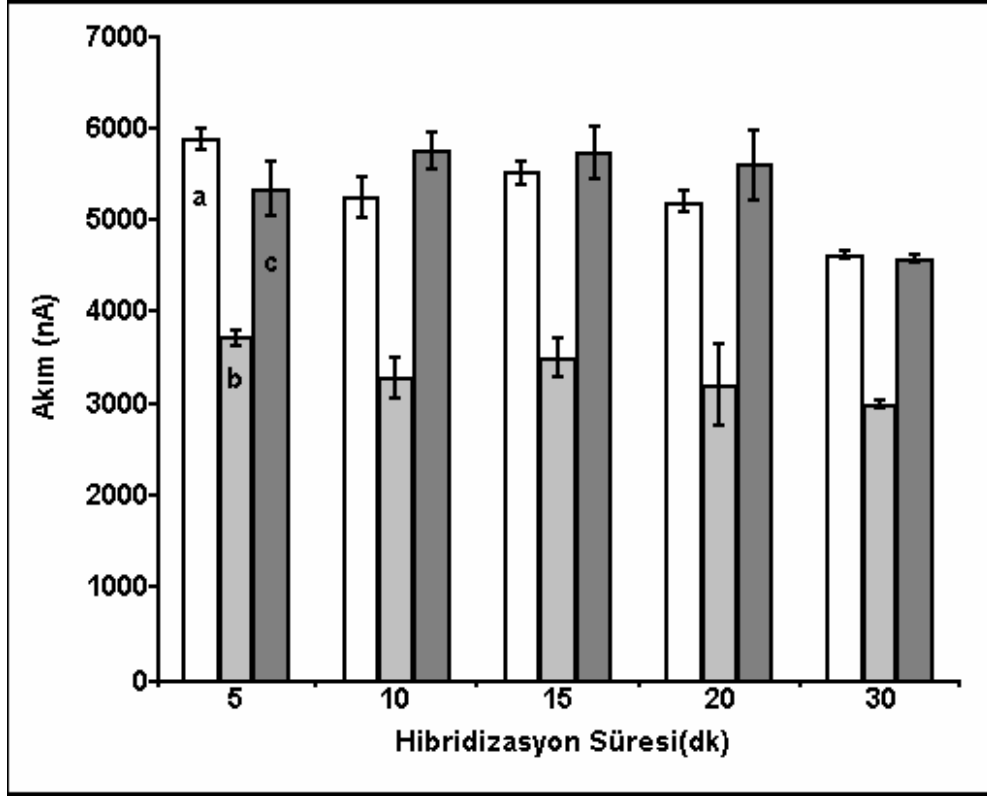


**Şekil 26:** Probe tuturma zamanının, hibridizasyona ve seçimlilik üzerine olan etkisinin incelenmesine ait grafik; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali.

Çalışma sonucunda 30 dakikalık sürenin en uygun prob tuturma süresi olduğu belirlenmiştir.

#### **3.1.1.4. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular**

Uygun hibridizasyon süresinin saptanmasında prob ve ilgili hedefi arasındaki etkileşimin yanı sıra rastgele dizi ile olan etkileşimide incelenmiştir. Ayrıca uygunsuz bağlanmadan kaynaklanan bir guanin yanıtının alınıp alınmadığından emin olabilmek amacı ile bir önceki basamakta olduğu gibi yine hedef dizi prob dizi olarak kullanılmıştır. Buna bağlı olarak hibridizasyon süresinin uygunluğunun ölçülmesinde, prob dizinin, kendisinin tam karşılığı olan hedef dizi ile verdiği hibridizasyon yanıtının en düşük seviyede, rastgele dizi ile verdiği hibridizasyon yanıtının ise yalnızca prob tutturulmuş elektrotlardan elde edilen yanıtla aynı büyüklükte olması esas alınmıştır. Çalışma sonucunda 30 dakikalık sürenin en uygun hibridizasyon süresi olduğu tespit edilmiştir.

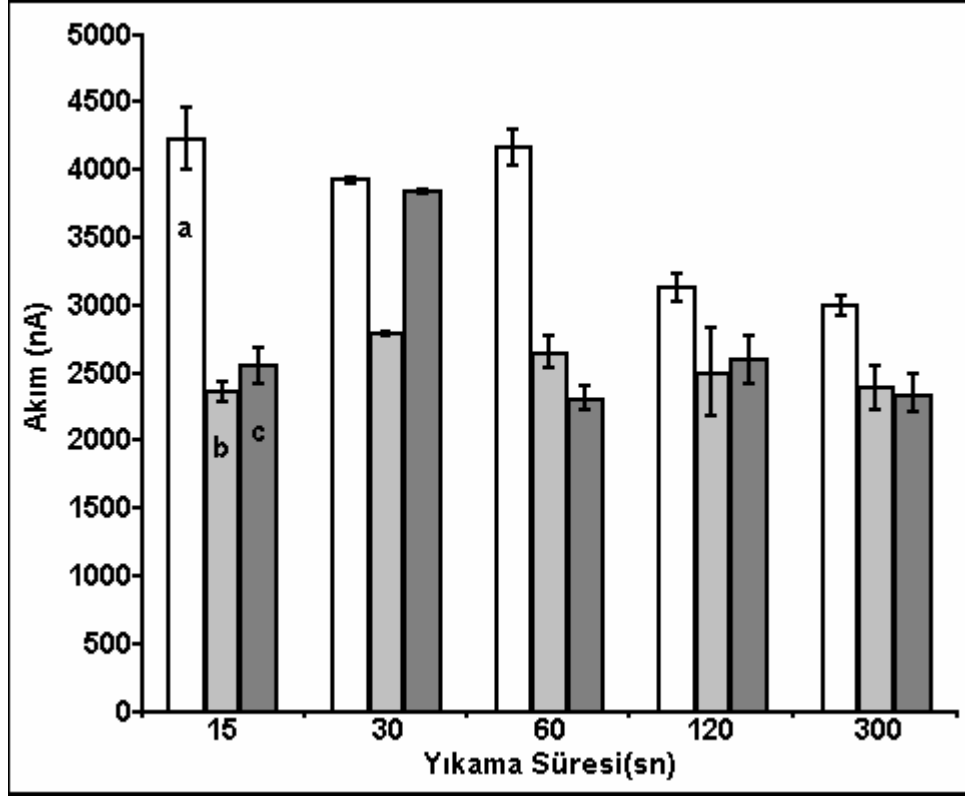


**Şekil 27:** Hibritleşme zamanının, hibridizasyon ve biyosensör seçimliliği üzerine olan etkisinin incelenmesine ait grafik; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali.

Çalışma sonucunda 30 dakikalık sürenin en uygun hibridizasyon süresi olduğu belirlenmiştir.

### 3.1.1.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Çalışmada istenmeyen bağlanmaların azaltılması amacıyla kullanılan yıkama çözeltisinin uygulanma süresinin biyosensör seçimliliğine olan etkisi araştırıldı.

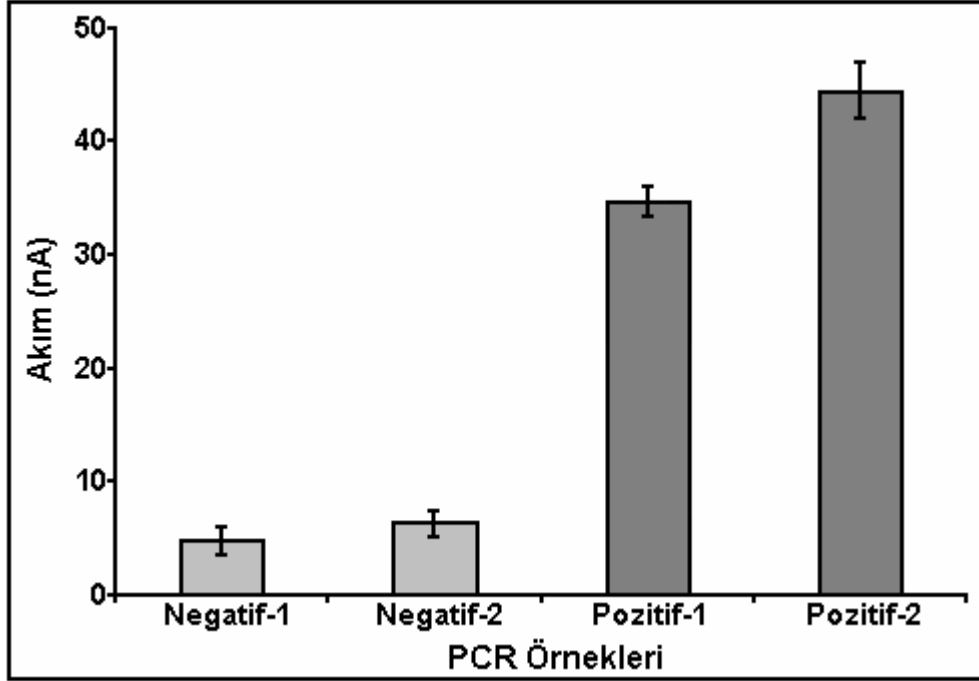


**Şekil 28:** Elde edilen hibritlerin yıkama çözeltisiyle zamana bağlı olarak yıkanmasını gösteren grafik; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali.

En uygun yıkama zamanının bulunması için yapılan çalışmada yıkama zamanının uygunluğunun ölçülmesinde önceki çalışmalardakine benzer olarak hedef dizi prob yerine kullanılmış yani tersine bir hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda prob dizinin, kendisine karşılık olan dizi ile verdiği hibridizasyon sinyalinin en düşük seviyede, rastgele dizi ile verdiği hibridizasyon sinyalinin ise en yüksek seviyede olması esas alınmıştır. Literatürde SSC'nin yıkama çözeltisi olarak kullanıldığı diğer çalışmalar incelenerek, SSC derişimi 2X olarak seçilmiştir. Bu çözelti ile 30

saniyelik yıkama süresinin, gerçekleştirilen deneylerde hibridizasyon sonrası gerekli ayırımın elde edilmesi açısından uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### 3.1.2. PCR Ürünleri Kullanılarak İnfluenza A Virüsünün Tanısına Ait Bulgular

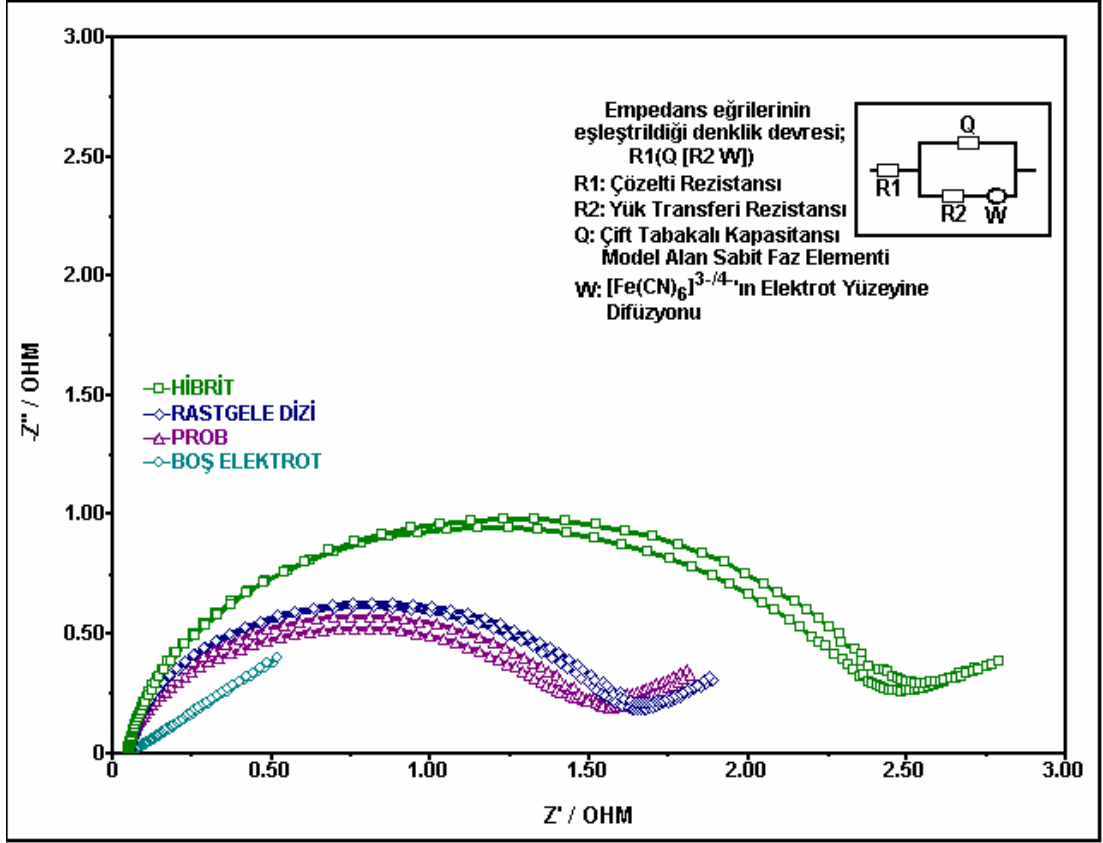


**Şekil 29:** Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak farklı PCR ürünlerinden elde edilen guanin sinyallerine dayalı grafik; ilk iki sütun negatif örnekleri, son iki sütun ise pozitif örnekleri belirtmektedir.

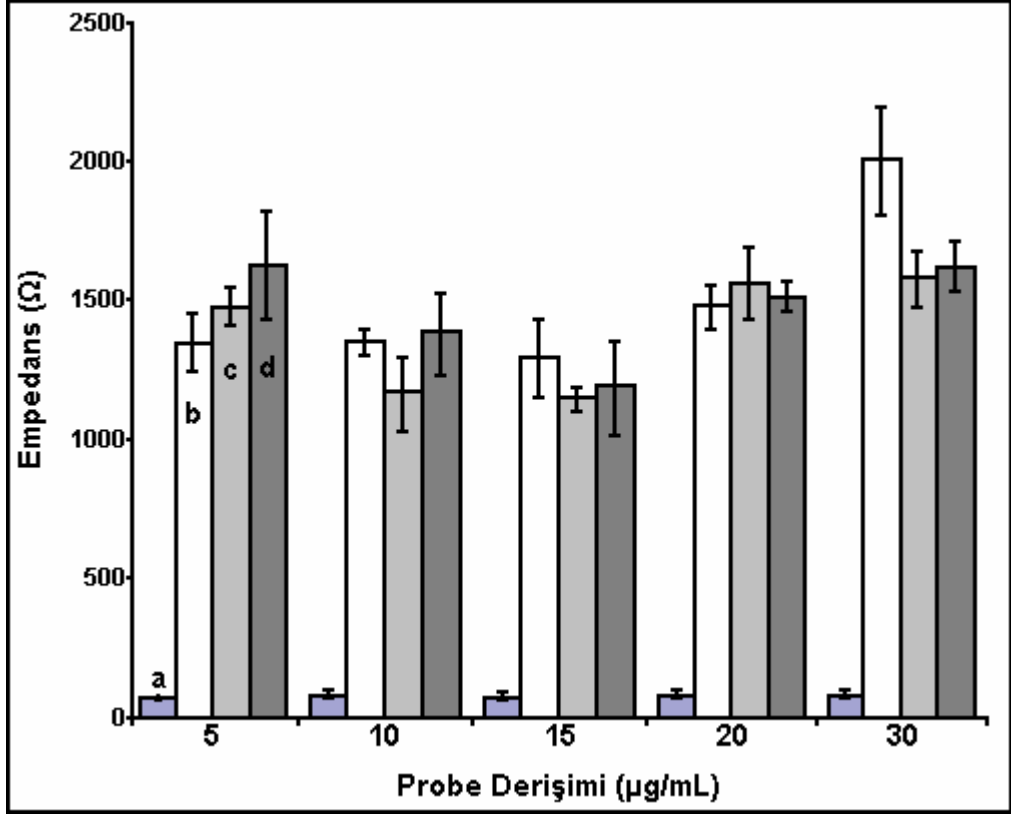
Çalışma sonucunda negatif PCR ürünü içeren örneklerde, beklendiği gibi ilgili proba hibridizasyon sonucunda guanin yanıtı düşük olmuştur. Ortalama olarak 10nA'lık yanıt, örneğin negatif olduğunu ifade etmektedir. Bu değer iki kat veya daha üstünde elde edilen guanin yanıtları örneklerin pozitif olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

### 3.2. EIS İle İnfluenza A Virüsünün Tanısına Ait Bulgular

Şekil 26'da, İnfluenza A Virüsünün tayinine ait nyquist eğrisi ve bu eğriye uygulanan denklik devresi gösterilmektedir. Bu yöntemde diğer çalışmalarda da uygulanan en uygun hibridizasyon basamakları farklı derişim ve sürelerde olmak koşuluyla aynı şekilde uygulanmıştır. Çalışmanın diferensiyal puls voltemetrisinden farklı olan tek basamağı ölçüm basamağıdır. Bu yöntemde sinyal potansiyeli incelenerek 0.24 volt olarak belirlenmiş olan  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  iyonik çözeltisi içerisinde ölçüm gerçekleştirilmiş ve sabit potansiyel, değişen frekans aralığında farklı elektrot yüzey tabakalarının iyonik ortama karşı gösterdiği direnç eğrileri ölçülerek değerlendirilmiştir. Gerekli frekans aralığı olarak, kullanılan tampon ve elektrot yüzeyi kalınlığına bağlı en uygun aralık olan  $10^6\text{Hz} - 5 \times 10^{-3}\text{Hz}$  seçilmiştir. Ayrıca uygun prob ve hedef dizi derişimleri de incelenmiştir, bu çalışmalara ait sonuçlar şekil 31 ve şekil 32'de gösterilmektedir. Ölçümde kullanılan  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  çözeltisi için literatürden yararlanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen eğriler ve grafikler beklenen hibridizasyonun gerçekleşmiş olduğunu gösterdi.

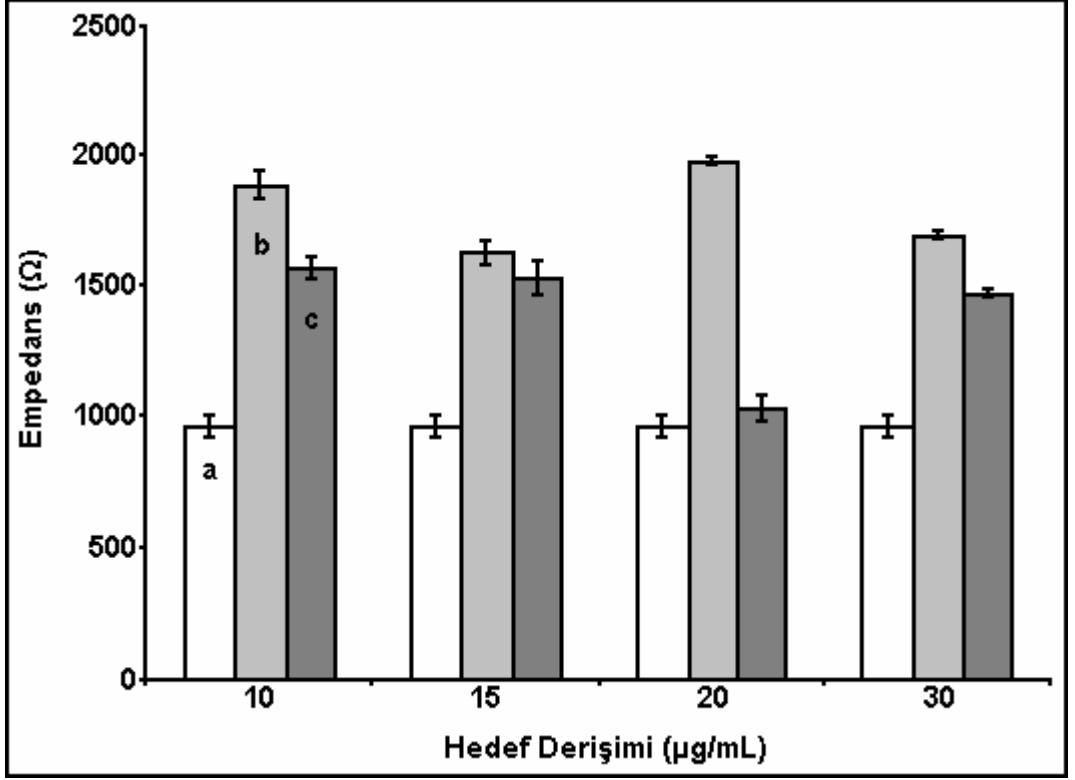


**Şekil 30:** İnfluenza A Virüsünün empedans yöntemiyle tayinine ait nyquist eğrisini ve bu eğriye uygulanan empedans denklik devresi.



**Şekil 31:** Empedans yöntemiyle yapılan çalışmada probe derişiminin incelenmesini gösteren grafik; **a)** yüzeyi boş elektrot **b)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **c)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **d)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen empedans eğrilerine ait değerler.

Çalışma sonucunda; yalnızca probdan elde edilen eğrinin hibritten elde edilen eğriye oranla daha küçük ve rastgele dizi ile etkileşimden elde edilen eğrinin ise yalnızca prob diziden elde edilen eğri ile aynı büyüklükte olması beklendi. Buna bağlı olarak uygun prob derişimi 20 µg/mL olarak gözüksede, diğer derişimlerde ortaya çıkan tutarsız farklanmalar nedeniyle bu yöntemin DNA ve benzeri küçük moleküllü ve çabuk bozunan biyolojik yapılarla çalışılması açısından uygun olmadığı bulundu.



**Şekil 32:** Empedans yöntemiyle yapılan çalışmada hedef derişiminin incelenmesini gösteren grafik; **a)** yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) **b)** prob-hedef hibridizasyonu sonrasında **c)** prob ile rastgele seçilmiş dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen empedans eğrilerine ait değerler.

Çalışma sonucunda; yalnızca probdan elde edilen eğrinin hibritten elde edilen eğriye oranla daha küçük ve rastgele dizi ile etkileşimden elde edilen eğrinin ise yalnızca prob diziden elde edilen eğri ile aynı büyüklükte olması beklendi. Buna bağlı olarak uygun hedef derişimi 20  $\mu\text{g/mL}$  olarak gözüksede, diğer derişimlerde ortaya çıkan tutarsız farklanmalar nedeniyle bu yöntemin DNA ve benzeri küçük molekülü ve çabuk bozunan biyolojik yapılarla çalışılması açısından uygun olmadığı bulundu.

## IV. BÖLÜM

### TARTIŞMA

#### 4.1. İnfluenza A Virüsünün Elektrokimyasal Yoldan Saptanması Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

İnfluenza A virüsü önemli derecede morbidite, mortalite ve finansal yük ile sonuçlanan solunum sistemi enfeksiyonlarının en büyük nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir buna bağlı olarak bu virüs ile enfekte olmuş hastalarda, virüsün klinik olarak hızlı tayininin yapılması oldukça önemlidir.

Bu virüsün tanısına yönelik çok sayıda klinik ve moleküler teknik mevcuttur. Bu tekniklerden bazıları; kültür, IF, Serolojik Serum(HI/CFT), hibridizasyon, PCR, multiplex PCR, PCR-EIA, real-time PCR, NASBA ve mikroçipler olarak sayılabilir. Her bir teknik avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlara da sahiptir (3, 88).

Tez çalışmamızda hibridizasyona yönelik DNA biyosensör tasarımı amaçlanmış ve sistem geliştirilirken beraberinde oluşabilecek dezavantajları en az seviyeye indirebilmek için bir takım parametreler göz önünde bulundurulmuştur. Bu parametrelerden en önemlileri geliştirilen biyosensörün sırasıyla; hassas, yüksek seçicilikte, kısa süreli tayinler gerçekleştirebilen ve maliyeti düşük bir sistem şeklinde olmasıdır.

İşaretleme-siz hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan biyosensör ile A tipteki İnfluenza virüsünün, matriks genine özgü prob tasarımına bağlı tayini; diferansiyel puls voltametri tekniğiyle guanin

yükseltgenme sinyalindeki değişimler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Tayinde hibridizasyon öncesinde biyosensör yüzeyine yalnızca gen haritasından seçilen bölge(prob) tutturulmuş ve inozinli prob dizilerle yapılan çalışmalarda beklenildiği gibi çok düşük sinyaller alınırken, guaninli prob dizilerle yapılan çalışmalarda ise beklenildiği gibi yüksek sinyaller elde edilmiştir. Elektrot yüzeyinin taranması sırasında, yaklaşık +1.00 V civarında (99) guanine ait pikin ortaya çıkışı, hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Guanin bazının yükseltgenme sinyalindeki değişimler elektrot yüzeyine tutturulan prob dizinin niteliğine bağlı olarak örnekte İnfluenza A virüsüne özgü dizinin bulunup bulunmadığına ilişkin bilgi vermiştir. Böylece geliştirilen sistem, örneğin alındığı bireyle ilgili olarak pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna dair yorum yapabilme imkanı sağlamıştır. Ayrıca tayinde kullanılan diferansiyel puls voltametri tekniği, diğer elektrokimyasal teknikler ile kıyaslandığında daha düşük tayin sınırına sahip bir analiz sağlamıştır (83).

İnfluenza A virüsü gibi bir RNA virüsü olan ve bulaşıcı viral hastalıklara sebebiyet veren HIV ve benzeri bazı virüsler için alternatif akım voltametri, altın çip yüzeyi ve PCR ile çoğaltılmış ürünler kullanılarak başarılı tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir (98). İnfluenza A virüsünün tayini için sentetik DNA dizilerinin veya PCR ürünlerinin kullanıldığı elektrokimyasal çalışmalar rapor edilmiştir. Andrey ve arkadaşları tayin için mikroçiplerden, redoks aktif kimyasallardan, streptavidin ve biotin işaretili oligonükleotidlerden yararlanmışlardır. Buna bağlı olarak İnfluenza A virüsünün tayini için tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz biyosensörün herhangi bir işaretleme basamağı ve hibridizasyon indikatörü içermemesi nedeniyle daha ekonomik ve daha hızlı sonuç vermesi en önemli yararlarıdır. İndikatöre dayalı

çalışmalarda deneysel işlemler açısından ekstra süreye ihtiyaç duyulmaktadır (26, 27, 41, 51, 69, 76).

Çalışmamızda sentetik dizilerle gerçekleştirilen bölümde hibridizasyon tayini gerçekleştirilerek, biyosensör sisteminin çalışması incelenmiştir. İlgili prob dizisiyle hibridizasyon sonucunda ortaya çıkan guanin sinyalindeki değişimler üzerinden, özgün hedef dizinin elektrot yüzeyine bağlanıp bağlanmadığı tayin edilmiştir. Geliştirilen biyosensör, prob ve hedef dizi arasında meydana gelen hibridizasyondan sonra yalnızca probtan elde edilen sinyale oranla daha düşük guanin yanıtını vermiştir. İstenmeyen bağlanmaların azaltılması için SSC ve SDS çözeltilerinin belli oranlardaki karışımı kullanılmıştır. Bu sayede problemler kendilerinin tam karşılığı olan dizilerle eşleştiklerinde en düşük guanin yanıtları elde edilmiş, rastgele seçilmiş dizilerle eşleşme sonucunda ise elde edilen yanıt artmıştır.

Çalışmada hastalardan elde edilen PCR ürünlerinin tayini yapılmadan önce, sentetik dizilerle gerekli en uygun hibridizasyon koşullarının saptanması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En uygun hedef dizi derişiminin belirlenmesi çalışmasında artan derişimlerde sentetik hedef dizi çözeltileri kullanılmıştır. Elektrot yüzeyinde prob ve hedef arasında gerçekleşen hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtlar değerlendirilerek, en uygun derişimi 7µg/mL olarak bulunmuştur. En uygun prob tutturma, hibridizasyon ve yıkama süresi tayinlerinde, birbirlerinin tam karşılığı olan dizilerle elde edilen yanıtların düşük olması, rastgele seçilmiş dizilerle elde edilen yanıtların ise aynı koşullarda yüksek olması esas alınmıştır. Mümkün olan en belirgin ayrımın sağlandığı koşullar en iyi tayin koşulları olarak belirlenmiştir. En uygun hedef derişimi olan 7µg/mL ile en uygun prob tutturma ve

hibridizasyon süreleri 30'ar dakika, istenmeyen bağlanmaların azaltılması için en uygun yıkama süresi ise sentetik dizilerle 30 saniye, gerçek PCR ürünleriyle 5 dakika olarak bulunmuştur.

En uygun hibridizasyon koşullarının saptanması çalışmalarında belirlenen deneysel parametreler kullanılarak hedef karışımlarını içeren gerçek örneklerle de tayinler yapılmıştır. Bu tayin hastalardan elde edilen örneklerde ilgili gen bölgesinin karşılığının olup olmadığına bağlı olarak virüsün tanısı amacını taşımaktadır. Deneyler tasarımı yapılan biyosensörün tayinlerdeki etkinliğini göstermiştir.

Hasta ve sağlıklı bireylerden elde edilen 4 PCR ürünüyle hibridizasyon çalışması gerçekleştirildi. İnfluenza A virüsünü tanıyan proba PCR ürünü arasında tam eşleşme gerçekleştiğinde, en düşük guanin sinyali elde edilmiştir. Buna bağlı olarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ayrıca EIS ile analizler yapılmıştır. Empedimetrik teknik ile sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda hücre içindeki akım ölçümüne bağlı olarak elde edilen empedans değerlerine bağlı analizler yapılarak voltametrik yöntemlerle kıyaslanmıştır. Steichen ve arkadaşlarının (26) DNA dizileriyle bağlantılı olarak yaptığı çalışmalara kıyasla daha tekrarlanabilir özellikte sonuçlar alınmış olmasına rağmen elde edilen verilerdeki bir takım açıklanamayan düzensizlikler nedeniyle bu yöntemin DNA dizi çalışmalarına çok fazla uygun olmadığına karar verilmiştir.

## V.BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada tez kapsamında yer alan çalışmalara uygun olarak; hem insanlarda hem de kanatlı hayvanlarda bir takım akut üst solunum yolları enfeksiyonlarına sebebiyet veren ve ölümcül olabilen İnfluenza A virüsünün tanısını gerçekleştirimek üzere elektrokimyasal biyosensörler tasarlandı. Tasarlanan biyosensörde tek kullanımlık kalem grafit elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı.

Bu amaçla tasarlanan biyosensörde, İnfluenza A virüsünün elektrokimyasal olarak tanısı, diferensiyal puls voltametri tekniği kullanılarak DNA'daki guanin bazının yükseltgenme yanıtı üzerinden hızlı, ekonomik, güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde gerçekleştirildi.

En uygun hibridizasyon analizinin yapılabilmesi için en uygun koşullar sentetik oligonükleotid dizileri kullanılarak gerçekleştirildi. Çözeltilerin en iyi bağlanma süreleri belirlendi. Hibridizasyon analizi için çeşitli basamaklarda kör çözeltiler ve rastgele seçilmiş diziler kullanılarak analizin güvenilirliği sağlandı.

İnfluenza A virüsünün diferensiyal puls voltametri tekniği kullanılarak işaretsiz hibridizasyona dayalı tayinini desteklemek için aynı en uygun hibridizasyon koşullarının saptanması ve derişim çalışmaları elektrokimyasal empedans spektroskopisine (EIS) dayalı biyosensörlerle de uygulandı ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu yöntemin DNA gibi küçük ve bozunabilir özellikteki biyolojik yapılar için uygun olmadığı gözlemlendi.

Bu çalışmanın yararları; harici hibridizasyon indikatörü kullanımını ortadan kaldırması, analizde kullanılan kalem grafit elektrot yüzeyinin kolaylıkla yenilenebilmesi, tayin süresinin kısa olması, hassas ve seçimli tayinlerin gerçekleştirilmesidir. Ayrıca geliştirilen bu biyosensör sistemleri hasta başı analizlerde kullanılmak üzere mikro-üretim teknolojisine uygulanabilir alt yapıya da sahiptir.

Sonuç olarak tez kapsamında belirtilen amaçlar büyük ölçüde gerçekleştirilmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarımnda, diğer hastalıkların ve hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların tanısına yönelik biyosensörlerin tasarımını ve mikroorganizmaların EIS tekniğine uygulanabilirliğini daha da geliştirerek devam etmeyi planlamaktayım.

## ÖZET

### İNFLUENZA A VİRÜSÜNÜN TANISINA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖR TASARIMI

Bu çalışmada, işaretli DNA hibridizasyonuna dayalı elektrokimyasal bir biyosensör tasarımı yapıldı.

Çalışmada gerçekleştirilen biyosensör, İnfluenza A virüsünün tanısına yönelik olarak tasarlandı. Çalışmada tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanıldı. Prob diziler elektrot yüzeyine ıslak adsorpsiyon yöntemiyle tutturuldu. Biyosensör tasarımında; hedef derişimi, hibridizasyon süresi, hibridizasyon sonrası sensör yüzeyinin yıkanma süresi, sensör seçimliliği ve tekraralanabilirlik gibi çeşitli parametrelerin tayine olan etkileri incelendi.

Voltametik teknikte asetat tamponu (pH: 4.8) içerisinde gerçekleştirilen ölçümlerde, elektrot yüzeyinde hibridizasyondan önce daha yüksek yanıt (guanin yükseltgenme sinyali) alınırken, hedef dizi ile hibritleşme sonrasında elde edilen yanıtın daha düşük olduğu gözlenmiştir. Prob dizinin rastgele seçilmiş dizilerle ile hibridizasyonu ile elde edilen yanıtların ise yalnızca prob diziden elde edilen yanıtlarla hemen hemen aynı düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Empedimetrik teknikte  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen ölçümlerde elektrot yüzeyinde hibridizasyondan önce alınan yanıtın (elektrot yüzeyinin gösterdiği direnç), prob dizi ile hedef dizinin hibritleşmesinden sonra alınan yanıtla oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Rastgele

seçilmiş olan diziler ile hibritleşme sonrasında elde edilen yanıtların ise yalnızca prob diziden elde edilen yanıtlarla hemen hemen aynı değerde olduğu gözlenmiştir. Bu sistem de mantık; elektrot yüzeyinin kalınlaşmasına bağlı direnç artımından kaynaklanan yanıt yükselmesi şeklindedir. İki teknikte kullanılan kalem elektrot yüzeyinin kolayca yenilenebilir olması, kalem elektrot sisteminin çoklu analizlerde uygulanabileceği hatta mikroçip cihaz üretiminde kullanılabileceği fikrini akıllara getirmiştir. Tasarımı yapılan biyosensör ile kısa sürede gerçekleştirilen virüs kaynaklı hastalık tanısı klasik tanı yöntemlerine farklı bir alternatif getirmiştir.

Böylece İnfluenza A virüsünün tanısı tasarlanan elektrokimyasal biyosensörlerle gerçekleştirilmiştir.

## ABSTRACT

### DESIGN OF ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF INFLUENZA A VIRUS

In this study; a label-free DNA hybridisation based electrochemical biosensor has been designed.

Biosensor is designed for the determination of the influenza A virus. Disposable pencil graphite electrodes (PGE) were used in the study. Probe sequences were attached on to the electrode surface by using wet adsorption method. At the biosensor design, various parameters as target concentration, hybridisation time, washing time, sensor selectivity and repeatability effects on detection were investigated.

By using voltammetric technique, from the measurements realized in ACB buffer (pH: 4.8), The response of the probe modified PGE were higher while compare with the signals which were obtained after hybridization. And the response of the probe modified PGE which was interacted with a non-complementary sequence resulted in same as probe modified PGE signals and proved the specificity of the hybridization with target.

By using impedimetric technique, unlabeled DNA probe sequences related to the influenza type A virus and its complementary target sequences were detected by monitoring the changes in surface impedance of the PGE, before and after hybridization process. The analysis of the hybridization behaviour was realised in the presence of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . After addition of the

complementary oligonucleotide to the ssDNA (probe) modified PGE electrode, an increase of the electron transfer resistance ( $R_{ct}$ ) was observed. The response of the probe modified PGE which was interacted with a non-complementary sequence resulted in same as probe modified PGE surface impedance and proved the specificity of the hybridization with target. Disposable pencil graphite electrode surfaces are advantageous for both technique.

At the end of the studies, in the development of new technologies capable of better identifying viral pathogens, a sensitive, low-cost, fast and reliable electrochemical based biosensor system has been achieved for determining Influenza Virus A.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Alvarez-Lueje, A., Braiin-Isasi, S., Nunez-Vergara, L.J., Squella, J.A. (2007). Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets, *Talanta*.
2. Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D. A., West, D.A., Holler, F.J., Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
3. Andrey, L., Ghindilis, A., Smitha, Maria W., Kevin, R., Schwarzkopfa, Kristian M., Rotha, Kia Peyvana, Munroa, Sandra B., Lodesa, Michael J., Stövera, Axel G., Bernardsa, K., Dilla, K. and McSheaa A. (2007). CombiMatrix oligonucleotide arrays: Genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10): 1853-1860.
4. AUTOLAB User Manual (2005). Eco Chemie, The Netherlands.
5. Bard, A.J. (1983). Chemical modification of electrodes, *J. Chem. Edu.*, 60: 302-304.
6. Barry, J.P., Barry, J.P., Norwood, C., Vouros, P., (1996). Detection and identification of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis- electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 1432-1438.
7. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V. , Turro, N.J., “ Binding modes and base spesificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tunning the stereoselectivity” , *J. Am. Chem. Soc.*, 108, (1986), 2081-2088.
8. Bej, A.K. (1996). Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and

strategies, *Nucleic acid analysis: principles and Bioapplications*, Editörler; Dangler, C.A., Wiley-Liss Inc., s. 1-29.

9. Bertino, J.R. (1992). *Antineoplastic Drugs*, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C.M. and Reynard, A.M., Section IX - Cancer Chemotherapy; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
10. Brabec, V., Koudelka, J. (1980). Oxidation of DNA at carbon electrodes the effect of the quality of the DNA sample, *J. Electroanal. Chem.*, 116: 793-805.
11. Brett, A.M., Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 861-867.
12. Brett, C.M.A., Brett, A.M.O. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, 3.baskı.
13. Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E. (1996). Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids, *Electroanalysis*, 8 (8-9): 753-758.
14. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997). Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.
15. Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7528-7530.
16. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J. (1989) Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris chelated complexes

of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2, 2'-Bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8901-8911.

17. Chiti, G., Marazza, G., Mascini, M. (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 427: 155-164.
18. Collins, F.S., Patrinos, A., Jordan, E. , Chakravarti, A. Gesteland, R., Walters, L. and the members of the DOE and NIH planning groups, "New goals for the U.S. Human Project: 1998-2003", *Science*, 282, (1998), 682-689.
19. Coulet, P. R., "What is a Biosensor?", Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet,(1991), Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
20. Deforce, D.L.D., Ryniers, F.P.K., Van den Eeckhout, E.G., Lemièr, F. Esmans, E.L.(1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 3575-3584.
21. Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53, *Science*, 274: 430-432.
22. Dervan, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2, Editörler; Eckstein, F. And Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s. 49-64.
23. Dervan, P.B., " Design of Sequence-specific DNA-binding molecules", *Science*, 232, (1986), 464-471.

24. DNA structure and Function (1994). Chapter 1: Introduction to the structure, properties, and reactions of DNA; Editör, Sinden, R.R., Academic Press, California, s. 1-57.
25. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç (1993). Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384.
26. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis*, 11: 586-588.
27. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta*, 422: 139-149.
28. [Erdem, A.](#), [Ariksoysal, D.O.](#), [Karadeniz, H.](#), [Kara, P.](#), [Sengonul, A.](#), [Sayiner, A.A.](#), [Ozsoz, M.](#) (2005). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Elect. Com.*, 7 (8): 815-820.
29. Erdem, A., Isabel Pividori, M., Del Valle, M., Alegret, S. (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567: 29-37.
30. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M. (2003). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-7.
31. Erdem, A., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor based

- on drug interactions, *Electroanal.*, 14 (14): 965-974.
32. Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Dalbastı, T. and Ozsoz, M. (1999). Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanalysis*, 11: 1372-1376.
33. Evans, A. (1991). *Potentiometry and ISE*, ACOL, London, s. 106-198.
34. Fojta, M., Doffkova, R., Palecek, E. (1996). Determination of traces of RNA in submicrogram amounts of single- or double-stranded DNAs by means of nucleic acid-modified electrodes, *Electroanalysis*, 8(5): 420-426.
35. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T. (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934.
36. Hodgson, J. , “ Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future”, *Nature Biotech.*, 16, (1998), 725-727.
37. Hogue, C.(2000). Identifying carcinogens, *Chem.&Eng. News*, 76: 8-9.
38. Jelen, F., Erdem A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, 55: 165-167.
39. Johnston, D.H., Glasgow, K.C., Thorp, H.H. (1995). Electrochemical Measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 8933-8938.

40. Johnston, D.H., Thorp, H.H.; " Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics"; J. Physc. Chem., 100, (1996), 13837-13843.
41. Ju, H. X., Ye, Y. K., Zhao, J. H., Zhu, Y. L. (2003). Hybridisation biosensor using di(2-2'bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA, Anal. Biochem., 313: 255.
42. Ju, H., Zhou, J., Cai, C., Chen, H. (1995). The electrochemical behavior of methylene blue at a microclinder carbon fiber electrode, Electroanal., 7: 1165-1170.
43. Kara, P., Cavdar, S., Berdeli, A., Ozsoz, M. (2007). Electrochemical genoassay design for allele-specific detection of toll-like receptor-2 gene polymorphism, Electroanalysis, 19(18):1875-1882.
44. Kara, P., Cavdar, S., Meric, B., Erensoy, S., Ozsoz, M. (2007). Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases, Bioelectrochemistry, (71):204-210.
45. Kara, P., Erdem, A., Girousi, S., Ozsoz, M. (2005). Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (38):191-195.
46. Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M. (2004). Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes

simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Anal.*

*Chim. Acta* 518 (1-2): 69-76.

47. Kara, P., Ozkan, D, Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Ozsoz, M. (2002). DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridisation label, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710-716.
48. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli, G. And Ozsoz, M. (2003). Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336 (1-2): 57-64.
49. Karadeniz H., Gulmez B., Sahinci F., Erdem A., Irem Kaya G., Unver N., Kivcak B., Ozsoz M. (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 295-302.
50. Kelley, S. O., Barton, J.K. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, 8: 31-37.
51. Kelley, S. O., Boon, E. M., Barton, J. K., Jackson, N. M., Hill, M. G. (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids. Res.*, 27: 4830-4837.
52. Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 9861-9870.

53. Kelley, S. O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G. (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids Res.*, 27: 4830-4837.
54. Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y.S., Giannoula, K., Mikkelsen, S.R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay, *Anal. Chem.*, 68: 1197-1200.
55. Kuhr, W.G. (2000). Electrochemical DNA analysis comes of age, *Nature Biotech.* 18: 1042-1043.
56. Labuda J., Buckova M., Heilerova L., Caniova-Ziakova A., Brandsteterova E., Mattusch J., Wennrich R. (2002). Voltammetric detection of antioxidative properties of flavanoids using electrically heated DNA modified Carbon Paste Electrode, *Sensors*, 2: 1-10.
57. Likhitwitayawuid K., Angerhofer C.K., Chai H., Pezzuto J.M., Cordell G.A. (1993). Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*, *J. Nat. Prod.*, 56: 1331-1338.
58. Liu J., Li J., Dong S., *Electroanalysis*, 8, (1997), 256-264.
59. Liu, J., Abid, S., Hail, M.E., Lee, M.S., Hangeland, J., Zein, N. (1998). Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions, *Analyst*, 123: 1455-1459.
60. Liu, S., Ye, J., He, P. ve Fang, Y. (1996). Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, *Anal. Chim. Acta*, 335: 239-243.
61. Lucarelli, F., Palchetti, I., Maraza, G., Macsini, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection

- of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.
62. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982). Electrochemistry of Osmium-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70.
63. Lumbey-Woodyear, T., Campbell, C.N., Freeman, E., Freeman, G., G.Heller, A. (1999). Rapid amperometric verification of PCR amplification of DNA. *Anal. Chem.*, 71: 535-538.
64. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.
65. Mascini, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73: No. 1, pp.23-30.
66. McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P. ve Linn, C.P. (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A-668 A.
67. Mearns, F.J. (2006). A study of hybridisation of DNA immobilised on gold: strategies for DNA biosensing, *Doktora Tezi*.
68. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' di-hydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 (4): 1339-1346.
69. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor for the

detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.

70. Mikkelsen, S.R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
71. Millan, K.M., Mikkelsen, S.R.(1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65: 2317-2323.
72. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., "Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode", *Anal. Chem.*, 66, (1994), 2943-2948.
73. Millan, K.M., Spurmanis, A. J., Mikkelsen, S.R.(1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes, *Electroanalysis*, 4: 929-932.
74. Molinier-Jumel, C., Malfroy, B., Reynaud, J. A. and Aubel-Sadron, G. (1978). Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(2): 441-449.
75. Motti, C., Dainese, E., Macsini, M., Minnuni, M., De Santis, P., Cozzani, I. (2000). The use of biotechnology in agriculture and the methods for the detection of genetically modified organisms (GMOS) in food, Meeting of the Italian Biochemical Society, sözlü bildiri.
76. Ozkan D Erdem A Kara P Kerman K Gooding JJ, Nielsen P E, Ozsoz M. (2002). Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylen blue on self-assembled alkanethiol

- monolayer modified gold electrodes. *Electrochem. Commun.*, 4: 796-802.
77. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M. (2002). Allele specific genotype detection of Factor V Leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Analytical Chemistry*, 74: 5931-5936.
78. Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Erken, H., Taylan, M. (2003). Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.
79. Palecek, E. (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
80. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.
81. Palecek, E. (2002). Past, presence and future of nucleic acids electrochemistry, *Talanta*, 56: 809-821.
82. Palecek, E. (1994). Probing of DNA structure with osmium tetroxide complexes in vitro and in cells, Editörler; F. Eckstein ve D.M.J. Lilley, *Nucleic acids and Molecular Biology*, Vol. 8: Springer-Verlag Berlin, 1994, 1-13.
83. Palecek, E., Fojta, M. (1994). Differential pulse voltammetric determination of RNA at the picomole level in the presence of DNA and nucleic acid component, *Anal. Chem.*, 66: 1566-1571.

84. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1994). Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation, *Anal. Chem.*, 66: 1236-1241.
85. Pang, D. and Abruna, H.D. (1998). Micromethod for the investigation of the interaction between DNA and redox-active molecules, *Anal. Chem.*, 70: 3162-3169.
86. Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D. (1999). Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C, *Chemico-Biological Interactions*, 117: 65-81.
87. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baskı, Academic press: s.226- 239.
88. Schweiger, B., Zadow, I., Heckler, R., Timm, H., and Pauli, G. (). Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples,
89. Service, R.F. (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399.
90. Steel, A.B., Herne, T.M., Tarlov, M.J. (1998). Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.
91. Steichen M. and Buess-Herman, C. (2005). Electrochemical detection of the immobilization and hybridization of unlabeled linear and hairpin DNA on gold, *Electrochem. Commun.*, 7(4): 416-420.
92. Takenaka, S., Ihara, T., Takagi, M. (1990). Bis-9 acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA, *J. Chem. Soc., Chem. Communications*, 21: 1485-1487.

93. Teijeiro, C., Perez, P., Marin, D., Palecek, E. (1995). Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 77-83.
94. Temel Biyokimya 2. (1997). Bölüm 8: Bilgi Kaynağı olan Makromoleküller; Editörler, Prof. Dr. Taner Onat, Prof. Dr. Kaya Emerk; Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı: sayfa 565-567.
95. Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E. (1999). Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 476: 71-80.
96. Tuite, E., Norden, B. (1994). Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: A spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 7548-7556. Turner, A.P.F. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Editörler; Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S.; Oxford University Press, Oxford, sayfa v-vii.
97. Umek, R. M., Lin, S. W., Vielmetter, J., Terbrueggen, R. H., Irvine, B., Yu, C. Y., Kayyem, J. F., Yowanto, H., Blackburn, G. F., Farkas, D. H., Chen, Y. P. (2001). Electronic Detection of Nucleic Acids, *J. Mol. Diagn.*, 3(2): 74-84.
98. Wang, J. (2002). Electrochemical Nucleic Acid Biosensors, *Anal. Chim. Acta.*, 469: 63-71.
99. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. (1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.

100. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N. (1996). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.*, 68: 2629-2634.
101. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T. (1998). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.
102. Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R. (1997). Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes, *Anal. Chim. Acta.*, 349: 77.
103. Wang, J., Kawde, A.N. (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Anal. Chim. Acta*, 431(2): 219-224. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salazar, M.(2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
104. Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R, Grant, D.H., Ozsoz, m., Beglieter, A., Mowat, M. (1997). Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.*, 69: 5200-5202.
105. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E. (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 45: 33 - 40.
106. Wang, J., Rivas, G., Cai, X. (1997). Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA

sequences from the Escherichia coli pathogen”, *Electroanalysis*, 9(5): 395-398.

107. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., , Shiraishi, H., Farias, A.M.P., Dontha, N., Luo, D. (1996). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 332: 139-144.
108. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S. (1997). Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA”, *Anal. Chim. Acta*, 337: 41-48.
109. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring-A review, *Anal. Chim. Acta*, 347: 1-8.
110. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C. (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, *Electroanalysis*, 10(8): 553-556.
111. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R.(1998). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375: 197-203.
112. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N. (1996). DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 68: 4365-4369.

113. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H. (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, Anal. Chem., 68: 2251-2254.
114. Wang, J., Rivas, G., Ozsoz, M., Grant, D.H., Cai, X., Parrodo, C.(1997). Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage, Anal. Chem., 69: 1457-1460.
115. Xia, C., Guoli, S., Jianhui, J., Ruqin, Y. (1999). Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications, Anal. Lett., 32 (4): 717-727.

## **Biyolog Buket MERİÇ'in Özgeçmişı**

### **Kişisel Bilgiler**

Doğum Tarihi: 07/09/1983

Doğum Yeri: İzmir

### **Yüksek Lisans Eğitimi:**

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans programı. 2006 –

### **Lisans Eğitimi:**

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü. 2005

### **Yabancı Dil:**

İngilizce: ÜDS (58.75), KPDS (52).

### **Projelerde Aldığı Görevler**

“Detection of Influenza A Virus by Using Electrochemical DNA Biosensors”. (Project No: 07/ECZ/001)

### **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler**

1. Pinar Kara, Seda Cavdar, Buket Meric, Selda Erensoy, Mehmet Ozsoz; “Electrochemical Probe DNA Design in PCR Amplicon Sequence For the Optimum Detection of Microbiological Diseases ”; Bioelectrochemistry, Accepted Manuscript, Available online, In Press – 2007.

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında**

#### **Basılan Bildiriler**

1. D.O. Ariksoysal, M. Ozsoz, P. Kara Kadayifcilar, G. Yalcin, S. Cavdar, B. Meric; “Use of Carbon Nanotubes in Biosensor System For Signal Enhancement”, 2006.

2. G. Yalcin, M. Cizmecioglu, P. Kara Kadayifcilar, D. Ariksoysal, S. Cavdar, B. Meric, O. Sogut, M. Ozsoz; “Electrochemical Biosensor For The Interaction of DNA and Antitumoral and Cytotoxic Chalcone Derivates”, 2006.

3. D. Ozkan-Ariksoysal, B. Meric, N. Aladag, G. Dogan, A. Sayiner and M. Ozsoz; “Label-Free Electrochemical Hybridization Genosensor For

The Detection And Discrimination of Influenza Type A and Type B Viruses”, 2007.

4. D. Ozkan-Ariksoysal, N. Aladag, B. Meric, U. Tamer and M. Ozsoz; “The Electrochemical Detection Of Gold Nanoparticles Behaviors Using Dna Biosensor Technology”, 2007.

5. D. Ozkan-Ariksoysal, B. Meric, N. Aladag, M. Ozsoz; “Detecting Dna Hybridization Based On Electro-Active Intercalators”, 2007.

6. B. Meric, L. Fojt, M. Ozsoz, V. Vetterl; “Detection of Influenza Virus A by Using Impedance Biosensors”, 2008.