

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

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BAKTERİSİNİN
RİFAMPİNE KARŞI GELİŞTİRDİĞİ DİRENÇ
MUTASYONLARININ ELEKTROKİMYASAL
DNA BİYOSENSÖRÜ İLE SAPTANMASI**

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

**Kimyager
Seda ÇAVDAR**

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

**İZMİR
2008**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ

(Danışman)

Üye : Doç. Dr. Emrah KILINÇ

Üye : Doç. Dr. Yücel ŞAHİN

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ'e ve Anabilim Dalımızdaki diğer tüm öğretim üyelerine teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Fakültemizdeki tüm çalışma arkadaşlarıma, her zaman desteklerini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

İZMİR – 2007

Kimyager Seda ÇAVDAR

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	6
 1. Elektrokimya	6
1.1. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları	8
1.2. Voltametrik Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar	8
1.2.1. Referans Elektrotlar	8
1.2.1.1. Referans Elektrot Çeşitleri	9
1.2.2. Çalışma Elektrotları ve Çeşitleri	10
1.2.2.1. Karbon Elektrotlar	12
1.2.2.2. Civa Elektrotlar	15
1.2.2.3. Diğer Elektrotlar	15
1.2.3. Yardımcı Elektrot	16
1.3. Voltametri	16
1.3.1. Uyarma Sinyalinin Çeşidine Göre Voltametrik Yöntemler	18
1.3.1.1. Dönüşümlü Voltametri	18
1.3.1.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi	20
1.3.1.3. Doğrusal Taramalı Voltametri	21
1.3.1.4. Kare Dalga Voltametrisi	22
1.3.2. Voltamogramlar	22

1.3.2.1. Faraday Yasası ve Faradaik Akım.....	23
1.3.2.2. Kapasitif Akım.....	24
1.3.3. Voltametrik Akımlar	25
1.3.4. Nernst Eşitliği	26
2. Biyosensör	27
2.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler.....	28
2.2. Çevirici Türüne Göre Biyosensör Çeşitleri.....	30
2.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	31
2.2.2. Optik Biyosensörler	31
2.2.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR).....	31
2.2.3. Kütle Hassas Biyosensörler	34
2.3. DNA Biyosensörleri	35
2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA	35
2.3.2. Peptik Nükleik Asitler (PNA).....	39
2.3.3. DNA ile İlgili Bazı Terimlerin Tanımlamaları	39
2.3.3.1. DNA Baz Dizilerinin Yazılımı ve Bazı Terimler ile İlgili Temel Bilgiler.....	39
2.3.3.2. Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu	42
3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	42
3.1. PCR'nin Temel Bileşenleri.....	43
3.1.1. Çoğaltılacak Olan Kalıp DNA	43
3.1.2. Taq DNA Polimerazlar.....	43
3.1.3. DNA Primerleri	44
3.1.4. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP).....	44
3.1.5. Tamponlar ve MgCl ₂	44

3.2. Pollimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi.....	45
3.2.1. Hedef DNA'nın Denatürasyonu	45
3.2.2. Primerlerin Bağlanması (Annealing).....	45
3.2.3. Uzama	46

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM.....	47
-----------------------------	-----------

2.1. Kullanılan Cihazlar.....	47
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
2.3. Kullanılan DNA Dizileri	48
2.3.1. Kullanılan Sentetik Prob Diziler	49
2.3.2. Kullanılan Sentetik Hedef Dizi	49
2.3.3. Kullanılan PCR Ürünü Hedef Dizi.....	49
2.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	50
2.4.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	50
2.4.2. DNA Dizilerinin Hazırlanışı	52
2.4.2.1. Sentetik Prob ve Hedef Dizi Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	52
2.4.2.2. PCR Ürünü Örneklerinin Hazırlanışı.....	52
2.4.3. Kovalent Bağlama Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	53
2.4.4. Etanolamin Hidro–Klorür Çözeltilisinin Hazırlanışı	53
2.4.5. ExtrAvidin–AF Çözeltilisinin Hazırlanışı	53
2.4.6. 1–NF Disodyum Çözeltilisinin Hazırlanışı	53

2.4.7. 6–Merkapto–1–Hekzanol Çözeltisinin Hazırlanışı	53
2.5. Kullanılan Yöntem	54
2.5.1. Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Rifampine	
Karşı Geliştirdiği Direnç Mutasyonlarının	
Elektrokimyasal Yoldan Saptanması	54
2.5.1.1. Elektrotların Hazırlanışı	57
2.5.1.2. Elektrot Yüzeylerinin Kovalent Bağlama	
Çözeltisi ile Kaplanması	57
2.5.1.3. Elektrot Yüzeylerine Prob Bağlanması	57
2.5.1.4. Elektrot Yüzeyindeki Boşlukların Etanolamin	
Hidro–Klorür ile Kaplanması.....	58
2.5.1.5. PCR Örnekleri ile Hibridizasyon	58
2.5.1.6. Yıkama	58
2.5.1.7. ExtrAvidin–AF Tutturma.....	59
2.5.1.8. 1–NF Bağlanması.....	59
2.5.1.9. Voltametrik Ölçüm	59
2.5.2. SPR ile Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin	
Tayini.....	59
2.5.2.1. Sensör Yüzeyinin Temizlenmesi.....	60
2.5.2.2. Altın Yüzeye Prob Bağlanması	60
2.5.2.3. Altın Yüzeye 6–Merkapto–1–Hekzanol	
Bağlanması	60
2.5.2.4. Hibridizasyon	60
2.5.2.5. Yıkama	61

2.6. Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Rifampine Karşı Geliştirdiği Direnç Mutasyonlarının Elektrokimyasal Yoldan Saptanmasında İncelenen Parametreler.....	61
2.6.1. Mutasyon Analizlerinin Saptandığı En Uygun Koşullar	62
2.6.1.1. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi.....	62
2.6.1.2. ExtrAvidin–AF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi.....	62
2.6.1.3. 1–NF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	63
2.6.2. PCR Ürünleri Kullanılarak Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Tayini	63
2.6.3. PCR Ürünleri Kullanılarak Direnç Mutasyon Analizi	65

BÖLÜM III

BULGULAR.....	67
----------------------	-----------

3.1. Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Rifampine Karşı Geliştirdiği Direnç Mutasyonlarının Elektrokimyasal Yoldan Saptanmasına Ait Bulgular.....	67
3.1.1. Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanmasına Ait Bulgular.....	67

3.1.1.1. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular	67
3.1.1.2. ExtrAvidin–AF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular	69
3.1.1.3 1–NF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular	70
3.1.2. PCR Ürünleri Kullanılarak Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Tayinine Ait Bulgular	72
3.1.3. PCR Ürünleri Kullanılarak Direnç Mutasyon Analizine Ait Bulgular.....	74
3.2. SPR ile Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Tayinine Ait Bulgular.....	77

BÖLÜM IV

TARTIŞMA	81
4.1. Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Rifampine Karşı Geliştirdiği Direnç Mutasyonlarının Elektrokimyasal Yoldan Saptanmasına Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	81
4.1.1. Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanmasına Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	81
4.1.1.1. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma.....	82

4.1.1.2. ExtrAvidin–AF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	83
4.1.1.3 1–NF’nin Bağlanma Süresinin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	83
4.1.2. PCR Ürünleri Kullanılarak Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Tayinine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	84
4.1.3. PCR Ürünleri Kullanılarak Direnç Mutasyon Analizine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	85
4.2. SPR ile Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Tayinine Ait Bulgular ile İlgili Tartışma	86

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER.....	87
ÖZET	90
SUMMARY	92
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Genel elektrokimyasal hücre şeması	7
Şekil 2. Çeşitli çalışma elektrotlarına ait çalışma potansiyeli aralıkları	11
Şekil 3. Karbon pastası elektrodunun şematik olarak gösterimi	12
Şekil 4. Kalem grafit elektrodun şematik olarak gösterimi	14
Şekil 5. Perde baskılı karbon elektrodun şematik olarak gösterimi.....	15
Şekil 6. Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi	16
Şekil 7. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyallerinin zamanla değişimi	18
Şekil 8. Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram	18
Şekil 9. Belirli bir potansiyel aralığında yapılan tarama sonucu oluşan, analite ait elektrokimyasal tepkimenin, tersinir olup olmadığını gösteren voltamogram.....	20
Şekil 10. A) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel puls voltametrisine ait bir voltamogram	21
Şekil 11. Biyosensörün yapısı ve bileşenleri	27
Şekil 12. A) Metal film olarak gümüş ve alüminyum kullanıldığında elde edilen dalgaboyuna karşı yansım grafiği B) Metal kalınlığının uygunluğuna göre dalgaboyuna karşı yansım grafiği.....	33
Şekil 13. SPR’de altın kaplı sensör yüzeyinde DNA hibridizasyonunun şematik gösterimi.....	34

Şekil 14. DNA çift sarmalı.....	37
Şekil 15. Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması	38
Şekil 16. Nükleik asitte bulunan şekerlerin kimyasal yapısı.....	39
Şekil 17. Kalem grafit elektrotların kovalent ajanlarla kaplandıktan sonra yüzeye sırasıyla prob dizi ve etanolamin tutturulması	55
Şekil 18. Denatüre edilmiş PCR ürünü hedef dizisinin prob dizi ile hibridizasyonunun ardından sırasıyla ExtrAvidin–AF ve 1–NF bağlanma basamakları ve buna bağlı oluşan naftole ait yükseltgenme sinyali	56
Şekil 19. Çeşitli basamaklarda kör çözeltiler kullanılarak S1 bölgesine karşılık gelen prob dizisi ile PCR ürünü hedef dizi ve rasgele hedef dizilerinin hibridizasyonuna ait basamaklar.....	64
Şekil 20. Şekil 19’da uygulanan çalışma basamakları sonrası oluşan naftolün yükseltgenmesine ait voltamogram	65
Şekil 21. S3 ve S4 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyon sonrası, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanlarının uygulanmasının ardından Diferansiyel Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri	68
Şekil 22. S4 ve S5 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyon, yıkama ve 10, 20, 30, 60 ve 90 dakikalık ExtrAvidin–AF bağlanmasının ardından Diferansiyel	

Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri 70

Şekil 23. S3 ve S4 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyon, yıkama, ExtrAvidin AF bağlanması ve 10, 20, 30, 60 ve 90 dakikalık 1-NF bağlanmasının ardından Diferansiyel Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri..... 71

Şekil 24. Kovalent bağlama çözeltisi ile kaplı elektrotların;

A: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + kör ExtrAvidin–AF + kör1-NF

B: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + kör ExtrAvidin–AF + **1-NF**

C: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + **ExtrAvidin–AF + 1-NF**

D: prob + etanolamin + kör hedef + **ExtrAvidin–AF + 1-NF**

E: prob + etanolamin + **PCR ürünü hedef + ExtrAvidin–AF + 1-NF**

F: prob + etanolamin + **rasgele hedef + ExtrAvidin–AF + 1-NF**

ile etkileşimleri sonucu alınan naftol yükseltgenme pik akımları 73

Şekil 25. Elektrot yüzeyine tüm S prob dizilerinin bağlanmasının ardından bazı bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyon sonrası diferansiyel puls voltametresi ile alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram 75

Şekil 26. a:S1 b:S2 c:S3 d:S4 e:S5 prob dizilerinin sırasıyla Örnek 1 ve Örnek 2’de S4 bölgesinde, Örnek 3’te S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile

hibridizasyonundan sonra alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram	76
Şekil 27. a:S1 b:S2 c:S3 d:S4 prob dizilerinin sırasıyla Örnek 4, Örnek 6 ve Örnek 7’de S4 bölgesinde, Örnek 5’te S2 bölgesinde, direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram	76
Şekil 28. Mycobacterium tuberculosis bakterisinin SPR ile tayinine ait Zaman–RU grafiği	78
Şekil 29. A: İmmobilizasyon tamponu (pH:3.8) B: 1ppm prob çözeltisi C: 0.1mM 6–merkapt–1–hekzanol D: Hibridizasyon tamponu (pH:7.4) çözeltilerine karşılık gelen Δ RU değerleri.....	79
Şekil 30. 1ppm prob çözeltisi (B) ve hibridizasyona (E) karşılık gelen Δ RU değerleri	80

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Biyolojik yanıtları elektriksel sinyallere çeviren analitik aletlere biyosensörler denir. Biyosensörler, bir elektrokimyasal sensörün yapısına hücre, doku, enzim, antikor, nükleik asit gibi biyolojik maddelerin katılmasıyla elde edilir. Biyosensör 'biyolojik kökenli' anlamına gelen biyo ve 'algılayıcı' anlamına gelen 'sensör' kelimelerinden oluşur. Biyokimyasal kısım, analizlenecek madde ile etkileşir. Bu etkileşim sonucu oluşan biyokimyasal ürün çevirici kısım tarafından okunabilir, sayısal bir değere çevrilir. Bu cihazlarla nitel ve nicel analiz yapmak mümkündür (21).

Analizi yapılacak madde ile etkileşerek onu tanıyan biyolojik materyal DNA olursa bu biyosensörlere DNA biyosensörleri (Genosensörler) adı verilir. Son yıllarda biyosensör tasarımında bu tür nükleik asit tanıma yüzeylerinin kullanıldığı sensörlere ve çip teknolojisine yönelik genosensör tasarımı çalışmalarına olan ilgi artmıştır (9, 10, 11, 18, 59, 61, 69, 72, 79, 87, 88, 95, 97).

Genosensörler, genetik ve bulaşıcı hastalıkların teşhis edilmesine, nokta mutasyonlarının tayinine ya da DNA hedefli bazı ilaçların ve maddelerin DNA'ya olan etkilerinin aydınlatılmasına, olanak sağlamaktadır (24, 25, 51, 52, 55, 61-64, 89, 92, 96, 97, 98). Prob olarak bir DNA dizisinin

kullanılması ve bu diziye karşılık gelen hedef diziyle hibridizasyonu sonucu oluşan çift sarmalın biyokimyasal yapısı sayesinde tanıma olayı gerçekleştirilir (6). Bu olayı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren çeviricinin duyarlılığı bu genosensörlerin hastalık ve etkileşim tayinlerinde kullanılması açısından çok önemlidir (27-30, 32, 48, 49, 55, 58).

Biyolojik materyallerden nükleik asit tayini için öncelikle DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması aşamalarını içeren basamak olan örnek hazırlama basamağı yer alır. Bu basamaktan sonra elde edilen örnek yapılacak analizlere yeterli olmayacağından, nükleik asitin belirli bölgesi, ikinci basamak olan çoğaltma basamağında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılır. Daha sonra son basamak olan tayin basamağına geçilebilir.

Araştırmanın Konusu ve Amacı

Verem olarak da adlandırılan tüberküloz hastalığı insanlık tarihinin ilk çağlarından itibaren görülen bir hastalıktır. 1865 yılında hastalığın enfeksiyon hastalığı olduğu gösterilmiştir. 1882 yılında Robert Koch tüberküloz basili bularak hastalıkta yeni bir çığır açmıştır.

Literatürde J. Wang, *Mycobacterium tuberculosis* basilinin indikatöre dayalı tanısını, ilk olarak elektrokimyasal genosensör ile sentetik oligonükleotid diziler kullanarak yapmıştır (94).

Daha önceden hijyen, diyet ve güneş kürü esasına dayanan tedavi yöntemleri, 1940'lı yılların başlarında streptomisin keşfi ve izonikotinik asitin tedaviye girmesi tüberküloz tedavisinde yeni ve etkin bir dönemin başlangıcı olmuştur. Tüberküloz hastalığı esas olarak akciğerleri tutan ve bunun yanı

sıra diğerk birçok organda da yerleşebilen, Mycobacterium tuberculosis adlı bir mikroorganizma (Koch basil) tarafından oluşturulan iltihabi bir hastalıktır.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar üç sınıfa ayrılabilirler. Öncelikli olarak tercih edilen ve tedavide daha etkili olan,

1. grup ilaçlar; İzoniazid, Rifampisin, Etambutol, Pirazinamid veya Morfozinamid ve Streptomisin'dir

2. grup ilaçlar; Tiasetazon, Paraaminosalisilik asit (PAS), Sikloserin ve Etionamid'dir.

3. grup ilaçlar; Viomisin, Kanamisin, Kapreomisin, Tiokarlid, Ofloksasin, Sikloksasin, Ampisilin-Sulbaktam, Alfasilin-Klavulant vs. yer almaktadır (37).

Antitüberküloz ilaç direnci, özellikle çok ilaca direnç, dünyada tüberkülozun kontrolünü sağlamada ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (77, 80).

Bugün dünyada en az 50 milyon multiple ilaç dirençli tüberküloz olgusu ile karşıkarşıya kaldığımız bilinmektedir. Bu durumdan sorumlu en önemli faktörlerin başında ise yetersiz ve/veya yanlış tedavi uygulamaları gelmektedir.

Rifampisin (RIF), en çok kullanılan antitüberküloz ilaçlarından biri olup, Streptomyces Mediterranei'nin kültür filtratlarından elde edilen rifamisinini sentetik bir türevidir. Rifampisin, hidrofobik hücre zarından hızla difüze olur. Bakterinin, DNA'ya bağımlı RNA polimerazın potent inhibitörüdür. Rifampisin, RNA polimerazı rpoB geni tarafından kodlanan b alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. Dirençli suşlarda mikobakteri, RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan gen olan rpoB'de 27 amino asitlik bir bölgede anlamsız mutasyonlar oluşturur. Mutasyonların büyük bir kısmının 526 ve 531 aminoasit

pozisyonları arasında olduğu kabul edilmektedir. Türkiye’de yapılan RIF direnci DNA dizi çalışmalarında ise vakaların %95’inden fazlasının bakterinin rpoB geninin 507-533. kodonlarını içeren 81 bazlık gen bölgesinde olduğu görülmüştür (12, 13, 14, 38).

Yapılan çalışmada rpoB genine ait 5 farklı bölgeden prob diziler seçildi. Bu bölge mutasyonların en sık gözlendiği 507–533. kodonları içeren, 81 baz uzunluğundaki alanı içeriyor. Bu diziler 5’ ucundan amino hekzil [NH₂–(CH₂)₆] işaretli olarak sentezlendi. Hedef dizi olarak kullanılan PCR ürünü hedef diziler ise biotin işaretli primer kullanılarak 5’ ucundan biotin işaretli olarak çoğaltıldı. Daha sonra Avidin–Biotin etkileşimine dayalı direnç mutasyonlarının analizi yapıldı. Burada amaç; enzime dayalı Genosensör ile DNA Dizi Analizi yöntemini kullanarak direnç mutasyonlarının analizini yapmaktır (17, 46).

Çalışma kapsamında; Mycobacterium tuberculosis bakterisinin RIF antibiyotiğine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının analizi amaçlanmış olup, ileride tasarlanabilecek, klinik tanıya uygulanabilir bir mikroçip teknolojisine yönelik enzime dayalı elektrokimyasal genosensör tasarlanmıştır.

Çalışmada tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine 5’ ucundan aminohekzil işaretli prob diziler kovalent bağlama çözeltisi ile bağlanmış, daha sonra sırasıyla ExtrAvidin–AF (ExtrAvidin–Alkalen Fosfataz) ve 1–NF (1–Naftil Fosfat) zeltelerinde bekletilmiştir. Aynı işlem prob dizilerin, rasgele bir hedef diziyle ve belirli bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef dizilerle hibridizasyona tabi tutulmasından sonra da gerçekleştirilmiştir. Burada amaç naftol oluşumunun

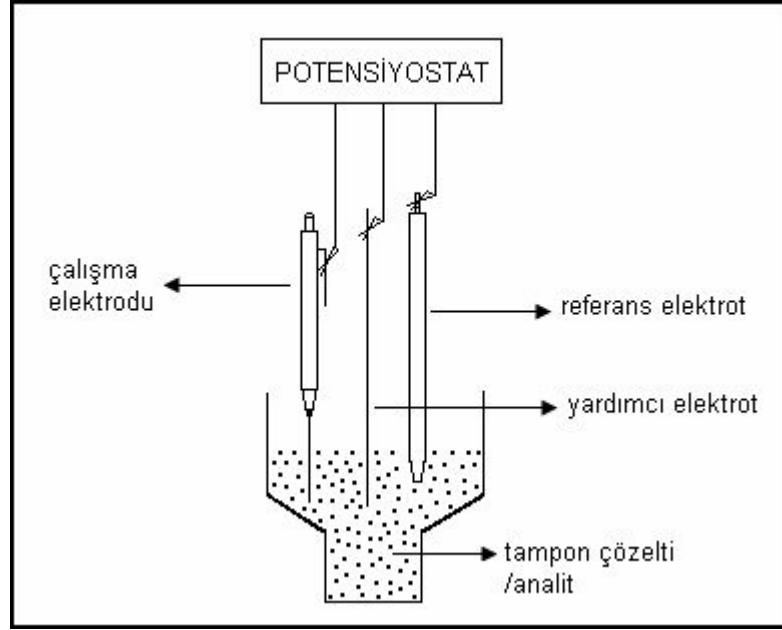
gerçekleşmesidir. Prob diziler biotin ile işaretli olmadığından ExtrAvidin AP elektroda bağlanamamış ve naftol oluşumuna sebep olacak ortam sağlanamamıştır. Aynı şekilde prob dizilerin rasgele hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra çift sarmal tam olarak oluşamamış ve yine naftol oluşumuna uygun ortam sağlanamamıştır. Her ikisinde de naftol yükseltgenme sinyalleri oldukça düşük çıkmıştır. Prob dizilerin biotin ile işaretli PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra ise; direnç mutasyonu gösteren bölgelerle hibridizasyonda düşük, tam karşılığı olan bölgelerle hibridizasyonda yüksek naftol yükseltgenme sinyali gözlenmiştir. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerindeki farklılıklar mutasyon analizinin gerçekleşmesini sağlamıştır.

Çalışmadaki *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini basamağını desteklemek için yüzey plazmon rezonans (SPR) yardımıyla geliştirilen optik genosensör ile de tayin gerçekleştirilmiştir. Tayini gerçekleştirmek için altın sensör yüzeyine tiyol işaretli sentetik prob dizi tuturulmuştur. Prob dizilerin yüzeyde dik konumda kalması için aradaki boşluklar 6–merkaptto 1–hekzanol ile doldurulmuş olup daha sonra rasgele hedef dizi ve prob dizinin karşılığı olan sentetik hedef dizi ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği bağlanma ve yıkama sonrası kırılma indisi değerlerindeki farklılıklardan anlaşılmış, böylece *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini tasarlanan optik genosensör ile de gerçekleştirilmiş olmuştur.

GENEL BİLGİLER

1. ELEKTROKİMYA

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonucu oluşan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır (15). Elektrokimyasal tepkimeler, elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede elektronların bir yerden başka bir yere geçişiyle, gerçekleşir. Bu tepkimeler, elektron transferi veya geçişi olan yükseltgenme–indirgenme türü tepkimelerdir. Elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için uygun ortamın sağlanması gerekmektedir. Bu ortam analizi yapılacak maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşümünün gerçekleştiği elektrot sistemi ve bu sistemdeki elektrotların birbirine bağlandığı bir çevirim sistemini içerir. Elektrot sistemi olarak genellikle üçlü elektrot sistemi kullanılır. Ortamdaki elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla ise tampon çözelti kullanılır (22).



Şekil 1: Genel elektrokimyasal hücre şeması.

Maddenin elektrokimyasal özelliklerini saptamak amacıyla kullanılan yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Elektroanalitik yöntemler diğer yöntemlere göre bazı üstünlüklere sahiptir. Elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elementin bir yükseltgenme basamağı için spesifiktir. Bu yöntemler için kullanılan cihazlar diğer yöntemlerde kullanılan cihazlara göre daha ucuzdur. Bu yöntemler kullanılarak analizi yapılacak maddenin çok düşük tayin sınırlarına kadar ulaşılabilir. Elektrokimyasal yöntemler, kimyasal türlerin derişimleri hakkında bilgi verir (2, 8).

Doğru akım, diferansiyel puls ve dönüşümlü voltametri gibi tekniklerle belirli potansiyel aralığında tarama yapılır ve meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Bu şekilde elektrokimyasal ölçüm gerçekleştirilir. Burada ölçülen akım difüzyona bağlı olduğundan difüzyon akımıdır. Difüzyon olayı, elektrot yüzeyinin hemen yakınındaki difüzyon tabakasında gerçekleşir. Oluşan akım ile difüzyon hızı doğru orantılı olarak değişim gösterir (22).

1.1. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları

Bir maddenin elektrokimyasal hücre içerisinde analizi yapılırken tampon çözelti içinde bulunan analit elektrot yüzeyine üç farklı yolla aktarılır (23).

Elektriksel Göç (Migrasyon): Elektriksel göç, elektriksel alanın etkisi altında yüklü parçacıkların hareket etmesine dayanan aktarım yoludur.

Karıştırma (Konveksiyon): Çözelti içinde bulunan indirgenebilen veya yükseltgenebilen maddelerin, karıştırma veya titreşim gibi fiziksel hareketler yardımıyla elektrot yüzeyine taşınmasıdır.

Difüzyon: Maddelerin, çözelti ile elektrot yüzeyindeki sıvı filmi arasındaki derişim farkından dolayı yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru hareket etmesi durumudur. Böylece derişim farkı ortadan kalkar.

Bu yollardan biri veya birkaçı deneysel koşullara bağılı olarak kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.2. Voltametrik elektrokimyasal analizde kullanılan elektrotlar

1.2.1 Referans elektrotlar

Elektrokimyasal analizler sırasında potansiyeli çalışılan çözelti ortamından etkilenmeden bu ortama duyarsız kalabilen ve analiz süresince sabit kalan elektrotlardır. Referans elektrotlar sıcaklık değışimlerine karşı ufak değışimler gösterebilirler (2, 21, 23, 29, 31).

İdeal bir referans elektrot öncelikle kolay hazırlanabilmelidir. Tersinir davranmalı ve nernst eşitliğine uymalıdır. Üzerinden çok küçük bir akım geçtiğinde, tekrar eski potansiyeline geri dönebilmelidir (62, 70, 74, 87).

1.2.1.1. Referans elektrot çeşitleri

Standart hidrojen elektrot (SHE)

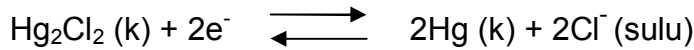
Elektrokimyada ilk olarak standart hidrojen elektrot referans elektrot olarak kullanılmıştır. Hazırlanması güç olan bir elektrottur. Bu nedenle pratik çalışmalarda öncelikle diğer referans elektrotlar tercih edilir.

Kalomel referans elektrot

Kalomel (Hg_2Cl_2) ve Hg'dan oluşmuş bir karışım, metalik civa ve KCl çözeltisinden oluşur. Hazırlanması oldukça kolaydır ancak tüm sistemler için kullanımı iyi sonuçlar vermeyebilir. Büyük sıcaklık katsayılarına sahiptir.

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

Oluşan elektrot tepkimesi şu şekildedir;



Tepkimeden de görüldüğü gibi bu elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır.

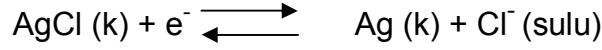
Gümüş–gümüş klorür referans elektrot

Gümüş–gümüş klorür referans elektrotları, doymuş kalomel elektrotlar gibi oldukça yaygın kullanım alanına sahip olan elektrotlardır. Doymuş

kalomel elektrottan üstünlüğü gümüş–gümüş klorür elektrodun doymuş kalomel elektroda göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesidir. Aynı zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girerler.

Bir gümüş–gümüş klorür referans elektrot gümüş bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl⁻ iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir.

Oluşan tepkime şu şekildedir;



Doymuş KCl çözeltisi kullanıldığı zaman 25 °C’ de standart hidrojen elektrota göre potansiyeli +0,222 V’ dur.

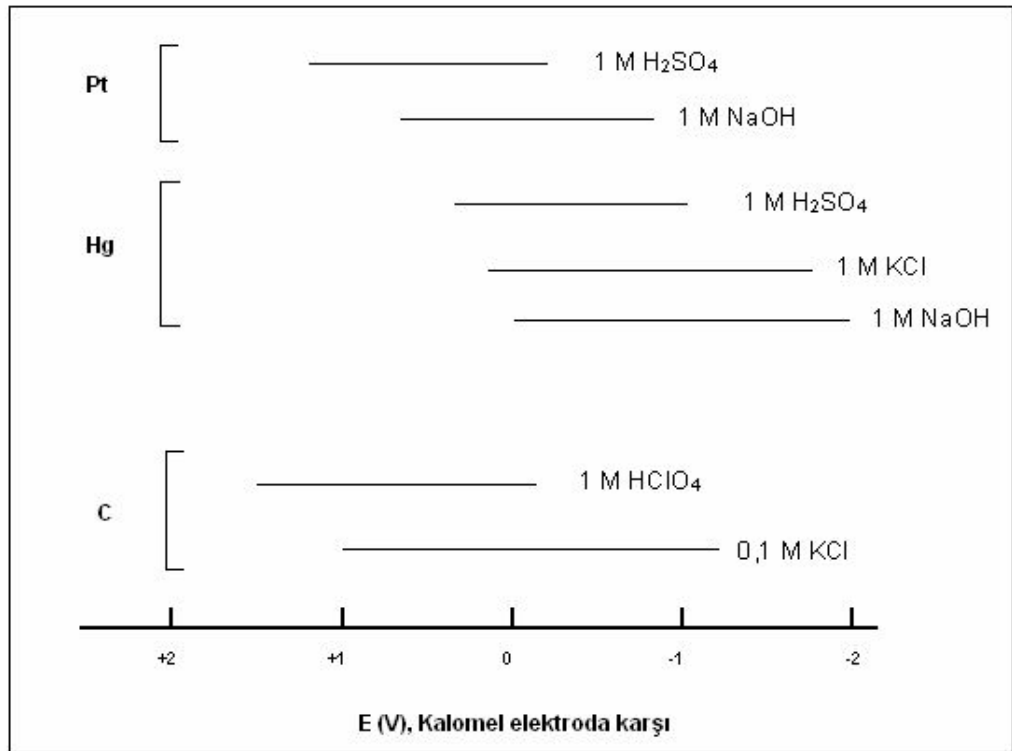
Civa–civa (I) sülfat referans elektrot

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

1.2.2. Çalışma elektrotları ve çeşitleri

Kullanılan analit maddenin yüzeyinde yükseltgendiği veya indirgendiği mikroeletrotlardır. Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişir. Yapımında kullanılan malzeme iletken olmalıdır. Bu amaçla 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 kullanılabilir. Çalışma elektrotları biyosensör tasarımına uygun bir şekilde geliştirilebilir. Bu elektrotlar çeşitli şekil ve büyüklüklerde hazırlanarak biyosensör tasarımına uygun hale getirilebilir.

Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda daldırıldıkları çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif potansiyel sınırları, suyun yükseltgenmesi sonucu oluşan moleküler oksijenden, negatif potansiyel sınırları ise suyun indirgenmesi sonucu oluşan hidrojenden kaynaklanır.



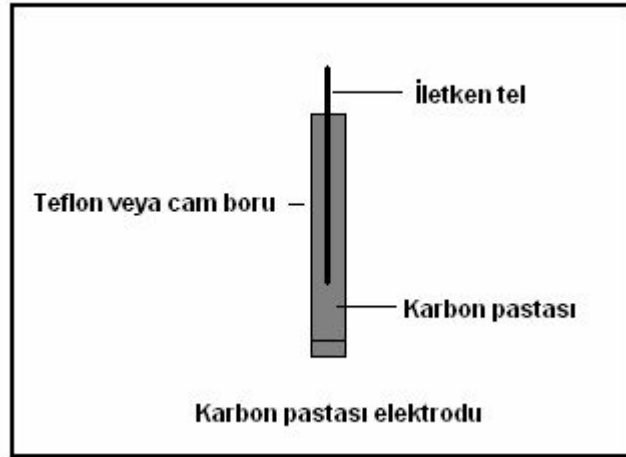
Şekil 2: Çeşitli çalışma elektrotlarına ait çalışma potansiyeli aralıkları.

1.2.2.1. Karbon elektotlar

Karbon elektrotların çeşitleri:

•Karbon pastası elektrodu (CPE)

Karbon pastası elektrotu; %70 grafit, %30 bağlayıcı maddenin homojen olarak karıştırılması ve bu karışımın 2–4mm çapında camdan ya da teflondan yapılmış borulara sıkıştırılmasıyla hazırlanır. Elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla borunun 2/3' üne kadar iletken bir tel uzatılır. Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri düzlemsel ve aromatik halkalar halinde birbirlerine zayıf π bağı ile bağlanırlar. Bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmekte ve böylece iletkenlik sağlanmaktadır.



Şekil 3: Karbon pastası elektrodunun şematik olarak gösterimi.

Karbon pastasının hazırlanmasında bağlayıcı madde olarak mineral yağ, parafin yağı, silikon yağı, bromonaftalen kullanılmaktadır. Karbon pastası bileşiminin elektrot etkinliği üzerine etkisi oldukça fazladır. Bağlayıcı olarak kullanılan organik sıvının karışımdaki oranı arttıkça, elektrodun elektron transfer hızı azalmaktadır.

Hazırlanması pratik ve ucuz, yüzey yenilenmesi ise kolaydır. Bu nedenlerden dolayı çalışmalarda sıklıkla tercih edilir. Ayrıca karbon pastasına çalışmaya uygun maddelerin eklenmesiyle elektrot modifiye edilebilir.

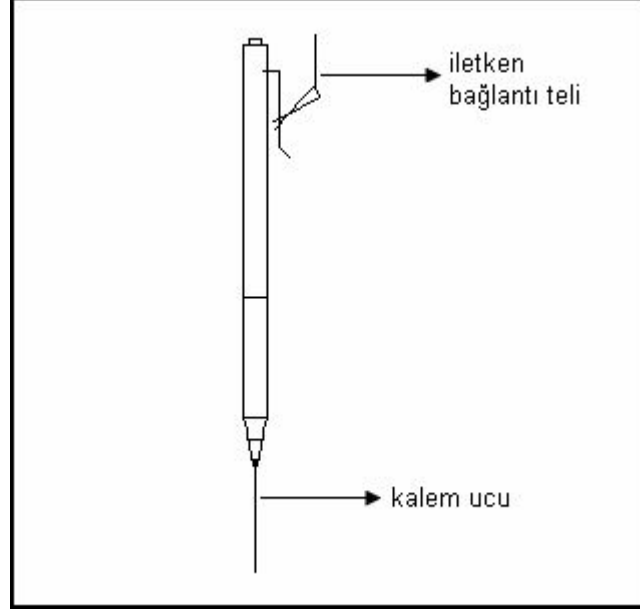
•Camsı karbon elektrot

Mikrometre boyutlu camsı karbon fenol/formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin, 1000-3000⁰C arasında, basınç altında, karbonizasyona uğratarak, inert malzemeden yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla elde edilir. Çok daha pürüzsüz ve düzgün yüzeyler elde edildiğinden dolayı elektrokimyasal yanıt da karbon pastası elektrotlarına göre daha tekrarlanabilir. Fiziksel dayanıklılığının yüksek olmasının yanı sıra kimyasal tepkimelere de katılmamaktadır. Geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlar.

•Kalem grafit elektrot

Kalem grafit elektrot grafitten oluşmuş olup, Tombo HB kalem uçlarının 3cm'lik eşit iki parçaya kesilmesiyle hazırlanır (93). Bu uçların oldukça kolay hazırlanması, tek kullanımlık ve ucuz olması çalışmalarda avantaj sağlamaktadır (50, 92). Yapılan çalışmalarda bu elektrotlarla alınan

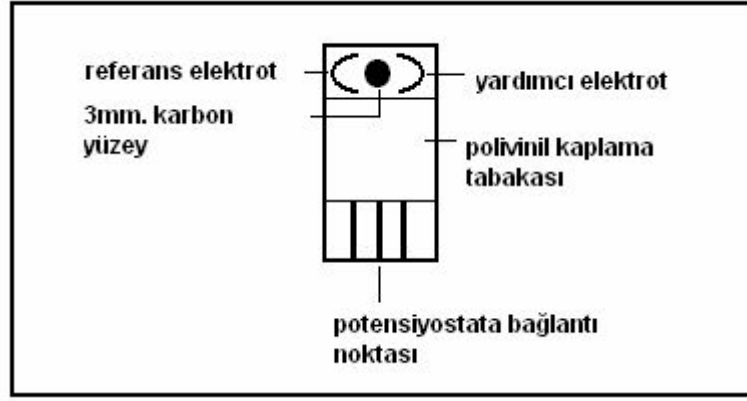
sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu ve daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabildiği gözlenmiştir.



şekil 4: Kalem grafit elektrodun şematik olarak gösterimi.

•Perde baskılı karbon elektrotlar

DNA mikroçip teknolojisi geliştikçe bu teknolojiye oldukça uygun olan perde baskılı karbon elektrotlara olan ilgi de hızla artmaktadır. Tek kullanımlık olmaları ve tekrarlanabilir sonuçlar vermeleri sonucu elektrokimyasal analizlerde oldukça tercih edilmektedirler (54, 57).



Şekil 5: Perde baskılı karbon elektrodun şematik olarak gösterimi.

1.2.2.2. Civa elektrotlar

Civa elektrotlarında, çalışma prensibi gereği her ölçüm kolayca oluşturulabilen yeni ve taze bir civa damlası yüzeyinde gerçekleştirilir. Geniş negatif potansiyel aralıklarında çalışılmasına imkân sağlaması elektrokimyasal analizlerde oldukça tercih edilmesine neden olmaktadır. Birçok metal iyonu bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturarak tersinir olarak indirgenebilir. Bu avantajlarının yanında en büyük dezavantajı, civanın toksik bir metal olması ve kolaylıkla yükseltgenmesi sonucu anot olarak kullanılabildiği potansiyel aralığının oldukça düşük olmasıdır (1).

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

1.2.2.3. Diğer elektrotlar

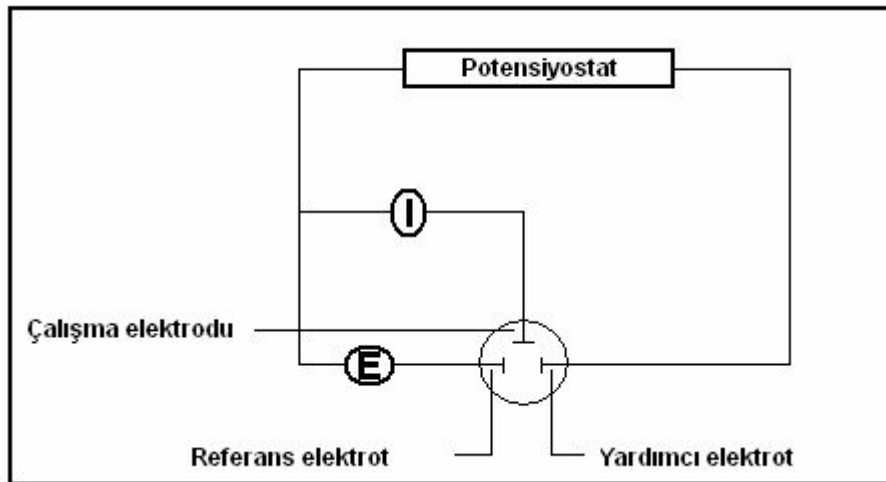
- Metal elektrotlar: Platin ve altın en çok tercih edilen metal elektrotlardır.

- Ultramikro elektrotlar: Çapları 50 μm 'den daha küçük olan elektrotlardır.

- Nano elektrotlar
- Karbon fiber elektrotlar

1.2.3. Yardımcı elektrot

Yardımcı elektrodun bir diğr adı da karşıt elektrot olarak bilinir. Elektriğın çalışılan çözelti ortamından geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağılar. Tepkimeye katılmaz. Bu amaçla platin tel ya da civa havuzu yardımcı elektrot olarak kullanılabilir.



şekil 6: Üçlü elektrot sisteminin potensiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi.

1.3. Voltametri

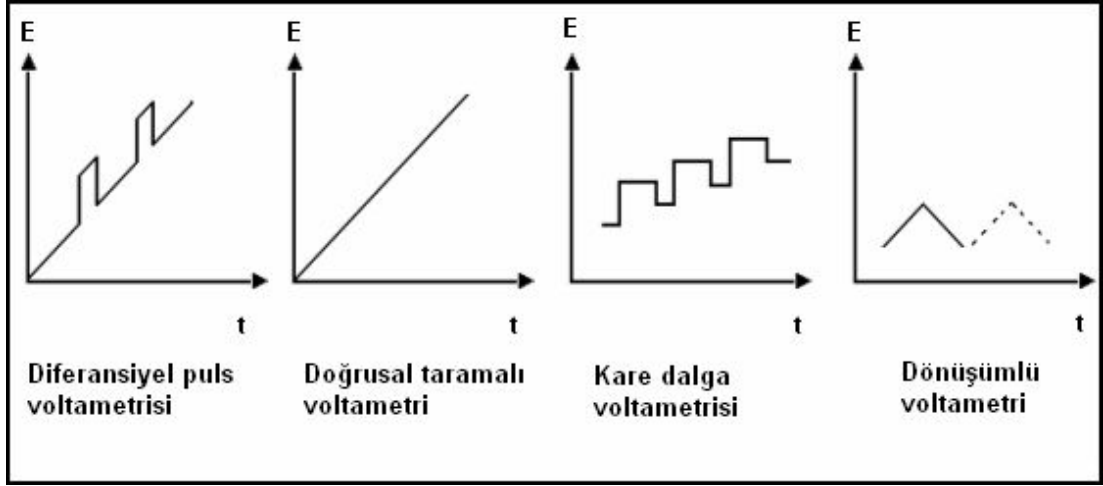
Polarize olmuş çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektroanalitik yöntem voltametri denir.

Uygulanan potansiyelin ölçülen akım değerine karşı çizilen grafiğine ise voltamogram denir. Voltametrik analizde öncelikle çalışılacak olan potansiyel aralığının belirlenmesi gerekir. Bu potansiyel aralığı kullanılan çalışma elektrodu, çözelti ve elektrolit türlerine bağlı olarak belirlenir.

Voltametri, Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky'nin 1920'lerin başında voltametrinin özel bir tipi olan polarografiyi bulmasının ardından bu tekniğe dayanarak geliştirilmiştir. Polarografide diğer voltametri tiplerinden farklı olarak çalışma elektrodu damlayan civa elektrodudur.

Voltametri, öncelikle analitik kimya olmak üzere; inorganik kimya, fizikokimya ve biyokimyacılar tarafından temel bir takım analizler için kullanılmaktadır. Bu analizler çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme / indirgenme işlemleri, yüzeydeki adsorbsiyon işlemleri, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçları içeren analizler de olabilir.

Voltametride en çok kullanılan uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır. Bu uyarma sinyalleri değiştirilebilen potansiyelde çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye uygulanır ve uyarma sinyallerinin çeşidine göre farklı akım cevapları oluşur (2).



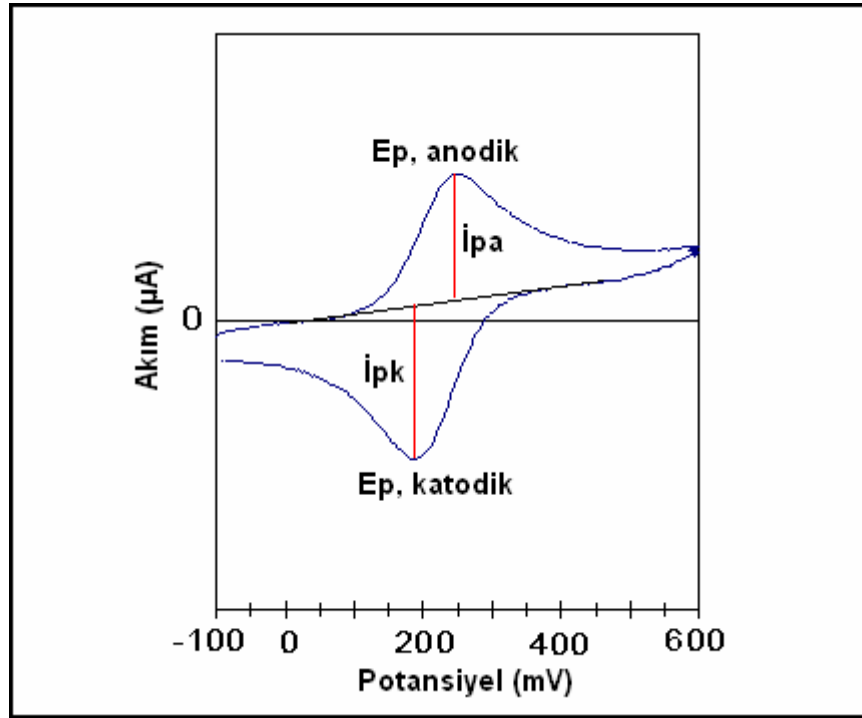
Şekil 7: Voltametriye kullanılan uyarma sinyallerinin zamanla değişimi.

1.3.1. Uyarma sinyalinin çeşidine göre voltametrik yöntemler

1.3.1.1. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri tekniği ile gerilimin bir fonksiyonuna karşı akım ölçülür. Önce başlangıç ve bitiş potansiyellerini içeren bir aralık belirlenir. Daha sonra başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru sabit hızda gerilim uygulanır. Gerilim yükseltgenme veya indirgenme yönünde olabilir. Uygulanan gerilim aynı sabit hızda bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrar uygulanır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli aralıktaki akımdaki değişim grafiğe geçirilir. Bu grafiğe Dönüşümlü Voltamogram adı verilir.

Dönüşümlü voltametri çoğunlukla elektrokimyasal bir analizde kullanılacak olan maddelerin elektriksel davranışlarını saptamak için tercih edilir. Bu teknik kullanılarak elektroaktif türlerin yükseltgenme–indirgenme tepkimelerinin mekanizmaları kolaylıkla aydınlatılabilir. Dönüşümlü voltametri miktar tayinine dayalı analizlerde tercih edilmemektedir.



Şekil 8: Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram.

Dönüşümlü voltametriye kapasitif akımın en düşük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık $10^{-5}M$ ile sınırlıdır. Yapılan taramanın hızı değiştirilebilir. Bunun sonucunda oluşan pik maksimumlarında, şekil değişikliği ve kaymalar olabilir. Voltamogramların, pik şekillerinden maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı vereceği anlaşılır. Tersinir bir elektrokimyasal tepkimede analite ait pik akımı aşağıdaki eşitlikle bulunur (2).

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

I_p = analite ait pik akımı

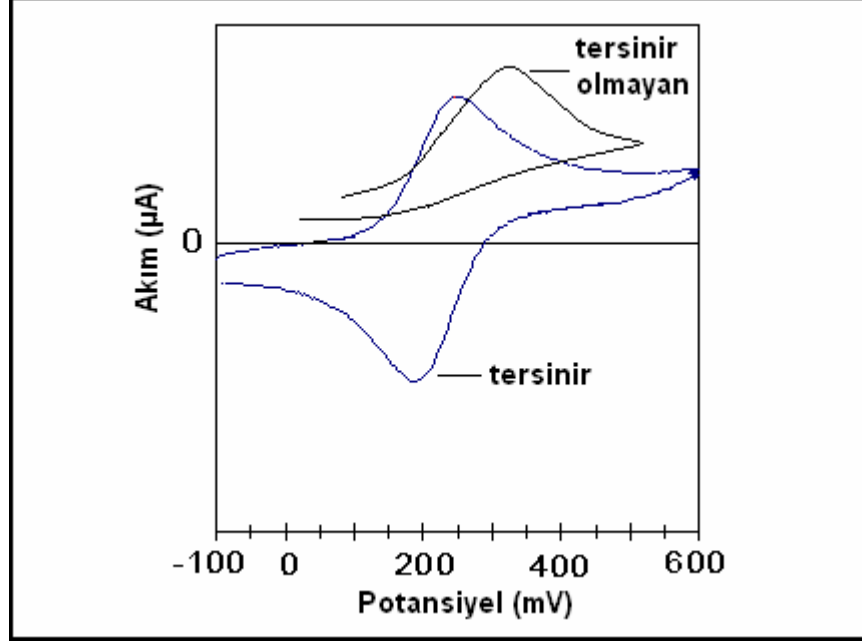
n = Elektron sayısı

A = Elektrot yüzey alanı (cm^2)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

C = Analit derişimi (mM)

v = Tarama hızı (V/s)



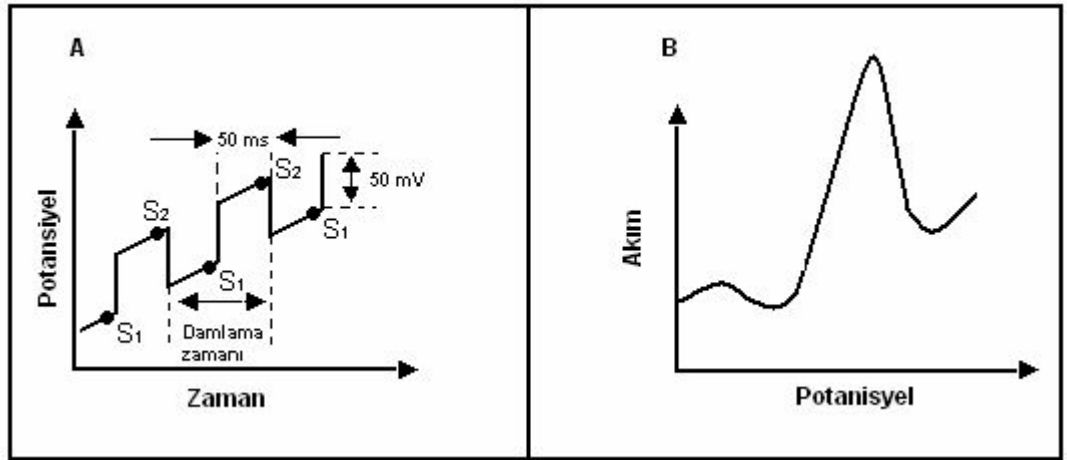
Şekil 9: Belirli bir potansiyel aralığında yapılan tarama sonucu oluşan, analite ait elektrokimyasal tepkimenin, tersinir olup olmadığını gösteren voltamogram.

1.3.1.2. Diferansiyel puls voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinde doğrusal bir tarama yapılarak periyodik pulslar oluşturulur. Böylece uyarma sinyalleri gerçekleştirilmiş olur. Ölçümler faradayik akımın en yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu zamanda yapılır. Bu da duyarlılık sınırının 10^{-7} – 10^{-8} M olduğu yüksek duyarlılık sağlar. Yöntemin en yararlı özelliği, yarı–dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,05V fark olan maddelerin bile pik maksimumlarının elde edilmesine olanak sağlamasıdır.

Potansiyel aniden arttırıldığında, elektrottaki yeni potansiyel, elektrot yüzeyi etrafında mevcut olan analit tabakasında, akım artışına neden olur. 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 (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır (2).



Şekil 10: A) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali, **B)** Diferansiyel puls voltametrisine ait bir voltamogram.

1.3.1.3. Doğrusal taramalı voltametri

Doğrusal taramalı voltametri ile doğru akım potansiyelinin zamanla doğrusal bir şekilde arttırılmasıyla uyarma sinyalleri elde edilir. Bu potansiyel

uygulaması sonrasında analizi yapılacak maddeye özgü akım cevapları potansiyelin bir fonksiyonu olarak voltamogramlarda incelenir. Doğrusal taramalı voltametrizde, iyi pik maksimumları elde edebilmek için yarı-dalga potansiyel farkı en az 0,2V civarında olmalıdır (2).

1.3.1.4 Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi, hızlı ve duyarlı olma üstünlüğüne sahip bir voltametri tekniğidir. Voltamogramların tamamı 10 milisaniyeden daha az bir sürede elde edilir. 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 ölçüm sayısı istenildiği kadar arttırılabilir. Yapılan ölçümlerin sayısı arttırıldıkça da sonuçların kesinliğini arttırmak mümkün olur. Kare dalga voltametrisinde tayin sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M' dir (2).

1.3.2. Voltamogramlar

Doğrusal taramalı voltamogramlar genelde voltametrik olarak bilinen sigmoidal (S şeklinde) şeklindeki eğrilerdir. Akım önce çok keskin bir artış gösterir. Daha sonra akım sabitlenir. Buna sınır akımı, i_s denir. Sınır akımı; kütle aktarım yollarıyla elektrot yüzeyine taşınacak analiz maddesinin taşınma hızıyla sınırlıdır. Oluşan sınır akımları analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri aşağıdaki ilişkiye dayanır.

$$i_s = k \cdot C_A$$

C_A = Analit konsantrasyonu

k = sabit

i_s = sınır akımı

Sınır akımlarını hızlı bir şekilde elde edilebilmek için sürekli hareket halinde olan elektrot ile veya çözelti ortamında çalışılmalıdır. Hareketli elektrot damlayan (damlayan civa elektrodu gibi) bir elektrot olabilir.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket halinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye Hidrodinamik Voltametri denir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye Polarografi denir.

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

1.3.2.1. Faraday yasası ve faradayik akım

Elektrokimyasal bir analiz yapılırken elektrokimyasal hücreye dışarıdan bir gerilim uygulanır. Uygulanan bu gerilim sonucunda elektroaktif madde, elektrotlardan herhangi birinde 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 harcanan elektrik miktarı Q'dur. Analizi yapılacak tek bir türe ait maddenin tümünün 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 sayısı, V; hacim (L), C; analitin konsantasyonu (M), F; faraday sabitini (96485 kulon) gösterir. Bu eşitliğe faraday yasası denir.

Analizi yapılacak maddenin uğradığı reaksiyonlardan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan, bu maddenin kimyasal dönüşümü için harcanan ve yalnızca elektron alış verişine dayanan akıma faradayik akım, i_f denir.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalırsa 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 altında; $i_c >> i_f$ olduğu için çalışılmaz.

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

1.3.2.2. Kapasitif akım

Elektrokimyasal analiz için analit çözeltisine daldırılan elektrodun negatif yükle yüklenmesi sonucu, çözelti ortamında bulunan pozitif yüklü parçacıklar elektroda doğru çekilir. Bu da ara yüzeyde bir potansiyel farkı oluşmasına sebep olur. Zıt işaretli yükler ara yüzeyde birikmeye başlar ve bu bölgede elektriksel bir çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya

indirgenecek elektroaktif bir madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyondan değil sistemden kaynaklanır. Sistemden kaynaklanan bu akıma kapasitif akım denir. Kapasitif akım ne kadar küçük olursa ölçümün hassaslığı o kadar artar.

1.3.3 Voltametrik akımlar

Elektroliz işleminde; herhangi bir noktadaki akım, analitin, difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine doğru aktarım hızına bağlı olarak değişir. **Cottrell denklemi**, bu aktarımın difüzyonla sağlandığı durumlarda faradayik akımı ifade eder ve oluşan difüzyon akımının zamana karşı fonksiyonu olarak yazılır.

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

i = t zamanındaki akım

n = elektrokimyasal tepkimeye giren elektron sayısı

D = difüzyon katsayısı (cm²/saniye)

F = faraday sabiti

A = elektrodun yüzey alanı (cm²)

C = analitin konsantrasyonu (mol/L)

t = zaman (saniye)

Analiz esnasında gerçekleşen tepkimelerin difüzyon kontrollü olup olmadığı Cottrell denklemi kullanılarak anlaşılır.

1.3.4. 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 konsantrasyonları bulunabilir. Bu da Nernst Denklemini açıklar.

Yukarıdaki tepkimeye göre Nernst denklemi 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

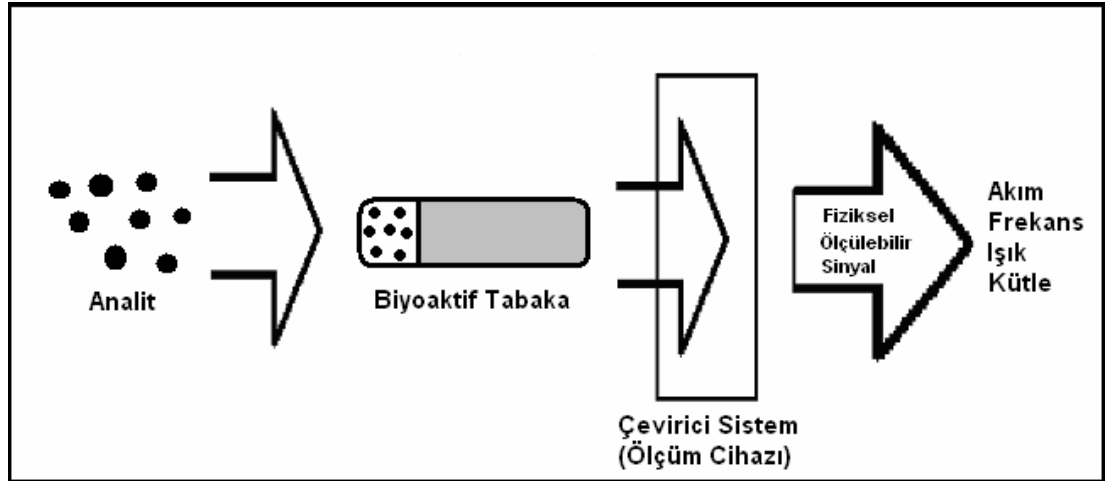
F = faraday sabiti

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

2. BİYOSENSÖR

Biyosensörler, biyolojik materyaller içeren ve/veya bunları çeşitli ortamlarda kalitatif ve/veya kantitatif tayin ve izlenmesinde kullanılan cihazlardır. Biyosensörlerde en önemli nokta sistemde mutlaka bir biyolojik materyal kullanılıyor olmasıdır. Bu biyolojik materyaller kullanılarak, çok seçici, çok hassas, çoğu zaman da çok daha hızlı ölçüm yapmak mümkündür.

Biyosensörler, birbiri içine geçmiş tanıyıcı bölüm ve tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşmeyi elektrik sinyaline çeviren bir çevirici sistemden oluşan biyoanalitik aletlerdir. Birinci kısım hedef analit ile seçimli olarak etkileşime giren biyokimyasal kısımdır. İkinci kısım ise bu etkileşimi algılayan elektriksel kısımdır. Tanıyıcı kısımda immobilize edilmiş ligandlar bulunmaktadır (16, 35, 75, 85).



Şekil 11: Biyosensörün yapısı ve bileşenleri

2.1 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikleri

İdeal bir biyosensör aşağıda adı geçen özelliklere sahip olmalıdır (33, 81).

Seçimlilik: İdeal bir biyosensör öncelikle seçimli olmalıdır. Çalışma ortamında analit ile girişim yapabilecek çeşitli bileşenler olabilir. Seçimli olan biyosensör, analiti varlığı tespit edilmiş olan bu bileşenlerden farklı olarak ölçülebilir. Seçimlilik yeterli değilse, bunu sağlamak için ek işlemler gerekir.

Kullanım ömrü: İdeal bir biyosensör, uzun kullanım ömrüne sahip olmalıdır. Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır.

Kalibrasyon: Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidir. İdeal bir biyosensörün kalibrasyona hiç gereksinim duymaması gerekse de, bu pratikte gerçekleşmemektedir. Bunun için biyosensör tasarımı için kullanılan cihazın kalibrasyon gereksiniminin mümkün olabilecek en az miktarda olması istenmektedir.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, aynı koşullar altında, ardarda yapılan ölçümlerde, elektrodun yaklaşık olarak aynı sonuçları okuması istenir. Bu durum pratikte mümkün değildir. Bu noktada tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından, aynı koşullarda, sabit bir örnek ile belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Biyolojik örnek için %15'ten fazla bağıl standart sapma ile kesinlik

sağlanabilir. Tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir çünkü tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün de o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Stabilite: Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlı olup, pH, ısı, nem, oksijen derişimi gibi faktörlere karşı elektrodun kararlılığını ifade etmektedir. İdeal bir biyosensör kararlı olmalıdır.

Duyarlılık: Duyarlılık, biyosensörün konsantrasyonda meydana gelen küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin duyarlılığının yüksek olması gerekir.

Tayin sınırı: Analitin, analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonu tayin sınırını belirler. Tayin sınırının düşük olması kullanılan malzemenin de az olmasını sağlar. Tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, elektrot yüzeyine tutturulan madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Ölçüm aralığı: Ölçüm aralığı akım–konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. İdeal bir biyosensörde bu aralığın geniş olması istenir.

Cevap zamanı: Cevap zamanının kısa olması çalışmada zamandan tasarruf sağlar. Bu bakımdan ideal bir biyosensörün hızlı cevap zamanına sahip olması istenir. Elde edilen akım–zaman eğrileri cevap zamanı hakkında

bilgi verir. Basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı yavaş, tersi söz konusu ise cevap zamanı hızlıdır.

Geriye dönme zamanı: Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. İdeal bir biyosensör hızlı geriye dönme zamanı özelliği göstermelidir.

Basitlik ve ucuzluk: İdeal bir biyosensörün tasarımı basit, maliyeti ucuz ve kullanımı kolay olmalıdır.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Biyosensör yapısında bulunan materyallerin küçültülebilmesi, biyosensör tasarımı açısından oldukça önemlidir. Biyosensörün sterilizasyonu ise ikinci bir önemli noktadır, ancak biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan bir etmen olarak karşımıza çıkar.

2.2. Çevirici türüne göre biyosensör çeşitleri

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (tanıyan) ile tayini gerçekleşecek olan analit (tanınan) arasında, sensör yüzeyinde bir etkileşme oluşur. Bu etkileşim, biyosensörlerde çoğu kez çok seçicidir. 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 algılar ve elektrik sinyaline çevirir.

2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler

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

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 yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir (36, 39).

2.2.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Yüzey Plazmon Rezonans (SPR), toplam iç yansıma koşulları altında düzlemsel–polarize ışığın metal yüzeye çarpması ile yürüyen fiziksel bir yöntemdir (5).

Toplam iç yansıma: Işık ışını yarım dairesel bir prizmaya çarptığında, yoğun bir ortamdan daha az yoğun ortama geçerken, düzlemin ara yüzeyi doğrultusunda kırılır. Geliş açısının değişmesi dışarıdan gelen ışığı, kritik açıya ulaşana kadar değiştirir. Bu noktada gelen ışığın tümü dairesel prizma

içerisinde yansır. Buna toplam iç yansıma (Total Internal Reflection, TIR) adı verilir.

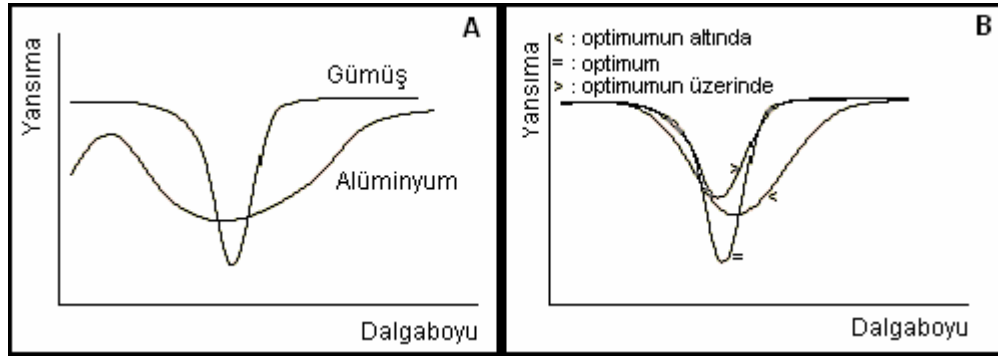
Yüzey plazmonları: Prizmanın, yansımanın gerçekleştiği tarafı ince bir metal film tabakasıyla kaplıdır. Çoğunlukla bu amaçla altın kullanılır. Çünkü altın uygun yansıma açısı ve dalgaboyu kombinasyonlarında SPR sinyali verir. Ayrıca altın biyolojik içerikli çözeltilere ve çözünen maddelere karşı kimyasal açıdan etkisizdir. Foton elektrik alanının enerjisi yeterli olduğunda, altın yüzeydeki elektronlarla etkileşime girer. Bu elektronlar dış kabuk ve geçiş bandı elektronlarıdır. Yansıyan ışık fotonları absorbe olur ve enerji yüzey plazmonlarına dönüşmek üzere elektronlara transfer olur (5).

SPR'nin dayandığı temel ilke:

SPR açısı ana olarak metal film tabakasının özelliklerine, yansıyan ışığın dalgaboyu ve metal filmin diğer tarafındaki ortamın kırılma indisine göre değişir (5). Kırılma indisi sıcaklığa duyarlı olarak değişir, buyüzden ölçümlerin uygun sıcaklıkta yapılması gerekir (78). Kırılma indisi çalışma ortamının yoğunluğundan etkilenmez (3).

Metal gelen ışık ile uygun bir dalgaboyunda etkileşime yatkın olan geçiş-bant elektronlarına sahip olmalıdır. Bu koşulları içeren metaller; gümüş, altın, bakır, alüminyum, sodyum ve indiyumdur. Buna ek olarak sensör yüzeyindeki metal okside olmamalıdır. Bu metallerden indiyumun çok pahalı, sodyumun çok reaktif, bakır ve alüminyumun çok geniş SPR açısına sahip olması ve gümüşün kolay okside olması nedeniyle altın en pratik metal olarak SPR cihazlarında tercih edilir.

Altın oksitlenmeye karşı çok dirençlidir fakat birçok kimyasal modifikasyon sistemleriyle çok uyumludur. Metalin kalınlığı çok büyük önem taşımaktadır. Optimum kalınlığın üzerinde bir tabakaya yansıyan ışık derin olmaz; optimum kalınlığın altında ise yansıyan ışık yayvanlaşır. Keskin bir dip elde etmek için ışık kaynağının monokromatik ve p-polarize (yüzeyin düzlemsel kısmında polarize olması) olması gerekmektedir. p-polarize olmayan tüm ışık kaynakları SPR'ye uygun olmayıp, yansıyan ışığın arka plandaki şiddetini de artırır (68).

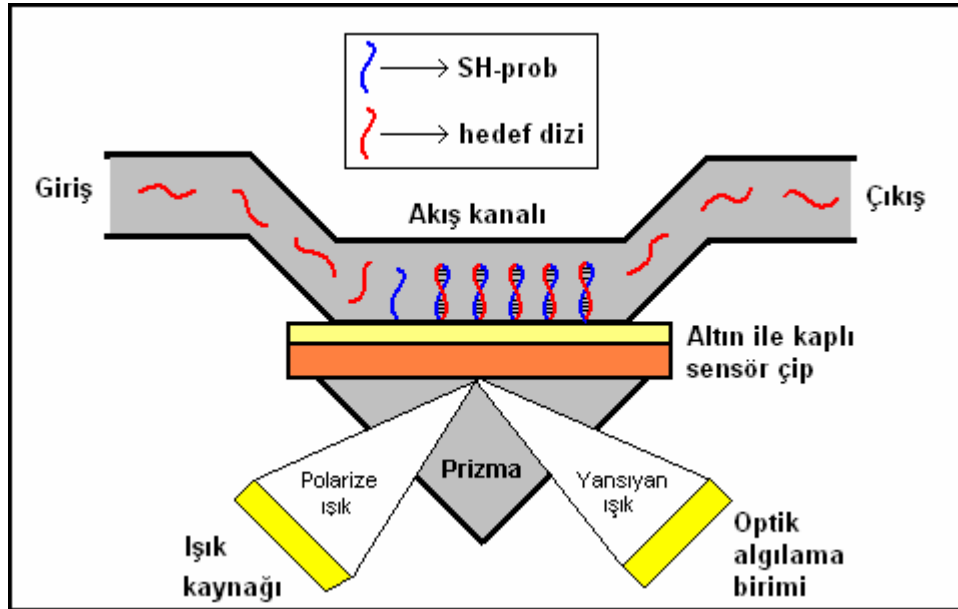


Şekil 12: A) Metal film olarak gümüş ve alüminyum kullanıldığında elde edilen dalgaboyuna karşı yansıma grafiği. **B)** Metal kalınlığının uygunluğuna göre dalgaboyuna karşı yansıma grafiği.

Deney öncesi metal yüzey, yansıyan ışık ve sıcaklık sabit tutulur, böylece SPR sinyali doğrudan SPR yüzeyinin sensör tarafındaki ortamın kırılma indisinin değişimine bağlı olarak değişir.

Kantitatif ölçümler:

Biyomoleküllerin sensör yüzeyine bağlanması sonucu kırılma açısı değişir ve bu değişim rezonans açısı veya rezonans dalgaboyu olarak ölçülür. Kırılma indisi bağlanan madde miktarıyla doğru orantılı olarak artar. Bazı SPR cihazları gerçek ölçüm değerini (açı veya dalgaboyu) isteğe bağlı olarak, gösterimi ve yorumu daha kolay olan bir değere çevirir. Kırılan ışıpta gerçek açının değiştiği bu birime Rezonans birim (RU) adı verilir (76).



Şekil 13: SPR'da altın kaplı sensör yüzeyinde DNA hibridizasyonunun şematik gösterimi.

2.2.3. Kütle hassas biyosensörler

Kütle hassas biyosensörlerde çevirici olarak piezoelektrik kristaller kullanılır. Rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimi ölçülür. Bu sebeple antikor–antijen

etkileşimlerinde sıkça kullanılır. Kütle hassas biyosensörlere Kuartz Kristal Mikrobals (Quartz Crystal Microbalance, QCM) örnek gösterilebilir (34).

2.3. DNA Biyosensörleri

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (60, 61, 73, 82, 95). DNA biyosensörleri, dizisi bilinen hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (61, 93) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin tayininde kullanılabilir (7, 93).

Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları:

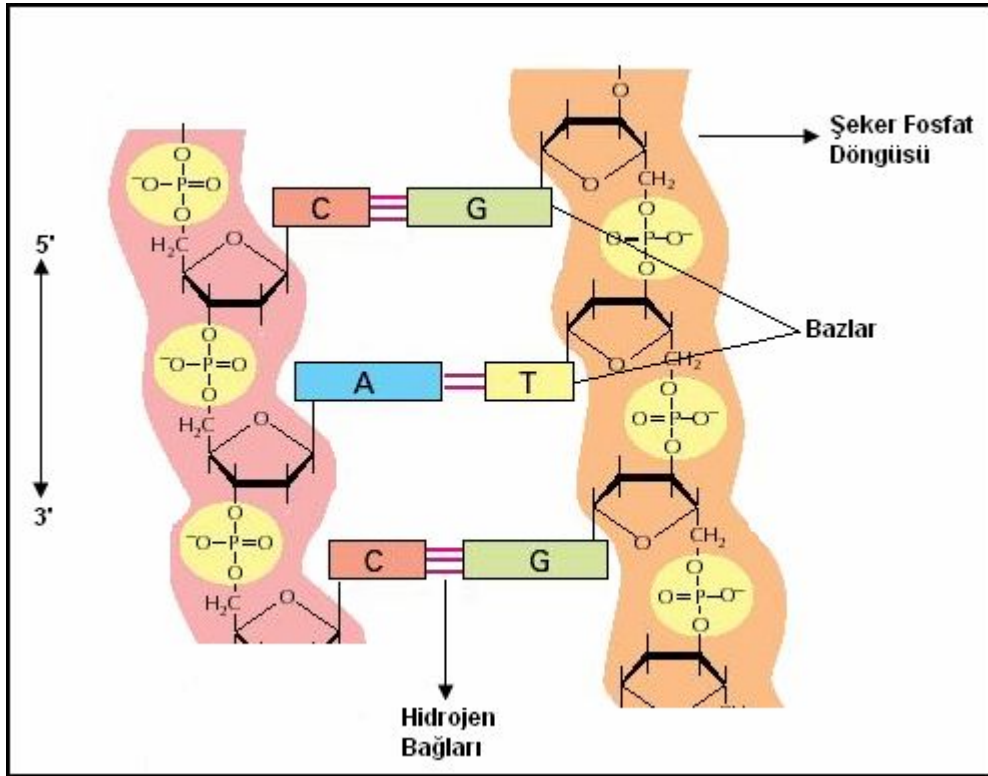
2.3.1. Nükleik asitler ve DNA

Nükleik asitler genetik bilgilerin kodlandığı makro moleküllerdir. Genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlarlar. İki tip nükleik asit vardır. Bunlar DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) olarak isimlendirilirler.

Bir nükleotidin yapısında şeker grubu, pürin veya pirimidin bazı ve fosfat grubu vardır. Belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin belirli bir diziliş sırasına göre 3'–5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucu nükleik asitlerin primer yapısı oluşur. Bu bağlanma şeker molekülünün 3' konumundaki karbonunun, kendinden sonra gelen nükleotidin şeker molekülünün 5' konumundaki karbonuna bağlanması ile gerçekleşir. Nükleik asit yapısındaki şekere göre deoksiribonükleik asit (DNA) ya da ribonükleik asit (RNA) adını alır.

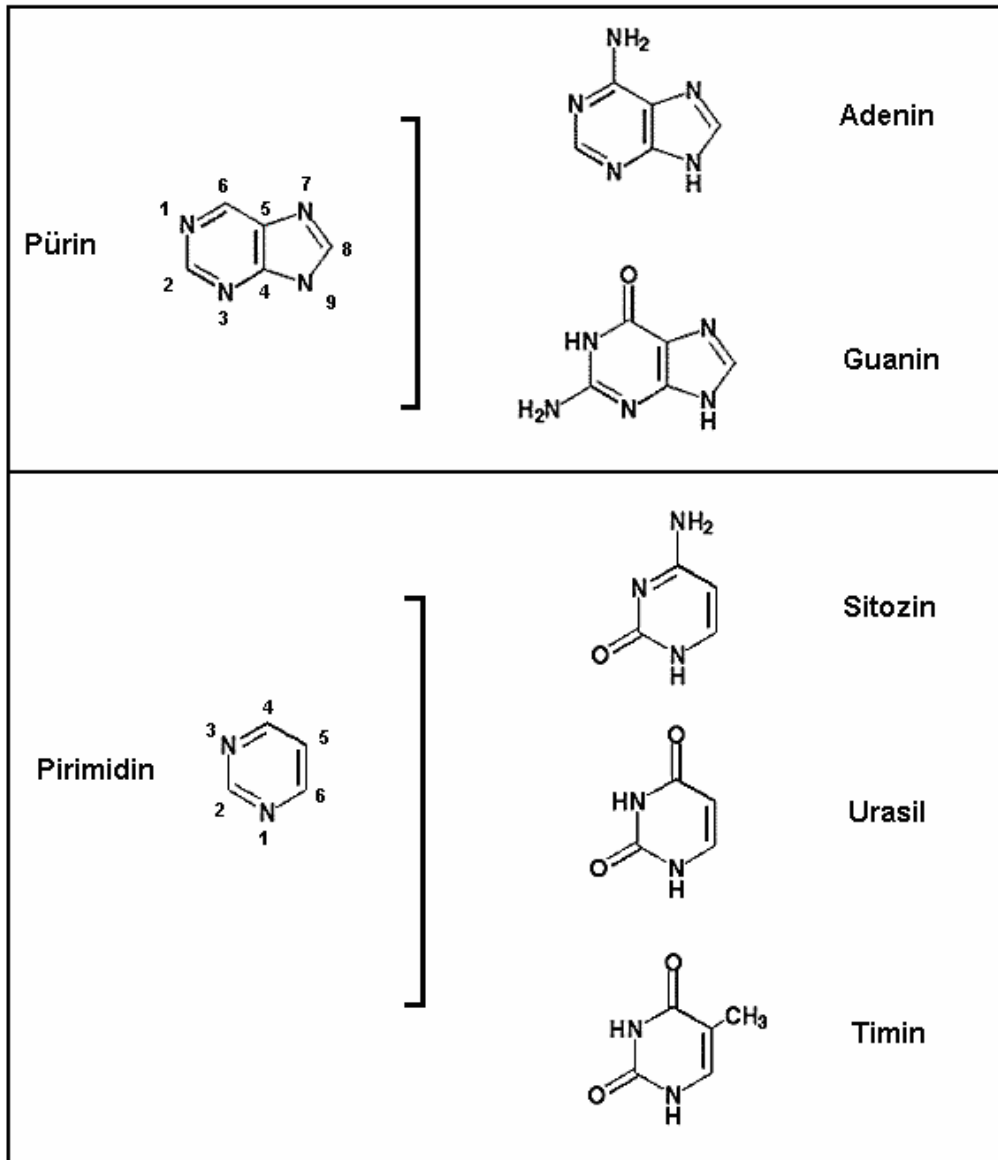
Nükleik asitlerin organik bileşikleri Pürin (Adenin, Guanin) ve Pirimidin (Urasil, Timin, Sitozin) bazlarıdır. Urasil pirimidin bazlarına dahil olup yalnızca RNA'da bulunur. Şeker grubu ise nükleik asitlerin ana omurgalarını oluşturduğu için pürin ve pirimidin bazları kadar önemli moleküllerdir. Polinükleotidler omurgada bulunan fosfat gruplarından dolayı asidik karakterlidir.

Chargaff tarafından ortaya konan DNA moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri, DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğunu göstermektedir. Buna dayanarak yapılan çalışmalarda 1950 yıllarında Watson, Crick ve Wilkins DNA yapısının çift zincirli heliks şeklinde bir yapı olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 14 DNA çift sarmalını göstermektedir. Bu zincirler boyunca pürin ve pirimidin bazları bulunmaktadır ve bu bazlar karşılıklı hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır. Pürin ve pirimidin bazları çift sarmal boyunca karşılıklı olarak birbirleriyle spesifik olarak bağlanırlar. Buna göre yapıda; Adenin (A) ile Timin (T), Guanin (G) ile de Sitozin (C) baz çiftlerini oluşturur. Bu sayede, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi de bulunabilmektedir. A-T baz çiftinde iki, G-C çiftinde üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Bazlar arasında bulunan bu hidrojen bağları zayıf olduklarından DNA molekülü ısıtıldığında bu bağlar kolaylıkla açılır ve DNA'nın çift zincirli heliks yapısı bozulur. Bu olaya denatürasyon adı verilir. Denatüre olan DNA uygun şartlar sağlanırsa tekrar çift zincirli hale gelebilir. Bu olaya da renatürasyon adı verilir (19, 20, 83).

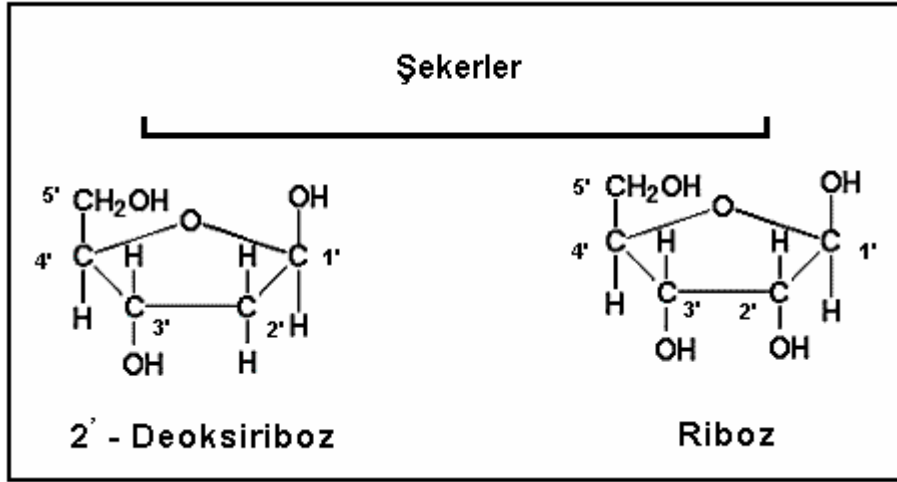


Şekil 14: DNA çift sarmalı.

Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri $5' \rightarrow 3'$ yönüne doğru, diğeri ise $3' \rightarrow 5'$ yönüne doğrudur. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Çift sarmalın dış yüzeyinde zincirler bulunmaktadır.



Şekil 15: Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması.



Şekil 16: Nükleik asitte bulunan şekerlerin kimyasal yapısı.

2.3.2. Peptik nükleik asitler (PNA)

DNA'nın omurgasını oluşturan negatif yüklü deoksiriboz–fosfat omurgasının, amit bağları ile bağlı peptide benzer, nötral bir yapıyla değiştirilmesi sonucu PNA'lar elde edilir. PNA, bir DNA analogudur. Negatif yüklü iki DNA yapısı hibridizasyona dayalı çalışmalarda elektrostatik olarak birbirini iter. PNA nötral yüklü olduğu için bu dezavantajı ortadan kaldırır. Ayrıca PNA'lar sıcaklığa ve enzimlere dayanıklıdır. Yüksek ısılarda denatüre olmazlar.

2.3.3. DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları

2.3.3.1. DNA baz dizilerinin yazılımı ve bazı terimler ile ilgili temel bilgiler

Aşağıda DNA baz dizilerinin yazılımı ve bazı terimler ile ilgili temel bilgiler hakkında kısa bilgiler verilmiştir (19, 20).

Oligonükleotid: Birden çok nükleotidin yanyana gelmesiyle oluşan yapıya oligonükleotid denir.

Dinükleotid: İki nükleotidin yanyan gelmesiyle oluşan yapıya denir.

Trinükleotid: Üç nükleotidin yanyana gelmesiyle oluşan yapıya denir.

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

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: Tekrarlayan baz çiftlerinden oluşan ve 5'→3' polaritesine sahip polimerlerdir. Nokta ile ayrılarak ifade edilirler. Örneğin mononükleotid gösterilişine, **poly(A).poly(T)** (veya **poly(dA).poly(dT)** şeklinde gösterilebilir), dinükleotide **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotide **poly(CAT).poly(ATG)** örnek verilebilir.

Baz çifti: Baz çifti, birbirinin karşılığı olan iki baz anlamına gelir. Bazların arasına nokta konularak ifade edilir. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

Prob: Sahip olduğu baz dizilimi bilinen oligonükleotid.

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

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch): Bir bazı veya birden fazla bazı hedef diziye karşılık gelmediği için, hedef diziyle tam olarak eşleşemeyen oligonükleotid.

Rasgele dizi (Non-complementary): Tüm bazıları hedef diziye karşılık gelmeyen oligonükleotid.

Mutasyon: Nükleik asitlerdeki bazı dizilerinde tabii yollarla yada kimyasal veya radyoaktif herhangi bir mutajen ajan vasıtasıyla meydana gelen değişimlere mutasyon adı verilir. Farklı insan genomlarında yaklaşık her 200 nükleotidte bir nükleotid farklıdır buna polimorfizm denir. DNA replikasyonu, fiziksel veya kimyasal etmenler ile DNA'da kalıcı hasarlar ortaya çıkmaktadır.

DNA'daki bir yada birkaç bazı ile ortaya çıkan mutasyona **nokta mutasyonu** adı verilir. Tek bir bazda oluşan nokta mutasyonu en yaygın görülen türüdür. Bu durum herhangi bir bazın kendi tamamlayıcısı olan baz dışındaki bir bazı ile birleşmesi ile meydana gelir.

Gen: Kalıtımın temel, fiziksel ve işlevsel birimidir. Ortalama 1500 nükleotidten oluşmuş canlının kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşır. Her gen, protein veya RNA molekülü gibi özel bir işlev taşıyan kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden oluşur.

2.3.3.2. Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu

Nükleik asit hibridizasyonu, karşılığı olan baz çiftlerinin, özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dubleks molekül oluşturması işlemidir (4).

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 (41, 65, 66, 67).

PCR, yaklaşık 30 jenerasyon sonra, seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar. Bu sebeple PCR’ye, DNA çoğaltma yöntemi de denebilir (41).

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

3.1.1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA

PCR'de 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 ipliğı 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'de 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 oligonükleotitten 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 dörtlü 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 MgCl₂

PCR'de kullanılmak üzere genellikle önerilen tampon 20°C'de 10-50mM Tris-HCl'dir. Tris ısısal döngüsü esnasında pH'ı 6.8-7.8 arasında değişen dipolar iyonik bir tampondur. Mg²⁺ 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. Mg²⁺ iyonunun düşük derişimde olması ürün oluşumunun

azalmasına, yüksek derişimde olması ise spesifik olmayan ürün birikimine sebep olur.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun işleyişı

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 iplikçiğinin birbirinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi işlemidir. Hedef DNA'nın denatürasyonu 95⁰C'de gerçekleştirilir. PCR için etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95⁰C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonu gerçekleştirilecek metaryelin türüne göre bu ısı işlemi 3–5 dakika kadar uygulanır.

3.2.2. Primerlerin bağlanması (Annealing)

Bu basamakta sıcaklık 55-60⁰C'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 konsantrasyon ve uzunlukları primer eşleşmesi için gereken ısı ve süreyi belirler. PCR'nin 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;

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

T_m değeri hesaplandıktan sonra bu sıcaklığın $5^{\circ}C$ altı uygulanabilir eşleşme ısısı olarak saptanır ve daha sonra optimum sıcaklık değeri denemelerle saptanır.

3.2.3. Uzama

Bu basamakta sıcaklık TaqDNA polimerazın çalıştığı sıcaklık olan $70-72^{\circ}C$ 'ye çıkarılır. Hedef DNA dizisinin kopyası TaqDNA polimerazın nükleotidleri primerlerin 3' ucuna yerleştirmesiyle gerçekleşir. Uzama, bağlanma gerçekleştikten sonra başlar. Sıcaklık $70^{\circ}C$ 'ye geldiğinde termal DNA polimerazlar en aktif hale geçerler ve baz uzaması 100 baz/saniye'ye ulaşır.

Uzama aşamasında genellikle $72^{\circ}C$ '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^{20} kat ürün meydana gelir.

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihazlar

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

Terazi (Sartorius-Analytic A-200)

Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)

pH-metre (Schott-Mainz CG 710)

Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag ve ARE 2-Velp)

Potansiyostat; AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda)

Ag/AgCl referans elektrot

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Cihazı; (Nomadics)

Pompa; (Goldman, Biasis, AR03)

Altın sensör; (TSPR1K23, Texas Instruments, ABD)

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)
- Di potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) (Riedel-de Haen)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Riedel-de Haen)
- Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Riedel-de Haen)

- Trizma hidroklorik asit (Trizma-HCl) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
- Etanolamin hidro-klorür (Sigma)
- N-Hidroksisüksinimid (Sigma)
- Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (Sigma)

- 1-Naftl Fosfat disodyum tuzu (Sigma)
- ExtrAvidin–Alkalen Fosfataz (Sigma)
- tri–Sodyum sitrat dihidrat (Merc)
- Sodyum dodesil hidrat tuzu (Merc)
- EDTA
- Tween 20 (Merck)
- 6–merkapt–1–hekzanol (Aldrich)

Tüm çalışmalarda Mili Q distile su (18 Mega–ohm’ luk) kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25,0 ± 0,5) °C’ de gerçekleştirildi.

2.3. Kullanılan DNA dizileri

Çalışmada kullanılan tüm sentetik diziler (S1, S2, S3, S4, S5) liyofilize toz halinde TIB Molbiol (Almanya) ’dan sağlandı. Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine ait PCR ürünü örnekleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan sağlandı.

2.3.1. Kullanılan sentetik prob diziler

Prob 1

5' NH₂ – (CH₂)₆ – CAT GAA TTG GCT CAG CTG GCT G – 3'

Prob 2

5' NH₂ – (CH₂)₆ – AG CGG GTT GTT CTG GTC CAT GAA – 3'

Prob 3

5' NH₂ – (CH₂)₆ – GGT CAA CCC CGA CAG CGG GTT – 3'

5' SH – (CH₂)₆ – GGT CAA CCC CGA CAG CGG GTT – 3'

Prob 4

5' NH₂ – (CH₂)₆ – CGA CAG TCG GCG CTT GTG GGT CAA – 3'

Prob 5

5' NH₂ – (CH₂)₆ – G CCC CAG CGC CGA CAG TCG – 3'

2.3.2. Kullanılan sentetik hedef dizi

5' – CAGCCAGCTGAGCCAA TTCATG GACCAGAAC AACCCGCT GTCGGG
G TTGACC CACAAGCGC CGACTGTCG GCGCTGGGGC – 3'

2.3.3. Kullanılan PCR ürünü hedef dizi

5'biotin-CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAA
CATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCAC CAGCCA
GCTGAGCCAA TTCATG GACCAGAAC AACCCGCT GTCGGGG TTGACC CA
CAAGCGC CGACTGTCG GCGCTGGGGCCGGCGGTCTGTACGTGAGC
ACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGG
CCCAACATCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCTGGTGTACGCGCGGGTCAAC
CCGTTCTGGGTTTCATCGAAACG-3'

2.4. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

2.4.1. Tampon çözeltilerinin hazırlanışı

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında Mili Q distile su kullanıldı. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra plastik şişelerde, buzdolabında saklandı. İyonik şiddeti sağlamak için fosfat ve tris–HCl tampon çözeltilerine litresine derişimi 0,02M olacak şekilde 1,168g NaCl eklendi.

0,05M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH:7,4)

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36g (0,01 mol) KH_2PO_4 ve 6,96g (0,04 mol) K_2HPO_4 içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pH metre ile 7,4'e ayarlanır.

0,02M Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH:7,0 ve 9,6)

Kullanılan 0,02M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3,152g (0,02 mol) Trizma HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7,0 ve 9,6 değerlerine ayarlanması, 0,1N NaOH ve / veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

1M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH:3,8)

Altın yüzeye tutturulan prob çözeltisinin hazırlandığı 1M fosfat tampon çözeltisi litresinde 136,09g KH_2PO_4 içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 3,8 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0,1N NaOH veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir (42, 56, 99).

Mycobacterium Tuberculosis bakterisinin rifampine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının 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 0,05M fosfat tampon çözeltisinde (pH:7,40) hazırlandı (44, 45).

SPR ile Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayininde kullanılan hibridizasyon tamponunun hazırlanışı

Hibridizasyon tamponu litresinde 3,56g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20mM), 37,2mg EDTA (0,1mM), 8,77g NaCl (150mM) ve 52 μL Tween 20 (%0,005) içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0,1N NaOH veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir (42, 56, 99).

Yıkama tamponunun hazırlanışı

Yıkama tamponu litresinde 15mM olacak şekilde 4,412g sodyum sitrat, 0,5M olacak şekilde 29,22g NaCl ve %0.1 olacak şekilde 1g sodyum dodesil hidrat tuzu içermektedir. Tampon 0,02M Tris HCl tampon çözeltisinde (pH:7,0) hazırlandı (43).

2.4.2. DNA dizilerinin hazırlanışı

2.4.2.1. Sentetik prob ve hedef dizi çözeltilerinin hazırlanışı

Mycobacterium tuberculosis rifampin *rpoB* direnç mutasyonu analizi ve SPR ile *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini için kullanılan prob ve hedef dizi stok çözeltileri 1000 µg/mL derişiminde ultra saf su ile hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

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

$$n \text{ (mol)} = M \text{ (kütle) g} / MA \text{ (molekül kütlesi) g/mol}$$

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

$$M \text{ (Molarite)} = M \text{ (kütle)} / [MA \text{ (molekül kütlesi)} \times V \text{ (hacim)}] = \text{mol /L}$$

Elektrokimyasal yöntemde kullanılan prob diziler, 50mM fosfat tampon çözeltisi (pH:7,4) kullanılarak hazırlandı. SPR ile yapılan çalışmada kullanılan prob diziler 1M fosfat tampon çözeltisi (pH:3,8) kullanılarak, sentetik hedef diziler ise hibridizasyon tamponu (pH:7,4) kullanılarak hazırlandı (44, 45, 46).

2.4.2.2. PCR ürünü örneklerinin hazırlanışı

Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından kültürde üretilmiş, *M.tuberculosis* izolatlarından ekstrakte edilen DNA'nın *rpoB* geninin 329 bp'lik bölümü (5'biotin-CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACAC-3') ve (5'-CGTTTCGATGAACCCGAACGGGTTGAC-3') primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi (12, 13, 14). Bu ürünler hibridizasyon tamponu ile uygun

derişime seyreltilip, hibridizasyondan önce denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi.

2.4.3. Kovalent bağlama çözeltisinin hazırlanışı

Kullanılan kovalent bağlama çözeltisi, 8mM NHS ve 5mM EDC olacak şekilde litresinde 0,921g NHS ve 0,959g EDC içermektedir. Çözelti Mili Q distile su ile hazırlandı (44, 45, 46).

2.4.4. Etanolamin hidro-klorür çözeltisinin hazırlanışı

Etanolamin hidro-klorür çözeltisi, 0,1M olacak şekilde litresinde 9,76g etanolamin hidro-klorür içermektedir. Çözelti 0,05M fosfat tampon çözelti içerisinde (pH:7,40) hazırlandı.

2.4.5. ExtrAvidin–AF çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti, 0,05M fosfat tampon çözeltisi (pH:7,40) ile 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlandı (86).

2.4.6. 1–NF disodyum çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti, 0,02M Tris HCl tampon çözeltisi (pH:9,60) ile litresinde 1g 1–NF disodyum tuzu içerecek şekilde hazırlandı (17).

2.4.7. 6–merkapt–1–hekzanol çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti, etanol:su (75:25) karışımında, litresinde 140µL 6–merkapt–1–hekzanol içerecek şekilde hazırlandı (42, 56, 99).

2.5. Kullanılan yöntem

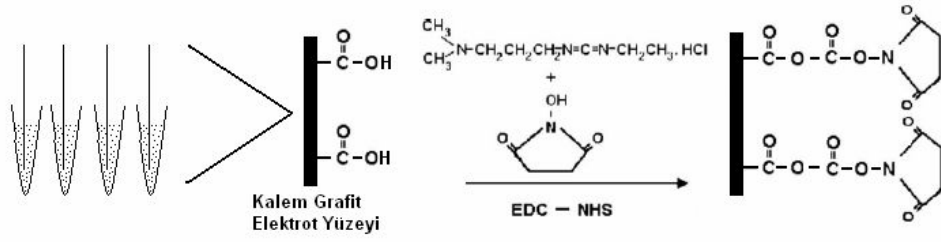
2.5.1. Mycobacterium Tuberculosis bakterisinin rifampine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal yoldan saptanması

Tasarlamış olduğumuz genosensör ile Mycobacterium tuberculosis rifampin direnç mutasyonu analizi için kullanılan yöntem basamakları sırasıyla şekil 17 ve şekil 18’de şematize edilmiştir.

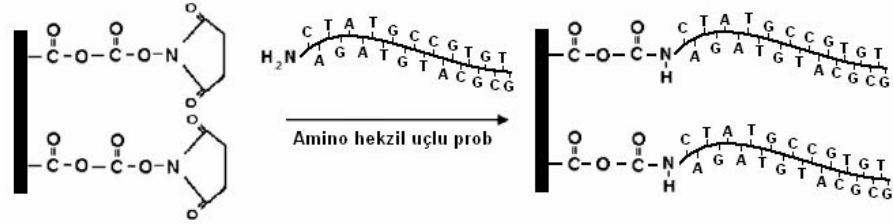
Tayin için belirtilen aşamaların uygulanması için gerekli süreler aşağıdaki gibidir:

- PGE yüzey kaplanması (kovalent bağlama çözeltisi ile) 60 dakika
- Prob tutturulması, 60 dakika
- Etanolamin hidro-klorür kaplanması, 60 dakika
- Denatürasyon, 10 dakika
- Hibridizasyon, 30 dakika
- Yıkama, 10 dakika
- ExtrAvidin–AF tutturma, 30 dakika
- 1–NF disodyum tutturma, 20 dakika
- Ölçüm, 1 dakika

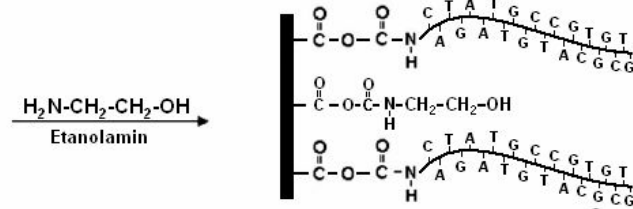
- Kovalent ajanlarla kaplama



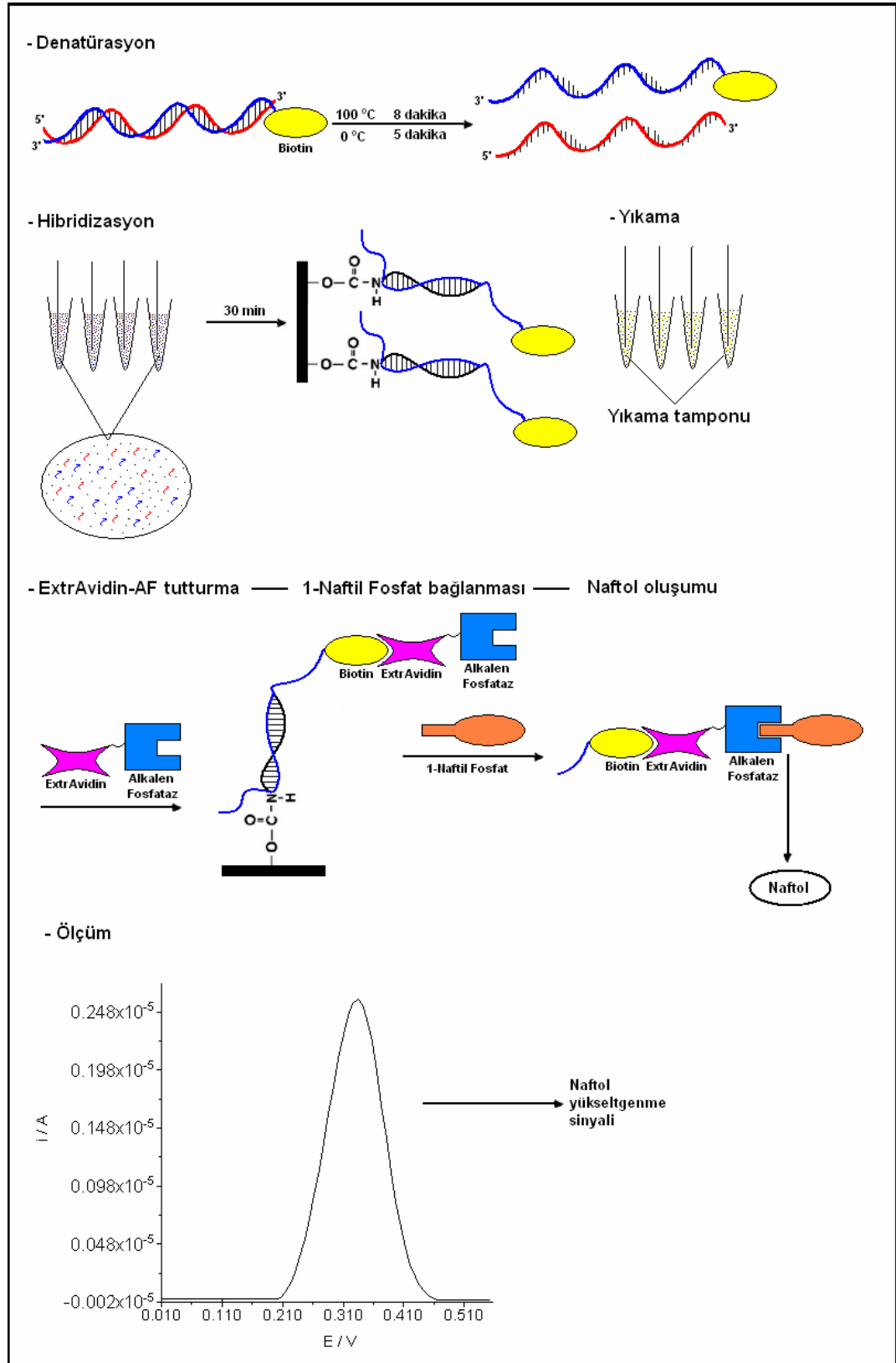
- Prob bağlama



- Etanolamin bağlama



Şekil 17: Kalem grafit elektrotların kovalent ajanlarla kaplandıktan sonra yüzeye sırasıyla prob dizi ve etanolamin tutturulması.



Şekil 18: Denatüre edilmiş PCR ürünü hedef dizisinin prob dizi ile hibridizasyonunun ardından sırasıyla ExtrAvidin–AF ve 1–NF bağlanma basamakları ve buna bağlı oluşan naftole ait yükseltgenme sinyali.

2.5.1.1. Elektrotların hazırlanışı

Çalışmamızda çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (Noki kalem model 2000, Japonya) 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 içine yerleştirildi (26, 27, 46, 47, 71, 90, 91). Her bir parametre için farklı grafit yüzeyler oluşturularak tek kullanımlık elektrot sistemi sağlandı.

2.5.1.2. Elektrot yüzeylerinin kovalent bağlama çözeltisi ile kaplanması

Mycobacterium tuberculosis prob dizilerinin PGE yüzeylerine tutunabilmesi için elektrotlar kovalent bağlama çözeltisi ile kaplandı. Bu amaçla taze hazırlanmış 8mM N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 5mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC) içeren yüzey kaplama çözeltisi içinde elektrotlar 1 saat bekletildi (40, 46, 47, 53).

2.5.1.3. Elektrot yüzeylerine prob bağlanması

0.05M fosfat tamponu (pH:7,40) içinde hazırlanmış 5 farklı prob dizisini içeren çözeltiler hazırlandı. Yüzeyi kovalent ajanlarla kaplanmış olan elektrotlar 10µg/mL (ppm) prob çözeltisi içerisinde 1 saat bekletildi (44, 46).

2.5.1.4. Elektrot yüzeyindeki boşlukların etanolamin hidro–klorür ile kaplanması

5 farklı prob dizisi ile kaplanmış olan elektrotlar, 0,05M fosfat tamponu (pH:7,40) içinde hazırlanmış, 0,1M etanolamin çözeltisi içerisinde 1 saat bekletildi.

2.5.1.5. PCR örnekleri ile hibridizasyon

Çift iplikli halde olan ve biotin işaretli PCR ürünleri, hibridizasyon tamponu ile derişimi 20 µg/mL olacak şekilde seyreltildi ve hibridizasyona uygun olması için denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi (43). Denatürasyon işlemi için ürünler 8 dakika kaynar su banyosunda (95⁰–100⁰C) tutularak ipliklerin birbirinden ayrılması, ardından ayrılan ipliklerin kendi üstüne tekrar bağlanmasını engellemek amacıyla 0⁰C buz banyosunda 5 dakika bekletilerek prob ile hibridizasyona uygun tek iplikli diziler elde edildi.

Denatürasyondan sonra yüzeyleri prob ve etanolamin hidro–klorür kaplı elektrotlar, hedef çözelti içerisinde 30 dakika bekletilerek hibridizasyon sağlandı.

2.5.1.6. Yıkama

Hibridizasyondan sonra, elektrot yüzeylerinden bağlanmayan ya da mutasyon içerdiği için hibridizasyon sonucu iyi bağlanmamış zayıf hibritleri yüzeyden uzaklaştırmak için elektrotlar, yıkama tamponu içerisinde 10 dakika bekletilerek yıkandı.

2.5.1.7. ExtrAvidin–AF tutturulması

Hibridizasyon sonucu oluşan çift sarmalın ucunda bulunan biotine bağlanması için elektrotlar 0,05M fosfat tampon çözeltisi (pH:7,40) ile 1:1000 oranında seğretilmiş Extravidin–AF çözeltisi içerisinde 30dakika bekletildi.

2.5.1.8. 1–NF bağlanması

Naftol oluşumunu sağlamak amacıyla elektrotlar, 0,02M Tris–HCl tamponu (pH:9,60) ile hazırlanmış olan 4mM 1–NF çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletildi.

2.5.1.9. Voltametrik ölçüm

Elektrot yüzeyinde hibridizasyon sonrası meydana gelen çift iplikli DNA ucunda oluşmuş olan naftolün, diferansiyel puls voltametri tekniği ile 0 V'dan 0.8V' a kadar, 15 mV / s tarama hızında, 50 mV genlik kullanarak, 20mM NaCl içeren, 0.05M'lık fosfat tamponu (pH = 7,40) içinde yükseltmesine ait pik akımı ölçüldü. 0.33V civarında naftol yükseltmeye sinyali görüldü.

2.5.2. SPR ile Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayini

Tasarlamış olduğumuz genosensör ile Mycobacterium tuberculosis bakterisinin analizi için kullanılan yöntem basamakları ve bu basamakların uygulanması için gerekli süreler aşağıdaki gibidir:

- Altın yüzeyinin temizlenmesi, 20 dakika
- Prob tutturulması, 120 dakika
- Merkaptotetrazol kaplanması, 60 dakika
- Hibridizasyon, 30 dakika

- Yıkama, 20 dakika

2.5.2.1. Sensör yüzeyinin temizlenmesi

Çalışmada sensör olarak TSPR1K23 altın sensör kullanıldı. Sensör yüzeyine 10µL pirana çözeltisi [$H_2SO_4:H_2O_2$ (3:1)] pipetlendikten sonra 10 dakika bekletildi. Daha sonra sensör distile su ile yıkandı. Tekrar pirana çözeltisi pipetlenip 10 dakika bekletildikten sonra bol distile su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.5.2.2. Altın yüzeye prob bağlanması

Temizlenen sensör SPR cihazına takıldıktan sonra prob çözeltisinin hazırlanacağı tampon olan 1M KH_2PO_4 (pH:3:8), sistem sabitlenene kadar altın sensör yüzeyinden geçirildi. Daha sonra aynı tamponda 1ppm olacak şekilde hazırladığımız tiyol işaretli sentetik prob dizinin 5µL/dk hızda, 2 saat boyunca altın yüzeye bağlanması sağlandı (42, 56, 99).

2.5.2.3. Altın yüzeye 6–merkapt–1–hekzanol bağlanması

Bağlanan prob dizilerin arasındaki boşlukları doldurmak üzere etanol:su (75:25) karışımında hazırlanmış 1mM merkapt hekzanol çözeltisi 1 saat boyunca altın yüzeyinden geçirildi (42, 56, 99).

2.5.2.4. Hibridizasyon

Hibridizasyonun gerçekleştiğini anlamak için hedef çözeltiyi vermeden önce sistem dengeye gelene kadar sensör yüzeyinden hibridizasyon tamponu geçirildi. Daha sonra aynı tamponda 2ppm olacak şekilde

hazırladığımız sentetik hedef dizinin 5µL/dk hızda, 30 dakika boyunca prob dizi ile hibridizasyonu sağlandı (56).

2.5.2.5. Yıkama

Hibridizasyonun ardından yine hibridizasyon çözeltisi ile yıkama yapılarak bağlanmayan dizilerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı.

2.6. Mycobacterium Tuberculosis bakterisinin rifampine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal yoldan saptanmasında incelenen parametreler

Yapılan çalışmaların tümü, rpoB geninde direnç mutasyonlarının tayini için, en uygun hibridizasyon ve mutasyon ayırımı koşullarının saptanmasına yöneliktir.

Çalışma kapsamında prob diziler ile bu dizilere karşılık gelen bölgelerin bulunduğu PCR ürünü hedef diziler ve tüm bazları hedeften farklı rasgele hedef diziler hibridizasyona tabi tutulmuş ve alınan yanıtlar arasındaki farklılanmadan yararlanılmıştır. Hibridizasyondan sonra PCR ürünü hedef dizi ile yüksek bir sinyal alınması beklenirken tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile düşük bir sinyal alınması beklenir. Her iki dizi ile alınan yanıtların oranı genosensörün seçimliliğinin göstergesidir.

En uygun mutasyon ayırım koşullarının saptanması ise; belirli bir bölgesinde mutasyon içeren bir PCR ürünü hedef dizinin prob diziler ile hibridizasyonu ile mutasyonun en iyi gözleendiği koşulların seçilmesidir. Mutasyon içermeyen bölgeler ile bu bölgelere karşılık gelen problemlerin hibridizasyonu sonrasında, naftolün yükseltgenmesine ait pik akımının

yüksek olduğu; mutasyon içeren bölgeye karşılık gelen prob dizi ile hibridizasyon sonrasında ise en düşük sinyalin elde edildiği koşullar saptanır.

2.6.1. Mutasyon analizlerinin saptandığı en uygun koşullar

2.6.1.1. Yıkama zamanının mutasyon analizine etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada PCR ürününün S3 ve S4 bölgelerine karşılık gelen prob dizilerinin, PCR ürünün denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş, S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren hedef dizi ile hibridizasyonu gerçekleştirildi. Hibridizasyondan sonra 5, 10, 15, 30 ve 60 dakika gibi farklı süreler kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi ve alınan naftol yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle en uygun yıkama zamanı saptandı.

2.6.1.2. ExtrAvidin–AF’nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada PCR ürününün S4 ve S5 bölgelerine karşılık gelen prob dizilerinin, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş, S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren biotin işaretli PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyonu sağlandı ve ardından uygun sürede yıkama gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra elektrotlar, 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika gibi farklı süreler boyunca ExtrAvidin–AF çözeltisi içerisinde bekletildi. Daha sonra alınan naftol yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle en uygun bağlanma süresi saptandı.

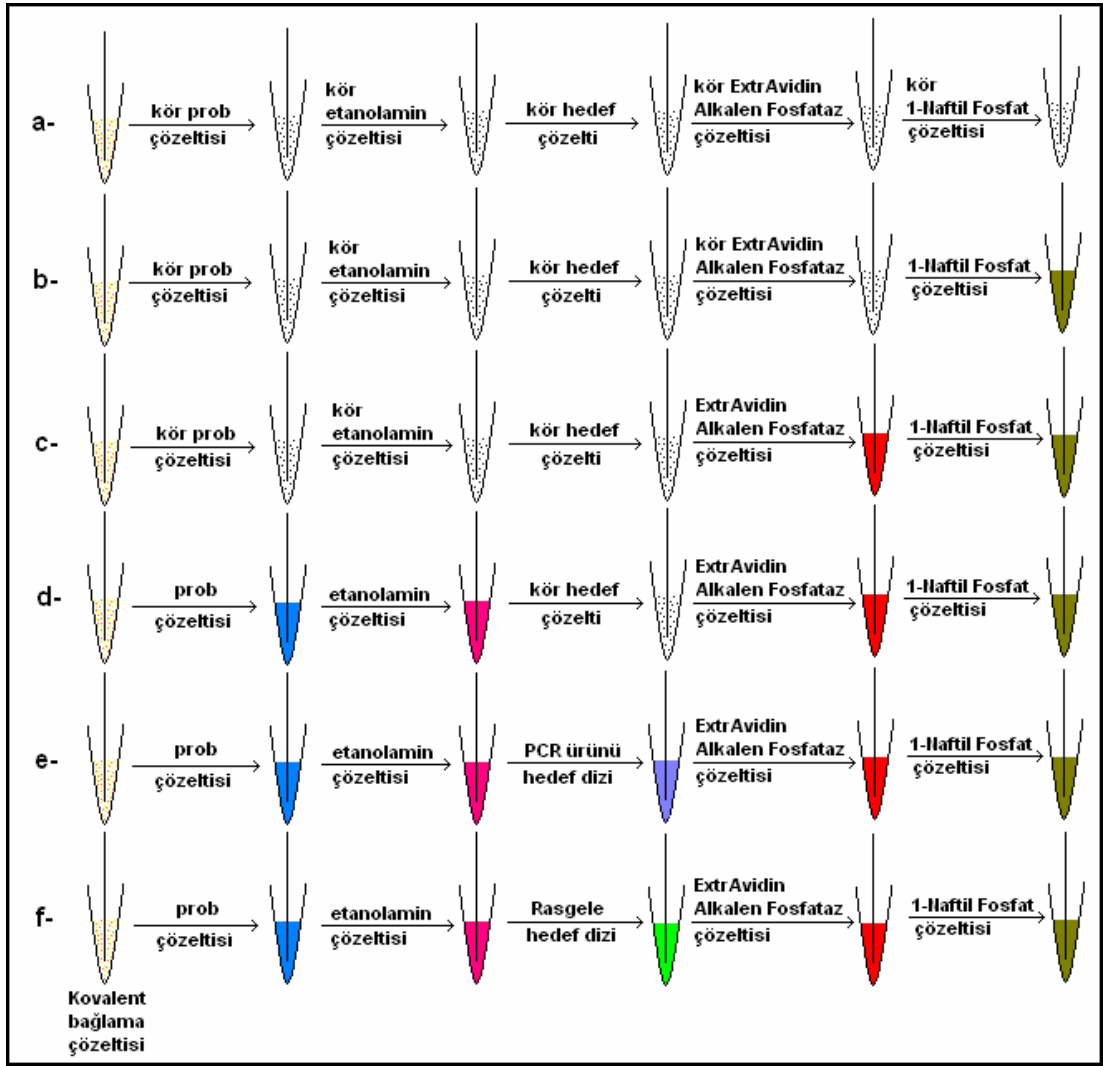
2.6.1.3. 1–NF'nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada PCR ürününün S3 ve S4 bölgelerine karşılık gelen prob dizilerinin, PCR ürününün denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş, S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren hedef dizi ile hibridizasyonu gerçekleştirildi. Yıkama işlemi ve ExtrAvidin–AF bağlanması gerçekleştirildikten sonra elektrotlar, 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika gibi farklı süreler boyunca 1–NF çözeltisi içerisinde bekletildi. Daha sonra alınan naftol yükseltgenme sinyalleri arasındaki farklılıkların incelenmesiyle en uygun bağlanma süresi saptandı.

2.6.2. PCR ürünleri kullanılarak Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayini

PCR ile çoğaltılmış gerçek hedef diziler denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi. Herbiri direnç mutasyonu içermeyen bölgesine karşılık gelen bir prob dizi ile hibridizasyona tabi tutuldu. Analizin güvenilirliğini sağlamak amacıyla çeşitli basamaklarda kör çözeltiler kullanılarak ve hibridizasyon basamağında Hepatit B virüsüne (HBV) ait rasgele bir hedef dizi de kullanılarak analizler yapıldı.

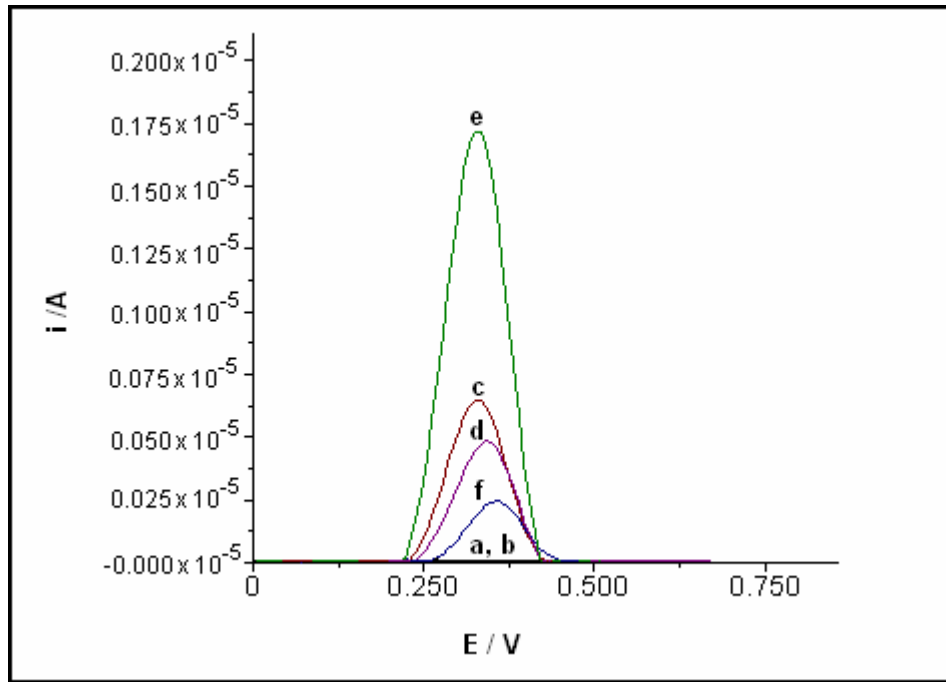
Şekil 19'da PCR ürününün S1 bölgesine karşılık gelen prob dizisi ile PCR ürünü hedef dizi ve rasgele hedef dizilerinin hibridizasyonu bulunmaktadır. Aynı zamanda çeşitli basamaklarda kör çözeltiler kullanılmıştır.



Şekil 19: Çeşitli basamaklarda kör çözeltiler kullanılarak S1 bölgesine karşılık gelen prob dizisi ile PCR ürünü hedef dizi ve rasgele hedef dizilerinin hibridizasyonuna ait basamaklar.

Şekil 20’de ise Şekil 19’da uygulanan çalışma basamakları sonucunda oluşan naftol yükseltgenme sinyallerine ait voltamogram görülmektedir. Buradan anlaşıldığı gibi, tüm basamaklarında kör çözeltilerin kullanıldığı **(a)** ve sadece son basamağında 1–NF kullanılan **(b)** basamakların bulunduğu çalışmada naftol yükseltgenme sinyalleri sıfıra yakın değerlerdedir. Kör

çözeltiler kullanılması nedeniyle elektrot yüzeyinde kaplama bulunmayan (c)'de ExtrAvidin–AF boş yüzeye bağlandığı için naftol yükseltgenme sinyalinde hafif bir artış meydana gelmiştir. Hibridizasyon basamağında kör ve rasgele hedef dizilerin kullanıldığı (d) ve (f)'de ise naftol yükseltgenme sinyalleri, PCR ürünü hedef dizinin kullanıldığı (e)'ye göre oldukça düşüktür.



Şekil 20: Şekil 19'da uygulanan çalışma basamakları sonrası oluşan naftolün yükseltgenmesine ait voltamogram.

2.6.3. PCR ürünleri kullanılarak direnç mutasyon analizi

PCR ile çoğaltılmış gerçek hedef diziler denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi. Herbiri direnç mutasyonu içeren bölgesine ait prob dizisi ve mutasyon içermeyen bölgelerine karşılık gelen bir prob dizi ile hibridizasyona

tabi tutuldu. Çalışma boyunca yöntem 2.6.2'deki çalışma basamakları sırasına uyuldu.

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1. Mycobacterium Tuberculosis bakterisinin rifampine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal yoldan saptanmasına ait bulgular

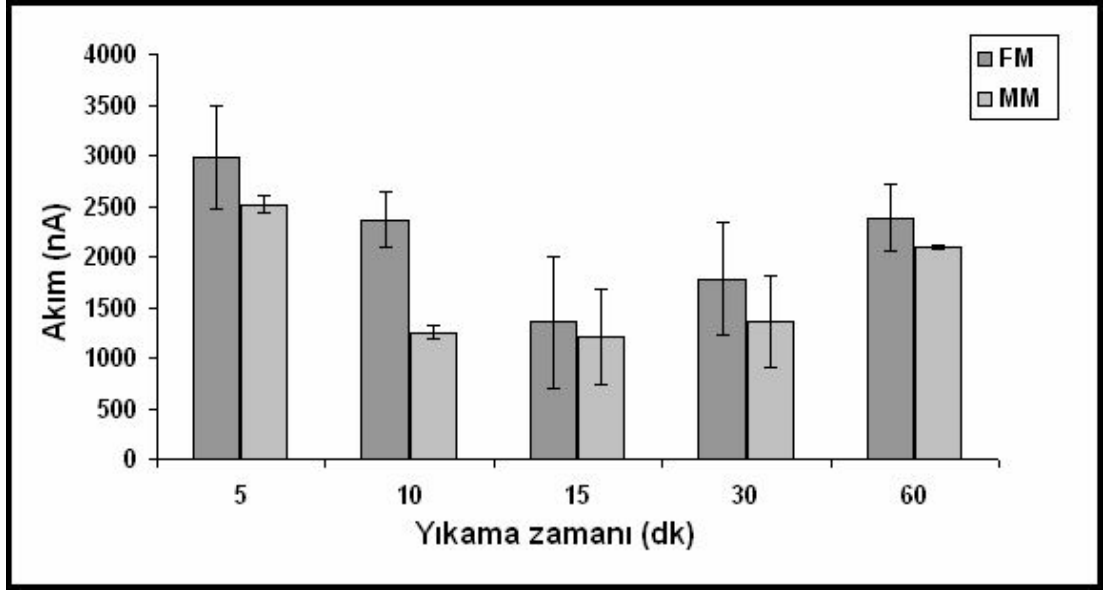
3.1.1. Mutasyon analizlerinin en uygun koşullarının saptanmasına ait bulgular

3.1.1.1. Yıkama zamanının mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular

Bu çalışmada S3 ve S4 problemleri ile kaplı elektrot yüzeyinde, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş ve 531. kodunda TCG'nin TTG'ye dönüşmesiyle S4 prob dizisinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içeren örnek hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyonunun ardından 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalık yıkamaların ve diğer çalışma basamaklarının uygulanmasından sonra alınan naftol yükseltgenme sinyalleri değerlendirildi.

Şekil 21, bir Yıkama Zamanı–Akım grafiğidir. Buradan alınan sonuçlara göre; 5 dakikalık yıkama zamanı uygulandığında alınan hibridizasyon yanıtları oldukça yüksek olmasına rağmen mutasyon ayırımı gözlenmemiştir. Yıkama zamanının 10 dakikaya çıkmasıyla birlikte mutasyon

içeren bölgede farklılanma gerçekleşmiş ve bu farklılanma 15 dakikalık yıkama zamanı ve bunu izleyen 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanlarında tekrar kaybolmuştur. Böylece 15 ve üzeri yıkama zamanlarından sonra alınan yanıtlarda mutasyon ayırımı mümkün olmamaktadır.



Şekil 21: S3 ve S4 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyon sonrası, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanlarının uygulanmasının ardından, Diferansiyel Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri. [FM:Full-Matched (tam eşleşmiş), MM:Mis-Matched (uygunsuz eşleşmiş)].

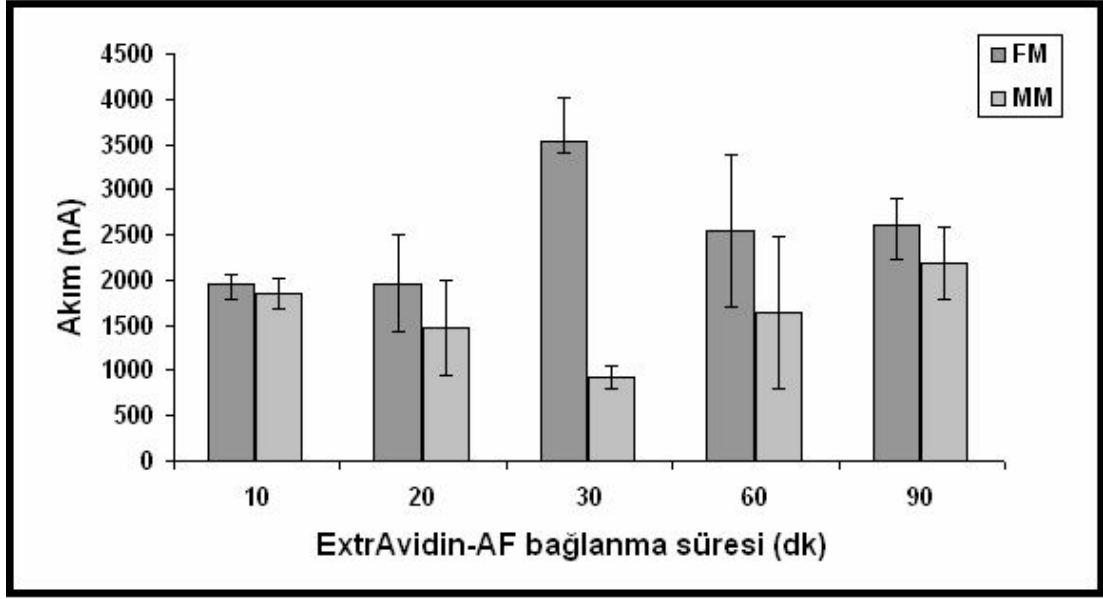
Sonuçta en uygun yıkama zamanını seçmek için yapılan değerlendirmede, kullanılan örneğin S4 bölgesinde direnç mutasyonuna sahip olması ile S3 bölgesinden alınan yanıtın yüksek, S4 bölgesinden alınan

yanıtın ise düşük olduğu aralık değ erlendirildi ve bu koşulu en iyi şekilde sağlayan 10 dakikalık yıkama zamanı en uygun olarak seçildi.

3.1.1.2. ExtrAvidin–AF’nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular

Çalışmada S4 ve S5 problemleri ile kaplanan elektrotlar, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş ve 526. kodunda CAC’nin CGC’ye dönüşmesiyle S4 prob dizisinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içeren örnek hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyon ve yıkama basamaklarından sonra elektrotlar, 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika boyunca ExtrAvidin–AF çözeltisinde bekletildi.

Şekil 22, bir ExtrAvidin–AF çözeltisinin Bağlanma Zamanı–Akım grafiğidir. Buradan alınan sonuçlara göre; 10 dakikalık bağlanma süresi uygulandığında alınan hibridizasyon yanıtları oldukça yüksek olmasına rağmen mutasyon ayırımı gözlenmemiştir. Bu süre 20 dakikaya çıkarıldığında nispeten bir farklılanma olmuştur fakat yine mutasyon ayırımı tam anlamıyla gerç ekleşmemiştir. 30 dakikalık bağlanma süresi uygulandığında ise mutasyon içeren bölgede farklılanma gerç ekleşmiştir. 30 dakikayı izleyen 60 ve 90 dakikalık bağlanma sürelerinde farklılanma kaybolmuştur. Böylece 60 ve üzeri bağlanma sürelerinde alınan yanıtlarda mutasyon ayırımı mümkün olmamaktadır.



Şekil 22: S4 ve S5 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyon, yıkama ve 10, 20, 30, 60 ve 90 dakikalık ExtrAvidin–AF bağlanmasının ardından Diferansiyel Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri.

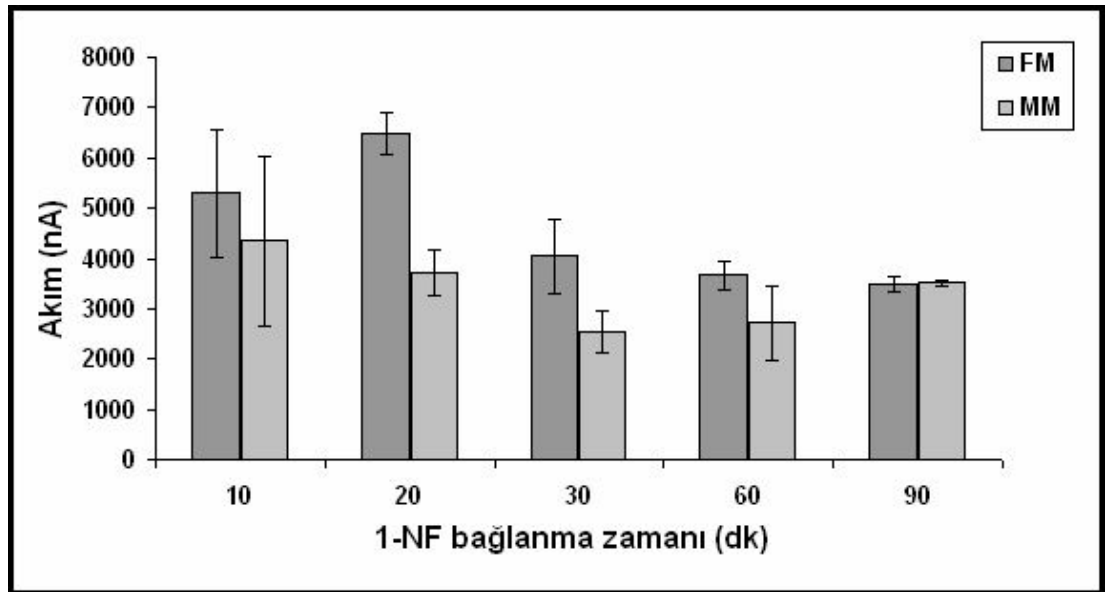
Sonuç olarak en uygun bağlanma süresini seçmek için yapılan değerlendirmede, kullanılan örneğin S4 bölgesinde direnç mutasyonuna sahip olması ile S5 bölgesinden alınan yanıtın yüksek, S4 bölgesinden alınan yanıtın ise düşük olduğu aralık değerlendirildi ve bu koşulu en iyi şekilde sağlayan 30 dakikalık bağlanma süresi en uygun olarak seçildi.

3.1.1.3. 1–NF’nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular

Çalışmada S3 ve S4 problemleri ile kaplanan elektrotlar, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş ve 526. kodonunda CAC’nin TAC’ye dönüşmesiyle

S4 prob dizisinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içeren örnek hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyon, yıkama ve ExtrAvidin–AF bağlanma basamaklarından sonra elektrotlar, 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika boyunca 1–NF çözeltisinde bekletildi.

Şekil 23, bir 1–NF Bağlanma Zamanı–Akım grafiğidir. Şekilde de gözüktüğü gibi 10 dakikalık bağlanma süresi mutasyon ayırımı için yeterli gelmemiştir. Bu süre 20 dakikaya çıkarıldığında hibridizasyon yanıtı yükselmiş, mutasyon ayırımı belirgin olarak gözlenmiştir. Bağlanma süresi olarak 30 dakika kullanıldığında ise mutasyon ayırımı nispeten gözlenmiş fakat aynı zamanda hibridizasyon yanıtı da oldukça düşmüştür. 30 dakikayı izleyen 60 ve 90 dakikalık bağlanma sürelerinde farklılaşma gitgide kaybolmuştur. Böylece 60 dakika üzerindeki bağlanma sürelerinde alınan yanıtlarda mutasyon ayırımı mümkün olmamaktadır.



Şekil 23: S3 ve S4 prob dizileri ile kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S4 bölgesinde direnç mutasyonu içeren, denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile

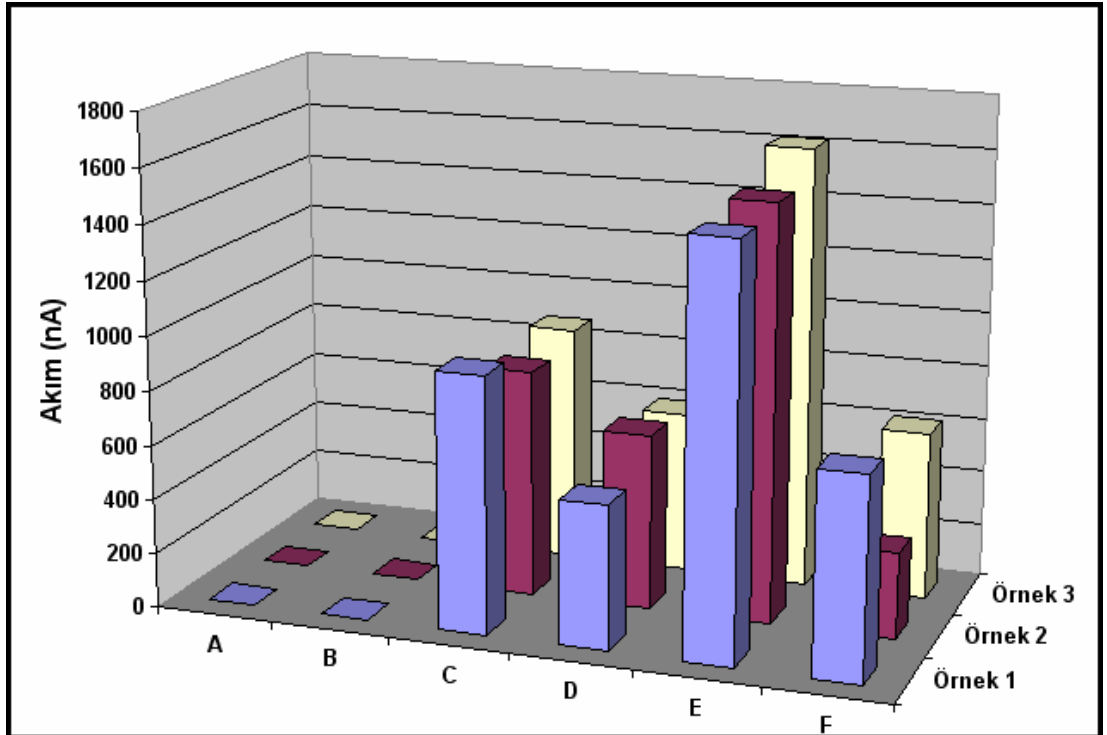
hibridizasyon, yıkama, ExtrAvidin AF bağlanması ve 10, 20, 30, 60 ve 90 dakikalık 1–NF bağlanmasının ardından Diferansiyel Puls Voltametri tekniği ile alınan naftol yükseltgenme sinyallerine ait pik akım şiddetleri.

Sonuç olarak en uygun bağlanma süresini seçmek için yapılan değerlendirmede, kullanılan örneğin S4 bölgesinde direnç mutasyonuna sahip olması ile S3 bölgesinden alınan yanıtın yüksek, S4 bölgesinden alınan yanıtın ise düşük olduğu aralık değerlendirildi. Böylece 30 dakika hibridizasyon yanıtını düşürdüğünden ve gereksiz zaman harcanmasına neden olduğundan ve 30 dakika üzerindeki bağlanma sürelerinde de alınan yanıtlarda mutasyon ayırımı mümkün olmadığından 20 dakika en uygun bağlanma süresi olarak seçildi.

3.1.2. PCR ürünleri kullanılarak Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayinine ait bulgular

Şekil 24; yöntem 2.6.2.'de belirtilen koşullarda; kovalent bağlama çözeltisiyle kaplı elektrotların çeşitli basamaklarda kör çözeltilerde bekletilerek, daha sonra tüm bazları hedeften farklı olan Hepatit B'ye ait bir dizi ve PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyonundan sonra alınan naftol yükseltgenme sinyallerinin üç boyutlu histamogramının şematik olarak gösterimidir. Buna göre tüm basamaklarda kör çözeltiler kullanıldığında **(A)** ve sadece son basamak hariç diğer basamaklarda kör çözeltiler kullanıldığında **(B)**, naftol oluşmadı ve dolayısıyla yükseltgenme sinyali de gözlenmedi. Son iki basamak hariç diğer basamaklarda kör çözeltiler

kullanıldığında **(C)**, naftol yükseltgenme sinyali gözlemlendi. Sadece hibridizasyon için kör çözeltinin hedef çözelti olarak kullanıldığı **(D)** basamakta az da olsa naftol yükseltgenme sinyali gözlemlendi. Ancak bu sinyalin büyüklüğünün hedef çözelti olarak PCR ürününün kullanıldığı **(E)** basamakta oluşan naftol yükseltgenme sinyalinden oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Yine hibridizasyon basamağında hedef dizi olarak rasgele bir dizi kullanıldığında **(F)** oluşan naftol yükseltgenme sinyali, **(E)**'de oluşan sinyale göre daha düşük çıktı. Bu da hibridizasyonun seçiciliğini kanıtladı. Birbirinden farklı üç örneğin verdiği yanıtlar yaklaşık olarak birbirine yakın çıktı.



Şekil 24: Kovalent bağlama çözeltisi ile kaplı elektrotların;

A: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + kör ExtrAvidin–AF + kör 1–NF

B: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + kör ExtrAvidin–AF + **1–NF**

C: kör prob + kör etanolamin + kör hedef + **ExtrAvidin–AF + 1–NF**

D: prob + etanolamin + kör hedef + **ExtrAvidin–AF + 1–NF**

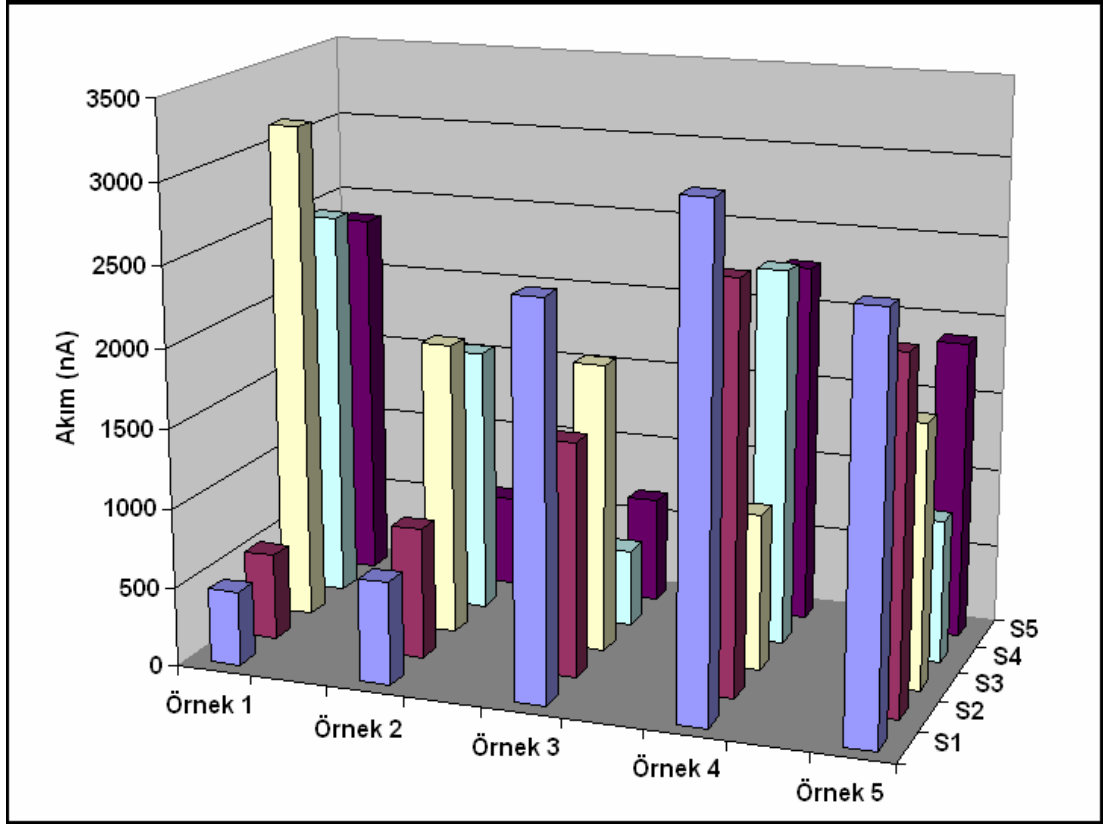
E: prob + etanolamin + **PCR ürünü hedef + ExtrAvidin–AF + 1–NF**

F: prob + etanolamin + **rasgele hedef + ExtrAvidin–AF + 1–NF**

ile etkileşimleri sonucu alınan naftol yükseltgenme pik akımları.

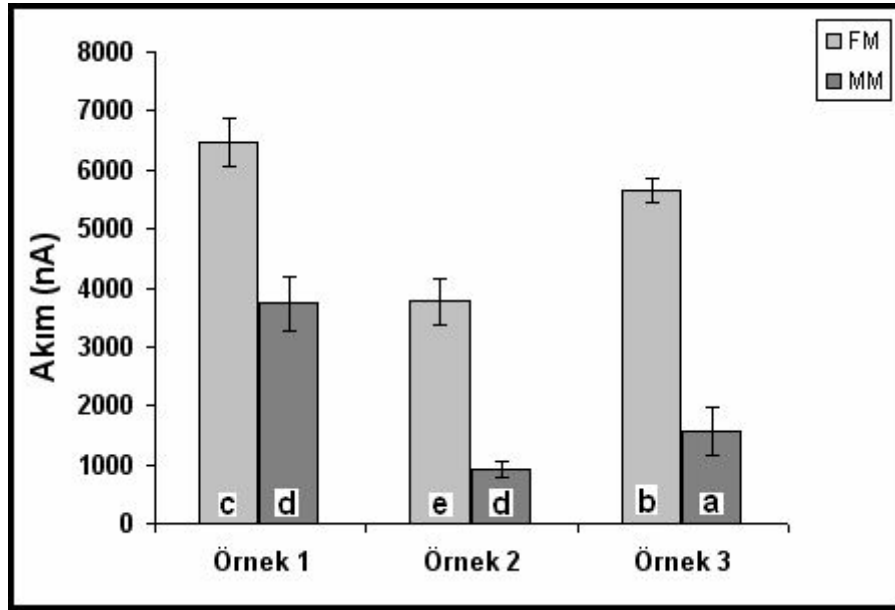
3.1.3. PCR ürünleri kullanılarak direnç mutasyon analizine ait bulgular

Şekil 25, tüm S prob dizileriyle kaplı elektrotlar ile içerisinde hem prob dizilere karşılık gelen bölgelerin, hem de direnç mutasyonlarını içeren bölgelerin bulunduğu, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş PCR ürünü hedef dizilerin, hibridizasyona uğramasından sonra elde edilen naftol yükseltgenme sinyallerinin, üç boyutlu histamogramının şematik olarak gösterimidir. Birbirinden farklı 5 örneğin her bir prob dizi ile verdikleri yanıtlar değerlendirildiğinde; 1. örneğin hem S1 hem de S2 prob dizileri ile düşük, S3, S4 ve S5 prob dizileri ile yüksek yanıt verdiği gözlemlendi. 2. örnekte S1, S2 ve S5 prob dizileri ile düşük yanıt alınırken S3 ve S4 prob dizileri ile yüksek yanıtlar alındı. 3. örnekte ise S4 ve S5 prob dizileri ile düşük yanıtlar alınırken diğer prob diziler ile yüksek yanıtlar alındı. 4. örnekte sadece S3 prob dizisi ile düşük yanıt alınırken diğer prob dizileri ile yüksek yanıt alındı. Son olarak 5. örnekte sadece S4 prob dizisi ile düşük yanıt alınırken diğer prob diziler ile yüksek yanıt alındı. Buna göre yapılan değerlendirmede 1. örneğin S1 ve S2, 2. örneğin S1, S2 ve S5, 3. örneğin S4 ve S5, 4. örneğin S3 ve 5. örneğin S4 prob dizilerine ait bölgelerinde direnç mutasyonu olduğu sonucu bulundu.

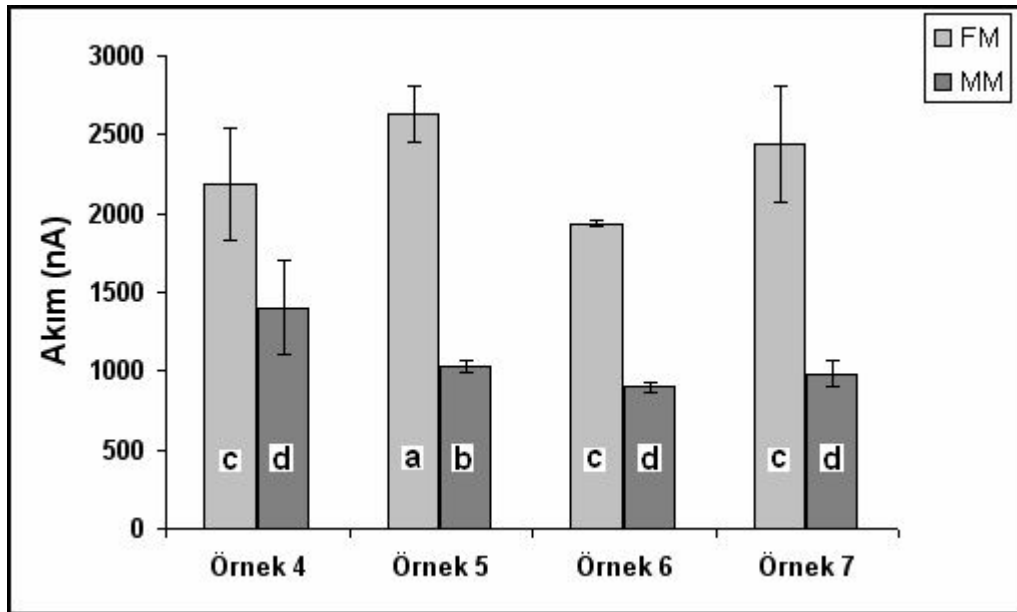


Şekil 25: Elektrot yüzeyine tüm S prob dizilerinin bağlanması sonrasında bazı bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyon sonrası diferansiyel puls voltametri ile alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram.

Şekil 26 ve Şekil 27 ise, biri mutasyonlu bölgeye, diğeri ise mutasyonsuz bölgeye karşılık gelmek üzere iki prob dizinin, denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyona uğramasından sonra elde edilen naftol yükseltgenme sinyallerine ait histamogramlardır. Birbirinden farklı 7 örnek değerlendirildiğinde; 1., 2., 4., 6. ve 7. örneklerin yalnızca S4, 3. örneğin yalnız S1 ve 5. örneğin yalnızca S2 prob dizilerine ait bölgelerinde direnç mutasyonu olduğu sonucu bulundu.



Şekil 26: a:S1 b:S2 c:S3 d:S4 e:S5 prob dizilerinin sırasıyla Örnek 1 ve Örnek 2’de S4 bölgesinde, Örnek 3’te S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram.



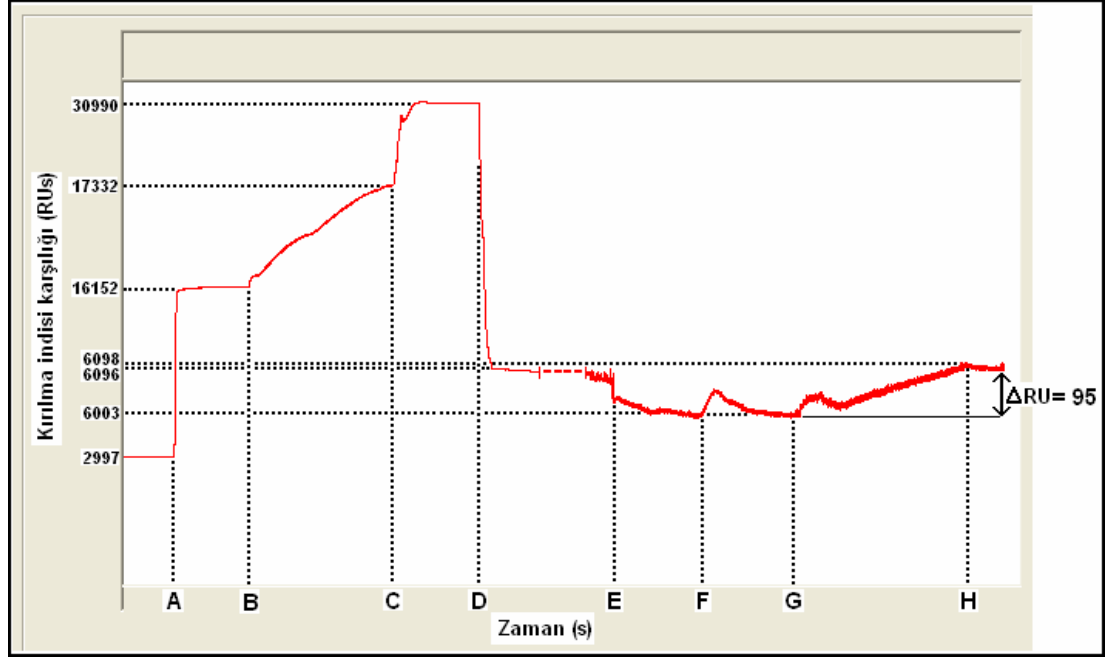
Şekil 27: a:S1 b:S2 c:S3 d:S4 prob dizilerinin sırasıyla Örnek 4, Örnek

6 ve Örnek 7’de S4 bölgesinde, Örnek 5’te S2 bölgesinde, direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra alınan naftol yükseltgenme pik akımlarına ait histamogram.

3.2. SPR ile Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayinine ait bulgular

Şekil 28, Mycobacterium tuberculosis bakterisinin SPR ile tayinine ait Zaman–RU grafiğidir. A’ya kadar olan zamanda ortamdan distile su geçirilerek kırılma indisi değeri suyun kırılma indisi olan 1.333’e ayarlandı. A zamanında ortama immobilizasyon tamponu enjekte edildi ve sistem sabitleninceye kadar (B zamanına kadar) tampon geçirilmeye devam edildi. B zamanında ortama immobilizasyon tamponu içerisinde hazırlanmış 1ppm prob çözelti enjekte edildi ve 2 saat boyunca 5µL/dk hızla sensör yüzeyinden geçmesi sağlandı. C zamanında ise bir önceki basamakta verdiğimiz prob dizilerin dik durmasını sağlamak amacıyla ortama 6–merkapt–1–hekzanol çözeltisi enjekte edildi. D zamanına gelindiğinde sentetik hedef dizi çözeltisini vermeden önce hedef dizinin hazırlanacağı tampon olan hibridizasyon tamponu, sabit bir RU değeri görene kadar ortamdan geçirildi. Hibridizasyonun seçimliliğini görmek için öncelikle E zamanında ortama rasgele bir hedef dizi enjekte edildi ve herhangi bir bağlanmanın olmadığı gözlemlendi. F zamanındaki yıkamanın ardından G zamanında ortama hibridizasyon tamponu içerisinde hazırlanmış olan 2 ppm sentetik hedef dizi enjekte edildi ve 30 dakika boyunca 5µL/dk hızla ortamdan geçişi sağlandı. H zamanındaki yıkamanın ardından bir azalma gözlenmedi ve $\Delta RU=95$ olarak

ölçüldü. Bu da bize hibridizasyonun gerçekleştiğini göstermiş oldu.



Şekil 28: Mycobacterium tuberculosis bakterisinin SPR ile tayinine ait Zaman–RU grafiği.

A: İmmobilizasyon tamponu (pH:3.8)

B: 1ppm prob çözeltisi

C: 0.1mM 6–merkapt–1–hekzanol

E: 2ppm rasgele hedef dizi

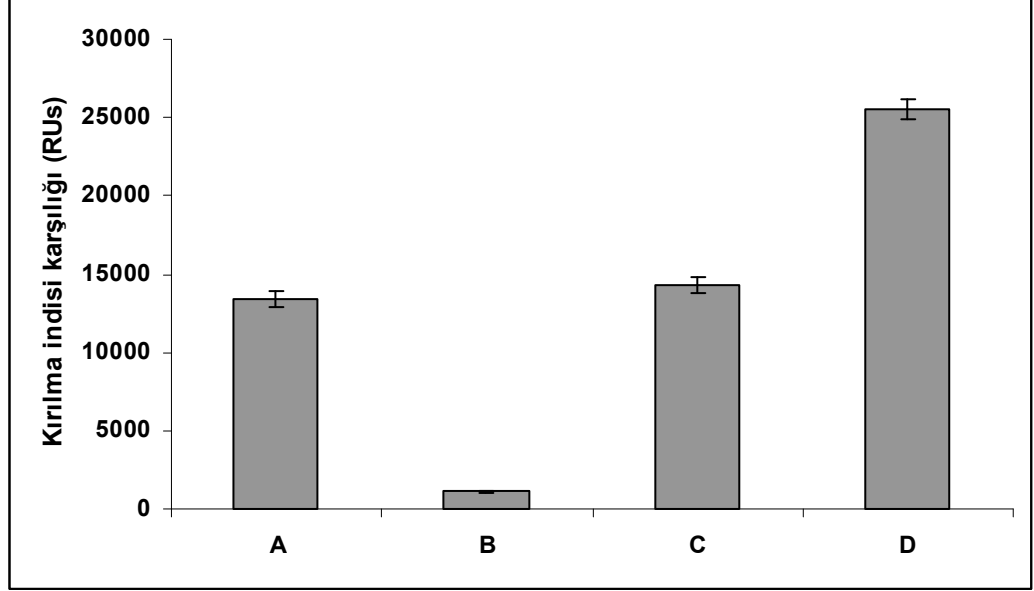
G: 2ppm hedef dizi

D, F, H: Hibridizasyon tamponu ile yıkama (pH:7.4)

Şekil 29 ve Şekil 30, yöntem 2.5.2.'de belirtilen çalışma basamaklarına karşılık gelen RU değerlerini gösteren histamogramramlardır. **(A)** immobilizasyon tamponunu ifade etmekte olup ΔRU değeri 13400 civarındadır. Aynı tampon içerisinde hazırlanmış prob çözeltideki yükselme ölçüldüğünde ΔRU değeri 1000 civarındadır **(B)**. 6–merkapt–1–hekzanol **(C)**

14000, hibridizasyon tamponu (**D**) 25000 civarlarında ΔRU değeri vermiştir.

Hibridizasyon sonrası ölçülen ΔRU değeri 80 civarındadır (**E**).



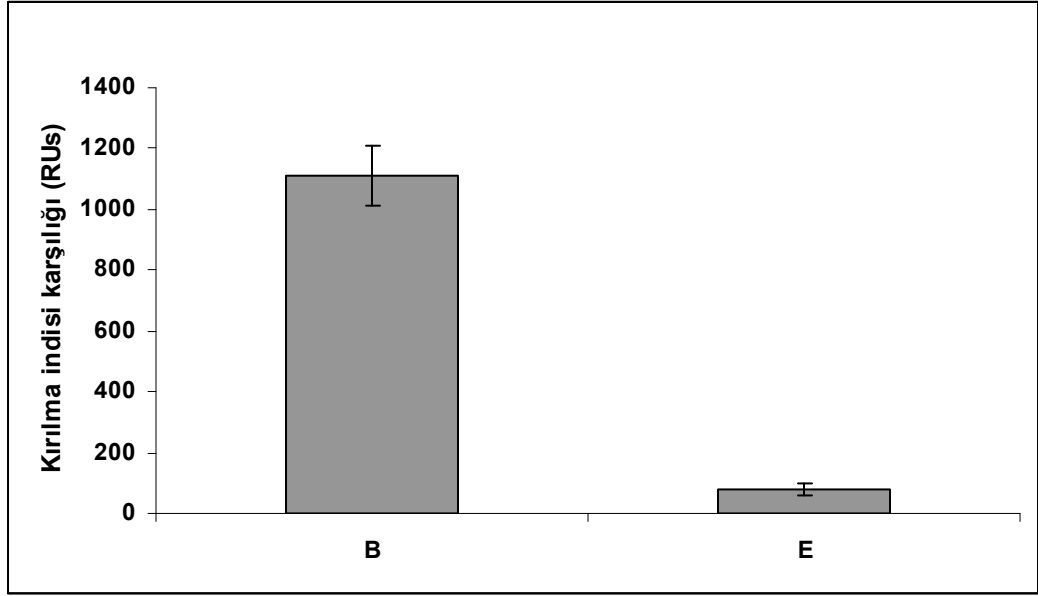
Şekil 29: A: İmmobilizasyon tamponu (pH:3.8)

B: 1ppm prob çözeltisi

C: 0.1mM 6–merkapt–1–hekzanol

D: Hibridizasyon tamponu (pH:7.4)

çözeltilerine karşılık gelen ΔRU değerleri



Şekil 30: 1ppm prob çözeltisi (**B**) ve hibridizasyona (**E**) karşılık gelen Δ RU değerleri

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Tüberküloz Hastalarında Rifampin Antibiyotiğine Karşı Gelişen Direnç Mutasyonlarının Saptanmasına Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma

Tüberküloz hastalığında bakteri hastaların kullandığı ilaca karşı direnç geliştirebilmektedir (12, 13, 14, 38, 77, 80). Bu direnç mutasyonlar şeklinde ortaya çıkmaktadır ve klinikte hızlı tanısı yapılabilirse tedavinin seyri daha iyi belirlenebilir. Tez çalışması kapsamında tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan rifampin antibiyotiğine karşı bakterinin geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal genosensör ile tayini yapılmıştır. Tasarlanan genosensör avidin–biotin ilişkisi kullanılarak geliştirildi. Direnç mutasyonlarının en sık gözlemlendiği rpoB gen bölgesine karşılık gelen 5 farklı prob dizi ile hibridizasyon ve mutasyon analizleri gerçekleştirildi.

4.1. Mycobacterium Tuberculosis bakterisinin rifampine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal yoldan saptanmasına ait bulgular ile ilgili tartışma

4.1.1. Mutasyon analizlerinin en uygun koşullarının saptanmasına ait bulgular ile ilgili tartışma

4.1.1.1. Yıkama zamanının mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular ile ilgili tartışma

Bu çalışmada, iyi bir mutasyon analizi için gereken en uygun yıkama zamanı belirlendi. Hibridizasyon sonrasında 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanları uygulanarak yapılan çalışmada 10 dakikalık yıkama zamanı en iyi mutasyon ayırımına ulaşmamızı sağladı.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda yıkama zamanları incelendiğinde bu sonuca yakın olarak 10 dakika ve 15 dakikalık yıkama süreleri kullanılmıştır (43, 44). Farklı yıkama zamanlarının ortaya çıkmasının sebebi kullanılan yıkama tamponlarının çeşitliliği olabilir. Bazı çalışmalarda yıkama tamponu olarak Tween 20 de kullanılmaktadır (86).

Diğer yıkama süreleri uygulandığında alınan sonuçları değerlendirecek olursak; 5 dakikalık süre, prob ile proba karşılık gelen bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef dizinin hibridizasyonu sonucu oluşan yapının ayrılması için yeterli olmamış olabilir. Yıkama tamponun iyonik oluşu ve deterjan içermesinden dolayı ise uzun süreli yıkama esnasında elektrot yüzeyi bozulmuş olabilir. Ayrıca 15 dakika ve üzeri sürelerde yıkama yapıldığında prob ile proba karşılık gelen bölgesinde direnç mutasyonu içermeyen PCR ürünü hedef dizinin hibridizasyonu sonucu oluşan çift sarmal yapı da yıkama süresinin artışıyla bozulmuş ve ardından elektrot yüzeyindeki kaplama yok olmuş olabilir. Böylece ExtrAvidin–AF'nin bağlanacağı boş yüzey meydana gelmiştir. Nitekim naftol yükseltgenme sinyalleri 10 dakikanın üzerindeki yıkama sürelerinde artışa geçmiştir.

Bu sonuçlardan hareketle 10 dakikalık yıkama zamanı en uygun yıkama zamanı olarak seçildi.

4.1.1.2. ExtrAvidin–AF’nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular ile ilgili tartışma

Bu çalışmada yine iyi bir mutasyon analizi için en uygun ExtrAvidin–AF bağlanma süresi belirlendi. Hibridizasyon ve yıkama basamaklarının ardından 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika boyunca ExtrAvidin–AF bağlanan elektrotlarla yapılan ölçümlerde 30 dakikalık süre en iyi mutasyon ayrımının gözlemlendiği süre oldu.

Daha önce yapılan çalışmalarda 10 dakika ve 1 saat gibi çok farklı bağlanma süreleri karşımıza çıkmaktadır (17, 46). Yine bir diğer çalışmada da bağlanma için 30 dakikalık süre kullanılmıştır (86). Bu farklılıkların sebebi birbirini izleyen çalışma basamaklarının farklı olması, çalışılan ortamın pH değerinin farklı olması veya kullanılan çözeltinin konsantrasyonunun farklı olması olabilir.

Diğer bağlanma sürelerini inceleyecek olursak; 10 ve 20 dakikalık süreler ExtrAvidin–AF ile biotin arasındaki bağlanmanın gerçekleşmesi için yeterli gelmemiş olabilir. 60 ve 90 dakikalık süreler ise uzun olmalarından dolayı elektrot yüzeyine bir noktadan sonra zarar vermiş olabilir.

Bu sonuçlardan hareketle 30 dakikalık bağlanma süresi en uygun olarak seçildi.

4.1.1.3. 1–NF’nin bağlanma süresinin mutasyon analizine etkisinin incelenmesine ait bulgular ile ilgili tartışma

Bu basamakta ise iyi bir mutasyon analizi için en uygun 1–NF bağlanma süresi belirlendi. Hibrit yapının ucunda bulunan biotine ExtrAvidin–AF bağlandıktan sonra 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika boyunca 1–NF çözeltisi

içerisinde bekletilen elektrotlar ile yapılan ölçümlerde 20 dakikalık bağlanma süresi en iyi mutasyon ayırımına ulaşmamızı sağladı.

Giallo ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada 10 dakikalık bağlanma süresi yeterli gelirken, laboratuvarımızda yapılmış olan bir çalışmada 1 saatlik bağlanma süresi kullanılmıştır (17, 46). Yine çalışma basamaklarındaki farklılıklardan dolayı bazı durumlarda 1 dakikalık süre bile bağlanma için yeterli gelmektedir (86).

Denemiş olduğumuz bağlanma zamanlarını değerlendirecek olursak; 10 dakikalık süre AF ve 1–NF arasında oluşacak olan reaksiyon için yeterli gelmemiş olabilir. 30 dakikada nispeten bir mutasyon ayırımı gerçekleşmiştir fakat prob ile proba karşılık gelen bölgesinde direnç mutasyonu içermeyen PCR ürünü hedef dizinin hibridizasyonu sonucu oluşan naftol yükseltgenme sinyalinde de bir azalma meydana gelmiştir. 30 dakikayı izleyen 60 ve 90 dakikalık bağlanma sürelerinde de gitgide bu sinyal düşmüştür. Bu durum süre artışının elektrot yüzeyine zarar vermesinden kaynaklanıyor olabilir.

Bu sonuçlardan hareketle 20 dakikalık bağlanma süresi uygun olarak seçildi.

4.1.2. PCR ürünleri kullanılarak Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayinine ait bulgular ile ilgili tartışma

Yöntem 2.6.2.'de belirtilen koşullarda elde edilen bulgulara dayanarak tüm basamaklarda kör çözeltiler kullanıldığında(A) ve sadece son basamak hariç diğer basamaklarda kör çözeltiler kullanıldığında(B) ortamda naftol oluşmadığı için naftol yükseltgenme sinyali de gözlenmemiş (46). (C)'de ise son iki basamağa kadar (ExtrAvidin–AF ve 1–NF bağlanma basamakları)

kullanılan çözeltilerin kör çözeltiler olması sebebiyle elektrot yüzeyleri boş kalmış ve elektrot yüzeyinde herhangi bir kaplama olmadığı için ExtrAvidin–AF yüzeye tutunabilmiştir. Daha sonra 1–NF’nin de ExtrAvidin–AF’ye bağlanmasıyla naftol oluşumu gerçekleşmiş ve naftol yükseltgenme sinyali gözlenmiştir. Hibridizasyon için hedef dizi olarak kör çözeltinin ve rasgele bir dizinin kullanıldığı basamaklarda (**D ve F**) boşluklara bir miktar ExtrAvidin–AF bağlanması ve 1–NF’nin da bunun üzerine bağlanması sonucu naftol oluşumu gerçekleşmiş ve naftol yükseltgenme sinyali gözlenmiştir. Hibridizasyon için PCR ürünü hedef dizilerin kullanıldığı basamakta (**E**), PCR ürünü hedef dizinin ucunda biotin olduğu için ExtrAvidin–AF kuvvetli bir şekilde biotine bağlanmış ve böylece naftol oluşumuna uygun ortam sağlanmıştır (46). Buyüzden naftol yükseltgenme sinyali de yüksek çıkmıştır.

4.1.3. PCR ürünleri kullanılarak direnç mutasyon analizine ait bulgular ile ilgili tartışma

En uygun mutasyon analizi şartlarına göre eldeki örneklerin tayini yöntem 2.6.2.’de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Elektrokimyasal genosensör ile analizini gerçekleştirdiğimiz örnekler, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı ile karşılaştırıldı (43). Bizim bulduğumuz sonuçlar ile bu sonuçlar birbiri ile tutarlı çıktı. Bunların sonucunda; 1 adet yalnızca S1 bölgesinde, 1 adet yalnızca S2 bölgesinde, 1 adet yalnızca S3 bölgesinde, 6 adet yalnızca S4 bölgesinde, 1 adet S4 ve S5 bölgelerinde aynı anda, 1 adet S1 ve S2 bölgelerinde aynı anda ve son olarak 1 adet S1, S2 ve S5 bölgelerinde aynı anda direnç mutasyonu içeren örnekler saptandı.

4.2. SPR ile Mycobacterium tuberculosis bakterisinin tayinine ait bulgular ile ilgili tartışma

Çalışmamızda elektrokimyasal genosensör ile tayin ettiğimiz Mycobacterium tuberculosis bakterisinin ikinci bir tayini optik bir genosensör ile gerçekleştirildi. Bu amaçla SPR kullanıldı (42, 56, 99).

İmmobilizasyon tamponundan 6–merkapt–1–hekzanole, bundan da hibridizasyon tamponuna geçildiğinde büyük ΔRU değerlerleri elde edildi. Bunun sebebi bu çözeltilerin kırılma indislerinin birbirlerinden oldukça farklı olmasıdır (5). Nitekim hibridizasyon tamponunun ardından ortama aynı tampon içerisinde hazırlanmış olan hedef dizi yollandığında ΔRU değeri daha az olmakta, fakat yıkama sonrası fazla bir azalmanın meydana gelmemesi bize hibridizasyonu göstermektedir.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında ilk olarak biotin–avidin etkileşiminden yararlanılarak tuberküloz tedavisinde kullanılan rifampin antibiyotiğine karşı *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin geliştirdiği direnç mutasyonlarının tayinini gerçekleştirmek üzere elektrokimyasal genosensör tasarlandı. Tasarlanan genosensörde tek kullanımlık kalem grafit elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı.

Bu amaçla tasarlanan genosensörde; bakterinin direnç mutasyonlarının en sık gözlemlendiği yer olan rpoB geninin 507–533. kodonlarını içeren 81 baz uzunluğundaki gen bölgesinin farklı kısımlarından seçilen 5 prob dizi, elektrot yüzeyine kovalent bağlarla bağlanarak biotin işaretli PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyona tabi tutuldu. Hibridizasyonun ardından ExtrAvidin AF'nin biotine, 1–NF'nin de ExtrAvidin–AF'ye bağlanmasıyla oluşan naftolün yükseltgenme sinyali Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği ile ölçülerek direnç mutasyonlarının analizi gerçekleştirildi.

En uygun hibridizasyon ve mutasyon analizinin yapılabilmesi için optimum koşullar PCR ürünü hedef diziler kullanılarak gerçekleştirildi. Çözeltilerin optimum bağlanma süreleri belirlendi. Hibridizasyon analizi için çeşitli basamaklarda kör çözeltiler ve rasgele hedef diziler kullanılarak analizin güvenilirliği sağlandı. Mutasyon analizi için belirli bölgesinde direnç

mutasyonu içeren *Mycobacterium tuberculosis* PCR ürünleri (gerçek hasta örnekleri) kullanıldı.

Hastalardan alınan örnekler ile yapılan çalışmada, kullanılan prob diziye karşılık gelen bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef dizi kullanılarak yapılan hibridizasyon sonucunda düşük naftol yükseltgenme sinyali gözlenirken, direnç mutasyonu içermeyen PCR ürünü hedef dizi kullanılarak yapılan hibridizasyon sonucunda yüksek naftol yükseltgenme sinyali gözlemlendi.

Çalışma sonucunda avidin–biotin etkileşimine dayalı, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin rifampin antibiyotiği kullanımına karşı geliştirmiş olduğu direnç mutasyonlarının saptanmasına yönelik, aynı zamanda klinik tanıya da uygulanabilen bir genosensör geliştirildi. Bu genosensörün, kolay ve ucuz bir yöntem olduğu ve DNA mikroarray teknolojisinin alt yapısına sahip olduğu gözlemlendi.

Mycobacterium tuberculosis bakterisinin elektrokimyasal genosensör ile tayini basamağını desteklemek için yüzey plazmon rezonans (SPR) yardımıyla geliştirilen optik genosensör ile DNA hibridizasyonundan yararlanılarak *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini ikinci kez gerçekleştirildi.

Bu amaçla tasarlanan genosensörde; ilk çalışmada adı geçen bölgeden seçilen ve tiyol işaretli olarak sentezlenen tek prob dizi altın sensör yüzeyine tutturularak sentetik hedef dizi ile hibridizasyona tabi tutuldu. Proben bağlanması ve hibridizasyon, SPR tekniği ile kırılma indisi esas alınarak analiz edildi. Hibridizasyonun ardından kırılma indisindeki artış ve bu artışın yıkama sonrası değişmemesi analizin gerçekleşmesini, hedef dizi olarak

rasgele bir hedef dizi kullanıldığında kırılma indisinde herhangi bir artış gerçekleşmemesi ise hibridizasyonun güvenilirliğini sağladı.

Bu genosensörün, daha da geliştirilmesi durumunda hastalardan alınan PCR örneklerine de uygulanabileceği ve kanserojen ajan kullanılan yöntemlere alternatif olan bir yöntem olduğu gözlemlendi.

Bundan sonraki çalışmalarımda diğer hastalıkların tanısına ve mutasyonların tayinine yönelik genosensörlerin tasarımını SPR tekniğini daha da geliştirerek devam etmeyi planlıyorum.

ÖZET

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BAKTERİSİNİN RİFAMPİNE KARŞI GELİŞTİRDİĞİ DİRENÇ MUTASYONLARININ ELEKTROKİMYASAL DNA BİYSENSÖRÜ İLE SAPTANMASI

Bu çalışmada, biotin–avidin etkileşimine dayalı elektrokimyasal bir genosensör tasarımı yapıldı. Yapılan genosensörün gerçek hasta örneklerine uygulanabildiği gösterildi.

Çalışmada geliştirilen genosensör *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tedavi sırasında rifampin (RIF) antibiyotiğine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının tayinine yönelik olarak tasarlandı. Kullanılan prob diziler, bakterinin RIF'e karşı en sık direnç gösterdiği rpoB geninin 507-533. kodonlarını içeren 81 baz uzunluğundaki “hot-spot” (sıcak) bölge'sine karşılık gelen 5 farklı bölgeden seçildi.

Çalışmada tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanıldı. 5' ucunda amino-hekzil işaretli prob diziler elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlandı. Prob dizi ile kaplı elektrotların, biotinli olarak çoğaltılmış ve denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyona tabi tutulup ExtrAvidin–AF ve 1–NF çözeltilerinde bekletilmesinin ardından oluşan naftolün yükseltgenme sinyalleri değerlendirildi. PCR ürünü hedef dizilerin

mutasyon içeren ve içermeyen bölgelerine karşılık gelen prob diziler ile hibridizasyonu sonucu alınan naftol yükseltgenme sinyalleri arasındaki farklılıklar, tasarlanan genosensörün seçimliliğini gösterdi.

Mutasyon ayırımının en iyi gözlemlendiği yıkama zamanı, ExtrAvidin–AF ve 1–NF bağlanma zamanları belirlendi. Alınan yanıtlara göre, mutasyonun bulunduğu prob dizi bölgesinden en düşük, diğer bölgelerden en yüksek sinyalin gözlemlendiği koşullar tayin edildi.

Böylece çalışmanın amacı olan, *Mycobacterium tuberculosis*'in rifampin antibiyotikine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının, hastalardan alınan ve biotin işaretli olarak çoğaltılan PCR örnekleri ile biotin–avidin etkileşiminden yararlanarak tasarlanan elektrokimyasal genosensör ile tayini gerçekleştirildi.

Çalışmadaki *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini basamağını desteklemek için yüzey plazmon rezonans (SPR) yardımıyla geliştirilen optik genosensör ile de bir çalışma yapıldı. Bu çalışmada ise sentetik prob dizi ile sentetik hedef dizi hibridizasyona tabi tutularak *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini gerçekleştirildi.

Çalışmada altın sensör yüzeyine tiyol işaretli prob dizi tuturuldu ve prob dizilerin yüzeyde dik konumda kalması için aradaki boşluklar 6–merkapt 1–hekzanol ile dolduruldu. Daha sonra rasgele hedef dizi ve prob dizinin karşılığı olan sentetik hedef dizi ile hibridizasyon gerçekleştirildi. Bağlanma ve yıkama sonrası kırılma indisi değerlerindeki farklılıklar analizin gerçekleşmesini sağladı.

Böylece *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tayini tasarlanan optik genosensör ile gerçekleştirilmiş oldu.

SUMMARY

THE DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTANCE MUTATIONS TO RIFAMPIN TREATMENT WITH ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR

In this study, an electrochemical genosensor was designed based on biotin–avidin interaction. The applicability of this genosensor on real samples from patients was showed.

The genosensor that was improved in this study was designed for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance mutations to rifampin treatment. Probe sequences were selected from 5 different parts of the 81 base hot-spot region of the *rpoB* gene which contains the resistance mutations to rifampin.

Disposable pencil graphite electrodes (PGE) were used in the study. 5' aminoethyl labeled probe sequences were covalently immobilized on to PGE surfaces. The oxidation signals of naphthol that formed after the hybridization between probe and denaturated and biotinylated PCR product and waiting in ExtrAvidin–AP (ExtrAvidin–Alkaline Phosphatase) and 1–NP (1–Naphthyl Phosphate) solutions were considered. The differences between responses obtained after hybridization with complementary and mutation regions proved the selectivity of the genosensor.

Washing time, ExtrAvidin–AP binding time and 1–NP binding time were determined for the best detection of mutations. The conditions, where the signals were lower at mutation regions and higher at complementary regions were selected.

In this way, the detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance mutations to rifampin treatment in biotinylated PCR products from real patients, imposing with biotin–avidin interaction was realized.

For supporting the step of detection of *Mycobacterium tuberculosis* bacterium, an other study was made with SPR. In this study, the detection of *Mycobacterium tuberculosis* bacterium was realized with hybridization between synthetic prob and target oligonucleotides.

In the study, the thiolated probe is insisted onto the Au surface and the holes between probes were filled with 6–mercapto–1–hexanol for holding probes perpendicular. After that, hybridization was performed between probe and complementary target and non–complementary target. The differences between responses of refractive indexes after binding and washing processes provided the realization the analysis.

In this way, the detection of *Mycobacterium tuberculosis* bacterium was performed with optic genosensor.

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. Barr, E.S. (1955). Concerning index of refraction and density. *Amer. J. Phys.* 23: 623-624.
4. Bej, A.K. (1996). Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, *Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications*; Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.
5. BIACORE AB BIACORE Technology Handbook. (1998).
6. 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.
7. 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.
8. Brett, C.M.A., Brett, A.M.O. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, 3.baskı.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Cavusoglu, C., Hilmioğlu, S., Guneri, S., Bilgic, A., (2002). Characterisation of rpoB Mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and Line Probe Assay, *J. Clin. Microbiol.*, 40 (12) : 4435-4438.
13. Cavusoglu, C., Karaca Derici, Y., Bilgic, A. (2004). In vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known rpoB mutations, *Clin. Microbiol. Infec.*, 10 (7): 662-665.
14. Cavusoglu, C., Turhan, A., Akinci, P., Soyler, I. (2006). Evaluation of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates, *J. Clin. Microbiol.*, 44 (7): 2338-2342.
15. Cheng, C.C., Goll, J.G., Neyhart, G.A., Welch, T.W., Singh, P., Thorp, H.H. (1995). Relative rates and potentials of competing redox process during DNA cleavage: oxidation mechanism and sequence specific

- catalysis of the self inactivation of oxometal oxidants by DNA, J.A.M. Chem. Soc., 117: 2970-2980.
16. Coulet, P.R. (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
 17. Del Giallo, M., Ozkan, D., Marrazza, G., Mascini, M., Ozsoz, M. (2005). Disposable electrochemical enzyme-amplified genosensor for salmonella bacteria detection, *Analytical Letters*, (38):2509-2523.
 18. Dell'Atti, D., Zavaglia, M., Tombelli, S.A., Bertacca, G., Cavazzana, A.O., Bevilacqua, G., Minunni, M., Macsini, M. (2007). Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma Virus strains, *Clinica Chimica Acta*, 383:140-146.
 19. Dervan, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
 20. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California. (1994). sayfa 1-57.
 21. Eggins, B.R. (1996). Biosensors: An Introduction, John Wiley and Sons LTD. and B.G. Teuber, West Sussex.
 22. Electrochemistry, C. M. A., Brett, A. M. O. (1992). Oxford University Press, 3. Baskı.
 23. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa; 289-384.

- 24.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.
- 25.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.
- 26.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.
- 27.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, *Electroanal.*, 15 (7): 1-7.
- 28.Erdem, A., Ozsoz, M. (2000). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem.*, 25: 469-475.
- 29.Erdem, A., Ozsoz, M. (2001). Interaction of anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437: 107-114.
- 30.Erdem, A., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor based on DNA drug interactions, *Electroanal.*, 14 (14): 965-974.
- 31.Evans; A. (1991). Potentiometry and ISE, ACOL, London, s.106-198.
- 32.Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T. (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators,

Electroanal., 12: 926-934.

33. Hall, E.A.H. (1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.
34. <http://www.baskent.edu.tr/~cokeliler/biyosensor.doc>
35. <http://www.biyomedtek.com/bmt-konular-no4.htm>
36. <http://www.biyomedtek.com/bmt-konular-no4.htm>
37. <http://www.draligus.com/saglik.php?id=251> Tuberkuloz verem bulasma yollari teshis ve tedavisi
38. http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Nuri_Kiraz.pdf
39. http://www.kontrolkalemi.com/forum/arsiv_baslik1915.0.html
40. Huey, F.T., Gong, H., Dong, X.D., Zeng, X., Tan, A.L.K., Yang, X., Swee, N.T. (2005). Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface, Anal. Chim. Acta, 551 (1-2): 23-29.
41. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., Thomas, J.W., PCR Protocols: A Guide to methods and applications, Academic Press INC., San Diego-California.
42. Jiang, T., Minunni, M., Wilson, P., Zhang, J., Turner, A.F.P., Mascini, M. (2005). Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor, Biosensors and Bioelectronics, (20):1939-1945.
43. Kara, P. (2007). Klinik tanıya yönelik DNA hibridizasyonuna dayalı elektrokimyasal genosensör tasarımı, Ege Üniversitesi, İzmir.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 4: 705-709.
49. 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.
50. 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.

51. Kelley, S.O., Barton, J.K. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, 8: 1997, 31-37.
52. 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.
53. Ligaj, M., Jasnowska, J., Musia, W.G., Filipiak, M. (2006). Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups, *Electrochim. Acta*, 51 (24): 5193-5198.
54. Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.
55. 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.
56. Manera, M.G., Spadavecchia, J., Leone, A., Quaranta, F., Rella, R., Dell'atti, D., Minunni, M., Mascini, M., Siciliano, P. (2007). Surface plasmon resonance imaging technique for nucleic acid detection, *Sensors and Actuators B Chemical*.
57. Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M. (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
58. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophys. Chem.*, 75: 87-95.

59. Mascini, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73: No. 1, pp.23-30.
60. 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.
61. Mikkelsen, S.R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
62. Millan, K.M., Mikkelsen, S.R. (1993). Sequence selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65: 2317-2323.
63. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R. (1994). Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, 66: 2943-2948.
64. Millan, K.M., Spurmanis, A.J., Mikkelsen, S.R. (1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes, *Electroanalysis*, 4: 929-932.
65. Mireille, M.K., Zalloua, P.A., Araj, G.F., Samaha-Kfoury, J., Shbaklo, H., Kanj, S.S., Khalife, S. and Deeb, M. (2007). Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59 (1):23-32
66. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-73.
67. Mullis, K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the

- polymerase chain reaction, *Ann Biol Clin*, 48(8): 579-82.
68. Nagata, K. and Handa, H. (2000). Real-Time Analysis of Biomelecular Interactions.
69. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M. (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 462 (1): 39-47.
70. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M. (2002). Allele spesific genotype detection of FactorV Leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.*, 74: 5931-5936.
71. 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 electorodes, *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.
72. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.
73. Palecek, E. (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
74. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baskı, *Academic press*: s.226- 239.
75. Pividori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.

- 76.Quinn, J. G. (2000). Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Analytical Biochemistry* 281: 135-143.
- 77.Raviglion, MC, Snider, DE, Kochi, A. (1995). Global epidemiology of tuberculosis, morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*; 273:220-226.
- 78.Roos, H. (1998). Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *J.Mol. Recognit.* 11: 204-210.
- 79.Service R.F. (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396.
- 80.Snider, DE, La Montagne, JR. (1994) The neglected global tuberculosis problem: A report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. *J Infect Dis*; 169:1189-1196. 231.
- 81.Söğüt, E.,Ö., Kayalı, A. (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 34(1): 41-57.
- 82.Steel, A.B., Herne, T.M., Tarlov, M.J. (1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.
- 83.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.
- 84.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.
- 85.Turner, A.P.F. (1987). "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Pres.

Oxford, sayfa 5-7.

86. Ülker, B. (2005). Determination of single base mutations related to the gene specific diseases by using electrochemical DNA biosensors in the integrated system, Friedrich-Alexander Üniversitesi, Nürnberg.
87. Vernon, S.D., Farkas, D.H., Unger E.R., Chan, V., Miller, D.L., Chen, Y.P., Blackburn, G., Reeves, W.C. (2003). Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor™: a model system for detection of multiple pathogens, *J. Infect. Dis.*, 3 (12): 1-9.
88. Wang, J. (1994). Analytical Electrochemistry, Wiley–VCH, New York.
89. 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.
90. 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- 79.
91. 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.
92. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. Wilson, P.K., Jiang, T., Minunni, M.N., Turner, A.F.P., Mascini, M. (2005). Anovel optical biosensor format for the detection of clinically relevant TP53 mutations, *Biosensors and Bioelectronics*, (20):2310-2313.

Kimyager Seda ÇAVDAR'ın Özgeçmişı

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 28/02/1982

Doğum Yeri: İzmir

Yüksek Lisans Eğitimi

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

Lisans Eğitimi

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, (İngilizce) Kimya Bölümü. 2004

Projelerde Aldığı Görevler

- 1- “DNA Dizi Analizine Yönelik Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı”, Ege Üniversitesi Araştırma Projesi, 2007/ECZ/004, Proje yürütücüsü, (2007).

Uluslar Arası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- 1- 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.
- 2- 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.