



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



PATOJENİK MİKROORGANİZMALARIN TANISINA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL NANOGENOSENSÖR TASARIMI

Yüksek Lisans Tezi

Sezin YÜKSEL

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İzmir

2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**PATOJENİK MİKROORGANİZMALARIN
TANISINA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL
NANOGENOSENSÖR TASARIMI**

Sezin YÜKSEL

Danışman: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyomedikal Teknolojiler Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Sezin YÜKSEL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Patojenik Mikroorganizmaların Tanısına Yönelik Elektrokimyasal Nanogenosensör Tasarımı” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26/12/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR

Raportör Üye : Prof. Dr. Özlem YEŞİL GELİKTAR

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Seval DARBAGLI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Patojenik Mikroorganizmaların Tanısına Yönelik Elektrokimyasal Nanogenosensör Tasarımı ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/ 12/ 2019



Sezin YÜKSEL

ÖZET**PATOJENİK MİKROORGANİZMALARIN TANISINA YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL NANOGENOSENSÖR TASARIMI**

YÜKSEL, Sezin

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

Aralık 2019, 101 sayfa

Bu çalışmada, patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik elektrokimyasal temelli bir nanogenosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tek kullanımlık kalem ucu elektrotlar (PGE) sensör yüzeyi olarak kullanılmış ve bu sensör yüzeyleri Grafen Oksit (GO) nanomateryali ile zenginleştirilmiştir. Tasarımı yapılan nanogenosensörde model mikroorganizma olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisine ait 22 baz uzunluğundaki gen bölgesi kullanılmıştır. Model patojenik mikroorganizma *E. coli*'nin hem sentetik dizileriyle hem de gerçek örnekleriyle çalışılmıştır.

Genosensörün hassasiyet ve seçiciliğini artırmak için Grafen Oksit nanomateryali kullanılmıştır. Grafen, karbon atomunun sp^2 hibritleşmesi yapan bal peteği örgülü yapılarından meydana gelen iki boyutlu bir nanomateryaldir. Grafen Oksit (GO) ise; grafitin oksidasyonu ile elde edilen grafen türevidir. Grafen oksitin yapısında farklı oksijen grupları bulunduğu için diğer moleküller ile daha iyi bağlanma imkanı sunmaktadır. Bu amaçla, Grafen Oksitin yüzeye daha iyi bağlanması için sensör yüzeylerine karbodimid kimyası uygulanarak, Grafen Oksit modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. GO kaplı sensör yüzeylere kovalent yolla *E. coli* prob dizisi immobilize edilerek, *E. coli* hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı *Mycobacterium tuberculosis* hedef dizi ile hibridizasyona tabi tutulmuştur. Sensör yüzeyindeki etkileşimler $5\text{mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ varlığında Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Tüm nanogenosensörün seçiciliği ve optimizasyon koşulları sentetik diziler ile elde edilmiştir. En uygun hibridizasyon koşullarını (prob ve hedef konsantrasyonu, hibridizasyon tamponu, yıkama tamponu vb.) saptamak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Optimizasyon koşullarının elde edilmesinin ardından PCR ürünleri (gerçek örnekler) ile çalışmaya başlanmıştır. Belirlenen tüm optimum koşullar altında tasarlanan nanogenosensörü doğrulayıcı çalışmalar ile devam edilmiştir.

Kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısında kullanılan diğer yöntemlere göre; daha hızlı, kolay ve maliyeti düşük bir nanogenosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Yüzey alanları ve hassasiyetlerini artıran bu nanogenosensörler, klinik tanıya uygulanabilirliği ve tek kullanımlık sistem ile mikroçip teknolojilerinin temeli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Nanogenosensör, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, Grafen Oksit, Patojenik Mikroorganizma

ABSTRACT**ELECTROCHEMICAL NANOGENOSENSOR DESIGN FOR THE
DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS**

YÜKSEL, Sezin

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

December 2019, 101 pages

In this study, an electrochemical based nanogenosensor design for the detection of pathogenic microorganisms was carried out. Disposable pen tip electrodes (PGE) were used as sensor surfaces and these sensor surfaces were enriched with Graphene Oxide (GO) nanomaterials. In the designed nanogenosensor, 22 base length gene region of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria were used as model microorganism. The model pathogenic microorganism *E. coli* was studied with both synthetic sequences and real samples.

A nanomaterial called Graphene Oxide (GO) is used to improve sensibility and selectivity of the genosensor. Graphene is a two-dimensional nanomaterial consisting of honeycomb braided structures that hybridize to sp^2 of carbon atoms. Graphene Oxide (GO) is a graphene derivative obtained by oxidation of graphite. Since graphene oxide has different oxygen groups in its structure, it provides better bonding with other molecules. For this purpose, Graphene Oxide modification was performed by applying carbodimide chemistry to sensor surfaces for better bonding of Graphene Oxide to the surface. The GO coated sensor surfaces were covalently immobilized with the *E. coli* probe sequence, hybridizing with the *E. coli* target sequence and the *Mycobacterium tuberculosis* sequence with all bases different from the target sequence. Interactions on the sensor surface were analyzed by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) method in the presence of 5mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

The selectivity and optimization conditions of all nanogenosensors were obtained with synthetic sequences. Studies have been conducted to determine the optimal hybridization conditions (probe and target concentration, hybridization buffer, wash buffer, etc.). After the optimization conditions were obtained, PCR products (real samples) were used. The study continued with verification of nanogenosensor that is designed under optimum conditions.

A faster, easier and more cost-effective nanogenosensor design was performed compared to other methods used in the diagnosis of hereditary and infectious diseases. These nanogenosensors, which increase their surface areas and sensitivity, have been found to be the basis of microchip technologies with their applicability to clinical diagnosis and a single-use system.

Keywords: Nanogenosensor, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Graphene Oxide, Pathogenic Microorganism

ÖNSÖZ

Çalışma süresince, patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik elektrokimyasal nanogenosensör tasarımı için gerekli alandaki çalışma örnekleri doğrultusunda araştırmalar yaparak bu konu üzerinde çalıştım.

Bu çalışmalar doğrultusunda; biyosensör tasarımı, nanomalzeme-DNA etkileşimi, elektrokimyasal ve voltametrik teknikler, yüzey modifikasyonları (grafen oksit, indirgenmiş grafen oksit, karbon nanotüp), tek nokta mutasyonu, biyomoleküllerin tasarlanan biyosensör yüzeyine bağlanmalarının elektrokimyasal olarak tayini (Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, Döngüsel Voltametri ve Diferansiyel Puls Voltametrisi) gibi çalışmalarda bulundum.

Çalışmamda tasarlanan patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik geliştirilen nanogenosensör ile kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısına yönelik geliştirilen diğer yöntemlere göre daha kolay, hızlı, düşük maliyet içeren bir tasarım gerçekleştirilmiştir. Tasarımı yapılan nanogenosensör ile yüzey alanı ve hassaslığı artırılarak, tek kullanımlık mikroçip teknolojilerinin de temeli olduğu belirlenmiştir. Tasarlanan bu nanogenosensörler ile patojenik mikroorganizmaların özellikle mikroçip teknolojisi ve klinik analizlere yönelik tanısında kullanılması hedeflenmektedir.

Çalışmam süresince çalışmamın bu noktaya gelmesinde katkılarını hiçbir şekilde esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

26 / 12 / 2019

Sezin YÜKSEL

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyosensörler	3
2.1.1 İdeal bir biyosensörde olması gereken özellikler	3
2.2 Biyosensör Sistemlerinin Sınıflandırılması	5

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.1 Algılayıcı sisteme göre biyosensörler	6
2.2.2 Çevirici sisteme göre biyosensörler	15
2.3 Biyosensörlerin Kullanım Alanları	25
2.3.1 Klinik tanıya yönelik biyosensörler	25
2.3.2 Gıda güvenliğine yönelik biyosensörler	26
2.4 Patojenik Mikroorganizmalar	26
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	27
2.5 Patojenik Mikroorganizmaların Tayininde Kullanılan Yöntemler	28
2.5.1 Kültürel yöntemler	28
2.5.2 İmmünolojik yöntemler.....	31
2.5.3 Moleküler yöntemler.....	34
2.6 Nanobiyosensörler	40
2.6.1 Metal nanopartiküller.....	40
2.6.2 Manyetik nanopartiküller.....	41
2.6.3 Kuantum noktalar (QD)	41
2.6.4 Karbon temelli nanomalzemeler	42

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	45
3.1 Kullanılan Elektrokimyasal Sistemler	45
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	46
3.4 Kullanılan DNA Dizileri.....	48
3.4.1 Kullanılan DNA dizilerinin hazırlanışı.....	51
3.4.2 Kullanılan PCR ürünü örneklerinin hazırlanması	51
3.5 Kullanılan Yöntemler	51
3.5.1 Kalem grafit elektrotların (PGE) hazırlanması.....	52
3.5.2 Kalem grafit elektrodunun (PGE) aktivasyonu	52
3.5.3 Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu.....	53
3.5.4 Grafen oksit (GO) modifiyeli PGE'lerin hazırlanışı	53
3.5.5 Grafen oksit (GO) modifiyeli PGE yüzeyine prob DNA tutturulması	53
3.5.6 Sentetik dizi ile hibridizasyon	53
3.5.7 PCR ürünü ile hibridizasyon.....	54
3.5.8 Yıkama.....	54

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.6 Elektrokimyasal Ölçümler	54
3.7 İncelenen Parametreler.....	55
3.7.1 Grafen nanomodifiye yüzeylerde gerçekleştirilen çalışmalar.....	56
3.7.2 Tasarlanan nanogenosensörün en uygun hibridizasyon koşullarının saptanması.....	57
3.7.3 PCR ürünleri kullanılarak patojenik mikroorganizmaların tanısı	59
3.8 Tasarlanan nanogenosensörü doğrulama amacıyla incelenen parametreler	60
3.8.1 Hedef dizi ve PCR ürününün seçiciliğe olan etkisi.....	60
3.8.2 Oluşturulan nanosensörün taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi.....	60
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
4.1 Grafen Nanomodifiye Yüzeylerde Gerçekleştirilen Çalışmalar	61
4.1.1 Grafen türevlerinin dsDNA ile etkileşimi	61
4.1.2 Nanomateryalin hibridizasyon üzerine etkisi.....	64
4.2 Patojenik Mikroorganizmaların Tanısına Yönelik Geliştirilen Nanogenosensörün Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	65

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3 Tasarlanan Nanogenosensörün En Uygun Hibridizasyon Koşullarının Saptanmasına Yönelik Sonuçların Değerlendirilmesi	67
4.3.1 Prob konsantrasyonunun etkisi	67
4.3.2 Hedef konsantrasyonunun etkisi	69
4.3.3 Hibridizasyon tampon çözeltisinin etkisi	70
4.3.4 Yıkama tampon çözeltisinin etkisi	72
4.3.5 Prob tutturma (immobilizasyon) süresinin etkisi	73
4.3.6 Yıkama süresinin etkisi	75
4.3.7 Grafen oksit (GO) modifikasyon süresinin etkisi	76
4.3 Tayin Sınırının (LOD) Belirlenmesi	78
4.4 PCR Ürünleri Kullanılarak Patojenik Mikroorganizmaların Tanısı	79
4.5 Tasarlanan Nanogenosensörü Doğrulamak Amacıyla İncelenen Parametreler	80
4.5.1 Hedef dizi ve PCR ürününün seçiciliğe olan etkisi	80
4.5.2 Oluşturulan nanosensörün taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi	81
4.6 Sentetik Hedef Dizi ve PCR Ürünü ile Yapılan Hibridizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	82

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5. GENEL SONUÇLAR.....	84
KAYNAKLAR DİZİNİ	86
TEŞEKKÜR.....	100
ÖZGEÇMİŞ	101



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Biyosensörün yapısı 3
2.2	Nükleotid yapısı 10
2.3	DNA ve RNA moleküllerinin yapısında bulunan bileşenler 11
2.4	a)DNA molekülü, b) DNA çift sarmal yapısı 12
2.5	DNA’da meydana gelen denatürasyon ve renatürasyon olayları..... 13
2.6	Analog cihazlarda kullanılan DPV uyarma sinyali ve DPV voltamogramı 20
2.7	Dönüşümlü voltametrde akım-gerilim eğrisini gösteren voltamogram 21
2.8	Empedans’ın potansiyel (zaman) ve akım (zaman) büyüklüklerine bağlı matematiksel değişimi 23
2.9	Nyquist eğrisi 24
2.10	Randles Devresi’nin şematik gösterimi 24
2.11	Farklı tiplerdeki ELISA sistemleri..... 32
2.12	Tipik lateral akış immunoassay test kiti 33
2.13	PCR aşamaları..... 36
2.14	Grafen ve türevlerinin şematik görüntüsü 44
3.1	Üçlü elektrot sistemi şeması 45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 Patojenik mikroorganizmaların tanısına yönelik geliştirilen nanogenosensörün elektrot yüzeyinde gerçekleşen aşamaları; a) GO modifikasyon, b) Biyolojik ve elektrokimyasal kısım	52
3.3 Tasarımı gerçekleştirilen nanogenosensörün çalışma basamaklarının şematize halde gösterimi	55
4.1 Yalın PGE ve yalın rGO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği	62
4.2 Yalın PGE ve yalın rGO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS yöntemiyle elde edilen Rct değerlerinin histogram grafiği	63
4.3 Yalın PGE ve yalın GO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS yöntemiyle elde edilen Rct değerlerinin histogram grafiği	64
4.4 Yalın ve GO kaplı yüzeylerin <i>E. coli</i> prob ile bağlanması (hibridizasyondan önce) ve <i>E. coli</i> prob ile sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyondan sonra alınan Rct verilerinin histogram grafiği	65
4.5 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) yöntemi ile geliştirilen nanogenosensör tasarımının incelenmesi a) Yalın GO PGE, b) <i>Escherichia coli</i> Prob (Hibridizasyon Öncesi), c) <i>Escherichia coli</i> Prob ve <i>Escherichia coli</i> Hedef (Hibridizasyon sonrası), d) <i>Escherichia coli</i> Prob ve <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hedef (Hibridizasyon sonrası) etkileşiminden sonra elde edilen Rct değerlerinin Nyquist diyagramı.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.6 GO yüzeylerde artan prob konsantrasyonlarında sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği..... 68
- 4.7 Sabit (1 ppm) *E. coli* Prob kaplı GO yüzeylerde artan hedef konsantrasyonlarında sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonucunda elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği 69
- 4.8 *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, farklı iyonik dengeye sahip hibridizasyon tamponları kullanılarak sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği..... 71
- 4.9 *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyonun ardından farklı iyonik dengeye sahip yıkama tamponları ile etkileşiminden sonra elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği 72
- 4.10 GO yüzeylere farklı sürelerde immobilize edilen *E. coli* prob dizisinin, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği..... 74
- 4.11 *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyonun ardından farklı sürelerde uygulanan yıkama işlemi sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği..... 75

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Yalın yüzeylere farklı sürelerde uygulanan Grafen Oksit (GO) nanomateryali sonrası <i>E. coli</i> prob ile hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği.....	77
4.13 Tayin sınırının hesaplanmasında oluşturulan % ΔRct değerlerinin kalibrasyon eğrisi	78
4.14 Optimum koşullar altında GO yüzeylere <i>E. coli</i> prob bağlanması (hibridizasyon öncesi) ve <i>E. coli</i> prob kaplı GO yüzeyler ile PCR Blank, <i>E. coli</i> PCR (FM) ve tüm bazları hedeften farklı <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCR ürünü (NC) hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği.....	79
4.15 GO kaplı yüzeylere <i>E. coli</i> prob bağlanması ve GO kaplı yüzeylerde sentetik hedef dizi (FM), sentetik tüm bazları hedeften farklı dizi (NC), PCR blank, <i>E. coli</i> PCR ürünü (FM) ve tüm bazları hedeften farklı <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCR ürünü (NC) etkileşimi sonrasında elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği.....	80
4.16 Sensör yüzeylerin SEM görüntüleri a) PGE, b) EDC/NHS PGE, c) EDC/NHS-GO PGE	81
4.17 GO yüzeylere <i>E. coli</i> prob bağlanmasından sonra (hibridizasyondan önce), <i>E. coli</i> prob yüzeylere sentetik <i>E. coli</i> hedef sentetik dizi (FM) - <i>E. coli</i> PCR ürünü (FM) ve tüm bazları hedeften farklı <i>Mycobacterium tuberculosis</i> hedef sentetik dizi (NC) - tüm bazları hedeften farklı <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCR ürünü (NC) ile hibridizasyondan sonra alınan Rct verilerinin 3D histogramı.....	83

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Algılayıcı ve çevirici sistemlere göre biyosensörler.....	6
3.1 Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve bunların sağlandığı firmalar	46
3.2 Çalışma aşamasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	47
3.3 Çalışmada kullanılan DNA dizileri ve PCR ürünleri.....	49
4.1 Optimum prob konsantrasyonu saptanmasına yönelik çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları	69
4.2 Optimum hedef konsantrasyonu saptanmasına yönelik çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.....	70
4.3 Farklı hibridizasyon tamponları kullanılarak elde edilen FM/NC oranları	71
4.4 Farklı yıkama tamponları kullanılarak elde edilen FM/NC oranları	73
4.5 Farklı prob tutturma süreleri ile çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.....	74
4.6 Farklı yıkama süreleri ile çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları	76
4.7 Farklı Grafen Oksit modifikasyon süreleri ile çalışma sonucu elde edilen FM/NC oranları.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
A	Adenin
ACB	Asetat Tampon Çözeltilisi
C	Sitozin
CV	Döngüsel Voltametri
-COOH	Karboksil Grubu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
dsDNA	Çift iplikli DNA
EDC	1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidroklorid
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
G	Guanin
GO	Grafen Oksit
NC	Hedeften tamamen farklı dizi (Non-complementary)
NH ₂	Amino Grubu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NHS	N- hidroksi süksinimit
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE	Kalem Grafit Elektrot
Rct	Yük transfer direnci
rGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SSC	Sodyum Salin Sitrata
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
ssDNA	Tek iplikli DNA
T	Timin

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunun yararlı özellikleri bulunmasına rağmen, bazı mikroorganizmalar ise; konukçusu olduğu insan, hayvan ve bitkileri çeşitli olarak zarara uğratmaktadır. Konakçısını zarara uğratan bu patojenik mikroorganizmalar, dünya çapında giderek ciddileşen çeşitli bulaşıcı hastalıkların etken maddeleridir. Bakteri, virüs, fungus, protozoa gibi patojenik mikroorganizmalar, çeşitli kalıtsal ve bulaşıcı hastalıklara ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Aşı ve antibiyotiklerin gelişmesi ile birlikte bulaşıcı hastalıklara karşı kazanılan ilk zaferlere rağmen, yeni ve çoklu ilaca dirençli patojenler sürekli olarak ortaya çıkmaktadır (Yoo and Lee, 2016). Patojenik mikroorganizmaların neden olduğu bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların çoğu gıda ve su kaynaklı hastalıklardır. Yılda 325.000 hastaneye yatış, 5.000 ölüm ve toplam 37.1 milyar dolarlık tıbbi maliyetle sonuçlanan tahmini 76 milyon vaka ile sadece gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında önemli bir halk sağlığı ve ekonomik yükü oluşturmaktadır (Dwivedi and Jaykus, 2011). En yaygın olarak bulunan patojenik mikroorganizmalar arasında; *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp*, *Plazmodium spp*, HIV virüsü, vb. bulunmaktadır.

Kalıtsal ve bulaşıcı hastalıklara neden olan patojenik mikroorganizmaların tanısının erken teşhisi çok önemlidir. Bu amaçla patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik birçok tanı yöntemleri geliştirilip, uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin temeli; biyolojik materyallerden (kan, serum, hücre, doku...) gıda ve su ya da çevresel atıklardan patojenik mikroorganizmaların bulunabileceği örneklerden elde edilen biyosensör sistemleri, yüksek hassasiyet ve özgüllük, düşük maliyetli olması gibi özellikleriyle birçok alana girip, özellikle de biyolojik materyallerin hızlı tayinine olanak sağlamaktadır (Mikkelsen, 1996). Günümüzde de, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların teşhisi, kanser tedavi ve teşhisinde kullanımları hızla artmaktadır.

Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayalı elektrokimyasal genosensörler, mikrobiyolojik kökenli hastalıkların teşhisi için diğer yöntemlere göre hızlı, kolay ve düşük maliyetlidir. Özellikle elektrokimyasal sistemlerin kolay

uygulanabilirliği, yüksek hassasiyet, hızlı cevap alınabilmesi, düşük maliyet ve minimize edilebilirliği özellikleri ile mikroçip teknolojilerinin temelini oluşturarak, özellikle klinik analizlere yönelik tasarımları geliştirilmektedir (Wang et al., 1997; Kara vd., 2016).

Son yıllarda, nanoteknolojinin de gelişmesiyle birlikte nanomateryal ile zenginleştirilen genosensör tasarımları hız kazanmıştır. Nanomateryal ile zenginleştirilen genosensörlerin yüzey alanları ve hassasiyetleri artırılarak, daha düşük sınırlı tayinleri elde edilmektedir (Ceci et al., 2010).

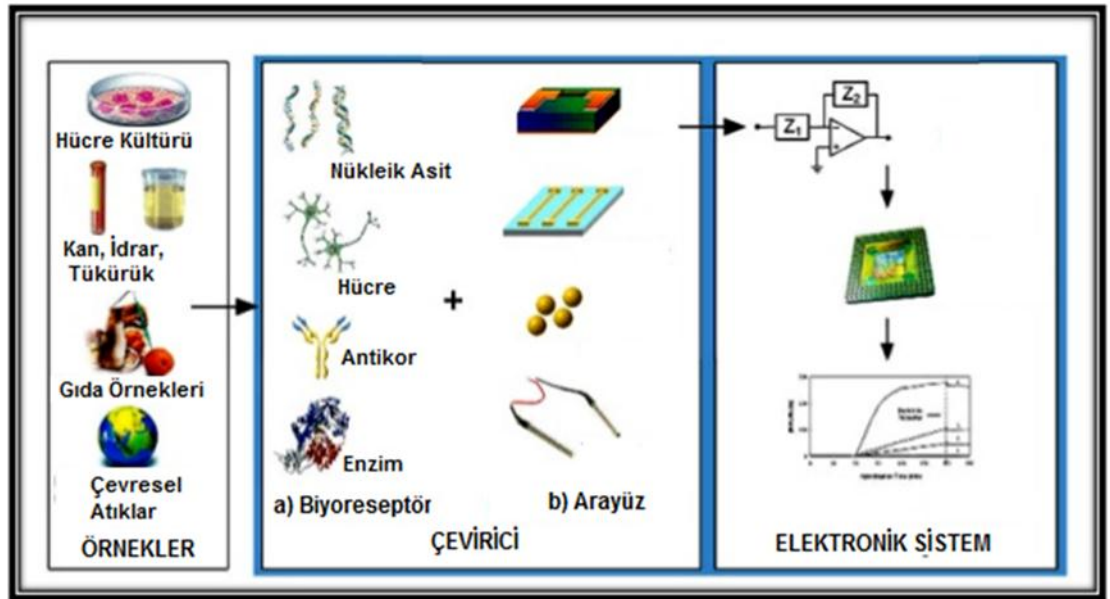
Karbon bazlı nanomateryallerden olan Grafen ve türevleri son yıllarda biyosensör sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Grafit türevi olan Grafen, karbon atomunun sp^2 hibritleşmesi yapan bal peteği örgülü yapılarından meydana gelen iki boyutlu bir nanomateryaldir. Grafen Oksit (GO) ise; grafitin oksidasyonu ile elde edilen grafen türevidir. Grafen oksitin yapısında farklı oksijen grupları bulunduğu için diğer moleküller ile daha iyi bağlanma imkanı sunmaktadır (Taniselass et al., 2019).

Tez çalışma kapsamında, patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik Grafen Oksit nanomateryali ile zenginleştirilmiş bir genosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Model olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisine ait PCR ürünü kullanılmış ve geliştirilen bu nanogenosensör ile patojenik mikroorganizmaların özellikle mikroçip teknolojisi ve klinik analizlere yönelik tanısında kullanılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyosensörler

Biyosensörler, analizi yapılacak biyolojik madde olan analit ile analite spesifik olan biyoreseptörün etkileşerek ve bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal yanıtı, fiziksel bir sinyale dönüştüren küçük analitik cihazlardır (Coulet, 1991). Biyosensörler birbiri içine geçmiş biri biyoreseptör, diğeri çevirici (dönüştürücü) adı verilen iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım olan biyoreseptör; analitin tanınmasından ve sensörün hassasiyetinden sorumlu olan kısımdır. İkinci kısım olan çevirici ise; etkileşme sonucunda oluşan maddeyi okunabilir bir sayısal değere çeviren kısımdır (Mehrvar et al., 2000; Thakur and Ragayan, 2013). Biyosensörün yapısı Şekil 2.1’de gösterilmektedir (Turan, 2018).



Şekil 2.1. Biyosensörün yapısı

2.1.1 İdeal bir biyosensörde olması gereken özellikler

Her biyosensörün sahip olduğu bazı statik ve dinamik özellikleri bulunmaktadır. Bu özelliklerin optimizasyonu, biyosensörün performansına yansımaktadır. Başarılı bir biyosensörün çalışabilmesi için, biyosensöre etki eden

bu özelliklere dikkat edilmesi gerekmektedir (Chaplin and Bucke, 1990; Hall, 1990; Thakur and Ragavan, 2013; Bhalla, 2016).

- **Seçicilik:** İdeal bir biyosensörde olması gereken özelliklerin en başında seçicilik parametresi gelmektedir. Biyosensörün hedef analiti için oldukça seçici olması gerekmektedir. Benzer kimyasal yapıya sahip kısımlarla minimum veya hiç reaktivite göstermemesi gerekmektedir. Bir biyosensör inşa etmek için; biyoreseptör seçiminde ilk önce seçicilik parametresine bakmak gerekmektedir.
- **Hassasiyet:** Bir biyosensör tarafından tespit edilebilecek minimum analit miktarı, tespit limitini veya hassasiyetini tanımlamaktadır. Biyosensör, hedef analiti için ilgilenilen aralıkta numunelerin ön temizliği ve ön konsantrasyonu gibi minimum ek adımlarla ölçüm yapabilmelidir.
- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı konsantrasyonlara sahip örneklerin, birkaç kez analiz edildiklerinde aynı veya birbirine yakın sonuçlar vermeleridir. Tekrarlanabilir sinyaller, bir biyosensörün tepkisi üzerine yapılan çıkarımlara, yüksek güvenilirlik ve sağlamlık sağlamaktadır.
- **Stabilite:** Biyosensör sisteminin içindeki ve çevresindeki ortam bozulmalarına karşı duyarlılık derecesidir. Bu bozulmalar, ölçülen bir biyosensörün çıkış sinyallerinde kaymaya neden olabilir. Bu ölçülen konsantrasyonda bir hataya neden olabilir ve biyosensörün kesinliğini ve hassasiyetini etkileyebilir.
- **Geniş Ölçüm Aralığı:** Sensör hassasiyetinin iyi olduğu konsantrasyon aralığıdır. Biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin doğrusal olduğu aralık olup, bu aralığın geniş olması gerekmektedir.
- **Hızlı Cevap Zamanı:** İdeal bir biyosensörün verimli bir şekilde çalışabilmesi için, hedef analitin gerçek zamanlı olarak izlenerek hızlı bir şekilde cevap vermesi gerekmektedir.
- **Kullanım Ömrü:** Biyosensörün performans özelliklerinde önemli bir bozulma olmadan uzun süre kullanılması gerekmektedir. Bunun

için kullanılan biyolojik materyallerin aktivitelerinde bozulma olmamasına dikkat edilmelidir.

- **Basitlik ve Ucuzluk:** İdeal bir biyosensörün tasarımı kolay, maliyeti ucuz ve kullanımı rahat olmalıdır. Bu nedenle, ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve maliyeti pahalı olan tasarımlar, basitleştirilip maliyeti de ucuz hale getirilmiştir.
- **Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik:** İdeal bir biyosensörün en önemli özelliklerinden birisi; küçültülebilir ve taşınabilir özellikte bir biyosensör tasarımıdır. Böylece, güçlü ip üstü laboratuvar cihazlarına entegre edilebilirler. Biyosensörün sterilizasyonu da diğer önemli özelliklerden birisidir. Ancak, biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı sterilizasyonu etkilemektedir.

2.2 Biyosensör Sistemlerinin Sınıflandırılması

Biyosensör sistemleri, biyomolekül çeşidine göre algılayıcı sistem ve çeviricinin türüne göre çevirici sistem olarak adlandırılan; 2 ana başlığa göre sınıflandırılmaktadır.

Tablo 2.1. Algılayıcı ve çevirici sistemlere göre biyosensörler.

ALGILAYICI SİSTEM	ÇEVİRİCİ SİSTEM
ENZİMLER (Enzim Temelli Biyosensörler)	ELEKTROKİMYASAL (Potansiyometrik, Amperometrik, Voltametrik, İmpedimetrik)
ANTİJEN-ANTİKOR (İmmünosensör)	OPTİK (Floresans, Yansıma, Biyoluminesans, Kırılma İndisi)
MİKROORGANİZMA (Mikrobiyal Biyosensörler)	PİEZOELEKTRİK (Yüzey Akustik Dalga, Piezokristalin Rezonans Frekansı)
HÜCRE	TERMAL (Reaksiyon Isısı, Adsorpsiyon Isısı)
DOKU	MANYETİK (Paramanyetik)
NÜKLEİK ASİTLER (Genosensörler)	ELEKTRİKSEL (Yüzey İletkenliği, Elektrolit İletkenliği)

2.2.1 Algılayıcı sisteme göre biyosensörler

Biyosensör sistemini oluşturan en önemli kısımlardan biri olan biyoreseptör, tespit için biyokimyasal mekanizmayı kullanan, maddeye karşı afinitesi olan ve etkileşime giren biyomolekül kısmıdır. Biyoreseptör sayesinde biyosensör, kendisine afinitesi olan hedef analiti tanıyarak onunla etkileşime girmektedir. Enzimler, antikorlar, hücreler, mikroorganizmalar, aptamerler ve nükleik asitler biyomolekül olarak kullanılmaktadır (Li et al., 2011).

2.2.1.1 Enzim temelli biyosensörler

Enzim temelli biyosensörler, biyoreseptör kısmında enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Enzimlerin substratlarıyla etkileşime girmesiyle oluşan biyokimyasal ürünün tespitine dayanmaktadır. Enzimler; herhangi bir parçalanmaya ve değişikliğe uğramayan, kimyasal dönüşümlerin modelini belirleyen moleküller olup, biyolojik sistemlerin katalizörleridir. Enzimler,

substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgünlüğü ve spesifikliğı sebebiyle en çok kullanılan biyomoleküller arasındadır. Ancak; pH, iyonik kuvvet, sıcaklık gibi faktörler, enzimlerin kararlılık göstermemesinden dolayı kullanımını sınırlamaktadır.

Biyosensörlerin geçmiş tarihine baktığımızda, biyosensör alanlarındaki ilk çalışmalar enzim biyosensörleri ile başlamıştır. Bu alandaki ilk çalışmalar, 1962’de Clark ve Lyons, 1967’de ise; Updike ve Hick tarafından Glukoz analizine yönelik Glukoz Oksidaz elektrotları üzerine geliştirilmiştir (Göpel and Heiduschka, 1995; Akyüz, 2011).

2.2.1.2 İmmünosensörler

Antikorlar, canlı vücuduna giren yabancı maddelere karşı üretilen ve immünoglobülinler olarak da bilinen protein molekülleridir. Y formuna sahip olup, bir çift ağır ve bir çift hafif zincir olmak üzere iki farklı zincire sahiptir. Her zincirin de kendine ait sabit ve değişken bölümleri bulunmaktadır. Antikorlar, değişken bölgede kendilerine spesifik ve immün sistem tarafından tanınabilen moleküller olan antijenler ile reaksiyona girmektedir (Goldsby et al., 2000).

İmmünosensörler, antijen ve antikor arasındaki etkileşimi ve oluşan immunokimyasal reaksiyonları inceleyen biyosensörlerdir. Antikor-antijen etkileşiminin yüksek stabilitesi ve biyolojik olarak hassas biyomolekülün genellikle çevirici yüzeyi üzerinde immobilize olması nedeniyle çoğu immünosensör tek kullanımlıktır. İmmünosensörler, çeşitli çevirici kısımlar ile kullanılarak farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. En yaygın olarak kullanılan immünosensör tipi, redoks enzimi tarafından üretilen redoks türlerinin (enzimatik etiket) ölçülebilir bir sinyale dönüştürüldüğü ELİSA testi olarak kabul edilmektedir (Moina and Ybarra, 2012).

2.2.1.3 Mikroorganizma temelli biyosensörler

Mikrobiyal Biyosensörler, biyoreseptör kısmında mikroorganizmaların kullanıldığı biyosensörlerdir. En çok tercih edilen mikroorganizmalar; bakteriler ve funguslardır. Mikroorganizmaların biyomolekül olarak kullanılmasının bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar; geniş bir alandaki kimyasal maddeleri metabolize etmeleri, yapılarında birçok enzim ve kofaktör bulundurmaları, farklı sıcaklık ve pH aralıklarında çalışmaya elverişli olmalarıdır. Enzim biyosensörleriyle karşılaştırıldıklarında, enzim saflaştırılmasına gerek duyulmadığı için maliyeti ucuz ve hızlıdır. Ancak, daha yavaş bir biyosensör cevabı vermektedir.

Mikroorganizmalar, değişik reseptör davranışları gösterdikleri için, Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde kullanılmaktadır. Mikrobiyal Biyosensörler genel olarak çevre analizlerinde, gıda ve klinik örneklerin izlenmesinde sık kullanılmaktadır (D'Souza, 2001; Lei et al., 2006; Yüce, 2011).

2.2.1.4 Aptamer tabanlı biyosensörler

Aptamerler; proteinler, amino asitler, ilaçlar, mikroorganizmalar, hücreler gibi çeşitli hedeflere yüksek spesifiklikte bağlanma özelliğine sahip, 15-40 baz uzunluğunda kısa tek zincirli DNA veya RNA dizileridir. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) teknolojisi ile in vitro ortamda seleksiyon yöntemiyle izole edilerek seçimleri gerçekleştirilir. Aptamerler, ilgili hedeflere yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanma yeteneklerinden dolayı kimyasal veya sentetik antikor olarak da adlandırılırlar. Aptamerler, antikorlar ile kıyaslandığında, bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar; in vitro ortamda üretilmesi, yüksek bağlanma afinitesi, küçük boyutlara sahip olması, kolay üretilmesi, termostabil olmasıdır. Aptasensörler, biyoreseptör kısmında aptamerlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Aptasensörler günümüzde bakteri ve virüs, hücre, ilaç tayinlerinde kullanılmaktadır (Chambers et al., 2008; Xu et al., 2009; Wu et al., 2015).

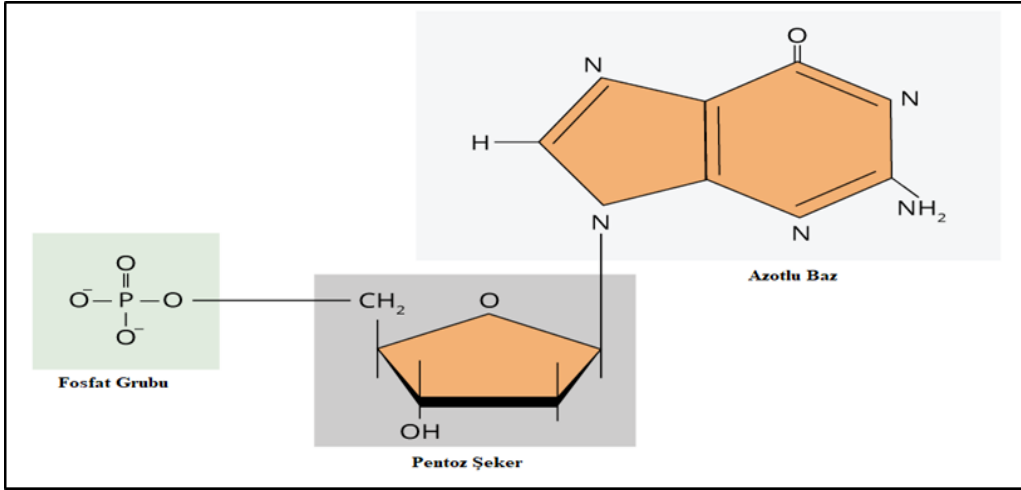
2.2.1.5 Nükleik asit tabanlı biyosensörler (Genosensörler)

Nükleik asitler, kalıtım materyali olan genleri oluşturan ve kalıtsal bilgiyi depolayarak bir sonraki kuşağa aktaran makromoleküllerdir. Yapılarında bulunan şekerin tipine bağlı olarak adlandırılan iki tip nükleik asit bulunmaktadır. Bunlar, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olarak isimlendirilmektedir. DNA, hücrenin genetik şifresini taşıırken, RNA ise; bu şifreyi proteinlerdeki amino asit dizisine taşıyan aracı moleküldür (Raven et al., 2017).

Nükleik asitler, nükleotidlerin yapı taşlarıdır. Çok sayıdaki nükleotidin (monomer) fosfodiester bağları ile birbirine bağlanmasından oluşan polinükleotid zincirleridir. DNA ve RNA nükleik asitleri, nükleotidlerin 3'- 5' fosfodiester bağları ile polimerize olarak meydana gelmektedir. Nükleik asit omurgası, fosfodiester bağı ile birbirine bağlanan şeker ve fosfat birimlerinden oluşur. Azotlu bazlar da, bu iki omurgayı bir arada tutmayı sağlar (Campbell and Reece, 2010).

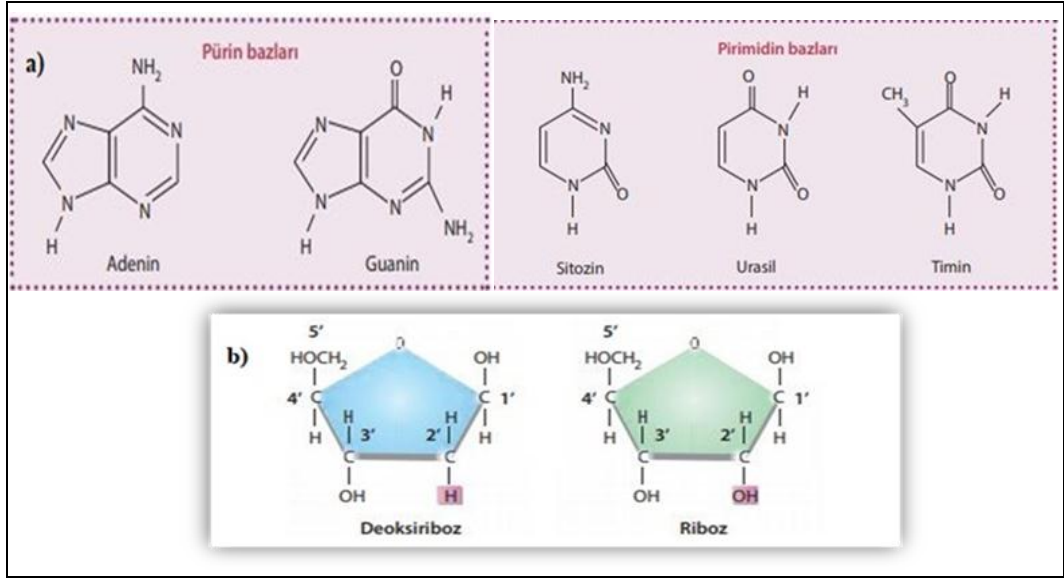
Bir nükleotid üç kısımdan oluşur:

- Azotlu organik baz,
- Beş karbonlu şeker (Pentoz),
- Fosfat grubu içermektedir.



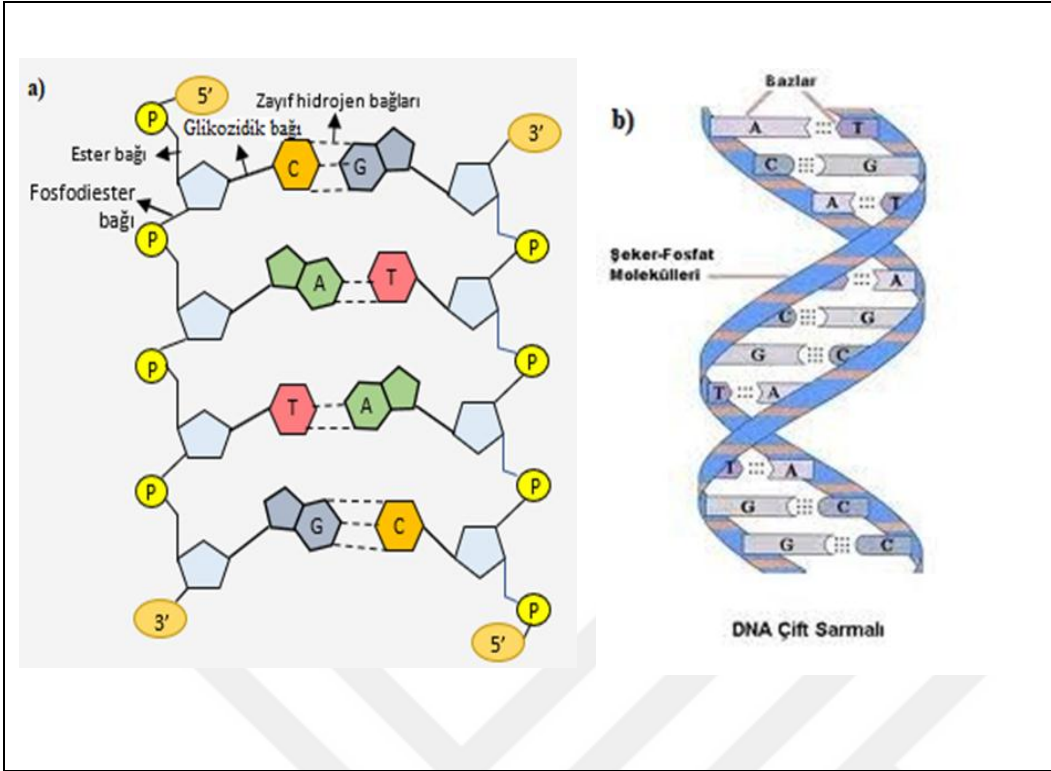
Şekil 2.2. Nükleotid yapısı (bosterbio.com)

Azotlu Bazlar; Pürin (çift halka) ve Pirimidin (tek halka) olmak üzere iki çeşittir. Pürinler, altı üyeli bir halka ile beş üyeli bir başka halkanın kaynaşmasıyla oluşan, çift halkalı yapıdır. Pürin ailesinin üyeleri; Adenin (A) ve Guanin (G)'dir. Pirimidinler ise, altı üyeli tek halkalı yapıdan oluşmaktadır. Pirimidin ailesinin üyeleri; Sitozin (C), Timin (T) ve Urasil (U)'dir. Adenin, Guanin ve Sitozin bazları hem DNA'da hem de RNA'da bulunmaktadır. Fakat, Timin (T) sadece DNA'da, Urasil (U) ise; sadece RNA'da yer almaktadır. **Pentoz şekeri;** riboz ve deoksiriboz olmak üzere iki çeşittir. Deoksiribonükleik asitlerde (DNA); deoksiriboz, Ribonükleik asitlerde (RNA) ise; riboz şekeri bulunmaktadır. Bu iki şeker arasındaki temel fark; deoksiriboz şekerinin 2' konumunda H bulunurken, riboz şekerinin 2' konumunda OH grubu bulunmasıdır. **Fosfat grubu;** bütün nükleik asitlerde bulunan fosfat grupları aynı olup, fosforik asitten oluşmaktadır. Fosfat grubu, şekerin 5' karbonuna ester bağı ile bağlanmaktadır (Snustad and Simmons, 2008; Lodish et al., 2018).



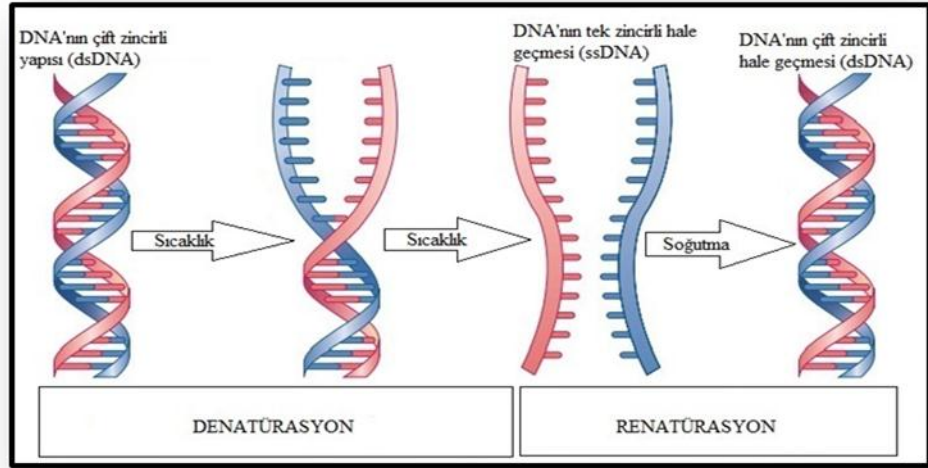
Şekil 2.3. DNA ve RNA moleküllerinin yapısında bulunan bileşenler (canlıbilimi.com)

DNA molekülü, çift sarmal (heliks) şeklinde, eksen etrafında sarılmış iki tane polinükleotid zincirine sahiptir. DNA'nın üç boyutlu yapısının ikili sarmal şeklinde olduğunu ilk kez 1953 yılında Watson ve Crick öne sürmüştür. İki adet şeker (deoksiriboz) ve fosfat omurgası sarmalın dış kısmında yer alırken, pürin ve pirimidin bazları sarmalın iç kısmında birbiriyle eşleşmektedir. Bu yerleşime göre; sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise; hidrofiliktir. Deoksiriboz ile fosfat molekülleri birbirine ester bağıyla bağlıdır. Fosfodiester bağlar olarak da bilinen bu bağlar son derece kuvvetlidir. Fosfodiester bağı şekerlerin 5'C ve 3'C atomlarını bağladığı için yapı 5' → 3' yönündedir. Çift zincirde karşılıklı olarak bulunan pürin ve pirimidin bazları da spesifik bir şekilde bağlanmaktadır. Bu bazlar, hidrojen bağları ile birbirine bağlanmaktadır. Adenin (A) ile Timin (T), Guanin (G) ile Sitozin (C) baz çiftleri oluşturur. Adenin ve Timin baz çiftinde iki, Guanin ve Sitozin baz çiftinde ise; üç Hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu eşleşmeler sayesinde çift sarmalın zincirleri birbirinin tamamlayıcısıdır. Pürin ve pirimidin bazlarında bulunan azot atomu ile deoksiriboz şekerinde bulunan karbon atomu arasında glikozidik bağı bulunmaktadır (Alberts et al.,2002).



Şekil 2.4. a) DNA molekülü, b) DNA çift sarmal yapısı (biyolojiportali.com)

Çift sarmal yapıdaki DNA, pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan zayıf hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır. Zayıf hidrojen bağları, fosfodiester bağlar kadar kuvvetli değildir. Bu yüzden, DNA yüksek sıcaklık veya kimyasal ortama maruz bırakıldığında, nükleotidler arasındaki bağlarda kopma olmaksızın, DNA çift zincirli heliks yapısını kaybederek ikiye ayrılmaktadır. Bu olaya **denatürasyon** adı verilmektedir. Adenin ve Timin arasında 2, Guanin ve Sitozin arasında 3 hidrojen bağı bulunduğu için, Guanin-Sitozin çifti daha geç ayrılmaktadır. Yüksek sıcaklık yöntemi ile ayrılan çift zincirli heliks yapısı yavaşça soğutulurken, karşılıklı hidrojen bağları kurulup, tekrar çift sarmal hale geçmektedir. Bu olaya ise; **renatürasyon** denir (Lewin, 2004).



Şekil 2.5. DNA’da meydana gelen denatürasyon ve renatürasyon olayları

Genosensörler; biyoreseptör olarak nükleik asitlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Sensör yüzeyinde, nükleik asitlerin hibridizasyon işlemine dayanmaktadır. Genosensörlerin çalışma prensibi, sensör yüzeyinde aranan hedefin belirli gen bölgesini içeren 20-40 baz uzunluğuna sahip tek sarmal prob DNA dizisi (ssDNA) ile prob dizisinin tam karşılığı olan hedef DNA dizisinin (ssDNA) etkileşimine dayanmaktadır. Tek sarmal prob dizi ile tek sarmal hedef dizinin etkileşmesi sonucu çift sarmal DNA (dsDNA) oluşması işlemine **nükleik asit hibridizasyonu** adı verilmektedir.

Günümüzde kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların teşhisi, mutasyon analizleri, klinik araştırmalarda, gıda sanayisinde, patojenik bakteri ve virüs tayinlerinde sık kullanılmaktadır. Çevirici kısım olarak elektrokimyasal çeviricileri kullanan Elektrokimyasal Genosensörler, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların hızlı ve erken tanısı için hızla geliştirilmektedir. Patojenik bakteri ve virüs tayinlerinde, infeksiyon ve kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemlere göre; daha hızlı, ucuz ve kolay yöntemlerdir (Tiwari and Turner, 2004; Karunakaran et al., 2015).

Tipik bir elektrokimyasal genosensörün tasarımı; prob immobilizasyonu, hibridizasyonu ve tayini ile gerçekleştirilmektedir.

Prob İmmobilizasyonu: Sensör yüzeyine prob DNA dizisinin tutturulması işlemidir.

Hibridizasyon: Sensör yüzeyine tutturulan prob DNA dizisi ile bu dizinin tam karşılığı olan hedef DNA dizisinin hidrojen bağı köprüleri ile bağlanması sonucunda hibridizasyon işlemi gerçekleşmektedir.

Tayin: Sensör yüzeyinde oluşan hibritin elektrokimyasal olarak algılanması yöntemleri ile tespitleri yapılmaktadır.

• DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Algılanması

İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemi

Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde, DNA bazlarından biriyle, özellikle Guanin bazıyla etkileşime girmektedir. Maddenin tek sarmal DNA (ssDNA)'yla etkileşiminden sonra alınan madde sinyali, bazlar açıkta olduğu için daha yüksek, çift sarmal DNA (dsDNA)'da ise; bazlar kapalı olduğu için madde sinyali daha düşüktür (Kara vd., 2002).

İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi

İndikatörsüz DNA Dizi algılama yöntemi iki yöneme dayanmaktadır. İlk yöntem Guanin sinyalinin oksidasyonuna dayalı yöntemdir. DNA'daki en elektroaktif ve kararlı baz Guanin bazı olup, +1.0 V civarında yükseltgenmektedir. Sensör yüzeyine immobilize edilen tek sarmal DNA (ssDNA)'daki bazlar açık olduğu için Guanin yükseltgenme sinyali yüksek, çift sarmal DNA (dsDNA)'daki Guanin bazı hibridizasyon sonucu Sitozin bazı ile bağlanması nedeniyle bazlar kapalı duruma geçtiği için Guanin yükseltgenme sinyali daha düşüktür.

İkinci yöntem ise; impedimetrik yöntem olan Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile sensör yüzeyinde oluşan hibritin Rct verilerine bakılarak tayinleri gerçekleştirilmektedir.

2.2.2 Çevirici sisteme göre biyosensörler

Çevirici sistem, biyoreseptörün analit ile etkileşiminden kaynaklanan biyokimyasal sinyali, fiziksel bir sinyal haline dönüştürmek için kullanılmaktadır. Üretilen sinyalin yoğunluğu, analit konsantrasyonuyla doğrudan veya ters orantılıdır. Çevirici kısım, biyosensör yüzeyinde meydana gelen ısı, ışık, potansiyel, akım, titreşim, basınç, kütle ölçerek, biyokimyasal reaksiyon hakkında bilgi vermektedir. Çevirici sisteme göre biyosensörler; optik, piezoelektrik, kalorimetrik ve elektrokimyasal sensörler olarak sınıflandırılmaktadır (Lowe et al., 2007; Sassolas et al., 2012).

2.2.2.1 Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, kütle bazlı ölçümlere dayanan sensörlerdir. Ayrıca, akustik prensibine (ses titreşimi) dayandığı için **akustik biyosensörler** olarak da adlandırılırlar. Mekanik bir kuvvet uygulandığında, elektrik sinyali üretirler (Malhotra et al., 2017).

Piezoelektrik sensörler, elektrik potansiyeli uygulandığında elastik bir deformasyona uğrayan kristalleri kullanırlar. Piezoelektrik sensörlerin prensibi; bu kristallerin biyolojik tanıma elemanı ile kaplanarak, hedef analitin reseptöre bağlanması sonucunda frekans ve kütleinde meydana gelen değişiklikleri ölçmesidir. Bu, biyosensördeki Kuvars Kristal Mikrobalansının özel bir uygulamasıdır (Choudhary et al., 2015).

●**Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM; Quartz Crystal Microbalance)**

Piezoelektrik sensörlerin önemli uygulamalarından biri olan Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM) tabanlı biyosensörler, kütleyle dayalı ölçüm yapan ve oldukça hassas olan sensör sistemleridir (Çakır, 2017). QCM, sensör yüzeyine immobilize edilen biyomoleküllerin etkileşimi sonucunda oluşan kütle değişimlerinin sebep olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır. QCM, her iki yüzeyinde eşit yarı çaplı ince bir kuvars kesme diskinde kaplanmış elektrotlardan oluşmaktadır. Elektrotlara elektriksel güç

uygulandığında elde edilen mekanik kuvvet, kuvars kristal doğal frekansında bir rezonans salınımı gerçekleştirir. Moleküllerin salınımlı kristalin yüzeyine adsorpsiyonu, frekansının düşmesine neden olur. Bu frekans değişimini ölçerek, yüzeyde biriken birim alan başına kütle miktarı büyük bir hassasiyetle belirlenebilmektedir. Frekans değişimi (Δf), birim alan başına adsorbe edilmiş moleküllerin kütlesi (Δm) ile doğru orantılıdır. Bu frekans değişimi ve sensör yüzeyine immobilize edilen moleküllerin kütleleri arasındaki bağıntı Sauerbrey denklemini ile açıklanmaktadır (Kimmel et al., 2011; Nyguven et al., 2019).

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

Denklemden; f_0 rezonans frekansını, A kristalin aktif alanını, P_q kuvarsın yoğunluğunu, M_q kuvarsın kesme katsayısını ve Δm ise; kristal üzerindeki kütle değişimini göstermektedir (Pohanka, 2017).

Günümüzde, patojen bakteri ve virüs tayinleri, DNA etkileşimleri, antijen-antikor etkileşimlerinde sık kullanılmaktadır.

2.2.2.2 Kalorimetrik biyosensörler

Kalorimetri, kimyasal veya biyokimyasal reaksiyona eşlik eden ısı ölçümüdür. Isı değişimleri, endotermik veya ekzotermik olabilmektedir (Ramanathan et al., 1998). Bu ısı değişimleri bir biyokimyasal reaksiyon sırasında ısının emilmesi veya oluşması ile reaksiyon ortamının değişmesine neden olmaktadır. Kalorimetrik Biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sonucu ortaya çıkan ısının içeriğindeki değişikliğin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Li et al., 2011). Pratik uygulamaların çoğunda kalorimetrik biyosensörler kullanılmıştır; çünkü bunlar oldukça hassas, nispeten ölçüm devresinde kullanımı ucuz ve kolaydır.

Kalorimetrik biyosensörler ilk olarak enzim elektrodu ve enzim reaksiyonlarıyla ilgili mikrokalorimetrik çalışmalardan esinlenerek ortaya çıkıp, uzun süre enzim bazlı sensörlere uygulanmıştır. Günümüzde ise; gıda sanayisinde, DNA hibridizasyon tayininde, kozmatik, farmasotik ve bileşen analiz tayinlerinde kullanılmaktadır (Monosik et al., 2012; Yakovlev et al., 2013).

2.2.2.3 Optik biyosensörler

Optik biyosensörler, sensör yüzeyinde oluşan biyolojik veya kimyasal reaksiyonun bir sonucu olarak gözlenen veya yayılan ışığın ölçümüne dayanan sensörlerdir. Optik ölçüm; floresan, absorbans, kemilüminesans, yansıma, ışık saçılımı ve kırılma indisindeki değişikliklere dayanabilir. Optik biyosensörlerin temel prensibi, sensör yüzeyine immobilize edilen biyomolekülün etkileşimi sonucunda meydana gelen sinyalin ışık yansıması, saçılımı ya da açısındaki değişimi ölçmektedir. Genellikle, en sık kullanılan optik biyosensörler, Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) ve Floresan Tabanlı Algılama sensörleridir (Garcia, 2009).

• Yüzey Plazmon Rezonans (SPR; Surface Plasmon Resonance)

Yüzey plazmon rezonans (SPR) tekniği, bir metal üzerinde adsorbe edilen çok ince malzeme katmanlarının kırılma endekslerini ölçmek için kullanılan optik bir yöntemdir. SPR Biyosensörlerinde, sensör yüzeyindeki bir biyo tanıma elemanı ile analit etkileşime girdiğinde, yüzey plazmon dalgalarındaki değişimin ölçümü gerçekleştirilmektedir. SPR yöntemi; belirli koşullarda, metalik bir film üzerindeki yüzey plazmonlarının fotonlar tarafından uyarılabildiği, dolayısıyla bir fotonun bir yüzey plazmonuna dönüştürülmesi ve absorbantın kırılma endeksine dayanması prensibine dayanmaktadır.

Günümüzde SPR Biyosensörleri, patojenik mikroorganizmaların tayininde, DNA ve protein etkileşimleri, antijen-antikor etkileşimlerinin saptanmasında kullanılmaktadır (Homola, 2003; Pattnaik, 2005; Mol and Fischer, 2010).

• Floresan Tabanlı Algılama

Floresan, seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılan optik bir yöntemdir. Floresan tabanlı algılamada, hedef moleküller veya biyolojik tanıma molekülleri floresan özellikteki boya gibi maddeler ile etiketlenmektedir. Floresan yoğunluğunu, hedef moleküllerin varlığını ve hedef ile biyoreseptör arasındaki etkileşimi göstermektedir. Floresan tabanlı algılama, çok düşük analit konsantrasyonlarını tespit edebilme özellikleri ile hassas bir yöntemdir. Düşük analit konsantrasyonlarında, floresan emisyon yoğunluğu konsantrasyonla doğru orantılıdır. Floresan tabanlı algılamada, floresan malzemeler ve yeşil floresan proteini yaygın olarak kullanılmaktadır (Fan et al., 2008; Garcia, 2009).

2.2.2.4 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, sensör yüzeyinde bulunan biyolojik tanıma elemanı ile bu elemana spesifik olan hedef molekülün etkileşmesiyle oluşan biyokimyasal reaksiyona, seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren, konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlardır. Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarından üretilen akım ölçülmektedir. Üretilen bu akım, mevcut olan elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile veya üretim/tüketim oranıyla ilişkilendirilmektedir. Sensör yüzeyinde oluşan biyokimyasal reaksiyon sonucunda elektriksel sinyaller oluşmaktadır. Böylece, oluşan elektriksel sinyaller sonucunda, analit konsantrasyonu ve içeriği analiz edilebilmektedir (Perumal and Hashim, 2014).

Elektrokimyasal sensörler, özellikle hasta başı bakım noktası gibi tıbbi cihazlara çeşitli avantajlar sağlar. Düşük üretim maliyetleri ve minimum güç gereksinimleri, hızlı yanıt alınabilmesi, basit tasarımlar, kolay kullanıcı arayüzleri, minyatürleştirme kolaylığı, sağlam ölçümler, düşük tespit limitleri ve küçük işletme hacimleri buna dahildir. Elektrokimyasal biyosensörler, özellikle nükleik asit tanıma yöntemlerine dayalı biyosensörlerde sık kullanılmaktadır. Günümüzde; bakteri ve virüs tayinleri, mutasyon analizleri, DNA molekülü ile

diğer maddeler arasındaki etkileşimler, ilaç-DNA etkileşimleri, toksik madde tayini, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.

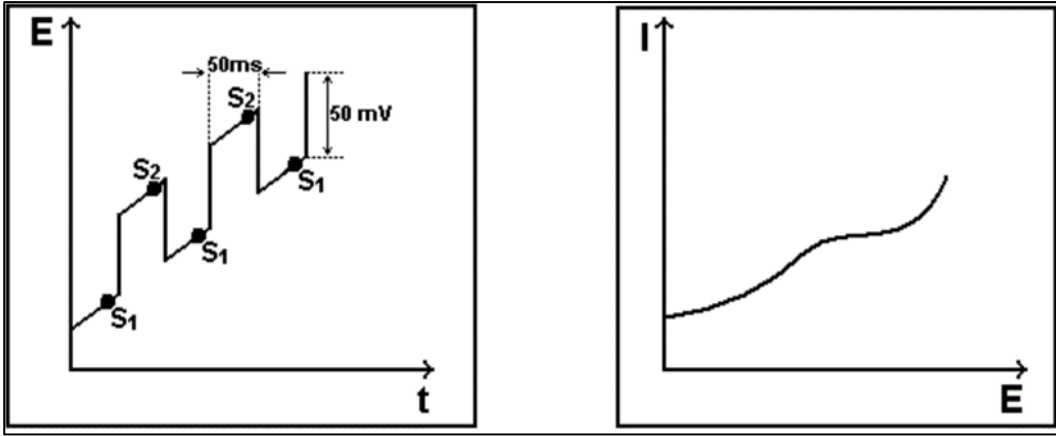
Elektrokimyasal Biyosensörler; Potansiyometri, Konduktometri, İmpedimetrik ve Amperometri gibi farklı yöntemler kullanılarak ölçülen elektriksel özelliklerin (direnç, akım, potansiyel) tespitine dayanmaktadır (Higson, 2012). Maddelerin elektrokimyasal özelliklerinin ölçülmesi ve ölçülen sinyallere göre maddelerin analizine dayanan bu yöntemlere '**elektroanalitik yöntemler**' adı verilmektedir. Bu yöntemlerin diğer analiz yöntemlerine göre; duyarlılık, hızlılık, seçicilik ve düşük maliyet gibi avantajları bulunmaktadır. Elektroanalitik yöntemlerde en sık kullanılan yöntemler; voltametrik ve impedimetrik yöntemlerdir (Yılmaz, 2016).

Voltametri tekniklerinden yaygın olarak Diferansiyel Puls Voltametrisi, Kare Dalga Voltametri ve Döngüsel Voltametri kullanılırken, impedimetrik yöntemlerden de Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) kullanılmaktadır. Voltametri teknikleri, akımın ölçülmesine dayalı, EIS ise; direncin ölçülmesine dayalı yöntemlerdir. Bu yöntemler; üçlü elektrot sistemine dayanmaktadır. Üçlü elektrot sistemi ise; çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrottan oluşmaktadır.

• Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

Diferansiyel Puls Voltametrisi uyarma sinyalleri; doğrusal bir tarama esnasında periyodik pulsların oluşturulmasıyla gerçekleştirilen çok duyarlı bir yöntemdir. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyel pulsların sonucu olarak oluşan akımın, uygulanan pulsların ömrü süresince zamanın fonksiyonu olarak ölçülmektedir. Tayin sınırı ise; 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

Şekil 2.6'da DPV uyarma sinyali ve voltamogram grafiği gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Analog cihazlarda kullanılan DPV uyarma sinyali ve DPV voltamogramı (Öner, 2013)

• Kare Dalga Voltametri (SWV)

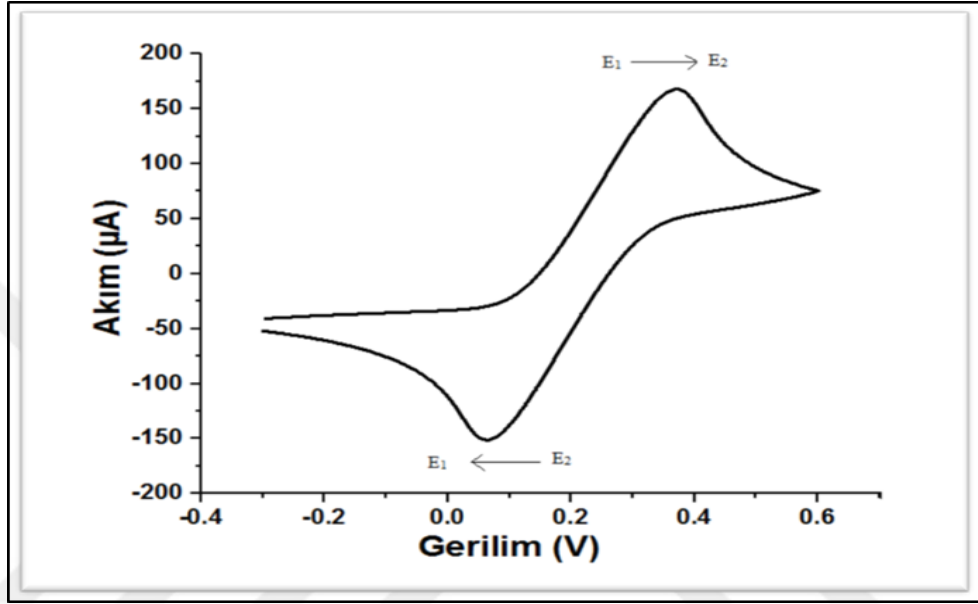
Kare Dalga Voltametrisi, son derece hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Tüm ölçümün yaklaşık olarak 10 ms^{-1} sürede gerçekleştiği için hızlı, 10^{-7} - 10^{-8} tayin sınırı bulunduğu için duyarlıdır. İleri puls katodik akım ile geri puls anodik akım arasındaki fark olan Δi 'nin bulunması ile voltamogram grafiği elde edilmektedir (Osteryoung, 1993).

• Döngüsel Voltametri (CV)

Döngüsel Voltametri (CV), elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgi edinmek için yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. CV yöntemi, diğer tekniklerden farklı olarak tayin duyarlılığını artırmak için değil, elektrokimyasal mekanizmanın aydınlatılması için kullanılmaktadır (Uslu, 2011).

Döngüsel Voltametrinde, çalışma elektroduna sürekli olarak değişen potansiyel uygulanarak, gerilimin fonksiyonu olarak akım değeri ölçülmektedir. Çalışma elektroduna potansiyel uygulandığında, uygulanmakta olan potansiyele göre; pozitif veya negatif yönde bir karakter göstermektedir. Çevresindeki çözeltiden elektron alıp, elektron vererek ölçülebilir bir akım oluşmasına neden olmaktadır. Potansiyel, standart indirgenme potansiyel değerine yaklaşarak madde indirgenmeye başlar. Elektrot yüzeyindeki maddenin hızına bağlı olarak daha da

madde indirgeneceği için akım değeri artar. Bu artan akım değeri; katodik pik değeridir. İndirgenme hızı artmaya başladıkça akımı, difüzyonla gelen madde miktarı kontrol etmeye başlayarak akım azalmaya başlar. Bu azalan akım değeri de anodik pik değeridir. Uygulanan potansiyel değerine karşılık gelen akım piklerinin oluşumu Şekil 2.7’de gösterilen voltamogramda verilmiştir (Wang, 2006; Göver, 2011).



Şekil 2.7. Dönüşümlü voltametri de akım-gerilim eğrisini gösteren voltamogram

• Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS), elektrot yüzey karakterizasyonuna dayalı bir teknik olup, elektrokimyasal sistemleri karakterize etmek için kullanılan ve elektrotların ara yüzeyinde meydana gelen değişimleri inceleyen güçlü bir tekniktir (Ciucci, 2019). Çalışılan sistemin, elektrik akımı cevabını periyodik küçük genlik sinyali uygulayarak izlemek için de kullanılmaktadır. Empedansa, sistem yanıtından elde edilen bilgiler kapasitans ve ara yüzey yük transfer direncini içerdiği için, sinyaller elektrot yüzeyinde meydana gelen farklı reaksiyonları algılamak için kullanılmaktadır. Sonuç olarak; bu teknik doğru verileri sağlama kabiliyetinden dolayı, yüzey işlemlerini araştırmak için kullanılmaktadır. (Boumya et al., 2017).

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, faradayik ve faradayik olmayan empedans ölçümü adı verilen redoks probu varlığında kullanılmaktadır. Bu redoks problemleri; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ veya $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ redoks çiftlerinden biri olabilmektedir. (Halliwell et al., 2014).

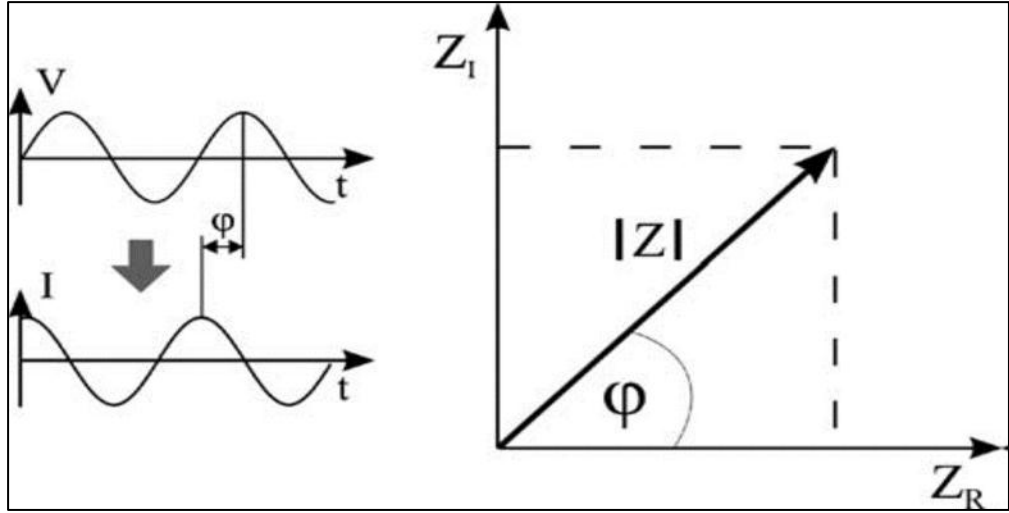
EIS ölçümlerinde, sinyal süreci için alternatif bir akım kullanılmaktadır. Alternatif akım (AC) devrelerinde, direncin eşdeğeri olarak Empedans kavramı kullanılmaktadır. Empedans; karmaşık direnç ölçümü olup, kapasitör ve indüktör devre elemanlarından oluşan devrelerde kullanılmaktadır. Biri reel, diğeri sanal kısım olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır.

$$Z = R + jX$$

Empedans, genellikle küçük bir genliğe sahip potansiyel uygulanarak ve mevcut cevabı tespit edilerek belirlenmektedir. Empedans Z , gerilim zaman fonksiyonu $V(t)$ ve elde edilen akım zaman fonksiyonu $I(t)$ 'nin bir kısmıdır. AC devrelerinde, potansiyel ve akım arasında zaman içerisinde bir faz kayması da meydana gelmektedir. Bu akım (I), zamanın bir fonksiyonu olarak, sinüzoidal dalga şeklindeki bir sinyaldir.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \phi)}$$

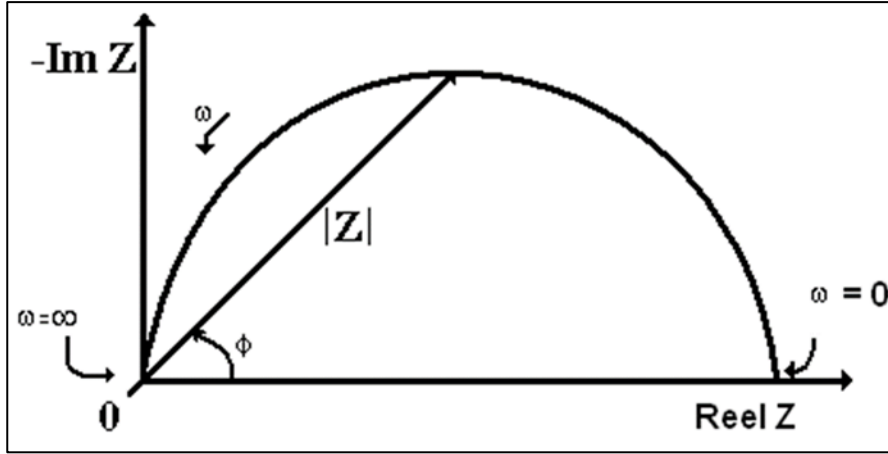
Yukarıdaki denklemde, V_0 ve I_0 maksimum potansiyel ve akım sinyalleri olup, f ; frekans, t ; zaman, ϕ ; potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır (Lisdar and Schafer, 2008; Uygun ve Ertuğrul Uygun, 2014).



Şekil 2.8. Empedans'ın potansiyel (zaman) ve akım (zaman) büyüklüklerine bağlı matematiksel değişimi

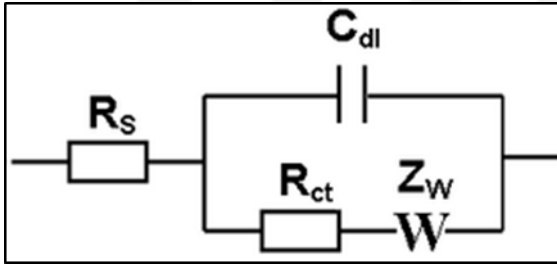
Empedans, ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilmektedir. Bunlar; Bode Eğrisi ve Nyquist Eğrisidir. Bode Eğrisinde, frekans empedansa göre çizilmekte olup, Nyquist Eğrisinde ise; empedans bileşeni yüksek frekansta bir yarım daire ve daha düşük frekansta bir lineer bileşen elde etmek için empedansın gerçek kısmına göre çizilmektedir.

Nyquist Eğrisi, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisinin bir empedans ölçüm diyagramı olup, X ve Y ekseninde 2 boyutlu olarak inşa edilmiştir. Her frekansta, X ekseninde empedans gerçek bileşeni olan Z_{re} ve Y ekseninde empedans sanal bileşeni olan Z_{im} arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Nyquist eğrisi genellikle bir veya daha fazla yarım daire içermektedir. Bu yarım daire bileşeni, yarı daire çapının ölçülmesiyle hesaplanan, elektrot yüzeyindeki yük elektron transfer sınırlama işlemini temsil etmektedir. Bazen Nyquist Eğrisi %45'lik açıyla diyagonal çizgi içermekte olup, bu çizgi de Warburg Empedansını temsil etmektedir.



Şekil 2.9. Nyquist eğrisi

Empedansa dayalı elektrokimyasal ölçümler, bir elektrik devresi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Genellikle çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrottan oluşan üçlü elektrot sistemi ile kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan eş değer devrelerden biri; R_s , R_{ct} , C_{dl} ve Z_w içeren Randles eş değer devresidir. (Brock, 2017).



Şekil 2.10. Randles Devresi'nin şematik gösterimi

Yukarıdaki devrede gösterilen bileşenlere baktığımızda; R_s , yüksek frekanslarda oluşan elektrotlar arasındaki çözelti direncidir. R_{ct} , elektrot yüzeyindeki elektron veya yük aktarma transferine dayanarak aktarılan yükün direncindeki artıştır. Çift katmanlı kapasitans olarak bilinen C_{dl} , elektrot ve çözelti içindeki iyonlar arasındaki dış yüzey kapasitansıdır. Z_w ise, Warburg empedansı olarak adlandırılan ve düşük frekanslarda oluşan lineer kısımdır. EIS, bu bileşenlerle belirlenen ve bir frekans aralığında empedans taraması gerçekleştirilerek elektrot yüzeyinde oluşan yük direncindeki artış olan R_{ct} değerindeki değişimlere bakılarak yorum yapılmaktadır.

2.3 Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensörler, canlının bulunduğu her uygulamada kendine yer edinerek çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Biyosensörlerin kullanım alanları;

- ✓ Gıda Güvenliği,
- ✓ Mikroorganizma Tespiti,
- ✓ Sanayi Atıklarının Kontrolü,
- ✓ Çevre Kirleticilerinin Kontrolü,
- ✓ Biyolojik Savunma (Askeri),
- ✓ İlaç Üretimi,
- ✓ Tarım Uygulamaları,
- ✓ Klinik Tanı ve Biyotıp (Kenar, 2010).

2.3.1 Klinik tanıya yönelik biyosensörler

Günümüzde klinik teşhis ve izleme aşamaları için hızlı ve doğru analizler yapmak gerekmektedir. Çeşitli kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların teşhisi ve izlenmesi, kan örneklerinin rutin testleri ve diğer ilgili bütün testler için büyük bir çaba sarf edilmektedir. Bu rutin teknikler için; analitik teknikler, uzman personel, zaman ve yüksek örnek hacimleri gerekmektedir. Biyosensörler ise; analit tespiti için kolay, düşük maliyetli, yüksek hassasiyetli, hızlı yanıt verme gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, biyosensörler ile maliyeti pahalı ekipmanlar ve uzman personel ihtiyacına gerek kalmamaktadır (Monosik et al, 2012; Bahadır ve Sezgintürk, 2015).

Günümüze kadar genetik ve bulaşıcı hastalıklar, kanser, kalp hastalıkları gibi çeşitli klinik tanıya yönelik birçok biyosensör geliştirilmiştir. İlk kez 1962’de L.C. Clark tarafından geliştirilen klinik tanıya yönelik ticari biyosensör tipi glukoz biyosensörleridir. Günümüze kadar da geliştirilen ve başarıya ulaşılan çeşitli ticari biyosensörler mevcuttur. Bunlar arasında; glukoz biyosensörleri, hamilelik testleri, çeşitli hastalık yapan patojen mikroorganizmaların tespitine yönelik biyosensörler (*E. coli* O157H7, *Helicobacter pylori*, İnfluenza A ve B virüsleri vb.), tümör işaretleyici biyosensörler (PSA, CEA, AFP) bulunmaktadır.

2.3.2 Gıda güvenliğine yönelik biyosensörler

Gıda endüstrisi, gıdaların kalitesini ve güvenliğini kontrol etmek için uygun analitik yöntemler geliştirmektedir. Gıdadaki biyolojik ve kimyasal maddelerin belirlenmesi önemlidir. Çünkü, bu kirletici maddeler insan sağlığı açısından tehlikeli olup, dünyadaki gıda endüstrisinde de büyük ekonomik kayıplara neden olabilir. Gıdalarda kalite, bu kirletici maddelerin fiziksel özellikleri ve kimyasal yapılarının miktarı ile ilgilidir. Biyosensörler, bu kirletici maddelerin yanı sıra aminoasitler, şekerler, alkoller gibi önemli analitler için kullanılmaktadır. Gıdada güvenlik ise; patojenik mikroorganizmaların ve onların toksinleri, alerjen ve toksik maddelerin miktarlarını saptamaktır. Gıda endüstrisinde biyosensörler ile temel olarak gıda güvenliği analizine odaklanılmaktadır (Aykut ve Temiz, 2006; Zhang et al, 2019).

Gıda güvenliğine yönelik çeşitli ticari biyosensörler geliştirilmiştir. Bunlar arasında; *Salmonella*, Botulinum toxin A, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157H7, glukoz, etanol, laktat biyosensörleri bulunmaktadır.

2.4 Patojenik Mikroorganizmalar

Konakçı bir organizma üzerinde ya da içinde yaşayan, konakçıya zarar veren organizmalara **parazit** denir. Bu mikrobiyal parazitlere ise; **patojen** adı verilmektedir. Protozoa, fungus, virüs ve bakteri gibi patojenik mikroorganizmalar, bitki, hayvan ve insan hastalıklarına neden olan mikroorganizmalardır. Konakçı-patojen ilişkisinin sonucu, mikroorganizmanın patojenitesine bağlıdır. Konakçının patojene dirençliliği ya da duyarlılığı değiştiği gibi, patojenin konakçıyı zarara uğratma kabiliyeti de değişir. Patojenite, her bir ayrı patojen için belirgin şekilde farklılık göstermekle birlikte, nicel ölçütü virülensdir. Virülens, belirli bir sürede konakçıda patojenik yanıtı sağlayacak hücre sayısıdır. En yaygın patojenik mikroorganizmalar arasında, *Plazmodium*, HIV virüsü, *Escherichia coli* ve *Salmonella* vb. bulunmaktadır. Patojenik mikroorganizmalar, her yıl insanların, hayvanların ve bitkilerin sağlığına büyük zarar vermektedir (Madigan and Martinko, 2010; Yi-Xian et al., 2012).

Bu çalışmamızda, model patojen mikroorganizma olarak *Escherichia coli* bakterisi kullanılmıştır.

2.4.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

1885 yılında Bakteriyolog Theodor Escherich, yeni doğan bebek dışkılarından bazı mikroorganizmalar izole ederek, bunlara *Bacterium coli commune* adını vermiştir (Bell and Kyriakides, 2002). Bakterilerin fenotipik özellikleri üzerine yapılan yoğun çalışmaların ardından, 1960 yıllarında *Escherichia coli* cinsi tanımlanmıştır (Blackburn and Mclure, 2002).

E. coli; *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan, *Escherichia* cinsi içerisinde en önemli tür olup, insanlar için önemli fırsatçı patojendir. Ortalama 1,1-1,5 µ çapında ve 2,0-6,0 µ boyunda, sporsuz, genellikle hareketli (flagella hareketi gösteren), gram negatif basillerdir. İnsan ve çoğu sıcakkanlı hayvanların doğal bağırsak florasında bulunan, fakültatif anaerob bir bakteridir (Torun, 2011; Çalış, 2012).

Mezofilik bir bakteri olan *E. coli*, 7-45°C arasında üreme özelliğine sahiptir. Fakat optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Sıcaklığa direnç göstermemekle beraber, soğuk ve donmuş ortamda canlılığını korur. *E. coli*'nin optimum pH değeri nötre yakın olmakla birlikte pH değeri 4.4 gibi oldukça asidik ortamda üreyebilmektedir (Uçar vd., 2016).

E. coli, karmaşık ve çeşitli antijen tiplerine sahip bir bakteridir. Somatik (O), Flagellar (H) ve Kapsüler (K) antijeni bulunmaktadır. Bu antijen tiplerine göre, ilk kez Kauffman tarafından geliştirilen serotip şemasına göre gruplandırılmıştır. O antijenleri; somatik, lipopolisakkarit yapıda, ısıya, kaynatmaya ve alkole dayanıklı fakat formale dayanıksız antijenlerdir. H antijenleri; protein yapıda, ısıya, kaynatmaya ve alkole dayanıksız fakat formale dayanıklı, hareketli türlerde bulunan antijenlerdir. K antijenleri; kapsül antijeni olup, bakterinin yüzeyinde bulunan genellikle asidik polisakkarit yapıdaki antijenlerdir (Nayır, 1998; Murray, 2003).

E. coli, özellikle çocuklarda diyare, dizanteri, hemorajik kolit, böbrek ve mesane hastalıkları, menenjit, sepsisemi, cerrahi yara enfeksiyonları gibi hastalıklara neden olup, bu hastalıkların bazıları ölüme kadar neden olabilmektedir. *E. coli*'nin enterotoksin, kapsül, salgıladığı enzimler gibi çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Bu farklı virülans faktörler, farklı *E. coli* suşlarında farklı hastalıklara neden olmasını sağlamaktadır. Patojenik *E. coli* suşları; virülans faktörler, patojenite özellikleri, O:H serotiplerine göre 6 ana alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroadhesiv *E. coli* (DAEC) ve Entero-agregatif *E. coli* (EAggEC)'dir (Bell and Kyriakides, 2002; Fratamico and Smith, 2005; Albayrak, 2018).

2.5 Patojenik Mikroorganizmaların Tayininde Kullanılan Yöntemler

Patojenik mikroorganizmaların günümüze kadar çeşitli tayin yöntemleri ile tanıları elde edilmektedir. Bu yöntemler; kültürel yöntemler, immünolojik yöntemler, moleküler yöntemler ve biyosensör temelli yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Aras, 2010).

2.5.1 Kültürel yöntemler

Patojenik mikroorganizmaların özellikle de bakterilerin tayininde genellikle kültürel yöntemler kullanılmaktadır. Kültürel yöntemler; hassas, ucuz, mikroorganizmaların sayısı ve niteliği hakkında hem kantitatif hem de kalitatif bilgi sağladıkları için 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Fakat, tüm temel zenginleştirme aşamaları, mikroorganizma kolonilerinin görülmesinin uzun zaman alması ve uzman ihtiyacının doğması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Baraketi et al., 2018).

Kültürel yöntemler, mikroorganizma kültür yöntemine dayalı en eski mikroorganizma saptama yöntemleridir. Belirli mikroorganizma türlerini tespit etmek amacıyla farklı seçici ortamlar kullanılmaktadır. Çeşitli mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu ortamlar, çeşitli besiyerler ile

sağlanmaktadır. Bu farklı besiyerler ve teknikler ile mikroorganizma kültürü gerçekleştirilmektedir.

Başlıca patojenik mikroorganizmaların tanısında kullanılan kültürel yöntemler; morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesine göre, biyokimyasal testlere göre, koloni sayımı, EMS yöntemi, Membran Filtrasyon Yöntemi, Mikroskopik yöntemler ile mikroorganizma tayinleri gerçekleştirilmektedir (Halkman ve Tunail, 2000; Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2006; Lazcka et al., 2007; Torun, 2011).

2.5.1.1 Morfolojik veya fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

Mikroorganizmaların morfolojik olarak incelenmesi mikroorganizma tayininin önemli bir aşamasıdır. Bu işlemin önemi, sonraki testler için bir basamaktır. Çeşitli boyama teknikleri ile mikroorganizmalar boyanarak, mikroskop altında mikroskopik incelemelerde tanıları gerçekleştirilmektedir. Bu boyamalar sayesinde, mikroorganizmanın morfolojisi ve grubu, gram reaksiyonu, sporlu olup olmadığı, flagellaya sahip olup olmadığı gibi özellikleri belirlenmektedir.

2.5.1.2 Biyokimyasal testler

Her mikroorganizmanın kendine özgü biyokimyasal özellikleri bulunmaktadır. Biyokimyasal testler, mikroorganizmaların bu biyokimyasal özelliklerine bağlı olarak gelişen testlerdir. Bu testler ile, mikroorganizmaların karbonhidrat başta olmak üzere çeşitli besin maddelerini kullanabilme, enzimlerinin faaliyetlerini ortaya koyabilme, yapım (anabolizma) ve yıkım (katabolizma) ürünlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Yaygın olarak; Fermantasyon testi, H₂S oluşumu ve IMVIC Testleri (İndol Üretimi, Metil Red, Voges-Proskauer ve Citrat) uygulanmaktadır.

2.5.1.3 Koloni sayımı

Katı besiyerinde gelişen mikroorganizmalar gözle görülecek şekilde koloni oluşturmaktadır. Bu koloniler sayılarak, gerçek örnekteki mikroorganizma sayısının hesaplanması gerçekleştirilmektedir. Koloni sayımı; dökme plaka yöntemi, yayma plaka yöntemi ve damlatma yöntemi olmak üzere üç şekilde gerçekleştirilmektedir.

2.5.1.4 En muhtemel sayı yöntemi (EMS)

Genellikle mikroorganizma sayısının az olduğu örneklerde kullanılmaktadır. EMS yönteminde her dölüsyondan birden fazla sayıda ekim yapılmaktadır. Örnekten ardışık 3 dölüsyondan 5'er adet sıvı besiyerine ekim yapılarak, tüpler inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonrası incelenen tüpler, gelişme olanları pozitif gösterilerek, istatistiksel yöntemlerle elde edilen tablolardan yararlanılıp hesaplama yapılmaktadır (Temiz, 2000).

2.5.1.5 Membran filtrasyon yöntemi

Hem canlı hem de toplam bakteri sayımı için kullanılmaktadır. Yöntem, belirli bir hacimdeki bakteri süspansiyonunun genellikle 0,45 µm por çapına sahip olan bir membran filtre yüzeyinden süzülmesi işlemine dayanır. Süzmeden sonra, filtre uygun bir besiyere konularak, inkübasyon sonucu koloniler sayılmaktadır.

2.5.1.6 Mikroskopik yöntemler

Sayım tekniğine dayanan mikroskopik yöntemler, sayımı yapılacak materyalin mikroskop altında incelenmesi prensibine dayanmaktadır. Mikroskopta ölü ve canlı mikroorganizmalar birlikte sayıldığı için bu sayım bir canlı sayımı değil, toplam sayım yöntemidir. Bu amaçla çok sayıda sayım tekniği geliştirilmiştir. Ayrıca, floresans boyayla mikroorganizmalar boyanarak canlı ve ölü hücrelerin ayrımı yapılarak, mikroskopik yöntemlerle tayini gerçekleştirilen teknikler de geliştirilmiştir.

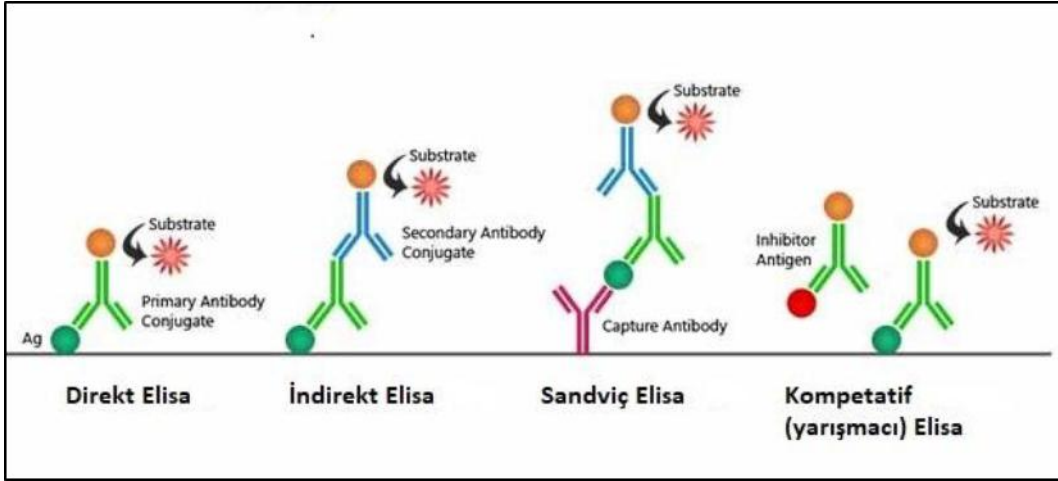
2.5.2 İmmünolojik yöntemler

Mikroorganizmaların tanısında yıllardır antijen ve antikor reaksiyonu uygulanmaktadır. İmmünolojik yöntemler, antijen ve antikoru spesifik olarak bağlanması prensibine dayanan uygulamalardır. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), lateks aglütinasyon testi, lateral akış immunoassay yöntemi, immunomanyetik ayırma (IMS) yöntemi gibi immünolojik yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan immünolojik yöntem; ELISA testidir.

2.5.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Antijen veya antikorları tespit etmek için doğru ve hassas bir yöntem olan ELISA, mikroorganizmaların tanısı için yaygın olarak kullanılan immünolojik yöntemlerden biridir. Bir biyolojik sıvı numunesinde, düşük konsantrasyonlarda antijen veya antikor konsantrasyonlarını renk değişimi ile hissedebilen analitik bir araçtır. ELISA tekniğinde, hedef moleküllerin tespiti için enzim etiketli antijenler ve antikorlar kullanılmaktadır. ELISA tekniğinin prensibi; tespit edilecek antijenin yüzeye immobilize edilip, enzim işaretli antikor ile etkileşimine dayanmaktadır. Bu enzim etiketli antijen-antikor reaksiyonu, enzimatik aktive sonucu ölçülmektedir. ELISA için kullanılan enzimler; peroksidaz, alkalen fosfataz gibi substratları renkli ürünlere dönüştürme kabiliyeti bulunan enzimlerdir (Zhao et al., 2013; Hosseini et al., 2018; Afsarimanesh et al., 2019).

ELISA testlerinin genel olarak 4 farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar; Direkt ELISA, İndirekt ELISA, Sandviç ELISA ve Kompetatif ELISA'dır.



Şekil 2.11. Farklı tiplerdeki ELISA sistemleri (Aslan, 2019)

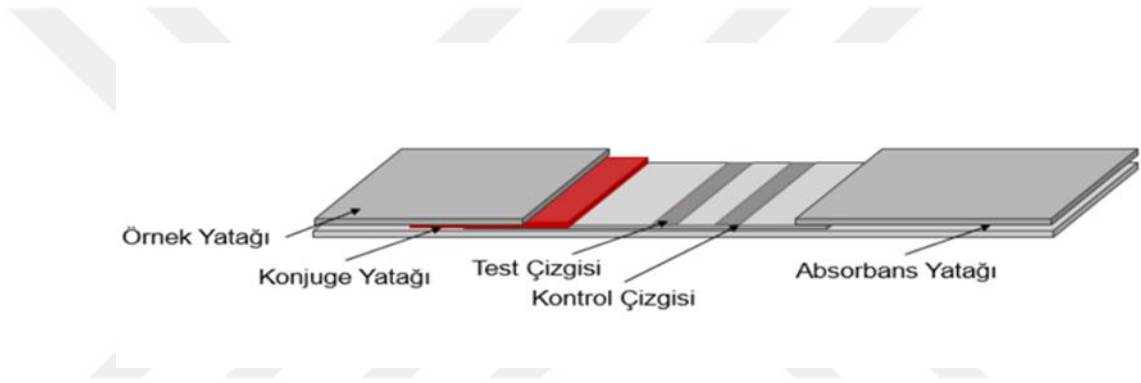
2.5.2.2 Lateks aglütinasyon testi

Lateks aglütinasyon testi, bir antijen veya antikorun varlığını belirlemek için kullanılmaktadır. Aglütinasyon; antijenler ile antikorların bağlanarak kümeleşmesi işlemine dayanmaktadır. Lateks aglütinasyon testinde partiküler antijen olarak lateks boncuklar kullanılmaktadır. Bu testin prensibi, spesifik antijen içeren bir numunede lateks partiküllerinin yüzeyinde kaplanmış bir antikor ile karıştırıldığında, gözlemlenen kümeleşme yeteneğindeki değişikliği saptamaktır. Aglütinasyon reaksiyonu, lateks partikülü üzerine kaplanmış spesifik antijen ile ters çevrilebilir ve spesifik antikorların varlığını belirlemek için bir numune üzerinde test yapılabilir. Lateks boncukların kullanılması tutarlılık ve stabilite gibi avantajlar sunmaktadır. Bu yöntem, patojenik mikroorganizma tayini ve genellikle de toksinlerin aranmasında kullanılmaktadır (Wanger et al., 2017).

2.5.2.3 Lateral akış immunoassay yöntemi

Patojenik mikroorganizmaların tayininde kullanılan ve antijen-antikor reaksiyonuna dayanan immünolojik yöntemlerden biri de 'Lateral Akış Teknolojisi'dir. Lateral akış testleri, bir hedef analitin varlığını veya yokluğunu belirlemek için tasarlanan testlerdir. Bu testlerin prensibi, ilgilenilen analiti içeren bir sıvı numunesi, dış kuvvetlerin yardımı olmadan (kılcal hareket) üzerine

analitle etkileşebilen moleküllerin tutturulduğu çeşitli polimerik şerit bölgeleri boyunca hareket etmesidir. Tanıma için kullanılan analit olarak antikorlar kullanılmaktadır. Numune teste uygulandıktan sonra, hedef analite özgü olan ve yaygın olarak renkli lateks veya altın nanopartiküllere konjuge olan konjuge salma pedi içinden geçerek, şerit boyunca tespit bölgesine taşınmaktadır. Bu, çizgiler halinde immobilize edilmiş spesifik antijen-antikor içeren gözenekli bir zar olup (nitroselüloz), farklı yoğunluklarda görülen çizgilerle okuma gerçekleştirilmektedir. Lateral akış immuassay testleri, 2-10 dakikada okuma gerçekleştirilecek şekilde tasarlanmıştır (Posthuma et al., 2009; Lin et al., 2013; Koczula and Gallotta, 2016).



Şekil 2.12. Tipik lateral akış immunoassay test kiti (Aydın, 2015)

2.5.2.4 İmmunomanyetik ayırma yöntemi (IMS)

İmmunomanyetik ayırma yönteminde (IMS); mikroorganizmaların tanımlanması için immunomanyetik boncuklar (IMB) kullanılmaktadır. Antikorla kaplı olan bu paramanyetik boncuklar, patojen tespiti ve karmaşık çevresel numunelerden elde edilen bakteri hücrelerinin konsantrasyonunda kullanılmaktadır. Bu yöntemin prensibi, hedef olmayan (istenmeyen) patojenlerin büyümesini bastırırken, hedef olan patojenlerin büyümesini sağlayan seçici bir ortam sağlamaktır. IMS yönteminde, hedef hücreler immunomanyetik boncuklar ile 1 saat inkübe edilerek manyetik bir ayıraçla ayrılır ve spesifik olmayan etkileşimleri ortadan kaldırmak için birkaç yıkama döngüsü izlenmektedir. İmmunomanyetik boncukların numune ile etkileşime girmemesi ve çeşitli molekül aralıklarının manyetik tanelere konjugasyonu gibi avantajları bulunmaktadır.

İmmunomanyetik ayırma tekniği ile karmaşık bir ortamdan istenilen patojenin seçici olarak ayrılması mümkün olmaktadır (Zourob et al., 2008; Grumezescu, 2017).

2.5.3 Moleküler yöntemler

Mikroorganizmaların gen sekanslarının tanımlanması, farklı suşların belirlenmesi ve kısa sürede tayin gerçekleştirilmesi amacıyla moleküler yöntemlerin kullanılması önemlidir. Moleküler Yöntemlerin çoğu nükleik asit bazlı olup, hibridizasyon tekniğine dayanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 16S rRNA temelli teknikler, izotermal amplifikasyon teknikleri, nükleik asit hibridizasyonuna dayalı teknikler gibi çeşitli moleküler yöntemler bulunmaktadır. En yaygın olarak kullanılan yöntem; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemidir (Zourob et al., 2008).

2.5.3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

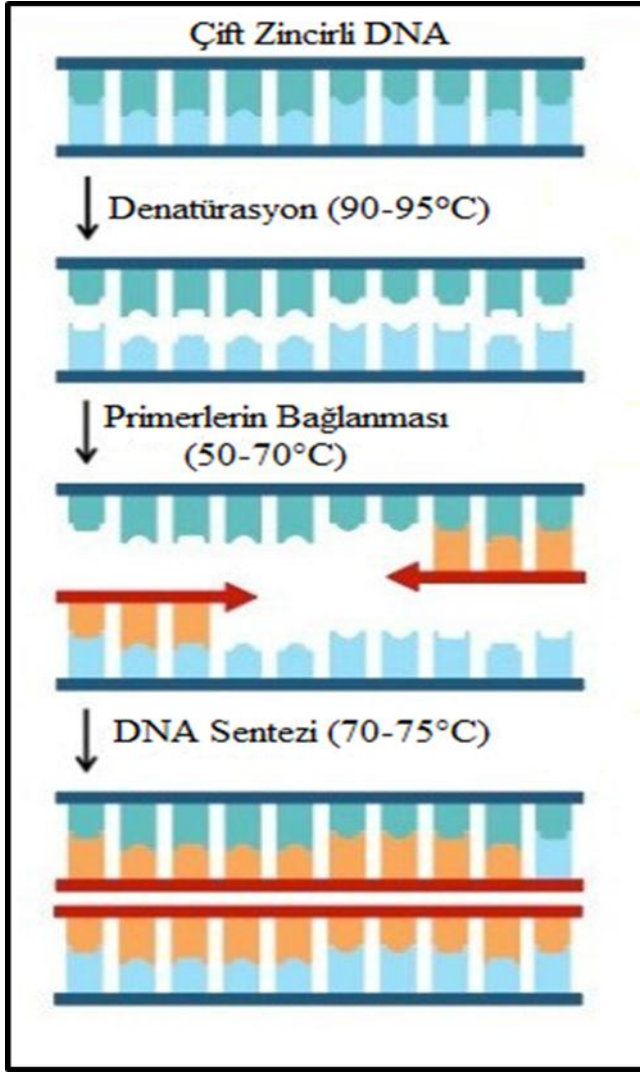
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 1980’lerde geliştirilen bir nükleik asit amplifikasyon tekniği olup, mikroorganizmaların tayininde yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerden biridir (Rajapaksha et al., 2019). 1980’lerin başında ilk kez bilim insanı Kary Mullis tarafından keşfedilen ve 1993 yılında da Nobel ödülünü kazandıran Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), hedeflenen bir genin veya özgül bir DNA dizisinin çoğaltılması işlemidir. PCR yönteminin prensibi, DNA’nın istenilen bölgesine özgü DNA parçasının, in vitro koşullar altında primer adı verilen bu bölgeyi içine alan oligonükleotid dizisi kullanılarak çoğaltılması (amplifikasyon)’dır.

Bir PCR reaksiyonunun temel bileşenleri olarak; çoğaltılması istenilen bir kalıp DNA, bu DNA dizisinin istenilen bölgeyi içine alan ve DNA dizisine bağlanacak olan primerler, ısıya dayanıklı DNA Polimeraz enzimi, sentezde kullanılacak olan dNTP’ler, uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon görevi gören maddeler kullanılmaktadır. Tipik bir PCR prosedürü, tutarlı sıcaklık değişimleri olan 20-40 tekrarlı döngüden oluşan bir otomatik ‘termal

dönüştürücü' adı verilen PCR makinesinde gerçekleşmektedir. PCR reaksiyonu, 3 aşamadan oluşmaktadır (Kubista et al., 2006; Delong and Zhou, 2015).

- **Denatürasyon (90-95°C):** Çoğaltılacak olan çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkta tek zincirli DNA haline getirilmesi işlemidir. Çift zincirli DNA, 90-95°C sıcaklık altında denatüre edilerek, tek zincirli DNA haline getirilir.
- **Primerlerin Bağlanması (50-70°C):** Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması işlemidir. DNA zincirinin yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Sıcaklık 50-70°C sıcaklığa düşürülerek, primerlerin DNA'ya bağlanması sağlanmaktadır. Primerler, 15-30 nükleotid uzunluğunda sentetik oligonükleotidler olup, DNA sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar.
- **DNA Sentezi (70-75°C):** Isıya dayanıklı DNA Polimeraz (Taq Polimeraz formu), ortamda bulunan dNTP'leri kullanarak primerlerin hedef zincir boyunca uzamasını sağlar. DNA sentezi, 70-75°C sıcaklıklarda gerçekleşir. DNA Polimeraz (Taq Polimeraz), dNTP'leri 5' → 3' yönüne doğru bağlayarak, primerlerin uzamasını sağlar. Bu reaksiyon, hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturmaktadır.

Denatürasyon, primer bağlanması ve DNA sentezi aşamaları bir PCR döngüsünü oluşturmaktadır. Her döngünün sonunda sentezlenen DNA zincirleri, bir sonraki döngü için hedef zincir oluşturmaktadır. Tüm PCR döngüsü, Denatürasyon ile başlayıp, bu üç aşamanın tekrarlanmasıyla devam etmektedir. Hedef DNA'nın PCR ile çoğaltılmasının ardından elde edilen DNA'lar Agaroz Jel Elektroforez yöntemiyle belirlenmektedir (Somma and Querci, 2006).



Şekil 2.13. PCR aşamaları (Çavuş, 2017)

PCR yöntemi; kalıtsal hastalıkların tanısında, patojenik mikroorganizmaların tanısında, problemlerin oluşturulmasında, DNA klonlamada, DNA dizi analizlerinde, genlerin fonksiyonel analizlerinde, genetik parmak izlerinin teşhisinde, gen ekspresyon çalışmalarında gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Patojenik mikroorganizmaların tanısında standart PCR yöntemi dışında, Multipleks PCR, Kantitatif PCR ve Real Time PCR yöntemleriyle de tayinler gerçekleştirilmektedir.

2.5.3.2 16S rRNA temelli teknikler

DNA dizisindeki farklılıklar, mutasyon sonucu ortaya çıkan varyasyonların tespiti için spesifik genler mikrobiyolojik çeşitliliğin bir ölçüsüdür. Daha çok

mikroorganizmaların türlerini belirlemekte kullanılan yöntemlerdir. 16S rRNA temelli teknikler, PCR temeline dayalı teknikler olup en yaygın kullanılan yöntemler; DGGE, RFLP, Ribotiplendirme (Çakır ve Çakmakçı, 2005; Çokay, 2011).

• Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)

Benzer genlerin ayrılması yöntemidir. DNA, üre ve formamid gibi denatüre edici ajan varlığında 60°C sıcaklıkta elektroforeze uygulanmaktadır. DNA, denatüre edici ajan varlığında erimeye başlamaktadır. DGGE yöntemi, erime özelliklerindeki farklılıklara dayanarak aynı boyuttaki genlerin ayrılmasını sağlamaktadır.

• Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP, DNA dizisindeki farklılıkların endonükleaz enzimleri ile kesilerek tanımlanmasına yönelik en basit yöntemidir. Her bir restriksiyon endonükleaz enzimi DNA'yı belirli bir bölgeden kesmektedir. Kesim sonucu oluşan DNA parçacıklarının sayısı ve büyüklükleri her mikroorganizmada farklıdır. Buna bağlı olarak, kesim sonrası elde edilen DNA parçacıkları agaroz jel elektroforezinde belirlenmektedir (Aydın ve Sudağıdan, 2016).

• Ribotiplendirme (Ribotyping)

Ribotiplendirme, spesifik genleri (16S rRNA) kodlayan kromozomal gen bölgeleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşan ürünün bir ribozomal RNA probu ile incelenmesidir. Ribotiplendirmede, dizi analizine gerek yoktur. Mikroorganizmaların ribozomal RNA'ları farklı olduğu için, restriksiyon enzimi ile kesildiğinde restriksiyon deseni sadece bir mikroorganizma türüne özgü olmaktadır. Kesilen DNA, Agaroz Jelde ayrılarak işaretli RNA Probu rRNA'yı kodlayan genlerin restriksiyon desenini göstermede kullanılmaktadır.

2.5.3.3 İzotermal amplifikasyon teknikleri

İzotermal koşullar altında nükleik asitleri çoğaltmak için birçok yeni yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA), yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA) ve iplik deplasmanlı amplifikasyon (SDA) bulunur. En yaygın olarak kullanılan yöntem; nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA)'dur (Lin et al., 2013).

• Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon (NASBA)

NASBA, 90'lı yılların başında PCR'daki gibi termal dönüştürücü kullanılmadan nükleik asitleri çoğaltmak için geliştirilmiştir. İzotermal, transkripsiyon bazlı amplifikasyon olup, nükleik asitlerin tespiti için ayarlanan hassas bir yöntemdir. Bu reaksiyon, hedef DNA veya RNA molekülünün amplifikasyonu için bir primer seti ile Avian Miyeloblastoz Virüsü (AMV) ters transkriptaz, RNaz-H ve T7-RNA polimerazı kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmektedir (Umesha and Manukumar, 2018).

2.5.3.4 Nükleik asit hibridizasyonuna dayalı teknikler

Nükleik asit hibridizasyonuna dayalı yöntemler, tek iplikli nükleik asit zincirinin (DNA veya RNA) kendisine komplementer olan diziler (DNA veya RNA) ile bağlanması sonucu çift iplikli nükleik asit oluşturma prensibine dayanan yöntemlerdir. Problar oluşan moleküllerin görünür hale gelmesi için radyoaktif olmayan veya radyoaktif bir maddeyle işaretlenmektedir. İşaretleyici prob ile hedef dizi hibridizasyon sonuçlarının analizi gerçekleştirilmektedir.

• In Situ Hibridizasyon Tekniği (ISH)

In situ Hibridizasyon (ISH) tekniği, nükleik asit dizilerinin (DNA veya RNA) kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinden saptanarak tayinleri gerçekleştirilen ve nükleik asit hibridizasyonuna dayalı bir yöntemdir. Diğer yöntemlerden farkı, nükleik asitlerin kendi hücresel ortamında tayini

gerçekleştirilmesidir. Böylece nükleik asitin hücredeki yeri belirlenebilmektedir. Hibridizasyon yönteminde ilk olarak prob elde etmek amacıyla bir işaretleyici ile prob işaretlenmektedir. Nükleik asitler tek zincirli hale getirilmek üzere denatüre edilir. Ardından işaretli prob ile hibridizasyona tabi tutulup, analizleri gerçekleştirilmektedir (Kara, 2007).

• Floresan In Situ Hibridizasyon Tekniği (FISH)

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi, moleküler sitogenetik bir teknik olup, bantlama ve boyama tekniklerinin gelişmesiyle en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. FISH, genleri ve kromozomları boyamada kullanılan floresan işaretli problemlerin kullanılarak in situ hibridizasyon yöntemi ile belirlenmesidir. FISH yönteminde ilk olarak hedef DNA'nın yüzeyde denatüre olması sağlanmaktadır. Ardından filogenetik boyalar ile boyanan floresan problemler ile hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Floresan problemler hibridize olduğunda, kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın dalga boyunda absorblanması ile görünür hale gelip, analizleri gerçekleştirilmektedir (Yıldırım et al., 2015).

• Southern Blot Hibridizasyon Tekniği

Southern Blot Tekniği, jel elektroforeziyle ayrılan DNA zincirlerinin işaretli problemler ile hibridizasyonuna dayanmaktadır. Southern Blot Tekniğinde ilk olarak mikroorganizmaların izole edilmiş DNA'ları restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. Ardından agaroz jele tabi tutulup, jelde ayrılan DNA zincirleri denatüre edilip bir membrana aktarılmaktadır. Son olarak da membran yüzeyindeki DNA'lar, işaretli problemler ile hibridizasyona tabi tutulup tayinleri gerçekleştirilmektedir (Çavuşoğlu, 2012).

• Northern Blot Hibridizasyon Tekniği

Northern Blot Tekniği, Southern Blot Tekniğine benzerdir. Southern Blottan farklı olarak membran yüzeyine DNA yerine RNA emdirilip, işaretli problemler ile hibridizasyona tabi tutulan tekniktir. Bu yöntemde de agaroz jele tabi tutulan RNA'lar, jelde ayrılması sağlanarak bir membrana aktarılmaktadır.

Membran yüzeyindeki RNA'lar ile işaretli problemlerin hibridizasyonu sağlanıp, analizleri gerçekleştirilmektedir.

2.6 Nanobiyosensörler

Nanoteknoloji, bir maddenin nanometre boyutunda fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması ve atomik, moleküler, supramoleküler yapılar düzeyinde kontrolü ile üretimi amacıyla yeni özelliklerde malzeme ve cihazların geliştirilmesini kapsayan bilim dalıdır. Son yıllarda, biyolojik sistem ve teknolojinin ortak ürünü olan biyosensörler, nanoteknolojinin dalı olan nanomalzemeler ile zenginleştirilmektedir. Nanomalzemeler, 1 ile 100 nm arasındaki boyutlarda, farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olan materyallerdir. Nanomalzemeler ile nano boyutlu yapılar haline gelen biyosensörlere **nanobiyosensör** adı verilmektedir. Nanomalzemelerin kullanılması, biyosensörlerin performansının ve hassasiyetinin artması, küçük boyutları ve yüzey/hacim oranı sayesinde sensör yüzey alanlarının artmasına neden olmaktadır. Böylece nanobiyosensörler ile seçicilik ve hassasiyet artırılarak patojenlerin belirlenmesi, çeşitli hastalıkların teşhisi, ilaç salınım sistemlerinde sık kullanılmaktadır (Celep, 2007; Holzinger et al., 2014; Tüylek, 2017; Göktürk ve Denizli, 2018).

Nanobiyosensör tasarımında kullanılan nanomalzemeler; boyut ve şekil (nanopartikül vb), kimyasal yapı (karbon temelli vb) ve fizikokimyasal (manyetik vb.) özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır.

2.6.1 Metal nanopartiküller

Metal nanopartiküller; benzersiz biyouyumluluk, optik, elektronik, fizikokimyasal ve kataliz özellikleri nedeniyle biyosensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metal nanopartiküller arasında en yaygın olarak kullanılan nanopartiküller; altın nanopartiküllerdir.

Altın nanopartiküller (AuNP), çözücülerin içinde μm büyüklüğündeki süspansiyon halindedir. Altın nanopartiküllerin kullanılma sebepleri arasında hedef

analitin varlığını gösteren bir renk değişikliğine neden olmasıdır. 100 nm'den küçük olanlar kırmızı, 100 nm'den büyük olanlar ise; sarı renk halini almaktadır. Ayrıca, biyoreseptörün sensör yüzeyine daha kararlı bağlanması ve sensör yüzeyini daha iletken hale getirme gibi avantajları da bulunmaktadır (Yeh et al., 2012; Zeng et al., 2016).

Wang ve arkadaşları (2008), *E. coli O157H7* tespiti için Altın Nanopartikül (AuNP) modifiyeli bir QCM biyosensörü geliştirmişlerdir (Wang et al., 2008).

2.6.2 Manyetik nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, uygulanan manyetik alana cevap gösteren metal ve metal oksitlerden oluşan nanopartiküllerdir. Geniş yüzey alanı, toksisite ve biyoyumluluk özelliklerinin yanında, önemli özelliklerinden biri yer ve taşınmanın manyetik bir alan tarafından kontrol edilebilmesidir. En yaygın kullanılan manyetik nanopartiküller; "Manyetit" (Fe_3O_4) ve "Maghemite" ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)'dir. Bunların ortak özelliği toksik olmaması ve biyoyumlu olmasıdır (Zeng et al., 2016; Ayata, 2018).

Günümüzde, kanser teşhisi, toksik madde tayini, patojen tayini gibi çeşitli uygulamalarda sık kullanılmaktadır.

2.6.3 Kuantum noktalar (QD)

Kuantum noktaları (QD), kuantum hapsetme etkileri nedeniyle benzersiz özelliklere sahip, kolloidal nanokristal yapıda, yarı iletken materyallerdir. Genelde periyodik tablodaki grup II ve VI veya grup III ve V elementlerinden oluşmaktadır. En çok üretilen kuantum nokta arasında CdSe, CdS, CdTe, PbS, PbSe, ZnS bulunmaktadır. Kuantum noktalarının; boyut ayarlı emisyon, dar ve simetrik fotoluminesans, geniş ve güçlü uyarma spektrumları, güçlü ışık yayma ve sağlam fotostabilite gibi özellikleri bulunmaktadır. Kuantum noktalarının toksisitesinin bulunmaması sebebiyle özellikle biyolojik sistemlerde sık kullanılmaktadır. Hedefe bağlandıklarında floresan (ışık yayma) özelliği gösterirler (Frasco and Chaniotakis, 2009; Morales-Narvaez et al., 2013).

Liu ve arkadaşları (2017), *Helicobacter pylori*'nin tespiti için Grafen Oksit modifiyeli yeni bir floresan tabanlı bir DNA biyosensörü geliştirmiştir (Liu and Su, 2017).

2.6.4 Karbon temelli nanomalzemeler

Doğada bulunan element olan Karbon, uzun süredir insanlar tarafından tanınmaktadır. Nanoteknolojinin de ilerlemesiyle makro ölçekten nano ölçeğe kadar ilerlemiştir. Günümüzde, nanoelektronik ve yüksek frekans elektroniği, enerji depolanması ve dönüşümü, biyolojik ve kimyasal sensörler gibi farklı alanlarda 3 boyutlu (3D)'ye kadar karbon allotropları bulunarak, uygulanmaktadır.

2.6.4.1 Karbon nanotüpler (CNT)

İlk olarak 1991 yılında Iijima tarafından keşfedilen CNT'ler, nano ölçekli tüplere sarılmış grafit levhalar olarak kabul edilmektedir. Karbon nanotüplerde esas malzeme karbon elementidir. Silindir yapıda olup, hegzagonal karbon atom ağı şeklindedir. Karbon nanotüpler, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tek duvarlı karbon nanotüpler temel silindirik yapıda olup, çok duvarlı nanotüpler ise; tek duvarlı nanotüplerin iç içe geçmesiyle oluşmaktadır. Karbon nanatüplerin eşsiz yapısal, elektronik ve kimyasal özellikleri sebebiyle biyosensör sistemlerinde sık kullanılmaktadır. Çözünürlüklerini ve biyoyumluluklarını artırmak için karboksil veya amino grupları ile fonksiyonel hale getirilebilir veya polimer, iyonik sıvı ve metal nanopartikül gibi diğer malzemeler ile kombinasyon oluşturabilirler (Wang and Dai, 2015; Sekmen 2019).

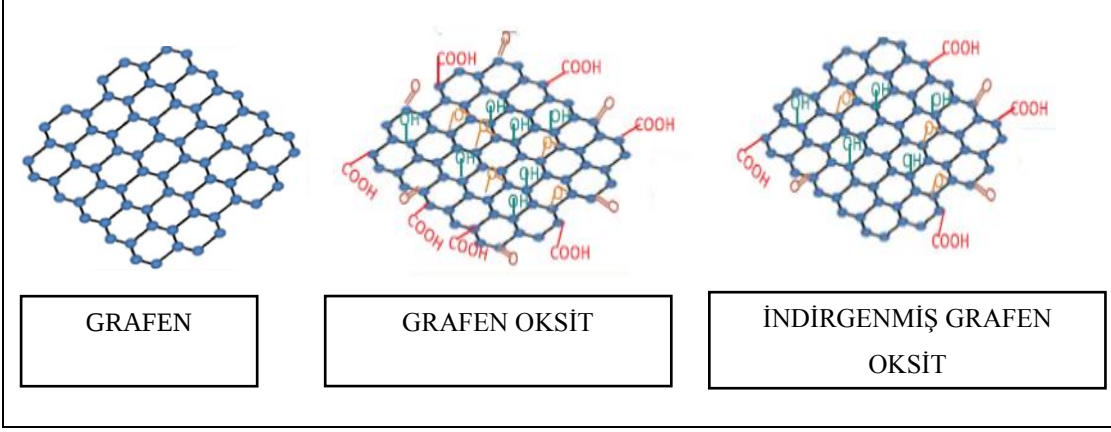
Son yıllarda, kalıtsal ve bulaşıcı hastalık teşhisinde, mikroorganizma tayinlerinde, kanser teşhisi ve tedavisi uygulamalarında kullanımı artmaktadır.

2.6.4.2 Grafen ve grafen türevi nanomalzemeler

Grafen, karbon atomunun sp^2 hibritleşmesi yapan bal peteği örgülü yapılarından bir tanesi olan iki boyutlu (2D) bir karbon tabakasıdır. Karbonun allotroplarından biri olan grafitin 1 atom kalınlığındaki halidir. Grafenin, üstün fiziksel, kimyasal, optik, elektriksel ve termal olmak üzere çeşitli özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler arasında yüksek mekanik ve kimyasal stabilite, yüksek termal ve olağanüstü elektriksel-termal iletkenlik, geniş yüzey alanına sahip olması, hızlı heterojenik elektron transferi, esneklik bulunmaktadır (Pumera, 2010; Escosura-Munica et al., 2018; Wu et al., 2018).

Grafen ve türevleri (Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit) biyouyumluluk özellikleri nedeniyle son yıllarda biyosensör üretiminde sık kullanılan nanomalzemelerdir. Grafen bazlı nanomalzemeler, elektrot yüzey işlevselliği için faydalı olan fonksiyonel gruplar olarak çok sayıda oksijen içermektedir. Farklı grafen elde etme yöntemlerine bağlı olarak oluşan grafen ve türevlerinin yüzeyde oluşan fonksiyonel gruplara bağlı olarak farklı alan ve uygulamalarda çalışılmaktadır. Grafen sentezinde genellikle kullanılan yöntem Hummers yöntemi adı verilen kimyasal indirgenme yöntemi ile sentezlenmektedir. Bu yöntem sırasında Grafen Oksit elde edilmektedir. Grafen oksitten elde edilen indirgenmiş grafen oksitin (rGO) ise; oksijen gruplarının azlığı nedeniyle yüksek derecede elektriksel iletkenliği bulunmaktadır. İndirgenmiş grafen oksit eldesi genellikle elektrokimyasal, kimyasal, termal, hidrotermal olarak çeşitli yöntemler ile sağlanmaktadır.

Grafen türevi nanomalzemeler günümüzde biyosensör tasarımlarında, süper kapasitörlerde, pillerde, elektronik cihazlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Tunç, 2017; Taniselass et al., 2019).



Şekil 2.14. Grafen ve türevlerinin şematik görüntüsü

2.6.4.3 Grafen oksit (GO)

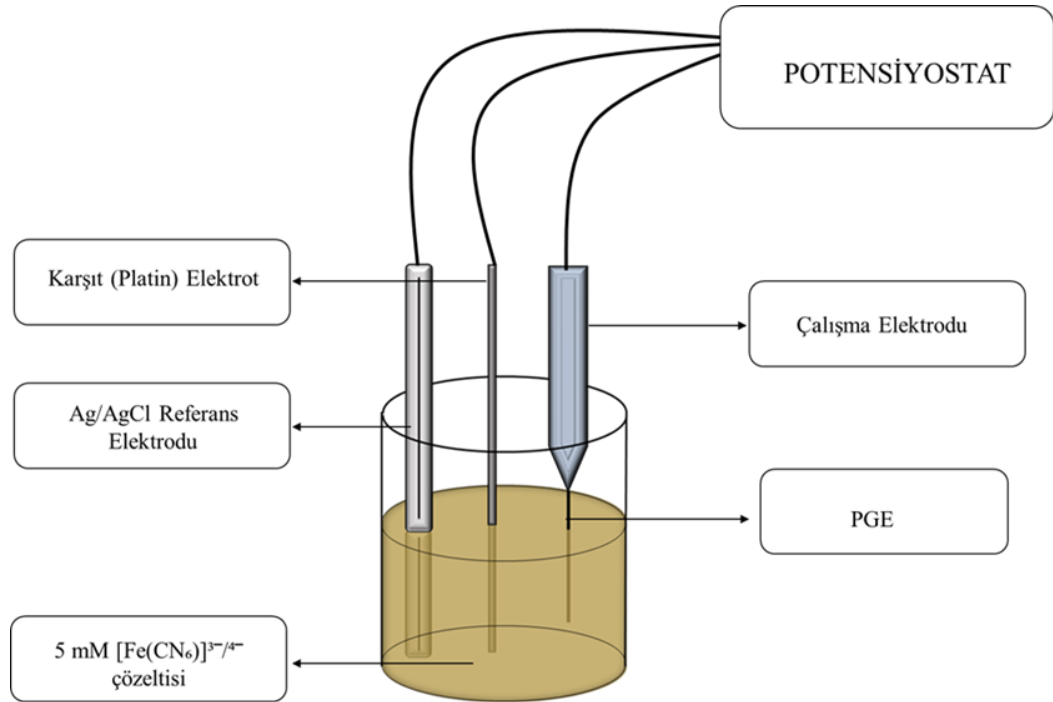
Grafen Oksit (GO), grafitin oksidasyonu sırasında elde edilen grafen türevidir. Saf grafen elde etme yönteminde öncü bir malzeme olan GO, çok sayıda oksijen grubu bulundurma sebebiyle, özellikle biyosensör ve biyoelektronik alanlarda mikro ve nano ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapısında karboksil, hidroksil, epoksi ve karbonil grupları bulunmaktadır. Bu gruplar sayesinde biyomoleküller ve diğer moleküller ile kolaylıkla bağlanabilmektedir. Grafen oksit, hidrofilik özelliktedir. Bu özelliği ile çözelti ve organik çözücülerde iyi bir şekilde çözünür hale gelmektedir. Geniş yüzey alanı sağlaması, biyoyumlu olması, kararlı yapıda olması ve yüksek elektron transfer hızına sahip olması gibi üstün özellikleri ile çeşitli biyomoleküllerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Morales-Norvaez et al., 2013; Taniselass et al., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Elektrokimyasal Sistemler

Tez kapsamında kullanılan ana elektrokimyasal sistem; μ -Autolab Type III (Eco Chemie- Hollanda) potansiyostat cihazıdır. İmpedimetrik ölçümler; NOVA 1.10 yazılımı ile birlikte kullanılmıştır. Voltametrik ölçümler ise; Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie – Hollanda) potansiyostat cihazı ile GPES 4.9 yazılımı birlikte kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler, üçlü elektrot sistemi yardımı ile ölçülmektedir. Kurulan düzenekte kullanılan üçlü elektrot sistemi; çalışma (indikatör) elektrodu, referans (karşılaştırma) elektrodu ve yardımcı (karşıt) elektrottan oluşmaktadır. Çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE), referans elektrot olarak AgCl ile kaplanmış Ag telinden oluşan Ag/AgCl referans elektrodu ve platin telden oluşan yardımcı (karşıt) elektrot kullanılmaktadır. Üçlü elektrot sisteminin içine daldırılıp, ölçüldüğü elektrokimyasal hücrede tampon çözeltisi bulunmaktadır. Tampon çözeltisinin hacmi 5 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.1. Üçlü elektrot sistemi şeması

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması boyunca kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, kimyasal maddelerin sağlandığı firmalar Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve bunların sağlandığı firmalar.

MADDE ADI	FİRMA ADI
Grafen Oksit (GO)	Nanografi
Asetik Asit (CH_3COOH)	Merck
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Di potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Merck
N-hidroksi süksinimit (NHS)	Merck
1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidrklorid (EDC)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
Trizma hidroklorik asit (Trizma-HCl)	Sigma
Tri-sodyum Sitrat dihidrat	Sigma
Sodyum dodecyl sülfat (SDS)	Sigma

3.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanmasında 18.2 MΩ Ultra saf su kullanılmıştır. Tampon çözeltiler, $+4^\circ\text{C}$ ’de saklanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltilerine; 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl eklenerek, istenilen pH değeri aralığına getirilmiştir. Bütün tampon çözeltiler, taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Çalışma aşamasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti Adı	İçeriği
Asetat Tampon Çözeltisi (ACB) (pH: 4.8)	0.5 M Glasiyel Asetik Asit ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH: 7.4)	10 mM KH_2PO_4 , 40 mM K_2HPO_4 ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Tris-HCl Tampon Çözeltisi (TBS) (pH: 7.00)	20 mM Trizma-HCl ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Hibridizasyon Tamponu (Stok) (20XSSC) (pH: 7.00)	0.3 M Sodyum Sitrat ve 3 M NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Hibridizasyon Tamponu (5XSSC) (pH: 7.00)	5XSSC (0.075 M Sodyum Sitrat, 0.75 M NaCl)
Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS)	%10'luk (100 g SDS/ 1L ultra saf su)
Kovalent Bağlama Ajanı	5 mM N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 5 mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC), Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile hazırlanmıştır.

Kovalent Bağlama Ajanı (2)	5 mM N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 8 mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC), Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile hazırlanmıştır.
Grafen Oksit Çözeltisi (GO)	400 µg / ml Grafen Oksit, Dimetil Sülfoksit (DMSO) çözeltisi içerisinde 1 saat sonikatör işlemi ile hazırlanmıştır.
Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit Eldesi İçin Grafen Oksit Çözeltisi (rGO)	1000 µg / ml Grafen Oksit, Asetat Tampon Çözeltisi (ACB) içerisinde 2 saat sonikatör işlemi ile hazırlanmıştır.
Yıkama Tamponu	1XSSC + %0.2 SDS
Ölçüm Çözeltisi	5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi, Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile hazırlanmıştır.

3.4 Kullanılan DNA Dizileri

Bu tez kapsamında, model mikroorganizma olarak kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinin belirli bir gen bölgesini temsil eden sentetik prob DNA dizisi, prob dizisinin tam karşılığı olan sentetik *E. coli* hedef DNA dizisi, *E. coli*'nin PCR ile çoğaltılmış gen bölgesi, tüm bazları hedeften farklı sentetik *Mycobacterium tuberculosis* hedef DNA dizisi ve tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü baz dizilimleri Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Çalışmada kullanılan, *Escherichia coli* bakterisine ait tüm sentetik diziler, liyofilize toz halinde Heliks Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) tarafından, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine ait hedef dizi ise; TIB Molbiol (Almanya)'dan temin edilmiştir. Ayrıca, *Escherichia coli* bakterisine ait PCR

ürünü ve hedeften baz dizilimi tamamen farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan DNA dizileri ve PCR ürünleri.

DNA Dizisinin Adı	Baz Dizilimi
<i>Escherichia coli</i> Prob	5'-NH ₂ -C6-GGC AGC GGT GAC TAT GGC ACC A -3'
<i>Escherichia coli</i> Hedef	5'-TGG TGC CAT AGT CAC CGC TGC C-3'
<i>Escherichia coli</i> PCR Ürünü	5'AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGA GTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCC GATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTG GCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAA CGTGCGGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCC CGGCTAGCGTCACCGCGTTTCGCCCCGACAGCTGGGAGAC GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAA CACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCAC CTCGGGCAATGGCGCAAATCTGCGGAATCTGACGCTG GGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGG TGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAG CATTGAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGG ATAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCACCACCAACGA TATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGA TTCTGGTCAC3'
Tüm Bazları Hedeften Farklı Dizi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hedef	5'-CAG CCA GCT GAG CCA ATTCATGGA CCA GAA CAA CCC GCT GTC GGGGTT GAC CCA CAA GCG CCG ACT GTCGGC GCT GGG GC-3'

Tüm Bazları	5'ATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATGAC
Hedeflen Farklı	CGCGTCTGTCATGGCTGTAGCTAGTCCGTTAGCCCATT
<i>Klebsiella</i>	CGGGGAGCCGAGTGGTGAGTATCCGACAGTCAACGAA
<i>pneumoniae</i> PCR	TTCCGGTTCGGAGAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCTGAT
Ürünü	GGTGTGTTGGTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGATGG
	CGCGGTCTACCCATCCAATGGTCTCATTGTCCGTGATG
	GTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCG
	AAAAACACAGCGGCCCTTCTCGCGGAGATTGAGAAGC
	AAATTGGACTTCCCGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCAC
	TTTCATGACGACCGCGTTCGGCGGCGTTGATGTCCTTCG
	GAAGGCTGGAGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACA
	CGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCA
	CGCACTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCA
	GTGCGCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCCGGTGCT
	GCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCGTC
	AGCGAACGTGCTATACGGTGGTTGTGCCGTTCTTGCGT
	TGTCACGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGAT
	CTGGCTGAATGGCCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAA
	ACACTACCCGGAAGCAGAGGTCGTCATTCCCGGGCACG
	GTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCG
	AACGTTGTCACAGCACACAAAAATCGCTCAGTCGCCGA
	GTAG3'
Tüm Bazları	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC- 3 '
Hedeflen Farklı	5' -AATGCGCAGCACCAAGGATAG-3'
<i>Klebsiella</i>	
<i>pneumoniae</i> PCR	
Ürünü Primer Seti	

3.4.1 Kullanılan DNA dizilerinin hazırlanışı

Çalışmada kullanılan liyofilize halde olan diziler, stok çözeltileri 1000 µg/ml olacak şekilde, 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -20°C'de saklanmıştır.

İstenilen konsantrasyonlardaki Prob DNA Dizileri, 0.5 M Asetat Tampon Çözeltisi (ACB) ile, Hedef DNA Dizileri ve PCR ürünleri ise; Hibridizasyon Tampon Çözeltisi (5X Sodyum Salin Sitrat) içerisinde hazırlanmıştır.

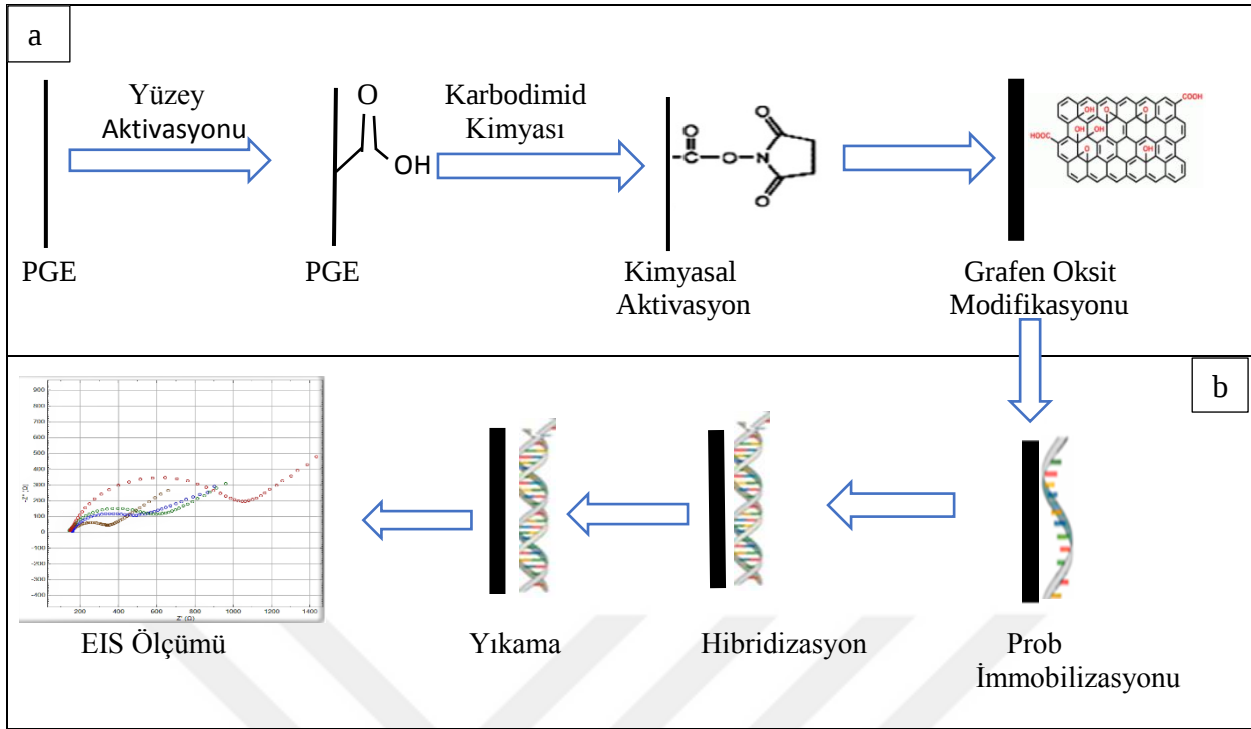
3.4.2 Kullanılan PCR ürünü örneklerinin hazırlanması

Hedef molekül olan *Escherichia coli*'nin gen bölgesini içeren PCR ürünü örnekleri ve tüm bazları hedeften farklı non-spesifik *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü örnekleri, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilerek, çalışmalarımızda kullanılmıştır.

PCR ürünü örnekleri, hibridizasyon tamponu ile uygun derişimde seyreltilerek, hibridizasyondan önce denatüre edilmiştir.

3.5 Kullanılan Yöntemler

Bu çalışmamızda; model mikroorganizma olarak *Escherichia coli* bakterisi kullanılmış olup, patojenik mikroorganizmaların tanısına yönelik elektrokimyasal nanogenosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Deney prosedürü iki basamakta gerçekleştirilmektedir. 1. Basamakta elektrot yüzeylerine Grafen Oksit (GO) nanomateryali ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 2. Basamakta ise; Grafen Oksit (GO) kaplı elektrot yüzeylerine *E. coli*'nin belirli gen bölgesini içeren prob DNA dizisi ile immobilize edilip, probun karşılığı olan *E. coli* hedef DNA dizisi ve biyosensörün seçiciliği için tüm bazları hedeften farklı Non-spesifik *Mycobacterium tuberculosis* hedef dizisi ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir. Bu basamaklar Şekil 3.2'de detaylı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Patojenik mikroorganizmaların tanısına yönelik geliştirilen nanogenosensörün elektrot yüzeyinde gerçekleşen aşamaları; a) GO modifikasyon, b) Biyolojik ve elektrokimyasal kısım

3.5.1 Kalem grafit elektrotların (PGE) hazırlanması

Çalışmamızda; çalışma elektrodu olarak kullanılan tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE), Tombo marka 0.5 mm kalem uçlarından oluşmaktadır. Elektrotlar, 0.5 mm çapında ve 6 cm uzunluğunda olup, deney koşullarına uygun olarak 3 cm olacak şekilde kesilerek hazırlanmıştır. Her bir parametre için farklı grafit yüzeyler kullanılarak, tek kullanımlık elektrot sistemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 Kalem grafit elektrodunun (PGE) aktivasyonu

Elektrot yüzeyleri, 0.5 M Asetat Tamponu (pH:4.8) içerisinde 60 sn süreyle +1.4 V'luk potansiyel uygulanarak, elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal aktivasyon, grafit yüzeylerdeki tüm fonksiyonel grupların, karboksilik (-COOH) gruplara yükseltgenmesi işlemidir.

3.5.3 Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu

Elektrot yüzeylerinde oluşturulan karboksilik (-COOH) gruplarını aktive etmek amacıyla yüzeylere karbodimid kimyası uygulanmıştır. Vialler içerisinde, 150 µl 5mM EDC ve 5 mM NHS içeren kovalent bağlama çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kovalent bağlama çözeltisi, yüzeydeki karboksilik grupları aktive ederek, Grafen Oksitin (GO) yüzeye daha iyi bağlanmasını sağlamaktadır (Sam et al., 2010; Isin vd., 2017).

3.5.4 Grafen oksit (GO) modifiyeli PGE'lerin hazırlanışı

Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra, Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanan Grafen Oksit (GO) çözeltisi ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar, 100 µl vialler içerisinde GO çözeltisi ile 15 dakika boyunca modifiye edilmiştir. Ardından GO modifiyeli elektrotlar 5 dakika boyunca kurutulmuştur (Congur et.al., 2018). Kovalent bağlama çözeltisi ile aktive edilmiş PGE yüzeyinde bulunan amino (-NH₂) grupları ile GO yüzeyinde bulunan karboksilik (-COOH) grupların kovalent olarak bağlanmasıyla GO modifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Roy et al., 2011).

3.5.5 Grafen oksit (GO) modifiyeli PGE yüzeyine prob DNA tutturulması

Grafen Oksit (GO) modifiyeli elektrotlar, -NH₂ işaretli Prob DNA dizisi ile kovalent yolla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Escherichia coli* bakterisinin gen bölgesini içeren prob DNA dizisi Asetat tamponu (ACB; pH:4.8) içerisinde 1 ppm konsantrasyonda hazırlanarak, 100 µl olacak şekilde viallere dağıtılmıştır. GO modifiyeli elektrotlar, *E. coli* prob DNA dizisini içeren çözelti içerisinde 1 saat boyunca immobilize edilmiştir.

3.5.6 Sentetik dizi ile hibridizasyon

E. coli prob dizisi ile kaplı GO yüzeyler, prob dizinin karşılığı olan hedef DNA dizisi ve tüm bazları hedeften farklı non spesifik dizi (NC) ile

hibridizasyona tabi tutulmuştur. 100 µl olacak şekilde viallerde hibridizasyon tamponu (5XSSC; pH: 7.0) içerisinde hazırlanmış olan 5 ppm konsantrasyonda *Escherichia coli* hedef ile non-spesifik *Mycobacterium tuberculosis* hedef içerisinde 30 dakika boyunca hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.7 PCR ürünü ile hibridizasyon

E. coli'nin PCR ile çoğaltılmış gen bölgesi ve farklı mikroorganizmaya ait (*Klebsiella pneumoniae*) non spesifik gen bölgesi 1:40 oranında hibridizasyon tamponu (5XSSC; pH:7.0) ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Çift sarmal halde olan PCR ürünleri, hibridizasyona uygun olabilmesi için; su banyosunda 95°C sıcaklıkta 8 dakika tutularak, denatüre edilip yani tek sarmal hale gelmesi sağlanmıştır. Ardından, tek sarmal hale gelen ürünlerin tekrar bağlanmaması amacıyla 0°C buz banyosunda 2 dakika boyunca bekletilmiştir. Böylece, hibridizasyona uygun tek sarmal diziler elde edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra, prob kaplı GO yüzeyler ile 30 dakika boyunca hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.8 Yıkama

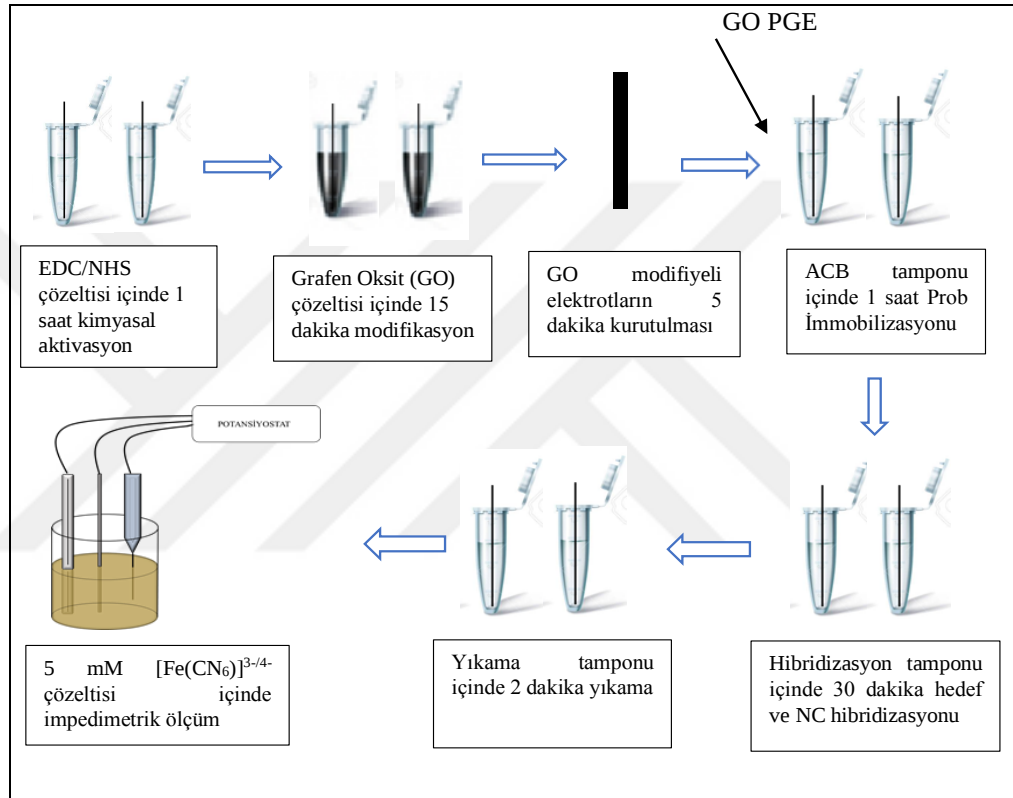
Hibridizasyon işleminden sonra, yüzeylere bağlanmayan veya spesifik olarak bağlanmayan dizilerin uzaklaştırılması amacıyla 100 µl olacak şekilde viallerde yıkama tampon çözeltisi (1XSSC + %0.2 SDS) içerisinde 2 dakika boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6 Elektrokimyasal Ölçümler

Voltametrik ölçümler, Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile 0.5 M Asetat tamponu (ACB) içerisinde 0.75-1.4 V potansiyel aralığında alınmıştır. Bu teknik sadece Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit (rGO) ile dsDNA etkileşimini araştırmak için kullanılmıştır.

İmpedimetrik ölçümler, elektron tranferine dayalı olup, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4-}$ çözelti içerisinde Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) tekniği ile

alınmıştır. Bu teknik ile ölçümler; 10 kHz ile 5 mHz frekans aralığında, 10 mV alternatif akım ve 0.24 V sabit potansiyel altında alınmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen Nyquist diyagramları, Randles eşdeğer devresi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ohm cinsinden elektrot yüzeyindeki artış olan R_{ct} değerlerine bakılarak yorum yapılmıştır. Tasarlanan nanogenosensörün ölçümleri EIS tekniği ile alınmış olup, nanogenosensörün çalışma prensibinin basamakları ayrıntılı olarak Şekil 3.3’de gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Tasarımı gerçekleştirilen nanogenosensörün çalışma basamaklarının şematize halde gösterimi

3.7 İncelenen Parametreler

Yapılan çalışmaların hepsi, patojenik mikroorganizmaların tayini için en uygun koşulların elde edilmesine yöneliktir.

İlk olarak, sensör yüzeyine modifiye edilen nanomateryalin etkisini araştırmak amacıyla dsDNA ile etkileşimleri incelenmiştir.

3.7.1 Grafen nanomodifiye yüzeylerde gerçekleştirilen çalışmalar

3.7.1.1 Grafen türevlerinin dsDNA ile etkileşimi

Nanomateriyalin etkisini araştırmak üzere Grafen türevleriyle dsDNA etkileşimi analiz edilmiştir.

Grafen türevleri ile ilk denemeler İndirgenmiş Grafen Oksit (rGO) ile dsDNA etkileşimi üzerinde denenmiştir. Ardından Grafen Oksit (GO) ile dsDNA etkileşimleri incelenmiştir.

Geliştirilen nanogenosensör çalışmasında, Grafen Oksit yöntemi ile devam edilmiştir.

Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit (rGO) İle dsDNA Etkileşimi

PGE yüzeylerine, 60 sn süreyle 1.4 V potansiyel uygulanarak aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece, yüzeydeki fonksiyonel gruplar karboksil gruplara yükseltgenmiştir. 1:1 oranında, ACB tamponu içerisinde hazırlanan Grafen Oksit, Döngüsel Voltametri (CV) tekniği ile PGE yüzeyine elektrokimyasal olarak İndirgenmiş Grafen Oksit (rGO) ile kaplanmıştır. Döngüsel Voltametri (CV) tekniği, (-1,1) - (+1,3) V potansiyel aralığında, 7 döngü ve 50 mVs⁻¹ tarama hızında gerçekleşmektedir (Pokpas et al., 2014). Ardından rGO kaplı elektrotlar, 150 µl olacak şekilde viallerde 5 mM EDC ve 8 mM NHS içeren kovalent bağlama çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karboksilik grupların aktive edilmesinin ardından, ACB tamponu içerisinde 10 ppm konsantrasyonda hazırlanan dsDNA içeren çözelti ile 1 saat boyunca immobilize edilmiştir. Immobilize işleminin sonrasında, 2 sn süreyle ACB tamponu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Voltametrik ve İmpedimetrik ölçümler ile alınmıştır.

Grafen Oksit (GO) İle dsDNA Etkileşimi

PGE yüzeylerine, 1.4 V, 60 sn süreyle elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Karboksilik grupları aktive etmek amacıyla, 5 mM EDC ve 5 mM NHS içeren kovalent bağlama çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. DMSO çözeltisi içerisinde hazırlanan Grafen Oksit (GO) çözeltisi içerisinde 15 dakika boyunca modifiye edilip, 5 dakika boyunca kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. GO modifiyeli elektrotlar, 10 ppm konsantrasyonda ACB tamponu içerisinde hazırlanan dsDNA çözeltisi içinde 1 saat boyunca immobilize edilmiştir. Yüzeye bağlanmayanları uzaklaştırmak için 2 sn süreyle ACB tamponuyla yıkama yapılmıştır. Sonuçlar, impedimetrik ölçüm ile alınmıştır.

3.7.1.2 Nanomateryalin hibridizasyon üzerine etkisi

Nanomateryalin hibridizasyon üzerine etkisini ve hassasiyetini tespit etmek amacıyla; GO modifiyeli elektrotlar ve GO modifiyesiz (yalın) elektrotlar, seçilen optimum koşullar altında, 1 ppm prob dizi ile 5 ppm hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı dizi hibridizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçların R_{ct} değerleri karşılaştırılıp, değerlendirilmiştir.

3.7.2 Tasarlanan nanogenosensörün en uygun hibridizasyon koşullarının saptanması

Yapılan çalışmaların hepsi, patojenik mikroorganizmaların tayini için en uygun hibridizasyon koşullarının elde edilmesine yöneliktir.

En uygun hibridizasyon koşullarının saptanmasında amaç, sensör yüzeyine immobilize edilen *E. coli* prob dizisinin, hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyonundan sonra alınan yanıtlar arasında bir farklanma olmasıdır. Bu, tasarlanan nanogenosensörün seçiciliğini göstermektedir. Hibridizasyondan sonra hedef dizi ile alınan yanıtın daha yüksek, tüm bazları hedeften farklı dizi ile alınan yanıtın daha düşük olması beklenmektedir. Bu farklanmaya bakılarak en uygun hibridizasyon koşulları saptanmaktadır.

3.7.2.1 Prob konsantrasyonunun etkisi

En uygun prob konsantrasyonunu belirlemek için, artan konsantrasyonlarda *E. coli* prob dizisi ile sabit 4 µg/ml *E. coli* hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı *Mycobacterium tuberculosis* hedef dizi (NC)'nin hibridizasyon ve yıkama işleminden sonra alınan sonuçlar incelenmiş ve en uygun prob konsantrasyonu saptanmıştır.

3.7.2.2 Hedef konsantrasyonunun etkisi

En uygun hedef konsantrasyonunu belirlemek için, bir önceki çalışmada belirlenen prob konsantrasyonu sabit tutularak artan konsantrasyonlarda hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyon ve yıkama işleminden sonra sonuçlar incelenerek, en uygun hedef konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.7.2.3 Hibridizasyon tampon çözeltisinin etkisi

Hibridizasyon tampon çözeltisinin etkisini belirlemek için, sabit prob dizi ile sabit hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC), 5 farklı iyonik denge içeriğine sahip olan hibridizasyon tamponu ile hazırlanarak, hibridizasyon ve yıkama işleminden sonra sonuçlar değerlendirilip, en uygun hibridizasyon tamponu seçilmiştir.

3.7.2.4 Yıkama tampon çözeltisinin etkisi

Yıkama tampon çözeltisinin etkisini belirlemek için, seçilen sabit prob dizisi ile sabit hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyon işleminden sonra 5 farklı iyonik denge içeriğine sahip olan yıkama tamponları ile yıkama işlemini gerçekleştirdikten sonra sonuçlar incelenip, en uygun yıkama tamponu saptanmıştır.

3.7.2.5 Prob tutturma (immobilizasyon) süresinin etkisi

En uygun prob tutturma süresinin etkisini belirlemek için, sabit konsantrasyondaki prob dizisi farklı sürelerde immobilizasyon işleminden sonra sabit hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyona tabi tutulmuştur. Sonuçlar değerlendirilip, en uygun prob tutturma süresi seçilmiştir.

3.7.2.6 Yıkama süresinin etkisi

Yıkama süresinin etkisini belirlemek için, sabit prob dizi ile hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) arasındaki hibridizasyondan sonra farklı sürelerde yapılan yıkama işleminin ardından alınan sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.7.2.7 Grafen oksit (GO) modifikasyon süresinin etkisi

Grafen Oksit modifikasyon süresinin etkisini saptamak için, farklı sürelerde sensör yüzeyine Grafen Oksit (GO) modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, prob dizi ile hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) hibridizasyona tabi tutulup, yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirilip, en uygun Grafen Oksit modifikasyon süresi seçilmiştir.

3.7.3 PCR ürünleri kullanılarak patojenik mikroorganizmaların tanısı

Sentetik hedef dizilerin kullanılmasıyla belirlenen en uygun hibridizasyon koşulları sağlandıktan sonra bu koşullar altında, *E. coli* Prob ile *E. coli*'nin PCR ile çoğaltılmış gen bölgesi hibridizasyona tabi tutulmuştur. Biyosensörün seçiciliğini elde etmek amacıyla farklı bir mikroorganizmaya ait tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü (*Klebsiella pneumoniae*) ve PCR Blank (Kör) kullanılarak hibridizasyona tabi tutulup, analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.8 Tasarlanan Nanogenosensörü Doğrulama Amacıyla İncelenen Parametreler

3.8.1 Hedef dizi ve PCR ürününün seçiciliğe olan etkisi

Prob dizi ile hedef dizi ve PCR ürününün etkileşiminin spesifikliğini doğrulamak amacıyla, Grafen Oksit modifiyeli elektrotlar *E. coli* prob dizisiyle immobilize edilmemiştir. Direkt olarak, optimum koşullar altında GO kaplı elektrotlar, 5 ppm hedef dizi, 5 ppm tüm bazları hedeften farklı dizi, 1:40 oranında hazırlanan hedef PCR ürünü (*E. coli* PCR) ve tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü (*Klebsiella pneumoniae* PCR) ile etkileştirilmiştir. Sentetik diziler ve PCR ürünlerinin sensör yüzeyindeki etkileşimleri incelenmiştir. Sonuçların Rct değerleri karşılaştırılmıştır.

3.8.2 Oluşturulan nanosensörün taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), mikroyapı morfolojisi ve kimyasal bileşim karakterizasyonlarının incelenmesi ve analizi için çok yönlü araçlardan biridir. Üç boyutlu bir yapıda, büyük çözünürlük ve alan derinliğine sahiptir. Taramalı Elektron Mikroskobu'nun prensibi, incelenen örneğin yüzeyi ile elektron demetinin yapmış olduğu fiziksel etkileşimlerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanıp, incelenmesidir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Yalın PGE, 5 mM EDC/NHS modifiyeli PGE ve GO modifiyeli PGE elektrotların mikroskobik karakterizasyonu 2 μ m çözünürlükte (ölçek) görüntülenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal genosensörler, kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tanısı için hızlı, ucuz ve kolay yöntemlerdir. Nanoteknolojinin son yıllarda hızla gelişmesiyle birlikte, nanomateryaller ile zenginleştirilen genosensör tasarımları hız kazanmıştır. Bu yeni nanogenosensör tasarımları ile yüzey alanları ve hassasiyetlerini artırarak daha güvenilir ve daha düşük tayin sınırlı analizler yapmak mümkün olmaktadır.

Tez kapsamında, patojenik mikroorganizmaların özellikle klinik analizlere yönelik tanısında kullanılması amacıyla bir nanogenosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan nanogenosensörde model mikroorganizma olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisi kullanılmış olup, Grafen Oksit (GO) nanomateryali ile zenginleştirilmiş ve grafen nanomodifiye sensör yüzeyleri elde edilmiştir. Nanomateryal modifikasyonunun hassasiyet ve seçiciliğe etkisini incelemek amacıyla grafen modifiye edilmiş ve edilmemiş yüzeylerde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1 Grafen Nanomodifiye Yüzeylerde Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.1.1 Grafen türevlerinin dsDNA ile etkileşimi

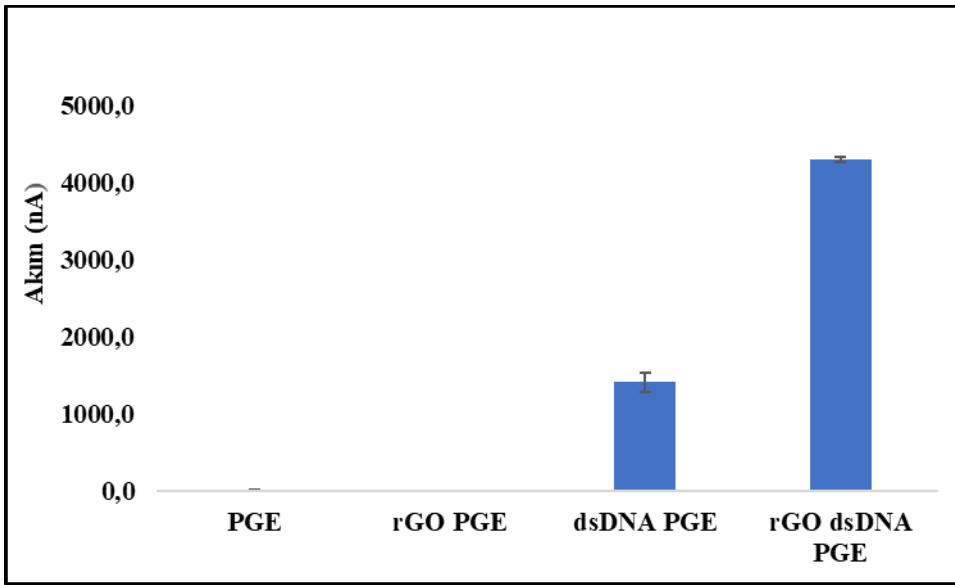
İndirgenmiş Grafen Oksit ve Grafen Oksit ile dsDNA etkileşiminin yöntemleri Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. İndirgenmiş Grafen Oksit ile dsDNA etkileşimi sonuçları voltametri ve impedimetrik ölçümler ile, Grafen Oksit ile dsDNA etkileşimi ise; impedimetrik ölçüm ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit (rGO) İle dsDNA Etkileşimi

İndirgenmiş Grafen Oksitin yüzeye kaplanması ve dsDNA ile olan etkileşiminin yöntemi Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır.

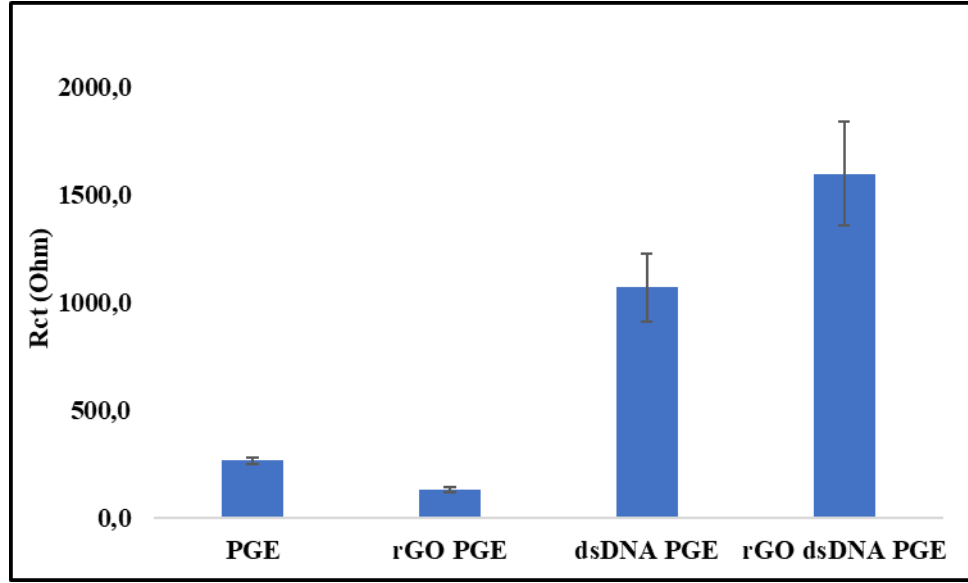
Voltametrik Ölçümler, sensör yüzeyine immobilize edilen DNA'ya yönelik ölçümler olup, Guanin bazının yaklaşık +1,0 V potansiyelde yükseltgenme sinyali vermesi esasına dayanmaktadır. Ölçümler, Diferansiyal Puls Voltametrisi (DPV) yöntemiyle ACB tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, yüzeyde aktifleştirilen -COOH gruplarına kovalent olarak dsDNA bağlanmıştır. PGE yüzeylerindeki dsDNA ile rGO kaplı yüzeylerdeki dsDNA'lara baktığımızda 4 kat kadar daha fazla dsDNA bağlandığı görülmektedir.



Şekil 4.1. Yalın PGE ve yalın rGO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği

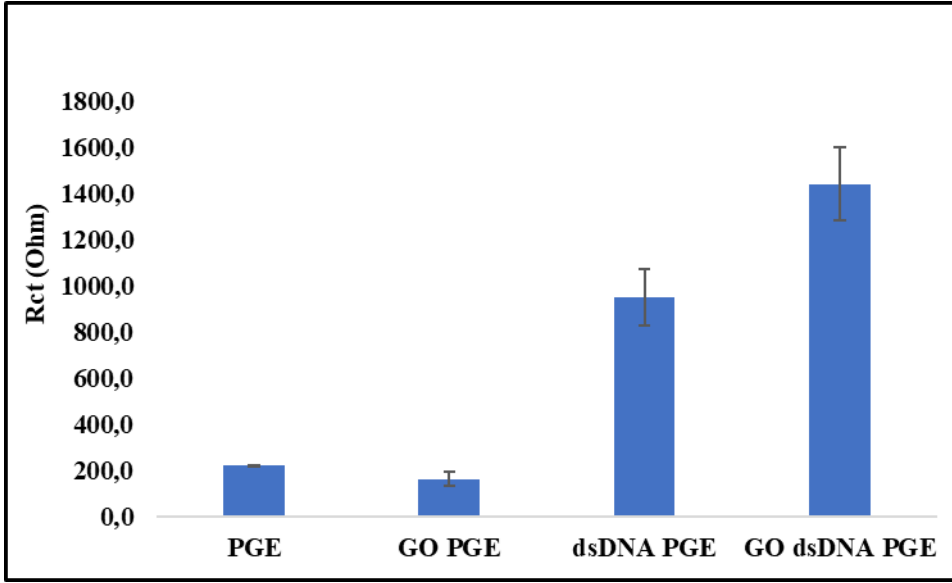
İmpedimetrik yöntemler, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere, rGO PGE'de elde edilen direnç PGE yüzeyde elde edilen dirençten daha düşüktür. Bunun sebebi; İndirgenmiş Grafen Oksit iletken ve yüzey alanı genişliği özelliği sebebiyle direncinin azalmasıdır. İletkenlik ve elektron transfer hızı arttığında direnç düşmektedir. Böylece, yüzeye kaplandığı saptanmaktadır. Sensör yüzeylerindeki dsDNA bağlanmalarına bakıldığında ise; rGO yüzeylerde daha yüksek R_{ct} değerleri elde edilmiştir. rGO PGE'de oluşturulan -COOH gruplar sayesinde, yalın yüzeydeki dsDNA'ya oranla daha fazla dsDNA bağlandığı saptanmaktadır.



Şekil 4.2. Yalın PGE ve yalın rGO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS yöntemiyle elde edilen Rct değerlerinin histogram grafiği

Grafen Oksit (GO) İle dsDNA Etkileşimi

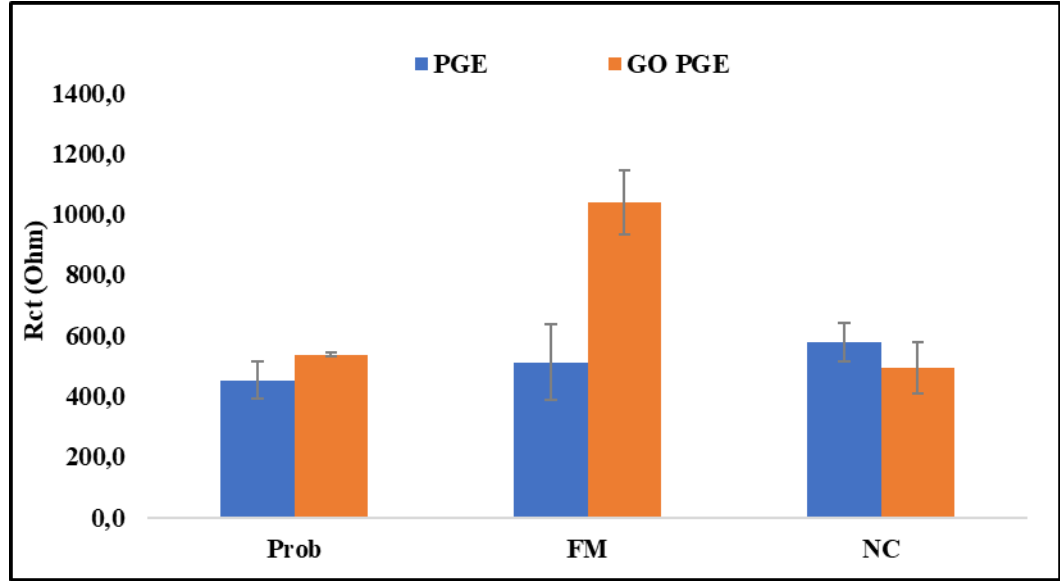
Grafen Oksit ile dsDNA etkileşimleri Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Grafen Oksit ile dsDNA etkileşiminin analizleri Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3’e baktığımızda, GO PGE’nin, PGE’ye göre daha düşük direnci bulunmaktadır. Rct değerlerinin düşüşü sensör yüzeyinin iletken hale geldiğini ve elektron transfer hızının artmasından kaynaklandığını göstermektedir. Bu sonuca göre, grafen oksitin sensör yüzeye modifiye edildiği belirlenmektedir. Sensör yüzeylerine immobilize edilen DNA’lara bakıldığında da bir farklanma bulunmaktadır. GO dsDNA PGE ile dsDNA PGE karşılaştırıldığında, GO dsDNA PGE’de; GO yüzeylerde oluşturulan -COOH gruplarından daha fazla DNA’nın bağlandığı görülmektedir.



Şekil 4.3. Yalın PGE ve yalın GO PGE yüzeyler ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS yöntemiyle elde edilen Rct değerlerinin histogram grafiği

4.1.2 Nanomateryalin hibridizasyon üzerine etkisi

Bu çalışmada, Grafen Oksit nanomateryalinin hassasiyetinin belirlenmesi, hibridizasyona olan etkisini ve nanomateryal ile elde edilen daha düşük tayin sınırını incelemek amacıyla yüzeylere Grafen Oksit modifiyesiz (yalın yüzey) ve Grafen Oksit modifiyeli yüzeyler ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yalın ve GO modifiyeli yüzeylerde, tüm belirlenen optimum koşullar altında 1 ppm prob dizi ile 5 ppm hedef dizi (FM) ve 5 ppm tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) Bölüm 3.7.1.2’de anlatıldığı gibi hibridizasyona tabi tutulup, Rct değerleri analiz edilmiştir.



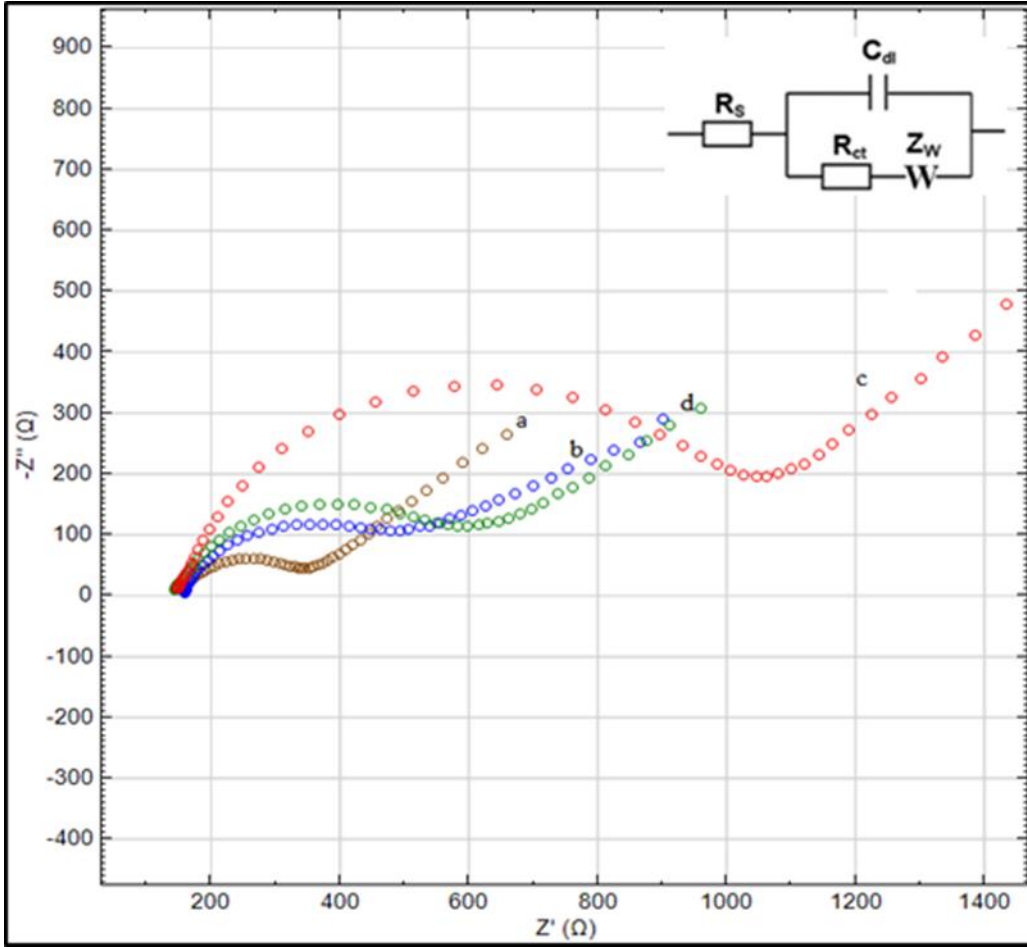
Şekil 4.4. Yalın ve GO kaplı yüzeylerin *E. coli* prob ile bağlanması (hibridizasyondan önce) ve *E. coli* prob ile sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyondan sonra alınan Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.4'de görüldüğü üzere, yalın yüzeylerde hibridizasyon gerçekleştiği görülmüş fakat FM'de daha düşük Rct değerleri elde edilmiştir. Genosensör seçimliliği için önemli olan FM/NC ayrımı ise gözlenememiştir. GO modifiyeli yüzeylerde ise; daha yüksek FM Rct değerleri elde edilmiştir. FM/NC ayrımında ise; daha yüksek ayrım elde edilmiştir. Böylece, geliştirilen nanogenosensör ile daha iyi sonuçların elde edildiği görülmüştür.

4.2 Patojenik Mikroorganizmaların Tanısına Yönelik Geliştirilen Nanogenosensörün Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Geliştirilen nanogenosensör tasarımı ile hibridizasyon tayinleri sentetik diziler ile sağlanmıştır. Hibridizasyon tayini, *E. coli* prob, *E. coli* hedef ve genosensör seçimliliği için tüm bazları hedeften farklı *Mycobacterium tuberculosis* hedef dizisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada, sensör yüzeyinde oluşan hibridizasyon öncesi ve sonrası analizler Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Randles eşdeğer devresi elemanlarından elektrot yüzeyinde oluşan yük direncindeki artış olan Rct'nin değerlerindeki değişimler yorumlanmaktadır. EIS, redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ varlığında kullanılıp, Rct değerlerinin analizi yapılmaktadır. Redoks

probu, elektron transferi aracılığıyla elektrot yüzeyiyle etkileşime girmektedir. Elektrot yüzeyi iletken olduğunda, elektron transfer hızı yüksek olduğu için direnç düşük, yüzey yalıtkan hale gelmeye başladığında ise; elektron transfer hızı yavaşlayıp, direnç artmaktadır. Şekil 4.5’de geliştirilen nanogenosensörün 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ içeren redoks çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen ölçüm değerlerinin Nyquist diagramı gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) yöntemi ile geliştirilen nanogenosensör tasarımının incelenmesi a) Yalın GO PGE, b) *Escherichia coli* Prob (Hibridizasyon Öncesi), c) *Escherichia coli* Prob ve *Escherichia coli* Hedef (Hibridizasyon sonrası), d) *Escherichia coli* Prob ve *Mycobacterium tuberculosis* Hedef (Hibridizasyon sonrası) etkileşiminden sonra elde edilen R_{ct} değerlerinin Nyquist diyagramı

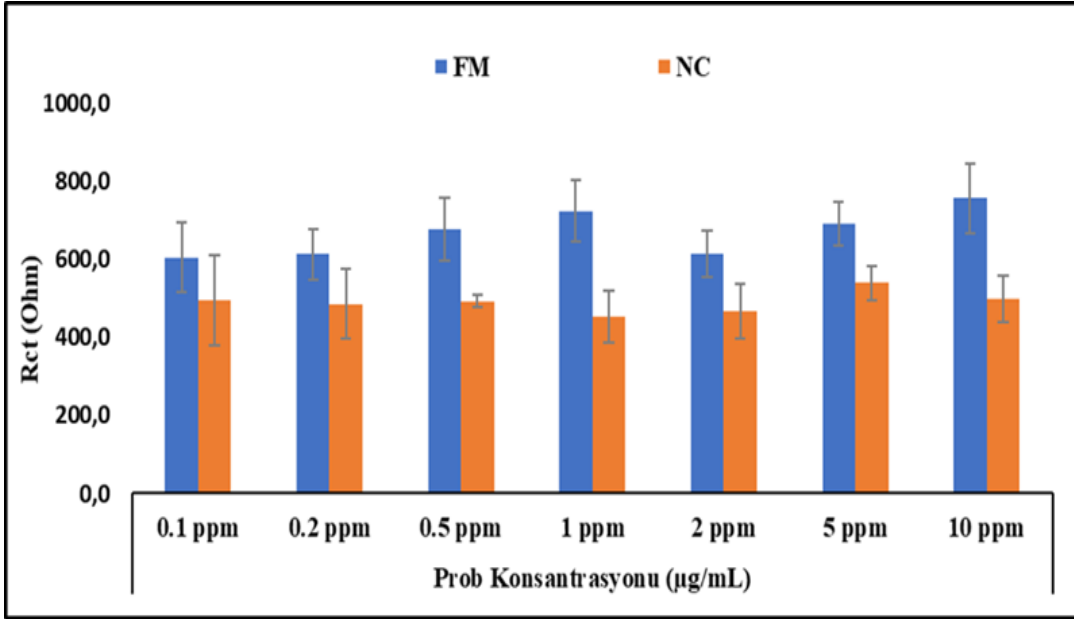
Şekil 4.5’deki R_{ct} verileri değerlendirildiğinde; a) GO PGE’deki R_{ct} değerleri yüzey iletken olduğu için düşük çıkmıştır. Böylece, sensör yüzeyine

nanomateryalin modifiye edildiği saptanmaktadır. b) GO kaplı elektrodun üzerine prob dizinin immobilize edilmesi sonucunda Rct değerlerinde artış gözlenmektedir. Bu durum, prob üzerinde bulunan negatif fosfat grupları ile redoks probu arasındaki etkileşim sonucunda, yüzeyin yalıtkan hale gelerek, elektron transfer hızının yavaşlaması sebebiyle artış gözlenmesidir. c) GO kaplı Prob dizi ile hedef dizinin hibridizasyon sonucunda sensör yüzeyi kalınlığı artarak, yüksek Rct değerleri elde edilmiştir. Rct değerlerinin artmasıyla, birbirine komplementer olan diziler arasında hibridizasyonun gerçekleştiği görülmektedir. d) GO kaplı Prob dizi ile tüm bazları hedeften farklı dizinin hibridizasyonu sonucunda düşük Rct değerleri elde edilmiştir. Prob dizi ile NC dizi birbirine spesifik olmadığı için yüzeye bağlanamamıştır. Prob diziye yakın bir sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte, en uygun optimum koşullar altında patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik nanogenosensör geliştirildiği belirlenmektedir.

4.3 Tasarlanan Nanogenosensörün En Uygun Hibridizasyon Koşullarının Saptanmasına Yönelik Sonuçların Değerlendirilmesi

4.3.1 Prob konsantrasyonunun etkisi

En uygun prob konsantrasyonunu seçmek amacıyla, Bölüm 3.7.2.1’de anlatıldığı gibi çalışma gerçekleştirilmiştir. Artan prob konsantrasyonlarında, sabit 4 µg/ml hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizinin (NC) hibridizasyon sonuçlarına bakılarak, en uygun prob konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu çalışmada, hibridizasyon tamponu 2XSSC, yıkama tamponu olarak ise; 1XSSC+%0.1 SDS kullanılmıştır.



Şekil 4.6. GO yüzeylerde artan prob konsantrasyonlarında sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.6'daki histogram grafiğinde, artan konsantrasyonlarda prob dizi ile kaplı elektrotlar, sabit hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyona tabi tutulmuştur. En uygun prob konsantrasyonunun seçilmesi amacıyla; probun yüzeye en iyi biçimde kaplanıp, en iyi hibridizasyon seçimliliğinin sağlandığı (FM/NC oranı ayrımı) prob konsantrasyonu seçilmektedir. Rct verileri incelendiğinde, 1 ppm'e kadar FM değerleri ve FM/NC arasındaki ayırım artmaya başlamıştır. 1 ppm'den sonra ayırım tekrar azalmaya başlamıştır.

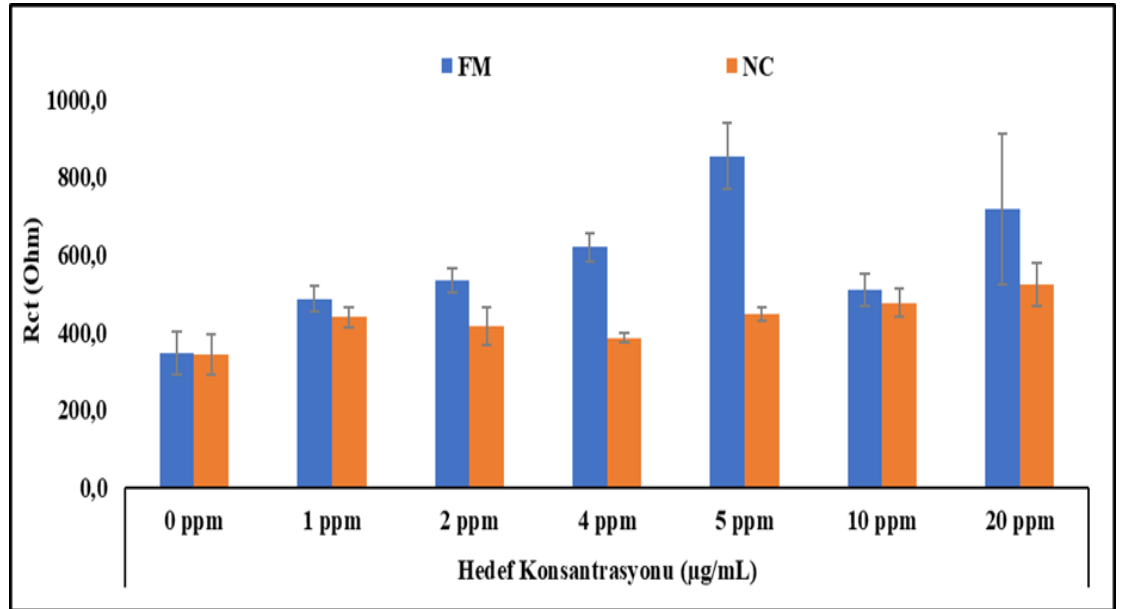
Tablo 4.1'de; FM/NC oranları verilmiştir. Bu tablo değerlendirildiğinde; en iyi ayırımın 1 ppm'de olduğu gözlenmiştir. Prob konsantrasyonu 1 ppm olarak seçilmiştir.

Tablo 4.1. Optimum prob konsantrasyonu saptanmasına yönelik çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.

Prob Konsantrasyonu	FM / NC
0.1 ppm	1.2
0.2 ppm	1.3
0.5 ppm	1.4
1 ppm	1.6
2 ppm	1.3
5 ppm	1.3
10 ppm	1.5

4.3.2 Hedef konsantrasyonunun etkisi

En uygun hedef konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, belirlenen sabit prob konsantrasyonu (1 ppm) ile artan konsantrasyonlarda hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyon tayini Bölüm 3.7.2.2'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır.



Şekil 4.7. Sabit (1 ppm) *E. coli* Prob kaplı GO yüzeylerde artan hedef konsantrasyonlarında sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonucunda elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.7’de görüldüğü üzere, hibridizasyondan önce (0 ppm) düşük Rct değerleri alınırken, artan hedef konsantrasyonu ile birlikte 5 ppm konsantrasyonuna kadar değerlerin arttığı görülmüştür. Fakat bu konsantrasyondan sonra Rct değerlerinde azalma meydana gelmeye başlamıştır. Bunun sebebi de, prob ve hedefin bu konsantrasyonda doygunluğa ulaşmasıdır. Ayrıca, artan hedef ve tüm bazları hedeften farklı dizi konsantrasyonu ile nanogenosensör seçimliliği de artmıştır.

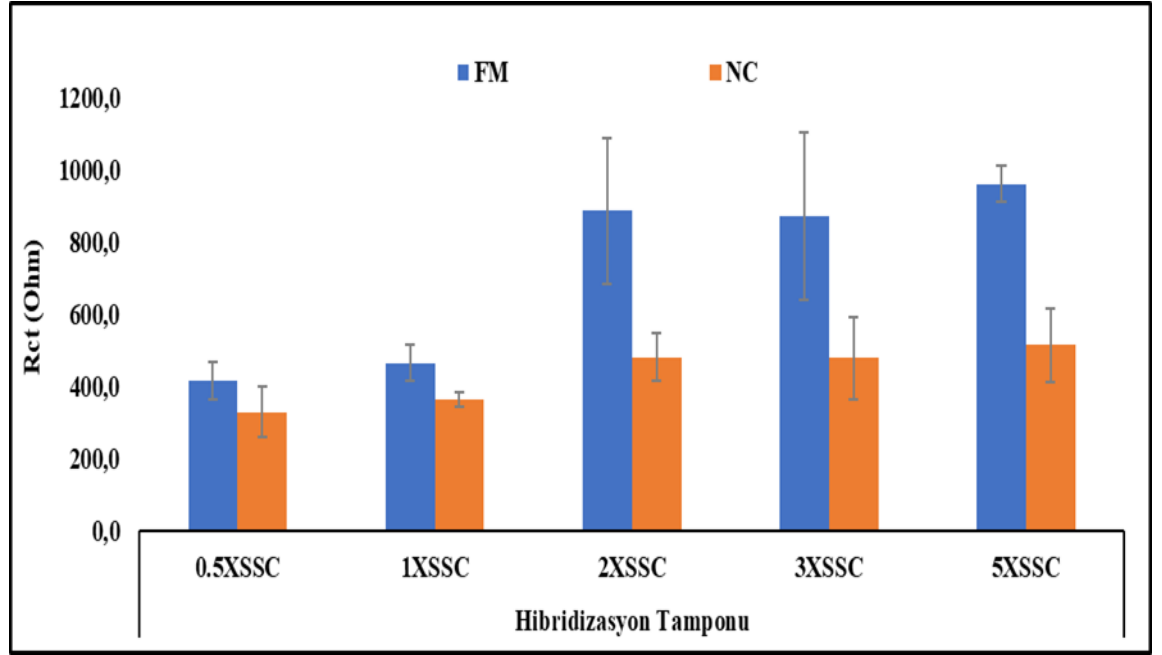
Tablo 4.2. Optimum hedef konsantrasyonu saptanmasına yönelik çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.

Hedef Konsantrasyonu	FM / NC
0 ppm	1.0
1 ppm	1.1
2 ppm	1.3
4 ppm	1.6
5 ppm	1.9
10 ppm	1.1
20 ppm	1.4

Tablo 4.2’deki verilere baktığımızda en iyi ayrımın 5 ppm’de olduğu gözlenmektedir. En iyi ayrım; FM’in Rct değer yanıtının en yüksek olduğu, NC’nin ise en düşük olduğu değerdir. Optimum hedef konsantrasyonu 5 ppm olarak seçilmiştir.

4.3.3 Hibridizasyon tampon çözeltisinin etkisi

Hibridizasyon tampon çözeltisinin etkisini belirlemek amacıyla, sabit 1 ppm konsantrasyonda prob dizi ile 0.5XSSC, 1XSSC, 2XSSC, 3XSSC ve 5XSSC olmak üzere 5 farklı iyonik dengeye sahip hibridizasyon tamponu içerisinde hazırlanan 5 ppm hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) Bölüm 3.7.2.3’de anlatıldığı gibi hibridizasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 4.8. *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, farklı iyonik dengeye sahip hibridizasyon tamponları kullanılarak sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere, hibridizasyon sonucu elde edilen Rct değerlerine bakıldığında, en yüksek FM değeri ve en düşük NC değeri 5XSSC hibridizasyon tamponu ile sağlanmıştır. Ayrıca tekrarlanabilirlik de göz önüne alınarak en uygun hibridizasyon tamponu belirlenmiştir.

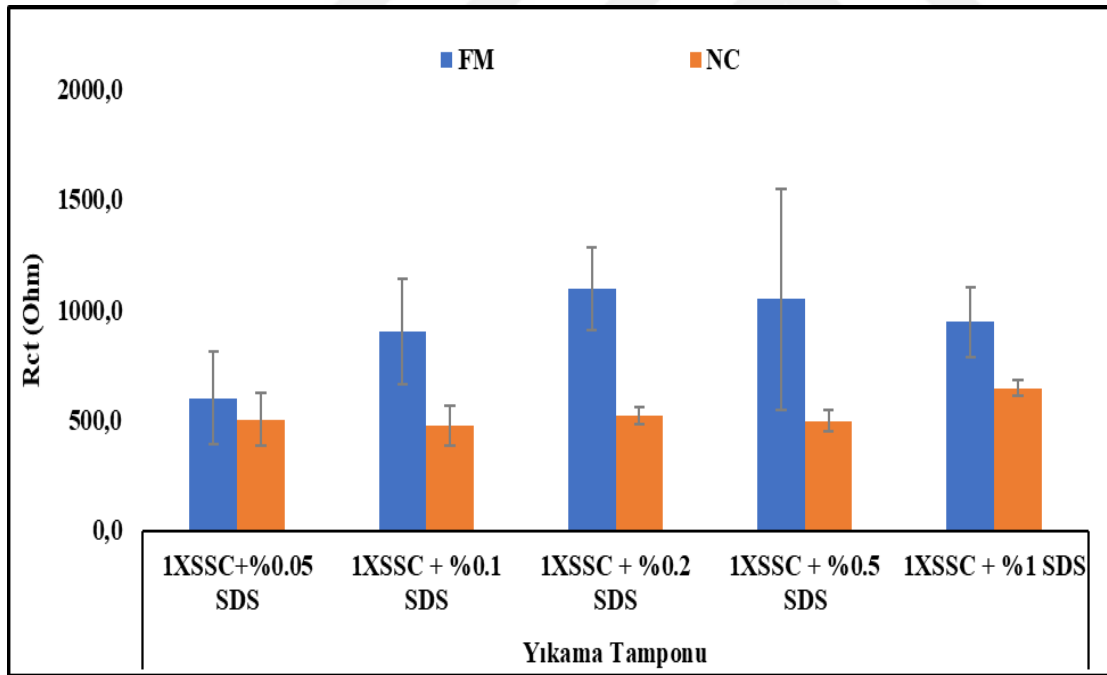
Tablo 4.3. Farklı hibridizasyon tamponları kullanılarak elde edilen FM/NC oranları.

Hibridizasyon Tamponu	FM / NC
0,5XSSC	1,3
1XSSC	1,3
2XSSC	1,8
3XSSC	1,8
5XSSC	1,9

Tablo 4.3’de, FM/NC değ er oranları verilmektedir. Bu oranlar da göz önüne alındığında en iyi ayrımın 5XSSC hibridizasyon tamponunda gözlendiği analiz edilmiştir. En uygun hibridizasyon tamponu, 5XSSC olarak seçilmiştir.

4.3.4 Yıkama tampon çözeltisinin etkisi

Yıkama tampon çözeltisinin etkisini belirlemek için, 1 ppm konsantrasyonda prob dizi ile 5XSSC hibridizasyon tamponu içerisinde hazırlanan 5 ppm hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) Bölüm 3.7.2.4’de anlatıldığı gibi hibridizasyona tabi tutulmuştur. 1XSSC+%0.05 SDS, 1XSSC+%0.1 SDS, 1XSSC+%0.2 SDS, 1XSSC+%0.5 SDS ve 1XSSC+%1 SDS olmak üzere 5 farklı iyonik dengeye sahip yıkama tamponu ile yıkamanın ardından R_{ct} değ erleri incelenmiştir.



şekil 4.9. *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyonun ardından farklı iyonik dengeye sahip yıkama tamponları ile etkileşiminden sonra elde edilen R_{ct} verilerinin histogram grafiği

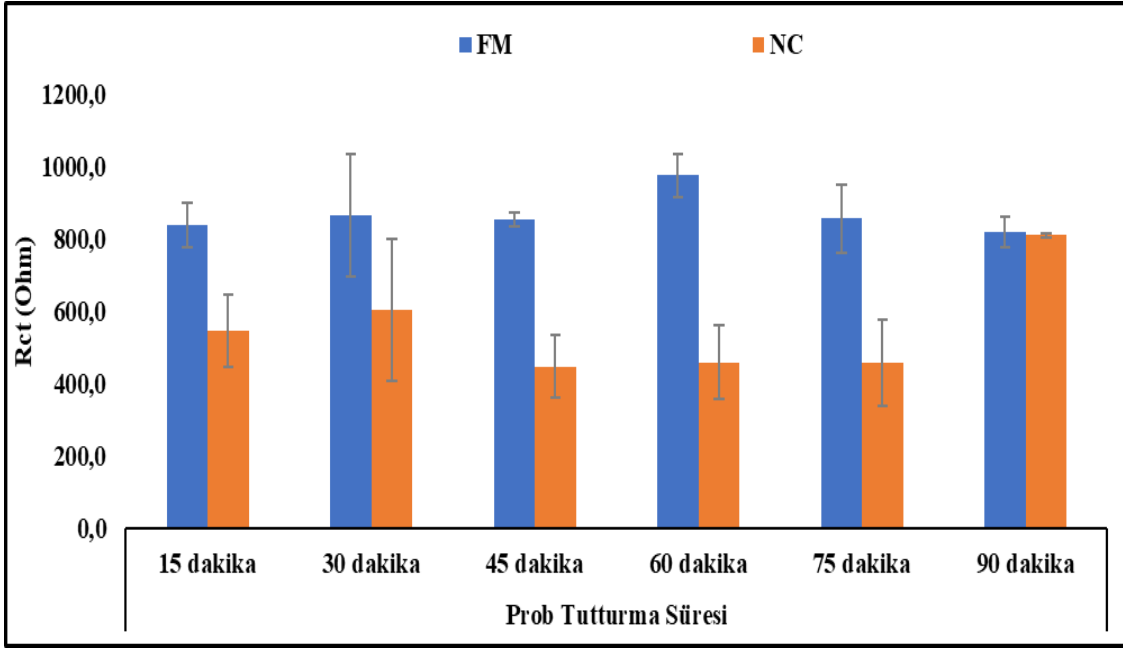
Şekil 4.9’de görüldüğü üzere, hibritin (FM) en yüksek, NC’nin ise; en düşük çıktığı yıkama tamponu 1XSSC+% 0.2 SDS tamponudur. Bu tampondan sonra Rct değerleri azalmaya başlamıştır. Tablo 4.4’de FM/NC verilerin oranlarına bakıldığında ise en iyi ayrımın 1XSSC+ %0.2 SDS ve 1XSCC+%0.5 SDS tamponunda elde edildiği gözlenmektedir. Fakat tekrarlanabilirlik göz önüne alındığında en iyi sonucun 1XSSC+%0.2 SDS yıkama tamponunda gerçekleştiği görülmektedir. En uygun yıkama tamponu 1XSSC+%0.2 SDS seçilmiştir.

Tablo 4.4. Farklı yıkama tamponları kullanılarak elde edilen FM/NC oranları.

Yıkama Tamponu	FM/ NC
1XSSC + %0.05 SDS	1,2
1XSCC + %0.1 SDS	1,9
1XSSC + %0.2 SDS	2,1
1XSSC + %0.5 SDS	2,1
1XSSC + %1 SDS	1,5

4.3.5 Prob tutturma (immobilizasyon) süresinin etkisi

Prob tutturma süresinin etkisini belirlemek için, 1 ppm konsantrasyonda prob dizi ile 5XSSC hibridizasyon tamponu içerisinde hazırlanan 5 ppm hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı dizi, Bölüm 3.7.2.5’de anlatıldığı koşullarda hibridizasyonları gerçekleştirilmiştir. 1 ppm prob dizisi sensör yüzeye 15 dakika, 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika, 75 dakika ve 90 dakika olmak üzere 6 farklı zaman diliminde immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, 5 ppm hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı dizi ile hibridizasyona tabi tutularak Rct değerleri analiz edilmiştir.



Şekil 4.10. GO yüzeylere farklı sürelerde immobilize edilen *E. coli* prob dizisinin, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.10'daki histogram grafiği incelendiğinde, yüksek FM değeri ve düşük NC değeri 60 dakikada elde edilmiştir. 60 dakikadan sonra FM değerleri doygunluğa ulaşmış, sabitlenmeye başlamıştır. Ayrıca, 60 dakikadan sonra FM/NC arasındaki farkta da azalma görülmektedir.

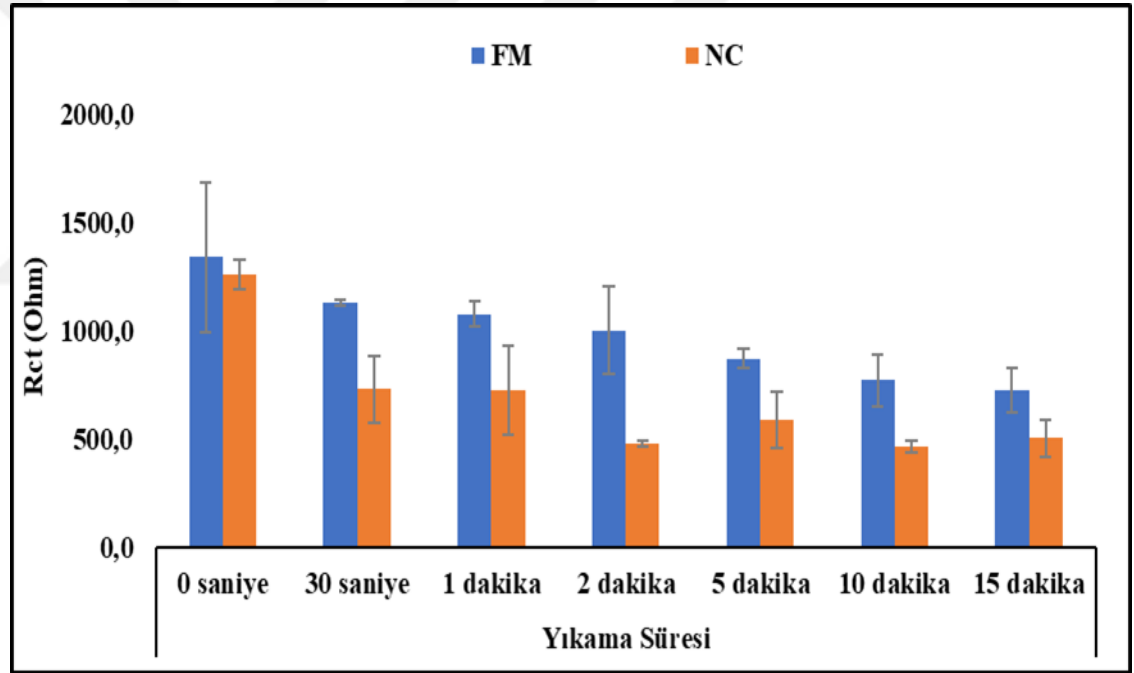
Tablo 4.5. Farklı prob tutturma süreleri ile çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.

Prob Tutturma Süresi	FM/ NC
15 dakika	1,5
30 dakika	1,4
45 dakika	1,9
60 dakika	2,1
75 dakika	1,9
90 dakika	1,0

Tablo 4.5'deki FM/NC değerlerine de bakıldığında, en iyi ayrımın 60 dakikada gerçekleştiği görülmektedir. En uygun prob immobilizasyon süresi 60 dakika olarak seçilmiştir.

4.3.6 Yıkama süresinin etkisi

Yıkama süresinin hibridizasyona olan etkisini tespit etmek için, 1ppm prob dizi ile 5 ppm hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) Bölüm 3.7.2.6'da anlatıldığı gibi hibridizasyona tabi tutulmuştur. Hibridizasyonun ardından 1XSSC+%0.2 SDS yıkama tamponu içerisinde 0 saniye, 30 saniye, 1 dakika, 2 dakika, 5 dakika, 10 dakika ve 15 dakika olmak üzere 7 farklı zaman dilimindeki yıkama işleminden sonra Rct değerleri incelenmiştir.



Şekil 4.11. *E. coli* prob kaplı GO yüzeylerde, sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyonun ardından farklı sürelerde uygulanan yıkama işlemi sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, yıkama yapılmadığında yüksek FM değerleri elde edilip, FM/NC ayrımında bir fark elde edilememiştir. Yıkama zamanının artmasıyla FM değerlerinde bir azalma görülüp, nanogenosensör seçimliliği

artmaya başlamıştır. 2 dakika yıkama süresinden sonra, FM/NC ayrımı azalmaya başlamıştır.

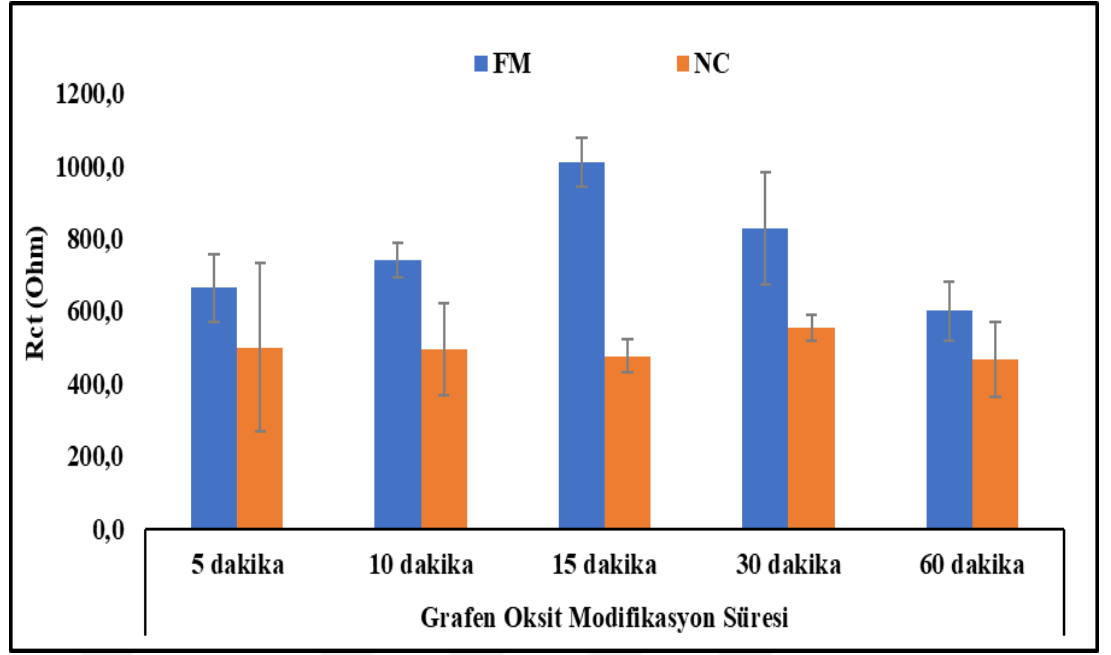
Tablo 4.6. Farklı yıkama süreleri ile çalışma sonucunda elde edilen FM/NC oranları.

Yıkama Süresi	FM / NC
0 saniye	1,1
30 saniye	1,5
1 dakika	1,5
2 dakika	2,1
5 dakika	1,5
10 dakika	1,7
15 dakika	1,4

Tablo 4.6'daki verilere bakıldığında ise; en iyi ayrımın 2 dakikada gerçekleştiği görülmektedir. Yıkama süresi 2 dakika seçilmiştir.

4.3.7 Grafen oksit (GO) modifikasyon süresinin etkisi

Grafen Oksit modifikasyon süresinin etkisini belirlemek için, hibridizasyon işlemleri gerçekleştirilmeden önce sensör yüzeye 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere 5 farklı zaman diliminde Grafen Oksit modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından 1 ppm prob ile 5 ppm hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile Bölüm 3.7.2.7'de anlatıldığı gibi hibridizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra Rct değerleri analiz edilmiştir.



Şekil 4.12. Yalın yüzeylere farklı sürelerde uygulanan Grafen Oksit (GO) nanomateryali sonrası *E. coli* prob ile hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, 15 dakikaya kadar FM değerleri ve FM/NC arasındaki ayırım artmaya başlamaktadır. 15 dakikadan sonra FM değerleri düşüp, nanogenosensör seçimliliği de azalmaktadır. Grafen oksitin modifikasyon süresi arttıkça sensör yüzeyi daha çok kaplandığı için hibridizasyon daha az gerçekleşmektedir.

Tablo 4.7. Farklı Grafen Oksit modifikasyon süreleri ile çalışma sonucu elde edilen FM/NC oranları.

Grafen Oksit Modifikasyon Süresi	FM / NC
5 dakika	1,3
10 dakika	1,5
15 dakika	2,1
30 dakika	1,5
60 dakika	1,3

Tablo 4.7'deki FM/NC oran değerlerine baktığımızda, en iyi ayırım 15 dakikada gerçekleşmektedir. Grafen Oksit modifikasyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir.

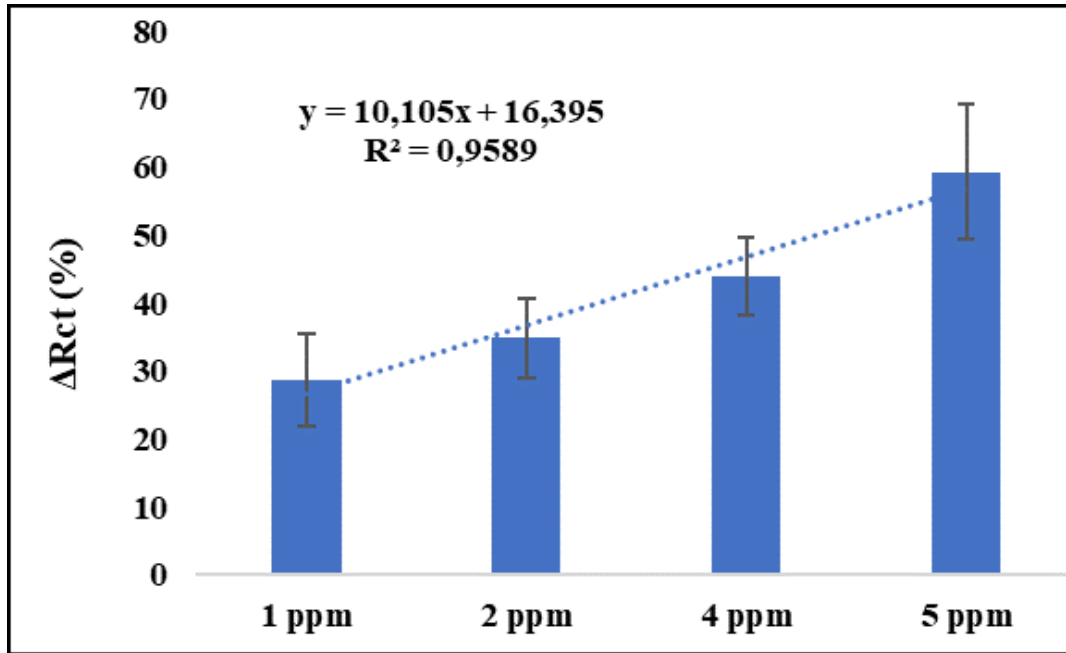
4.3 Tayin Sınırının (LOD) Belirlenmesi

Optimum hedef konsantrasyonu belirlendikten sonra, patojenik mikroorganizma tayini edilebileceği en düşük konsantrasyonu hesaplamak için, Şekil 4.13 'de gösterilen grafikte 1 ppm ile optimum seçilen 5 ppm hedef dizi aralığında alınan Rct verileri gösterilmiştir. LOD aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$LOD = 3s/m$$

Bu formülde s, standart sapmayı; m, kalibrasyon eğrisinin eğimini; 3 ise bir sabit olan Sinyal/Gürültü (S/N) oranını göstermektedir.

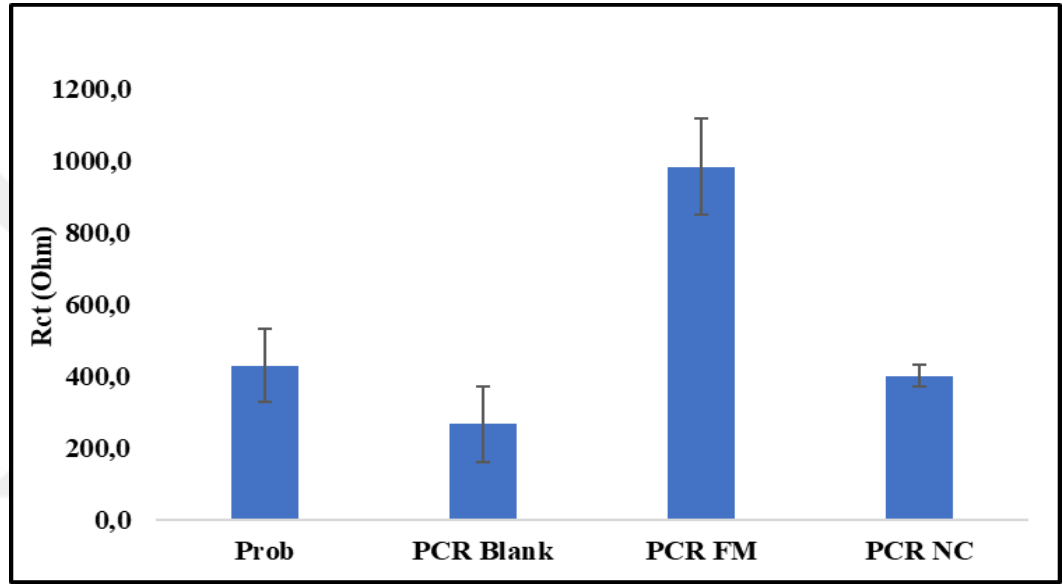
Elde edilen veriler doğrultusunda, tayin sınırı (LOD) 206 nM (1.37 ppm) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.13. Tayin sınırının hesaplanmasında oluşturulan % ΔRct değerlerinin kalibrasyon eğrisi

4.4 PCR Ürünleri Kullanılarak Patojenik Mikroorganizmaların Tanısı

Patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik tasarlanan nanogenosensörün seçiciliğine ait tüm optimum koşullar sentetik dizilerle gerçekleştirildikten sonra, bu optimum koşullar altında *E. coli* PCR, PCR Blank ve tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleriyle hibridizasyon işlemi Bölüm 3.5.7’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır.



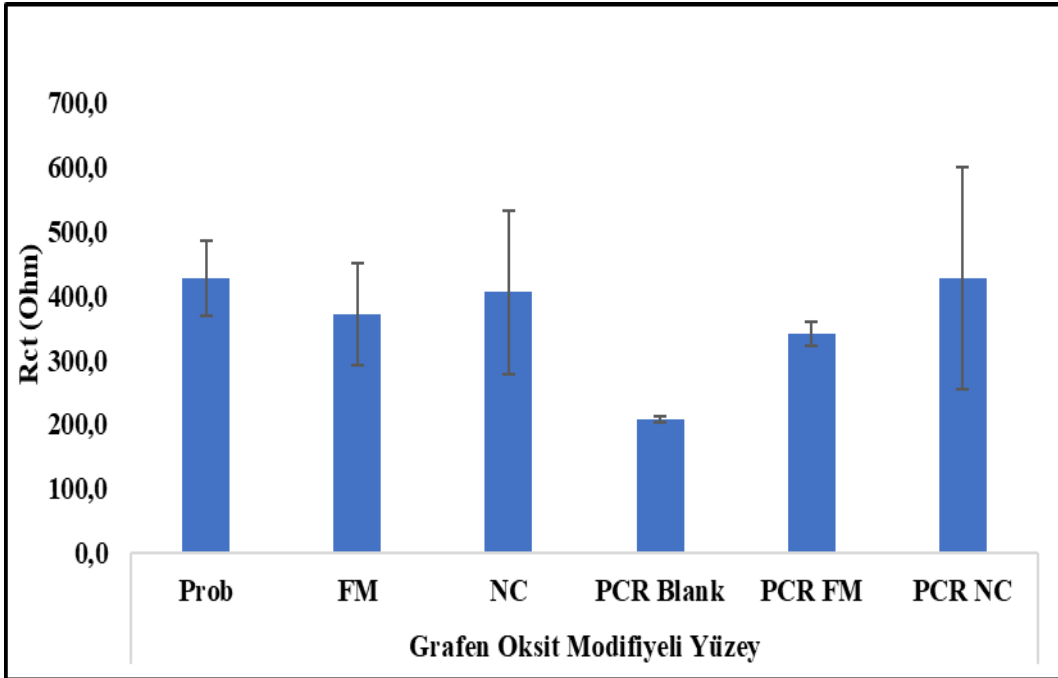
Şekil 4.14. Optimum koşullar altında GO yüzeylere *E. coli prob* bağlanması (hibridizasyon öncesi) ve *E. coli prob* kaplı GO yüzeyler ile PCR Blank, *E. coli PCR* (FM) ve tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü (NC) hibridizasyon sonrası elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Bu çalışma sonucunda, *E. coli* PCR ürününün (FM) Rct değerlerinin arttığı ve prob diziye bağlandığı görülmektedir. Nanogenosensörün seçiciliği için kullanılan farklı bir mikroorganizmaya ait *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü (NC)’nin ise; Rct değerlerinin düşük geldiği gözlenmektedir. NC PCR ürününün, prob’a spesifik olmadığı için yüzeye bağlanamamıştır. Ayrıca, yüzey incelemesi ve ortama ne kadar etki ettiğini saptamak amacıyla PCR ürünü yerine PCR Blank (Kör) kullanılarak, hibridizasyona tabi tutulmuştur. PCR Blank (kör) de yüzeye bağlanmayıp, sonuçlara etki etmediği saptanmıştır.

4.5 Tasarlanan Nanogenosensörü Doğrulama Amacıyla İncelenen Parametreler

4.5.1 Hedef dizi ve PCR ürününün seçiciliğe olan etkisi

Bu çalışmada, *E. coli* Prob dizisinin, *E. coli* hedef dizi ile *E. coli* PCR ürününe spesifik olduğunu kanıtlamak için, prob içermeyen GO kaplı yüzeylerde hedef ve PCR ürünü, tüm bazları hedeften farklı dizi ve tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü hibridizasyon işlemi Bölüm 3.8.1’de anlatıldığı gibi uygulanıp, sonuçlar değerlendirilmiştir.



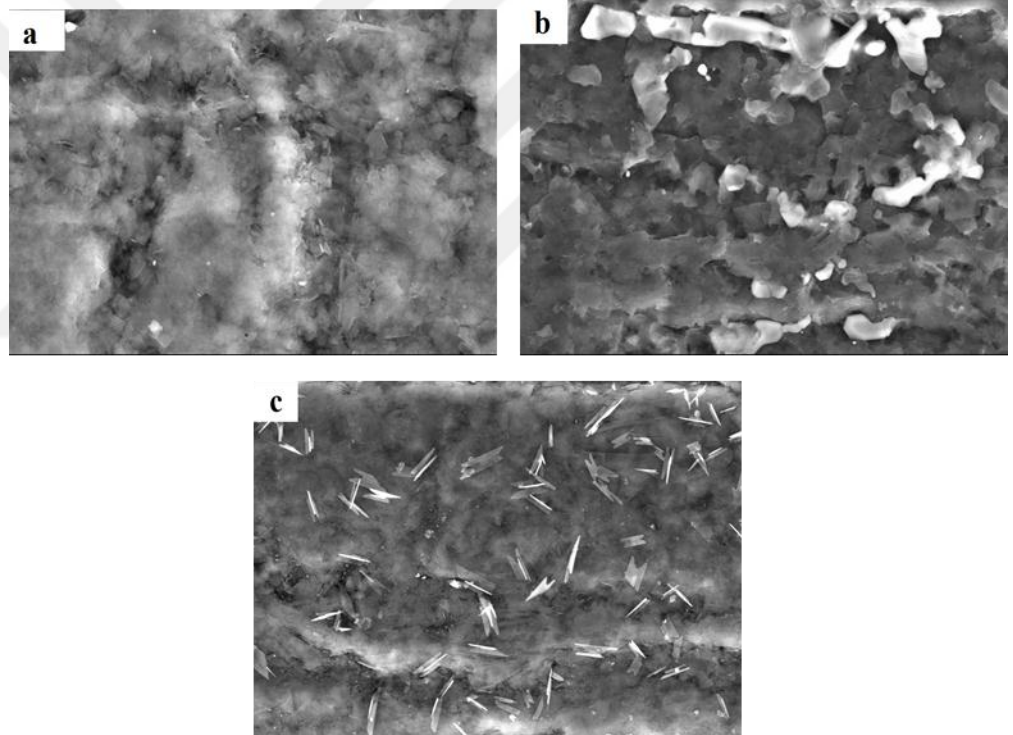
Şekil 4.15. GO kaplı yüzeylere *E. coli* prob bağlanması ve GO kaplı yüzeylerde sentetik hedef dizi (FM), sentetik tüm bazları hedeften farklı dizi (NC), PCR blank, *E. coli* PCR ürünü (FM) ve tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü (NC) etkileşimi sonrasında elde edilen Rct verilerinin histogram grafiği

Şekil 4.15’de, probsuz GO kaplı yüzeylerin *E. coli* hedef dizi, tüm bazları hedeften farklı dizi, *E. coli* PCR, tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü ve PCR Blank etkileşimi sonucunda elde edilen Rct değerleri gösterilmiştir. Bu değerlere bakıldığında, hedef dizi ile PCR ürününün GO kaplı yüzeylerde düşük Rct değerleri elde edildiği görülmüştür. Bu değerler ile GO kaplı yüzeylere hedef dizi

ve PCR ürününün bağlanamadığı sonucu elde edilmektedir. Böylece, *E. coli* Prob dizisinin *E. coli* hedef dizi ve *E. coli* PCR ürününe spesifik olduğu kanıtlanmıştır.

4.5.2 Oluşturulan nanosensörün taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

Yalın PGE, 5 mM EDC/ NHS PGE ve EDC/NHS-GO PGE'lerin SEM görüntüleri Şekil 4.16'da gösterilmektedir. SEM görüntülerinde sensör yüzeyine Grafen Oksitin modifiye edildiği doğrulanmıştır.



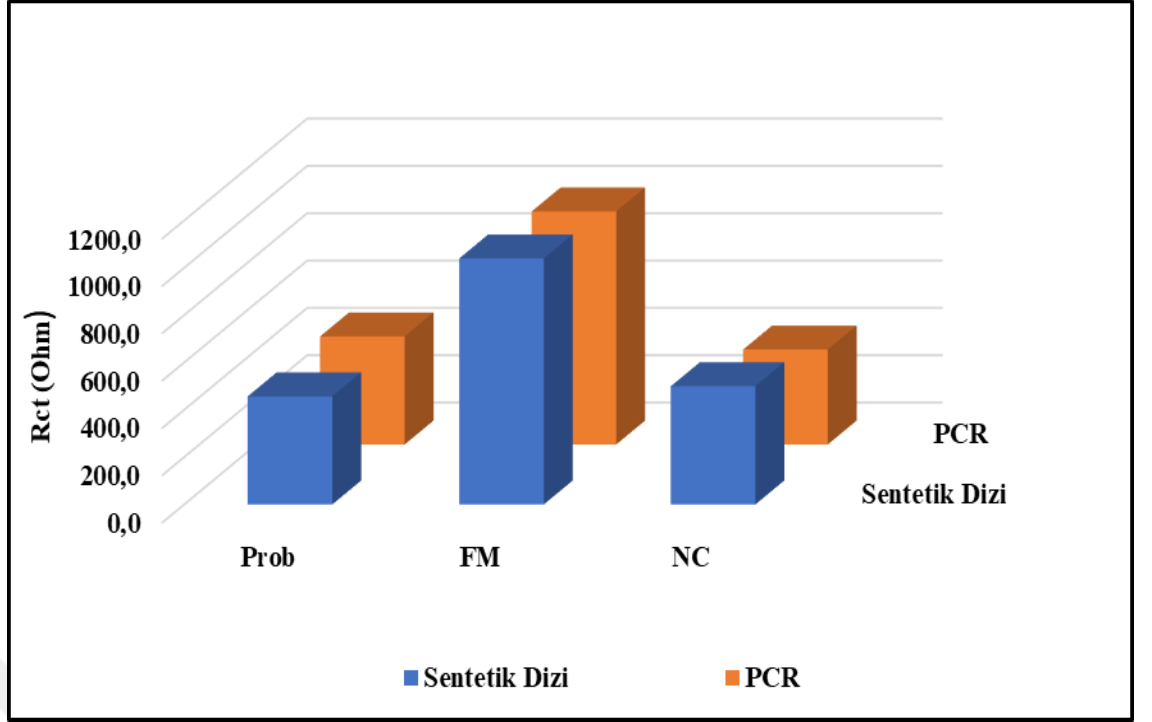
Şekil 4.16. Sensör yüzeylerinde SEM görüntüleri a) PGE, b) EDC/NHS PGE, c) EDC/NHS-GO PGE

4.6 Sentetik Hedef Dizi ve PCR Ürünü ile Yapılan Hibridizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Patojenik mikroorganizmaların tanısına yönelik geliştirilen nanogenosensör tasarımı ilk olarak sentetik diziler ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon için en uygun koşullar sentetik diziler ile sağlanmıştır. Sentetik diziler ile sağlanan optimum koşullar belirlendikten sonra, bu optimum koşullar altında PCR ürünleri (gerçek örnekler) ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi belirlenen optimum koşullarda; Grafen Oksit kaplı elektrot yüzeylere *E. coli* Prob dizisinin immobilize edilmesinin ardından, hibridizasyondan önce ve *E. coli* hedef dizi, tüm bazları hedeften farklı *Mycobacterium tuberculosis* hedef dizi, *E. coli* PCR ürünü ve tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra alınan Rct değerlerinin üç boyutlu histomogramı Şekil 4.17’de şematik olarak gösterilmektedir.

Şekil 4.17’deki histogram grafiğine bakıldığında, hibridizasyondan önce yalnızca GO yüzeyde prob kaplı yüzeylerin Rct değerleri düşük oranda gözlenmiştir. *E. coli* hedef ve *E. coli* PCR ürünü ile hibridizasyon sonucunda ise yüksek Rct değerleri elde edilmiştir. Bu durum hibridizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Genosensörün seçimliliği için kullanılan NC dizi ve NC PCR ürünü de düşük Rct değerleri elde edilmiştir. Bunun sebebi prob dizi ile spesifik olmadıkları için yüzeye bağlanmamalarından kaynaklanmaktadır. Bu durum da, nanogenosensörün seçimliliğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.17. GO yüzeylere *E. coli* prob bağlanmasından sonra (hibridizasyondan önce), *E. coli* prob yüzeylere sentetik *E. coli* hedef sentetik dizi (FM) - *E. coli* PCR ürünü (FM) ve tüm bazları hedeften farklı *Mycobacterium tuberculosis* hedef sentetik dizi (NC) - tüm bazları hedeften farklı *Klebsiella pneumoniae* PCR ürünü (NC) ile hibridizasyondan sonra alınan Rct verilerinin 3D histogramı

5. GENEL SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, nükleik asit tanıma yöntemi kullanılarak patojenik mikroorganizmaların tayinine yönelik Grafen Oksit nanomateryali ile zenginleştirilmiş bir genosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Model mikroorganizma olarak hakkında en çok bilgiye sahip olunan, mikroorganizmalar arasında en sık bulunan patojenik mikroorganizma olan *Escherichia coli* bakterisi kullanılmıştır. *E. coli* bakterisinin hem sentetik DNA dizisiyle, hem de PCR ürünüyle çalışılmıştır. Tasarlanan nanogenosensörün seçiciliği için farklı bir mikroorganizmaya ait sentetik dizi (*Mycobacterium tuberculosis*), farklı mikroorganizmaya ait PCR Ürünü (*Klebsiella pneumoniae*) ve PCR Blank kullanılmıştır.

En uygun hibridizasyon koşulları sentetik DNA dizileri kullanılarak elde edilmiştir. Bu optimum koşulların saptanmasında temel amaç; prob dizinin karşılığı olan hedef dizi ile tüm bazları hedeften farklı dizi arasındaki farklılanmadır. Hibridizasyon öncesi ve sonrası bütün veriler yüzey karakterizasyonu yöntemine dayanan Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile alınmıştır. EIS sonucunda elde edilen Rct verileri yorumlanıp, uygun optimizasyon koşulları seçilmiştir.

Çalışmanın optimizasyon koşulları; prob konsantrasyonu, hedef konsantrasyonu, hibridizasyon tamponu, yıkama tamponu, prob immobilizasyon süresi, yıkama süresi ve Grafen Oksit modifikasyon süresi parametreleriyle sağlanıp, belirlenmiştir.

Sentetik diziler ile elde edilen tüm optimum koşullar belirlendikten sonra, bu koşullar altında *E. coli*'nin gerçek örnekleri ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri ve sentetik diziler ile elde edilen sonuçların birbirine yakın sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında ilk olarak; nanomateryal modifikasyonunun hassasiyet ve seçiciliğe etkisini incelemek amacıyla grafen modifiye edilmiş ve edilmemiş yüzeylerde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ardından geliştirilen nanogenosensörü

doğrulayıcı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; prob dizinin hedef dizi ve PCR ürününe spesifik olduğunu kanıtlamak için EIS veri sonuçları yorumlanmıştır. Bu veriler sonucunda, prob dizinin hedef dizi ve PCR ürününe spesifik olduğu belirlenmiştir. İkinci olarak da, nanomateriyalin yüzeye bağlandığını kanıtlamak amacıyla Grafen Oksit (GO) ve yalın yüzeylerin SEM görüntüleri değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda, nanomateriyalle zenginleştirilmiş genosensör ile yüzey alanları ve hassasiyetlerini artırmış olan bu yeni nanogenosensörler ile daha düşük tayin, hassas ve güvenilir analizler yapmak mümkün olmaktadır. Mikroçip teknolojilerinin temelini oluşturan elektrokimyasal genosensörler ile kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tanısı için kullanılan diğer yöntemlere göre daha kolay, hızlı ve ucuz yöntemler olduğu belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda, bu nanogenosensörlerle patojenik mikroorganizmaların özellikle klinik analizlere yönelik tanısında kullanılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Afsarimanesh, N., Mukhopadhyay, S. and Kruger, M.,** 2019, Electrochemical Biosensor: Point-of-Care for Early Detection of Bone Loss, *Smart Sensors, Measurement and Instrumentation*, Sydney.
- Akyüz, E.,** 2011, Ürik Asit Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Albayrak, Ö.,** 2018, Escherichia coli ve Klebsiella Pneumoniae İzolatlarında Karbapenem Direnci ve Dirençten Sorumlu Enzimlerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.,** 2002, Molecular Biology of The Cell, *Garland Science*, New York.
- Aras, Z.,** 2010, Mikrobiyolojide Kullanılan Hızlı Tanı Yöntemleri, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104 pp.
- Aslan, T.,** 2019, Sığırlarda Paratüberküloz Hastalığının Serolojik Teşhisinde Laboratuvar Yapımı ELISA Kitinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Ayata, N.,** 2018, Monoklonal Antikor İçeren Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve İn Vitro Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aydın, A. and Sudağıdan, M.,** 2016, Gıda Mikrobiyolojisinde Moleküler Biyolojik Tekniklerin Kullanımı ve Tiplendirme Yöntemleri, *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(1), 1-9 pp.
- Aydın, U.,** 2015, Gaitada Gizli Kan Tanısında Kullanılacak Moleküler Baskılanmış Polimer Tabanlı Hasta Başı Test Kiti İçin Altın Nanopartikül İşaretli Sentetik Hemogloblin Molekülünün Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aykut, U. and Temiz, H.,** 2006, Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59 pp.
- Bahadır, E. and Sezgintürk, M.,** 2015, Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses, *Analytical Biochemistry*, 478, 107-120 pp.
- Baraketi, A., Salmieri, S. and Lacroix, M.,** 2018, Foodborne Pathogens Detection: Persevering Worldwide Challenge, Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens-A Prospective Way for Rapid Analysis, 53-73 pp.
- Bell, C. and Kyriakides, A.,** 2002, Pathogenic E. coli. Foodborne Pathogens: Hazards, risk analysis and control, Blackburn C.W. and McClure, P.J. (eds.), *CRC Press*, New York. 279-306 pp.
- Bhalla, N., Pawan , J., Formisano, N. and Estrela, P.,** 2016, Introduction to biosensors, *Essays in Biochemistry*, 60, 1-8 pp.
- Biyoloji Portalı,** <http://www.biyolojiportali.com/konu-anlatimi/11/8/Nukleik-Asitlerin-Cesitleri-ve-Yapisi>, (Erişim Tarihi; 15 Mart 2019)
- Blackburn, C. and McClure, P.,** 2002, Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control, *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge.
- Bosterbio,** <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-fundamental-review>, (Erişim Tarihi: 16 Mart 2019)
- Boumya, W., Laghrib, F., Lahrich, S., Farahi, A., Achak , M., Bakasse, M. and El Mhammedi.,** 2017, Electrochemical Impedance Spectroscopy Measurements for Determination of Derivatized Aldehydes in Several Matrices, *Heliyon*, 3(10), 2405-8440 pp.
- Brock, J.,** 2017, Electrochemical Impedance Spectroscopy Methods, *Analysis and Research* , New York.
- Campbell, N. and Reece, J.,** 2010, Biyoloji, Ankara, *Palme Yayınevi*.
- Canlı Bilimi,** <https://www.canlibilimi.com/nukleotitlerin-yapisi-nasildir/>, (Erişim Tarihi: 18 Mart 2019)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ceci, P., Chiancone, E., Kasyutich, O., Bellapadrona, G., Castelli, L., Fittipaldi, M., Gatteschi, D., Innocenti, C. and Sangregorio C.,** 2010, Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles in *Listeria innocua* Dps (DNABinding Protein from Starved Cells): A Study with the Wild-Type Protein and a Catalytic Centre Mutant, *Chem. Eur. J.*, 16, 709-717.
- Celep, Ş.,** 2007, Nanoteknoloji ve Tekstilde Uygulama Alanları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Chambers, J., Arulanandam, B., Matta, L., Weis, A. and Valdes, J.,** 2008, Biosensor Recognition Elements, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10, 1-12 pp.
- Chaplin, M. and Bucke, C.,** 1990, Biosensors: Enzyme Technologies, *Cambridge University Press*, 197-220 pp.
- Choudhary, A. and Kailash.,** 2015, Biosensor based on piezoelectric crystal Probe, *Advances in Applied Science Research*, 6(8), 91-95 pp.
- Ciucci, F.,** 2019, Modeling Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Current Opinion in Electrochemistry*, 13, 132-139 pp.
- Congur, G., Eksin, E. and Erdem, A.,** 2018, Impedimetric detection of miRNA-34a using graphene oxide modified chemically activated graphite electrodes, *Sensors and Actuators A*, 279, 493-500 pp.
- Cooper, G. and Hausman, R.,** 2007, The Cell A Molecular Approach, Sinauer Associates, Inc., Washington.
- Coulet, P. R.,** "What is a Biosensor?", Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Editörler; L.J. Blum, P.R. Coulet, (1991), Marcel Dekker Inc., New York, 1-6 pp.
- Cummings, C., Branch, J., Richardson, P. and Bartlett, P.,** 2016, A reference electrode for use in supercritical difluoromethane, *Electrochimica Acta*, 187, 323-328 pp.
- Çakır, İ. ve Çakmakçı, M.,** 2005, Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(12), 1-7 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çakır, O.,** 2017, Pestisit Tayini İçin Moleküler Baskılama Temelli Yüzey Plazmon Rezonans ve Kristal Mikroterazi Sensörlerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Çalış, A.,** 2012, Gıdalarda ve Çevre Sularında Patojenik Bakterilerin (E. coli) Tanısı İçin Nanopartikül Esaslı Tanı Kitleri ve Süspansiyon Arraylerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara.
- Çavuş, H.,** 2017, ‘‘Polimeraz Zincir Reaksiyonu Nedir Ve Nasıl Yapılır?’’ <http://molekulerbiyolojiyegenetik.org/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-ve-nasil-yapilir/> (Erişim Tarihi: 9 Temmuz 2019)
- Çavuşoğlu, Z.,** 2012, Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarından Elde Edilen Bakteriyofajlarda Bulunan SCIN, CHIPS, SEI, SEK Toksin Genlerinin Varlığının PZR ve Southern Blot Yöntemi ile Kıyaslanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Çetintaş, G.,** 2013, p-aminofenol Tayini İçin Duyarlı Grafen Bazlı Elektrokimyasal Sensör, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Çokay, B.,** 2011, FISH ve Standart Mikrobiyolojik Yöntemlerle Gıda ve Sulardaki Önemli Bakterilerin Belirlenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Delong, R. and Zhou, Q.,** 2015, Introductory Experiments on Biomolecules and Their Interactions, *Academic Press*. United States.
- D'Souza, S.,** 2001, Microbial Biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 337-353 pp.
- Dwivedi, H. and Jaykus, L.-A.,** 2011, Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions, *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 40-63 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fan, X., White, I., Shopova, S. and Zhu, H.,** 2008, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620, 8-26 pp.
- Frasco, M. and Chaniotakis, N.,** 2009, Semiconductor Quantum Dots in Chemical Sensors and Biosensors, *Sensors*, 9, 7266-7286 pp.
- Fratamico, P. and Smith, J.,** 2005, Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology, *Caister Academic Press*, 12(12), Norwich, England.
- Garcia, M.,** 2009, Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 27-33 pp.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby.,** Immunology, 2000, USA. W.
- Göktürk, I. ve Denizli, A.,** 2018, Nanobiyosensörler: Hastalık Teşhisi İçin Gelecek Vaat Ediyor Mu?, *Bioreg Bilim*, 33-40 pp.
- Göpel, W. and Heiduschka, P.,** 1995, Interface analysis in biosensor design, *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9-10), 853-883 pp.
- Göver, T.,** 2011, 6-(Ferrosenil) Hegzantiyol'un Altın Elektrot Yüzeyindeki Elektrokimyasal Etkisinin ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. and Reimhult, E.,** 2008, Electrochemical Biosensors- Sensor Principles and. *Sensors*, 8, 1400-1458 pp.
- Grumezescu, A.,** 2017, Nanobiosensors, *Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, Bucharest.
- Hall, E.,** 1990, Biosensors, Chapter 1: Biosensors in context, Open University Press, United Kingdom.
- Halkman, K. ve Tunail, N.,** 2000, İzolasyon ve İdentifikasyon. K. Halkman içinde, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara: *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Sim Matbaası*, 1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halliwell, J., Savage, A., Buckley, N. and Gwenin, C.,** 2014, Electrochemical Impedance Spectroscopy Biosensor for Detection of Active Botulinum Neurotoxin, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2, 12-15 pp.
- Higson, S.,** 2012, Biosensors for medical applications, *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge.
- Holzinger, M., Goff, A. and Cosnier, S.,** 2014, Nanomaterials for biosensing applications : A Review, *Frontiers in Chemistry*, 2(63), 1-10 pp.
- Homola, J.,** 2003, Present and Future of Surface Plasmon Resonance Biosensors, *Anal Bioanal Chem*, 377, 528–539 pp.
- Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M. and Martinez-Chapa, S.,** 2018, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z, *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, Hyderabad.
- Isin, D., Eksin, E. and Erdem, A.,** 2017, Graphene oxide modified single-use electrodes and their application for voltammetric miRNA analysis, *Materials Science and Engineering C*, 75, 1242–1249 pp.
- Kara, P.,** 2007, Klinik Tanıya Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı, Doktora Tezi, EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kara, P., Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A. and Ozsoz, M.,** 2002, DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as the electrochemical hybridization label, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(8), 710-716pp.
- Kara, P., Yikmaz, O., Kilickaya, O. and Ozsoz, M.,** 2016, Effect of Surface Chemistry Method in Electrochemical Genosensing for Optimum Detection of Pathogens, *Journal of The Electrochemical Society*, 163(7), 293-299 pp.
- Karunakaran, C., Bhargava, K. and Benjamin, R.,** 2015, Biosensors and Bioelectronics, *Elsevier*, Amsterdam.
- Kenar, L.,** 2010, The Use of Biosensors for the Detection of Chemical and Biological Weapons, *Turkish Journal of Biochemistry*, 35(1): 72-74 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kerman, K., Kobayashi, M. and Tamiya, E.,** 2004, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology, *Measurement Science and Technology*, 15, 1-11 pp.
- Kimmel, D., LeBlanck, G., Meschievitz, M. and Cliffl, D.,** 2011, Electrochemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 84, 685-707 pp.
- Koczula, K. and Gallotta, A.,** 2016, Lateral Flow Assays, *Essays in Biochemistry*, 60, 111–120 pp.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K. and Zoric, N.,** 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125 pp.
- Lazcka, O., Campo, F. and Munoz, F.,** 2007, Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1205-1217 pp.
- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.,** 2006, Microbial Biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 568, 200-210.
- Lewin, B.,** 2004, Genes VIII. United States, *Prentice Hall*.
- Li, S., Singh, J., Li, H. and Banerjee, I.,** 2011, Biosensor Nanomaterials, *Wiley-VCH*, Weinheim, Germany.
- Lisdat, F. and Schafer, S.,** 2008, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Springer-Verlag*, 391, 1555-1557 pp.
- Liu, Z. and Su, X.,** 2017, A novel fluorescent DNA sensor for ultrasensitive detection of *Helicobacter pylori*, *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 66-72 pp.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. and Martin, K.,** 2018, Molecular Cell Biology, *W. H. Freeman and Company*, New York.
- Lowe, C.R.,** 2007, Overview of Biosensor and Bioarray Technologies, *Handbook of Biosensors and Biochips*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Madigan, M. and Martinko, J.**, 2010, Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Ankara, *Palme Yayınevi*.
- Malhotra, S., Verma, A., Tyagi, N. and Kumar, V.**, 2017, Biosensors: Principle, Types and Applications, *IJARIE-ISSN*, 3(2), 2395-4396 pp.
- Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, JM., Young, MM. and Luong, JH.**, 2000, Fiber-Optic Biosensors, *Trends and Advances Anal Sci*, 16(7), 677–692 pp.
- Mikkelsen, S. R.**, 1996, Electrochemical Biosensors for DNA Sequence Detection, *Electroanalysis*, 8 (1), 15-19 pp.
- Moina, C. and Ybarra, G.**, 2012, Fundamentals and Applications of Immunosensors, Argentine Republic: Advances In Immunoassay Technology.
- Mol, N. and Fischer, M.**, 2010, Surface Plasmon Resonance Methods and Protocols, *Springer*, Netherlands.
- Monosik, R., Stred'ansky, M. and Sturdik, E.**, 2012, Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26, 22-34 pp.
- Monosik, R., Stredansky, M. and Sturdik, E.**, 2012, Biosensors — classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109-120 pp.
- Morales-Narvaez, E., Hassan, A.R. and Merkoçi, A.**, 2013, Graphene Oxide as a Pathogen-Revealing Agent: Sensing with a Digital-Like Response, *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 13779 –13783 pp.
- Murray, P.**, 2003, Manuel of Clinical Microbiology, Edit: Baron, E., Pfaller, M.A., Jargensen, J.H., Tenover, R.H., ASM Press, Eighth Edition, Washington, 1055-1056 pp.
- Muyo Öner, M.**, 2013, Biyomoleküllerin Elektrokimyasal Biyosensörler İle Algılanması, Yüksek Lisans Tezi, EU Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nagar, B., Balsells, M., Escosura-Muñiza, A., Gomez-Romero, P. and Merkoçi, A.,** 2018, Fully Printed One-Step Biosensing Device Using Graphene/AuNPs Composite, *Biosensors and Bioelectronics*, 1-23 pp.
- Nayır, A.,** 1998, Üriner infeksiyonlara zemin hazırlayan faktörler, *ANKEM Derg.* 12(3), 294-297 pp.
- Nguyen, H., Lee, S., Lee, U. and Fermin, C.,** 2019, Immobilized Enzymes in Biosensor Applications, *Materials*, 12(121), 1-34 pp.
- Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi,** 2006, 4(5), 6–10 pp.
- Osteryoung J.,** 1993, Voltammetry for the future, *Accounts of Chemical Research*, 26, 77-83 pp.
- Pattnaik, P.,** 2005, Surface Plasmon Resonance, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126, 0273-2289 pp.
- Perumal, V. and Hashim, U.,** 2014, Advances in biosensors: principle, architecture and applications, *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1-15 pp.
- Pividori, M., Merkoçi, A. and Alegret, S.,** 2000, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 291-303.
- Pohanka, M.,** 2017, The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications: A Review, *International Journal of Electrochemical Science*, 12, 496-506 pp.
- Pokpas, K., Zbeda, S., Jahed, N., Mohamed, N., Baker, P. and Iwuoha, E.,** 2014, Electrochemically Reduced Graphene Oxide Pencil-Graphite in situ Plated Bismuth-film Electrode for the Determination of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry, *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 736-759 pp.
- Posthuma-Trumpie, G., Korf, J. and Amerongen, A.,** 2009, Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats: A literature survey, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 569-582 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pumera, M.**, 2010, Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry, *Chemical Society Reviews*, 39, 4146–4157 pp.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D. and Chapman, J.**, 2019, A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms, *The Royal Society of Chemistry*, 144, 396-411 pp.
- Ramanathan, K., Khayyami, M. and Danielsson, B.**, 1998, Enzyme Biosensors Based on Thermal Transducer/Thermistor. A. Mulchandani, & K. Rogers, Enzyme and Microbial Biosensors Techniques and Protocols (s. 175-186) Totowa: *Methods in Biotechnology*.
- Raven, P., Johnson, G., Mason, K., Loson, J. and Singer, S.**, 2017, Biology, *McGraw-Hill Education*, New York.
- Roy, S., Soin, N., Bajpai, R., Misra, D.S., McLaughlin J.A. and Roy, S.S.**, 2011, Graphene oxide for electrochemical sensing applications, *Journal of Material Chemistry*, 21, 14725-14731 pp.
- Sam, S., Touahir, L., Andresa, J.S., Allongue, P, J.N. Chazalviel, Gouget-Laemmel, A.C., Villeneuve, C.H., Morailon, A., Ozanam, F., Gabouze, N. and Djebbar, S.**, 2010, Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces, *Langmuir*, 26, 809–814 pp.
- Sassolas, A., Blum, L. and Leca-Bouvier, B.**, 2012, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 30, 489-511 pp.
- Sekmen, E.**, 2019, Bazı metal nanopartiküllerin çeşitli biyoekstreler ile yeşil sentezi, karakterizasyonu ve grafit elektrot modifikasyonunda kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Snustad, D. and Simmons, M.**, 2008, Principles of Genetics, *Hoboken: John Wiley & Sons*, Inc.
- Somma M, and Querci M.**, 2006, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, *World Health Organization*, 9-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taniselass, S., Md Arshad, M. and Gopinath, S.,** 2019, Graphene-based electrochemical biosensors for monitoring noncommunicable disease biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 276-292 pp.
- Temiz, A.,** 2000, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, *Hatipoğlu Yayınevi*, Ankara.
- Thakur, M. and Ragavan, K.,** 2013, Biosensors in food processing, *Association of Food Scientists & Technologists*, 50(4), 625-641 pp.
- Tiwari, A. and Turner, A.,** 2014, Biosensors of Nanotechnology, *Wiley*, Sweden.
- Torrinha, Á., Amorim, C., Montenegro, M. and Araújo, A.,** 2018, Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, 190, 235-247 pp.
- Torun, Ö.,** 2011, Gıda Örneklerinde ve Sularda Escherichia coli Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Tunç, S.,** 2017, DNA Hasarı Tayini İçin Grafene Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Turan, E.,** 2018, Karbon Nanotüp Katkılı DNA Biyosensörü Tasarımı ve Metilen Mavisi ile Ölçüm Yönteminin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Tüylek, Z.,** 2017, Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim, *BEU Journal of Science*, 6(2), 71-80 pp.
- Uçar, G., Yörük, N. and Güner, A.,** 2015, Escherichia coli Enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 1(3), 22-9 pp.
- Umesha, S. and Manukumar, H.,** 2018, Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 84-104 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uslu, B. and Özkan, S.,** 2011, Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: A review of recent trends and developments, *Analytical Letters*, 44, 2644-2702 pp.
- Uygun, Z. and Ertuğrul Uygun, H.,** 2014, A short foodnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 448-453 pp.
- Wang, J.,** 2006, Analytical Electrochemistry, *Wiley-VCH*, Canada.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D. and Valera, F.S.,** 1997, *Anal. Chim. Acta*, 337, 41
- Wang, Z. and Dai, Z.,** 2015, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview, *Royal Society of Chemistry*, 7, 6420–6431 pp.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Actor, J. and Dasgupta, A.,** 2017, Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: A Comprehensive Review for Board Preparation, *Certification and Clinical Practice*, Cambridge.
- Wu, X., Chen, J., Wu, M. and Zhao, J.,** 2015, Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy, *Theranostics*, 5(4), 322-344 pp.
- Wu, X., Mu, F., Wang, Y. and Zhao, H.,** 2018, Graphene and Graphene-Based Nanomaterials for DNA Detection: A Review, *Molecules*, 23(2050), 2-23 pp.
- Xu, Y., Cheng, G., He, P. and Fang, Y.,** 2009, A Review: Electrochemical Aptasensors with Various Detection Strategies, *Electroanalysis*, 21(11), 1251-1259 pp.
- Yakovleva, M., Bhand, S. and Danielsson, B.,** 2013, The enzyme thermistor- A realistic biosensor concept A critical review, *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yeh, Y.-C., Creran, B. and Rotello, V.**, 2012, Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology, *National Institutes of Health*, 4(6), 1871–1880 pp.
- Yıldırım, K. Ö., Gökalp, F. D. and Kanev, M.**, 2015, In situ Hibridizasyon Yöntemleri, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3, 613-621 pp.
- Yılmaz, S.**, 2016, Uygulama Örnekleriyle Elektroanalitik Kimya, *Gazi Kitabevi*, 4. baskı, Ankara.
- Yi-Xian, W., Zun-Zhong, Y., Cheng-Yan, S. and Yi-Bin, Y.**, 2012, Application of Aptamer Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microorganisms, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(4), 634-642 pp.
- Yoo, S. and Lee, S.**, 2016, Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms, *Trends in Biotechnology*, 32(1), 7-25 pp.
- Yüce, M.**, 2011, Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Zeng, Y., Zhu, Z. and Lin, Y.**, 2016, Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 781, 147-154 pp.
- Zhang, X., Wu, D., Zhou, X., Yu, Y., Liu, J., Hu, N. and Wu, Y.**, 2019, Recent progress in the construction of nanozyme-based biosensors and their applications to food safety assay, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121115-668 pp.
- Zhao, X., Lin, C.-W., Wang, J. and Oh, D.**, 2014, Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens, *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297-312 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zourob, M., Elwary, S. and Turner, A., 2008, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, Springer Science+Business Media, New York.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğum her konuda benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarına bulundukları değerli katkılarından dolayı; Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ'a ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fatma Nil ERTAŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmam süresince dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen, laboratuvarında geçirdiğim zamanları keyifli hale getiren çalışma arkadaşlarım Ezgi KIVRAK'a, Hande DURUSÖZ'e ve İrem AYDIN KIRLANGIÇ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek, sevgi ve sabırlarıyla her zaman yanımda olan değerli ailem annem Ümit YÜKSEL'e ve babam Yusuf YÜKSEL'e teşekkür ederim. Yüksek lisans süreci ve hayatım boyunca her zaman destek gösteren ablam Dr. İnci YÜKSEL ERGÜN'e teşekkür ederim.

26/ 12/ 2019



Sezin YÜKSEL

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 8 Nisan 1991

Yabancı Dil: İngilizce

E-mail: sezinyuksel91@gmail.com

Lisans Eğitimi: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2016)

Kongre/Sempozyum Bildirileri

1. Kıvrak E., Bozkurt B., Durmaz-Armağan G., **Yüksel S.**, Ünver-Somer N., Kara P., “Electrochemical Detection of Isoquinolines In Human Serum and Urine Samples”, XII International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Poster presentation, Ankara, Türkiye (Haziran, 2018)
2. **Yüksel S.**, Aydın-Kırlangıç İ., Ertaş F. N., Yılmaz F. F., Kara P., “Patojenik Mikroorganizmaların Tanısına Yönelik Elektrokimyasal Nanobiyosensör Tasarımı”, 31. Ulusal Kimya Kongresi, Poster Sunumu, İstanbul, Türkiye (Eylül, 2019)