



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GRAFEN OKSİT MODİFİYE ELEKTROTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE VOLTAMETRİK miRNA
TAYİNİNE YÖNELİK UYGULAMALARI**

Deniz IŞIN

Tez Danışmanı : K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 27.10.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GRAFEN OKSİT MODİFİYE ELEKTROTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE VOLTAMETRİK miRNA
TAYİNİNE YÖNELİK UYGULAMALARI**

Deniz IŞIN

Tez Danışmanı: K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 27.10.2017

Bornova-İZMİR

2017

Deniz IŞIN tarafından **yüksek lisans tezi** olarak sunulan “**Grafen Oksit Modifiye Elektrotların Geliştirilmesi ve Voltametrik miRNA Tayinine Yönelik Uygulamaları**” 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 27.10.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

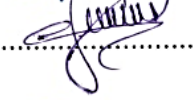
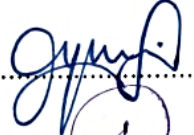
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Raportör Üye : Prof. Dr. Sevil İRİŞLİ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emel SOKULLU

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“GRAFEN OKSİT MODİFİYE ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE VOLTAMETRİK miRNA TAYİNİNE YÖNELİK UYGULAMALARI”** 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.

27/10/2017



Deniz IŞIN

ÖZET**GRAFEN OKSİT MODİFİYE ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE
VOLTAMETRİK miRNA TAYİNİNE YÖNELİK UYGULAMALARI**

IŞIN, Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Ekim 2017, 105 sayfa

mikroRNA'lar (miRNA), 19-25 nükleotit uzunluğundaki RNA dizileridir. miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimler, insan sağlığını tehdit eden kanser, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle miRNA'ların kısa sürede, duyarlı ve seçimli bir şekilde analizini yapabilen, aynı zamanda kullanımı pratik, hazırlanışı kolay, minyatürize edilebilmeye uygun biyosensör platformlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Grafen, sp^2 hibritleşmesine sahip karbon atomlarının bal peteği örgüsü oluşturmasıyla meydana gelen iki boyutlu düzlemsel yapıdaki nanomalzemedir. Yakın bir geçmişte keşfedilen grafen; kusursuz fiziksel, kimyasal, elektriksel, termal ve optik özelliklere sahiptir. Grafen oksit (GO), kimyasal gruplarca aktif grafenin büyük kapasiteyle ve en ucuz şekilde üretilebildiği formudur. Geniş yüzey alanı sunduğundan modifiye edildiği yüzeyin immobilizasyon ve adsorpsiyon kapasitesini artırır.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz GO modifiye tek kullanımlık voltametrik temelli biyosensörler ile seçimli ve duyarlı bir şekilde elektrokimyasal miRNA analizleri yapılmıştır. Bu kapsamda kullan-at tipi elektrot olan kalem ucu grafit (PGE) yüzeyler GO ile modifiye edildikten sonra, analiz platformu olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada hedef miRNA dizisi olarak seçtiğimiz Alzheimer ile ilişkilendirilen miRNA-34a'ya spesifik DNA probu ve hedef miRNA-34a dizisi arasında gerçekleştirilen DNA-miRNA hibridizasyonu, voltametrik yöntemle

tain edilmiştir. GO modifiye PGE yüzeyi taramalı elektron mikroskopisi (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri (CV) teknikleri ile karakterize edilmiştir. miRNA tayinine yönelik geliştirilen GO modifiye biyosensör tasarımı, GO konsantrasyonu, DNA prob konsantrasyonu, hedef miRNA konsantrasyonundaki değişimin yanıt etkisi incelenmiş, deneysel koşullar optimize edilmiş ve optimum koşullarda miRNA-34a'ya spesifik biyosensörün seçimliliği test edilmiştir.

Geliştirdiğimiz elektrokimyasal biyosensörler, PGE'lerin kullanımının kolay olması, GO ile PGE yüzeyinin modifikasyonunun kısa zamanda ve ekstra kimyasal madde kullanımını gerektirmeden yapılabilmesi açısından önemli avantajlara sahiptir. Çalışmamızda herhangi bir elektrokimyasal indikatöre gerek kalmaksızın hedef miRNA'nın seçimli ve duyarlı bir şekilde voltametrik yöntemle dayalı analizini mümkün kılan GO modifiye elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Grafen oksit, Kalem grafit elektrot, miRNA, nükleik asit hibridizasyonu, elektrokimyasal biyosensörler.

ABSTRACT**THE DEVELOPMENT OF GRAPHENE OXIDE MODIFIED
ELECTRODES AND ITS APPLICATION TO VOLTAMETRIC
DETECTION OF miRNA**

IŞIN, Deniz

MSc in Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

October 2017, 105 pages

microRNAs (miRNA) are small RNA molecules, that contains 19-25 nucleotides. The abnormal expression of miRNA causes different type of cancer and neurodegenerative diseases such as Alzheimer, and metabolic diseases as diabetes. Therefore, the studies have been performed in order to investigate practical, easy-to-prepare, miniaturize biosensor platforms which can detect miRNAs rapidly, sensitively and selectively.

Graphene is a crystalline allotrope of carbon with 2-dimensional properties. Graphene was discovered in the recent past and it has perfect physical, chemical, electrical, thermal and optic properties. Graphene oxide (GO) is a form of chemically active graphene that can be produced cost effectively. Due to its large surface area, GO also increases the immobilization and adsorption capacity of the surfaces.

GO modified disposable electrodes were used in our study for sensitive and selective voltametric detection of miRNAs. Disposable pencil graphite electrode (PGE) surfaces were modified by GO and used as a platform for analyzing of miRNA. The detection of specific recognition of miRNA-34a, which has been related to Alzheimer disease, was performed according to DNA-RNA hybridization by using GO-PGEs. The characterization of the GO-PGEs was investigated by using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV), and scanning electron microscopy (SEM) techniques. The

effect of the changes at GO concentration, DNA probe concentration, miRNA-34a concentration upon to biosensor response on detection of hybridization between miRNA-34a target and its complementary DNA probe was explored and optimized, and then, the selectivity of miRNA-34a biosensor was tested under the optimum conditions.

GO-PGEs were developed in our study that presented important advantages such as, being cost-effective, easy to use without requiring any extra chemicals, and surface modification in a short time. In this study selective and sensitive GO modified electrochemical biosensor was developed for miRNA analysis by using voltametric techniques without using any electrochemical indicator.

Keywords: Graphene oxide, pencil graphite electrode, miRNA, nucleic acid hybridization, electrochemical biosensor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, yanında çalışmaktan onur duyduğum, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'a,

Tez çalışmalarımda araştırma desteği sağlayan ve bursiyeri olduğum 115Z099 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında TÜBİTAK kurumuna ve 16/FBE/011 no'lu proje kapsamında *Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP)* sağladıkları maddi ve manevi destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma ve her başarımda şüphesiz en büyük katkıyı sağlayan, beni her zaman motive eden aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir

Deniz Işın
27.10.2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xxii
ŞEMA DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Elektrokimya.....	3
2.1.1 Elektrokimyasal tabakalar	3
2.1.2 Voltametri ve esasları	4
2.1.3 Polarografi	12
2.1.4 Voltametrik teknikler.....	13
2.1.5 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)	17
2.2 Biyosensörler	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.1 İdeal bir biyosensörde olması gereken özellikler.....	19
2.2.2 Nükleik asitler	21
2.3 Nükleik Asit Biyosensörleri.....	26
2.3.1 Elektrokimyasal nükleik asit biyosensörlerinin tasarımında kullanılan nanomalzemeler	34
2.4 Grafen ve Grafen Türevi Nanomalzemeler.....	36
2.4.1 Grafen oksit.....	38
2.4.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1 Kullanılan Cihazlar	46
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.3 Kullanılan Malzemelerin ve Çözeltilerin Hazırlanışı	49
3.3.1 Tampon çözeltilerin hazırlanışı.....	49
3.3.2 Kullanılan grafit elektrodun (PGE) hazırlanışı	50
3.3.3 Kalem grafit elektrot modifikasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	50
3.3.4 miRNA dizilerinin hazırlanışı.....	50

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.5 GO modifiye edilmiş PGE'lerin hazırlanışı	50
3.3.6 Farklı GO konsantrasyonlarının elektrokimyasal dönüşümlü voltametri (CV) yöntemiyle incelenmesi.....	51
3.3.7 PGE ve GO-PGE'lerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskobik karakterizasyonu	51
3.3.8 PGE, CA-PGE ve CA-GO-PGE'lerin CV yöntemiyle karakterizasyonu.....	52
3.3.9 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'lerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterizasyonu.....	52
3.3.10 miRNA-34a hibridizasyonunun voltametrik tayinine yönelik çalışmalar	52
4. BULGULAR.....	56
4.1 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'nin Mikroskobik ve Elektrokimyasal Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular	56
4.2 GO Konsantrasyonundaki Değişimin Elektrot Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	59
4.3 miRNA-34a Hibridizasyonunun Geliştirdiğimiz GO Modifiye Biyosensör ile Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular	61
4.3.1 miRNA-34a DNA prob konsantrasyonundaki değişimin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular	61

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.2 Farklı prob immobilizasyon süresinin yanıt etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular.....	62
4.3.3 Farklı hibridizasyon sürelerinde gerçekleştirilen miRNA-34a hibridizasyonunun yanıt etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular.....	63
4.3.4 Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-34a hibridizasyonunun yanıt etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular.....	64
4.3.5 Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında hibridizasyonun farklı sürelerde gerçekleştirilmesinin yanıt etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular.....	66
4.3.6 Geliştirdiğimiz GO modifiye biyosensörün miRNA-34a dizisine seçimliliğinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular	67
5. TARTIŞMA	69
5.1 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'nin Mikroskobik ve Elektrokimyasal Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma.....	69
5.2 GO Konsantrasyonundaki Değişimin Elektrot Yanıtına Etkisinin Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma	69
5.3 miRNA-34a Hibridizasyonunun Geliştirdiğimiz GO Modifiye Biyosensörün Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma.....	71

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.3.1 miRNA-34a DNA prob konsantrasyonundaki değişimin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	71
5.3.2 Farklı prob immobilizasyon süresinin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	71
5.3.3 Farklı hibridizasyon sürelerinde gerçekleştirilen miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	72
5.3.4 Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	72
5.3.5 Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında hibridizasyonun farklı sürelerde gerçekleştirilmesinin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	73
5.3.6 Geliştirdiğimiz GO modifiye biyosensörün miRNA-34a dizisine seçimliliğinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	73
6. SONUÇLAR	75
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	81
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Üçlü elektrot sistemi	3
2.2 Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	5
2.3 Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) Camsı karbon elektrot (GCE), (C) kalem grafit elektrot (PGE), (D) perde baskılı elektrot (SPE)	6
2.4 (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi.	14
2.5 Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.	16
2.6 Bir elektrokimyasal hücrede empedimetrik ölçüm sonucu oluşan Nyquist eğrisi.	18
2.7 Biyosensörlerin yapısı.....	19
2.8 Pürin ve pirimidin bazlarının yapısı.....	22
2.9 DNA'nın yapısı	23
2.10 DNA ve PNA'nın kimyasal formülü	25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
2.11 RNA ve LNA'nın kimyasal formülü	26
4.1 (a,b) PGE, (c,d) CA-PGE, (e,f) GO-PGE, (g,h) CA-GO-PGE'lerin sırasıyla 10 µm ve 1 µm ölçeklerde SEM görüntüleri	57
4.2 (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) GO-PGE, (d) CA-GO-PGE'nin elektrokimyasal davranışını gösteren dönüşümlü voltamogramlar. (B) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) GO-PGE, (d) CA-GO-PGE ile elde edilen 2 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} ye ait ortalama yükseltgenme sinyalinin gösteren histogramlar (n=3).....	58
4.3 (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-GO-PGE'ye ait 2,5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren redoks çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen ölçümlere ait (A) Niquist eğrileri, (B) histogramlar (n=3). İç şekil: Empedans verilerini düzenlemede kullanılan eşdeğer devre modeli. İlgili parametreler; R _s çözelti direncidir. Sabit faz elementi (Q), elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki boşluk yük kapasitansına bağlıdır. R _{ct} ise elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer direncidir. Sabit faz element W, elektrot yüzeyinde kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.	59
4.4 (A) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-PGE üzerine 200 µg/mL GO modifikasyonu sonrası, (B) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-PGE üzerine 400 µg/mL GO modifikasyonu sonrası, (C) (a) PGE, (b) CA- PGE, (c) CA-PGE üzerine 600 µg/mL GO modifikasyonu sonrası elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.....	60
4.5 Sonikasyon öncesi (a) 200, (b) 400, (c) 600 µg/mL ve 1 saat sonikasyondan sonra (a') 200, (b') 400, (c') 600 µg/mL GO çözeltilerinin elde edilen fotoğrafları	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.6 (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-GO-PGE, 5 µg/mL miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş (d) CA-PGE ve (e) CA-GO-PGE; 10 µg/mL miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş (f) CA-PGE ve (g) CA-GO-PGE; 15 µg/mL miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş (h) CA-PGE ve (i) CA-GO-PGE yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram.....62
- 4.7 (a) CA-GO-PGE, (b) 5 dakika (c) 15 dakika, (d) 30 dakika, (e) 45 dakika, (f) 60 dakika, (g) 90 dakika süreyle elektrot yüzeyine immobilize edilmiş 10 µg/mL miRNA-34a DNA prob varlığında ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram.....63
- 4.8 (a) 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile 20 µg/mL hedef miRNA-34a'nın (b) 15 dakika, (c) 30 dakika, (d) 60 dakika hibridizasyonu sonucu ölçülen ortalama guanin yükseltgenme sinyalini gösteren histogram.....64
- 4.9 (a) 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile (b) 5 µg/mL, (c) 10 µg/mL, (d) 15 µg/mL, (e) 20 µg/mL, (f) 25 µg/mL, (g) 30 µg/mL, (h) 35 µg/mL, (i) 40 µg/mL hedef miRNA-34a'nın hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyali (A) voltamogram ve (B) histogramı. İç şekil: kalibrasyon grafiği.....65

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.10 (a) CA-GO-PGE, (b) 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a prob ile 35 µg/mL hedef miRNA-34a'nın (c) 15 dakika, (d) 30 dakika, (e) 60 dakika hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyali (A) voltamogram ve (B) histogramı 66
- 4.11 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a DNA probu ile 35 µg/mL (a) hedef miRNA-34a (b) miRNA-16, (c) miRNA-155, (d) miRNA-15a, (e) miRNA-660 hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram 67
- 4.12 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a DNA probu ile 35 µg/mL (a) miRNA-34a ile miRNA-16, (b) miRNA-34a ile miRNA-155, (c) miRNA-34a ile miRNA-15a, (d) miRNA-34a ile miRNA-660 dizilerinin 1:1 karışımı varlığında gerçekleştirilen hibridizasyon sonucu ölçülen yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram 68

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 miRNA tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri.....	29
2.2 Nükleik asit analizlerine yönelik grafen temelli geliştirilmiş biyosensörler.....	41
4.1 PGE, CA ile aktive edilmiş PGE, 400 µg/mL GO ile modifiye edilmiş PGE'ye ve 400 µg/mL GO ile modifiye edilmiş CA-PGE'ye ait ortalama anodik akım değerlerini (I_a) ve yük geçişleri (Q^+) (n=3) ile hesaplanan yüzey alan değerleri (A).	58
6.1. Literatürdeki bazı GO modifiye elektrokimyasal biyosensörlerin kıyaslanması	79

ŞEMA DİZİNİŞemaSayfa

3.1. PGE yüzeyinin CA ile aktivasyonu, CA-PGE yüzeyine GO modifikasyonu, DNA probun CA-GO-PGE yüzeyine modifikasyonu, elektrot yüzeyinde DNA prob ile miRNA-34a hedef dizi arasında hibridizasyon	53
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μg	mikrogram
μL	mikrolitre
mL	mililitre
μM	mikromolar
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
<u>Kısaltmalar</u>	
PGE	Kalem grafit elektrot
CPE	Karbon pasta elektrot
SPE	Perde baskılı elektrot
GCE	Camsı karbon elektrot
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp

1. GİRİŞ

20. yüzyılda Richard Feynman'ın *nanomalzeme* tanımını yapmasıyla birlikte, nanomalzemelere dayalı yeni bir bilim çağı başlamıştır. Üstün fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğu keşfedilen ve nanopartiküllerle başlayan bu dönemde fullerenler, nanotüpler, nanoçubuklar ve nanokablolar gibi pek çok farklı formda nanomalzeme sentezlenerek fiziksel ve kimyasal yapıları anlaşılmaya çalışılmış, nanomalzemeler elektronikten savunma sanayisine kadar oldukça geniş bir alanda yer edinmişlerdir (Wang, 2005; Erdem, 2007; Willner and Willner, 2010; Marin and Merkoçi, 2012).

Grafen, sp^2 hibritleşmesine sahip karbon atomlarının bal peteği örgüsü oluşturmasıyla meydana gelen iki boyutlu düzlemsel bir yapıdaki bir nanomalzemedir (Geim and Novoselov, 2007; Bonanni et al., 2012). Üç boyutlu yapıdaki karbon nanotüpler ve fullerenin sentez mekanizması 1960'lı yıllarda anlaşılabilmişken, grafitin tek katmanlı hali olan grafen 2004 yılına kadar sentezlenememiştir. İki boyutlu grafen malzemesine ilişkin çığır açan çalışmalarına yönelik "2010 Nobel Fizik Ödülü", Andre Geim ve Konstantin Novoselov'a verilmiştir.

Biyosensörler, analite spesifik olarak tasarlanmış bir algılama elementi sayesinde hedef analiti algılayabilen ve bu algıyı okunabilir bir sinyale dönüştürebilen analitik cihazlardır. Protein, toksin, ilaç veya nükleik asit gibi farklı biyokimyasal yapıdaki analit; enzim-substrat, antijen-antikor, avidin-biotin gibi spesifik ve seçimli etkileşim mekanizmaları ile algılanabileceği gibi; DNA ve RNA gibi nükleik asit formları ile de algılanabilir. Algılayıcı reseptör olarak nükleik asitler kullanılarak tasarlanan biyosensörler, *nükleik asit biyosensörleri* olarak tanımlanmakta ve oldukça özel bir başlık altında incelenmektedir. Nükleik asit biyosensörleri; kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tayininde, ilaç ve protein gibi (biyo)moleküller ile nükleik asit etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasında, toksin ve patojenlerin tayininde kullanılmaktadırlar. Bir nükleik asit olan algılama elementi ile analitin algılanması ve bu algının elektrokimyasal yöntemlerle okunabilir bir sinyale dönüştürülmesi sonucunda *elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri* tasarlanmış olur (Palecek and Bartosik, 2012). Elektrokimyasal

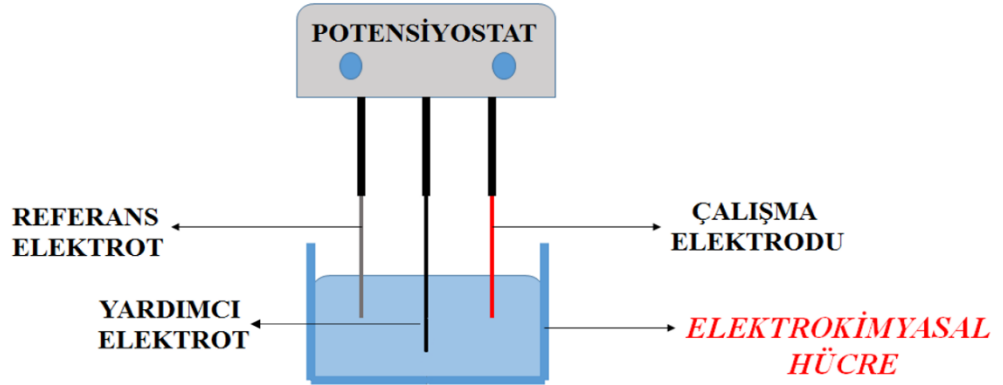
yöntemler hızlı sonuç vermeleri, düşük maliyetli ve kolay uygulamaya sahip olmalarının yanı sıra, seçimli ve duyarlı bir şekilde analiz yapılmasını sağladıkları için klasik yöntemlere göre avantajlıdır (Palecek and Bartosik, 2012; Wang, 2005; Erdem, 2007; Willner and Willner, 2010; Marin and Merkoçi, 2012).

Çalışmamızda, grafen oksit (GO) modifiye edilmiş tek kullanımlık elektrotların geliştirilmesi ve bu biyosensörlerle Alzheimer ile ilişkilendirilen miRNA-34a biyobelirtecinin voltametrik tayinine yönelik uygulamaları hedeflenmiştir. GO ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyleri, mikroskopik ve elektrokimyasal yöntemlerle (taramalı elektron mikroskopisi (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri (CV) teknikleriyle) karakterize edilerek miRNA analizine yönelik seçimli ve hassas elektrokimyasal biyosensör tasarımının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Elektrokimya

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve kimyasal tepkimeler ile maddelerin elektriksel davranışları arasındaki ilişkiyi inceleren bilim dalıdır (Skoog et al. 1996). Yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri elektron aktarımının söz konusu olduğu süreçlerdir ve daima bir arada yürürler. Elektrokimyasal tepkimeler elektrokimyasal hücre denilen düzeneklerde gerçekleşir ve bu tepkimelerin gerçekleşebilmesi için, incelenmek üzere ele alınmış maddeyi içeren bir çözelti, bu maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı ikili veya üçlü elektrot sistemi ve bu elektrotları birbirine bağlayan transducer, yani çevrim sistemi gerekir. İkili elektrot sistemlerinde, ikinci elektrot polarlanmayan bir elektrottur ve karşılaştırma elektrodu olarak bilinir. Üçlü elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise yardımcı elektrottur.



Şekil 2.1. Üçlü elektrot sistemi.

2.1.1 Elektrokimyasal tabakalar

Elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilirken, elektrodun kendisine yapışık olan çözelti tabakasında bulunan bir türle arasında olan elektron aktarımından dolayı heterojen tabakalar meydana gelmektedir (Skoog et al. 1996).

Türbülent akış tabakası: Elektrottan uzakta kalan çözelti yığımında gözlenir.

Laminer akış bölgesi: Laminer akışa geçiş yüzeye yaklaşıldığında gerçekleşir. Bu bölgede sıvı tabakaları birbiri üzerinden kayarak elektrot yüzeyine paralel bir yön izler.

Nernst difüzyon tabakası: Laminer akımının hızı elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, sıvı ile elektrot arasındaki sürtünme nedeniyle sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresinde ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Bu çözelti tabakası, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığında olabilir.

2.1.2 Voltametri ve esasları

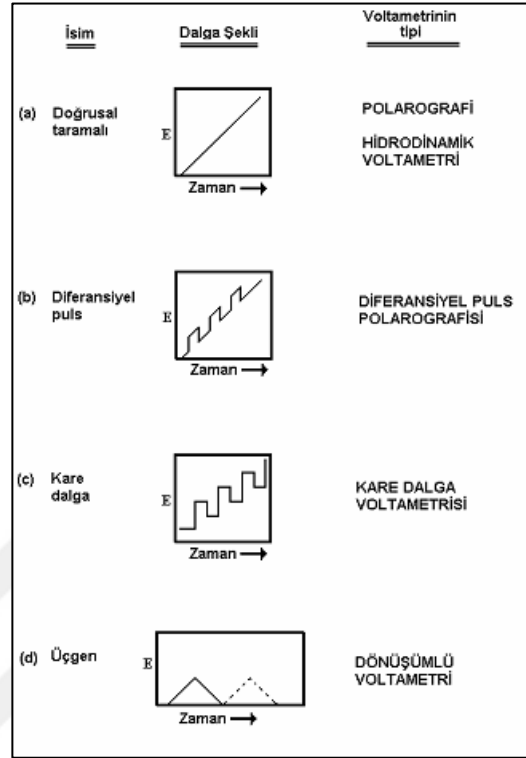
Voltametri, alanı çok küçük olan bir çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyele bağlı bir fonksiyonu olarak ölçülmesidir. Analit hakkında bilgi edinilmesine yarayan elektroanalitik metotlara verilen isimdir (Skoog et al. 1996). Uygulanan potansiyelin ölçülen akım değerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir.

Tarihsel olarak voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında uygulama alanına giren ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografiden geliştirilen bir yöntemdir. Polarografinin diğer voltametri tiplerinden farkı, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu kullanılmasıdır.

2.1.2.1 Voltametrinde kullanılan uyarma sinyalleri

Kullanılan çalışma elektrotları, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometre kare veya daha küçük olan elektrotlardır. Yüzey alanı küçüldükçe polarizasyon artacağından mikro elektrotlar kullanılır. Bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yönetime bağlı karakteristik bir akım cevabı oluşturur (Skoog et al. 1996). Voltametrinde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin görüntüsü, Şekil 2.2'de

verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.



Şekil 2.2. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri (Skoog et al., 1996)

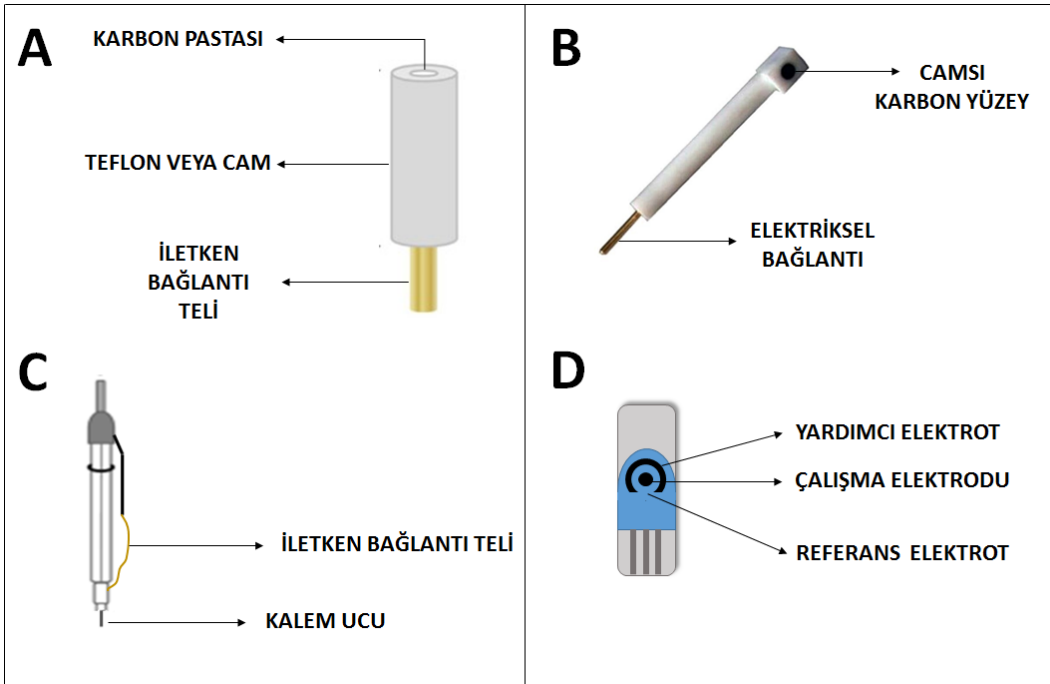
2.1.2.2 Voltametrde kullanılan çalışma elektrotları

Çalışma elektrotları, potansiyeli zamana bağlı doğrusal olarak değişen, analitin yüzeyde yükseltgendiği veya indirgendiği mikro elektrotlardır. Bunlara örnek olarak, civa, platin, altın, bizmut, karbon bazlı katı elektrotlar ve modifiye elektrotlar verilebilir.

Bu tip elektrotların her birinin potansiyel çalışma aralığı farklıdır ve bu aralık elektrot türüne, çözücüye, kullanılan elektrolit türüne ve pH'ye bağlı olarak değişir. Potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan büyük akımlarla belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojen kaynaklı olarak belirlenir.

Karbona dayalı elektrotlar:

Geniş bir potansiyel aralığında çalışmaya olanak sağladıklarından ve maliyetlerinin düşük olmasından dolayı elektrokimyasal analizlerde en sık tercih edilen elektrotlardır (Erdem ve Ozsoz, 2001a; 2001b; Wang vd., 1996). Karbona dayalı elektrotlara örnek olarak; karbon pasta elektrodu (CPE), camsı karbon elektrot (GCE), kalem grafit elektrot (PGE), perde baskılı karbon elektrot (SPCE) verilebilir.



Şekil 2.3. Karbona dayalı elektrot çeşitleri. **(A)** Karbon pastası elektrodu (CPE), **(B)** Camsı karbon elektrot (GCE), **(C)** kalem grafit elektrot (PGE), **(D)** perde baskılı elektrot (SPE)

Civa Elektrot

Civa elektrot her damlada yenilenen elektrot yüzeyine sahip olması ve her ölçümden sonra kontamine olmamış yüzey sağlaması sebebiyle elektrokimyasal analizlerde oldukça yaygın kullanılmaktadır.

Metal elektrotlar:

Platin ve altın gibi inert ve iletken metallere yapılmış elektrotlardır. Bu elektrotlar geniş bir potansiyel aralığına sahiptir (Liu et al., 2010; Karadeniz et al., 2006).

2.1.2.3 Voltametri de kullanılan referans (karşılaştırmalı) elektrotları

Elektrokimyasal uygulamalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyerek sabit kalan ve tamamıyla çalışan çözeltinin bileşimine duyarlı olan elektrotlardır (Skoog vd., 1996; Evans, 1991; Pietrzyk and Frank, 1979; Yıldız ve Genç, 1993; Service, 1998).

Standart Hidrojen Elektrot (SHE)

Potansiyeli bilinmeyen herhangi bir elektrodun standart potansiyelini saptamak için söz konusu elektrot ve elektrot potansiyeli sıfır kabul edilen Standart Hidrojen Elektrot (SHE) kullanılır (Tural vd., 2006).

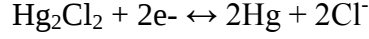
Uygun şartlar altında hidrojen elektrot elektrokimyasal olarak tersinirdir. Bir tuz köprüsü aracılığıyla birleştiği yarı-hücreye bağlı olarak anot veya katot olarak davranır. Elektrot anot olduğunda hidrojen, hidrojen iyonlarına yükseltgenir; elektrodun katot olması durumunda ters reaksiyon gerçekleşir.

Genel olarak bu elektrodun potansiyeli tüm sıcaklıklarda sıfır volt olarak kabul edilir. Hidrojen gaz elektrotlar, elektrokimyasal çalışmalarda sadece referans elektrotlar olarak değil, aynı zamanda pH tayinlerinde indikatör elektrot olarak da yaygın biçimde kullanılmıştır. Hazırlanması zor bir elektrot olduğundan fazla kullanışlı değildir (Tural vd., 2006).

Kalomel Elektrot

Kalomel elektrot, referans elektrot olarak oldukça yaygın olarak kullanılan elektrotlardan biridir. Laboratuarda kolaylıkla hazırlanabilir.

Elektrotta gerçekleşen;

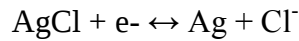


reaksiyonunun potansiyeli ortamdaki klor iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. Dengeye gelmesi için birkaç gün bekletilmelidir. Sıcaklık değişimlerinden kolay etkilenen bir elektrottur.

Gümüş–Gümüş Klorür Referans Elektrot

Bu elektrot hazırlanırken; bir tüpün en alt kısmında cam veya plastikten yapılmış gözenekli bir tıpa, bunun üstünde çözelti sızmalarını önlemek için potasyum klorürce doymuş bir köprü, onun üstünde katı potasyum klorür ve en üstte de içine 1–2 damla gümüş nitrat damlatılmış doymuş potasyum klorür çözeltisi bulunur. Bu çözeltinin içine ucu AgCl ile kaplanmış gümüş bir tel daldırılır.

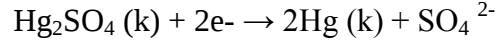
Gümüş-gümüş klorür elektrodu,



reaksiyonuna dayanır. Gümüş-gümüş klorür referans elektrotları da oldukça yaygın kullanılırlar. Bu elektrot doygun kalomel elektroda göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilir ve daha az analitle reaksiyona girer.

Civa–Civa (I) Sülfat Referans Elektrot

Elektrot potansiyeli sülfat iyonlarının aktifliği ile bulunur. Doygun kalomel elektrot ile benzerlikler içermektedir. Reaksiyon şu şekildedir:



2.1.2.4 Yardımcı elektrot

Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturur ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün belirlenmesinde rol oynamayan bir elektrottur. Genellikle helezon şeklinde bir platin tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna iletilmesini sağlayan karşıt elektrottur.

2.1.2.5 Voltamogramlar

Doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle voltametrik dalga olarak bilinen sigmoidal eğriler (S şeklinde) verir. Keskin artıştan sonra sabitlenen akıma **sınır akımı**, i_s denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bu yüzden

$$i_s = k.C_A$$

şeklinde yazılabilir. Burada C_A analit konsantrasyonu ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır (Skoog vd., 1998; Pietrzyk ve Frank, 1979).

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

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye **Hidrokinamik Voltametri** adı verilir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye **Polarografi** denir.

Elektrot sistemine potansiyel uygulandığında kapasitif akım ve faradayik akım olmak üzere 2 çeşit akım oluşur.

1-Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrot bir elektrolit çözeltisine daldırıldığında ve negatif yükle yüklendiğinde çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir potansiyel farkı oluşur. Ters işaretli yükler ara yüzeyin iki tarafında biriktiğinden dolayı bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım sistemden kaynaklanır, reaksiyona bağlı değildir, bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır.

2-Faradayik akım (i_f) : Reaksiyondan kaynaklanan (analiz edilecek maddeden) akımdır.

$$i = i_f + i_c \text{ olduğundan } i_c \text{ azalırsa duyarlılık artar.}$$

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

2.1.2.6 Voltametrik akımlar

Bir elektroliz işleminde akım, analitin difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine taşınma hızı ile kontrol edilir ve bu hız $\partial C_A / \partial X$ ile ifade edilir. Burada X, elektrottan olan uzaklığı cm cinsinden göstermektedir. Düzlemsel bir elektrot için, akım;

$$i = nFD_A (\partial C_A / \partial X)$$

şeklinde gösterilebilir.

Burada:

I : Amper cinsinden akımı,

N : Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

F : Faraday sabiti (96487 Coulomb / mol),

A : cm² cinsinden elektrot yüzey alanını,

D_A : A' nın cm²s⁻¹ cinsinden difüzyon katsayısını,

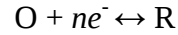
C_A : mol/cm³ cinsinden A'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

Oluşan difüzyon akımının zamana karşı fonksiyonu **COTTRELL denklemini** verir.

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

2.1.2.7 Elektrokimyasal bir olayda faradayik işlemler

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akım iletilirken, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken, diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R sırasıyla, redoks çiftinin yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade eder. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [C_O(0,t) ve C_R(0,t)], Nernst Denkleminde göre saptanmasında kullanılabilir.

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_0}{C_R}$$

E^0 : Redoks tepkimesi için standart potansiyel

R : Gaz sabiti ($8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

T : Sıcaklık (K)

n : Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F : Faraday sabiti (96487 Coulomb/mol)

Elektrot ara yüzeyinde meydana gelen redoks tepkimesi sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilir. Bir elektrottaki kimyasal madde miktarının geçen akımla doğru orantılı olduğunu ifade eden bu işlemlere, **faradayik işlemler**, bu şekilde oluşan akımlara da **faradayik akımlar** adı verilir.

2.1.3 Polarografi

Polarografi, ilk bulunan ve elektrot olarak damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametri tipidir. Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi ile ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede **artık akım** adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir.

Akımın büyüklüğü, analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman sınır akımları gözlenir. Kütle aktarımı difüzyonla olduğu için polarografik sınır akımlarına genellikle **difüzyon akımları** denir ve i_d ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır. Difüzyon akımı analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

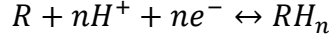
Artık akımların oluşma sebepleri olarak safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları ve destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar örnek gösterilebilir.

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğru bir sonuç elde etmek için artık akımın

etkisi giderilmeye çalışılır (Skoog vd., 1996; Tural vd., 2006; Yıldız ve Genç, 1993).

Polarografide pH'nın etkisi:

Bazı organik ve inorganik madde reaksiyonları aşağıdaki gibi ifade edilir:

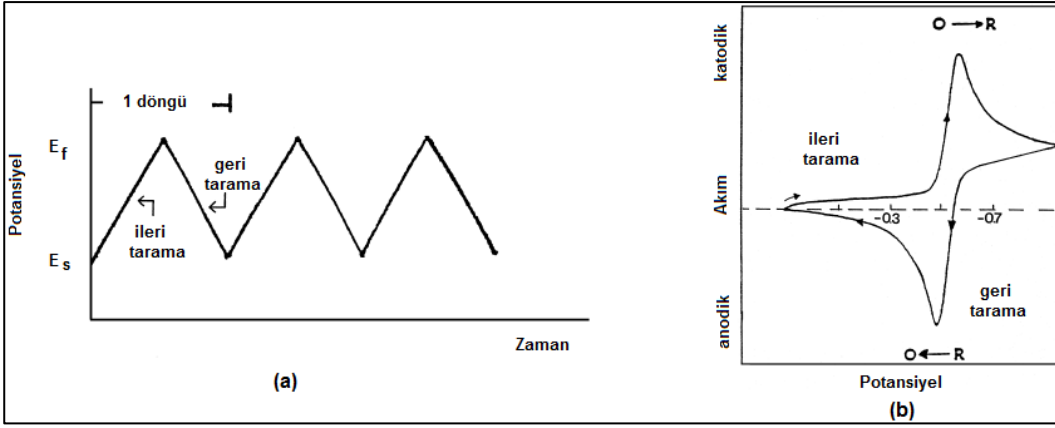


R, analitin yükseltgenmiş şekli ve RH_n de indirgenmiş şeklini göstermektedir. Bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri denklemden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde pH değerine bağlıdır; pH'nın değişimi, reaksiyon sonucunda oluşan ürününün değişmesine bile sebep olabilir. Bu nedenle analit çözelti çok iyi şekilde tamponlanmazsa, elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH değeri büyük oranda değişebilmektedir. Bu değişimler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve polarogramlarda iyi bir görünümü olmayan yayvan eğrilerin oluşmasına neden olur. Ayrıca, özellikle organik maddelerle yapılan polarografide tekrarlanabilir yarı-dalga potansiyelleri ve difüzyon akımları elde etmek için iyi bir tamponlama yapmak oldukça önemlidir.

2.1.4 Voltametrik teknikler

2.1.4.1 Dönüşümlü voltametri

Bu teknikle, akım, gerilime bağlı bir fonksiyonu olarak ölçülür. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıktaki akım değişimi grafiğe geçirilerek **dönüşümlü voltamogram** elde edilir. Dönüşümlü voltametride durgun sistemde ve üçlü elektrot sistemiyle çalışılır ve hızı difüzyon tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda gözlenebilir. İlk olarak, potansiyel bir maksimuma kadar artar, daha sonra başlangıç değerine yine doğrusal olarak geri döner.



Şekil 2.4. (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; **(b)** Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi.

Dönüşümlü voltametri doğru akımdaki gibi kapasitif akımın en küçük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık 10^{-5} M ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri, analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir.

Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında, seçilen potansiyel aralığının yanında, seçilen tarama hızının ve tarama sayısının da etkisi vardır.

Elektrot yüzey alanı hesabı aşağıdaki denklem (Cummings and Elving, 1978) kullanılarak yapılır:

$$I_p = 2,687 * 10^5 * n^{3/2} * A * D^{1/2} * C * V^{1/2}$$

I_p : pik akımı

n : transfer edilen elektron sayısı ($n=1$)

A : elektrot yüzeyi

C : Redoks prob çözeltisinin konsantrasyonu (2 mM)

V : tarama hızı (0,05 V/s)

D : Difüzyon katsayısı (sabit: $7,6 * 10^{-6}$)

Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir.

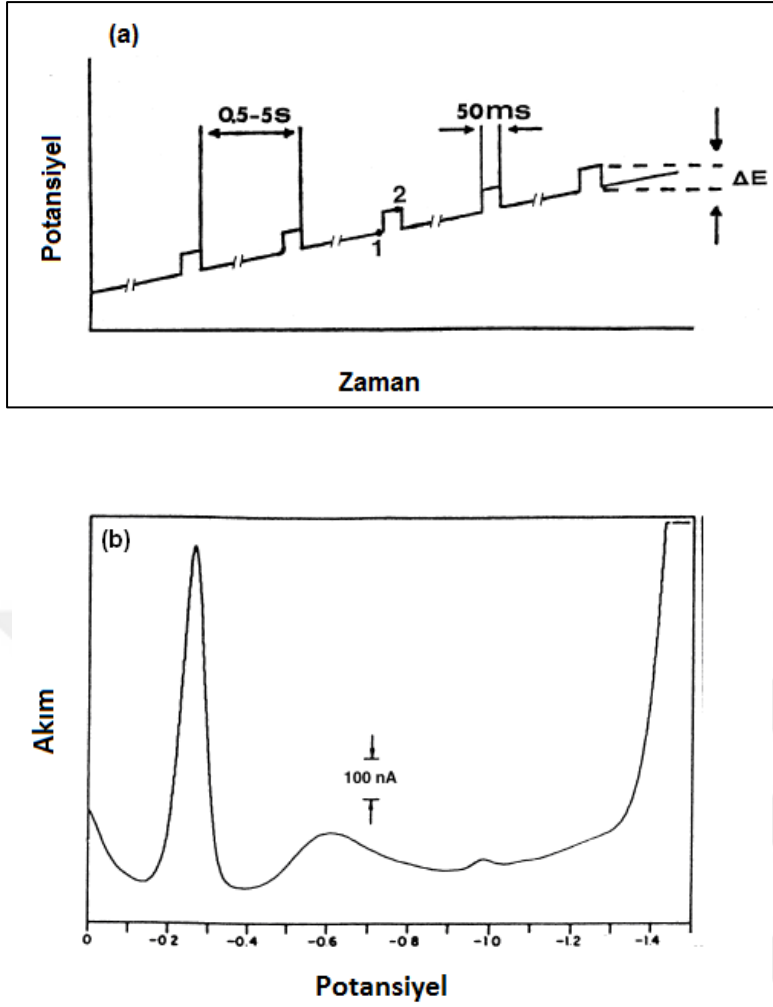
$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, tepkime tersinir; ne kadar uzaksa tersinmez olarak adlandırılır (Skoog vd., 1998).

2.1.4.2 Diferansiyel puls voltametrisi

DPV tekniğiyle, yarı-dalga potansiyelleri 0,04 – 0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile birbirinden farklı konumlarda pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls polarografisi, çok duyarlı bir yöntemdir ve tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

10 mV'luk veya 50 mV'luk bir puls civa damlasına uygulanır. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır.



Şekil 2.5. Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; **(a)** Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; **(b)** Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması duyarlılığın artmasıyla açıklanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV arttırıldığında, elektrodun çevresindeki yüzey tabakasında, elektroaktif bir tür varsa, analizlenecek madde konsantrasyonunu yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürmek için bir akım artışı gözlenir. Ancak bu potansiyel için gerekli olan denge konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra akım, difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ve buna **difüzyon kontrollü akım** denir. Puls polarografisinde akım artışı tamamen sona ermeden önce akım ölçümü yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından büyüktür. Damla değiştiğinde, çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir.

Gerilim pulsu ilk uygulandığı zaman damla üzerinde yük artışı meydana geldiğinden faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma oluşur. Bu akım zamanla azalırken yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru geldikçe sifıra yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek suretiyle faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal/gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlılık da artar (Skoog vd., 1998; Tural vd., 2006).

2.1.5 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve esasları

Sıvı/katı ara yüzeylerin karakterizasyonu amacıyla kullanılan bir elektrokimyasal yöntem olan elektrokimyasal empedans spektroskopisi, ara yüzeylerin dielektrik özellikleri ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Bununla birlikte, elektrokimyasal reaksiyonlar meydana gelirken oluşan yük transfer değerleri hakkında da bilgi sunmaktadır (Monk, 2002).

Bir elektrokimyasal hücrede, potansiyelin zamana bağlı sinüzoidal değişimi sonucunda oluşan alternatif akıma karşı bir direnç meydana gelir.

$$V = I \cdot Z$$

denkleminde Z empedansı ifade ederken, potansiyel (V) ve alternatif akım (I) zamana bağlı olarak değişmektedir.. Devrede oluşan direnç (R) ve Z 'nin birimi Ohm (Ω) ile ifade edilir.

Empedans, gerçek ve zahiri olmak üzere iki bileşenden oluşur;

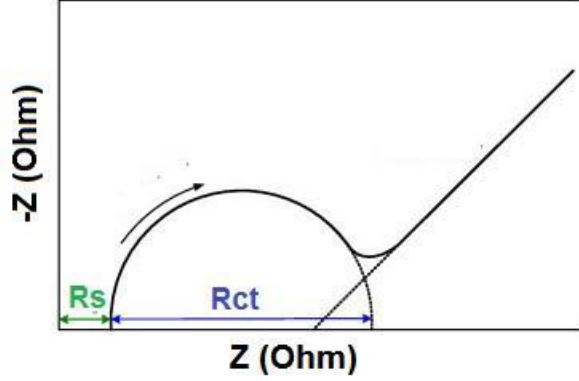
$$Z = Z' - jZ'' \quad (i = \sqrt{-1})$$

Z : empedans

Z' : gerçek empedans,

Z'' : zahiri empedans

Gerçek empedansın x ekseninde, zahiri empedansın y ekseninde olduğu grafik Nyquist eğrisi olarak tanımlanmaktadır (Monk, 2002).



Şekil 2.6. Bir elektrokimyasal hücrede empedimetrik ölçüm sonucu oluşan Nyquist eğrisi.

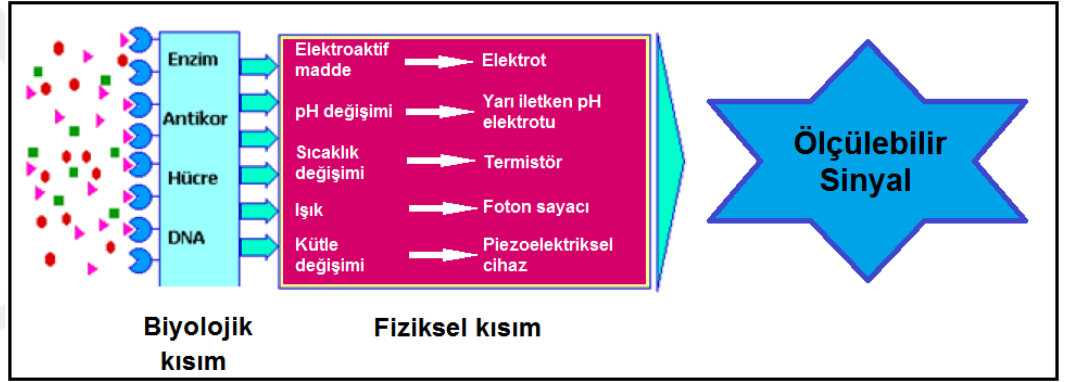
Şekil 2.6’da gösterilen Nyquist eğrisinde, ölçümün ilk aşamasında yüksek frekanslarda meydana gelen çözelti direnci (R_s), bu direnci takiben meydana gelen yarım daire, elektrota transfer edilen yüke karşı oluşan direnç (R_{ct}) ve düşük frekanslarda oluşan lineer kısım ise Warburg empedansı (R_w) olarak tanımlanmaktadır. Sistemin yük depolama özelliği ise kapasitans olarak gösterilmektedir. Bu teknikle belirlenen bir frekans aralığında empedans taraması gerçekleştirilir ve elektrot yüzeyinde meydana gelen olaylar incelenirken R_{ct} değerindeki değişimler yorumlanır.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, yüzey kaplama, bağlanma sabitleri, hız sabitleri ve yüzey reaktivitesi gibi biyolojik moleküllerin etkileşimlerinin incelenerek bu işlemlerin karakterizasyonu hakkında bilgi veren ve günümüzde oldukça popüler olan bir yöntemdir.

Elektrokimyanın pek çok uygulama alanı bulunmaktadır, bunlardan biri **Biyosensörlerdir.**

2.2 Biyosensörler

Biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bir araya getirilerek, multidisipliner bir anlayış çerçevesinde biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısım; analizlenecek maddeyle etkileşerek onun tanınmasını sağlarken, biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını ölçülebilir bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (Coulet, 1991).



Şekil 2.7. Biyosensörlerin yapısı.

Biyosensörler, diğer tayin yöntemlerine kıyasla, yüksek algılama hızı ve esneklik gibi birçok avantaja sahiptirler. Hızlı, gerçek zamanlı analizler sayesinde, kullanıcılara anında interaktif bilgiler sunulur.

2.2.1 İdeal biyosensörde olması gereken özellikler

İdeal bir biyosensör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

Seçicilik: Seçicilik, ideal bir biyosensörde bulunması gereken en önemli özelliklerden biridir. Biyosensör yeteri kadar seçici değilse bu eksikliği ortadan kaldırmak için başka işlemlerin ilave edilmesi gerekmektedir ve bu da işlemin süresini uzatır.

Tekrarlanabilirlik: Aynı deneysel koşullarda, ard arda yapılan ölçümlerde, elektrodun birbiriyle tutarlı değerler okuması istenir. Bu durum teoride kolayca ulaşılabilir gibi gözükse de, pratikte pek mümkün olmamaktadır. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi ve güvenilir olduğundan söz edilebilir. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka ayrıntılı olarak incelenmelidir.

Kararlılık: İdeal bir biyosensörde elektrot kararlılığının yüksek olması istenir. Elektrot kararlılığını etkileyen etmenler kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, ısı, nem, pH, ortamdaki oksijen konsantrasyonu gibi parametrelerdir.

Kullanım ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör, biyolojik çeviricinin zamanla aktivitesinde azalma meydana gelmesidir. Bu durum biyosensörün, kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

Kalibrasyon gereksinmesi: Teoride ideal bir biyosensörün kalibrasyona hiç gerek duymaması ya da çok az ihtiyaç duyması beklenir. Ama bu pratikte sağlanamadığından biyosensörler kullanım ömürleri boyunca sık aralıklarla kalibre edilmelidirler.

Yüksek duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, biyosensörün idealitesini arttırmaktadır.

Geniş ölçüm aralığı: Biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığı, ölçüm aralığı olarak adlandırılmaktadır.

Yeterli düzeyde tayin sınırı: Tayin sınırını, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye seçiciliği, immobilize edilen madde miktarı etkiler. Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir.

Hızlı cevap süresi: Akım-zaman grafiği incelenerek biyosensör elektrodunun cevap süresi anlaşılmaktadır. Eğer, elde edilen eğride basamakların şekli basık ve genişse cevap süresi uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap süresi kısa (hızlı)'dır.

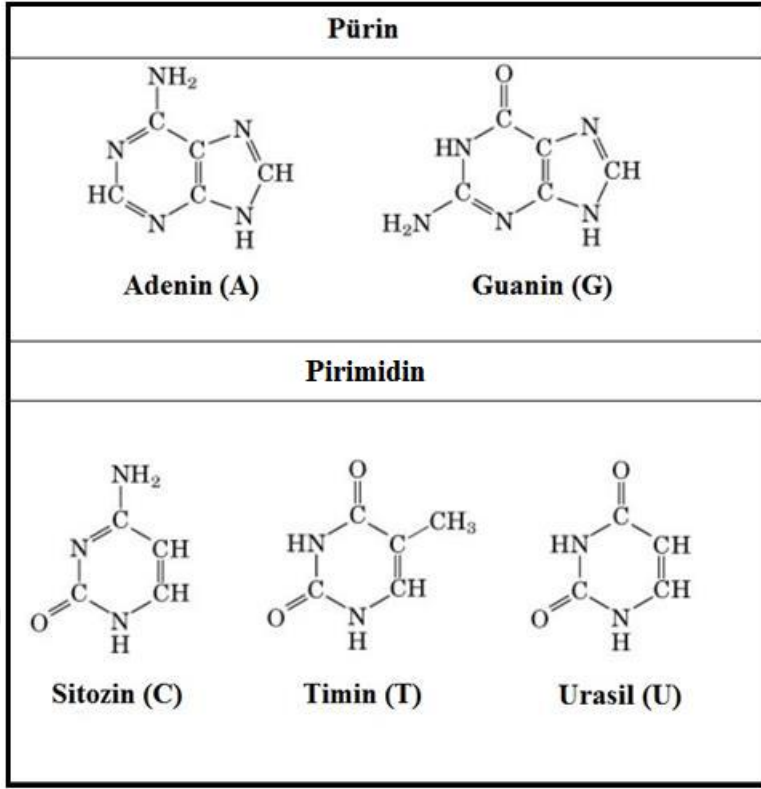
Hızlı geriye dönme süresi: Örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. İlk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa, ikinci örnek de bu süre geçtikten sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve ucuzluk: İdeal biyosensör tanımında basitlik ve ucuzluk da önemli etkenlerdir. Basit, ucuz ve kullanımı rahat olan biyosensörler ideal biyosensörler olarak tanımlanır. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, her geçen gün basitleştirilmekte ve mümkün olduğunca maliyet düşürülmeye çalışılmaktadır.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametrelerden birisidir. Ama biyosensör tasarımında elektrotlarının boyutlarının küçültülmesi ve sterilize edilebilmesi önem arz etmektedir.

2.2.2 Nükleik asitler

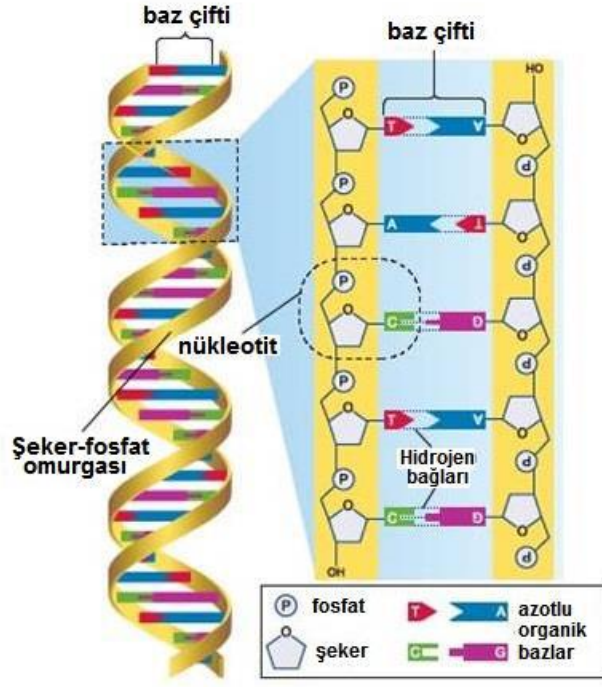
Nükleik asit moleküllerinin yapı taşlarına, **nükleotit** adı verilir. Nükleotitler, bir azotlu baz, bir pentoz şekeri ve bir fosfat grubundan oluşmaktadır ve azotlu bazlar, pürinler ve pirimidinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.8). Pürinler, dokuz atomlu, iki halkalı, adenin (A) ve guanin (G), pirimidinler altı atomlu tek, halkalı, sitozin (S), timin (T) ve urasildir (U). DNA'da bu nükleotitlerden, A,T,G,S, RNA'da ise A,U,G,S bulunmaktadır (Dervan, 1986, 1998; Plambeck ve Lown, 1984; Brett vd., 1997, Erdem ve Ozsoz, 2011).



Şekil 2.8. Pürin ve pirimidin bazlarının yapısı.

2.2.2.1 DNA (Deoksiribonükleik Asit)

Deoksiribonükleik asit veya kısaca DNA, tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. DNA'nın başlıca rolü bilginin uzun süreli saklanmasıdır. DNA moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri ve Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Buna dayanarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısı için çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli önerilmiştir.



Şekil 2.9. DNA'nın yapısı.

Çift sarmal DNA molekülünün iki zincirini bir arada tutan yapı bazları arasında yer alan hidrojen bağlarıdır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısımda yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir (A-T ve G-C şeklinde). Bu sayede, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğundan, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde, ikinci zincirdeki baz dizisi kolayca belirlenebilmektedir.

DNA'nın iki görevi vardır. Bunlardan birincisi hücre bölünmesinin hazırlıkları sırasında kendini kopyalamasıdır, buna **duplikasyon** denir. DNA'nın kendini eşlemesi esnasında, iki sarmal ipliği bir arada tutan hidrojen bağları bir fermuar gibi açılır ve açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitlerin uçlarına, hücrede önceden sentezlenmiş nükleotitler bağlanır. Böylece birbirinin aynı olan iki DNA meydana gelmiş olur. İkinci görevi ise, kendinde olan bilgiyi RNA'ya (Ribonükleik asit) aktarmasıdır. Bu işleme **transkripsiyon** denir. Bu işlem

sonucunda RNA’da toplanan bilgi ribozomlarda protein, enzim gibi maddelerin sentezinde kullanılır.

2.2.2.2 miRNA

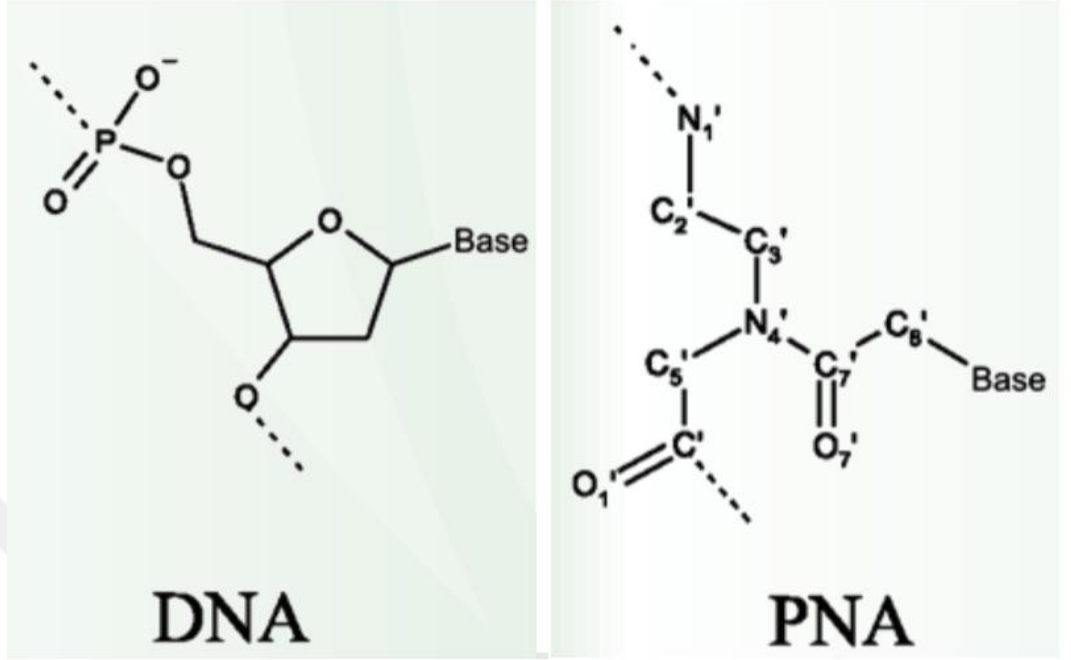
RNA tüm yaşam formlarında olduğu bilinen, yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesi için gerekli olan aminoasit ve proteinlerin genomik DNA’dan kodlanarak üretilmesini sağlayan bir temel yapıtaşdır. RNA’lar, haberci RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), küçük nükleer RNA (snRNA) gibi görevlerine göre sınıflandırılmış olmakla birlikte; insan genomunda işlevi halen bilinmeyen, herhangi bir protein kodlanmasında görev almayan RNA’lar da (non-coding RNA, ncRNA) bulunmaktadır. Bu RNA’ların anormal ekspresyonu insan vücudunda kanserli dokuların oluşmasına neden olmaktadır (Cheng et al., 2005; Washietl et al., 2007).

ncRNA’ların bir grubu olan mikroRNA’lar (miRNA), 19-25 nükleotit uzunluğundaki kısa RNA dizileri olup, tüm ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. miRNA’lar mRNA’nın transkripsiyon ürününe bağlanarak post-transkripsiyonel regülasyonu sağlarlar (Xu et al., 2016). Çoğunlukla işlevlerini bu şekilde gösteren miRNA’lar, sık olmamakla birlikte gen susturulması ve translasyonel baskılamada da görev alırlar (Yin and Ai, 2013). İnsan genomunda yaklaşık 1000 miRNA’nın olduğu ve bunların % 60’ının pek çok farklı hücrede görüldüğü rapor edilmiştir (Friedman et al., 2009).

2.2.2.3 PNA (Peptid Nükleik Asit)

Peptid nükleik asitleri (PNA) oligonükleotid analoglarıdır, burada şeker fosfat omurgası yalancı peptid iskeletiyle değiştirilir. PNA’lar DNA ve RNA’yı yüksek seçicilik ve özgüllük ile bağlayarak kendilerine karşılık gelen nükleik asit komplekslerinden daha kararlı PNA-RNA ve PNA-DNA hibritleri meydana getirirler. PNA-DNA ve PNA-RNA komplekslerinin termal kararlılıkları da DNA-DNA ve DNA-RNA duplekslerinden daha yüksektir. PNA’lar nükleazlara ve proteazlara dirençlidir ve proteinler için düşük afiniteye

sahiptirler. Bu özellikler PNA'ları biyolojik ve tıbbi uygulamalarda çekici bir biyomolekül yapmaktadır (Sugiyama et al., 2017).

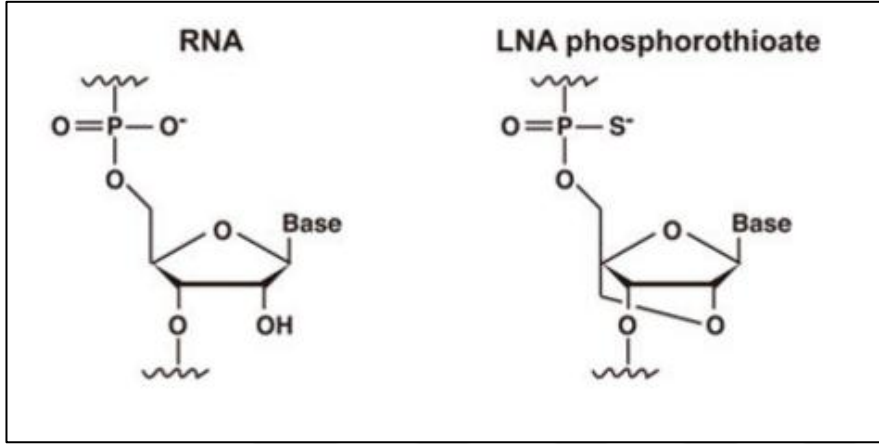


Şekil 2.10. PNA ve DNA'nın kimyasal formülü

PNA, genetik teşhis ve PCR sıkıştırma, plasmit vektör etiketleme gibi çeşitli moleküler biyoloji tekniklerinde çok yönlü bir araç olarak kullanılmaktadır. PNA'lar DNA taklit etme özelliklerinden dolayı DNA ve mRNA'ya sıkı bağlanarak genlerin transkripsiyonunu ve translasyonunu engelledikleri için gen terapisi ve ilaç tasarımı da kullanılmaktadırlar. Ayrıca peptitleri, ilaçları veya moleküler izleyicileri plasmit vektörlere bağlamak amacıyla da kullanılan PNA'lar bağlanma alanına göre plasmitteki genlerin transkripsiyonunda veya plasminin fizyolojik aktivitesinde hiçbir etkiye sahip değildir. Bu yaklaşım, gen transferinde ve ilaçların plasmitlere bağlanmasında meydana gelen engelleri ortadan kaldırmaya yardımcı olduğundan gen iletimi veya dokuya spesifik hedeflemeyi geliştiren bir yaklaşımdır (Braden et al., 1999).

2.2.2.4 LNA (Kilitli Nükleik Asit)

LNA'lar, furanoz halkasında ikinci oksijeni halkadaki dördüncü karbonu bağlayan metilen köprüsü içeren suni nükleik asit analoglarıdır. Bu modifikasyon onları nükleazlara karşı dirençli hale getirir ve dupleksin erime sıcaklığını arttırarak tamamlayıcı RNA dizilerine afinitelerini arttırır.



Şekil 2.11. RNA ve LNA'nın kimyasal formülü

LNA'ların yüksek termodinamik kararlılık ve yüksek nükleik asit tanıma özelliği sergilediği görülmektedir. LNA erime sıcaklığı ile ilgili (T_m) bir çalışmada, erime sıcaklıklarında LNA'ya karşılık gelen DNA ve RNA oligonükleotitlerine kıyasla LNA monomeri başına sırasıyla 3-5 °C ve 4-8 °C artış gözlenmiştir (McTigue et al., 2004).

2.3 Nükleik Asit Biyosensörleri

DNA Biyosensörleri

Nükleik asit analizlerinde elektrokimyasal DNA biyosensörleri, pratik olma, seçimli ve duyarlı sonuçları verebilme, ekonomik olma, hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar alma gibi özellikleriyle öne çıkmaktadır (Palecek et al Fojta, 2001; Erdem, 2007). Tanıma yüzeylerini nükleik asit dizilerinin oluşturduğu bu tip biyosensörlerde hedefin algılanması, DNA hibridizasyonu gibi oldukça spesifik

olan bir mekanizmaya dayalıdır. Bu nedenle yüksek seçimlilikte tayinlere imkan tanımaktadır (Palecek, 1961).

Günümüzde *ilaç-DNA*, *DNA-DNA*, *DNA-RNA* etkileşimlerinin tayini elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. (Ozkan et al., 2004; Erdem et al., 2007; Havran et al., 2009). Kullanılan yöntem, kolay ve düşük maliyetli olup, hızlı ve seçimli bir şekilde, DNA ile etkileşme türü incelenen ve hedeflenen maddenin az miktarlarında çalışmayı mümkün kılmaktadır.

miRNA biyosenörleri

miRNA'lar üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, miRNA'ların pek çok kanser türünde (Cho et al. 2010; Ruan et al., 2009), kalp hastalıklarında (Cai et al., 2010), diyabette (Pandey et al., 2009) nörodejeneratif hastalıklarda (Eacker et al., 2009; Kocerha et al., 2009) böbrek (Liang et al., 2009) ve karaciğer hastalıklarında (Chen, 2009) rol oynadıkları saptanmıştır. Tüm hayati risk tehlikesi teşkil eden hastalıkların regülasyonunda görev alan miRNA'lar, elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri alanında da oldukça ilgi çekici bir konu haline gelmiştir ve literatürde miRNA'ların elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri ile tayinine yönelik yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır (Yin et al., 2012a). Bu çalışmalardan bazıları Tablo 2.1'de verilmiştir. Örneğin; Gao ve arkadaşları tarafından miRNA let-7b tayinine yönelik bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Total RNA'dan izole edilen miRNA'lar OsO₂ nanopartikülleri ile işaretlenmiş, ITO çalışma elektrodu yüzeyinde miRNA let-7b'ye spesifik DNA probu ile miRNA let-7b hibridizasyonu sonrasında hidrazinin amperometrik olarak algılanmasıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörün miRNA-106'ya karşı seçimliliği test edilmiş, miRNA let-7b'ye ait tayin sınırı (DL) 80 fmol/L olarak hesaplanmıştır (Gao and Yang, 2006). Başka bir çalışmada yine miRNA let-7b tayini için empedimetrik biyosensör geliştirilmiştir (Ren vd., 2013). Altın elektrot yüzeyine tiyol ile işaretli miRNA let-7b'ye spesifik DNA probu immobilize edilmiş, miRNA let-7b ile hibridizasyon öncesi ve sonrasında empedimetrik ölçümler gerçekleştirilmiş ve transfer edilen yüke karşı oluşan direnç (R_{ct}) deki farklanmaya dayalı olarak

miRNA let-7b varlığı/yokluğuna dair yorumlar yapılmıştır. miRNA let-7 ailesindeki diğer miRNA dizilerine karşı seçiciliği test edilen bu elektrokimyasal biyosensör ile miRNA let-7b'ye ait DL 1 fM olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada (Tran et al., 2013), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile modifiye GCE yüzeyinde miRNA-141' e spesifik DNA probu ile miRNA-141 arasında hibridizasyon gerçekleştirilmiş ve bu hibridizasyon CV tekniği ile tayin edilmiştir. MWCNT modifikasyonu sayesinde daha duyarlı analizlerin gerçekleştirilebildiği bu biyosensör platformunun miRNA-103 ve miRNA-29b-1'e karşı seçiciliği test edilmiş; miRNA-141'e ait DL 8 fM olarak saptanmıştır.

miRNA-15a'nın tayin edildiği bir çalışmada (Erdem et al., 2013), streptavidin kaplı manyetik partiküllerin (MB) yüzeyine biotin ile işaretli DNA probu immobilize edilmiş ve miRNA-15a ile MB yüzeyinde hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan DNA : miRNA hibritine streptavidin alkalen fosfataz (SALP) enzimi immobilize edilmiş ve substratı olan α -naftil fosfat ile gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan α -naftol'ün yükseltgenme sinyalinin 16 grafit çalışma elektrodu içeren çoklu ölçüm sistemleri (MUX-SPE16) yüzeyinde doğrusal taramalı voltametri (LSV) yöntemi ile ölçülmesi sonucunda miRNA-15a tayin edilmiştir. miRNA-15a tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal çoklu ölçüm sisteminin hedef miRNA'dan farklı rastgele miRNA varlığında seçiciliği test edilmiş, miRNA-15a'ya ait DL 34,20 fmol olarak hesaplanmıştır. miRNA-15a, miRNA-660, miRNA-16'nın elektrokimyasal tayinine yönelik olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) ve MUX-SPE16 ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada (Erdem et al., 2014a), her bir miRNA'ya spesifik biotin ile işaretli inosin substituye DNA probu MB yüzeyine immobilize edilmiş, hedef miRNA'lar ile hibridizasyon sonrasında oluşan hibrit formların alkali muamele ile MB yüzeyinden koparılması ve elektrot yüzeyine immobilizasyonu sonrasında guanin bazının yükseltgenme sinyali DPV yöntemi ile ölçülmüştür. Bu çalışmada her bir DNA probunun diğer miRNA dizilerine karşı seçiciliği test edilmiştir. miRNA-16'ya ait DL, PGE ile 230 pmol, MUX-SPE16 ile 4,3 pmol olarak hesaplanmıştır. Diğer bir çalışmada, geliştirdiğimiz manyetik partiküllere dayalı biyosensör sistemi ile miRNA-34a,

miRNA-181b, miRNA-155 analizleri de yapılmıştır (Erdem et al, 2014b). Tek kullanımlık PGE'lerin kullanıldığı bu çalışmada, miRNA-34a'ya ait DL 0,026 nmol olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.1. miRNA tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri. **Analiz platformlarına ait kısaltmalar:** ITO elektrot: İndiyum kalay oksit elektrot, **PAn** nanokablolarla kaplı Au/ Ti mikroeletrotlar: Poli (anilin) nanokablolarla kaplı altın/titanyum mikroeletrotlar, **SPE:** Perde baskılı elektrot, **SPGE:** Perde baskılı altın elektrot, **MWCNT/GCE:** Çok duvarlı karbon nanotüp modifiye camsi karbon elektrot, **Den/Au/Grafen/GCE:** Dendritik altın nanoyapılar ve grafenle modifiye camsi karbon elektrot, **PGE:** Kalem grafit elektrot, **MUX-SPE16:** 16 çalışma elektrodu içeren çoklu ölçüm sistemi. **RGO:**İndirgenmiş grafen oksit, **AuNP:** Altın nanopartikülleri, **PAMAM:** Poliamido amin, **CoTCPP:** kobalt tetra (4-karboksifenil) porfirin. **Kullanılan elektrokimyasal ölçüm yöntemlerine ait kısaltmalar:** **CV:** Dönüşümlü voltametri, **DPV:** Diferansiyel puls voltametrisi, **EIS:** Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, **LSV:** Doğrusal taramalı voltametri, **SWV:** Kare dalga voltametrisi.

miRNA	Analiz platformu	Ölçüm yöntemi	Gözlemle- nebilme sınırı (DL)	Kaynak
miRNA -261, miRNA -522	Damlayan civa elektrodu	DPV	10 nM	Bartosik et al., 2014
miRNA -522	Damlayan civa elektrodu	DPV	2 nM	Bartosik et al., 2013
miRNA let7 ailesi	ITO elektrot	EIS	2 fM	Gao et al., 2013
miRNA -122b	Altın elektrot	Amperometri	10 aM	Ge et al., 2014

miRNA -21	Altın elektrot	DPV	6 fM	Meng et al., 2013
miRNA let-7b	PAn nanokablolarla kaplı Au/ Ti mikroelektrotlar	İletkenlik ölçümleri	5 fM	Fan et al., 2007
miRNA -122	SPE	DPV	0,01 μ M	Lusi et al., 2009
miRNA let-7b	Altın elektrot	Amperometri	0,10 nM	Gao and Yu 2007a
miRNA let-7b	ITO elektrot	Amperometri	0,20 pM	Gao and Yu 2007b
miRNA let-7b	ITO elektrot	Amperometri	80 fmol/L	Gao and., 2006
miRNA -16	Altın çipler	Amperometri	2 pM	Pöhlman n and Sprinzl 2010
miRNA let-7b	Altın elektrot	EIS	1 fM	Ren et al., 2013
miRNA -141	MWCNT/GCE	CV	8 fM	Tran et al., 2013
miRNA -21	Bi ₂ S ₃ nanoçubuklarla modifiye ITO elektrot	Elektrofotometri	1,67 fM	Wang et al., 2014

miRNA -21	Altın disk elektrot	CV, DPV	45 fM	Xia et al., 2013
miRNA -21	Den/Au/Grafen/GCE	Kronoamperometri	0,06 pM	Yin et al., 2012b
miRNA -21	PGE	DPV	1 μ M	Kilic et al., 2012
miRNA -21	PGE	EIS	3,12 pmol	Kilic et al., 2014
miRNA -15a	MUX-SPE16	LSV	34,20 fmol	Erdem et al., 2013
miRNA -15a, miRNA -660, miRNA -16	PGE, MUX-SPE16	DPV	PGE ile 230 pmol, MUX-SPE16 ile 4,3 pmol	Erdem et al., 2014a
miRNA -34a, miRNA -181b, miRNA -155	PGE	DPV	0,026 nmol	Erdem et al., 2014b
miRNA Let-7b	Altın elektrot	DPV, EIS	99,2 fM	Peng et al., 2014
miR-141,	RGO-CNT/SPGE	CV, SWV	30 fM	Tran et al., 2013

miR-26b-1				
miR-222	SPE	DPV	7 pM	Bettazzi et al., 2013
miRNA Let-7b	Pd, Pt, GO/SPGE	CV, DPV	8 fM	Cheng et al., 2014
miR-126	CHIT/GRP tabakaları/PAMAM/GCE	CV, DPV	0,79 fM	Liu et al., 2015
Hsa-miR-21, hsa-miR-32, hsa-miR-122	AuNPs/SPE	SWV, EIS	0,4 fM	Labib et al., 2013
miR-29b-1, miR-141	CoTCPP/RGO/GCE	CV, SWV	-	Souza et al., 2014
miR-21	Altın elektrot	CV	10 fM	Wen et al., 2013
miR-34a miR-15a	PGE	CV, EIS	-	Congur et al., 2015

miR-155				
miR-660				
miR-34a	CNF/SPE	DPV, EIS	54 pmol	Erdem et al., 2015
miR-15a				
miR-660				
miRNA-let-7b	ITO elektrot	CV	0,2 pM	Gao et al., 2007b
miR-92				
miR-320				
miR-21	PGE	DPV	6 pmol	Kilic et al., 2012
miR-192				
miR-21	SPCE	DPV	9 fM	Ma et al., 2016

PNA Biyosensörleri

Peptit nükleik asitler, DNA biyosensörleri için heyecan verici fırsatlar sunmaktadır. Çözelti fazındaki PNA, eşsiz yapısı, hibridizasyon ve teşhis etme özellikleri sayesinde DNA biyosensörleri tasarımında dönüştürücü yüzeylere

kolaylıkla modifiye edilebilir. PNA tabakalarının yüzey-kaplama aracı olarak kullanılması DNA biyosensörlerine olağanüstü dizi spesifikliği kazandırır.

DNA benzerlerinin bu şekilde kullanımı DNA tanılarında büyük avantajlar sunar. PNA problemleri birbirine yakın diziler arasındaki ayrımı görmeyi sağlarken, spesifik olmayan adsorpsiyon etkilerinin de ortadan kalkmasında ve büyük DNA parçalarındaki dizilerin saptanmasında rol oynar. PNA ve DNA arasındaki yük farklılığı spesifik olmayan DNA eşleşmelerinin de asgariye indirilmesi konusunda yardımcı olabilmektedir (Wang, 1999).

LNA Biyosensörleri

LNA'lar oligonükleotidlere dayalı birçok moleküler biyoloji tekniğinin hassasiyetini ve özgüllüğünü arttırmaya yardımcı olmaktadır. LNA'lar dsDNA ile hibridize olduğunda düşük toksisite, nükleaz sindirimine direnç, gelişmiş tripleks oluşumu ve standart kimyasal yöntemlerle sentezi gibi biyolojik sensör geliştirilmesine yönelik birçok mükemmel özelliğe sahiptir.

LNA problemlerinin yüksek kimyasal kararlılığı ve enzimatik bozunmaya dirençleri, LNA tabanlı biyosensörlerin geniş biyolojik numuneler yelpazesinde kullanılmasına olanak sağlar. Bu özellikler mevcut bazı DNA biyosensörlerinin biyoteknoloji ve tıbbın farklı disiplinlerinde uygulanabilirliğini sağlayacak analitik araçların oluşturulmasında büyük rol oynamaktadır (Briones and Moreno, 2012).

2.3.1 Elektrokimyasal nükleik asit biyosensörlerinin tasarımında kullanılan nanomalzemeler

Nanoteknoloji, maddenin nanometre boyutunda, yani atomsal, moleküler ve supramoleküler yapılar düzeyinde denetlenmesi yoluyla yeni malzeme, cihaz ve sistemlerin tasarlanmasını ve üretilmesini konu alan bir teknoloji dalıdır. Günümüzde birçok sektörde devrim niteliğinde bir potansiyele sahip olan ve heyecan verici bir hızla gelişen nanoteknoloji başka bir ifadeyle, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, düzenlenmesi ve tasarlanması olarak tanımlanmaktadır. Nano birimi ile 100 – 0.1 nanometre (nm)

(10-7 metre ile 10-10 metre) arasındaki herhangi bir büyüklük ifade edilmektedir. Bugün bilim adamları bu nano-ölçekteki olguları ve yöntemleri öğrenmeye ve kendi kendini çoğaltabilen, denetleyebilen, kontrol edebilen, onarabilen araçlar, malzemeler ve yapılar oluşturmaya çalışmaktadırlar. Nanoteknolojinin günümüzde diğer bilim dallarına sağladığı avantajlar ve bunu takiben hemen hemen her alanda hızlı bir ilerlemenin kaydedilmesi sonucunda, bilim ve teknolojiye yeni ufuklar açılmaya başlamıştır. Nanoteknoloji ile üretilen nanopartikül, nanotüp ve nanokablolara gibi gelişmiş fizikokimyasal özelliklere sahip nanomalzemeler, biyomoleküler algılamaya yönelik elektrokimyasal sensörlerin daha seçici ve daha hassas bir şekilde geliştirilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. (Cai et al., 2003; Chen et al., 2001; Caliskan et al., 2009; Erdem et al., 2006, 2007a, b, 2010; McFarland and Duyne 2003; Guo et al., 2004; Hahm and Lieber, 2004; Karadeniz et al., 2007a; Koehne et al., 2004; Luo et al., 2006; Merkoçi et al., 2005; Musameh et al., 2002; Ozsoz et al., 2003; Ravindran et al., 2003; Salem et al., 2004; Yapasan et al., 2010; Wildgoose et al., 2006; Wu et al., 2003).

Nano boyutlardaki nanomalzemeler sensör tasarımlarında;

- Enzim, DNA, protein vb. gibi biyolojik moleküllerin elektrot yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırmak,
- Elektrokimyasal reaksiyonların gerçekleşme süresini kısaltmak,
- Biyomalzemeleri nanobarkotlarla etiketlemek,
- Biyomoleküler etkileşim/tanıma reaksiyonu sonucunda duyarlı sinyallerin elde edilmesini sağlamak,
- Tanıma yüzeyi ve/veya çevirici bölümün küçültülebilmesi

gibi amaçlar için kullanılmakta, bu durum aynı zamanda, biyosensörlerin boyut olarak da minyatürize edilebilmesine olanak sağlamaktadır (Erdem et al., 2006, 2007a; Katz et al., 2004; Luo et al., 2006; Merkoçi et al., 2005; Musameh et al.,

2002; Patolsky and Lieber, 2005; Pumera et al., 2007; Vaseashta 2005; Wang 2005a, 2005b; Wildgoose et al., 2006).

DNA analizlerine yönelik biyosensör çalışmalarında nanopartiküllerin elektrot yüzeyine modifiye edilme işlemi son yıllarda çok sık kullanılan bir yöntemdir. Diğer nanomalzemelerin kullanımında olduğu gibi nanopartikül ile modifiye edilmiş sensörün yüzey alanı büyür ve immobilize olan DNA miktarı artar. Ayrıca DNA hibridizasyonu için daha düşük tayin sınırları ve nanopartiküller kullanılarak elde edilen kararlı yüzey nedeniyle daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahip sonuçlar elde edilmektedir.

Elektrot yüzeyine modifiye edilen nanomalzemeye göre çeşitli elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımları yapılabilmektedir. Örneğin; *polimer* (*polipirol*, *poli(vinil ferrosen)*, *poli[pirol-ko-4-(3-pirol)bütanoik asit]* vb.) (Ramanavicius et al., 2006, Kuralay et al., 2008, Peng et al., 2005, 2006), *karbon nanotüp* (Erdem 2007; Wang 2005c, Karadeniz et al., 2008, Çalışkan et al., 2009; Erdem et al., 2010; Yapasan et al., 2010), *iyonik sıvı (IL)*, *nanopartikül*, *grafen*, ***grafen oksit*** (Sun et al., 2009; Li et al., 2014; Qi et al., 2012; Erdem et al., 2012a, Olenych et al., 2016) *modifiye elektrokimyasal DNA biyosensörleri* vb.

2.4 Grafen ve Grafen Türevi Nanomalzemeler

Grafen, sp^2 hibritleşmesine sahip karbon atomlarının bal peteği örgüsü oluşturmasıyla meydana gelen iki boyutlu düzlemsel yapıdaki nanomalzemedir. Çok güçlü karbon-karbon bağlarıyla iki boyutlu düzlemsel yapısını kazanan ve iki yönde sonsuza kadar uzanan bir örtü görünümündeki grafen;

- Bilinen ilk iki-boyutlu nanomalzemedir (Geim and Novoselov, 2007).
- Kusursuz fiziksel, kimyasal, elektriksel, termal ve optik özelliklere sahiptir (Geim and Novoselov, 2007; Novoselov et al., 2005).
- İki boyutlu yapısı sayesinde çok geniş bir yüzey alanı sunar (Geim and Novoselov, 2007; Novoselov et al., 2005).

- Yapısı, kimyasal işlemlerle modifikasyona müsaittir.
- Kontrol edilebilir elektronik özelliklere sahiptir (Zeng et al., 2013).
- Nanopartiküller (Kong et al., 2014) nanotüpler (Yang and Li, 2014) ve nanokablolar (Huang et al., 2014) gibi pek çok farklı nanomalzeme ile kombine edilerek kullanılabilir.
- Çeşitli (biyo)polimerler ile sağlam nanokompozit yapılarının oluşturulmasını sağlar (Liu et al., 2014; Su et al., 2014; Thammasoontaree et al., 2014; Trigueiro et al., 2014; Xue et al., 2014; Zhang et al., 2014).
- Grafen oksit, indirgenmiş grafen (Eda et al., 2008) gibi farklı formları araştırmacılar tarafından sentezlenebilmiştir (Xue et al., 2014; Liu et al., 2014; Erdem et al., 2012a; 2014a; Muti et al., 2011; Wang et al., 2009b).

Erdem ve arkadaşları tarafından (Erdem et al., 2012a) geliştirilmiş nükleik asit tayini için ve anti-kanser ilaç olan mitomisin C ile DNA arasındaki etkileşimin hassas bir şekilde incelenebilmesi için grafen oksit modifiye tek kullanımlık elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Bu çalışmayla grafen oksit modifiye edilmiş PGE'lerin nükleik asit ve ilaçların tayininde kullanılabilecek hızlı ve duyarlı bir biyosensör platformu olacağı literatürde ilk kez rapor edilmiştir.

Xue ve arkadaşları (Xue et al., 2014), hassas ve seçici bir serotonin tayini için, indirgenmiş grafen oksit (rGO)/polianilin (PANI) nanokompozitleri ve moleküler olarak işaretlenmiş polimerlere (MIP) dayalı altın nanopartiküller (AuNP) ile çift katmanlı membran algılama yüzeyi tasarlamıştır. Bu çalışmada, yalnızca yüzey seçimliliği değil aynı zamanda işaretli membranın iletkenliği ve elektrokatalitik etkinliğinin artırıldığı da gösterilmiştir.

Sayılan üstün özellikleri sayesinde, grafen ve türevi nanomalzemeler iletken filmlerin oluşturulmasında (Wassei and Kaner, 2010), (bio)sensör tasarımlarında (Alwarappan et al., 2009; Cheng et al., 2010; Xue et al., 2014; Zhang et al., 2014;

Wu et al., 2014; Liu et al., 2014; Erdem et al., 2012a; Muti et al., 2011; Erdem et al., 2014a), yakıt pillerinde (Wang et al., 2009a), süper kapasitörlerde (Wang et al., 2009b; Trigueiro et al., 2014) ve elektronikte (EDA, 2008) kullanılmaya başlanmıştır.

2.4.1 Grafen oksit

Grafenin yapısının aydınlatılması sonrasında pek çok farklı formu sentezlenmiştir, bunlardan bir tanesi de grafen oksittir (GO). GO, kimyasal gruplarca aktif grafenin büyük kapasiteyle ve en ucuz bir şekilde üretilebildiği formudur. Grafitin önce kimyasal oksidasyon ile grafit oksite dönüştürülmesi ve ardından eksfoliasyon işlemiyle elde edilebilen GO, kompozit malzemelerin üretilmesinde en ümit vaat eden tabakalı yapıdaki nanomalzemelerden biridir. Yapısındaki karbonil, epoksi ve karboksilik asit grupları sayesinde organik ve inorganik gruplarla etkileşime girebilir. Geniş yüzey alanı sunduğundan modifiye edildiği yüzeyin immobilizasyon ve adsorpsiyon kapasitesini artırır (Yang et al., 2015). Yine oksit grupları sayesinde grafene kıyasla çözeltilerde ve organik çözücülerde çok daha iyi çözünür yapıdadır (Dreyer et al., 2010). Sahip olduğu üstün özellikleri sayesinde GO'ya dayalı pek çok (biyo)sensör tasarımı literatürde bulunmaktadır.

2.4.1.1 Grafen oksit modifiye elektrokimyasal biyosensörler ve uygulamaları

Nanomalzemelere dayalı biyosensör tasarımlarında, nanomalzemelerin üstün fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri sayesinde daha seçimli ve duyarlı analiz platformları oluşturulabilmekte; bu biyosensör tasarımları nanomalzemeler sayesinde küçültülerek çip teknolojisine uyarlanabilmektedirler. Grafenin bahsedilen üstün özellikleri sayesinde, biyosensörlerin önemli bir grubunu oluşturan nükleik asit biyosensörlerinin geliştirilmesine yönelik uygulamaları bulunmaktadır. Grafenin farklı formlarına dayalı olarak geliştirilen nükleik asit biyosensörleri Tablo 2.2'de verilmiştir. Örneğin; *Salmonella enterica*'nın elektrokimyasal tayini için camı karbon elektrot (GCE) yüzeyi grafen oksit ve altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş, bu elektrot yüzeyinde *Salmonella*

enterica ile aptamerinin etkileşimi elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile tayin edilmiştir. Geliştirilen grafen oksit temelli aptasensörün seçimliliği *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* varlığında test edilmiş; *Salmonella enterica*'ya ait gözlemlenebilme sınırı (DL) 3 cfu/mL olarak bulunmuştur (Ma et al., 2014). Başka bir çalışmada, insan trombininin grafen oksit temelli aptasensör ile florimetrik tayinine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Luet et al., 2009). Bu amaçla araştırmacılar grafen oksiti sentezlemişler ve bir floresans boyası ile işaretli aptamer ile trombinin etkileşimini florimetrik olarak izlemişlerdir. Geliştirilen aptasensörün seçimliliği sığır serum albümini (BSA), immunoglobulin G (IgG), insan serum albümini ve sığır trombini varlığında test edilmiştir. Bu çalışmada insan trombinine ait gözlemlenebilme sınırı 2 nM olarak bulunmuştur.

Hajihosseini ve arkadaşları (Hajihosseini et al., 2016), grafen oksit-altın nanopartikül modifiye camı karbon elektrot ve ölçüm yöntemi olarak diferansiyel puls voltametri yöntemini kullanarak, *Helicobacter pylori* tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişler ve redoks indikatörü olarak oracet blue (OB) kullanmışlardır. *Helicobacter pylori* için tayin sınırının 27 pM olarak bulunduğu saptanmıştır. Akhavan ve arkadaşları (Akhavan et al., 2012), indirgenmiş grafen nanotabaka ve nanoduvallarının sentezini gerçekleştirmişler; bu nanoyapılarla modifiye GCE yüzeyinde tek nokta polimorfizminin (SNP) diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniği ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaya ait DL, grafen nanotabaka ile modifiye GCE ile $5,4 \pm 3.5$ fM; grafen nanoduvallar ile modifiye GCE ile $9,4 \pm 5,4$ zM olarak bulunmuştur.

Bir başka çalışmada (Wang et al., 2016) SPR teknolojisiyle miRNA tayini yapan bir biyosensör üretilmiş ve kullanılan platform grafen oksit-altın nanopartikül (GO-AuNPs) hibritleriyle modifiye edilmiştir. Bu çalışmada, miRNA tayini iki aşamada gerçekleştirilmiş olup bunlardan ilkinde; DNA probunun altın film üzerine immobilize edilip hedef miRNA'nın bir bölümünün tayinini sağlamak, diğer adımda ise yardımcı DNA bağlanmış GO-AuNPs hibritlerine hedef miRNA'nın kalan kısmının bağlanarak tayinin gerçekleştirilmesi

aşamasının izlendiği görülmüştür. DL değeri 1fM değerinin altında bulunmuştur (Wang et al., 2016).

DNA hibridizasyonu tayinine yönelik Yola ve arkadaşları (Yola et al., 2014), tarafından gerçekleştirilen çalışmada, GCE yüzeyi Fe-Au nanopartükülleri ve 2-aminoethanethiol ile fonksiyonlandırılan grafen oksit (Wang et al., 2011) ile modifiye edilmiştir. Elektrokimyasal indikatör kullanılarak CV, SWV ve EIS teknikleri ile DNA hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiş ve tayin sınırı (DL), 2×10^{-15} M olarak bulunmuştur. DNA hibridizasyon tayinine yönelik GCE ile yapılan diğer bir çalışmada (Gupta et al., 2014), elektrot yüzeyi p-aminotiyofenol (ATP) içeren Au nanopartükülleri ile fonksiyonlandırılan grafen oksit ile modifiye edilmiştir. Bu çalışmada hedef DNA dizisine ait gözlemlenebilirlik sınırı 1×10^{-14} M olarak hesaplanmıştır.

Muti ve arkadaşları tarafından Hepatit B Virüsü (HBV) hastalığının tayinine yönelik olarak grafen oksit modifiye tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE) geliştirilmiştir (Muti et al., 2011). Grafen oksit modifiye PGE'lerin elektrokimyasal karakterizasyonu EIS tekniği ile, mikroskopik karakterizasyonu ise TEM yöntemi ile yapılmıştır. DPV ile ölçülen guaninin yükseltgenme sinyaline dayalı analizlerin gerçekleştirildiği bu çalışmada, tek bazı hedeften farklı DNA dizisi ve rastgele DNA dizisi varlığında biyosensörün seçiciliği test edilmiştir. Bu çalışmaya ait DL 2,02 μ M olarak bulunmuştur. Diğer bir çalışmada, grafen oksit modifiye PGE'ler ile çift sarmal DNA (dsDNA) ile bir antikanser ilaç olan mitomisin C (MC) nin etkileşimi incelenmiş (Erdem et al., 2012b); bu etkileşim DPV ve EIS teknikleri ile tayin edilmiştir. Bu çalışmada DL 9,06 μ g/mL olarak bulunmuştur. Erdem ve arkadaşları tarafından lizozim proteininin kitosan ve grafen oksit nanokompozit yapısı ile modifiye PGE'lere dayalı geliştirilen empedimetrik aptasensör ile tayini gerçekleştirilmiştir (Erdem et al., 2014a). Geliştirilen aptasensörün trombin ve sığır serum albüminine (BSA) karşı seçiciliği test edilmiş; bu çalışmaya ait DL 28,53 nM olarak bulunmuştur.

Tablo 2.2. Nükleik asit analizlerine yönelik grafen temelli geliştirilmiş biyosensörler. **Analitlere ait kısaltmalar:** PML/RARA: promyelositik lösemi/retinoik asit reseptör alfa, ATP: Adenozin trifosfat, OTA: Okratoksin A, HBV: Hepatit B virüsü, MC: Mitomisin C. **Kullanılan ölçüm yöntemlerine ait kısaltmalar:** CV: Dönüşümlü voltametri, SWV: Kare dalga voltametri, DPV: Diferansiyel puls voltametri, EIS: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, SPR: Yüzey plazmon rezonans teknolojisi

Analit	Kullanılan grafen türü	Ölçüm yöntemi	Gözlem- lenebilme sınırı (DL)	Kaynak
DNA metilasyonu	Grafen oksit	Kemiluminesans	0,007 U/mL	Chen and Li, 2014
DNA hibridizasyonu	Grafen oksit	CV, SWV, EIS	2,0 x 10 ⁻¹⁵ M	Yola et al., 2014
Tek nokta polimorfizmi	İndirgenmiş grafen nanotabaka ve nanoduvlarlar	DPV	5,4 ± 3,5 fM; 9,4 ± 5,4 zM	Akhavan et al., 2012
Trombin	Grafen oksit	Floresans	2 nM	Lu et al., 2009
miRNA-21	Grafen	Kronoamperometri	0,06 pM	Yin et al., 2012b
Nukleolin	Grafen	CV, EIS	794 hücre/mL	Feng et al., 2011
DNA hibridizasyonu	Elektrokimyasal olarak indirgenmiş	CV, EIS, DPV	5 aM	Dong et al., 2012b

	grafen oksit			
<i>Salmonella enterica</i>	Grafen oksit	Kolorimetri	8 nM	Thavanathan et al., 2014
miRNA-159	Grafen	EIS, DPV	0,17 pM	Zhou et al., 2014b
Hg ²⁺	Grafen oksit	Fotoelektrokimyasal -amperometri	3,33 fM	Li et al., 2014
Trombin	Grafen	QCM	0,182 nM	Zhang et al., 2014
Endotoksin	Grafen	DPV, CV, EIS	8,7 fg/mL	Bai et al., 2014
Lizozim	Grafen oksit	EIS	28,53 nM	Erdem et al., 2014a
interferon- γ	İndirgenmiş grafen oksit	Floresans	0,1 ng/mL	Kim et al., 2014
<i>Salmonella enterica</i>	Grafen oksit	EIS	3 cfu/ mL	Ma et al., 2014
DNA hibridizasyonu	Grafen	CV, DPV, EIS	3,2 x 10 ⁻¹⁵ M	Huang et al., 2014
DNA hibridizasyonu	Grafen oksit	Kolorimetri	750 x 10 ⁻¹² M	Li et al., 2014a
Trombin	Grafen oksit	Floresans	3 ng/mL	Li et al., 2014b
ATP	Grafen oksit	Kemiluminesans	1,4 nmol	Song et al., 2014

OTA	İndirgenmiş grafen oksit	EIS	0,74 pM	Jiang et al., 2014
Kokain	Grafen oksit	Floresans	190 nM	Qiu et al., 2013
PML/RARA	Grafen oksit	CV, EIS	$3,2 \times 10^{-14}$ mol/L	Yang et al., 2013b
Creutzfeldt–Jakob Hastalığı	Grafen oksit	Kemiluminesans	0,25 nM	Choi et al., 2013
DNA hibridizasyonu	Grafen oksit	CV, EIS	$1,10 \times 10^{-14}$ M	Gupta et al., 2013
DNA hibridizasyonu	Grafen oksit	DPV, CV	$3,5 \times 10^{-15}$ M	Han et al., 2013
HBV	Grafen oksit	EIS, DPV	2,02 μ M	Muti et al., 2011
MC, dsDNA	Grafen oksit	DPV	9,06 μ g/mL	Erdem et al., 2012a
miRNA let-7 ailesi	Grafen oksit	Floresans	9 pM	Cui et al., 2012
miR-141	İndirgenmiş grafen oksit	CV, SWV	30 fM	Tran et al., 2013b
miR-29b-1, miR-141	İndirgenmiş grafen oksit	SWV	8 fM	Tran et al., 2013a
miRNA Let-7b	Grafen oksit	CV, DPV	3,55 fM	Cheng et al., 2014

miR-126	Grafen tabakaları	CV, DPV	0,79 fM	Liu et al., 2014
BCR/ABL fusion gen	Grafen tabakaları	CV, EIS, DPV	2,11 pM	Wang et al., 2014
miR 29b-1, miR-141	İndirgenmiş grafen oksit	CV, SWV	-	Souza et al., 2014
miR-16 miR-21 miR-26a	Grafen oksit	Floresans	2,1 fM	Dong et al., 2012a
PNA-DNA hibridizasyonu	Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit	CV	$5,45 \times 10^{-13}$ mol/L	Du et al., 2013
<i>Helicobacter pylori</i>	Grafen oksit	DPV	27 pM	Hajihosseini et al., 2016
miR-21 miR-125b miR-96	Grafen tabakaları	Floresans	1 pM	Ryoo et al., 2013
miR-21	Grafen oksit	Kemiluminesans, Floresans, Kolorimetri, LSV	60 fM	Sun et al., 2015
miR-141 miR-429	Grafen oksit-AuNPs	SPR	1 fM	Wang et al., 2016

miR-200a				
miR-21				

2.4.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope-SEM), elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile tasarlanmış, yüksek büyütmelemlerle üzerinde analiz yapılabilecek görüntülerin elde edildiği, elektro-optik prensiplerle çalışan cihazlardır (<http://www.mos.org/sin/SEM>). Taramalı elektron mikroskobu, birçok alanda, araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımının yanında, mikro elektronikte, hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır.

Taramalı elektron mikroskobunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucu meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sistemler dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

Deneyler ve ölçümler sırasında kullanılan tüm cihazlar ve donanımlar:

Terazi (Mettler Toledo AB204-S)

Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex)

pH-metre (Orion 420A)

Manyetik karıştırıcı (Biosan MS 3000)

Vorteks (Biosan V1)

Potansiyostat (μ -AUTOLAB ve AUTOLAB 30; sırasıyla GPES 4,9 ve NOVA 1,11 yazılımlı; Eco Chemie, Hollanda)

Kalem grafit elektrot (tek kullanımlık grafit elektrot; PGE)

Grafit kalem ucu (Tombo, 0.5 HB)

Ag/AgCl referans elektrot (BAS)

Platin tel (yardımcı elektrot olarak kullanıldı).

Faraday kafesi

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Grafen oksit

Dimetilsülfoksit (Sigma)

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimidhidroklorür (Sigma)

N-hidroksisüksinimid

Asetik Asit (% 99-100) (Sigma)

Hidroklorik Asit (% 37) (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Dipotasyum mono hidrojen fosfat (Riedel-de Haen)

Potasyum dihidrojenfosfat (Riedel-de Haen)

Tris (hidroksimetil) amino metan hidroklorür (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

EDTA disodyum tuzu (Sigma)

Potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat (Sigma)

Potasyum hekzasiyanoferrat(III) (Sigma)

Potasyum klorür (Sigma)

Oligonükleotit dizileri

Çalışmamızda model miRNA dizisi olarak seçilen miRNA-34a, Alzheimer hastalığının (Cogswell et al., 2008; Culpan vd., 2011; Wang et al., 2009c; Bhattacharjee et al., 2014; Schipper, 2007) ve farklı kanser türlerinin (Patel et al., 2013; Lize et al., 2010; Chang et al., 2008; He et al., 2007a; Raver-Shapira et al., 2007; Welch et al., 2007; Corney et al., 2010; Jansson et al., 2012) biyobelirteci olarak bilinmektedir. Çalışmamızda GO-PGE'lere dayalı geliştirilen elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri ile miRNA-34a voltametrik yöntemle

tain edilmiştir. Bu kapsamda, inozin substitüye miRNA-34a'ya spesifik DNA probu ile miRNA-34a hedef dizisi arasında gerçekleştirilen nükleik asit hibridizasyonu sonrasında, +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyali, diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemi ile ölçülmüştür.

miRNA-34a DNA probu:

5'-NH₂-(CH₂)₆ - ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC A-3'

İnozin süstitüye miRNA-34a DNA probu:

5'-NH₂- C₆ – ACA ACC AXC TAA XAC ACT XCC A- 3' (X= İnozin)

miRNA-34a RNA target:

5' -UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U-3' (U=Urasil)

miRNA-15a:

5'-UAG CAG CAC AUA AUG GUU UGU G-3'

miRNA-16:

5'-UAG CAG CAC GUA AAU AUU GGC G-3'

miRNA-155:

5'-UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GU-3'

miRNA-660:

5'-UAC CCA UUG CAU AUC GGA GUU G-3'

3.3 Kullanılan Malzemelerin ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1 Tampon çözeltilerin hazırlanışı

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında ultra saf su kullanıldı. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra cam şişelerde, buzdolabında saklandı.

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,40; PBS):

Kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 , 6,69 g (0,04 mol) K_2HPO_4 ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,40 olmaktadır. Çözeltinin pH'ı gerekliyse, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pH metre ile 7,40'a ayarlandı.

0,05 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,80; ABS):

Kullanılan 0,05 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,2722 g sodyum asetat trihidrat, 0,1154 mL asetik asit ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'ının 4,80 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,00; Tris-EDTA):

0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1,576 g Trizma HCl ve 0,372 g EDTA içermektedir. Çözeltisinin pH'sının 8,00 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve/veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

Redoks probu çözeltisinin hazırlanışı: Empedans ölçümleri için: $2,5 \times 10^{-3}$ mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 100 mM KCl içerecek şekilde 200 mL saf su içerisinde, CV ölçümleri için: 2×10^{-3} mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 100 mM KCl içerecek şekilde 200 mL saf su içerisinde hazırlandı.

3.3.2 Kullanılan grafit elektrodun (PGE) hazırlanışı

Çalışmalarımızda kullanılan tek kullanımlık grafit elektrot (PGE), Tombow kalem uçlarının 3,0 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (Erdem and Ozsoz 2001a, 2001b; Erdem et al., 2005, 2006, 2010, 2012a, 2012b) 1,0 cm'lik kısmı elektrokimyasal hücre içerisinde kalacak şekilde kalem içerisine yerleştirildi.

Çalışmalarımızda gerektiğinde, PGE'nin yüzey aktivasyonu, 30 saniye süreyle +1,4 V uygulanarak ABS (pH=4,80) içinde yapıldı.

3.3.3 Kalem grafit elektrot modifikasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.3.3.1 Kovalent bağlayıcı ajan çözeltisinin hazırlanışı (CA)

5 mM olacak şekilde EDC ve NHS tartılarak 5 mL PBS'de çözöldü.

3.3.3.2 Grafen oksit çözeltisinin hazırlanışı

Toz halde bulunan grafen oksit tartılarak 400 µg/mL olacak şekilde dimetil-sülfoksit (DMSO) çözeltisi içerisinde, 1 saat süren sonikasyon işlemi ile hazırlandı.

3.3.4 miRNA dizilerinin hazırlanışı

DNA ve miRNA dizileri, 500 µg/mL konsantrasyonunda Tris-EDTA tampon çözeltisi ile hazırlandı ve -20 °C'de dondurularak saklandı.

3.3.5 GO modifiye edilmiş PGE'lerin hazırlanışı

Elektrokimyasal olarak aktive edilmiş elektrotların yüzeyinde karboksil gruplarının oluşumu amacıyla, elektrotlar kovalent bağlayıcı ajan EDC/NHS (CA) çözeltisinin içerisinde 1 saat +4°C'de bekletildi. Daha sonra PBS'de yıkanarak DMSO çözeltisi içerisinde hazırlanan GO çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle

bekletildi (Erdem et al., 2017). Böylece CA ile kimyasal olarak aktive edilmiş PGE yüzeyinde yer alan amino grupları ile GO'nun karboksil grupları arasında gerçekleşen kovalent bağlanma yardımıyla (Roy et al., 2011), GO'nun PGE yüzeyine modifikasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra GO modifiye edilmiş elektrotlar 5 dakika süreyle kurutuldu.

3.3.6 Farklı GO konsantrasyonlarının elektrokimyasal dönüşümlü voltametri (CV) yöntemiyle incelenmesi

Aktive edilmiş PGE'ler, yüzeydeki karboksil gruplarının aktivasyonu amacıyla CA çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra, 10 saniye PBS'de (pH: 7,40) yıkanarak, konsantrasyonları 200, 400, 600 µg/mL olan GO çözeltileri içerisine daldırılıp 15 dakika bekletildi. Yüzey modifikasyonu gerçekleştikten sonra modifiye edilmiş PGE'ler 5 dakika kurutularak elektrokimyasal davranışları incelendi. PGE'lerin CA ile aktive edilmesi ve GO ile yüzey modifikasyonu öncesi ve sonrasında CV ölçümleri gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal dönüşümlü voltametri (CV) ölçümleri, -0,5 V ile +1,3 V arasında, 50 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde, 2 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks prob çözeltisi içerisinde yapıldı.

3.3.7 PGE ve GO-PGE'lerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskobik karakterizasyonu

PGE, CA-PGE, GO-PGE ve CA-GO-PGE'lerin mikroskobik karakterizasyonu, 1 ve 10 µm çözünürlüklerde ve 5,00 kV hızlandırma gerilimi ile alan etkili taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) olan Quanta 400 FEI kullanılarak gerçekleştirildi. SEM analizleri, İYTE-MAM (İzmir)'de hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi.

3.3.8 PGE, CA-PGE ve CA-GO-PGE'lerin CV yöntemiyle karakterizasyonu

PGE yüzeyinde CA ile sağlanan aktivasyonun ve GO modifikasyonunun etkisini incelemek amacıyla, PGE, 5 mM EDC/NHS modifiye PGE (CA-PGE) ve 400 µg/mL GO modifiye CA-PGE (CA-GO-PGE)'lerin dönüşümlü voltametri tekniği ile karakterizasyonu, 0,1 M KCl içerisinde hazırlanan, 2 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks çözeltisi içerisinde bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. CV ölçümü sonucunda elde edilen PGE, CA-PGE ve CA-GO-PGE'lere ait anodik akım değerleri, yük geçişleri ve yüzey alanları hesaplandı.

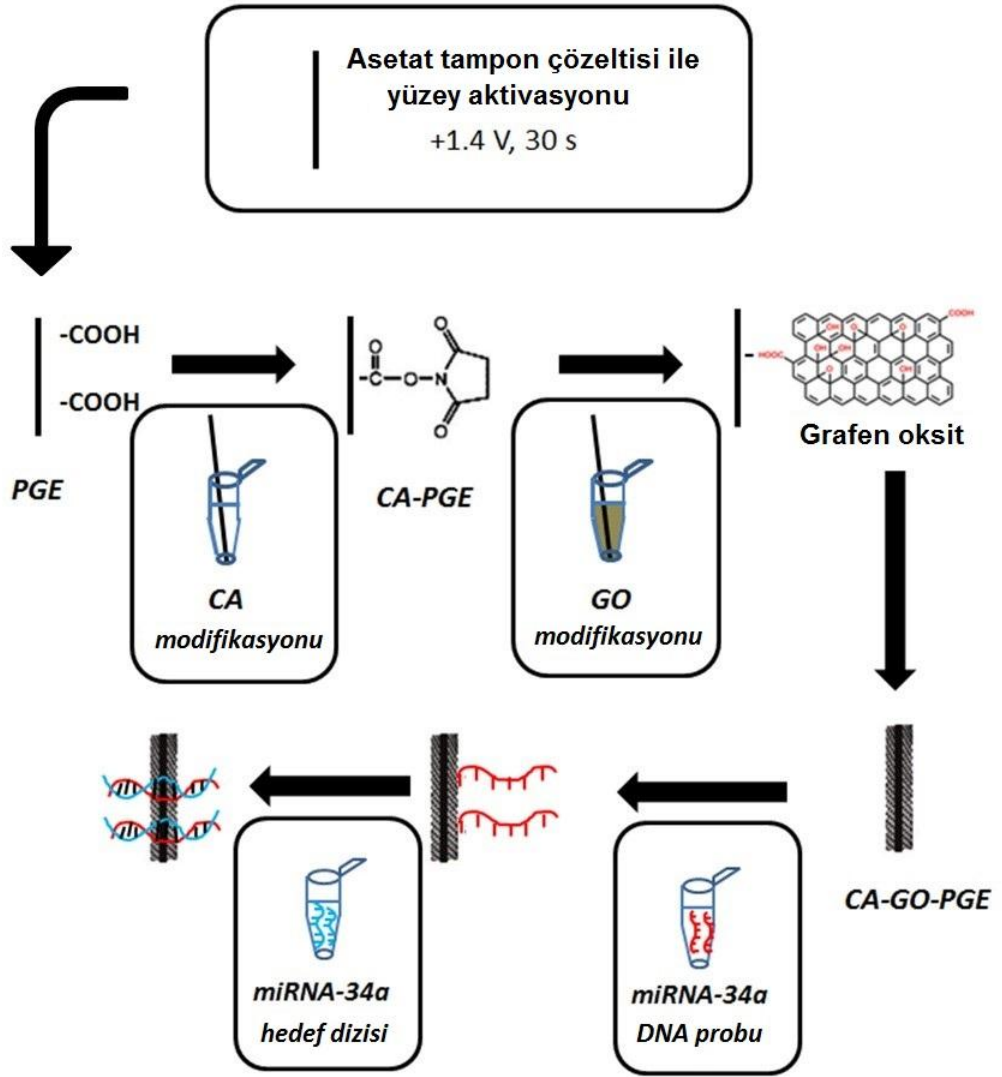
3.3.9 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'lerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterizasyonu

Elektrotların yüzey karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, PGE, CA-PGE ve CA-GO-PGE'lerin 0,1 M KCl içerisinde hazırlanan, 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks prob çözeltisi içerisinde EIS ölçümü gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri, redoks prob çözeltisi içerisinde, 100 mHz – 100 kHz frekans aralığında, 98 farklı frekansta, transfer edilen yüke karşı oluşan direnç değerleri (R_{ct}) ölçüldü.

3.3.10 miRNA-34a hibridizasyonunun voltametrik tayinine yönelik çalışmalar

miRNA-34a DNA probu ve hedef dizi miRNA-34a arasındaki hibridizasyonun verimini arttırmak amacıyla farklı parametreler için optimizasyon çalışmaları yapılarak voltametrik ölçümler gerçekleştirildi. İzlenen deneysel prosedür, Şema-3.1'de verildi. Elektrotlar, hesaplanan miktarda konsantrasyona sahip miRNA-34a DNA probuna daldırılıp 60 dakika immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra, PBS'de yıkanıp, miRNA-34a, miRNA-16, miRNA-155, miRNA-15a, miRNA-660 dizilerini içeren viyallere daldırıldı ve 60 dakika boyunca bekletilerek DNA:RNA hibridizasyonu sağlandı. Daha sonra elektrotlar, 10 saniye boyunca PBS'de yıkandı ve takiben DPV ölçümleri alındı.



Şema 3.1. PGE yüzeyinin CA ile aktivasyonu, CA-PGE yüzeyine GO modifikasyonu, DNA probun CA-GO-PGE yüzeyine modifikasyonu, elektrot yüzeyinde DNA prob ile miRNA-34a hedef dizi arasında hibridizasyonu gösteren şema.

3.3.10.1 miRNA-34a DNA prob konsantrasyonu çalışması

CA-GO-PGE' ler, 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$ amino işaretli miRNA-34a DNA prob çözeltilerini içeren viyallere daldırıldı ve 15 dakika bekletildi. Prob modifiye edilmiş CA-GO-PGE'ler 10 saniye boyunca PBS ile yıkandı. GO modifiye edilmemiş elektrotlar içinde aynı deneysel prosedür izlendi. Takiben her iki deney grubu için DPV ölçümleri gerçekleştirildi.

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ölçümleri, +0,2 V ile +1,4 V arasında, 50 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama ile ABS (pH 4,80) içerisinde yapıldı. Ham verilere ait ortalama zemin düzeltiminde, GPES programının ikinci düzeyde Savitzky & Golay filtrasyonu (0,03 pik genişliği baz alınarak) uygulandı.

3.3.10.2 Prob immobilizasyon süresi çalışması

CA-GO modifiye edilmiş PGE'ler, içerisinde 10 µg/mL prob bulunan 40 µL'lik viyallere daldırıldı ve viyaller içerisinde 5, 15, 30, 45, 60, 90 dakika bekletildi. Bu süre sonunda immobilize edilmiş PGE'ler 10 saniye PBS ile yıkandı. DPV ölçümleri, bölüm 3.3.10.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.3.10.3 miRNA-34a hedef dizi hibridizasyon süre çalışması

10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE'ler içerisinde 20 µg/mL hedef miRNA-34a bulunan viyallere daldırılıp 15, 30, 60 dakika bekletildi. Bu süreler sonunda spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla elektrotlar 10 saniye PBS çözeltisi içerisinde yıkandı. DPV ölçümleri, bölüm 3.3.10.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.3.10.4 miRNA-34a hedef dizi konsantrasyon çalışması

10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE'ler içerisinde 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 µg/mL hedef miRNA-34a bulunan viyallere daldırılıp 60 dakika bekletildi. Bu süre sonunda elektrotlar spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla 10 saniye boyunca PBS'de yıkanıp DPV ölçümleri alındı. Ölçümlerden sonra tayin sınırı hesaplaması yapıldı.

3.3.10.5 miRNA-34a DNA prob ve miRNA-34a hedef dizi hibridizasyonunda seçicilik çalışması

10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE'ler, 35 µg/mL hedef miRNA-34a ve diğer miRNA dizileri;

miRNA-16, miRNA-155, miRNA-15a, miRNA-660; ayrıca karışım örneklerinde miRNA-34a hedef dizisi ile diğer miRNA dizilerinin 1:1 oranında karışımını içeren viyallere daldırıldı ve 60 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra elektrotlar 10 saniye boyunca PBS’de yıkandı ve DPV ölçümleri alındı.

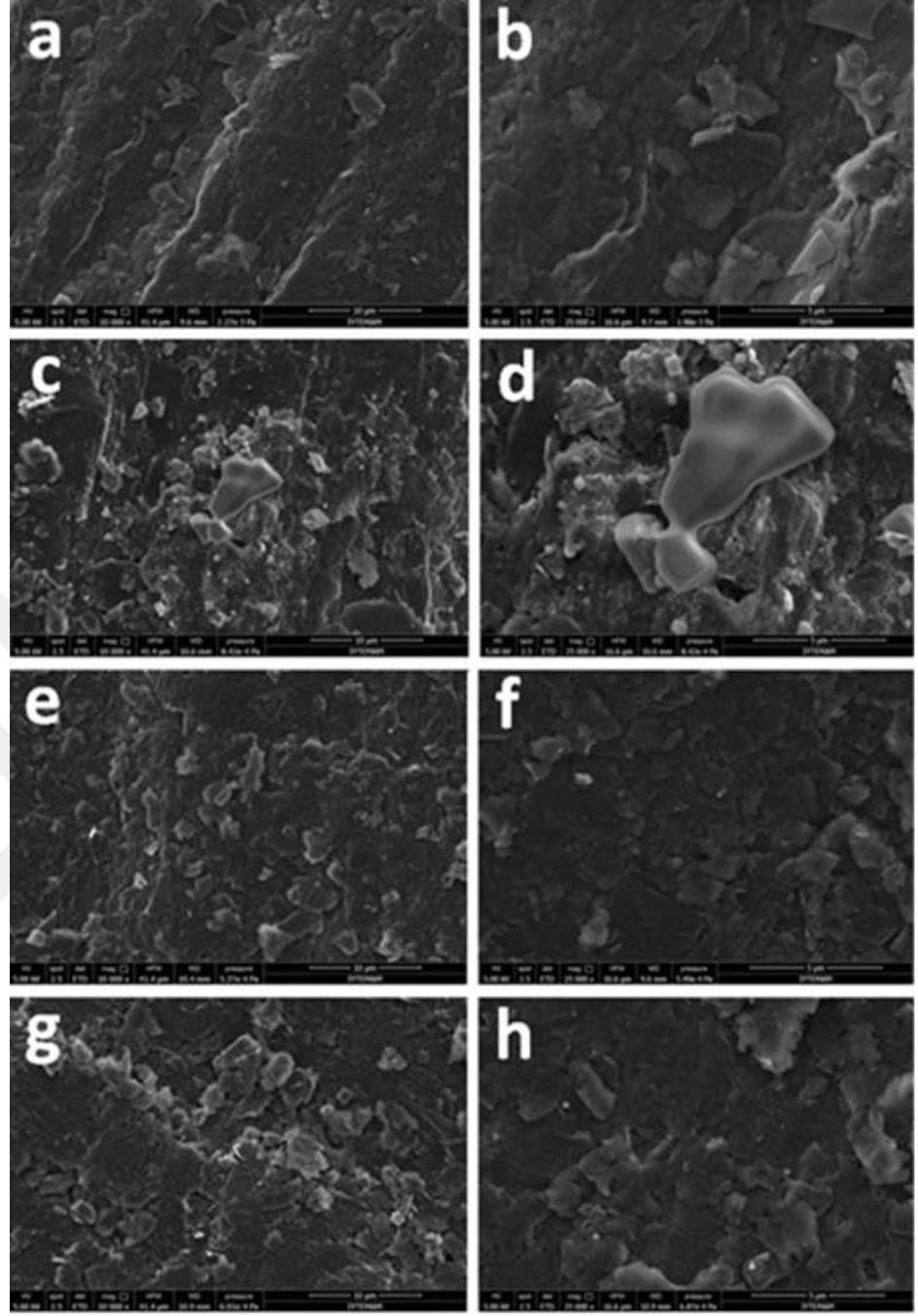


4. BULGULAR

4.1 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'nin Mikroskopik ve Elektrokimyasal Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular

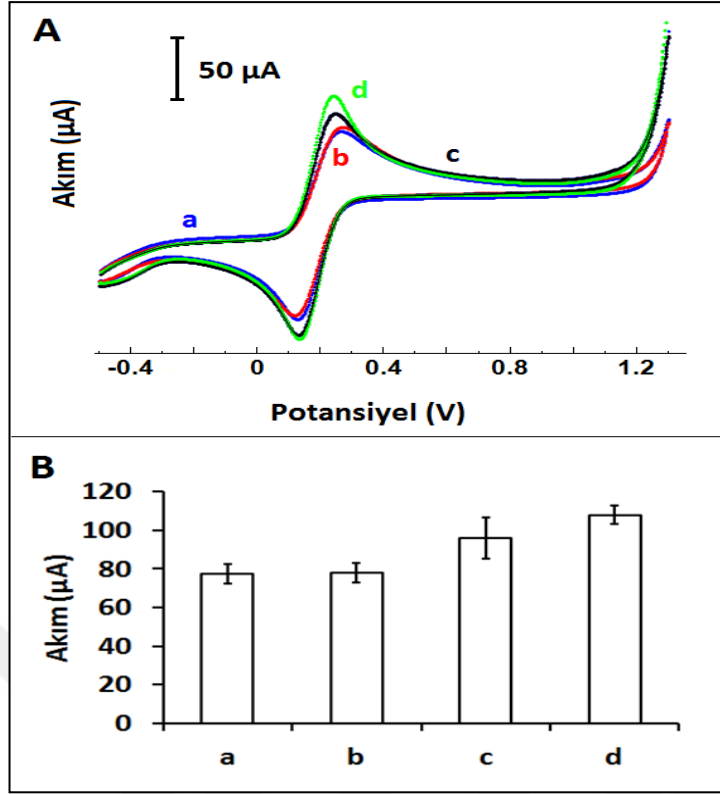
Yüzeyleri modifiye edilmemiş ve CA ve GO ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri alındı ve Şekil 4.1'de gösterildi.





Şekil 4.1. (a,b) PGE, (c,d) CA-PGE, (e,f) GO-PGE, (g,h) CA-GO-PGE’lerin sırasıyla 10 μm ve 1 μm ölçeklerde SEM görüntüleri.

PGE yüzeyinde CA ile aktivasyonun ve GO modifikasyonunun etkisini incelemek amacıyla, PGE, CA-PGE ve 400 μg/mL GO modifiye CA-PGE ’lerin dönüşümlü voltametri tekniği ile karakterizasyonu, 0,1 M KCl içerisinde hazırlanan, 2 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks çözeltisi içerisinde gerçekleştirildi.



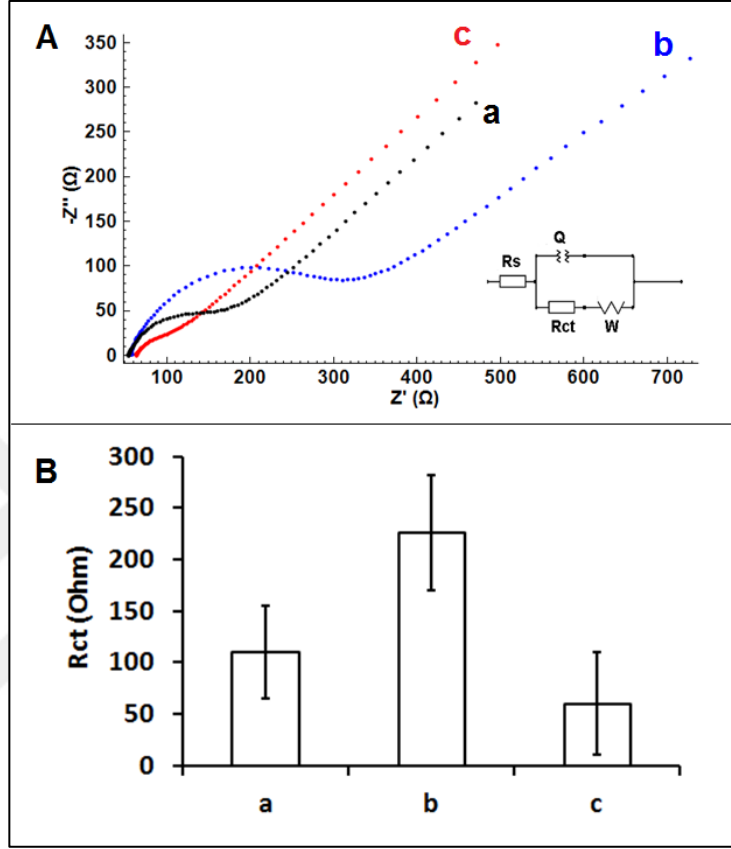
Şekil 4.2. (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) GO-PGE, (d) CA-GO-PGE'nin elektrokimyasal davranışını gösteren dönüşümlü voltamogramlar. (B) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) GO-PGE, (d) CA-GO-PGE ile elde edilen 2 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ye ait ortalama yükseltgenme sinyalini gösteren histogramlar (n=3).

CV ölçümü sonucunda elde edilen PGE, CA-PGE, GO-PGE ve CA-GO-PGE'lere ait anodik akım, yük geçişleri ve yüzey alanları hesaplandı ve Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. PGE, CA ile aktive edilmiş PGE, 400 μg/mL GO ile modifiye edilmiş PGE'ye ve 400 μg/mL GO ile modifiye edilmiş CA-PGE'ye ait ortalama anodik akım değerlerini (I_a) ve yük geçişleri (Q^+) (n=3) ile hesaplanan yüzey alan değerleri (A).

	I_a (μA)	Q^+ (C*10 ⁻⁴)	A (cm ²)
PGE	77,33 ± 5,02	13,1 ± 0,30	0,23
CA-PGE	78,05 ± 4,92	14,2 ± 0,40	0,24
GO-PGE	95,96 ± 10,67	16,4 ± 0,90	0,28
GO-CA-PGE	108,07 ± 4,55	17,2 ± 0,90	0,33

Elektrotların empedimetrik yüzey karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, PGE, CA-PGE ve CA-GO-PGE'lerin 0,1 M KCl içerisinde hazırlanan, 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks çözeltisi içerisinde EIS ölçümü gerçekleştirildi.

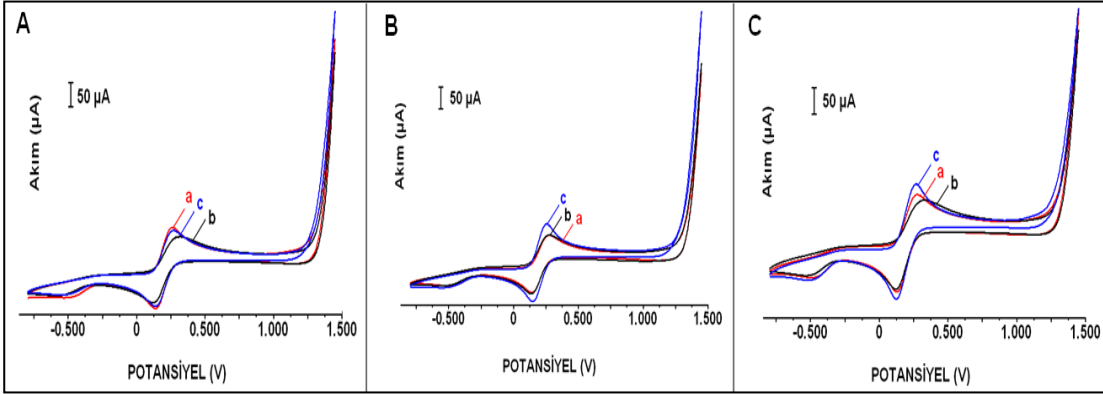


Şekil 4.3. (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-GO-PGE'ye ait 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen ölçümlere ait (A) Niquist eğrileri, (B) histogramlar (n=3). **İç şekil:** Empedans verilerini düzenlemede kullanılan eşdeğer devre modeli. İlgili parametreler; R_s çözelti direncidir. Sabit faz elementi (Q), elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki boşluk yük kapasitansına bağlıdır. R_{ct} ise elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer direncidir. Sabit faz element W, elektrot yüzeyinde kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.

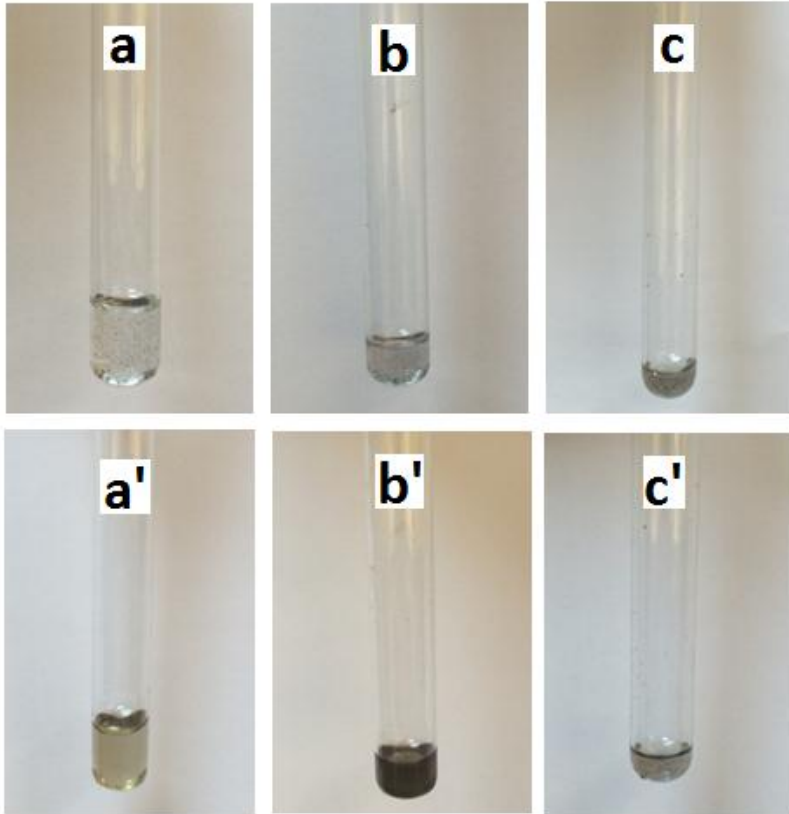
4.2 GO Konsantrasyonundaki Değişimin Elektrot Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

GO konsantrasyonundaki değişimin biyosensör yanıtına etkisi incelendi (Şekil 4.4). Farklı konsantrasyonlarda GO, PGE yüzeylerine immobilize edildi ve

CV ölçümleri gerçekleştirildi. CV yöntemiyle ölçülen sinyaldeki en fazla artış, 400 $\mu\text{g/mL}$ GO modifiye edilmiş PGE ile elde edildi.



Şekil 4.4. (A) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-PGE üzerine 200 $\mu\text{g/mL}$ GO modifikasyonu sonrası, (B) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-PGE üzerine 400 $\mu\text{g/mL}$ GO modifikasyonu sonrası, (C) (a) PGE, (b) CA-PGE, (c) CA-PGE üzerine 600 $\mu\text{g/mL}$ GO modifikasyonu sonrası elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.



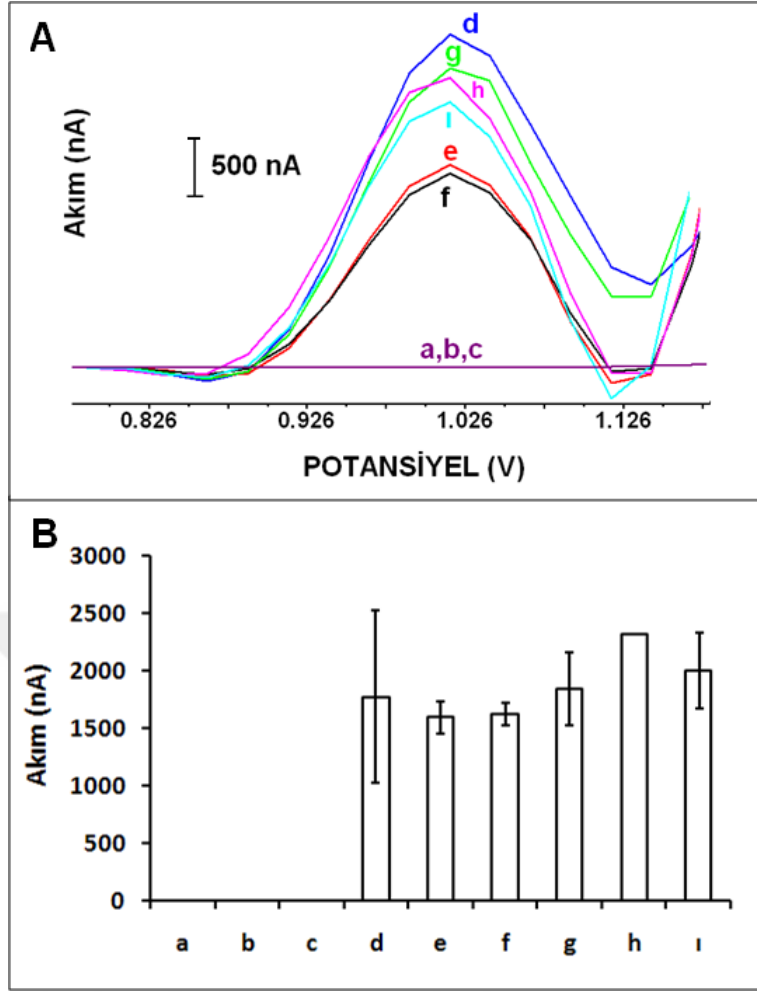
Şekil 4.5. Sonikasyon öncesi (a) 200, (b) 400, (c) 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1 saat sonikasyondan sonra (a') 200, (b') 400, (c') 600 $\mu\text{g/mL}$ GO çözeltilerinin elde edilen fotoğrafları.

GO çözeltisine uygulanan 1 saat sonikasyon işlemi sonrasında, en homojen GO dağılımının 400 µg/mL konsantrasyonunda elde edildiği saptandı.

4.3 miRNA-34a Hibridizasyonunun Geliştirdiğimiz GO Modifiye Biyosensör ile Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular

4.3.1 miRNA-34a DNA prob konsantrasyonundaki değişimin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

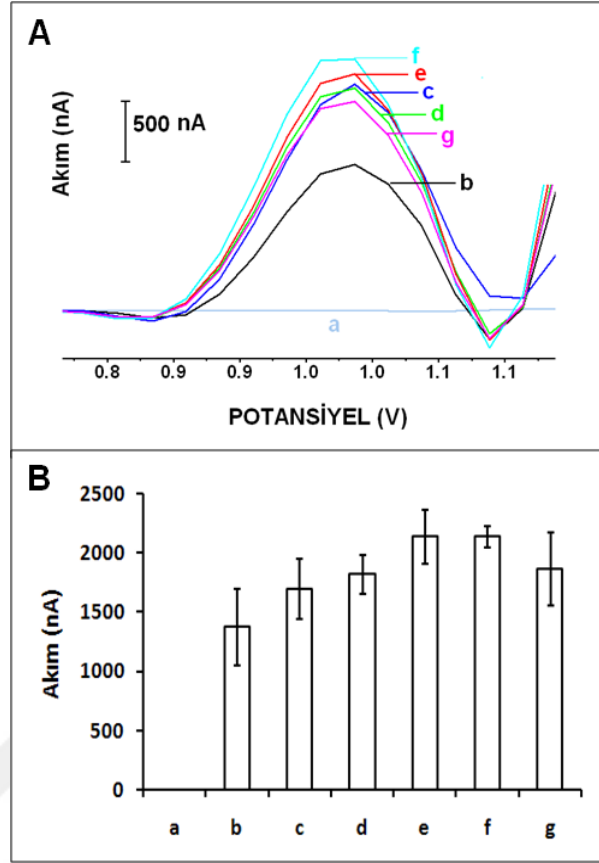
miRNA-34a DNA probun, modifiye edilmemiş, CA modifiye edilmiş ve CA-GO modifiye edilmiş PGE'lere immobilize edilerek yaklaşık +1,00 V'da ölçülen guanin sinyalindeki değişime bağlı olarak optimum prob konsantrasyonu belirlendi (Şekil 4.6). Konsantrasyonları 5-15 µg/mL arasında değişen miRNA-34a DNA probu elektrotlara immobilize edildi ve ölçülen guanin sinyalleri ve sinyallerdeki % artışlar değerlendirildi.



Şekil 4.6. (a) PGE, **(b)** CA-PGE, **(c)** CA-GO-PGE, 5 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş **(d)** CA-PGE ve **(e)** CA-GO-PGE; 10 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş **(f)** CA-PGE ve **(g)** CA-GO-PGE; 15 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş **(h)** CA-PGE ve **(i)** CA-GO-PGE yükseltgenme sinyallerini gösteren **(A)** voltamogram, **(B)** histogram.

4.3.2 Farklı prob immobilizasyon süresinin yanıt etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

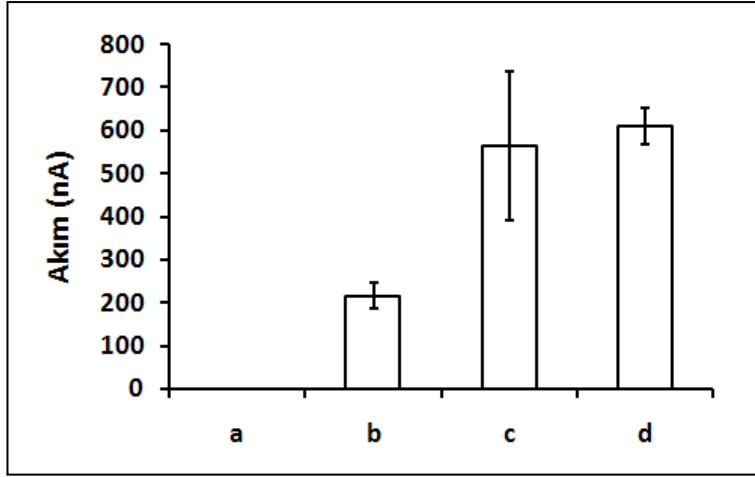
miRNA-34a DNA probun CA-GO-PGE yüzeyine immobilizasyon süresindeki farklılığın ölçülen guanin sinyaline etkisini ölçmek amacıyla, 5 - 90 dakika arasında immobilizasyon süreleri seçilerek süreye bağlı ölçülen guanin sinyalleri incelendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. (a) CA-GO-PGE, **(b)** 5 dakika **(c)** 15 dakika, **(d)** 30 dakika, **(e)** 45 dakika, **(f)** 60 dakika, **(g)** 90 dakika süreyle elektrot yüzeyine immobilize edilmiş 10 µg/mL miRNA-34a DNA prob varlığında ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren **(A)** voltamogram, **(B)** histogram.

4.3.3 Farklı hibridizasyon sürelerinde gerçekleştirilen miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

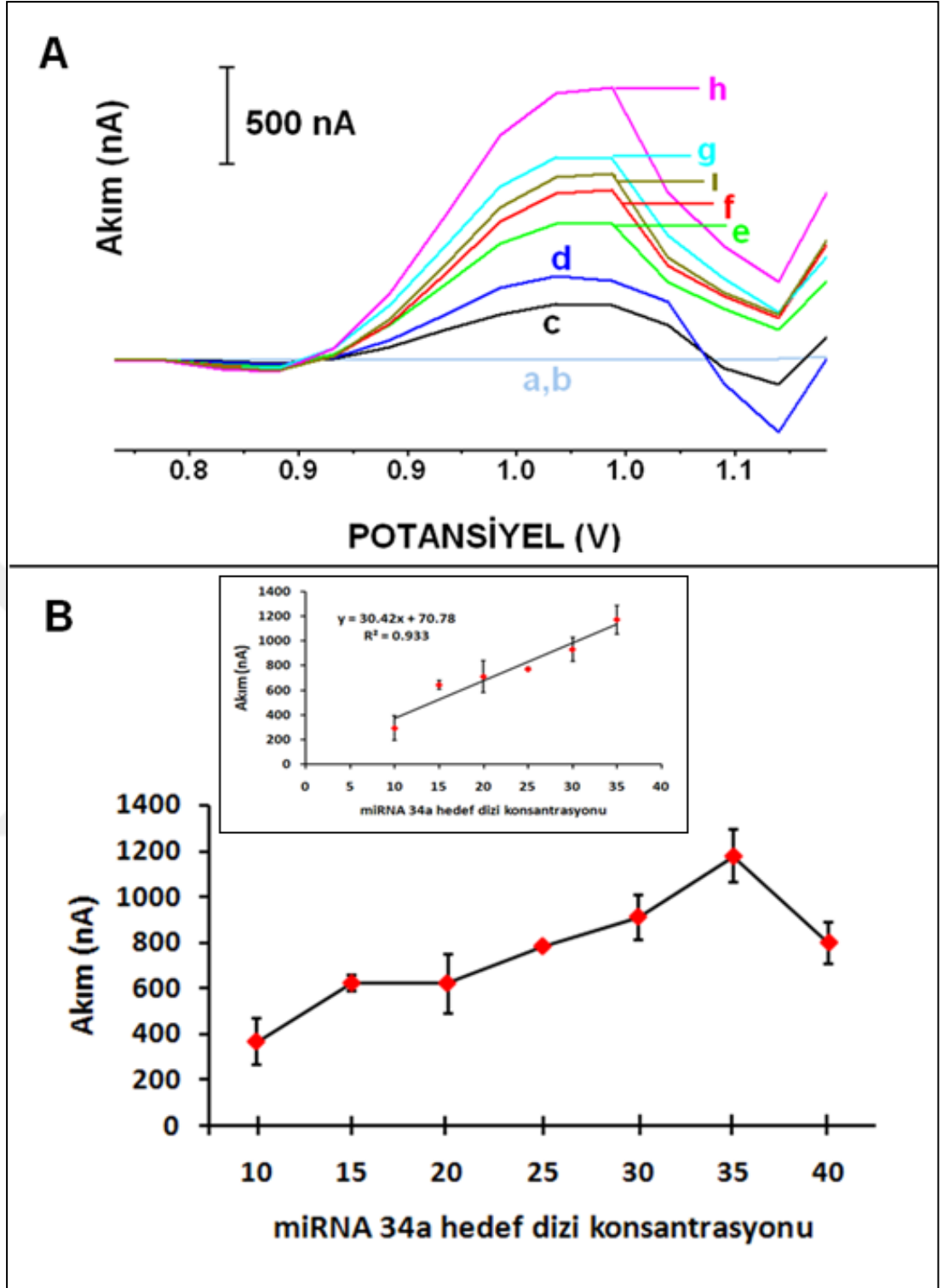
Optimum hibridizasyon süresinin belirlenmesi için 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a DNA probu ve 20 µg/mL hedef miRNA-34a hibridizasyonu 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika süreyle gerçekleştirildi.



Şekil 4.8. (a) 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA prob immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile 20 µg/mL hedef miRNA-34a'nın (b) 15 dakika, (c) 30 dakika, (d) 60 dakika hibridizasyonu sonucu ölçülen ortalama guanin yükseltgenme sinyalini gösteren histogram.

4.3.4 Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

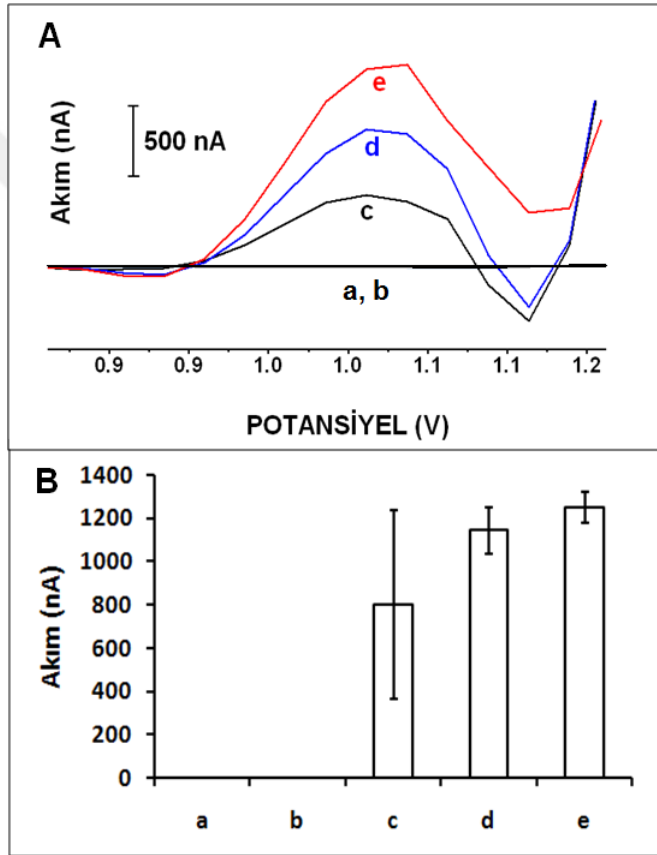
Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-34a varlığında gerçekleşen hibridizasyona yönelik ölçülen guanin sinyalindeki değişimi görmek amacıyla, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a prob ile 5-40 µg/mL konsantrasyon aralığında değişen miRNA-34a hibridizasyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. (a) 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile (b) 5 µg/mL, (c) 10 µg/mL, (d) 15 µg/mL, (e) 20 µg/mL, (f) 25 µg/mL, (g) 30 µg/mL, (h) 35 µg/mL, (i) 40 µg/mL hedef miRNA-34a'nın hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyali (A) voltamogram ve (B) histogramı. **İç şekil:** kalibrasyon grafiği.

4.3.5 Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında hibridizasyonun farklı sürelerde gerçekleştirilmesinin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

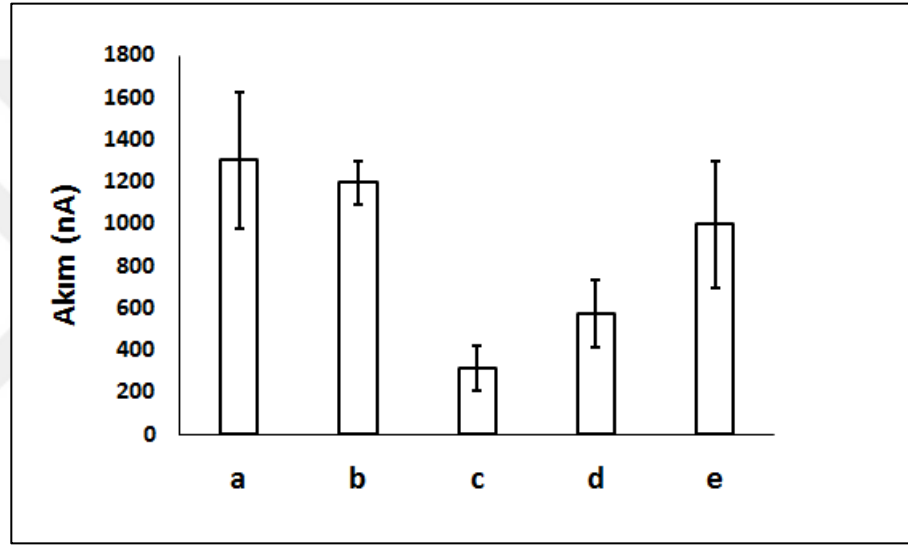
Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında (sırasıyla 10 $\mu\text{g/mL}$ ve 35 $\mu\text{g/mL}$) gerçekleştirilen hibridizasyonun farklı sürelerde incelenmesine yönelik sonuçlar Şekil 4.10' da gösterildi.



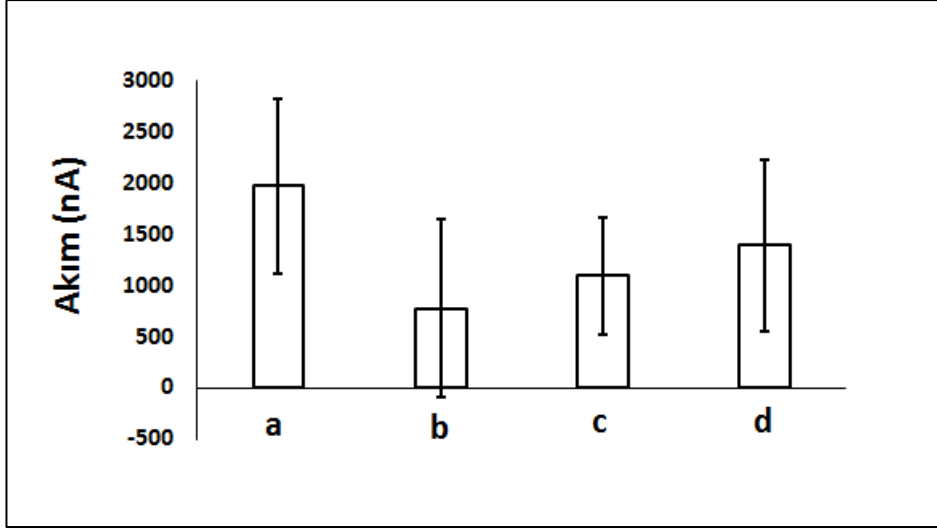
Şekil 4.10. (a) CA-GO-PGE, **(b)** 10 $\mu\text{g/mL}$ inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu immobilize edilmiş CA-GO-PGE, 10 $\mu\text{g/mL}$ inozin süstitüye miRNA-34a prob ile 35 $\mu\text{g/mL}$ hedef miRNA-34a'nın **(c)** 15 dakika, **(d)** 30 dakika, **(e)** 60 dakika hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyali **(A)** voltamogram ve **(B)** histogramı.

4.3.6 Geliştirdiğimiz GO modifiye biyosensörün miRNA-34a dizisine seçimliliğinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular

Seçimlilik çalışması 10 $\mu\text{g/mL}$ inozin süstitüye miRNA-34a prob ve 35 $\mu\text{g/mL}$ hedef miRNA-34a, ya da diğer miRNA dizileri; miRNA-16, miRNA-155, miRNA-15a, miRNA-660 (Şekil 4.11) veya karışım örneklerinde (miRNA-34a : miRNA-16, miRNA-34a : miRNA-155, miRNA-34a : miRNA-15a, miRNA-34a : miRNA-660 karışımları varlığında) test edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. 10 $\mu\text{g/mL}$ inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile 35 $\mu\text{g/mL}$ (a) hedef miRNA-34a (b) miRNA-16, (c) miRNA-155, (d) miRNA-15a, (e) miRNA-660 hibridizasyonu sonucu ölçülen yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram.



Şekil 4.12. 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ile 35 µg/mL **(a)** miRNA-34a ile miRNA-16, **(b)** miRNA-34a ile miRNA-155, **(c)** miRNA-34a ile miRNA-15a, **(d)** miRNA-34a ile miRNA-660 dizilerinin 1:1 karışımı varlığında gerçekleştirilen hibridizasyon sonucu ölçülen yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram.

5. TARTIŞMA

5.1 PGE, CA-PGE, CA-GO-PGE'nin Mikroskopik ve Elektrokimyasal Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma

Yüzeyi GO ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PGE'lerin mikroskopik karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) tekniğiyle yapıldı (Şekil 4.1). SEM görüntüleri incelendiğinde, GO-PGE'ye kıyasla (Şekil 4.1-e,f), CA ile aktive edilmiş edilmiş PGE yüzeyine GO modifikasyonunun (CA-GO-PGE) (Şekil 4.1-g,h) daha homojen bir şekilde kaplandığı görülmektedir.

CV ölçümü ile elde edilen karakterizasyon sonuçlarına bakıldığında CA-PGE yüzeyine GO modifikasyonu sonrasında, anodik pik akımında % 38,5 oranında bir artış elde edildiği görüldü (Şekil 4.2). PGE, CA-PGE, GO-PGE ve CA-GO-PGE'lerin yüzey alanları kıyaslandığında, CA-GO-PGE ($A=0,33 \text{ cm}^2$)'nin en geniş yüzey alanına sahip olduğu tespit edildi.

Elektrotların empedimetrik yüzey karakterizasyonu sonrasında elde edilen sonuçlara göre, herhangi bir modifikasyon olmaksızın PGE'ye ait R_{ct} değeri; $110,2 \pm 45,5 \text{ Ohm}$ (% RSD (n=3); % 41,3) iken CA ile aktivasyonundan sonra R_{ct} değeri; $225,8 \pm 74,4 \text{ Ohm}$ (% RSD (n=3); % 32,9) olarak ölçülmüştür. CA-PGE'ye GO modifikasyonu sonrasında ise R_{ct} değeri; $56,7 \pm 18,7 \text{ Ohm}$ (% RSD (n=3); % 32,9) olarak ölçülmüştür. CA-PGE yüzeyine 400 $\mu\text{g/mL}$ GO modifikasyonu sonrası R_{ct} değerinde, CA-PGE'ye göre % 74,9 azalış olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

5.2 GO Konsantrasyonundaki Değişimin Elektrot Yanıtına Etkisinin Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma

Modifiye edilmemiş PGE'lerde ortalama anodik akım (I_a), % 13,2 (n=10) bağlı standart sapma ile $73,3 \pm 12,7 \mu\text{A}$ şeklinde hesaplandı. CA ile yüzeyi aktive

edilen PGE ile CV ölçümleri alındığında, ortalama I_a değerinde % 25 azalış saptandı. CA-PGE'lerin yüzeylerinin GO ile modifikasyonu sonrasında herbir GO konsantrasyonu için oluşturulan deney grubunda ortalama I_a değerinde artış yüzdeleri sırasıyla % 36, % 87, % 49 olarak belirlendi. PGE yüzeyine 400 µg/mL GO immobilize edildikten sonra ortalama I_a ve bağıl standart sapma değerleri $82,9 \pm 3,7 \mu A$ ve % RSD (n=4); % 4,5 hesaplandı. GO'nun elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra ölçülen akım değerleri, GO'nun iletken yapısına bağlı olarak artmıştır (Muti et al., 2011). Sinyalde en fazla artışın 400 µg/mL GO elektrot yüzeyine immobilize edildikten sonra gözlenmesi sonucunda, GO modifiye empedimetrik biyosensör geliştirilmesine yönelik çalışmamızın (Erdem et al., 2017) sonuçlarına paralel olarak, çalışmamızda optimum GO konsantrasyonu 400 µg/mL kullanılmasına karar verildi.

En yüksek anodik yük geçişi değeri (Q_a), elektrot yüzeyine 400 µg/mL GO modifikasyonu sonrası gözlenmiştir. Ayrıca pik potansiyelleri arasındaki fark (ΔE_p) hesaplandığı zaman, modifiye edilmemiş PGE için $\Delta E_p = 0,129 V$, CA modifiye edilmiş PGE için $\Delta E_p = 0,148 V$ ve GO modifiye edilmiş PGE'ler için sırasıyla farklı GO konsantrasyonunda; 200 µg/mL; $\Delta E_p = 0,105 V$, 400 µg/mL; $\Delta E_p = 0,095 V$, 600 µg/mL; $\Delta E_p = 0,125 V$ olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde PGE yüzeyine 400 µg/mL GO modifikasyonu sonrasında $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probunun elektrokimyasal davranışının daha tersinir hale geldiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, literatürdeki sonuçlara benzerdir (Alwarappan et al., 2009; Qi et al., 2012).

5.3 miRNA-34a Hibridizasyonunun Geliştirdiğimiz GO Modifiye Biyosensörün Voltametrik Yöntemle İncelenmesine Yönelik Bulgular ile İlgili Tartışma

5.3.1 miRNA-34a DNA prob konsantrasyonundaki değişimin yanıtta etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Konsantrasyonları 5-15 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen miRNA-34a DNA probu elektrotlara immobilize edildikten sonra ölçülen guanin sinyalleri ve sinyallerdeki % artışlar değerlendirildiğinde, guanin sinyalindeki artışın 10 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a DNA prob konsantrasyonuna kadar devam ettiği, ancak 15 $\mu\text{g/mL}$ 'den sonra azaldığı gözlemlendi. CA-GO-PGE'lere 10 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a DNA probu immobilizasyonundan sonra ölçülen ortalama guanin sinyali $1846 \pm 318,9$ nA (% RSD (n=2); % 17,3) şeklinde ölçüldüğü (Şekil 4.6 B-g) saptandı. Dolayısıyla optimum prob konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$ olarak seçildi.

5.3.2 Farklı prob immobilizasyon süresinin yanıtta etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

5 - 90 dakika arasında değişen immobilizasyon sürelerinde prob immobilize edildikten sonra ölçülen guanin sinyalleri incelendiğinde (Şekil 4.7); guanin sinyalinde 60 dakikaya kadar aşamalı bir artış ve daha sonrasında sinyalde bir azalma gözlemlendi. Optimum prob immobilizasyon süresi olarak 60 dakika belirlendi. Ölçülen ortalama guanin sinyali $2135 \pm 89,8$ nA (% RSD (n = 4); % 4,2) olarak hesaplandı (Şekil 4.7 A-f).

5.3.3 Farklı hibridizasyon sürelerinde gerçekleştirilen miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Optimum hibridizasyon süresinin belirlenmesi için 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ve 20 µg/mL hedef miRNA-34a hibridizasyonu 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika süreyle gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, hibridizasyon öncesi inosin süstitüye prob ile herhangi bir sinyal gözlenmedi (Şekil 4.8-a). Hibridizasyon varlığında elde edilen ortalama guanin sinyalleri (n=3) sırasıyla, $216 \pm 29,3$ nA (% RSD; % 13,6), $563 \pm 172,9$ nA (% RSD; % 30,7) ve $609 \pm 43,1$ nA (% RSD; % 7,1) olarak ölçüldü (Şekil 4.8-b,c,d). 30 dakika ve 60 dakika süreyle gerçekleştirilen hibridizasyondan sonra guanin sinyalleri arasında büyük bir fark olmamasına rağmen, 60 dakika sonucunda elde edilen sonuçların daha tekrarlanabilir olması sebebiyle, optimum hibridizasyon süresi 60 dakika olarak belirlendi.

5.3.4 Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-34a hibridizasyonunun yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a prob ile konsantrasyonu 5-40 µg/mL aralığında değişen miRNA-34a hedef hibridizasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen sonuçlara göre, ölçülen guanin sinyalinin 35 µg/mL'e kadar arttığı, sonrasında azalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.9). En yüksek ve en tekrarlanabilir guanin sinyali, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a prob ve 35 µg/mL hedef miRNA-34a dizisi arasında gerçekleştirilen hibridizasyon varlığında elde edildiği için, optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonu olarak 35 µg/mL seçildi.

10 µg/mL miRNA-34a inozin süstitüye DNA prob ile konsantrasyonları 5-35 µg/mL aralığında değişen miRNA-34a hedef dizisi arasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen hibridizasyon sonrasında ölçülen guanin yükseltgenme sinyalindeki değişime bağlı olarak (Şekil 4.9-iç şekil), tayin sınırı (DL) (Miller

and Miller, 2005) % 93 güvenilirlikle 7,52 $\mu\text{g/mL}$ (40 μL örnekte 42,7 pmol) olarak hesaplandı.

5.3.5 Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında hibridizasyonun farklı sürelerde gerçekleştirilmesinin yanıtı etkisinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Optimum prob ve optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonlarında (sırasıyla 10 $\mu\text{g/mL}$ ve 35 $\mu\text{g/mL}$) gerçekleştirilen hibridizasyonun farklı sürelerde incelemesine yönelik sonuçlara göre, ortalama guanin sinyali 60 dakika hibridizasyon sonucunda $1174 \pm 115,7$ nA (% RSD (n=3); % 9,8) olarak ölçüldü ve optimum süre olarak belirlendi (Şekil 4.10).

5.3.6 Geliştirdiğimiz GO modifiye biyosensörün miRNA-34a dizisine seçimliliğinin voltametrik yöntemle incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Seçimlilik çalışması sonucunda, 10 $\mu\text{g/mL}$ inozin süstitüye miRNA-34a DNA prob ile 35 $\mu\text{g/mL}$ miRNA-34a hedef dizisi, miRNA-16, miRNA-155, miRNA-15a, miRNA-660 dizileri hibridizasyonu sonucu ölçülen ortalama guanin sinyalleri ve bağıl standart sapma değerleri sırasıyla; $1301,6 \pm 323,2$ nA, $1194,8 \pm 101,5$ nA, $316 \pm 105,9$ nA, $571 \pm 159,9$ nA ve $997,6 \pm 300,3$ nA, % RSD (n=3); % 24,8, % 8,5, % 33,5, % 28 ve % 30,1 olarak hesaplandı (Şekil 4.11).

miRNA-34a : miRNA-16, miRNA-34a : miRNA-155, miRNA-34a : miRNA-15a, miRNA-34a : miRNA-660 karışımlarının varlığında gerçekleştirilen hibridizasyon varlığında ölçülen ortalama guanin sinyalleri ve bağıl standart sapma değerleri sırasıyla; $1973,2 \pm 852,3$ nA, $769,5 \pm 869,7$ nA, $1093,9 \pm 575,2$ nA, $1389,5 \pm 841,8$ nA, % RSD (n=3); % 43,2, % 113, % 52,6, % 60,6 olarak hesaplandı (Şekil 4.12). Elde edilen sonuçlara göre, miRNA-34a'ya spesifik geliştirilen CA-GO-PGE biyosensörünün miRNA dizisine bağlı olarak farklı

mikroRNA'ların varlığında bile hedef miRNA dizisine seçimli bir davranış gösterdiği sonucuna varıldı.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada geliştirdiğimiz grafen oksit (GO) modifiye edilmiş tek kullanımlık voltametrik biyosensörler ile seçimli ve hassas elektrokimyasal şekilde şekilde miRNA analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda hedef miRNA dizisi olan Alzheimer ile ilişkilendirilen miRNA-34a seçilmiştir. Voltametrik yöntemler kullanılarak miRNA-34a'ya spesifik DNA probu ve hedef miRNA-34a dizisi arasında gerçekleştirilen DNA-miRNA hibridizasyonu tayin edilmiştir. Özellikle demansın en sık görülen tipi olan Alzheimer hastalığı, yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ve nöropsikiyatrik semptomların ve davranış değişikliklerinin eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Hafıza kaybı erken semptomlardan biridir ve hastalığın ilerlemesi ile birlikte bilişsel (kognitif) yeteneklerdeki kayıp, frontal ve temporal lob işlevleri ile ilişkili, dil alanlarında işlev kaybı (afazi), beceri gerektiren hareketlerde işlev kaybı (apraksi) ve tanıma fonksiyonlarında bozulmaya doğru gitmeye başlar ve tedavisi mümkün olmamaktadır (Wang et al., 2009c; Bhattacharjee et al., 2014). Bu nedenle, hastalığın ilk aşamalarında teşhise yönelik seçimli ve duyarlı bir şekilde, ucuz, pratik ve hızlı sonuçlar verebilen analiz platformlarına ihtiyaç duyulmaktadır; mevcut PCR, ELISA gibi analiz yöntemleri karmaşık olup, ekstra kimyasal kullanımından dolayı pahalı ve zaman alıcıdır.

Elektrot yüzey alanını ve elektriksel iletkenliği arttırdığı için kalem grafit elektrotların (PGE) yüzeyleri GO ile modifiye edildi. GO'nun elektrot yüzeyine daha kararlı ve etkili bir şekilde bağlanmasını sağlamak için PGE yüzeyinin kovalent bağlayıcı ajanla (CA) aktivasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen yüksek duyarlılıkta, tekrarlanabilir sonuçlara bağlı olarak CA-GO-PGE'nin çalışmamızda elektrokimyasal miRNA analizinde uygulanmasına karar verildi. CA-GO modifiye PGE yüzeyi, mikroskobik ve elektrokimyasal yöntemlerle (taramalı elektron mikroskopisi (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri (CV) tekniklerle) karakterize edildi. DNA-miRNA hibridizasyonunun elektrokimyasal yöntemlerle tayin edilmesi için geliştirilen GO modifiye edilmiş PGE'lere dayalı biyosensör tasarımı, GO konsantrasyonu, DNA prob konsantrasyonu, hedef miRNA konsantrasyonundaki değişimin yanıt

etkisi incelendi; deneysel koşullar optimize edildikten sonra miRNA-34a'ya spesifik biyosensörün seçimliliği voltametrik yöntemle tespit edildi.

CA-PGE yüzeyine GO modifikasyonu sonrasında CV ölçümleri gerçekleştirildiğinde anodik pik akımında % 38,5'lik artış elde edildiği görüldü. Ayrıca, PGE, CA-PGE, GO-PGE ve CA-GO-PGE'lerin yüzey alanları kıyaslandığında, CA-GO-PGE'nin en geniş yüzey alanına sahip olduğu tespit edildi.

Elektrotların elektrokimyasal yüzey karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, PGE, CA-PGE, GO-PGE ve CA-GO-PGE'lerin redoks çözeltisi içerisinde EIS ölçümü gerçekleştirildi. CA-PGE yüzeyine 400 µg/mL GO modifikasyonu sonrasında R_{ct} değerinde CA-PGE'ye kıyasla, % 74,9 azalış olduğu gözlemlendi. Bu azalışın nedeni olarak, GO modifikasyonunun elektrolit ile elektrot yüzeyi arasında elektron transferini kolaylaştırıcı etki yaparak iletkenliği arttırdığı düşünülmektedir. (Erdem et al., 2014a, 2014b, 2014c, 2015; Yang et al., 2013a, 2013b; Zhou et al., 2014a, 2014b).

GO konsantrasyonundaki değişimin biyosensör yanıtına etkisi, farklı konsantrasyonlarda GO'nun PGE yüzeylerine immobilizasyon sonrası, CV ölçümleri gerçekleştirilerek incelendi. GO'nun elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra ölçülen akım değerleri incelendiğinde, GO'nun iletken yapısından dolayı (Muti et al., 2011) yüzeyi daha iletken hale getirmesi sebebiyle arttığı tespit edilmiştir. Sinyalde en fazla artışın 400 µg/mL GO immobilize edildikten sonra elde edilmesine bağlı olarak çalışmalara bu konsantrasyonda devam edilmesine karar verildi.

Voltametrik miRNA tayinine yönelik optimizasyon çalışmaları için CA-GO-PGE elektrotları üzerinde diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniği kullanılarak ölçümler yapıldı. miRNA-34a'ya spesifik DNA probun, modifiye edilmemiş, CA modifiye edilmiş ve CA-GO modifiye edilmiş PGE yüzeylerine immobilize edilerek ölçülen guanin sinyallerine bağlı olarak optimum prob konsantrasyonu belirlendi. 5-15 µg/mL miRNA-34a DNA probu elektrotlara immobilize edildi ve ardından, +1,00 V civarında guanin sinyali ölçüldü (DPV).

Guanin sinyalindeki artış, 10 µg/mL miRNA-34a DNA prob konsantrasyonuna kadar devam edip, 15 µg/mL'den sonra sinyalin azaldığı gözlemlendiğinden optimum prob konsantrasyon değeri, 10 µg/mL olarak saptandı.

miRNA-34a DNA probunun elektrot yüzeyine optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla; 5 dakika ile 90 dakika arasında prob immobilizasyonu gerçekleştirilerek ölçülen guanin sinyalleri incelendi. Guanin sinyalinde 60 dakikaya kadar bir artış gözlenirken daha uzun immobilizasyon sürelerinde ölçülen sinyalin azaldığı gözlemlendi ve 60 dakika optimum prob immobilizasyon süresi olarak seçildi.

Optimum hibridizasyon süresinin tayininde, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a DNA probu ve 20 µg/mL hedef miRNA-34a hibridizasyonu 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika sürelerinde incelendi. 60 dakikada elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliği daha iyi olduğundan, optimum hibridizasyon süresi 60 dakika olarak seçildi.

Optimum hedef miRNA-34a konsantrasyonunun saptanması için miRNA-34a konsantrasyonundaki değişimin sensör yanıtına olan etkisi incelendi. 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a prob ile 5-40 µg/mL hedef dizi hibridizasyonu gerçekleştirildi ve hibridizasyon öncesi inozin süstitüye prob ile herhangi bir guanin sinyali gözlenmedi. Hibridizasyon varlığında +1,00 V'da ölçülen guanin sinyalinin 5 ile 35 µg/mL miRNA-34a hedef dizi konsantrasyon aralığında doğrusal olarak arttığı gözlenirken, 40 µg/mL konsantrasyonunda hedef dizi varlığında azalmaya başladığı görüldü. Hibridizasyona sürecinde en yüksek ve en tekrarlanabilir guanin sinyali, 10 µg/mL inozin süstitüye miRNA-34a prob ve 35 µg/mL hedef miRNA-34a dizisi arasında gerçekleşen hibridizasyon sonrası elde edildiği için optimum hedef dizi konsantrasyonu, 35 µg/mL olarak seçildi.

10 µg/mL miRNA-34a inozin süstitüye DNA prob ile konsantrasyonları 5-35 µg/mL aralığında değişen miRNA-34a hedef dizisi arasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen hibridizasyon sonrasında ölçülen guanin yükseltgenme sinyaline dayalı olarak, tayin sınırı (DL) (Miller and Miller, 2005) % 93 güvenilirlikle 7,52 µg/mL (40 µL örnekte 42,7 pmol) olarak hesaplandı.

Seçimlilik çalışması, 10 µg/mL inozin sübstitüye miRNA-34a prob ve 35 µg/mL hedef miRNA-34a, yada diğer miRNA dizileri; miRNA-16, miRNA-155, miRNA-15a, miRNA-660 veya karışım örnekleri (miRNA-34a : miRNA-16, miRNA-34a : miRNA-155, miRNA-34a : miRNA-15a, miRNA-34a : miRNA-660 karışımları varlığında) DPV tekniğiyle test edildi. Elde edilen sonuçlara göre, çalışmamızda geliştirdiğimiz CA-GO-PGE biyosensör ile farklı mikroRNA'ların varlığında bile diziye bağlı olarak miRNA-34a'ya seçimli bir davranış sergilediği gözlemlendi.

Literatürde asılı civa damla elektrodu (HMDE) (Bartosik et al., 2013; 2014), indiyum bakır oksit (ITO) (Gao et al., 2006; 2007b; 2013; Wang et al., 2014), altın elektrot (AuE) (Ge et al., 2014; Meng et al., 2013; Gao and Yu., 2007a; Ren et al., 2013; Peng et al., 2014; Wen et al., 2013), perde baskılı elektrot (SPE) (Lusi et al., 2009; Bettazzi et al., 2013; Cheng et al., 2014; Labib et al., 2013; Erdem et al., 2015; Ma et al., 2016), camı karbon elektrot (GCE) (Tran et al., 2013a; Yin et al., 2012b; Liu et al., 2014) kullanılarak miRNA tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal biyosensörlere kıyasla, çalışmamızda CA-GO modifiye PGE kullanımı ile daha kısa sürede, pratik, duyarlı ve seçimli bir şekilde, voltametrik miRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullan-at tipi PGE'ler, minyatürize edilerek çip teknolojisine uyarlanabilme özellikleriyle metal elektrotlar ya da civa elektrotlara göre daha avantajlı olup, son yıllarda düşük maliyetleri sebebiyle yeni biyosensör teknolojilerinin geliştirilmesinde perde baskılı elektrotlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca literatürde GO modifiye edilerek geliştirilen diğer elektrokimyasal biyosensörlere kıyasla, çalışmamızda kovalent ajan kullanımı, PGE kullanımı ve uygulanan deneysel yöntemler ile daha kısa sürede, pratik ve duyarlı bir şekilde GO modifiye edilmiş biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir (Yang, et al., 2013b; Alwarappan et al., 2009; Hajihosseini et al., 2016; Xue et al., 2014; Kim et al., 2010).

Tablo 6.1. Literatürdeki bazı GO modifiye elektrokimyasal biyosensörlerin kıyaslanması.

	Elektrot tipi	Tayin edilen madde	Hibridizasyon süresi	GO modifikasyonu süresi
Alwarappan et al., 2009	GCE	dopamin, serotonin	-	5 saat
Hajihosseini et al., 2016	GCE	helikobakter pilori	2 saat	- *ortam sıcaklığında kurutma
Xue et al., 2014	GCE	serotonin	-	12 saat
Kim et al., 2010	GCE	dopamin	-	- *kızılötesi lambası ile kurutma
Tez çalışması	PGE	miRNA-34a	60 dk	15 dk

miRNA tayinine yönelik izlenen deneysel prosedürlerde, manyetik partiküllere dayalı herhangi bir ara örnek hazırlama basamağının olmaması (Erdem and Congur, 2014a), elektrokimyasal tayin aşamasında enzimatik reaksiyon (Erdem et al. 2013), ya da elektroaktif bir indikatörün bağlanmasına dayalı ek bir deneysel basamak içermemesi sebebiyle, bu çalışmada geliştirilen deneysel prosedürün daha pratik ve daha ekonomik olduğu görülmektedir. **Projede elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kanser, diyabet, Alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar gibi birbirinden oldukça farklı hastalıkların biyobelirtici olan miRNA-34a'nın elektrokimyasal tekniklerle kısa sürede, seçimli ve duyarlı bir şekilde tayininin çalışmamızda tasarlanan CA-GO-PGE'ler kullanılarak gerçekleştirilebileceğine karar verilmiştir. Bu kapsamda tez çalışmasında geliştirilen GO modifiye elektrokimyasal biyosensörler literatürde bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.**

Tez çalışmasında, miRNA'ların analizine yönelik geliştirilen çip teknolojisinin "tanı kitleri (point-of-care; POC)" pazarında oldukça büyük bir payı bulunmaktadır. Geliştirdiğimiz GO tabanlı elektrokimyasal biyosensörlerin gelecekte çip teknolojisine uyarlanabileceği, böylece ucuz, pratik, seçimli ve duyarlı bir şekilde miRNA analizlerini gerçekleştirebilecek yeni çip teknolojilerinin bu pazarda yer bulacağı, bu sayede ülke ekonomisine katkıda bulunulacağı öngörülmektedir. Bunun yanı sıra, hastanelerde kısa sürede çeşitli

kanser türlerine ait biyobelirteçlerin, demans, Alzheimer, Parkinson's gibi nörodejeneratif hastalıkların, obezite, diyabet, gibi metabolik hastalıkların tayini, geliştirdiğimiz elektrokimyasal biyosensör platformlarına dayalı tanı kitleri ile gerçekleştirilebileceğini ümit ediyoruz. Böylece nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisi sağlanabilecek ve hastanın tedavi süreci hızlı bir şekilde başlatılabilecektir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akhavan, O., Ghaderi, E. and Akhavan, R.R.**, 2012, Toward single-DNA electrochemical biosensing by graphene nanowalls, *ACS nano*, 6: 2904–2916 pp.
- Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C. and Li, C.-Z.**, 2009, Probing the electrochemical properties of graphene nanosheets for biosensing applications, *Journal of Physical Chemistry C*, 113: 8853–8857 pp.
- Bai, L., Chai, Y., Pu, X. and Yuan, R.**, 2014, A signal-on electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of endotoxin using threeway DNA junction-aided enzymatic recycling and graphene nanohybrid for amplification, *Nanoscale*, 6: 2902-2908 pp.
- Bartosik, M., Hrstka R., Palecek E. and Vojtesek B.**, 2014, Magnetic bead-based hybridization assay for electrochemical detection of microRNA, *Analytica Chimica Acta*, 813: 35–40 pp.
- Bartosik, M., Trefulka M., Hrstka, R., Vojtesek B. and Palecek E.**, 2013, Os(VI)bipy-based electrochemical assay for detection of specific microRNAs as potential cancer biomarkers, *Electrochemistry Communications*, 33: 55–58 pp.
- Bettazzi, F., Hamid-Asl, E., Esposito, C.L., Quintavalle, C., Formisano, N., Laschi, S., Catogno, S., Iaboni, M., Marazza, G., Macsini, M., Cerchia, L., Franciscis, V., Condorelli, G. and Palchetti, I.**, 2013, Electrochemical detection of miRNA-222 by use of a magnetic bead-based bioassay, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 40:, 1025-1034 pp.
- Bhattacharjee, S., Zhao Y., Lukiw and W.J.** 2014, Deficits in the miRNA-34a-regulated endogenous TREM2 phagocytosis sensor-receptor in Alzheimer's disease (AD); anupdate, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6: 1-5 pp.
- Bonanni, A., Loo, A. H. and Pumer, M.**, 2012, Graphene for impedimetric biosensing, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37: 12–21 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Braden L.J., Mohamed A.I and Smith C.I.E.,** 1999, A peptide nucleic acid – nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA, *Nat Biotechnol*, 17: 784 – 787 pp.
- Brett, A. M. O., Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A. and Cruz, M.L.,** 1997, Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137 pp.
- Briones, C. and Moreno, M.,** 2012, Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, Spain, 3071-3089 pp.
- Cai, B.Z., Pan Z.W. and Lu Y.J.,** 2010, The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator, *Current Medical Chemistry*, 17: 407–411 pp.
- Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P. and Fang, Y.,** 2003, Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 375 (2): 287–293 pp.
- Caliskan, A., Erdem, A. and Karadeniz, H.,** 2009, Direct DNA hybridization on the single-walled carbon nanotubes modified sensors detected by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, *Electroanalysis*, 21: 2116-2124 pp.
- Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A. and Mendell, J.T.,** 2008, Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *National Genetics*, 40: 43-50 pp.
- Chen, C. and Li, B.,** 2014, Chemiluminescence resonance energy transfer biosensing platform for site-specific determination of DNA methylation and assay of DNA methyltransferase activity using exonuclease III-assisted target recycling amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 48-54 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D. and Dai, H.,** 2001, Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization, *Journal of American, Chemical Society*, 123: 3838–39 pp.
- Chen, X.M.,** 2009, MicroRNA signatures in liver diseases, *World Journal of Gastroenterology*, 15: 1665–1672 pp.
- Cheng, F., Zhang J., He T., Shi J., Abdel-Halimc E.S. and Zhu J.,** 2014, Bimetallic Pd–Pt supported graphene promoted enzymatic redox cycling for ultrasensitive electrochemical quantification of microRNA from cell lysates, *Analyst*, 139: 3860-3865 pp.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammanna, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D.S. and Gingeras, T.R.,** 2005, Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution, *Science*, 308: 1149–1154 pp.
- Cheng, Z.G., Li, Q., Li, Z.J., Zhou, Q.Y. and Fang, Y.,** 2010, Suspended graphene sensors with improved signal and reduced noise, *Nano Letters*, 10: 1864–1868 pp.
- Cho, W.C.,** 2010, MicroRNAs in cancer—from research to therapy, *Biochimica Biophysica Acta*, 1805: 209–217 pp.
- Choi, W., Choi, J. and Lee, J.H.,** 2013, Rapid hybridization using graphene oxide and 1,10-oxalyldiimidazole chemiluminescence, *RSC Advances*, 3: 22455-22460 pp.
- Cogswell, J. P., Taylor, J.I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D. and Richards, C.A.,** 2008, Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *Journal of Alzheimers Disease*, 14: 27-41 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Congur, G., Eksin, E. and Erdem, E.,** 2015, Impedimetric detection of microRNA at graphene oxide modified sensors, *Electrochimica Acta*, 172: 20-27 pp.
- Corney, D.C., Hwang, C.I., Matoso, A., Vogt, M., Flesken- Nikitin, A., Godwin, A.K., Kamat, A.A., Sood, A.K., Ellenson, L.H., Hermeking, H. and Nikitin, A.Y.,** 2010, Frequent down regulation of miR-34 family in human ovarian cancers, *Clinical Cancer Research*, 16: 1119-1128 pp.
- Coulet, P. R.,** 1991, "What is a Biosensor?, *Chapter 1*; Biosensor principles and applications", L.J. Blum, P.R. Coulet (ed), M. Dekker Inc., New York, 7p.
- Cui, L., Lin, X., Lin, N., Zhu, Song, Y., Zhu, Z., Chen, X. and Yang, C.J.,** 2012, Graphene oxide-protected DNA probes for multiplex microRNA analysis in complex biological samples based on a cyclic enzymatic amplification method, *Chemical Communications*, 48: 194-196 pp.
- Culpan, D., Kehoe, P.G. and Love, S.,** 2011, Tumour necrosis factor- α (TNF- α) and miRNA expression in frontal and temporal neocortex in Alzheimer's disease and the effect of TNF- α on miRNA expression in vitro, *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2: 156-162 pp.
- Cummings, T.E. and Elving, P.J.,** 1978, Determination of the electrochemically effective electrode area, *Analytical Chemistry*, 50: 480-488 pp.
- Dervan, P. B.,** 1986, Design of sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471 pp.
- Dervan, P.B.,** 1998, "Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach", *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 49p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dong, H., Zhang, J., Ju, H., Lu, H., Wang, S., Jin, S., Hao, K., Du, H. and Zhang, X.,** 2012a, Highly sensitive multiple microRNA detection based on fluorescence quenching of graphne oxide and isothermal strand-displacement polymerase reaction, *American Chemical Society*, 84: 4587-4593 pp.
- Dong, H., Zhu, Z., Ju, H. and Yan, F.,** 2012b, Triplex signal amplification for electrochemical DNA biosensing by coupling probe-gold nanoparticles–graphene modified electrode with enzyme functionalized carbon sphere as tracer, *Biosensors and Bioelectronics*, 33: 228-232 pp.
- Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W. and Ruoff, R.S.,** 2010, The chemistry of graphene oxide, *Chemical Society Reviews*, 39: 228–240 pp.
- Du, D., Guo, S., Tang, L., Ning, Y., Yao, Q. and Zhang, G.J.,** 2013, Graphene-modified electrode for DNA detection via PNA-DNA hybridization, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 186: 563-570 pp.
- Eacker, S.M., Dawson, T.M. and Dawson, V.L.,** 2009, Understanding microRNAs in neurodegeneration, *National Review of Neuroscience*, 10: 837–841 pp.
- Eda, G., Fanchini, G. and Chhowalla, M.,** 2008, Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material, *Nature Nanotechnology*, 3: 270- 274 pp.
- Erdem, A.,** 2007, Nanomaterial based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74: 318–325 pp.
- Erdem A., Eksin, E and Muti M.,** 2014a, Chitosan–graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme, *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 115: 205–211 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A.A. and Ozsoz, M.,** 2005, Electrochemical genomagnetic assay for the detection of Hepatitis B virus DNA in polymerase chain amplicons by using disposable sensor technology, *Electrochemical Communications*, 7: 815-820 pp.
- Erdem, A. and Congur, G.,** 2014a, Label-free voltammetric detection of MicroRNAs at multi-channel screen printed array of electrodes comparison to graphite sensors, *Talanta*, 118: 7-13 pp.
- Erdem, A. and Congur, G.,** 2014b, Dendrimer enriched single-use aptasensor for impedimetric detection of activated protein C, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117: 338-345 pp.
- Erdem, A. and Congur, G.,** 2014c. Dendrimer modified 8-channel screen-printed electrochemical array system for impedimetric detection of activated protein C, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196: 168-174 pp.
- Erdem, A., Congur, G., Canavar, P.E. and Karadeniz H.,** 2014b, Electrochemical detection of microRNAs using genomagnetic assay combination with disposable graphite sensor technology, *Chemical Sensors*, 4: 21-25 pp.
- Erdem, A., Congur, G. and Eksin, E.,** 2013, Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of MicroRNAs, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188: 1089-1095 pp.
- Erdem, A., Eksin, E. and Congur, G.,** 2015, Indicator-free electrochemical biosensor for microRNA detection based on carbon nanofibers modified screen printed electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755: 167-173 pp.
- Erdem, A., Eksin, E., Isin, D. and Polat, D.,** 2017, Graphene oxide modified chemically activated graphite electrodes for detection of microRNA, *Electroanalysis*, 29: 1350-1358 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Muti, M., Papakonstantinou, P., Canavar, E., Karadeniz, K., Congur, C. and Sharma, S.,** 2012a, Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction, *Analyst*, 137: 2129-2135 pp.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Canavar, P.E. and Congur, G.,** 2012b, Single-use sensor platforms based on carbon nanotubes for electrochemical detection of DNA hybridization related to *Microcystis* spp., *Electroanalysis*, 24: 502-511 pp.
- Erdem, A., and Ozsoz M.,** 2001a, Interaction of anticancer drug, Epirubicin with DNA, *Analytica Chimica Acta*, 437: 107-114 pp.
- Erdem, A., and Ozsoz M.,** 2001b, Voltammetry of anticancer drug, Mitoxantrone and DNA, *Turkish Journal of Chemistry*, 25 (4): 469-475 pp.
- Erdem, A., and Ozsoz, M.,** 2011, “Nucleic acids as biorecognition element in biosensor development”, *Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring*, Royal Society of Chemistry, UK, 6p.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P. and Murphy, H.,** 2006, Direct DNA hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes, *Analytical Chemistry*, 78: 6656-6659 pp.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., McMullan, M. and Karadeniz, H.,** 2010, Streptavidin modified carbon nanotube based graphite electrode for label-free sequence specific DNA detection, *Electroanalysis*, 22(6): 611- 617 pp.
- Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Güven, G., Özsöz, M. and Pişkin, E.,** 2007, Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid sensor systems, *Electroanalysis*, 19: 798–804 pp.
- Evans, A.** 1991, “Potentiometry and ISE”, *ACOL*, London, 106-198 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fan, Y., Chen, X., Trigg, A.D., Tung, C., Kong J. and Gao, Z.,** 2007, Detection of microRNAs using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps, *Journal of American Chemical Society*, 129: 5437-5443 pp.
- Feng, L., Chen, Y., Ren, J. and Qu, X.,** 2011, A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells, *Biomaterials*, 32: 2930-2937 pp.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P.,** 2009, Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs, *Genome Research*, 19: 92–105 pp.
- Gao, Z., Deng, H., Shen, W. and Ren, Y.,** 2013, A label-free biosensor for electrochemical detection of femtomolar microRNAs, *Analytical Chemistry*, 85: 1624–1630 pp.
- Gao, Z. and Yang, Z.,** 2006, Detection of microRNAs using electrocatalytic nanoparticle tags, *Analytical Chemistry*, 78: 1470-1477 pp.
- Gao, Z. and Yu Y.H.,** 2007a, A microRNA biosensor based on direct chemical ligation and electrochemically amplified detection, *Sensors and Actuators B*, 121: 552–559 pp.
- Gao, Z. and Yu, Y.H.,** 2007b, Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays, *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 933-940 pp.
- Ge, Z., Lin, M., Wang, P., Pei, H., Yan, J., Shi, J., Huang, Q., He, D., Fan, C. and Zuo, X.,** 2014, Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor, *Analytical Chemistry*, 86: 2124-2130 pp.
- Geim, A.K. and Novoselov, K.S.,** 2007, The rise of graphene, *Nature Materials*, 7: 6183–6191 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, M., Chen, J., Liu, D, Nie, L. and Yao, S.,** 2004, Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes, *Bioelectrochemistry*, 62: 29–35 pp.
- Gupta, V.K., Yola, M.L., Qureshi, M.S., Solak, A.O., Atar, N. and Üstündağ, Z.,** 2013, A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/goldnanoplatfrom for detection of DNA arrays, *Sensors and Actuators B*, 188: 1201-1211 pp.
- Hahm, J. and Lieber, C. M.,** 2004, Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors, *Nano Letters*, 4: 51–54 pp.
- Hajihosseini, S., Nasirizadeh, N., Hejazi, M.S. and Yaghmaei, P.,** 2016, A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode, *Materials Science and Engineering C*, 61: 506-515 pp.
- Han, X., Fang, X., Shi, A., Wang, J. and Zhang, Y.,** 2013, An electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods decorated graphene oxide sheets for sensing platform, *Analytical Biochemistry*, 443: 117-123 pp.
- Havran, L., Vacek J. and Fojta, M.,** 2009, The reduction of doxorubicin at a mercury electrode and monitoring its interaction with DNA using constant current chronopotentiometry, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 74 (11- 12): 1727-1738 pp.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A. and Hannon, G.J.,** 2007a, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, *Nature*, 447: 1130-1134 pp.
- Huang, M., Wu, Y. and Hua W.,** 2014, A facile synthesis of reduced graphene oxide-wrapped WO₃ nanowire composite and its enhanced electrochemical catalysis properties, *Ceramics International*, 40: 7219–7225 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jansson, M.D. and Lund, A. H.**, 2012, MicroRNA and cancer, *Molecular Oncology*, 6: 590-610 pp.
- Jiang, L., Qian, J., Yang, X., Yan, Y., Liu, Q., Wang, K. and Wang, K.**, 2014, Amplified impedimetric aptasensor based on gold nanoparticles covalently bound graphene sheet for the picomolar detection of ochratoxin A, *Analytica Chimica Acta*, 806: 128-135 pp.
- Karadeniz, H., Erdem, A. and Caliskan A.**, 2008, Electrochemical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbon nanotube based screen-printed electrodes, *Electroanalysis*, 20 (17): 1932-1938 pp.
- Karadeniz, H., Erdem, A., Karasulu, E. and Alparslan, L.**, 2007a, Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (2): 322-326 pp.
- Karadeniz, H., Gulmez, B., Erdem, A., Jelen, F., Ozsoz, M. and Palecek, E.**, 2006, Echinomycin and cobalt-phenanthroline as redox indicators of DNA hybridization at gold electrodes, *Frontiers in Bioscience*, 11: 1870-1877 pp.
- Katz, E., Willner, I. and Wang, J.**, 2004, Electroanalytical and bioanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles, *Electroanalysis*, 16: 19-44 pp.
- Kilic, T., Erdem, A., Erac, Y., Seydibeyoglu, M.O., Okur, S. and Ozsoz, M.**, 2014, Electrochemical detection of a cancer biomarker mir-21 in cell lysates using graphene modified sensors, *Electroanalysis*, 27: 317-326 pp.
- Kilic, T., Topkaya S.N., Ariksoysal, D.O., Ozsoz, M., Ballar, P., Erac, Y. and Gozen, O.**, 2012, Electrochemical based detection of microRNA, mir21 in breast cancer cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 38: 195-201 pp.
- Kim, M.G., Shon, Y., Lee, J., Byun, Y., Choi, B.-S., Kim, Y.B and Oh, Y.-K.**, 2014, Double stranded aptamer-anchored reduced graphene oxide as target-specific nano detector, *Biomaterials*, 35: 2999-3004 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, Y.R., Bong S., Kang Y.J., Yang Y., Mahajan R.K., Kim J.S. and Kim H.,** 2010, Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2366-2369 pp.
- Kocerha, J., Kauppinen S. and Wahlestedt C.,** 2009, ‘MicroRNAs in CNS disorders, *NeuroMolecular Medicine*, 11: 162–172 pp.
- Koehne, J. E., Chen, H., Cassell, A. M., Ye, Q., Han, J., Meyyappan, M. and Li, J.** 2004, Miniaturized multiplex label-free electronic chip for rapid nucleic acid analysis based on carbon nanotube nanoelectrode arrays, *Clinical Chemistry*, 50: 1886–1893 pp.
- Kong, F.Y, Gu, S.X., Li, W.-W., Chen, T.T., Xu, Q. and Wang, W.,** 2014, A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination, *Biosensors and Bioelectronics*, 56: 77-82 pp.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H. and Yıldız, A.,** 2008, Electrochemical biosensing of DNA immobilized poly (vinylferrocenium) modified electrode, *Electroanalysis*, 20: 2563-2570 pp.
- Labib, M., Khan, N., Ghobadloo, S.M., Cheng, J., Pezacki, J.P. and Berezovski M.V.,** 2013, Three-mode electrochemical sensing of ultralow microRNA levels, *Journal of American Chemical Society*, 135: 3027–3038 pp.
- Li, C., Yang, Y., Zhang, B., Chen, G., Wang, Z. and Li, G.,** 2014a, Conjugation of graphene oxide with DNA-modified gold nanoparticles to develop a novel colorimetric sensing platform, *Particle & Particle System Characterization*, 31: 201-208 pp.
- Li, X., Ma, K., Zhu, S., Yao, S., Liu, Z., Xu, B., Yang, B. and Tian, W.,** 2014b, Fluorescent aptasensor based on aggregation-induced emission probe and graphene oxide, *Analytical Chemistry*, 86 (1): 298-303 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liang, M.Y.**, 2009, MicroRNA: a new frontier in kidney and blood pressure research. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 297: 553–558 pp.
- Liu L., Jiang, S., Wang, L., Zhang, Z. and Xie, G.**, 2015, Direct detection of microRNA-126 at a femtomolar level using a glassy carbon electrode modified with chitosan, graphene sheets, and a poly(amidoamine) dendrimer composite with gold and silver nanoclusters, *Microchimica Acta*, 182: 77-84 pp.
- Liu, S., Liu, J., Wang, L. and Zhao, F.**, 2010, Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition, *Bioelectrochemistry*, 79 (1): 37-42 pp.
- Liu, X., Zhang L., Wei, S., Chen, S., Ou, X. and Lu, Q.**, 2014, Over oxidized polyimidazole/grapheneoxide copolymer modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, guanine and adenine, *Biosensors and Bioelectronics*, 57: 232–238 pp.
- Lize, M., Pilarski, S. and Dobbelstein, M.**, 2010, E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, 17: 452-458 pp.
- Lu, C.H., Yang, H.H., Zhu, C.L., Chen, X. and Chen G.N.**, 2009, A graphene platform for sensing biomolecules, *Angewandte Chemie International Edition*, 48: 4785 –4787 pp.
- Luo, X. L., Morrin, A., Killard, A. J. and Smyth, M. R.**, 2006, Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanalysis*, 18 (4): 319–326 pp.
- Lusi, E. A., Passamano, P. Guarascio, Scarpa, A. and Schiavo L.**, 2009, Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs, *Analytical Chemistry*, 81: 2819–2822 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ma, W., Situ, B., Lv, W., Li, B., Yin, X., Vadgama, P., Zheng, L. and Wang, W.,** 2016, Electrochemical determination of microRNAs based on isothermal strand-displacement polymerase reaction coupled with multienzyme functionalized magnetic micro-carriers, *Biosensors and Bioelectronics*, 80: 344-351 pp.
- Ma, X., Jianga, Y., Jia, F., Yuc, Y., Chen, J. and Wang Z.,** 2014, An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella, *Journal of Microbiological Methods*, 98: 94–98 pp.
- Marin, S., and Merkoçi, A.,** 2012, Nanomaterials based electrochemical sensing applications for safety and security, *Electroanalysis*, 24: 459 – 469 pp.
- McFarland, A. D. and Van Duyne, R. P.,** 2003, Single silver nanoparticles as real- time optical sensors with zeptomole sensitivity, *Nano Letters*, 3: 1057–1062 pp.
- McTigue, P.M., Peterson, R.J. and Kahn, J.D.,** 2004, Sequence-dependent thermodynamic parameters; for locked nucleic acid (LNA)-DNA duplex formation, *Biochemistry*, 43, 5388–5405 pp.
- Meng, X., Zhou, Y., Liang, Q., Qu, X., Yang, Q., Yin, H. and Ai, S.,** 2013, Electrochemical determination of microRNA-21 based on bio bar code and hemin/G-quadruplet DNAenzyme, *Analyst*, 138: 3409-3415 pp.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., Vale, M. and Alegret, S.,** 2005, New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 826–838 pp.
- Miller, J.N. and Miller, J.C.,** 2005, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education, 271: 121-123 pp.
- Monk, P.,** 2002, “Fundamentals of electroanalytical chemistry”, Willey & Sons, England, 14p.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A. and Lin, Y.,** 2002, Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochemical Communications*, 4: 743–746 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muti, M., Sharma, S., Erdem, A. and Papakonstantinou, P.,** 2011, Electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization by single-use graphene oxide based sensor, *Electroanalysis*, 23: 272-279 pp.
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V. , Jiang, D., Katsnelson, M.I. , Grigorieva, I.V., Dubonos, S.V. and Firsov, A.A.,** 2005, Two-dimensional gas massless Dirac fermions in graphene, *Nature*, 438: 197–200 pp.
- Olenych, I.B., Aksimentyeva, O.I., Monastyrskii, L.S., Horbenko, Y.Y., Partyka M.V., Luchechko, A.P. and Yarytska, L.I.,** 2016, Effect of graphene oxide on the properties of porous silicon, *Nanoscale Research Letters*, 11: 43-50 pp.
- Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Özkan, D., Tuğrul, B., Topcuoglu, N., Erken H. and Taylan, M.,** 2003, Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor v leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Analytical Chemistry*, 75: 2181– 2187 pp.
- Palecek, E. and Bartosík, M.,** 2012., Electrochemistry of nucleic acids, *Chemical Reviews*, 112: 3427–3481 pp.
- Palecek, E. and Fojta, M.,** 2001, DNA hybridization and damage, *Analytical Chemistry*, 73: 75–83 pp.
- Palecek, E.,** 1961, Oscillographic polarography of deoxyribonucleic acid degradation products, *Biochimica and Biophysica Acta*, 51: 1–8 pp.
- Pandey, A.K., Agarwal, P., Kaur, K. and Datta, M.,** 2009, MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 23: 221–232 pp.
- Patel, D., Boufraqueh, M., Jain M., Zhang, L., He, M., Gesuwan, K., Gulati, N., Nilubol, N., Fojo, T. and Kebebew, E.,** 2013, miR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors, *Surgery*, 154: 1224-1229 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patolsky, F. and Lieber, C.M.**, 2005, Nanowire nanosensors, *Materials Today*, 8 (4): 20–28 pp.
- Peng, H., Soeller, C., Vigar, N., Kilmartin, P. A., Cannell, M. B., Bowmaker, G. A., Cooney, R. P. and Travas-Sejdic, J.**, 2005, Label-free electrochemical DNA sensor based on functionalised conducting copolymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1821-1828 pp.
- Peng, H., Soeller, C., Cannell, M. B., Bowmaker, G. A., Cooney and R. P., Travas-Sejdic, J.**, 2006, Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1727-1736 pp.
- Peng, Y., Jiang J. and Yu R.**, 2014, A sensitive electrochemical biosensor for microRNA detection based on streptavidin–gold nanoparticles and enzymatic amplification, *Analytical Methods*, 6: 2889–2893 pp.
- Pietrzyk, D.J. and Frank, C. W.**, 1979, “Analytical Chemistry”, 2.Baskı, Academic press: 226- 239 pp.
- Plambeck, J. A. and Lown, J. W.**, 1984, Electrochemical studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J. Electrochem. Soc.*, 131 (11): 2556-2563 pp.
- Pöhlmann, C. and Sprinzl, M.**, 2010, Electrochemical detection of microRNAs via gap hybridization assay, *Analytical Chemistry*, 82: 4434–4440 pp.
- Pumera, M., Sanchez, S., Ichinose, I. and Tang, J.**, 2007, Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators B Chemical*, 123: 1195–1205 pp.
- Qiu, L., Zhou, H., Zhu, W., Qiu, L., Jiang, J., Shen, G. and Yu, R.**, 2013, A novel label-free fluorescence aptamer-based sensor method for cocaine detection based on isothermal circular strand-displacement amplification and graphene oxide absorption, *New Journal of Chemistry*, 37: 3998-4003 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qi, X., Gao, H., Zhang, Y., Wang, X., Chen, Y. and Sun, W.,** 2012, Electrochemical DNA biosensor with chitosan-Co₃O₄ nanorod-graphene composite for the sensitive detection of staphylococcus aureus nuc gene sequence, *Bioelectrochemistry*, 88: 42–47 pp.
- Ramanavicius, A., Ramanaviciene A. and Malinauskas, A.,** 2006, Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole, *Electrochimica Acta*, 51: 6025-6037 pp.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z. and Oren, M.,** 2007, Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53- mediated apoptosis, *Molecular Cell*, 26: 731-743 pp.
- Ravindran, S., Chaudhary, S., Colburn, B., Özkan and M., Özkan, C. S.,** 2003, Covalent coupling of quantum dots to multiwalled carbon nanotubes for electronic device applications, *Nano Letters*, 3: 447–453 pp.
- Ren, Y., Deng, H., Shen, W. and Gao, Z.,** 2013, A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum, *Analytical Chemistry*, 85: 4784–4789 pp.
- 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.
- Ruan, K., Fang, X.G. and Ouyang, G.L.,** 2009, MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer, *Cancer Letters*, 285: 116–126 pp.
- Ryoo, S.R., Lee, J., Yeo, J., Na, H.K., Kim, Y.K., Jang, H., Lee, J.H., Han, S.W., Lee, Y., Kim, V.N. and Min, D.H.,** 2013, Quantitative and multiplexed microRNA sensing in living cells based on peptide nucleic acid and nano graphene oxide (PANGO), *American Chemical Society*, 7: 5882-5891 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salem, A. K., Chao, J., Leong, K. W. and Searson, P. C.,** 2004, Receptor-mediated self-assembly of multi-component magnetic nanowires, *Advanced Materials*, 16: 268–271 pp.
- Schipper, H. M., Maes, O. C., Chertkow, H. M. and Wang, E.,** 2007, MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells, *Gene Regulation and Systems Biology*, 1: 263-274 pp.
- Sengiz, C., Congur, G. and Erdem, A.,** 2015, Development of ionic liquid modified disposable graphite electrodes for label-free electrochemical detection of DNA hybridization related to *Microcystis spp.*, *Sensors*, 15: 22737-22749 pp.
- Service, R. F.,** 1998, New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399 pp.
- Skoog, D. A., Holler, F.J. and Nieman T.A.,** 1998, “Enstrümantal analiz İlkeleri”, Kılıç E., Köseoğlu, F. Ve Yılmaz, H., (Eds.), Bilim Yayıncılık, Ankara, 563s.
- Skoog, D. A., West, D. A. and Holler, F. J.,** 1996, “Analitik Kimyanın Temelleri”, Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (Eds.), Bilim Yayıncılık, 303s.
- Song, Y., Yang, X., Li, Z., Zhao, Y. and Fan, A.,** 2014, Label-free chemiluminescent ATP aptasensor based on graphene oxide and an instantaneous derivatization of guaninebases, *Biosensors and Bioelectronics*, 51: 232-237 pp.
- Souza, C.D., Zrig, S., Wang, D., Pham, M.C. and Piro, B.,** 2014, Electrocatalytic miRNA Detection Using Cobalt Porphyrin-Modified Reduced Graphene Oxide, *Sensors*, 14: 9984-9994 pp.
- Su, S., Chen, B., He, M. and Hu, B.,** 2014, Graphene oxide–silica composite coating hollow fiber solid phase micro extraction online coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace heavy metals in environmental water samples, *Talanta*, 123: 1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sugiyama, T., Hasegawa, G., Niikura, C., Kuwata, K., Imamura, Y., Demizu, Y., Kurihara, M. and Kittaka, A.,** 2017, PNA monomers fully compatible with standard Fmoc-based solid-phase synthesis of pseudocomplementary PNA, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27: 3337-3341 pp.
- Sun, E., Wang, L., Zhou, X., Ma, C., Sun, Y., Lei, M., Lu, B. and Han, R.,** 2015, Graphene oxide/DNA-decorated electrode for the fabrication of microRNA biosensor, *Royal Society of Chemistry*, 5: 69334-69339 pp.
- Sun, W., Duan, Y., Li, Y., Gao, H. and Jiao, K.,** 2009, Electrochemical behaviors of guanosine on carbon ionic liquid electrode and its determination, *Talanta*, 78: 695-699 pp.
- Thammasoontaree, N., Rattanarat, P., Ruech, N., Siangproh, W., Rodthongkum, N. and Chailapakul, O.,** 2014, Ultra-performance liquid chromatography coupled with graphene/polyaniline nanocomposite modified electrode for the determination of sulfonamide residues, *Talanta*, 123: 115–121 pp.
- Thavanathan, J., Huang, N.M. and Thong, K.L.,** 2014, Colorimetric detection of DNA hybridization based on a dual platform of gold nanoparticles and graphene oxide, 55: 91-98 pp.
- Tran, H.V., Piro, B., Reisberg, S., Duc, H.,T. and Pham, M.,C.,** 2013a, Antibodies directed to RNA/DNA hybrids: An electrochemical immunosensor for microRNAs detection using graphene-composite electrodes, *Analytical Chemistry*, 85: 8469-8474 pp.
- Tran, H.V., Piro, B., Reisberg, S., Tran, L.D., Duc, H.T. and Pham, M.C.,** 2013b, Label-free and reagentless electrochemical detection of microRNAs using a conducting polymer nanostructured by carbon nanotubes: Application to prostate cancer biomarker miR-141, *Biosensors and Bioelectronics*, 49: 164–169 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trigueiro, J. P. C., Lavall, R.L. and Silva, G.G.**, 2014, Supercapacitors based on modified graphene electrodes with poly (ionic liquid), *Journal of Power Sources*, 256: 264-273 pp.
- Tural, H., Gökçel, İ. ve Ertaş, N.**, 2006, “Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 2. Baskı, İzmir, 186: 131-206 ss.
- Vaseashta, A.**, 2005, “Nanostructured Materials Based Next Generation Devices and Sensors, nanostructured and Advanced materials”, Vaseashta A., Dimova-Malinovska, D., Marshall, J. M., (Eds.), Springer, Netherlands, 1p.
- Wang, C.Y., Li, D. and Too, C.O.**, 2009a, Electrochemical properties of graphene paper electrodes used in lithium batteries, *Chemical Materials*, 21: 2604–2606 pp.
- Wang, H.L., Hao, Q., Yang, X.J., Lu, L.D. and Wan, X.**, 2009b, Graphene oxide doped polyaniline for supercapacitors, *Electrochemistry Communications*, 11: 1158–1161 pp.
- Wang J.**, 1999, PNA Biosensors for nucleic acid detection, *Current Issues Molecular Biology*, 1(2): 117-122 pp.
- Wang, J.**, 2005a, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors, *Electroanalysis*, 17: 7–14 pp.
- Wang, J.**, 2005b, Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions, *Small*, 1 (11): 1036–1043 pp.
- Wang, J.**, 2005c, Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 130: 421–426 pp.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Farias, P. A. M., Dontha, N. and Luo, D.**, 1996, Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 332: 139-144 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, M., Yin, H., Shen, N., Xu, Z. and Sun, B., Ai, S.,** 2014, Signal-on photoelectrochemical biosensor for microRNA detection based on Bi₂S₃ nanorods and enzymatic amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 53: 232-237 pp.
- Wang, Q., Li, Q., Yang, X., Wang, K., Du, S., Zhang, H. and Nie, Y.,** 2016, Graphene oxide-gold nanoparticles hybrids-based surface plasmon resonance for sensitive detection of microRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 77: 1001-1007 pp.
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L. and Qin, C.,** 2009c, miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation, *Brain Research Bulletin*, 80: 268–273 pp.
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J. and Lin, Y.,** 2011, Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 29: 205-212 pp.
- Washietl, S., Pedersen, J.S., Korbel, J.O., Stocsits, C., Gruber, A.R., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Reiche, K., Tanzer, A., Ucla, C., Wyss, C., Antonarakis, S.E. , Denoeud, F., Lagarde, J., Drenkow, J., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Guigó, R., Snyder, M., Gerstein, M.B., Reymond, A., Hofacker, I.L. and Stadler, P.F.,** 2007, Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome, *Genome Research*, 17: 852–864 pp.
- Wassei, J. K. and Kaner, R.B.,** 2010, Graphene, a promising transparent conductor, *Materials Today*, 13: 52–59 pp.
- Welch, C., Chen, Y. and Stallings, R.L.,** 2007, microRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells, *Oncogene*, 26: 5017-5022 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wen, Y., Liu, G., Pei, H., Li, L., Xu, Q., Liang, W., Li, Y., Xu, L., Ren, S. and Fan, C.,** 2013, DNA nanostructure-based ultrasensitive electrochemical microRNA biosensor, *Methods*, 64: 276–282 pp.
- Wildgoose, G. G., Banks, C. E., Leventis, H. C. and Compton, R. G.,** 2006, Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis, *Microchimica Acta*, 152: 187–193 pp.
- Willner, I. and Willner, B.,** 2010, Biomolecule-based nanomaterials and nanostructures, *Nano Letters*, 3805–3815 pp.
- Wu, J., Zhou, C., Yu, J., Cao, H., Li, S. and Jia, W.,** 2014, Design of infrared surface plasmon resonance sensors based on graphene ribbon arrays, *Optics & Laser Technology*, 59: 99–103 pp.
- Wu, K., Fei, J., Bai, W. and Hu, S.,** 2003, Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at a nanostructured film-modified electrode, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 376: 205–209 pp.
- Xia, N., Zhang, L., Wang, G., Feng, Q. and Liu, L.,** 2013, Label-free and sensitive strategy for microRNAs detection based on the formation of boronate ester bonds and the dual-amplification of gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 47: 461–466 pp.
- Xu, Y., Wang, Y., Liu, S., Yu, J., Wang, H., Guo, Y. and Huang, J.,** 2016, Ultrasensitive and rapid detection of miRNA with three-way junction structure-based trigger-assisted exponential enzymatic amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 81: 236–241 pp.
- Xue, C., Wang, X., Zhu, W., Han, Q., Zhu, C., Hong, J., Zhou, X. and Jian, H.,** 2014, Electrochemical serotonin sensing interface based on double-layered membrane of reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites and molecularly imprinted polymers embedded with gold nanoparticles, *Sensors and Actuators B*, 196: 57–63 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, G., Cao, J., Li, L., Rana, R.K. and Zhu, J.J.,** 2013a, Carboxymethyl chitosan-functionalized graphene for label-free electrochemical cytosensing, *Carbon*, 51: 124-133 pp.
- Yang, T., Meng, L., Wang, X., Wang, X., Wang, L. and Jiao, K.,** 2013b, Direct electrochemical DNA detection originated from the self-redox signal of sulfonated polyaniline enhanced by graphene oxide in neutral solution, *ACS Applied Material Interfaces*, 5: 10889-10894 pp.
- Yang, X., Qin, J., Jiang, J., Chen, K., Yan, X., Zhang, D., Li, X. and Tang, H.,** 2015, Fabrication of P25/Ag₃PO₄/graphene oxide heterostructures for enhanced solar photocatalytic degradation of organic pollutants and bacteria, *Applied Catalysis B: Environmental*, 166: 231–240 pp.
- Yang, Y.J. and Li, W.,** 2014, CTAB functionalized graphene oxide/multiwalled carbon nanotube composite modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite, *Biosensors and Bioelectronics*, 56: 300-306 pp.
- Yapasan, E., Caliskan, A., Karadeniz, H. and Erdem, A.,** 2010, Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors, *Materials Science and Engineering B*, 169 (1-3): 169–173 pp.
- Yıldız, A. ve Genç, Ö.,** 1993, “Enstrümental Analiz”, Hacettepe Yayınları, A-64, 289-384 ss.
- Yin, H. and Ai, S.,** 2013, Electrochemical determination of microRNA-21 based on bio bar code and hemin/G-quadruplet DNAenzyme, *Analyst*, 138: 3409-3415 pp.
- Yin, H., Zhou, Y., Chen, C., Zhu, L. and Ai, S.,** 2012a, An electrochemical signal ‘off-on’ sensing platform for microRNA detection, *Analyst*, 137: 1389-1395 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yin, H., Zhou, Y., Zhang, H., Meng, X. and Ai, S.,** 2012b, Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system, *Biosensors and Bioelectronics*, 33: 247– 253 pp.
- Yola, M.L., Tanju, E. and Atar, N.,** 2014, A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide, *Electrochimica Acta*, 125: 38-47 pp.
- Zeng, Y.B., Zhou, Y., Kong, L., Zhou, T.S. and Shi, G.Y.,** 2013, A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine, *Biosensors and Bioelectronics*, 45: 25–33 pp.
- Zhang, Z, Gu, S., Ding, Y., Shen, M. and Jiang, L.,** 2014, Mild and novel electrochemical preparation of β -cyclodextrin/ graphene nanocomposite film for super-sensitive sensing of quercetin, *Biosensors and Bioelectronics*, 57: 239–244 pp.
- Zhou, Y., Dong, H., Liu, L., Liu, J. and Xu, M.,** 2014a, A novel potentiometric sensor based on a poly (anilineboronic acid)/graphene modified electrode for probing sialic acid through boronic acid-diol recognition, *Biosensors and Bioelectronics*, 60: 231-236 pp.
- Zhou, Y., Wang, M., Xu, Z., Ni, C., Yin, H. and Ai, S.,** 2014b, Investigation of the effect of phytohormone on the expression of microRNA-159a in *Arabidopsis thaliana* seedlings based on mimic enzyme catalysis systematic electrochemical biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 244-250 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi: 28.05.1992

Doğum yeri: İzmir

Eğitim:

İlköğrenimi: Dokuzeylül İlköğretim Okulu (1998-2003)-Suphi Koyuncuoğlu İlköğretim Okulu (2003-2006)

Lise öğrenimi: İzmir Atatürk Lisesi (2006-2010)

Lisans Eğitimi: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2010-2015)

Yüksek Lisans Eğitimi: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı (Eylül 2015-Ekim 2017)

Aldığı burslar:

Bursiyer araştırmacı, 115Z099 no'lu TÜBİTAK projesi: Grafen Oksit Modifiye Elektrotlarla Empedimetrik ve Voltametrik miRNA Tayini (15 Eylül 2015-15 Mayıs 2016)

Yer aldığı projeler:

Proje Başlığı: Grafen Oksit Modifiye Elektrotlarla Empedimetrik ve Voltametrik miRNA Tayini

115Z099 no'lu TÜBİTAK projesi (Eylül 2015-Mayıs 2016), Proje bursiyeri

Proje Başlığı: Grafen Oksit Modifiye Elektrotların Geliştirilmesi ve miRNA Tayinine Yönelik Uygulamaları

BAP projesi; 16 /FBE/011 (Eylül 2016-halen devam etmektedir), Proje araştırmacısı

YAYINLAR

Isin, D., Eksin, E., Erdem, A., 2017, Graphene Oxide Modified Single-use Electrodes and Their Application for Voltammetric miRNA Analysis, Material Science and Engineering: C, 75: 1242-1249.

Erdem, A., Polat, D., **Isin, D.**, Eksin, E., 2017, Graphene Oxide Modified Chemically Activated Graphite Electrodes for Detection of microRNA, *Electroanalysis*, 29: 1350-1358.

BİLDİRİLER

D.Isin, E. Eksin, A. Erdem, “Graphene Oxide Modified Disposable Sensors for Electrochemical Detection of Nucleic Acids”, 13th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN16), Thessaloniki, Greece, (07.2016); *Poster Presentation*.

D. Isin, D. Polat, E. Eksin, A. Erdem, “Impedimetric Detection of microRNA by Using Graphene Oxide Modified Graphite Electrodes”, International Conference 10th Aegean Analytical Chemistry Days, Çanakkale 18 Mart University & T.C. İstanbul University, (10.2016); *Project Poster Presentation*.