



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEFTAZİDİM-DNA ETKİLEŞİMİNİN DNA BİYOSENSÖRLERİ İLE
İNCELENMESİ**

BEGÜM TUĞÇE KURTOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜLTEKİN GÖKÇE**

SİVAS-2021

**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEFTAZİDİM-DNA ETKİLEŞİMİNİN DNA BİYOSENSÖRLERİ
İLE İNCELENMESİ**

BEGÜM TUĞÇE KURTOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜLTEKİN GÖKÇE**

SIVAS-2021

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

SEFTAZİDİM-DNA ETKİLEŞİMİNİN DNA BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ

Begüm Tuğçe KURTOĞLU
Yüksek Lisans Tezi
Analitik Kimya Ana Bilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE
2021, xi+81 sayfa

Seftazidim, ağır bakteriyel olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan oldukça geniş spektrumlu bir III. kuşak sefalosporindir. Bu çalışmada seftazidimin tek sarmal ve çift sarmal calf thymus DNA ile etkileşimi tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanılarak voltametrik ve impedimetrik yöntemlerle ayrı ayrı incelenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışma sırasıyla kalem grafit elektrotların elektrokimyasal olarak aktive edilmesi, elektrot yüzeyine DNA probunun pasif adsorpsiyon ile immobilize edilmesi ve DNA'nın seftazidim ile etkileşiminin voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmesi ve sonuçların istatistiksel verilerle açıklanması basamaklarını içermektedir. Çalışmanın her basamağında pH, sıcaklık, derişim ve zaman optimizasyonları yapılmıştır. Çalışmada seftazidim-DNA etkileşimi dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi, kare dalga voltametrisi ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi teknikleri ile incelenmiştir. Tek sarmal ve çift sarmal DNA kullanılarak seftazidim tayini için en düşük tayin sınırları sırasıyla voltametrik olarak 2,40 ppm ve 2,38 ppm; impedimetrik olarak 0,97 ppm ve 1,09 ppm olarak bulunmuştur. Deney sonuçları seftazidimin DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığını göstermiştir. Projede çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşı elektrot olarak platin telden oluşan üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Seftazidim, Kalem grafit elektrot, Tek sarmal DNA, Diferansiyel puls voltametrisi, Kare dalga voltametrisi, İmpedimetrik DNA biyosensörü

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CEFTAZIDIME-DNA INTERACTION WITH DNA BIOSENSORS

Begüm Tuğçe KURTOĞLU
Master Thesis

Department of Analytical Chemistry

Supervisor :Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE

2021, xi+81 .pages

Ceftazidime is a very broad spectrum belongs to III. generation cephalosporin used in the treatment of severe bacterial infections. In this study, the interaction of ceftazidime with single-stranded and double-stranded calf thymus DNA was investigated separately using voltammetric and impedimetric methods with disposable pencil graphite electrodes and the results obtained were compared. The study includes the steps of electrochemically activating pencil graphite electrodes, immobilizing the DNA probe onto the electrode surface by passive adsorption, analyzing the interaction of DNA with ceftazidime voltammetrically and impedimetrically and explaining the results with statistical data. pH, temperature, concentration and time optimizations were carried out in every step of the study. In the study, ceftazidime-DNA interaction was investigated by cycling voltammetry, differential pulse voltammetry, square wave voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques. The detection limits for ceftazidime determination using single-stranded and double-stranded DNA were estimated respectively of 2,40 ppm and 2,38 ppm voltammetrically; 0,97 ppm and 1,09 ppm impedimetrically. Experimental results showed that ceftazidime binds to DNA as electrostatically. In the project, a triple electrode system consisting of pencil graphite electrode as working electrode, Ag / AgCl as reference electrode and platinum wire as counter electrode were used.

Keywords: Ceftazidime, Pencil graphite electrode, Single-stranded DNA, Differential pulse voltammetry, Square Wave Voltammetry, Impedimetric DNA biosensor

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY	ii
YÖNERGE	iii
KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR/SİMGELER	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Elektrokimya	5
2.1.1. Elektrokimyasal tabakalar	5
2.1.2. Voltametri.....	8
2.1.2.1. Voltametrizde Kullanılan Uyarma Sinyalleri:.....	9
2.1.2.2. Voltametri de Kullanılan Elektrotlar	9
2.1.2.3. Çalışma Elektrotları	9
2.1.2.4. Referans Elektrotlar	12
2.1.2.4. Karşıt elektrot	14
2.1.3. Elektrokimyasal Olayda Kütle Aktarım Yolları.....	14
2.1.4. Voltamogramlar.....	15
2.1.4.1. Voltametrik Akımlar.....	16
2.1.4.3. Polarografi	18
2.1.5. Voltametrik Teknikler	19
2.1.5.1. Doğrusal Taramalı Voltametri	19
2.1.5.2. Dönüşümlü Voltametri	19
2.1.5.3. Diferansiyel Puls Voltametri	20
2.1.5.4. Kare Dalga Voltametrisi	20
2.1.5.5. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)	21

2.2. Biyosensör.....	23
2.2.1. Bir biyosensör de olması gereken özellikler	24
2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Moleküllerin Yapıları: ...	26
2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA.....	26
2.3.2. İnterkalasyon	29
2.3.3. DNA Hakkında Kullanılan Terimler	29
2.4. DNA Biyosensörleri.....	30
2.4.1. DNA - İlaç Etkileşiminin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerle algılanması	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1. Deneyde Kullanılan Aletler	35
3.3. Seftazidim Hakkında Genel Bilgi	36
3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.4.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:	36
3.4.2. DNA Çözeltilerinin Hazırlanması:.....	37
3.5. Kullanılan Yöntem.....	38
3.5.1. Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması	38
3.6. Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine DNA'nın tutturulması (PGE/DNA)	39
3.6.1. PGE Yüzeyine ct dsDNA (PGE/dsDNA) ve ct ssDNA (PGE/ssDNA) İmmobilizasyonunun İncelenmesi	39
3.6.1.1. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Süresinin İncelenmesi	39
3.6.1.2. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Miktarının İncelenmesi	41
3.6.2. DNA İmmobilize Edilmiş PGE' lerle (PGE/DNA) SEF-DNA Etkileşiminin İncelenmesi.....	42
3.6.2.1. PGE/DNA ile SEF-DNA Etkileşiminde Uygun Etkileşim Süresinin incelenmesi	42
3.6.2.2. PGE/DNA ile SEF Miktarının İncelenmesi.....	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
4.1. CV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma ..	45
4.2. SEF-DNA etkileşiminde SWV yöntemine göre yapılan deneylere ilişkin bulgular ve tartışma.....	46

4.2.1.PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular ve tartışma.....	46
4.2.1.1. PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonunda uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma.....	46
4.2.1.2. PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonunda uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma.....	50
4.2.2. SEF-DNA Etkileşimine İlişkin Bulgular Ve Tartışma.....	53
4.2.2.1. SEF-DNA Etkileşiminde Uygun Etkileşim Süresinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular ve Tartışma	53
4.2.2.2. SEF-DNA etkileşiminde optimum etkileşim derişimlerinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma	56
4.3. SEF-DNA Etkileşiminde EIS Tekniğı Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma	60
4.3.1. PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonuna ilişkin bulgular ve tartışma.....	64
4.3.1.1. PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonunda en uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma.....	64
4.3.1.2 PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonunda en uygun etkileşim derişiminin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma.....	66
4.3.2. SEF-DNA ile etkileşimine ilişkin bulgular ve tartışma.....	68
4.3.2.1. SEF-DNA etkileşiminde uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma	68
4.3.2.2. SEF-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma	70
5. SONUÇ	74
6. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektrokimyasal Hücre ve Biyosensör Düzenegi.....	5
Şekil 2.3. Elektroanalitik Yöntemler Şeması.....	7
Şekil 2.4. Üçlü Elektrot Sistemi	8
Şekil 2.5. Voltametri de kullanılan yöntemlerde potansiyel uyarma sinyalleri.....	9
Şekil 2.5. Karbon Pastası Elektrot	11
Şekil 2.6. Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) kalem grafit elektrot (PGE), (C) perde baskılı elektrot (SPE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE).....	12
Şekil 2.7. Elektrokimyasal Kütle Aktarım Olaylarının Gösterimi	14
Şekil 2.8. (a) Dönüşümlü voltametri de elektroda uygulanan potansiyel- zamanı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametri de elde edilen akım-potansiyel eğrisi .	19
Şekil 2.9. SWV de (a) uyarma sinyali (b) puls taraması ile oluşan uyarma sinyali (c) kare dalga da oluşan uyarma sinyalleri.....	21
Şekil 2.10. Elektrokimyasal hücrede impedimetrik ölçüm sonrası Nyquist eğrisi.....	22
Şekil 2.11. Biyosensörün çevirici yapısı	24
Şekil 2.12. Pürin ve pirimidin bazlarının yapısı	26
Şekil 2.13. DNA-RNA yapıları	27
Şekil 2.14. DNA'nın yapısı ve dizilim şekli.....	28
Şekil 2.15. DNA bazlarıyla etkileşen hibridizasyon indikatöründe DNA dizi algılanması	32
Şekil 3.1. Deney düzenegi	38
Şekil 4.1. 10^{-2} M SEF'in PBS'de (pH 7,4) dönüşümlü voltamogramı (tarama hızı: 50 mV/s).....	45
Şekil 4.2. ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B).....	47
Şekil 4.3. ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B).....	49

Şekil 4.4. ct dsDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında SWV tekniğı ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B).....	51
Şekil 4.5. ct ssDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 20 (e) 30 (f) 40 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında SWV tekniğı ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)	52
Şekil 4.6. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 dakikalarda bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B).....	54
Şekil 4.7. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 dakikalar da bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B).....	55
Şekil 4.8. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 ppmler de bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B).....	57
Şekil 4.9. SEF-dsDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiğı.....	58
Şekil 4.10. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 30 ppmler de bekletilerek SWV yöntemiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B).....	59
Şekil 4.11. SEF-ssDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiğı	60
Şekil 4.12. dsDNA-SEF etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-dsDNA etkileşimden sonra PGE.....	62
Şekil 4.13. ssDNA-SEF etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-ssDNA etkileşimden sonra PGE.....	62

Şekil 4.14. SEF-dsDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-dsDNA etkileşiminden sonra PGE	63
Şekil 4.15. SEF-ssDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-ssDNA etkileşiminden sonra PGE	63
Şekil 4.16. dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ölçümlerinin ortalama Δ oran değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi	65
Şekil 4.20. 30 ppm sabit derişimdeki SEF'nin dsDNA ile PGE yüzeyine tutturulmasına ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi.....	69
Şekil 4.21. 30 ppm sabit derişimdeki SEF'nin ssDNA ile PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi.....	70
Şekil 4.22. 20 dakika sürede SEF'in dsDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi	71
Şekil 4.23. İmpedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin SEF ile dsDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyon grafiği	71
Şekil 4.24. 10 dakika sürede SEF'nin ssDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi	72
Şekil 4.25. İmpedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin SEF ile ssDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyon grafiği	72

KISALTMALAR/SİMGELER

SEF	Seftazidim
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
SPCE	Perde baskılı karbon elektrot
CPE	Karbon pasta elektrodu
R-GCE	Dönen camsı karbon elektrot
PGE	Kalem grafit elektrot
PGE/dsDNA	Yüzeyine dsDNA immobilize edilmiş PGE
PGE/ssDNA	Yüzeyine ssDNA immobilize edilmiş PGE
GCE	Camsı karbon elektrot
DKE	Doygun kalomel elektrot
SHE	Standart Hidrojen Elektrot
HMDE	Asılı civa damla elektrodu
AuE	Altın elektrot
SWV	Kare Dalga Voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
ABS	Asetat Tampon çözelti
Rct	Aktarılan yüke karşı gerçekleşen direnç
Cdl	Çift tabaka kapasitansı
PBS	Fosfat Tampon çözelti

CPSA Kronopotansiyometrik sıyırma analizi

W Warburg empedansı



1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nükleik asitler canlıda genetik bilginin aktarıldığı, saklandığı ve taşındığı moleküllerdir. 1960'lı yıllarda nükleik asitlerin elektroaktivitesi Palecek tarafından keşfedilmiştir. Bu sayede bu moleküllerin tayini için birçok elektrokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir [1]. Birçok bileşiğin tanınmasında ve incelenmesinde nükleik asitlerin kullanımı büyük önem taşıyor hale gelmiştir. 1950'li yıllarında ise Crick ve Watson tarafından deoksiribonükleik asit (DNA) keşfedilmiştir. Bu keşif sonrasında yapılan çoğu araştırmalar DNA etkileşimine dayalı biyosensörler ile ilgili olmuştur ve bu biyosensörlerin gelişmesine odaklanılmıştır [2,3].

Deoksiribonükleik asit (DNA), tüm canlılar için büyük önem taşıyarak gen aktarımını gerçekleştirir. Kendinden daha küçük moleküllerle elektrostatik olarak ya da olmayarak etkileşim yapar. Meydana gelen bu etkileşimlerin olumlu veya olumsuz sonuçları olabilir. Bu yüzden *in vivo* olarak genlerin mutasyonu, hastalıkların nedenleri, DNA kopyalanması, DNA hedefli ilaçların tayini ve etki mekanizmasıyla ilgili konular çok önemli bir yere sahiptirler. Özellikle son zamanlarda anahtar konulardan en önemlisi olarak söylenmektedir [4]. Bu nedenle son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin geliştirmesine ve kullanımına yönelik elektrokimyasal yöntemlerin kullanımına ilgi büyük ölçüde artmıştır.

Elektrokimyasal sensörler yani algılayıcı sistemler analitik kimya olmak üzere; tıp, mühendislik, kimya, biyoloji, optik, savunma sanayisi, gıda üretim analizleri vb. pek çok bilim dalının bilgilerinden yararlanarak kendisine pek çok uygulama alanı bulmuş ve çalışmalarımızın temelini oluşturmuştur. Elektrokimyasal sensörler IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından "İyonlara seçici ya da kimyasal bileşiklere tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar" olarak tanımlanmıştır [5].

Tayini gerçekleştirilecek olan molekülün biyo algılayıcı bileşenle etkileşmesinden sonra oluşan sinyalleri elektrokimyasal sinyallere çeviren sistemlere elektrokimyasal biyosensörler denir. Elektrokimyasal sistemlerin yapılarına bir biyolojik element (enzim, DNA, hücre vb.) katıldığında biyosensör ismini alırlar [6].

Biyosensörler, biyolojik olayı algılayan işlenebilir hale getirerek onu bir sinyale dönüştüren analitik aletlerdir [7]. Biyosensör kelimesi “**biyo**” (biyolojik kökenli) ve “**sensör**” (algılayıcı) gibi iki ayrı kelimenin bir araya gelmesiyle oluşan gelen nitel ve nicel analiz yapabilen karmaşık yapıları cihazlardır [8].

Canlı yapısı biyosensörlere verilebilecek en iyi örnektir. Çünkü canlılar buldukları çevreyle vücutlarında sahip oldukları fiziksel ve kimyasal biyolojik sensörler ile iletişim kurabilirler. Mesela duyu organlarıyla görebilirler, tadabilirler, dokunabilirler veya konuşabilirler. Bundan kaynaklı biyolojik sensörler canlıları kapsayan tüm alanlarda kullanılırlar.

Biyosensörler son zamanlarda hayatı kolaylaştıran en önemli etken haline gelmişlerdir. Biyosensörler ölçümü yapılacak olan maddelerin biyolojik sinyallerini elektriksel sinyale çeviren analitik cihazlardır. Bu cihazlar iki dönüştürücüden yani elektrokimyasal ve biyokimyasal sistemlerden meydana gelirler. Bu sistemlerden elektrokimyasal olan kısmı analizi yapılacak olan maddenin analiz sonucu sayısal verilere dönüştürürken, biyokimyasal kısmı ise analizi yapılacak olan maddeyle etkileşim yaparak maddeyi tanıır.

Literatüre baktığımızda teknolojinin gelişiminden ve biyolojik bileşenlerin hassas duyarlılığından kaynaklı son yıllarda biyosensörlerin kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Biyo algılayıcı olarak nükleik asitler, enzim, antikor, reseptör vb. maddeler kullanılmıştır. Bu cihazlarda en önemli biyo algılayıcı olarak ise DNA kullanılmıştır. Biyo algılayıcı olarak DNA'nın kullanılması DNA-madde etkileşimi hakkında miktar tayini ve etkileşiminin incelenmesi için önemlidir. Bu nedenle de elektrokimyasal DNA biyosensörleri oldukça gelişmiştir ve bu alanda birçok çalışma yapılmıştır [9].

Biyosensörler biyolojik algılayıcı olarak Deoksiribonükleik asit (DNA)'nın kullanıldığı cihazlara DNA biyosensörleri (Genosensörler) olarak adlandırılır [10]. Genosensörler bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tespit edilmesinde hızlı sonuçlar almada olanak tanımaktadır. Bu sayede DNA ile etkileşim yaparak DNA'ya zarar veren maddelerin tespitini sağlar.

Deoksiribonükleik asit ilaç molekülleriyle ve kimyasal maddelerle etkileşim de bulunurlar. Bu etkileşimde geliştirilen metotların araştırılması, ilaç tayinine yönelik yeni metot geliştirme bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu durum anti kanser

etkisi taşıyan ilaç moleküllerinde DNA ile etkileşmesinden kaynaklı hızlı ve güvenilir bir şekilde ortaya konması ve ilaç geliştirme bakımından büyük önem taşımaktadır [11-13].

Deoksiribonükleik asitin yapısı Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin bazlarından meydana gelir. Bilinen bir oligonükleotid dizisine sahiptir. Bu yapılar DNA biyosensörlerinde ligand olarak kullanılır. Bu sayede son zamanlarda DNA biyosensörlerine ilgi önemli ölçüde artmıştır. DNA biyosensörleri kullanılarak bazı ilaçların ve DNA hedefli maddelerin DNA üzerinde meydana getirdiği etkilerin ortaya çıkarılması için ve mutasyon tayinlerinde, maddelerin toksik etkilerinin bulunmasında ya da bu maddelerin etkileşim mekanizmasında kullanılabilirler [14].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri temel olarak kullanılacak olan ilaç, madde, protein, toksin vb. maddeler ve DNA'nın elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle ve etkileşim sonrasında DNA'nın ve maddenin yapısında meydana gelen değişimlerin elektrokimyasal metotlarla incelenmesinde, miktar tayinlerinde ve DNA'da meydana gelen hibridizasyonu incelemede kullanılır.

Elektrotlar hızlı seri kullanım için küçültülebilir ve farklı şekillerde düzenlenip kullanılabilirler. Biyolojik tanımda elektrotlar; elektrot-çözelti ara yüzeyinde oluşan elektrik sinyaline, empedans ya da potansiyel değişimlerine dönüştürebilirler [15,16].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri sayesinde DNA ve ilaç etkileşmesinde meydana gelen sinyallerdeki artış veya azalma olayları gözlemlenir. Bu biyosensörler daha çok anti kanser ilaçlarla DNA arasında meydana gelen etkileşimi gözlemlememize olanak sağlamaktadır. Bu yöntem kullanılarak DNA'daki hasarı bulma içinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanım açısından oldukça hızlı, hassas ve basit analizler gerçekleştiren metotlardan biridir [17-19].

Yapılan çalışmaların içeriğine göre DNA-madde etkileşmesinde meydana gelen sinyallerden elde edilen madde cevaplarına ya da DNA'daki guanin ve adenin sinyallerinde oluşan artma veya azalmaya bağlı olarak elektrokimyasal tayinler yapılmaktadır. Bu sinyallerde oluşan artma ya da azalmaya göre etkileşimde meydana gelen olayın nasıl olduğu açıklanır [20].

Elektrokimyasal yöntemler diğer yöntemlerin aksine daha seçimli, hızlı, az miktar madde kullanılarak ölçüm yapma olanağı, basit, kolay ve maliyet bakımından ucuz yöntemlerdir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri DNA-DNA veya DNA-madde etkileşimleri sonucunda meydana gelen sinyalleri incelemek, oluşan kompleks yapıları anlamak, bağlanma sabiti, maddenin etkileşimi esnasında ortaya çıkan serbest radikallerin gözlemlenmesinde belirlenmesinde ve maddenin hangi noktaya sabitlendiği bölgenin yapısını bulmada olanak sağlar.

1.2. Araştırmanın Amacı

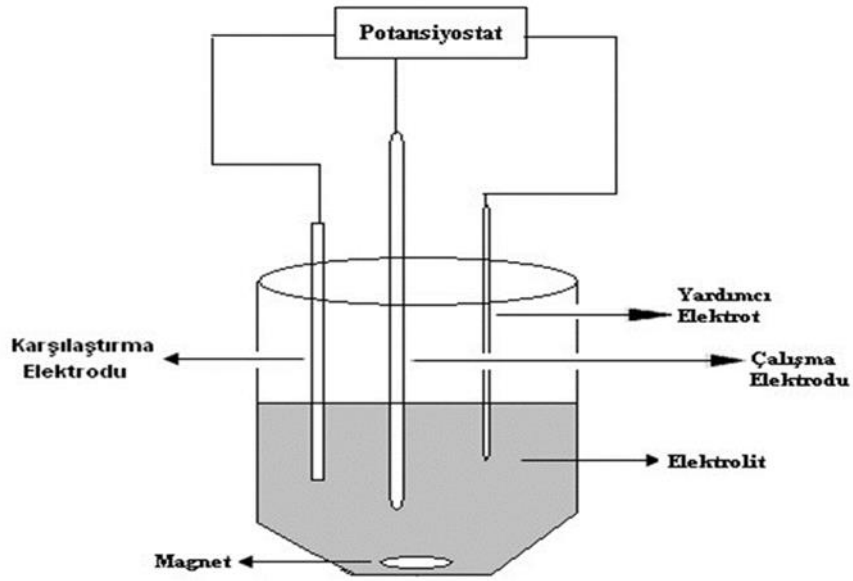
Çalışma da tasarımı gerçekleştirilen elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle DNA-antibiyotik arasındaki etkileşimde meydana gelen değişiklikleri incelenmesi amaçlanmıştır. SEF ile tek ve çift sarmal DNA kullanılarak aralarındaki değişimler ayrı ayrı deneyler yapılarak incelenecektir ve hangisinin en uygun tanıma yüzeyi olabileceğine bakılacaktır.

DNA-SEF etkileşimlerinde meydana gelen değişimleri SWV ve EIS yöntemleri kullanılarak bağımsız birbirine paralel deneyler yapılacaktır. Bu şekilde bu yöntemlerin üstünlükleri bulunan tayin miktarları temel alınarak karşılaştırma yapılacaktır. Ancak, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımında kullanılan bazı elektrotların yani platin, altın, karbon pasta, camsi karbon gibi indikatör elektrotlarının maliyetleri çok yüksektir. Bizim bu çalışmamızda amaçlarımızdan bir diğeri ise indikatör elektrot olarak PGE'nin kullanılması ve bu elektrotun diğerlerine göre tasarımı oldukça basit, maliyeti ucuz ve duyarlılığı da çok yüksek olduğunun kanıtlanması olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, maddelerin elektriksel davranışlarını inceleyen bilim dalıdır. Bu elektriksel davranışlar sonucunda meydana gelen kimyasal ve fiziksel değişiklikler gözlemlenir. Elektrokimyasal tepkimelere indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri de denir. Bunun nedeni ise elektriksel olaylarda meydana gelen elektron ve yük aktarımıdır. Elektrokimyasal tepkimeler, bir düzenele elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleştirilir. Bu tepkimelerin meydana gelebilmesi için; analiti içeren bir çözelti, elektrot sistemi ve elektrotları birbirine bağlayan transistör (çevrim sistemi) gereklidir. Elektrot sistemi dediğimiz bu sistem genellikle üçlü elektrot sisteminden oluşur. Çözelti olarak ise tampon çözeltiler kullanılır.



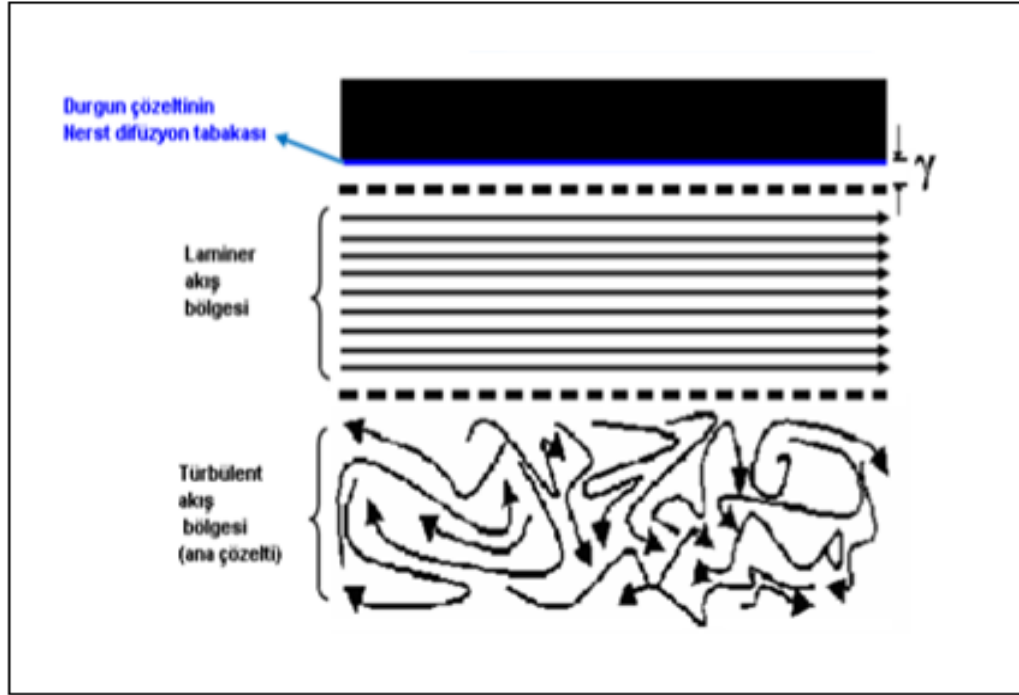
Şekil 2.1. Elektrokimyasal Hücre ve Biyosensör Düzenegi

Üçlü elektrot sisteminde referans elektrotu, çalışma elektrotu ve yardımcı elektrottan oluşmaktadır.

2.1.1. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal ölçümler esnasında elektrot yüzeyiyle analit arasında kütle aktarımına bağlı heterojen tabakalar meydana gelmektedir [21].

Oluşan tabaka şekil 2.2’de gösterildiği gibidir. Şekil 2.2’de gösterilen bölgelerden ilk bölgede çözelti Türbülent ve laminer akış bölgelerinin oluşturduğu çözülden meydana gelen ve burada oluşan kütle aktarımı karıştırıcı tarafından iletimle sağlanır. Diğer bölgede ise elektrot yüzeyinde oluşan γ kalınlığındaki Nernst difüzyon tabakasını oluşturur. Durgun difüzyon tabakası içinde kütle aktarımı, aynı karıştırılmayan çözümlerdeki gibi yalnızca difüzyonla oluşur [21].



Şekil 2.2. Elektrot yüzeyinde oluşan tabaka şeması

Türbülent akış tabakası: Çözelti yığnında meydana gelir.

Laminer akış bölgesi: Düzgün paralel olacak şekilde sıvı tabakalarıyla elektrot yüzeyinde birbiri üzerine kayarlar. Yüzeğe yaklaşıldığında ise laminer akış oluşur.

Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyine mesafesi δ cm olan laminer akışın hızı elektrotla sıvı arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yakın olur. Bundan kaynaklı elektrot etrafında durgun, ince bir çözelti tabakası oluşur.

Maddelerin elektrokimyasal davranışlarının ve özelliklerinin analiz işlemlerinde yapılan yöntemlere elektroanalitik yöntemler adı verilir. Elektroanalitik yöntemler için kullanılan aletler diğer yöntemlerde kullanılanlara oranla daha düşük maliyete sahiptir. Bu yöntemlerle analiz edilecek maddeleri oldukça düşük tayin sınırlarına kadar ulaşabilirler.

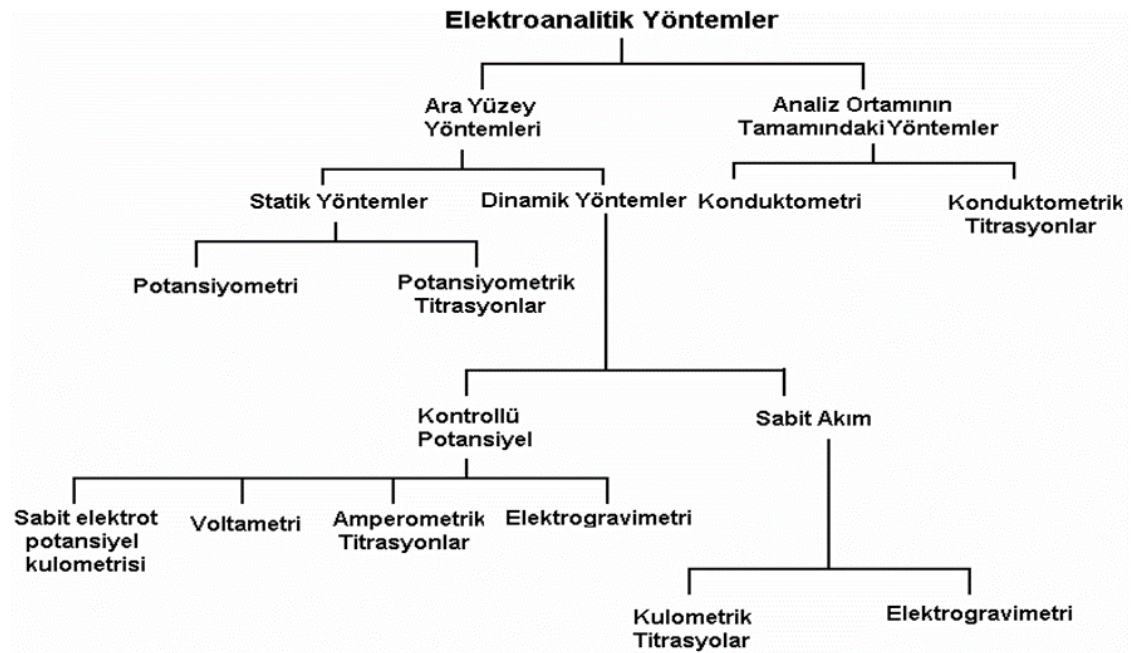
Elde edilen ölçümler pek çok kez element ya da molekülün yükseltgenme basamağı için seçicidir [22,23].

Elektroanalitik yöntemler, maddelerin ara yüzeylerindeki yük aktarımının adsorpsiyonu ve derecesi, sitokiyometrisi, kimyasal tepkimelerin denge sabitleri ve hızları, kütle aktarım hızlarıyla ilgili bilgiler verir [24,25].

Bu yöntemlerde kullanılan cihazların diğer yöntemlerde kullanılan cihazlara oranla yüksek hassasiyet ve duyarlılıkları, maliyet bakımında ucuz olması, hızlı ve doğru yanıt alımı, kolay kullanılabilir olması gibi pek çok açıdan bize avantajlar sunmaktadır.

Elektrot-çözelti sistemine elektriksel etki uygulanarak sistemin verdiği cevabı ölçen yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Elektroanalitik yöntemlerin hepsinde potansiyel, akım ve zaman ölçümleri yapılır. Yapılan elektroanalitik ölçümlerde, iki şekilde ölçüm yapılır. Bunlardan ilki belirli potansiyel aralığında tarama yapılmasıyla meydana gelen akımın ölçülmesi, diğeri ise akımın sıfır veya çok düşük olduğu potansiyel aralıklarında ölçüldüğü ölçümlerdir.

Elektroanalitik yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerin akımın varlığı veya yokluğuna dair işleyişine göre statik ve dinamik olarak iki sınıfa ayrılır.



Şekil 2.3. Elektroanalitik yöntemler şeması

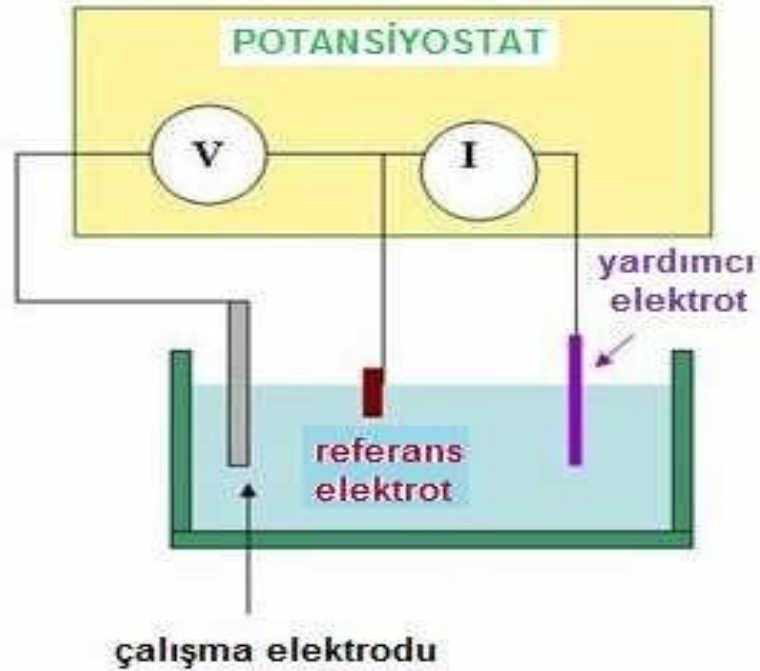
2.1.2. Voltametri

Voltametri, elektroda uygulanan gerilimin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektroanalitik yöntemlere denir. Ölçüm sonuçlarına göre çizilen grafiğe ise **voltamogram** denir. Bu yöntemde hücreye çalışma elektrotuyla karşılaştırma elektrodu arasında uygulanan ve zamanla değiştirilen gerilime karşı hücrede çalışma elektrotuyla karşıt elektrot arasında meydana gelen akım ölçülür.

Voltametricide bazı durumlarda gerilim değeri sabit tutularak veya istenilene göre değiştirilerek madde miktarına bağlı olarak meydana gelen akım ölçülür. Bu yöntemde maddeyi analiz etmek için elektroda uygulanan gerilim aralığı kullanılacak olan çalışma elektrotuna, kullanılan çözeltiye ve elektrolitlerin türüne bağlıdır.

Voltametri analitik olmayan pek çok deneysel çalışmalarda kullanılabilir ve fiziko, biyokimya, inorganik gibi alanlarda yaygın kullanım alanına sahiptir.

Bu yöntemde çoğunlukla kullanılan çalışma elektrotları, kutuplanmayı fazlalaştırmak için; yüzey alanlarını birkaç milimetrekare, bazı uygulama yöntemleri için ise birkaç mikrometrekare ya da alanı küçük mikro elektrotlardan meydana gelirler. Voltametri yönteminde deneysel çalışma yapılırken üçlü elektrot sistemi kullanılır.



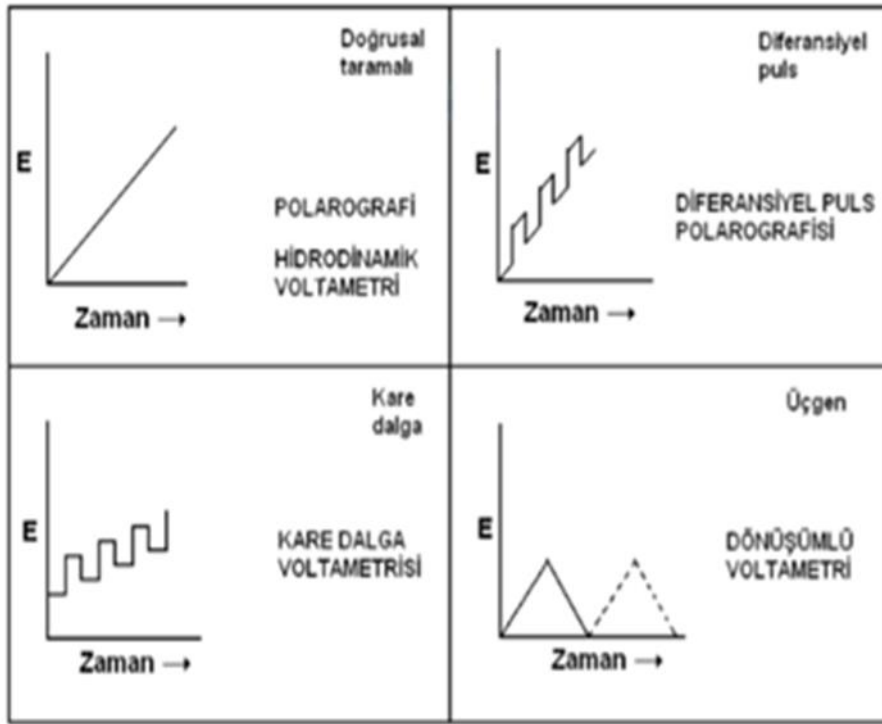
Şekil 2.4. Üçlü elektrot sistemi

2.1.2.1. Voltametrinde Kullanılan Uyarma Sinyalleri

Voltametri yönteminde, kullanılan yöntem, elektrotlara ve elektrokimyasal hücreye göre bir uyarma sinyali uygulanır. En çok kullanılan uyarma sinyalleri ise diferansiyel puls, kare dalga, doğrusal taramalı ve üçgen dalga voltametrisidir.

Elektrolitte olan bir taneciğin taşınabilme durumu için, elektrolitteki taneciğe bir kuvvetin etki etmesi gereklidir. Bu etki eden kuvvet elektriksel, mekanik veya kimyasal yönde bir kuvvet olmalıdır [26].

Elektrokimyasal hücrenin çalışması bakımından maddenin elektrot yüzeyinde aktarımı üç şekilde gerçekleştirilir [27]. Bu aktarım yolları şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Voltametrinde kullanılan yöntemlerde potansiyel uyarma sinyalleri

2.1.2.2. Voltametri de Kullanılan Elektrotlar

2.1.2.3. Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrotları, yüzeyinde analiz yapılacak maddenin yükseltgenip indirgendiği elektrotlardır. Bu elektrotların yapısında altın, bizmut, platin, civa, grafit, karbon bazlı katı elektrotlar ya da bu elektrotlar farklı malzemelerin modifiye yapılması sonucunda meydana gelen elektrotlardır.

Çalışma elektrotları zamanla gerilimi doğrudan olarak değişen elektrotlardır. Bu elektrotlar gerilim çalışma aralıkları birbirlerinden farklıdır ve gerilim aralığının tespiti oldukça önemlidir. Gerilim yani potansiyel aralığı çözücüye, kullanılan elektrolit türüne, pH'a ve elektrot türüne göre değişmektedir [28].

Çalışma elektrotları yapılarından dolayı gruplara ayrılmaktadır. Bu gruplar şu şekildedir:

Karbon esaslı elektrotlar:

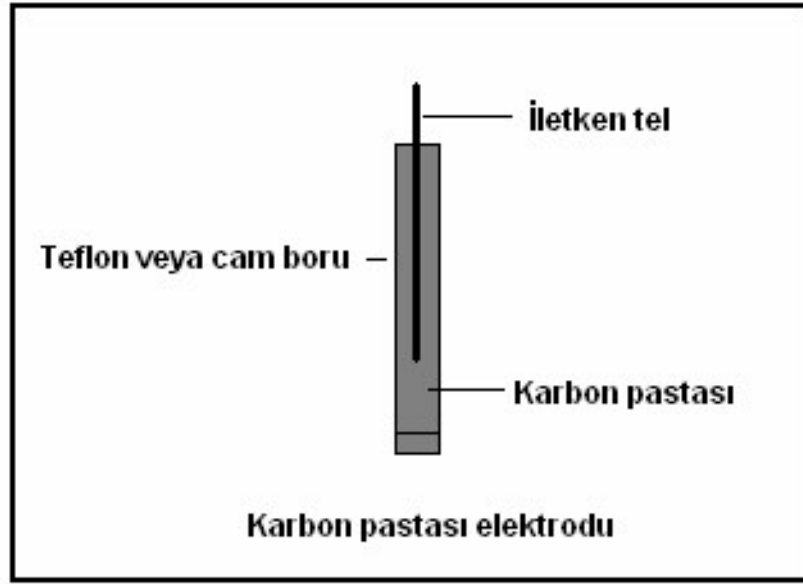
Potansiyel aralığı açısından çok geniş bir aralığa sahiptirler ve maliyet açısından ucuz olmasından dolayı elektrokimyasal yöntemlerde yapılan analizlerde sık kullanım alanına sahiptirler [29]. Bu elektrotlara karbon pasta elektrodu (CPE), kalem grafit elektrot (PGE), camsı karbon elektrot (GCE), perde baskılı karbon elektrot (SPCE) örnek gösterilebilir [30-32].

Camsı Karbon Elektrot (GCE):

Camsı karbon elektrot (GCE), yüksek elektriksel ve mekaniksel özelliklere sahip, tekrar edilebilirliği yüksek, geniş potansiyel aralığına sahip olmasından dolayı kullanım alanı çok geniş bir elektrottur. Camsı karbon elektrotlarında carbon materyali ya fenol / formaldehit polimerlerinin ya da poliakrilonitrilin 1000⁰C - 3000⁰C basınç altında karbonizasyona uğramasından kaynaklı meydana gelirler. Bu elektrotların yüzeyi fiziksel açıdan dayanıklıdır. GCE, küçük polar bulunduran amorf yapıdadır.

Karbon Pastası Elektrotu (CPE):

Karbon pastası elektrot (CPE), kullanım açısından pratik ve maliyeti düşük elektrotlardır. CPE, hazırlanmasında bağlayıcı etken kullanılır. Bu bağlayıcı etken madde mineral, silikon, parafin, bromonaftalen olabilir. CPE, yüzey yenilenmesi basit olması nedeniyle oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir [33].



Şekil 2.5. Karbon Pastası Elektrot

Perde baskılı karbon(grafit) elektrotlar(SCPE):

Perde baskılı elektrotlar, son zamanlarda oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır ve tek kullanımlıktırlar. Diğer elektrotlara göre maliyet bakımından ucuz değildir. Son yıllarda özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisinin uygulanabilirliği açısından başarılı sonuçlar veren, kararlılık ve tekrar edilebilirliğinden dolayı geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir [34,35].

Kalem Grafit Elektrot (PGE):

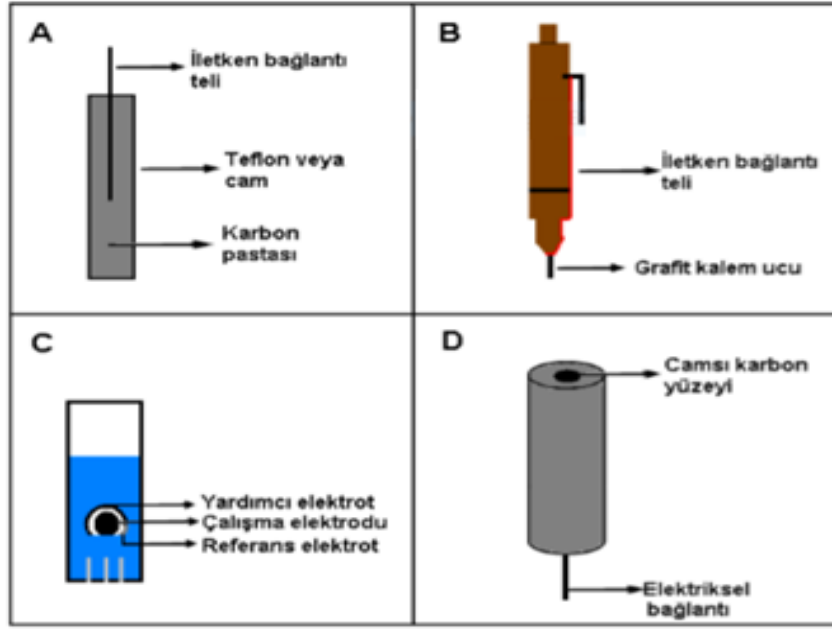
Kalem grafit elektrot (PGE), yüksek tekrar edilebilirliği, maliyet bakımından ucuz olması, tayin sınırının oldukça düşük olmasından ve tek kullanımlık olmasından dolayı son yıllarda bu elektrotlara ilgi oldukça artmıştır [36].

Civa Elektrot:

Civa elektrotlar negatif gerilim sınırının oldukça yüksek olması ve civanın kolay yükseltgenabilir olmasından dolayı kullanım alanı yaygındır. Bundan dolayı da elektrokimyasal analizlerde daha yaygın kullanım alanına sahiptirler.

Metal elektrot:

Altın ve platin gibi iletken metallere yapılmış elektrotlardır. Bu elektrotlar geniş bir gerilim aralığına sahiptirler [37].



Şekil 2.6. Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) kalem grafit elektrot (PGE), (C) perde baskılı elektrot (SPE), (D) Camı karbon elektrot (GCE).

2.1.2.4. Referans Elektrotlar

Referans elektrotlar, çalışma esnasında potansiyeli çevresel etkenlerden etkilenmeyen, sabit ve çalışılan madde bileşimine karşı tepkisiz kalan elektrotlardır [38,39]. Referans elektrot özellikleri şu şekildedir:

- Polarize edilmemeli
- Kolay hazırlanabilmeli
- Gerilimi sabit olmalı
- Tekrar edilebilir olmalı
- Çok düşük akımlarda bile gerilimi sabit kalabilmelidir.

Karşılaştırma (referans) elektrotları çeşitleri vardır. Bunlar:

Standart hidrojen elektrot (SHE)

Standart hidrojen elektrotlar elektrokimya alanında ilk kullanılan elektrotlardır. Hazırlanması bakımından zor olduğundan pratik ve hızlı sonuçlar elde edilecek çalışmalarda diğer karşılaştırma elektrotları kullanılır. SHE potansiyeli bütün sıcaklık değerlerinde sıfır volt olarak alınır.

Kalomel Elektrot

Kalomel (Hg_2Cl_2) elektrotun kolay hazırlanabilir olduğundan çalışmalara kolaylık sağlar ve bu nedenle yaygın olarak kullanım alanına sahiptirler. Kalomel elektrotlar sıcaklık değişiminden kolay etkilenirler.

Doygun kalomel elektrotun $25\text{ }^\circ\text{C}$ ' de potansiyel değeri $+0,244\text{ V}$ ' dur. Elektrotun tepkimesi ise şu şekildedir:



Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot



Gümüş-gümüş klorür elektrotu yukarıdaki reaksiyonu gerçekleştirir. Doygun kalomel elektrotlara oranla yaygın kullanım alanına ve yüksek sıcaklıklarda kullanılırlar.

Bu elektrotlar gümüş yapıda telin elektrolitik yöntemle gümüş klorürle kaplanır ve Cl^- iyonu içeren çözeltiye batırılmasıyla oluşurlar. Daha az analit içeren maddeyle etkileşim yaparlar.

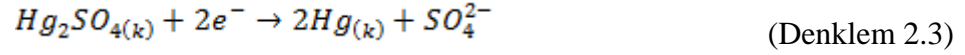
Standart hidrojen elektro oranla potansiyeli $+0,222\text{ V}$ dur. Kalomel elektrotlar gibi yaygın kullanım alanına sahiptirler ama 60°C 'nin üstündeki sıcaklıkta kullanılabildikleri için kalomel elektrotta göre daha avantajlıdır.

Gümüş-gümüş klorür elektrotu gümüş elektrodun gümüş klorür ile doyurulmuş KCl çözeltisine daldırılmasıyla elde edilir.

Civa – civa (I) sülfat referans elektrot

Potansiyeli sülfat iyonlarının aktiflikleri ile belirlenir. Daha çok kalomel elektrotta benzerler. Bu elektrotlar sıcaklık değişim katsayıları düşük, kolay hazırlanabilir, tersinir davranış sergileyen, polarize edilemeyen elektrotlardır.

Reaksiyon tepkimeleri:



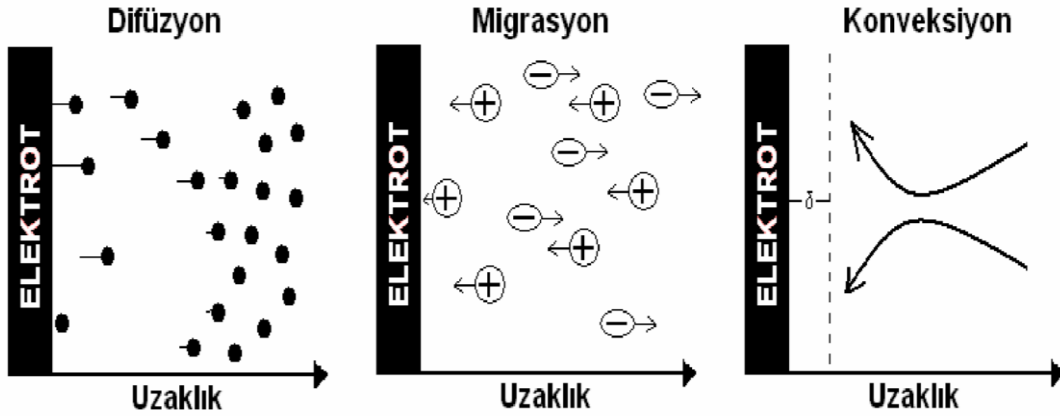
2.1.2.4. Karşıt elektrot

Üçlü elektrot sisteminde yardımcı elektrot olarak kullanılırlar. Bunun nedeni ise çalışma elektrotunun polarizasyon potansiyelinin ölçülmesinden kaynaklanan hataları ortadan kaldırmaktır. En sık kullanılan karşıt elektrot platin teldir.

2.1.3. Elektrokimyasal Olayda Kütle Aktarım Yolları

Elektrolitteki bir taneciğin taşınabilmesi için, elektrolitteki taneciğe kuvvet etki etmelidir. Etki eden kuvvet mekanik, elektriksel ya da kimyasal açıdan bir kuvvet olmalıdır [40].

Elektrokimyasal analizi yapılacak bir maddenin elektrot yüzeyine aktarımı üç şekilde gerçekleşmektedir. Bu aktarım yolları şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Elektrokimyasal Kütle Aktarım Olaylarının Gösterimi

Migrasyon: Dışarıdan taneciğe uygulanan çekim kuvveti etkisiyle bir ivme uygulanacak ve o yönde hareket edecektir. Elektriksel alanın etkisiyle oluşan yüklü parçacıkların taşınmasında gerçekleşen aktarım yoludur. Bir diğer adıyla **göç** denir.

Konveksiyon: Yükseltgenip indirgenebilen maddelerin çözeltilde oluşturduğu karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin sebep olduğu kütle aktarım yoludur.

Difüzyon: Maddelerin derişim farkından dolayı kimyasal kuvvetten kaynaklanan yani az yoğun ortamdan çok yoğun ortama geöme olayıdır.

2.1.4. Voltamogramlar

Voltamogram, voltametrik yöntemler sonucu elde edilen sinyallerin potansiyele karşı akım değerini gösteren grafiklerdir. Doğrusal taramalı voltamogramlar voltametrik dalga olarak bilinen sigmoidal eğriler yani S şeklinde oluşur. Keskin bir artıştan sonra meydana gelen sabit akıma **sınır(limit) akım (i_s)** denir. Bu akım analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine aktarım hızıyla sınırlıdır. Bundan kaynaklı da analiz yapılacak maddenin derişimiyle doğru orantılıdır. Aralarındaki bağlantı aşağıda gösterilmiştir:

$$i_s = k \cdot C_A \quad (\text{Denklem 2.4})$$

Bu bağlantıda;

i_s : sınır akım

C_A : analit derişimi

k :sabit

Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye bağlıdır [41].

Elektrot yüzeyinde daha reaksiyon gerçekleşmediği zaman çok küçükte olsa bir akım gözlenir. Bu akım da artık akım denir. Yöntemin duyarlılığı artık akımın büyüklüğünden anlaşılır. Artık akım giderildiğinde ya da minimum düzeye düşürüldüğünde duyarlılıkta artış meydana gelir.

Yarı-dalga potansiyeli, akımın sınır akımının yarına eşit olmasına denir. Bu yarı dalga potansiyeli konsantrasyondan bağımsızdır.

$E_{1/2}$ ile gösterilmektedir.

Polarografi, damlayan civa elektrotunun kullanıldığı voltametriye denir. **Hidrodinamik Voltametri**, çözelti veya elektrotun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye denir.

Elektrot sistemine gerilim uygulandığı zaman ortaya iki akım oluşur. Bunlar kapasitif ve faradayik akımdır.

1-Kapasitif akım (i_c):

Elektrolit çözelti içerisindeki bir elektrotun negatif yükle yüklenmesi sonucunda çözeltideki pozitif yükler elektrota çekilirler. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesiyle elektriksel bir çift tabaka meydana gelir.

Ara yüzeyde bir potansiyel farkı meydana gelir. Burada oluşan ara yüzey yani çift tabaka kapasitör gibi davranır. Kapasitörü yüklemek için ortamda indirgenip yükseltgenecek bir madde olmasa bile akım oluşur. Burada oluşan akım reaksiyona bağlı değildir ve sistemden kaynaklanır. Ve bu akıma da kapasitif akım denir.

Kapasitif akım ne kadar küçük olursa ölçümde o kadar doğru sonuç verir. Fon akımın meydana gelmesinde etkili etkenlerden biride kapasitif akımdır.

2-Faradayik akım (i_f):

$$i = i_f + i_c \quad (\text{Denklem 2.5})$$

Bu bağlantıya göre i_f azalırsa duyarlılık artar.

Çözelti ve elektrot arasında yüzeyde oluşan akımın iletimi esnasında elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu gerçekleşirken diğerinde ise indirgenme reaksiyonu gerçekleşir. Bu şekilde reaksiyon sonunda meydana gelen akıma faradayik akım denir. Yani reaksiyonla oluşan akımdır.

2.1.4.1. Voltametrik Akımlar

Elektroliz işlemlerinde uygulanan gerilime bağlı geçen akım, analiz edilecek maddenin difüzyon tabakasının dış tarafında elektrot yüzeyine aktarma hızıyla kontrol edilir. Bu aktarma hızı:

$$\frac{\partial C_A}{\partial X} \text{ ile verilir.} \quad (\text{Denklem 2.6})$$

Düzlemsel olan elektrot için akım şu şekilde gösterilir:

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial C_A}{\partial X} \right) \quad (\text{Denklem 2.7})$$

Bu bağlantıya göre:

n: Analitin molü başına elektron mol sayısı

i: Amper cinsinden akım

X:cm olarak elektrottan uzaklık

A: cm²cinsinden elektrot yüzey alanı

D_A: A'nın cm²s-1 cinsinden difüzyon katsayısı

C_A: mol/cm³ cinsinden A'nın konsantrasyonu

F: Faraday sabiti (96487 Coulomb / mol elektron)

Difüzyon akımının zamana karşı fonksiyonu COTTRELL denklemini verir. Bu denklem şu şekildedir:

$$i = \frac{nFAC_A D_A^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (\text{Denklem 2.8})$$

2.1.4.2. Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Elektrot ve çözelti arasındaki ara yüzeyden akımın iletilmesi esnasında elektrotlardan birinde indirgenme diğerinde ise yükseltgenme tepkimesi meydana gelir. Akımın iletimi esnasındaki tepkime işlemlerine faradayik işlemler denir. Tepkime;



Bu tepkimede O ve R'nin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş halini gösterilmektedir. Elektrot gerilimi, elektroaktif maddenin elektrot ara yüzeyindeki konsantrasyonunun [C_o(0,t) ve C_R(0,t)], Nernst denkleminde bulunur. Bu denklem;

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

(Denklem 2.10)

T: Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

E^0 : Redoks tepkimesi için standart potansiyel

F: Faraday sabiti (96487 Coulomb)

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

n: Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

2.1.4.3. Polarografi

Voltametri de ilk bulunan ve ilk kullanılanıdır. Bu voltametrik yöntemde damlayan civa elektrotu kullanılır. Polarografi de oluşan akım potansiyel eğrilerine **polarogram** denir.

Sınır akım, akımın büyüklüğü analitin elektrot yüzeyine aktarım hızıyla sınırlı olduğunda gözlem yapılır. Polarografik sınır akımlarına difüzyon akım da denilmektedir. Bunun nedeni ise kütle aktarım difüzyonla meydana gelmesidir. Ve i_d ile gösterilmektedir. Difüzyon akım analitin derişimiyle doğru orantılıdır.

Artık akım, destek elektrolite ait polarogramın incelenmesiyle ortamda analit yokken bile hücre içerisinde gözlemlenen küçük akımlardır. Artık akımların meydana gelmesine neden olan safsızlıkların indirgenmesi ve safsızlıkların içerisinde düşük miktarda çözünmüş oksijen, destek elektrolitin tuzdaki safsızlıklar ve kullanılan sudan kaynaklı ağır metal iyonlarıdır.

Günümüzde yüksek duyarlılığı, seçiciliği ve kolaylığından kaynaklı puls teknikleri Polarografinin yerini almıştır. Bu yöntemler duyarlılık ve doğruluk, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır.

2.1.5. Voltametrik Teknikler

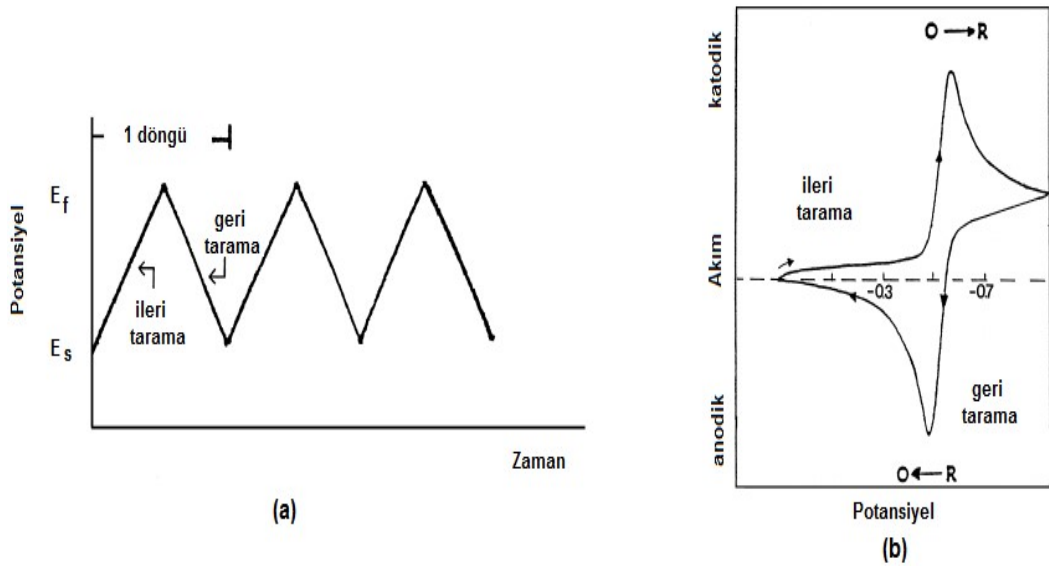
2.1.5.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

Doğrusal taramalı voltametri, uyarma sinyali doğru akım potansiyelinin zamanla doğrusal olarak artmasıyla oluşur. Bu yöntem ilk ve en basit voltametrik yöntem çalışma elektrotunun geriliminin belli bir hızla arttırılıp ya da azaltıldığı yöntemdir. Gerilime göre ölçülen akım voltamogramlarda gözlemlenir.

Maksimum pik akımlarını elde etmek için yarı dalga potansiyel farkının minimum 0,2 V olmalıdır. Potansiyel tarama hızı ise $5-20 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında olmalıdır. Voltamogramlarda sigmoidal(S) eğrisi şeklindedir [42].

2.1.5.2. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri, potansiyelin fonksiyonu olarak akım ölçülür. Bu yöntemde üçlü elektrot sistemi ve durgun bir sistemle çalışır. Değişen potansiyel aralıklarına karşı belli bir aralıkta akımda meydana gelen değişimleri grafikte incelenir ve bu grafiğe **dönüşümlü voltamogram** denir. Analiz edilecek maddenin indirgenip yükseltgenmesi voltamogramlarda gözlenir. Potansiyel aralığı maksimum değere ulaşır daha sonra tekrardan başlangıç noktasına doğru doğrusal olarak geri döner.



Şekil 2.8. (a) Dönüşümlü voltametri de elektroda uygulanan potansiyel- zamanı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametri de elde edilen akım-potansiyel eğrisi

CV de potansiyel negatif yönlü ya da pozitif yönlü gerçekleşebilir. Bu potansiyel başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru uygulanır. Kapasitif akımın en küçük olduğu kısımlarda çalışır. 10^{-5} M ile duyarlılıkları sınırlıdır. Bu yöntem miktar tayinlerinde kullanılabilir uygun yöntem değildir ama analitin hangi potansiyelde nasıl davranış sergilediği hakkında bilgi verir.

Dönüşümlü voltametri de bir sistemin hangi potansiyelerde kaç adımda indirgeni yükselttiği, elektrokimyasal yönden tersinir davranış sergileyip sergilemediği, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı şekilde olup olmadığı ve elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadığını kolay şekilde anlamayı sağlar [43,44].

2.1.5.3. Diferansiyel Puls Voltametri

Diferansiyel puls voltametri, tayin sınırının düşürülmesinde kullanılan voltametrik yöntemdir. Genellikle çoğu elektroaktif türün eser miktarlarının tayinlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir.

Bu yöntemde doğrusal tarama sırasında akım, pulstan önce ve sonra olmak üzere iki defa ölçülür. Bu şekilde akımdaki fark uygulanan potansiyele karşı grafik oluşturulur ve bu oluşan grafiğe diferansiyel puls voltamogramı denir. Grafikte voltamogram yükseklikleri analiz edilerek maddelerin konsantrasyonuyla doğru orantılı olan akım pikleri elde edilir [45].

Analiz edilecek maddeye ait yarı dalga potansiyeli;

$$E_P = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (\text{Denklem 2.11})$$

Formülünden bulunur. Burada ΔE : puls genliğini ifade eder.

Potansiyelin ve puls genliğinin iyi bir şekilde seçilmiş olması bu yöntemde duyarlılığı arttıran en önemli etkidir. Genellikle 50 mV'luk potansiyel farkı ile birbirinden ayırt edilebilirler. Ayırt ediciliği yüksek olan duyarlılık sınırları arasındadır.

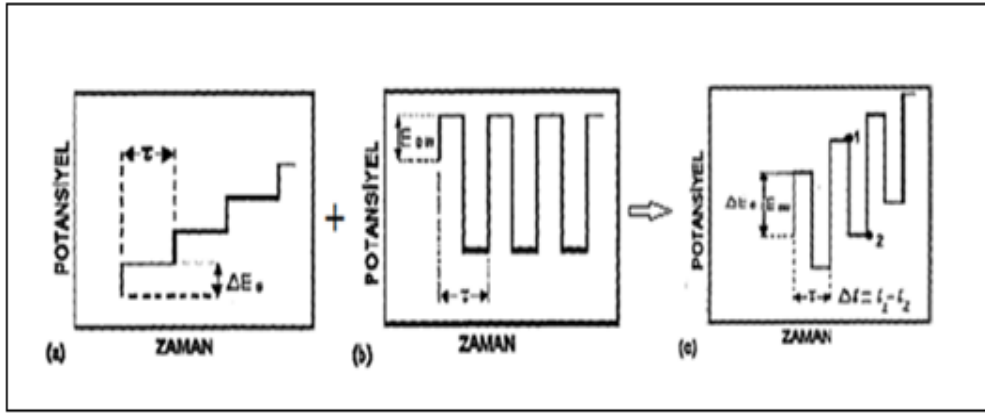
2.1.5.4. Kare Dalga Voltametri

Kare dalga voltametri (SWV), hızlı ve oldukça duyarlı bir voltametrik yöntemdir. Bu yöntemde 10 ms 'den daha az sürede voltamogramın tamamı elde edilebilir. Ölçüm sayısı

artıkça sonuçların kesinliğinin artması da mümkündür. Tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

SWV’de akımlar arasında fark oluşur ve bu fark Δi ile gösterilir. Bu fark iki şekilde hesaplanır. Yani birincisi potansiyelindeki akımdan, ikinci ise potansiyelindeki akım değerleri çıkartılarak bulunur.

İleri taramada elde edilen ürünün geri tarama esnasında yükseltgenmesine yetecek kadar büyüklükte bir tersinir indirgenmesinde puls boyutu oluşur. SWV de ileri puls ile katodik akım (i_1), geri puls ile de anodik akım (i_2) oluşur. Ayrıca akımlar arasında meydana gelen fark arttıkça derişimlerde artar. Bu yüzden derişimle akım doğru orantılıdır.



Şekil 2.9. SWV de (a) uyarma sinyali (b) puls taraması ile oluşan uyarma sinyali (c) kare dalga da oluşan uyarma sinyalleri

2.1.5.5. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal reaksiyonların meydana geldiği anda yük transfer değerleri hakkında bilgi veren yöntemdir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), sıvı/katı yüzeylerin karakterizasyonu için kullanılan bir yöntemdir ve bu yüzeylerde dielektrik özellikleriyle ilgili bilgi sunmaktadır [43].

Hücre içerisinde gerilimin zamana bağlı sinüzoidal değişiminde oluşan alternatif akıma karşı direnç meydana gelir.

$$“V = I \cdot Z” \text{ formülüyle hesaplanır.} \quad (\text{Denklem 2.12})$$

Burada;

V: potansiyel(gerilim)

I: alternatif akım

Z: empedanstır.

Devrede meydana gelen dirençle empedansın birimi Ohm(Ω)'dur. Empedans iki bileşenden oluşur. Gerçek ve zahiri bileşenleridir. Empedans hesaplanması:

$$Z = E_t / I_t \quad (\text{Denklem 2.13})$$

$$Z = Z' - jZ'' \quad (i = \sqrt{-1}) \quad (\text{Denklem 2.14})$$

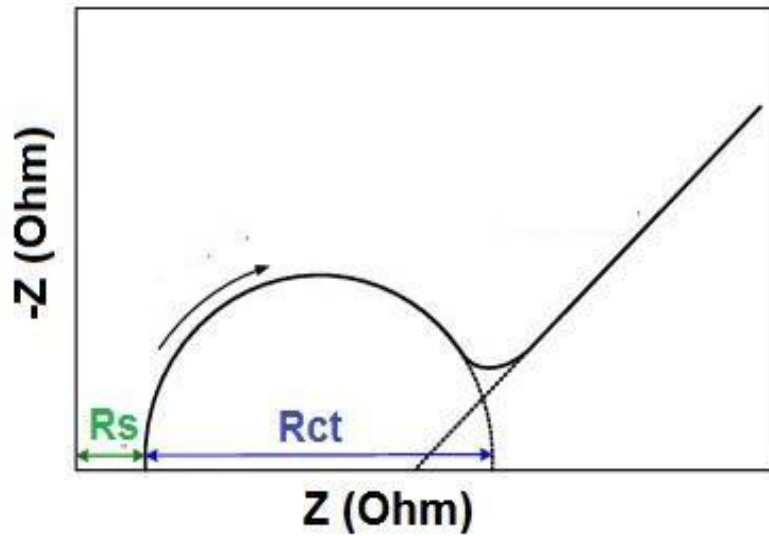
Z = empedans

Z' = gerçek empedans,

Z'' = zahiri empedans

Zahiri empedans y ekseninde, gerçek empedansta x ekseninde grafiğe geçer ve bu grafik Nyquist eğrisi olarak bulunur [46].

EIS verileri Bode ve Nyquist eğrileri ile grafiğe geçilir [47]. Hücre içerisinde redoks prob çözeltisi kullanılır ve üçlü elektrot sistemiyle çalışılır. Prob çözeltisi ferri/ferrosiyanyür içeren redoks çözeltidir.



Şekil 2.10. Elektrokimyasal Hücrede İmpedimetrik Ölçüm Sonrası Nyquist Eğrisi

Şekil 2.10’da gösterilen Nyquist grafiğinde, ölçümde ilk aşamada yüksek frekanslarda oluşan çözelti direnci (R_s), bu çözelti direncini takip eden yarım daire elektrota transfer yapılan yüke karşı oluşan direnç (R_{ct}) ve küçük frekanslarda meydana gelen lineer bölge ise Wamburg empedansı (R_w) şeklinde ifade edilmiştir.

Sistemin yük depolamasına Kapasitans denir. Bu yöntemle belirlenen bir frekans aralığında empedans taraması yapılır ve elektrot ara yüzeyinde oluşan olayların incelenmesinde R_{ct} değerinde oluşan değişimler yorumlanır.

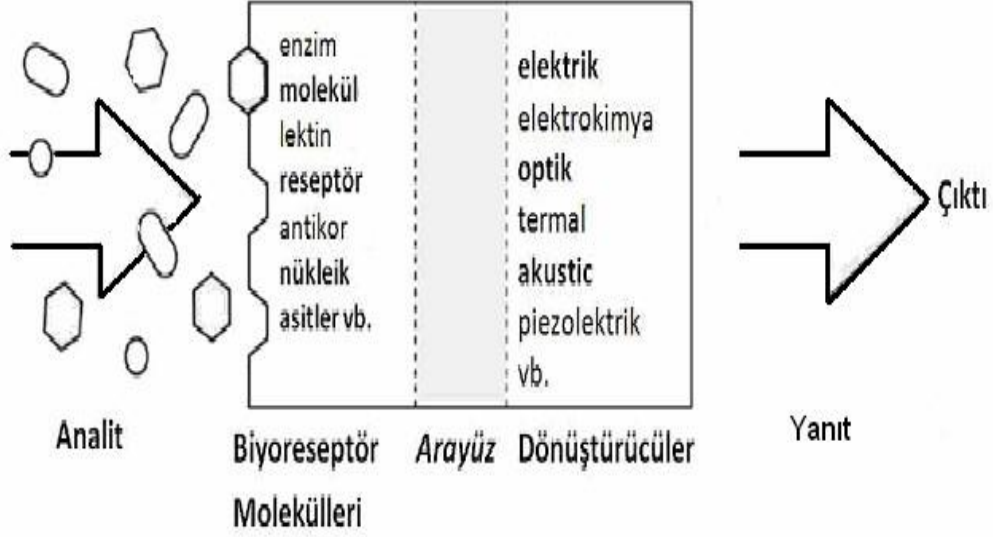
EIS yüzey kaplama, yüzey reaktivitesi, hız ve bağlanma sabitleri gibi biyolojik moleküllerin birbirleriyle etkileşmesiyle oluşan karakterizasyonu ile ilgili bilgi sunar. Bu yöntem günümüzde oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir [48].

2.2. Biyosensör

Biyosensörler, fizik, kimya, tıp, mikrobiyoloji, fizik, mühendislik, sanayi gibi pek çok bilim alanında bilgi birikiminden multidisipliner anlayış çerçevesinde faydalanılarak ve biyolojik moleküllerin ya da sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik metotların işlem özelliklerinin birleşmesiyle geliştirilen biyoanalitik aletlerdir.

Biyosensörler iç içe geçmiş iki çeviriciden meydana gelmektedir. Bu çeviricilerden biri biyokimyasal diğeri ise elektrokimyasaldır. Biyokimyasal olan kısım analit ile etkileşime girerek tanıma işlemi gerçekleştirirken, elektrokimyasal kısım ise bu tanıma işlevini okunabilir bir sayısal değere çevirir [49].

Biyosensör



Şekil 2.11. Biyosensörün Çevirici Yapısı

Biyosensörler fiziksel bir büyüklüğü elektriksel verilere dönüştüren yapılardır. Kimyasal algılayıcı, kimyasal bilgileri analitiksel olarak faydalanılarak elektrik sinyaline dönüştüren küçük düzeneklerden oluşur.

Biyosensörler “biyo” ve “sensör” kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. “biyo” biyolojik kökenli olduğunu, “sensör” ise algılayıcı yapıda olduğunu göstermektedir. Biyosensörler kalitatif ve kantitatif analiz yapabilen karmaşık aletlerdir. Yani biyosensörler biyoalgılayıcılar için yapılarında biyolojik algılayıcı içeren ve fizikokimyasal dönüştürücüyle birleştirilmiş analitik aletlerdir [50].

Biyosensörler, arttırılmış algıma hızı ve esneklik açısından diğer tayin tekniklerine oranla birçok avantaja sahiptirler. Biyosensörler de amaç analit içerisinde bulunan kimyasalın derişimiyle doğru orantılı bir sinyal elde etmektir.

2.2.1. Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler

Yüksek Duyarlılık: Biyosensöre tutturulmuş biyolojik madde yalnızca belirli maddelere karşı duyarlı olmasıdır.

Kalibrasyon: İdeal bir biyosensörün az kalibrasyona ihtiyaç duyması veya kalibrasyona hiç ihtiyaç duymaması istenir. Ancak biyosensörler çalıştıkları zaman dilimi boyunca kalibre Fakat biyosensörler çalıştıkları süre boyunca kalibre edilmelidirler.

Yeterli Miktarda Tayin Sınırı: Tayin sınırı, belli bir konsantrasyon değerinin altında olması istenmektedir. Yani analiz edilecek maddenin işlemdeki en küçük konsantrasyonudur. Tayin sınırını madde miktarı, maddenin duyarlılığı ve elektrot yüzey alanının büyüklüğü etkiler.

Kullanım Ömrü: Biyolojik çeviricinin aktivitesinin azalması biyosensörün kullanım ömrünü sınırlar. Buna göre biyosensörün kalibrasyon sıklığını, tekrarlanabilirliğinin ve bunlar gibi diğer özelliklerini de olumsuz açıdan etkilemektedir. Bir biyosensörün kullanım ömrünün uzun olması gerekmektedir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Bir biyosensörün ölçebildiği analiz edilecek maddenin derişim aralığıdır. Aralık az veya fazla olduğu durumlarda ölçümler sonuç vermeyebilir.

Tekrarlanabilirlik: Biyosensör için aynı şartlar altında arka arkaya gerçekleştirilen ölçümlerde kesinliği için yapılan işlemlerdir. Yapılan deneylerde ölçüm sonuçlarının birbirine yakın olması beklenir. Bir biyosensör de tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa uygulanan yöntem o kadar iyi demektir.

Hızlı Yanıt Süresi: akım zaman grafiğindeki eğriden elektrotun yanıt süresi hakkında bilgi alınabilir. Bu grafikte eğriler arasındaki basamaklar dar ise yanıt süresinin hızlı, geniş ise yanıt süresinin yavaş olduğunu gözlemleyebiliriz.

Seçicilik: Analitin örnek üzerinde varlığının tespit edilmesi ve diğer maddelerden farkını görmek için yapılan işlemdir. Biyosensör için en önemli değişkenlerdendir.

Basitlik ve ucuzluk: biyosensörün tasarımı basit, kolay kullanıma sahip ve ucuz olmalıdır.

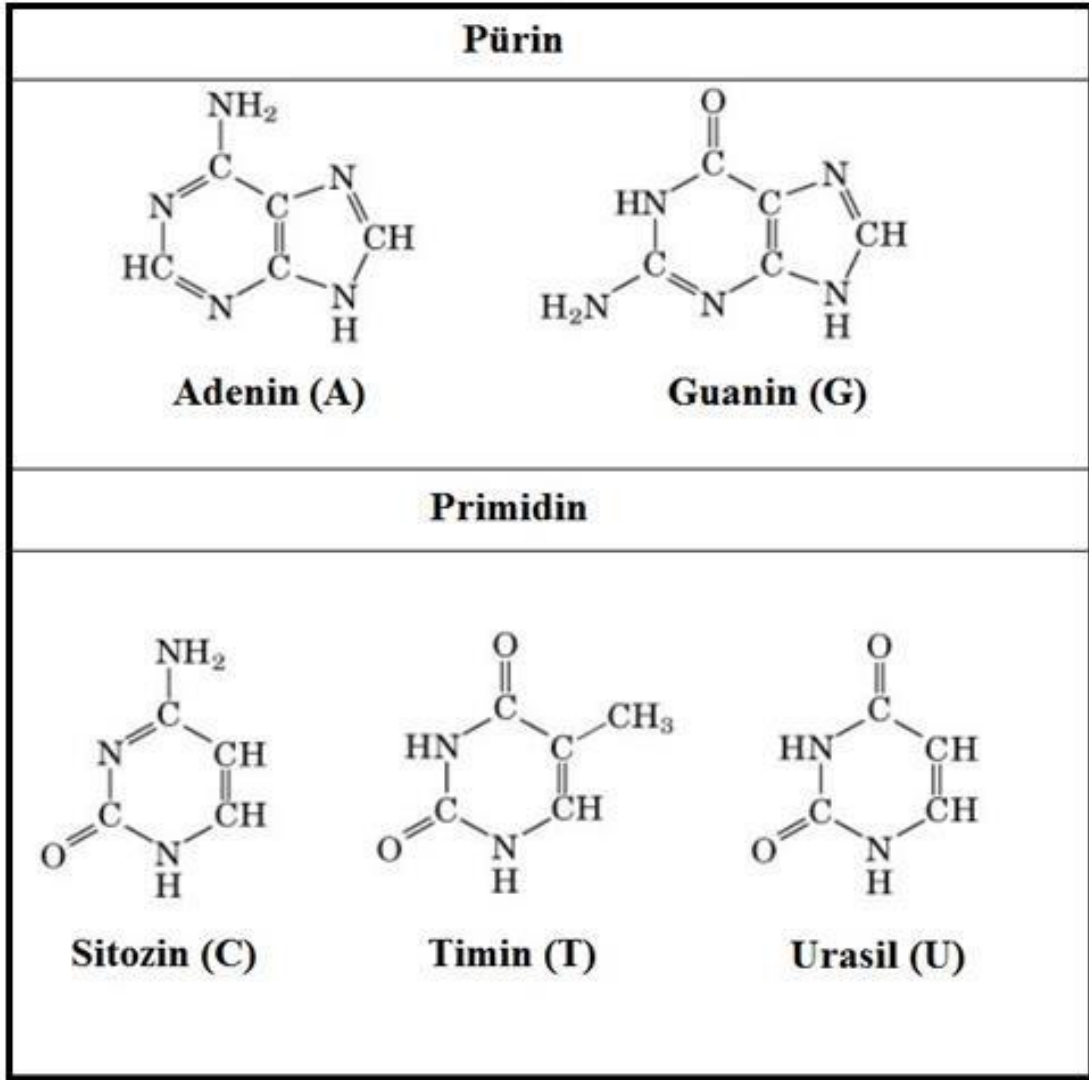
Kararlılık: Biyosensör de çalışılan elektrotun kararlı (stabil) olması istenmektedir. Biyolojik malzemelerin dayanıklılığına, pH, ısı, nem, oksijen konsantrasyonu gibi fiziksel etkenler elektrotların stabilitesini etkilemektedirler.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: biyosensörler tasarım bakımından oldukça önemli özelliktir. Elektrotların boyutlarının küçük ve steril edilebilir olmalıdır.

Sterilizasyonu etkileyen en önemli değişken biyolojik materyallerin fiziksel dayanıklılığıdır.

2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Moleküllerin Yapıları

2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA

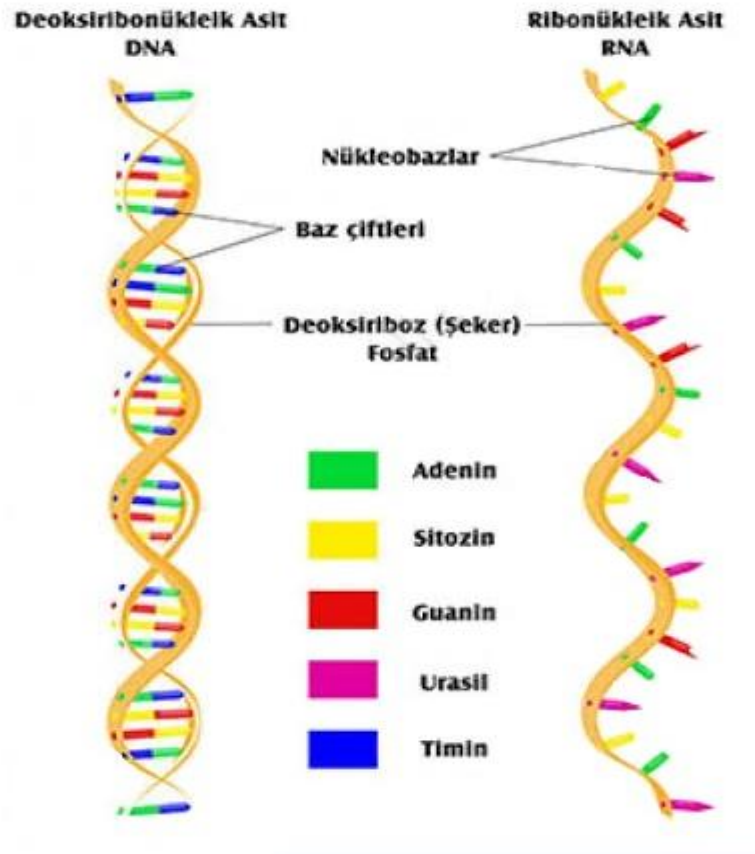


Şekil 2.12. Pürin ve pirimidin bazlarının yapısı

Nükleik asit, makro moleküldür ve nesilden nesile genetik bilgilerin taşındığı ve korunduğu yapıdır. Yapıtaşlarına ise nükleotid denir. Nükleotidler bir araya gelerek nükleik asitleri meydana gelir. Deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit olmak üzere iki yapısı vardır.

Nükleotidler, pentoz şekeri, fosfat grubu ve azotlu bazdan meydana gelir. Azotlu bazlar; pirimidin ve pürin bazlarıdır. İçlerinde bulundurduğu azotlu baz sayesinde nükleotidler isimlendirilirler. Pirimidin bazları bir halkalı ve altı atomlu, urasil (U), sitozin (S) ve timin (T);pürin bazlarıysa çift halkalı ve dokuz atomlu, guanin (G), adenin (A)'dir. Urasil (U) bazı sadece RNA'da bulunur. Deoksiribonükleik asit (DNA)'da adenin, timin, guanin ve sitozin bazları bulunur. Ribonükleik asitte ise adenin, urasil, guanin ve sitozin bazları bulunur [51,52].

DNA ve RNA arasındaki fark içerdikleri beş karbonlu şekerdeki oksijen atomunun bir eksik olmasıdır ve RNA'da urasil bazı bulunmasıdır.



Şekil 2.13. DNA-RNA Yapıları

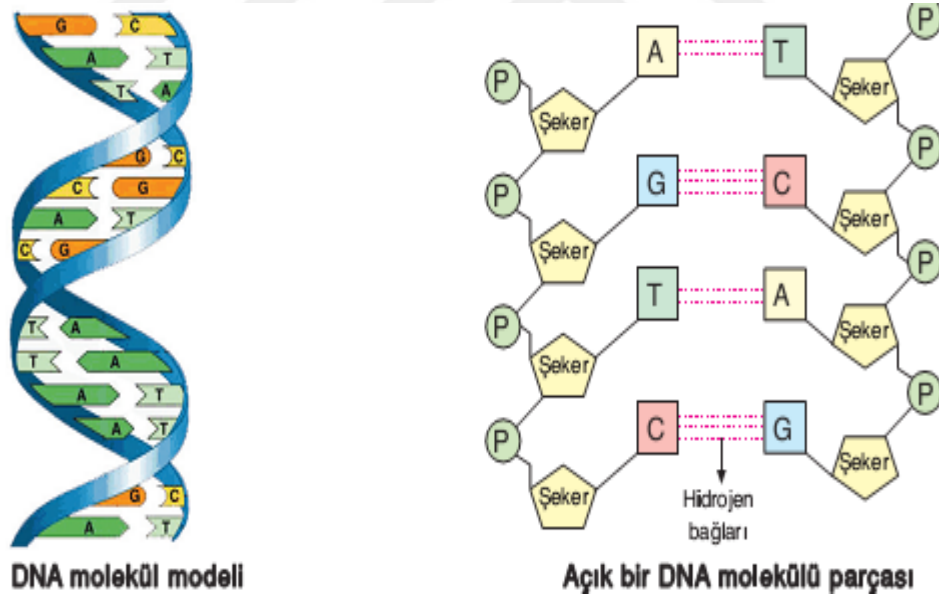
Nükleik asitlerin yapısı belli bir diziliş sırasında belli sayı ve tür nükleotidlerin 3'-5' fosfodiester bağlarıyla bağlanarak polinükleotid zinciri meydana gelir. 3'-5' fosfodiester bağlarıyla bağlanma da şeker bileşiğinin 3' konumundaki karbon kendinden sonra yer

alan nükleotidin şeker bileşiğinin 5' konumunda yer alan karbona bağlanmasıyla meydana gelir. DNA ve RNA'nın iskelet yapısı fosfodiester bağlarıyla oluşur [53].

Endonükleaz; moleküldeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimidir. İki taraftan parçalayan **ekzonükleaz** olmak üzere iki nükleaz enzimi vardır.

Deoksiribonükleik asit (DNA), canlı yapısında biyolojik faaliyetlerin şifresinin aktaran genleri meydana getirir. Yani genetik bilgiyi aktarır. DNA'da hücreler için gerekli olan maddeleri üreten bilgiler yer alır. Enzim ve proteinlerin biyolojik sentezleri canlı organizmaların replikasyon ve transkripsiyon yoluyla olur.

DNA moleküllerine ait olan X ışınları difraksiyon verilerine göre ve Chargaff tarafından DNA'da guanin ve sitozin bazlarıyla timin ve adenin bazlarının miktarları birbirine eşit olduğu gösterilmiştir. Bundan yola çıkarak Watson, Wilkins ve Crick 1950 yıllarında DNA yapısının çift zincire sahip ve heliks şeklinde bir yapı önerisinde bulunmuşlardır.



Şekil 2.14. DNA'nın Yapısı ve Dizilim Şekli

DNA'da şeker ve fosfat grupları ester bağı ile birbirine bağlanırlar. Bazlar ise hidrojen bağıyla bağlanırlar. Adenin ile timin arasında ikili hidrojen bağı varken sitozin ile guanin arasında üçlü hidrojen bağı vardır. DNA'da çift zincirli sarmal yapıda bazlar sarmalın iç kısmında. Şeker ve fosfat grupları ise dış kısmında bulunurlar. Bundan dolayı sarmalın

içi hidrofobik, dışı ise hidrofilik yapıdadır. DNA ısı gördüğü zaman heliks yapısı bozulur ve ikiye bölünür. Bu bölünmenin nedeni hidrojen bağlarının zayıf olmasından kaynaklanır. DNA heliks yapısının bölünmesi durumuna **denatürasyon** denir. DNA tekrar çift sarmal yapısına uygun koşullar altında geri dönebilmektedir. Bu duruma da **renatürasyon** denir.

DNA'nın yapısında yer alan şeker ve fosfat grupları bütün nükleotidlerindeki yapısında aynıdır. DNA molekülünün kendini eşleyebilmesi ve kendisinde bulundurduğu bilgiyi RNA'ya aktarması olarak iki görevi vardır. Kendini eşlemesi esnasında hücre bölünmesinin hazırlıklarıyla kendini kopyalaması ve kromozomların ikiye ayrılması sırasında DNA kendisinden bir kopya oluşturur ve bu olaya da **duplikasyon** adı verilir. Diğer görevinde ise RNA'ya aktardığı bilgiyi ribozomlarda enzim, protein sentezinde kullanır. Ve bu olaya da **transkripsiyon** adı verilir.

2.3.2. İnterkalasyon

DNA'da baz çiftlerinin aralarında, düzlemsel halka sistemine sahip bileşenlerin birbiriyle güçlü bağ kurarlar. Bu bağlanma olayına da interkalasyon adı verilir [54]. İnterkalasyon olayı maddenin yapısına göre dönüşümlü (tersinir) ya da dönüşümsüz olarak meydana gelir.

DNA interkalasyon olayı çoğunlukla kanserojendir. Bunun nedeni ise DNA'da ki baz çifti arasına interkalatörün girmesi için baz çiftleri aralarının açılması beklenir ve DNA sarmal yapısında normalin tersi yönde kıvrılır. Bu şekilde transkripsiyon engellenerek zehirlenme ve mutasyon meydana gelir.

İnterkalasyon da DNA zincir yapısı kırılır ve bu kırılma da DNA senteziyle DNA'ya bağımlı olan RNA sentezini bozar. Buna neden olan maddeleri Topoizomeraz(II) enzimiyle inhibe edilir [55].

2.3.3. DNA Hakkında Kullanılan Terimler

Baz çifti: Karşılıklı iki bazın bir araya gelmesiyle meydana gelir. Örneğin adenin ile timin ya da guanin ile sitozin çiftleridir.

Sentez: Yeni DNA'da yeni zincirin uzaması.

Hedef dizi (Target): Prob dizisine tam anlamıyla karşılık gelen oligonükleotit.

Prob: Hedef dizileri belirlemek amacıyla kullanılan baz dizisi belli olan oligonükleotit.

Oligonükleotit: Birden fazla bazın bir araya gelmesiyle oluşur.

Dinükleotitler: Bazlardan sadece iki tanesinin bir araya gelmesiyle oluşur.

Trinükleotitler: Bazlardan üç tanesinin bir araya gelmesiyle oluşur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR): Daha önce karar verilmiş olan bir primer çifti tarafından çift sarmallı DNA'nın laboratuvarında sentezlenmesi işlemidir.

Tekrarlayan oligonükleotitler: Polimer içindeki tekrarlayan birden fazla nükleotidi gösterir. Tekrarı olan nükleotidlere ise nükleotid sayısına göre mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnektir.

Rastgele dizi (Non complementary): Hedef nükleotid dizisinden farklı bir nükleotid dizilimine sahip oligonükleotittir.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch): Bir nükleotid ya da birden fazla nükleotidi hedef dizisinden farklı olan oligonükleotittir.

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: 5'-3' polaritesine sahip olan ve noktayla ayrılarak ifade edilen nükleotid çiftlerinden oluşan polimerlerdir.

2.4. DNA Biyosensörleri

Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte biyosensör tasarımında nükleik asitlerden meydana gelen tanıma yüzeylerinin kullanılması artmıştır. Bu sayede çip teknolojisine yönelik DNA biyosensörleri çalışmaları ortaya çıkmıştır [56].

DNA biyosensörlerinde tanıma yüzeyi olarak DNA kullanılmaktadır. Bu biyosensörler Genosensörler de denir. DNA biyosensörleri analiz işlemlerinde yaygın kullanım alanına sahiptir. DNA biyosensörleri spesifik, seçimli, analitik, pratik, duyarlı, maliyeti düşük, hızlı ve tekrarlanabilir olması gibi özellikleri vardır [57].

DNA biyosensörleri elektrokimyasal biyosensörler arasında bulunurlar. Çevirici sistem ve nükleik asit tanıma tabakasının birleştirilmesiyle DNA biyosensörleri oluşur. Bu biyosensörlerde hibritleşme sonucu meydana gelen elektrik sinyalinden faydalanılarak analiz işlemi yapılır. DNA hibridizasyon biyosensörleri genellikle tek iplikçi birden fazla

baz diziminde probun çevirici yüzeyine tutturulmasına dayanır. Bu şekilde hibritleşmeyle hedef dizi bulunur [58].

Maddeler ile DNA arasında meydana gelen etkileşim, tıpta, hastalık teşhisinde, analizde, çevresel araştırmalarda, ilaç etki mekanizmasının aydınlatılmasında, toksik madde analiz işlemleri gibi birçok alanda araştırma yapılmaktadır [59].

Genosensörler de elektrot yüzeyine DNA'nın sağlam şekilde immobilize edilmesi gerekmektedir. Bu işlemde üç yöntemle yapılır:

1. Adsorbsiyon,
2. Kovalent bağlanma,
3. Elektrostatik bağlanma şeklinde yapılır.

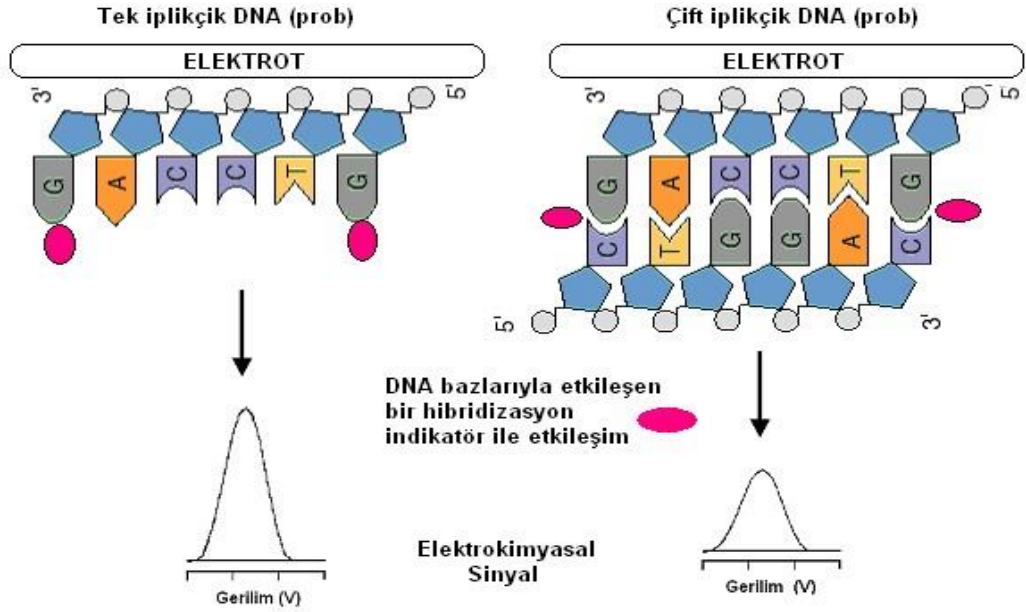
Üç aşama şeklinde DNA biyosensörleri tasarımı yapılır. Aşamaları:

1. Probun tutturulması
2. Hedef diziyile hibridizasyon yapılması
3. İşaretlemesiz ya da işaretlemeye dayalı yöntemlerin kullanımıyla tayinin yapılması.

Son zamanlar da görülen gelişmeler DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler genetik çalışmalar için büyük önem oluşturmaktadır. DNA'nın yapısında bulunan en önemli elektroaktif ürün guanindir. Bu biyosensörlerde de guanine ait sinyaller doğrudan ölçülebilir.

DNA biyosensörleri bulaşıcı, kalıtsal hastalıkların teşhis edilmesinde çok sık kullanılır. Bakteri, parazit, mantar ve virüs kökenli hastalıkların belirlenmesinde kullanılırlar.

2.4.1. DNA - İlaç Etkileşiminin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerle Algılanması



Şekil 2.15. DNA bazlarıyla etkileşen hibridizasyon indikatöründe DNA dizi algılanması

Hibridizasyon indikatörü için DNA kullanıldığında DNA'daki bazlarla etkileşim yapıyor. Bu etkileşim daha çok guanin bazıyla yapıyor. Şekil 2.16.'da da gösterildiği gibi ssDNA'da meydana gelen sinyali (bazların açıkta olması sebebiyle), hibridizasyondan sonra oluşan dsDNA'da (bazlar kapalı olduğundan) meydana gelen madde sinyalindeki oranla oldukça fazladır [60].

Hibritleşme tayinleri için kullanılan immünokimyasal ve voltametrik tekniklerle karşılaştırıldığında voltametrik tekniklerin daha hızlı cevap verdiği gözlemlenir. Fakat çok miktarda bir seri analizi yapılacaksa iyi otomasyona sahip Enzyme Immuno Assay (EIA) gibi immünokimyasal yöntemlerin kullanılması daha uygundur [61].

İlaç-DNA etkileşimi en yaygın DNA biyosensörleri kullanılarak çalışmalar yapılır. DNA'nın bir bazında ya da ilacın sinyalinde meydana gelen değişimler takip edilerek ilaç-DNA etkileşim türü hakkında bilgi elde edilebilir [62,63].

İlaç-DNA etkileşim türleri üç farklı şekilde meydana gelmektedir. Bunlar; interkalasyon, çapraz bağlanma ve elektrostatik bağlanmadır.

DNA'da yer alan ve elektroaktif baz olan adenin/guanin bazlarının sinyalleri üzerinden ya da analitin elektrokimyasal sinyali üzerinden yararlanılarak yapılır. Burada ölçülen sinyaller de meydana gelen değişimlere göre DNA-ilaç etkileşimi hakkında yorumda bulunulabilir.

DNA ve ilaç arasındaki etkileşim, bileşiklerin hızlı şekilde görüntülenmesi ve cihazların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. DNA-ilaç etkileşiminde tayin sırasında elektrokimyasal biyosensörlerle; DNA ile ilacın yaydığı kendi sinyalinde oluşan artma ya da azalmayla ve DNA'daki adenin ya da guanin sinyallerinde meydana gelen değişimlerle pek çok tayin yapılır.

Analitin DNA ile etkileşmesi şu şekilde olur;

- DNA çift sarmal yapısında olan küçük ve büyük oluklara bağlanmasıyla,
- İlaç, 3'-5' fosfat omurgasına elektrostatik şekilde bağlanmasıyla, nükleik asidin negatif yüklü çeker
- DNA'nın baz çiftleri arasına girerek İnterkalasyon yapması şeklinde sınıflandırılabilir.

DNA-ilaç etkileşimi yapıldıktan sonra sırasıyla deney yapılır. Bu işlemler elektrot yüzünün yıkanması, voltametri yöntemleri kullanılarak elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilmesi ve ölçülen sinyallerin aynı olup olmadığı karşılaştırılmasına bakılır. Ve DNA-ilaç etkileşiminin öncesi ve sonrası için ilaç ve DNA'nın önceden ölçülmüş sinyallerindeki artış ya da azalması incelenir.

Çalışmalar da analitin DNA ile etkileşiminden sonra analitin veya DNA'daki bazın sinyalinde meydana gelen artma veya azalma sonucu etkileşimi yorumlanır. Elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak ilaç-DNA etkileşimi için tayin yapılır [64].

DNA-ilaç etkileşimi hakkında literatür de pek çok yayın vardır. Bu yayınlar yeni sentezlenecek maddelerin DNA hedefli madde sentezi yapılırken, bu maddelerin etkileşimleri etkin ve hızlı olması istenmektedir. Bununla birlikte çevresel atıkların, kimyasal maddelerin DNA ile etkileşimlerinin ölçülmesi ve bu ölçümü yapılan maddelerin insanlar üzerinde olumlu ya da olumsuz etkilerinin araştırılması bakımından oldukça önemlidir.

Anti kanser maddelerin DNA ile gerçekleştirdiği etkileşimlerini incelemek için farklı yöntemler kullanılır. Son dönemlerde yapılan elektrokimyasal ölçümler sayesinde DNA biyosensörlerin önemi oldukça artmaktadır [65,66].

Elektrokimyasal yöntemlerin maliyet bakımından ucuz, basit, hızlı ve seçimli şekilde incelenmesini sağlar ve küçük miktarlarda çalışma alanı oluştururlar [67].



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneyde Kullanılan Aletler

Deney esnasında yapılan ölçümler ve kullanılan cihazlar;

- Potansiyostat; μ -AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü- Chemie, Hollanda)
- Vortex (Velp Scientifica)
- Manyetik karıştırıcı (AGE Velp)
- Duyarlı Terazî (precisa XB 220A)
- pH-metre (8WTW Inolab pH 720)
- Çalışma elektrodu (Kalem grafit elektrot) (0,5 mm Rotring Kalem 0,5, Tombow HB model)
- Ag/AgCl referans elektrodu
- Platin tel (Yardımcı elektrot)
- Ses Titreşimli Temizleyici (Bandelin Sonorex)
- Manyetik Karıştırıcı (ARE 2-Velp ve elektro-mag)

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ✓ Seftazidim
- ✓ Asetik asit (Merck, %99-100)
- ✓ Tris hidroklorik asit (Sigma)
- ✓ Potasyum Klorür (KCl)
- ✓ Potasyum Di Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4)
- ✓ Potasyum Bi fosfat(K_2HPO_4)
- ✓ Potasyum ferri siyanür ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- ✓ Potasyum Ferro Siyanür ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- ✓ Hidroklorik asit (HCl, Merck, %37)

- ✓ Sodyum Hidroksit (NaOH, Merck)
- ✓ Sodyum klorür(NaCl, Merck)
- ✓ Buzağı timus bezinden alınan tek ve çift sarmal DNA (ssDNA- dsDNA, Sigma)

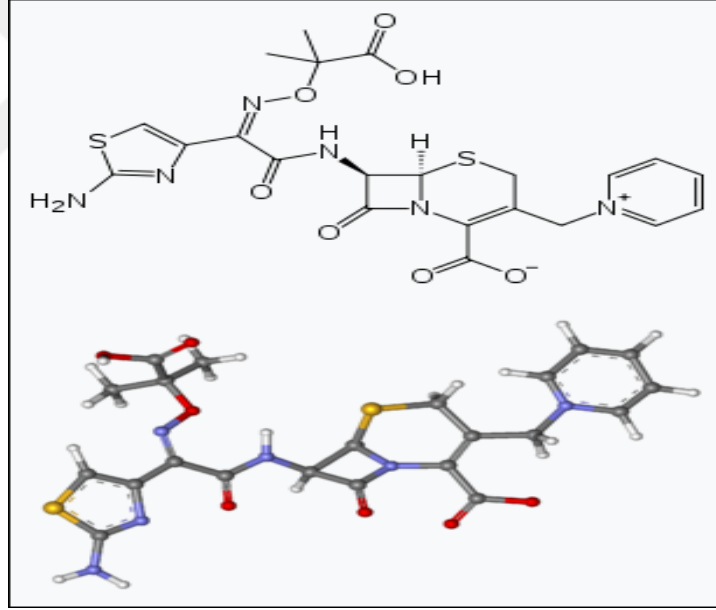
Deneysel çalışmalar gerçekleştirilirken deney ortamı oda şartlarında yapıldı.(25,0± 0,5 °C). Deney aşamalarında kullanılan su ultra saf su olarak kullanıldı.

3.3. Seftazidim Hakkında Genel Bilgi

Molekül Ağırlığı: 546,58 g/mol

Formül: C₂₂H₂₂N₆O₇S₂

Açık Kimyasal Formül:



Seftazidim sefalosporinler grubunun üçüncü kuşak antibiyotiklerindedir. Üçüncü kuşak sefalosporinler gram negatif etkinliğine sahiptirler.

3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltileri daha sonra cam şişelerde saklandı.

0,5 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 4,8; ABS):

Deney esnasında kullanılmak için asetat tampon çözeltisi; 28,8 ml asetik asit alınıp saf su içerisine eklenir. Litresinde 0,5 mol CH_3COOH bulunduran çözelti için pH 4,8 oluncaya kadar damla damla olacak şekilde 0,1 M NaOH ya da 0,1 N HCl çözeltisi eklenir. İyonik şiddeti dengelemek için 1,168 g NaCl tartıp eklenir.

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 7,4; PBS):

Deney esnasında kullanılmak için fosfat tampon çözeltisi; litresinde 1,36 g KH_2PO_4 (0,01 mol) ve 6,96 g K_2HPO_4 (0,04 mol) tartılıp alınarak saf su içerisine aktarılır. 1,168 g NaCl (0,02 mol) tartılıp alınarak çözelti içerisine aktarılır.

Hazırlanan çözeltinin (PBS) pH değeri yaklaşık 7,4'e olmalıdır. Çözelti de pH ayarlamak için gerekirse 0,1 M NaOH ya da 0,1 M HCl çözeltileri kullanılır.

0,02 M Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 8,0; TBS):

Stok DNA çözeltilerini hazırlamak amacıyla kullanılır. Litresinde 10 mmol Trizma HCl ve 1 mmol EDTA vardır.

Redoks Çözeltisinin Hazırlanması

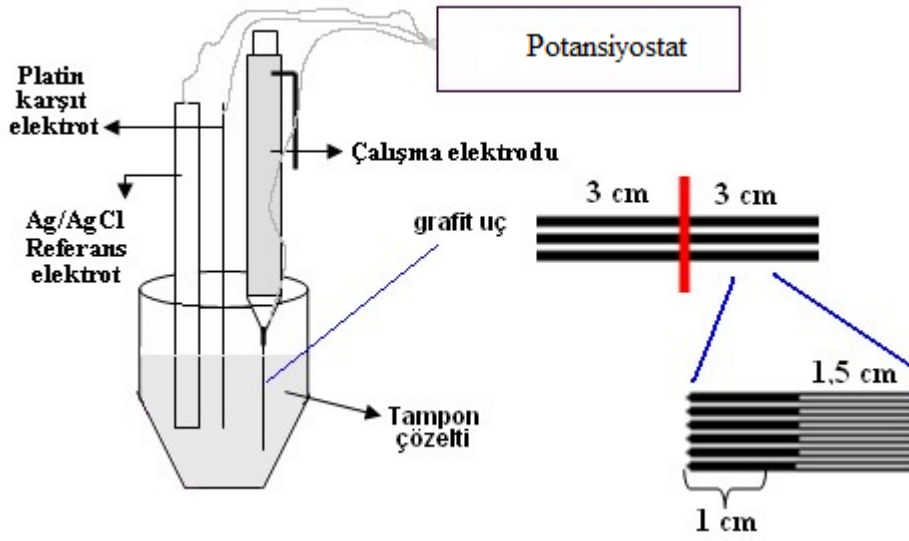
EIS ölçümlerinde molekül ağırlığı 329,243 g olan $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'den 164,5 mg ve molekül ağırlığı 422,38g olan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'dan 208,13 mg tartılıp alınır ve redoks propları içeren 200 mL çözelti hazırlanır. Çözelti de iyonik şiddetini sabitlemek için 1,49 g KCl eklenir. Karanlık ortamda saklanmalıdır.

3.4.2. DNA Çözeltilerinin Hazırlanması:

Deneyel çalışma da Calf Thymus DNA kullanıldı. Calf Thymus DNA, buzağının timus bezinden elde edilir. Calf Thymus DNA'nın tek sarmal DNA (ct ssDNA) ve çift sarmal DNA (ct dsDNA) olarak ayrı ayrı hazırlandı.

Stok DNA 1000 ppm olmak şartıyla 0,02 M Tris-EDTA (pH 7,0) çözeltisi ile hazırlanarak 20°C'de karanlık bir ortamda saklandı. Sonra stok olarak hazırlanan DNA çözeltilerinden istenilen konsantrasyonlar da 0,05 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) kullanılarak hazırlandı. Ancak ssDNA deneye başlanmadan denatüre edildi. Buradaki amacı ise ssDNA'nın kendini eşlemesini engellemektir.

3.5. Kullanılan Yöntem



Şekil 3.1. Deney düzeneği

Tez için yapılan elektrokimyasal deneylerde cihaz olarak NOVA 2.1 yazılım programını içeren **µ-AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü) Potansiyostat** kullanıldı. Kare dalga voltametri (SWV), dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) teknikleri kullanıldı. Çalışma kapsamında üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Bunlar;

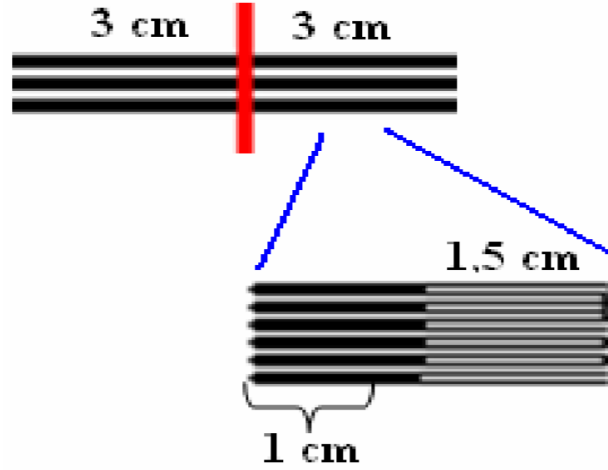
- Platin tel (yardımcı elektrot)
- Çalışma elektrodu (tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE))
- Referans elektrot (Ag/AgCl referans elektrodu)

Elektrotları kullanıldı.

Deney esnasında kullanılan elektrotların aktivasyonu, DNA'ların elektrot yüzeyine tutturulması ve elektrot yüzeyinde DNA-analit etkileşiminin incelenmesi basamaklarında literatür de yer alan teknikler kullanıldı [68-70].

3.5.1. Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması

- **Tek kullanımlık grafit elektrot (PGE):**



Şekil 3.2. PGE'nin hazırlanması

PGE (kalem grafit elektrotlar), Tombow marka kalem uçlarının 3 cm boyutunda kesilip hazırlanarak deney için hazırlandı.[71]. Ölçüm sırasında kalem uçları hücre içerisine 1,5 cm'lik kısmı batacak şekilde yerleştirildi.

Hazırlanan PGE elektrotların yüzey aktivasyonunu yapmak için ABS çözeltisi içerisinde 30 saniye boyunca +1,4 V potansiyel uygulanır. Yapılan deneyler her bir parametre için en az üç ölçüm alındı. Sonuçlara göre ortalama değerleri, bağıl standart sapmaya bağlı hata çubuklarıyla grafik yapıldı.

3.6. Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine DNA'nın tutturulması (PGE/DNA)

3.6.1. PGE Yüzeyine ct dsDNA (PGE/dsDNA) ve ct ssDNA (PGE/ssDNA) İmmobilizasyonunun İncelenmesi

DNA'nın kalem grafit elektrot yüzeyine immobilizasyonunda adsorpsiyon tekniği kullanıldı. Daha önce aktive edilmiş PGE'lerle ct dsDNA ve ct ssDNA için yapılan deneyler için ayrı ayrı işlem yapıldı.

3.6.1.1. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Süresinin İncelenmesi

ct dsDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE'lerle yapılan süre optimizasyonu:

SWV yönteminde PGE'ler, aktive edilmiş yüzeyleri çözelti içine batacak şekilde içerisine 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm ct dsDNA'dan 110 µL koyulan viallere batırıldı ve adsorpsiyon tekniğine göre farklı bekleme sürelerinde bekletildi. (SWV tekniğinde

kullanılan parametreler; Basamak potansiyeli: 0,005 V, Genlik modülasyonu: 0,02 V; Frekans: 25 Hz, Tarama hızı: 0,10 V/s). SWV yönteminden elde edilen voltamogramlardaki guanin pik akımında oluşan değişimlerden faydalanılarak en uygun etkileşim süresi bulundu. Bütün çalışmalarda ölçme işleminden önce PGE'ler, etkileşim çözeltinin çözücüsüne 3 s batırılıp çıkarılarak yıkama işlemi yapıldı (bu işlemde amaç arta kalan, bağlanmayan veya etkileşime girmeyen reaktifleri uzaklaştırmak için). SWV tekniğindeki ölçümler 0,5 M ABS (pH 4,8) çözeltisinde yapıldı.

EIS yönteminde yapılan deneylerde aktive edilmiş PGE, PGE-DNA etkileşiminde süre ve konsantrasyon optimizasyonu ve SEF-DNA etkileşiminin incelenmesinden meydana gelmektedir. Bu ölçümler 0,1 mol/L KCl içeren $2,5 \times 10^{-3}$ M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1/1) redoks çözeltisi içerisinde yapıldı. Ct dsDNA immobilizasyonunda süre optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm sabit dsDNA konsantrasyonunda adsorpsiyon sürelerinde empedans ölçümlerinden bulunan Rct değerlerinden faydalanılarak süre optimizasyonu gerçekleştirildi. Ölçümler 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında ve genlik 0,01 V olacak şekilde, + 0,22 V'luk açık devre geriliminde ve Ag/AgCl referans elektrotuna karşı yapıldı. Çalışma esnasında yapılan bütün empedans ölçümlerinde aynı parametreler kullanıldı.

ct ssDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE' lerle yapılan süre optimizasyonu:

SWV yönteminde PGE'ler, aktive edilmiş yüzeyleri çözelti içine batacak şekilde içerisine 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm ct ssDNA'dan 110 µL koyulan viallere batırıldı ve adsorpsiyon tekniğine göre farklı bekleme sürelerinde bekletildi. (SWV tekniğinde kullanılan parametreler; Basamak potansiyeli: 0,025 V, Modülasyon süresi: 0,05 s; Tarama hızı: 0,05 V/s). SWV yönteminden elde edilen voltamogramlardaki guanin pik akımında oluşan değişimlerden faydalanılarak en uygun etkileşim süresi bulundu. Bütün çalışmalarda ölçme işleminden önce PGE'ler, etkileşim çözeltinin çözücüsüne 3 s batırılıp çıkarılarak yıkama işlemi yapıldı (bu işlemde amaç arta kalan, bağlanmayan veya etkileşime girmeyen reaktifleri uzaklaştırmak için). SWV tekniğindeki ölçümler 0,5 M ABS (pH 4,8) çözeltisinde yapıldı.

EIS yönteminde yapılan deneyler aktive edilmiş PGE, PGE-DNA etkileşiminde süre ve konsantrasyon optimizasyonu ve SEF-DNA etkileşiminin incelenmesinden meydana gelmektedir. Bu ölçümler 0,1 mol/L KCl içeren $2,5 \times 10^{-3}$ M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1/1) redoks çözeltisi içerisinde yapıldı. ct ssDNA immobilizasyonunda süre optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm sabit ssDNA konsantrasyonunda adsorpsiyon sürelerinde empedans ölçümlerinden bulunan R_{ct} değerlerinden faydalanılarak süre optimizasyonu gerçekleştirildi. Ölçümler 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında ve genlik 0,01 V olacak şekilde, + 0,22 V'luk açık devre geriliminde ve Ag/AgCl referans elektrotuna karşı yapıldı. Çalışma esnasında yapılan bütün empedans ölçümlerinde aynı parametreler kullanıldı.

3.6.1.2. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Miktarının İncelenmesi

ct dsDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE' lerle yapılan derişim optimizasyonu:

SWV yönteminde PGE'ler, aktive edilmiş yüzeyleri çözelti içine batacak şekilde içerisinde 0,05 M PBS'de hazırlanan 15 dakika ct dsDNA'dan 110 μ L koyulan viallere batırıldı ve adsorpsiyon tekniğine göre farklı bekleme derişimlerinde bekletildi. (SWV tekniğinde kullanılan parametreler; Basamak potansiyeli: 0,025 V, Modülasyon süresi: 0,05 s; Tarama hızı: 0,05 V/s). SWV yönteminden elde edilen voltamogramlardaki guanin pik akımında oluşan değişimlerden faydalanılarak en uygun etkileşim derişim bulundu.

EIS yönteminde yapılan deneylerde aktive edilmiş PGE, PGE-DNA etkileşiminde süre ve konsantrasyon optimizasyonu ve SEF-DNA etkileşiminin incelenmesinden meydana gelmektedir. Bu ölçümler 0,1 mol/L KCl içeren $2,5 \times 10^{-3}$ M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1/1) redoks çözeltisi içerisinde yapıldı. Ct dsDNA immobilizasyonunda derişim optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 10 dakika dsDNA süresinde belirli derişimlerde bekletildi. Empedans ölçümlerinden bulunan R_{ct} değerlerinden faydalanılarak derişim optimizasyonu gerçekleştirildi.

ct ssDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE' lerle yapılan derişim optimizasyonu:

SWV yönteminde PGE'ler, aktive edilmiş yüzeyleri çözelti içine batacak şekilde içerisinde 0,05 M PBS'de hazırlanan 10 dakika ct ssDNA'dan 110 μ L koyulan viallere batırıldı ve adsorpsiyon tekniğine göre farklı bekleme derişimlerinde bekletildi. (SWV tekniğinde

kullanılan parametreler; Basamak potansiyeli: 0,025 V, Modülasyon süresi: 0,05 s; Tarama hızı: 0,05 V/s). SWV yönteminden elde edilen voltamogramlardaki guanin pik akımında oluşan değişimlerden faydalanılarak en uygun etkileşim derişim bulundu.

EIS yönteminde yapılan deneylerde aktive edilmiş PGE, PGE-DNA etkileşiminde süre ve konsantrasyon optimizasyonu ve SEF-DNA etkileşiminin incelenmesinden meydana gelmektedir. Bu ölçümler 0,1 mol/L KCl içeren $2,5 \times 10^{-3}$ M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1/1) redoks çözeltisi içerisinde yapıldı. Ct ssDNA immobilizasyonunda derişim optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 20 dakika dsDNA süresinde belirli derişimlerde bekletildi. Empedans ölçümlerinden bulunan R_{ct} değerlerinden faydalanılarak derişim optimizasyonu gerçekleştirildi.

3.6.2. DNA İmmobilize Edilmiş PGE' lerle (PGE/DNA) SEF-DNA Etkileşiminin İncelenmesi

Aktivasyon işlemi yapılan PGE'lere en uygun şartlar altında ct DNA (ssDNA ve dsDNA) immobilizasyonu yapıldıktan sonra ct DNA modifiye PGE yüzeylerinde DNA-SEF etkileşiminin incelenmesi için deneyler aşağıdaki gibi yapıldı:

3.6.2.1. PGE/DNA ile SEF-DNA Etkileşiminde Uygun Etkileşim Süresinin incelenmesi

PGE/dsDNA - SEF etkileşimi için süre optimizasyonu:

SWV tekniğinde, optimum şartlarda önceden ct dsDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 μ L' lik viallere batırıldı ve farklı etkileşim sürelerinde bekletildi ve sonra SWV ölçümlerinden alınan guanin pik sinyallerindeki değişimden faydalanılarak süre optimizasyonu yapıldı.

EIS yönteminde ki çalışmada ise optimum şartlarda ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 μ L' lik viallere batırıldı ve farklı adsorpsiyon sürelerinde bekletildi ve empedans ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlerden ölçülen R_{ct} değerlerinden faydalanılarak süre optimizasyonu yapıldı.

PGE/ ssDNA - SEF etkileşimi için süre optimizasyonu:

SWV tekniğinde, optimum şartlarda önceden ct ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 µL' lik viallere batırıldı ve farklı etkileşim sürelerinde bekletildi ve sonra SWV ölçümlerinden alınan guanin pik sinyallerindeki değişimden faydalanılarak süre optimizasyonu yapıldı.

EIS yönteminde ki çalışmada ise optimum şartlarda ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 µL' lik viallere batırıldı ve farklı adsorpsiyon sürelerinde bekletildi ve empedans ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlerden ölçülen Rct değerlerinden faydalanılarak süre optimizasyonu yapıldı.

3.6.2.2. PGE/DNA ile SEF Miktarının İncelenmesi

PGE/dsDNA ile SEF miktarının incelenmesi:

SWV tekniğinde, optimum şartlarda önceden ct dsDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 µL' lik viallere batırıldı ve farklı derişimlerde ölçüm alındı. Daha sonra SWV ölçümlerinden alınan guanin pik sinyallerindeki değişimden faydalanılarak SEF tayini yapıldı.

EIS yöntemindeki çalışmada ise optimum koşullarda ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış SEF içeren 110 µL'lik viallere batırıldı ve sabit sürede farklı derişimlerdeki SEF çözeltilerinde bekletildi ve empedans ölçümleri alındı.

PGE/ssDNA ile SEF miktarının incelenmesi:

SWV tekniğinde, optimum şartlarda önceden ct ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde SEF içeren 110 µL' lik viallere batırıldı ve farklı derişimlerde ölçüm alındı. Daha sonra SWV ölçümlerinden alınan guanin pik sinyallerindeki değişimden faydalanılarak SEF tayini yapıldı.

EIS yöntemindeki çalışmada ise optimum koşullarda ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış SEF içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı

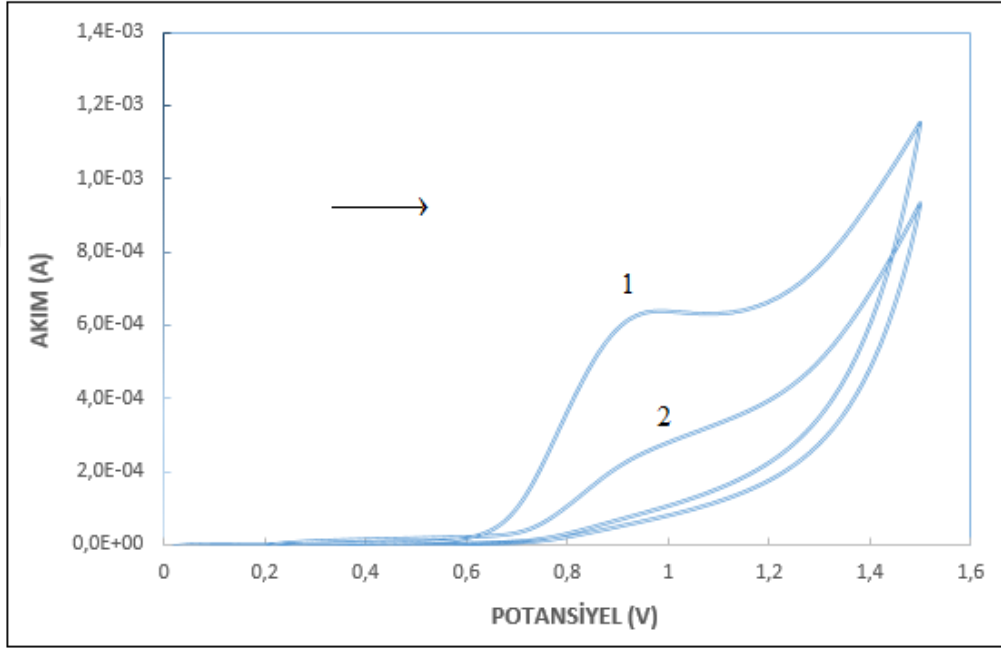
ve sabit sürede farklı derişimlerdeki SEF çözeltilerinde bekletildi ve empedans ölçümleri alındı.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. CV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma

Dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak hücre içerisine 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış 10^{-2} M SEF konularak 50 mV/s tarama hızında ölçüm alındı. Bu ölçüm sonucunda elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil.4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. 10^{-2} M SEF'in PBS'de (pH 7,4) dönüşümlü voltamogramı (tarama hızı: 50 mV/s)

SEF'in dönüşümlü voltamogramından elektrokimyasal davranışı incelendiğinde 0,85 V civarında tersinmez olarak bir yükseltgenme pikine sahip olduğu görülmektedir. İlk taramada (1) gözlenen pik akımı ikinci taramada (2) büyük oranda azalmaktadır; bu da yükseltgenen SEF'in PGE yüzeyine kolaylıkla adsorplandığını düşündürmektedir [72].

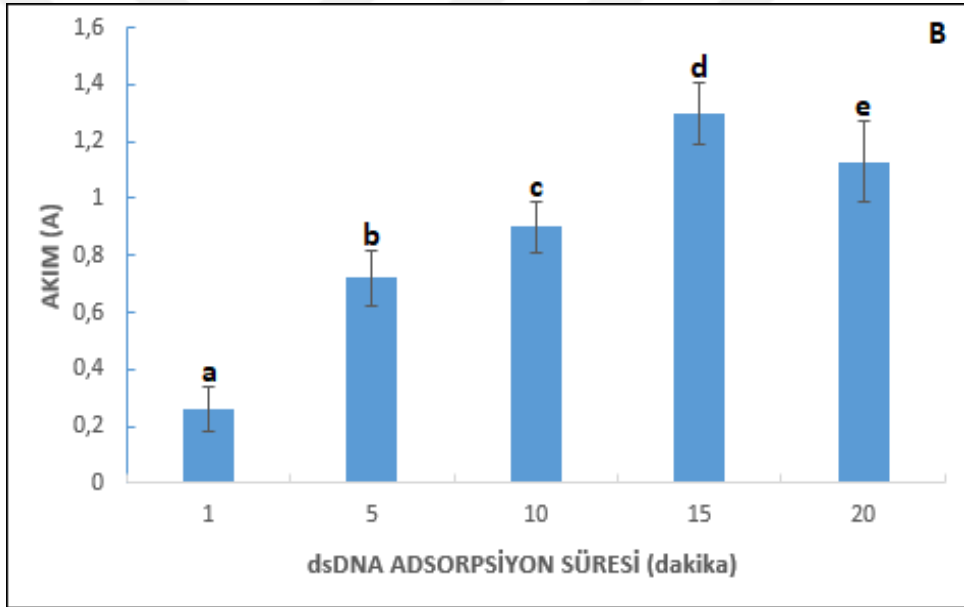
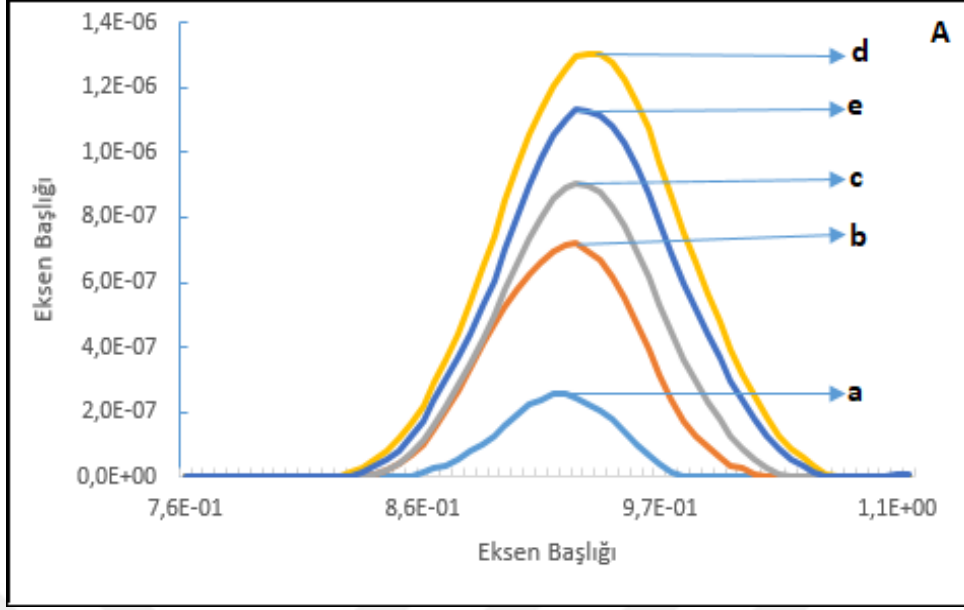
4.2. SEF-DNA etkileşiminde SWV yöntemine göre yapılan deneylere ilişkin bulgular ve tartışma

4.2.1.PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular ve tartışma

4.2.1.1. PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonunda uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

Madde 3.6.1.1.'de anlatıldığı şekilde ct dsDNA ve ct ssDNA için SWV deneyleri gerçekleştirilerek voltametrik ölçümler alındı.

ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda etkileşim süreleri incelendiğinde optimum etkileşim süresinin 15 dakika olduğu görüldü. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil 4.2'de verildi:

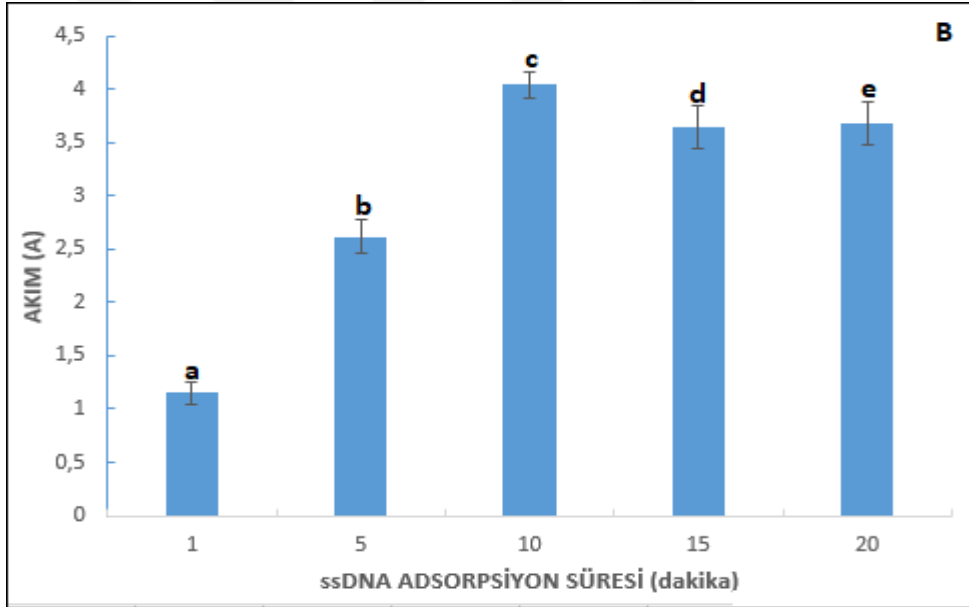
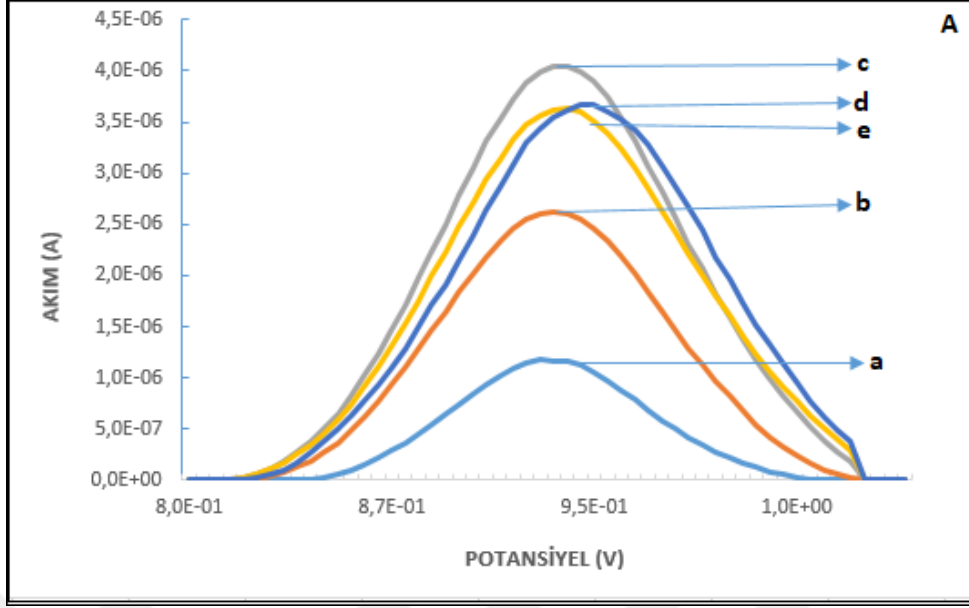


Şekil 4.2. ct dsDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)

Tez kapsamında tanıma yüzeyi olarak kullanılan ct dsDNA ve ct ssDNA'nın, 30 s ve 1,4 V potansiyel uygulanarak aktive edilen PGE yüzeyine adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonunun ilk basamağını DNA'nın en uygun immobilizasyon süresini tayin etmek oluşturmuştur. Bunun için SWV yöntemi ile 0,2 V -1,5 V potansiyel aralığında, PBS tamponunda (pH 7,4) yapılan potansiyel taramasında, yaklaşık 0,95 V potansiyel değerinde görülen guanin bazının yükseltgenme pik akımı referans olarak seçildi. Ct dsDNA'nın en uygun immobilizasyon süresi tayin edilirken aktive edilmiş elektrotlar,

PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki dsDNA çözeltilerinde 1 dakikadan 20 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve PBS tamponunda kare dalga ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.2’de voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 15 dakikalık etkileşim süresinden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen bloke olduğu görüldü ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum süre 15 dakika olarak tayin edildi.

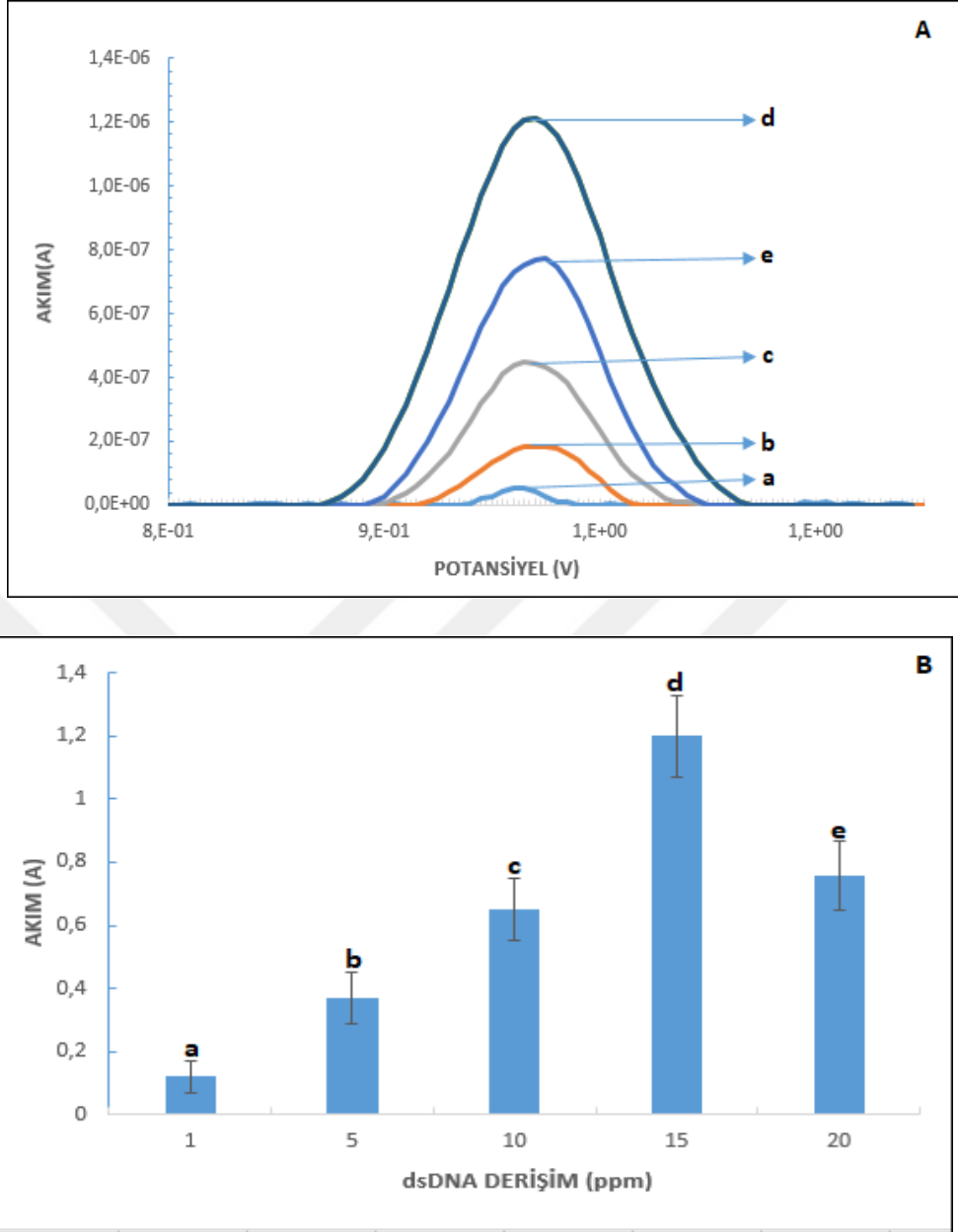
Ct ssDNA’nın immobilizasyonunda optimum sürenin tayin edilmesinde yukarıdaki işlemler tekrar edildi. Aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ssDNA çözeltilerinde 1 dakikadan 20 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve PBS tamponunda SWV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.3’te voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşıldı ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum süre 10 dakika olarak tayin edildi.



Şekil 4.3. ct ssDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)

4.2.1.2. PGE yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA immobilizasyonunda uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

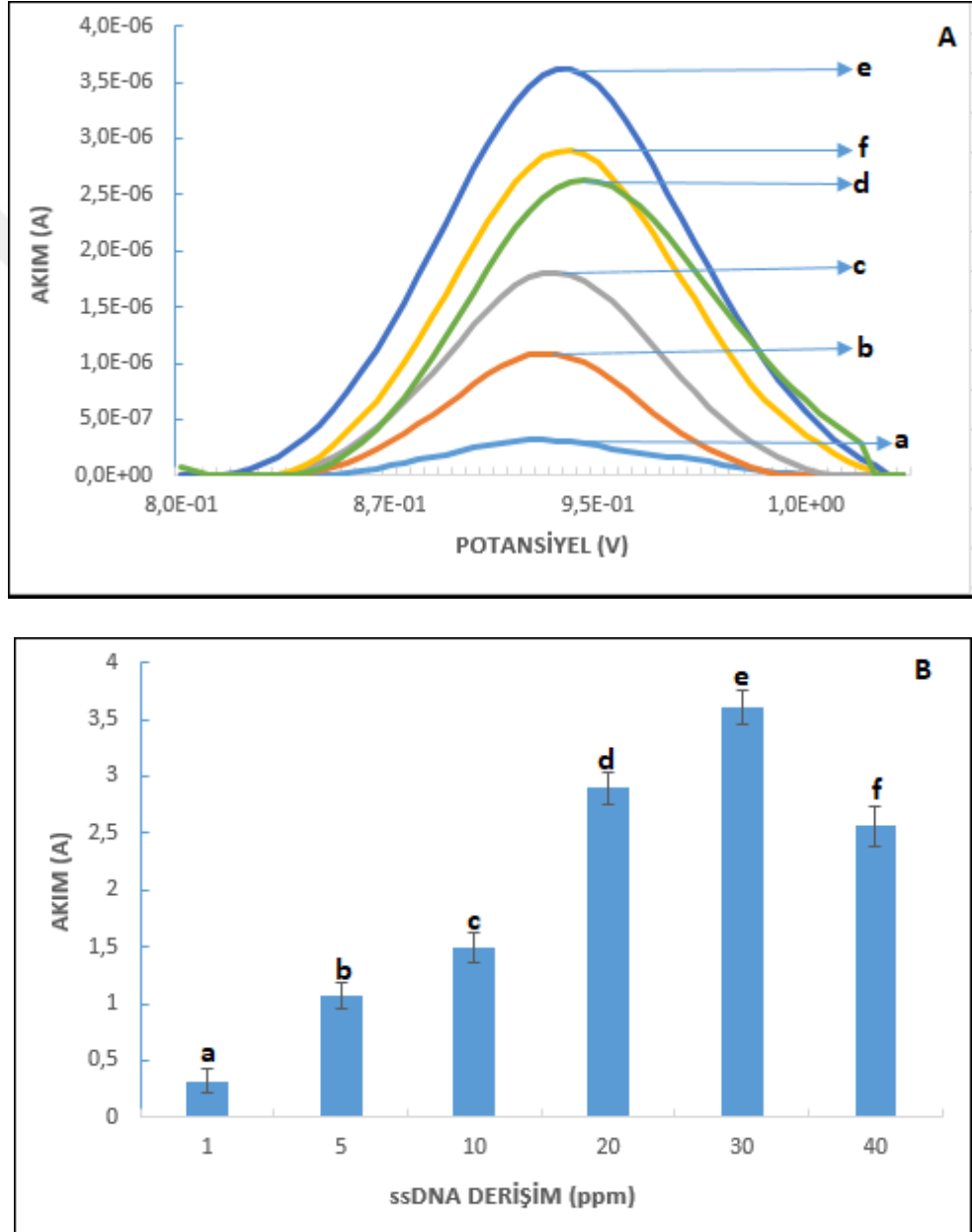
Ct dsDNA için optimum immobilizasyon süresi 15 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA'nın optimum derişim değerinin belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 1 ppm – 20 ppm derişim aralığındaki dsDNA çözeltilerinde 15 dakika bekletildi ve PBS tamponunda SWV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.4'te voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan dsDNA derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 15 ppm dsDNA derişiminden sonra guanin pik akımlarının değışmediğı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin DNA ile tamamen kaplandığı anlaşıldı ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum derişim 15 ppm olarak tayin edildi.



Şekil 4.4. ct dsDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)

ct ssDNA'nın immobilizasyonunda optimum derişim değerinin tayin edilmesinde dsDNA için yapılan işlemler tekrar edildi. ct ssDNA için optimum immobilizasyon süresi 10 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın optimum derişim değerinin belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 1 ppm – 40 ppm derişim aralığındaki ssDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi ve ABS tamponunda SWV ölçümleri alındı ve

sonuçlar Şekil 4.5'te voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ssDNA derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 30 ppm ssDNA derişiminden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yzeyinin ssDNA ile tamamen kaplandığı anlaşıldı ve bzyece ssDNA immobilizasyonu için optimum derişim 30 ppm olarak tayin edildi.

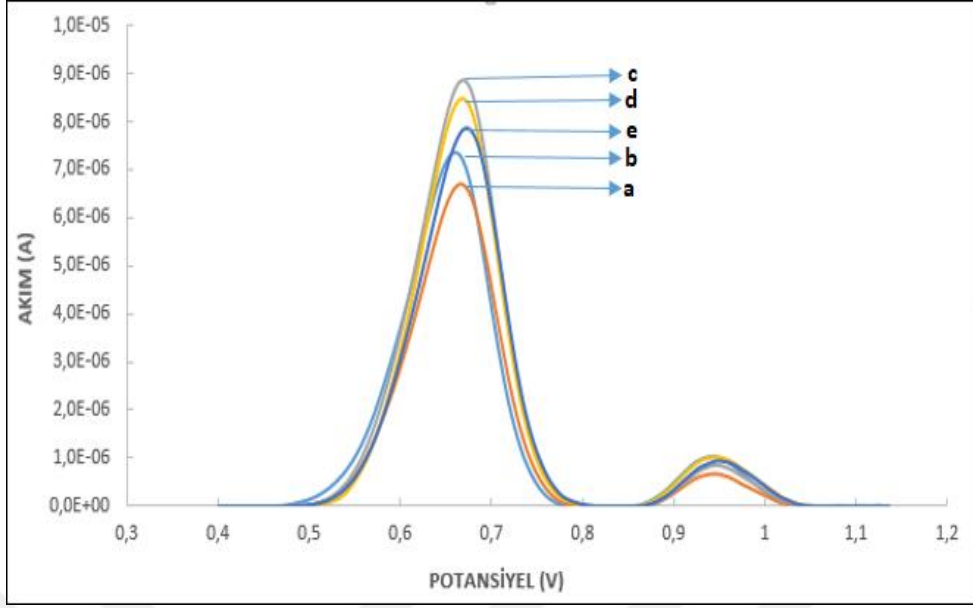


Şekil 4.5. ct ssDNA' nın PGE yzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 20 (e) 30 (f) 40 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile olülen guanin sinyallerini gzyeren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)

4.2.2. SEF-DNA Etkileşimine İlişkin Bulgular Ve Tartışma

4.2.2.1. SEF-DNA Etkileşiminde Uygun Etkileşim Süresinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular ve Tartışma

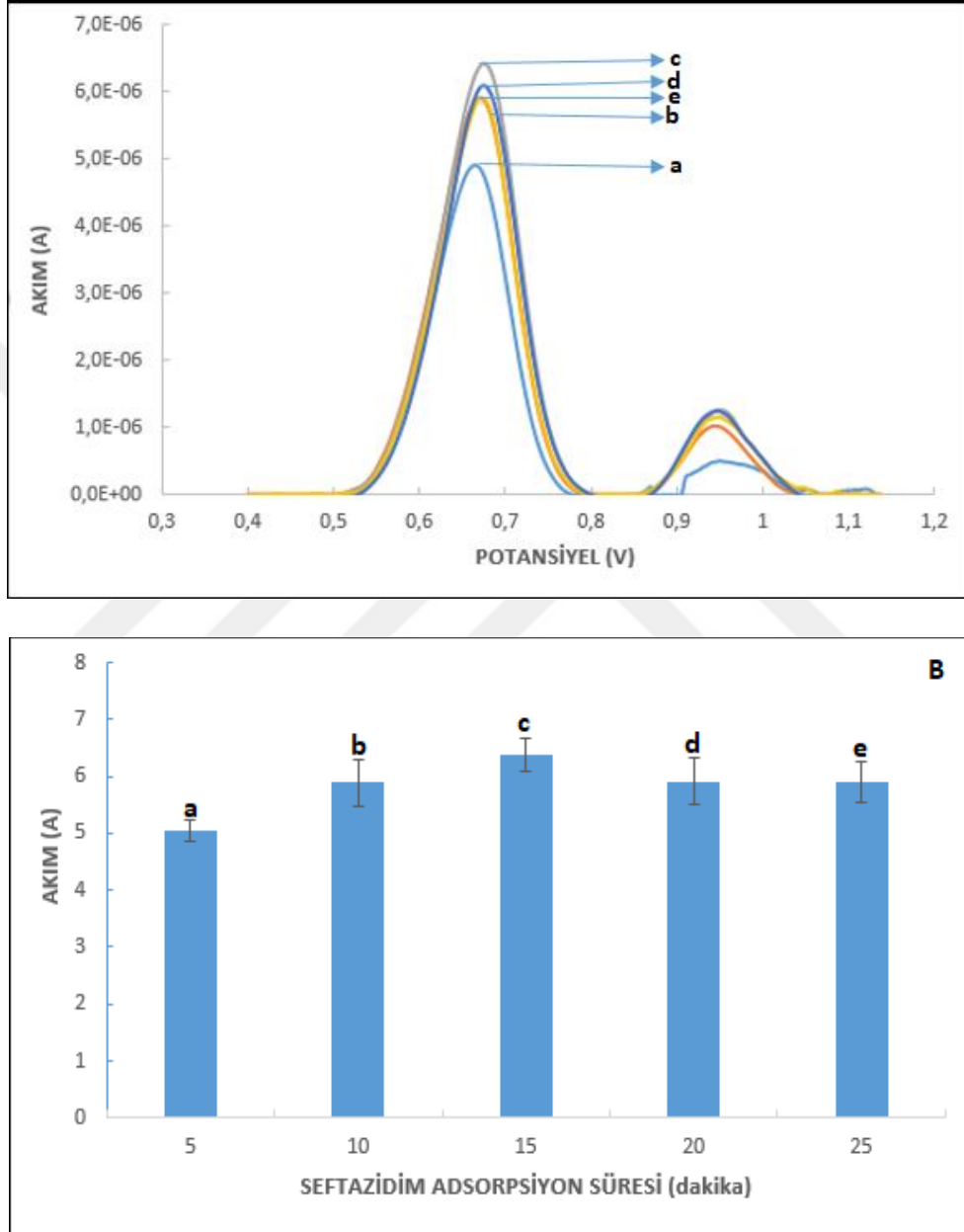
ct dsDNA ve ct ssDNA için Madde 3.6.1.1' de anlatıldığı şekilde deneyler yapıldı. SWV tekniğiyle ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için optimum derişim 15 ppm ve optimum etkileşim süresi 15 dakika olarak bulundu. Bu şartlarda yüzeyine ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki SEF çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı sürelerde etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler yapıldı. Ölçümler sonucunda 0,65 V civarında dsDNA-SEF etkileşiminden kaynaklanan yeni bir pik meydana gelirken 0,95 V civarında oluşan guanin piklerinde de önemli bir azalma olduğu görüldü. SEF'ten kaynaklanan ve 0,65 V'ta meydana gelen yükseltgenme piki referans alınarak SEF-dsDNA etkileşim süresi 15 dakika olarak bulundu. Elde edilen voltamogram ile histogram Şekil 4.6'da gösterildi.



Şekil 4.6. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 dakikalarda bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

SWV tekniğiyle ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için optimum derişim 30 ppm ve optimum etkileşim süresi 10 dakika olarak bulunmuştu. Bu şartlarda yüzeyine ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki SEF çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı sürelerde etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler yapıldı. dsDNA-SEF etkileşiminde olduğu gibi 0,65 V civarında ssDNA-SEF etkileşiminden kaynaklanan yeni

bir pik meydana gelirken 0,95 V civarında oluşan guanin piklerinde de önemli bir azalma olduğu görüldü. SEF'ten kaynaklanan ve 0,65 V'ta meydana gelen yükseltgenme piki referans alınarak SEF-ssDNA etkileşim süresi 15 dakika olarak bulundu. Buna göre oluşan histogram ve voltamogram grafikleri şekil 4.7 de gösterildi.

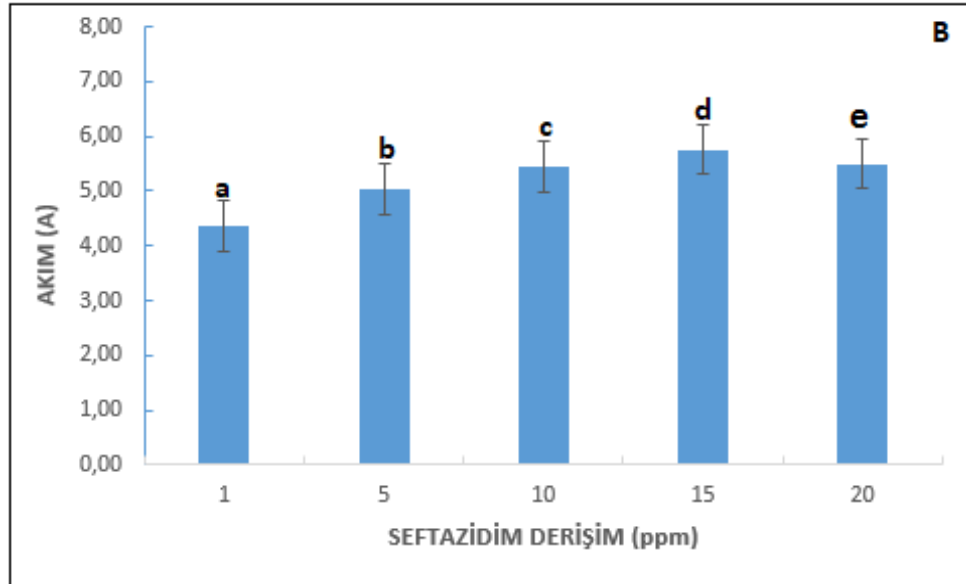
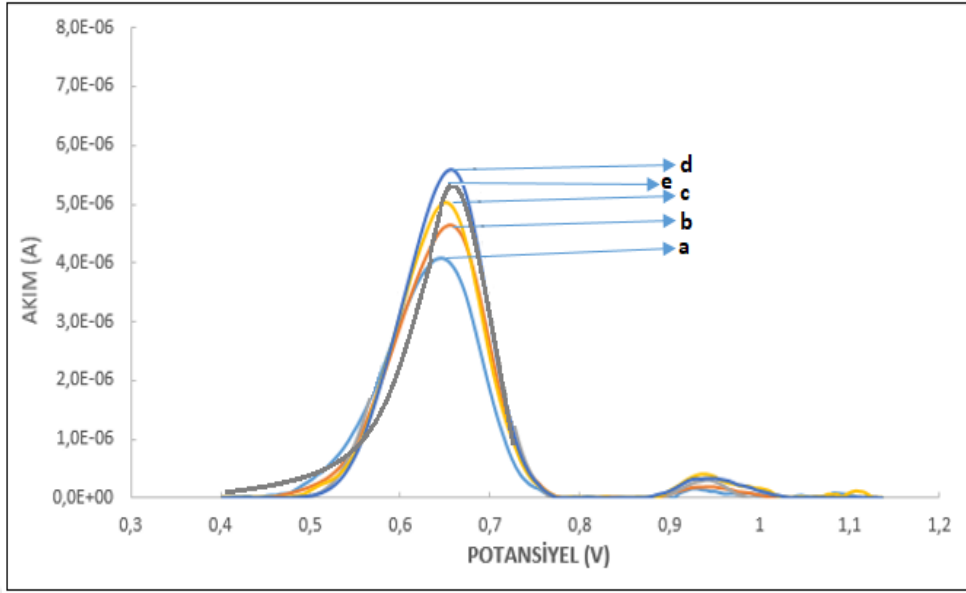


Şekil 4.7. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 dakikalar da bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

Optimum koşullarda yüzeyine dsDNA ve ssDNA immobilize edilen PGE'ler, sabit derişimde SEF içeren çözeltilerde farklı sürelerde bekletildikten sonra alınan SWV ölçümlerinde, 0,65 V'ta yeni yükseltgenme piklerinin meydana gelmesi SEF'in DNA ile güçlü bir etkileşime girdiğini göstermektedir. Artan etkileşim süresi ile birlikte bu yükseltgenme akım değerlerinin de arttığı ve her iki DNA türü için 15 dakikalık etkileşim süresinin optimum olduğu gözlenmiştir.

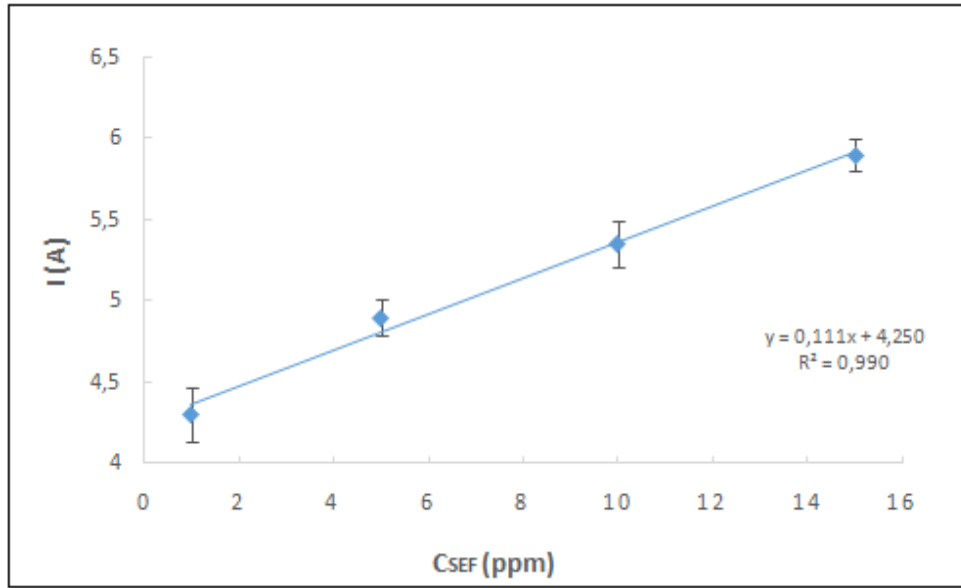
4.2.2.2. SEF-DNA etkileşiminde optimum etkileşim derişimlerinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

ct dsDNA ve ct ssDNA için yöntem 3.6.1.1' de anlatıldığı şekilde deneyler yapıldı. SWV tekniğıyle ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için optimum derişim 15 ppm ve optimum etkileşim süresi 15 dakika olarak bulundu. Bu şartlarda da yüzeyine ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 15 dakika sabit sürede SEF çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı derişim miktarlarıyla etkileştirildi ve yıkama işleminde sonra voltametrik ölçümler yapıldı. SEF'in yükseltgenme sinyalinde gerçekleşen değışimler incelendi ve optimum SEF-dsDNA etkileşim miktarı 15 ppm olarak bulundu. Elde edilen voltamogram ile histogram Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



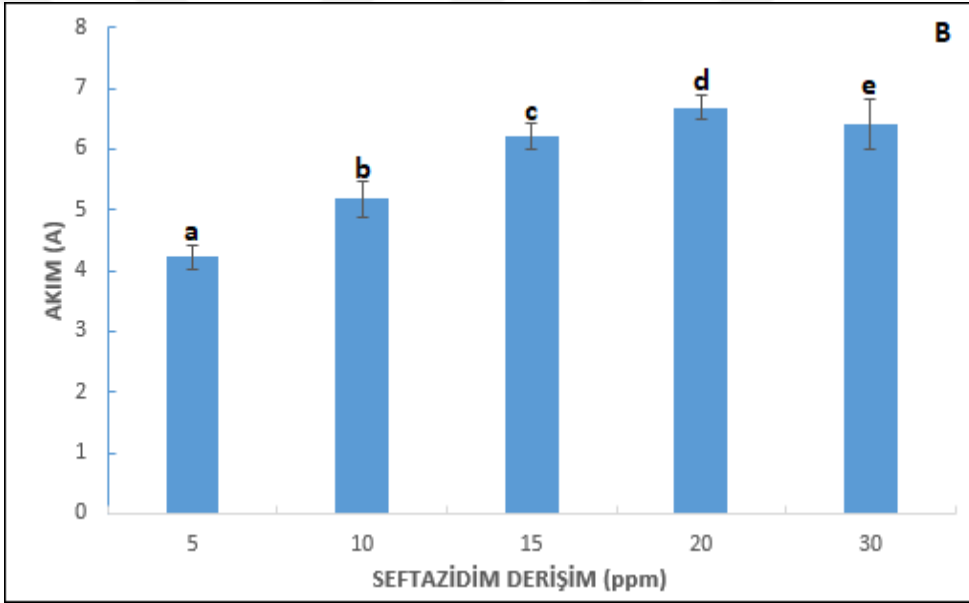
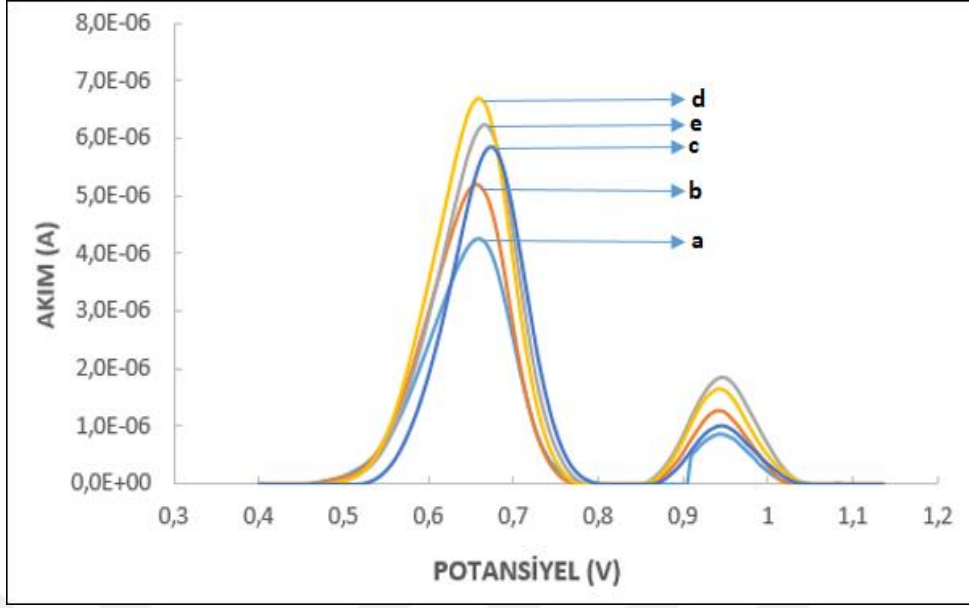
Şekil 4.8. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 ppmler de bekletilerek SWV yöntemiyle SEF sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

dsDNA-SEF etkileşimi sonrasında 0,65 V'ta görülen yükseltgenme sinyallerinin SEF derişimine bağılı değışiminden yararlanılarak oluşan kalibrasyon grafiğı Şekil 4.9'da verilmiştir.



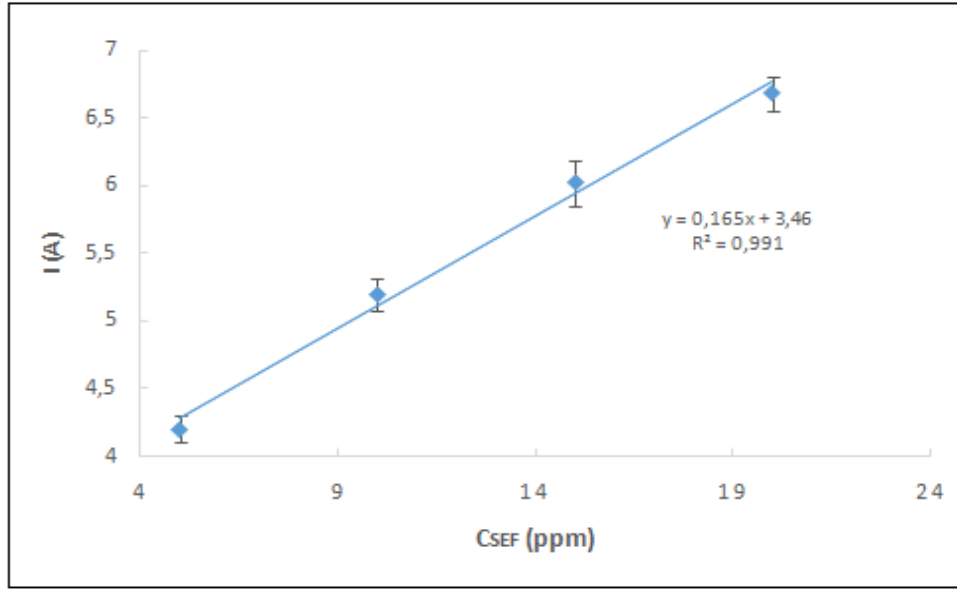
Şekil 4.9. SEF-dsDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiği

SWV tekniğiyle ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için optimum derişim 30 ppm ve optimum etkileşim süresi 10 dakika olarak bulundu. Bu şartlarda da yüzeyine ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 15 dakika sabit sürede SEF çözeltisi (110 µL hacmindeki vialerde bulunan) ile farklı derişim miktarlarıyla etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler yapıldı. SEF'e ait yükseltgenme sinyalinde gerçekleşen değişimler incelendi ve optimum SEF-ssDNA etkileşim miktarı 20 ppm olarak bulundu. Elde edilen voltamogram ile histogram Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. SEF immobilizasyon çalışmasının sinyale olan yanıtı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler SEF içerisinde (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 30 ppmler de bekletilerek SWV yöntemiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

ssDNA-SEF etkileşimi sonrasında 0,65 V'ta görülen yükseltgenme sinyallerinin SEF derişimine bağılı değışiminden yararlanılarak oluşan kalibrasyon grafiğı Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. SEF-ssDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiği

DNA ile etkileşen SEF derişiminin 0,65 V'ta meydana gelen yükseltgenme pik akımlarındaki değişime karşı çizilen kalibrasyon grafikleri incelendiğinde SEF'in hem dsDNA hem de ssDNA ile katı elektrot yüzeyinde güçlü bir şekilde etkileştiği görüldü. Kalibrasyon grafikleri ve regresyon doğrusunun standart sapması ve eğiminden yararlanılarak tayin sınırları hesaplandı ve SEF'in en düşük tayin sınırı dsDNA ile 2,38 ppm; ssDNA ile 2,40 ppm olarak hesaplandı. Çalışılan ortamda SEF'in tek başına iken alınan dönüşümlü voltamogramında 0,85 V civarında gözlenen yükseltgenme pik potansiyelinin SEF-DNA etkileşiminden sonra 0,65 V civarına doğru negatif kayması ve guanin pik akımında meydana gelen azalmalar etkileşimin elektrostatik olduğunu düşündürmüştür [73].

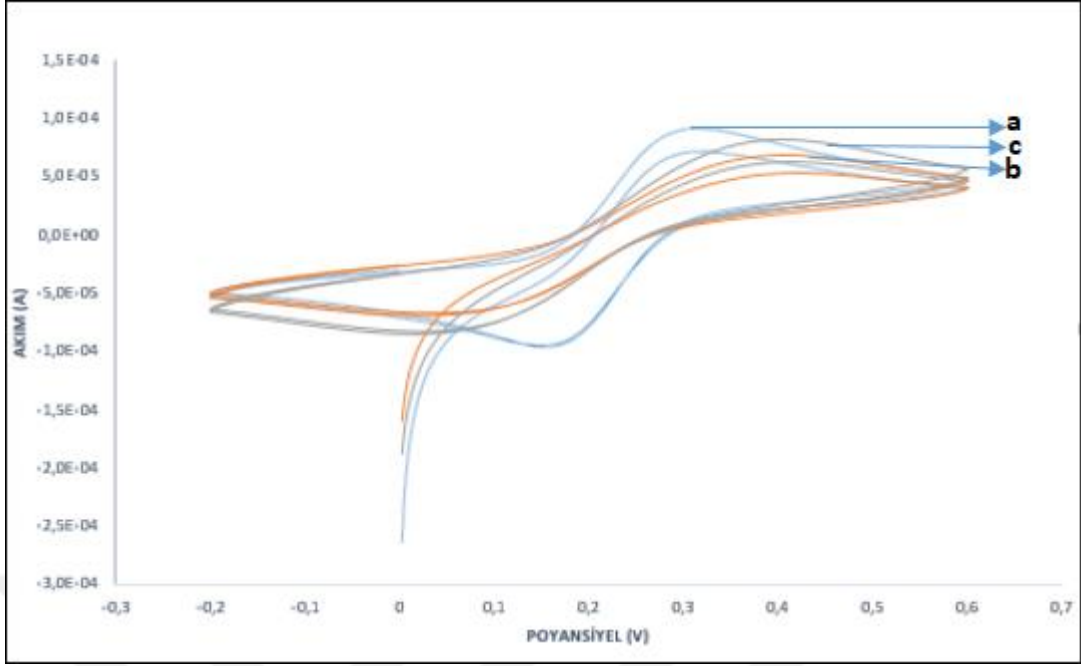
4.3. SEF-DNA Etkileşiminde EIS Tekniği Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma

Çalışma elektrotu olarak kullanılan PGE yüzeyleri, EIS yönteminde de tıpkı SWV yönteminde olduğu gibi 30 s ve 1,4 V potansiyel uygulanarak aktive edildi. Bundan sonraki EIS ölçümlerinde, SWV yönteminde olduğu gibi dsDNA ve ssDNA aktif PGE yüzeyine immobilize edildi ve bunun için optimum immobilizasyon süresi ve optimum DNA derişimleri impedimetrik olarak tayin edildi. İmpedimetrik ölçümlerde yük aktarım direncinde (R_{ct}) veya bağıl yük aktarım direncinde (Δ_{oran}) meydana gelen değişimler incelenerek deney sonuçları yorumlandı. Empedans ölçümleri için uygulanması gereken

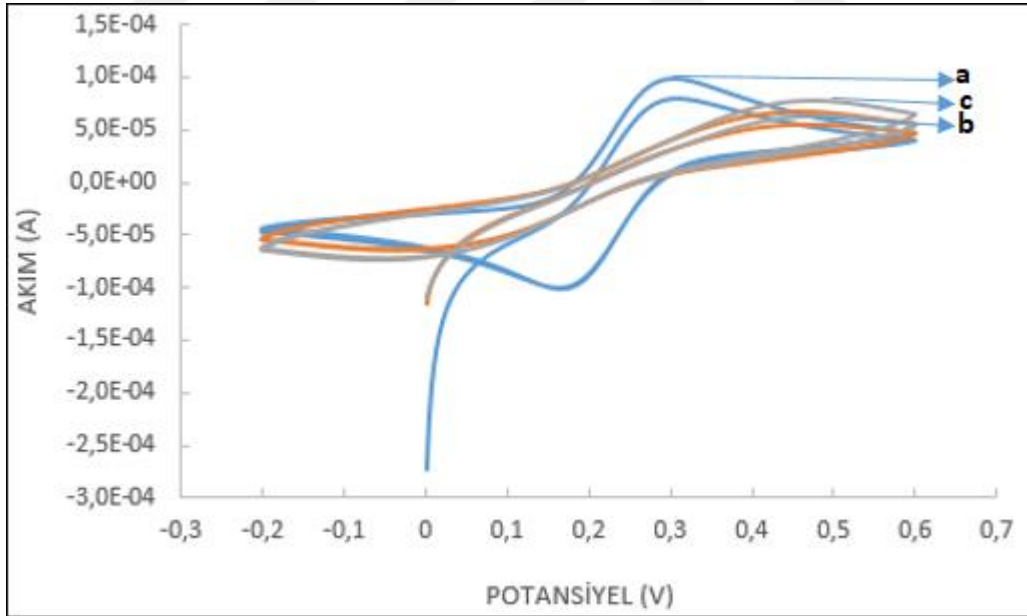
potansiyel değeri (Ag/AgCl referans elektroda karşı 0,21 V), $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3}$ sisteminin redoks potansiyelinden hesaplandı. İmpedimetrik ölçümler, bu sabit potansiyelde 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında ve 10 mV AC genliğinde gerçekleştirildi. Empedans değerleri FRA yazılımı desteği ve sisteme eşdeğer bir elektrik devresi ($R_s/Cdl/R_{ct}/W$) kullanılarak çizilen Nyquist grafiklerinden hesaplandı. Elektroda ait elektriksel parametrelerin yorumlanmasında, elektronların PGE/çözelti ara yüzeyindeki geçişine karşı elektrot direnci olarak tanımlanan R_{ct} değeridir ve bu değer Nyquist grafiğindeki yarım dairenin çapı ile orantılıdır [74]. İmpedimetrik deney basamaklarında kullanılan farklı elektrotlardan elde edilen sonuçları karşılaştırmak, bağımsız ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için bağıl R_{ct} değerleri (Δ_{oran}) değerleri kullanıldı [75].

Bu teknikte EIS ölçümleri, dönüşümlü voltametri ölçümleriyle paralel olarak deney yapıldı. Sırayla aktive edilmiş elektrodun (PGE_{aktive}), ct DNA (ct dsDNA veya ct ssDNA) immobilize edilmiş elektrodun ($\text{PGE}_{aktive/DNA}$) ve SEF ile etkileştirilmiş elektrodun ($\text{PGE}_{aktive/DNA/SEF}$) CV ve EIS ölçümleri alındı. EIS çalışmalarından elde edilen spektrum verilerinden ct dsDNA ve ct ssDNA için ayrı ayrı immobilizasyon süresi ve derişim değerleri optimize edildi. Dönüşümlü voltametri yönteminden bulunan sonuçlar, DNA'nın immobilizasyonundan ve SEF-DNA etkileşiminden sonra elektrot yüzeyinde gerçekleşen değişimlerin de bir göstergesi olmuştur.

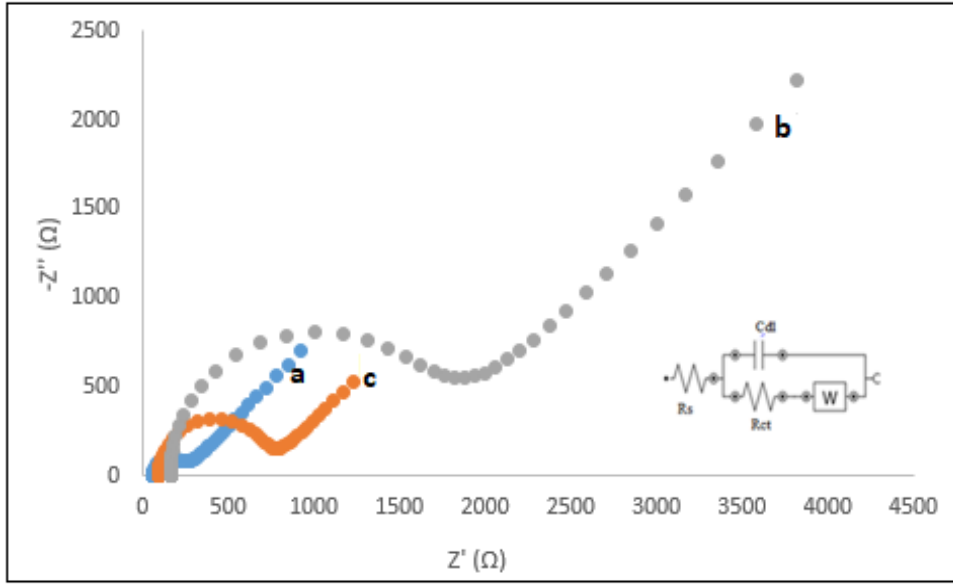
ct dsDNA ve ct ssDNA immobilize edilen PGE'lerin SEF etkileşimlerinden sonra ve önce redoks çözeltisindeki dönüşümlü voltametrik davranışları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de, impedimetrik davranışları ise Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de verildi:



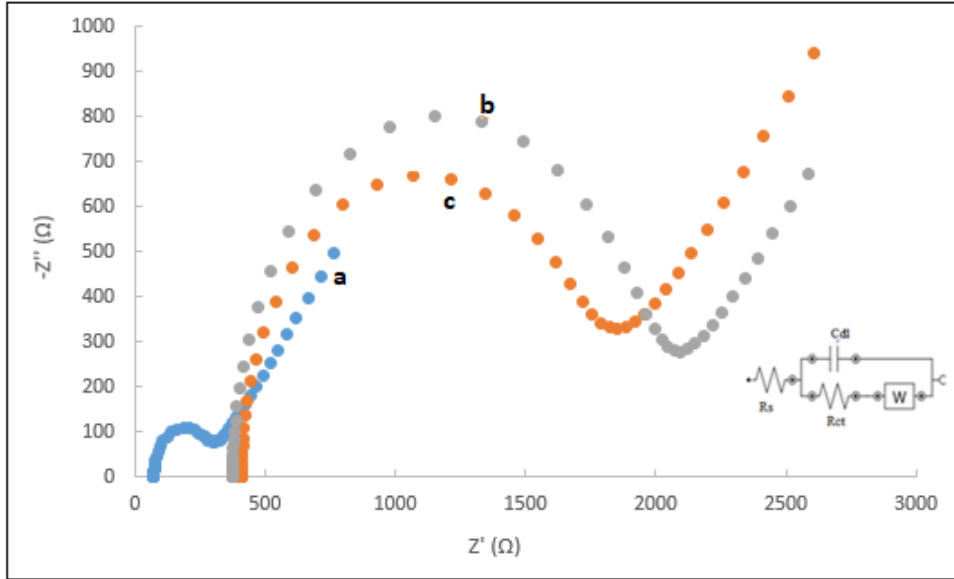
Şekil 4.12. dsDNA-SEF etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-dsDNA etkileşimden sonra PGE



Şekil 4.13. ssDNA-SEF etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-ssDNA etkileşimden sonra PGE



Şekil 4.14. SEF-dsDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-dsDNA etkileşiminden sonra PGE



Şekil 4.15. SEF-ssDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) SEF-ssDNA etkileşiminden sonra PGE

İmpedimetrik ölçümlerle paralel olarak gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri deneylerinden elde edilen sonuçlar SEF-DNA etkileşiminin karakteristiğinin ortaya koyulmasına yardımcı olmuştur. Şekil 4.12 ve 4.13 incelendiğinde, modifiye edilmemiş (çıplak) elektrot ile redoks probunda alınan dönüşümlü voltamogramda pik akımının, modifiye edilmiş elektroda göre çok yüksek olması çıplak elektrot yüzeyinin iletkenliğinin de yüksek olduğuna işaret eder. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, dsDNA immobilizasyonu

yapıldıktan sonra, aynı koşullarda redoks sisteminden elde edilen dönüşümlü voltamogramda pik akımındaki şiddetli azalma elektrot yüzeyinin dsDNA ile kaplandığını ve buna paralel olarak negatif yüklü prop ve negatif yüklü DNA iskeleti arasındaki elektrostatik itmenin bir sonucu olarak, elektrot yüzeyinin iletkenliğinin de azaldığı anlaşılmaktadır [76]. Aynı şekilde ssDNA immobilizasyonundan sonra alınan dönüşümlü voltamogramda da (Şekil 4.13) pik akımlarının azaldığını hatta bu azalmanın dsDNA immobilize edilen elektrottan alınan voltamograma göre daha fazla olduğunu yani ssDNA'nın elektrot yüzeyi ile nispeten daha fazla etkileştiğini görmek mümkündür. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de DNA'nın SEF ile etkileşiminden sonra aynı koşullarda alınan dönüşümlü voltamogramlarında ise redoks sisteminde pik akımlarının yeniden arttığı, ancak bu artışın dsDNA durumunda biraz daha fazla olduğu görülmektedir

4.3.1. PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonuna ilişkin bulgular ve tartışma

4.3.1.1. PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonunda en uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

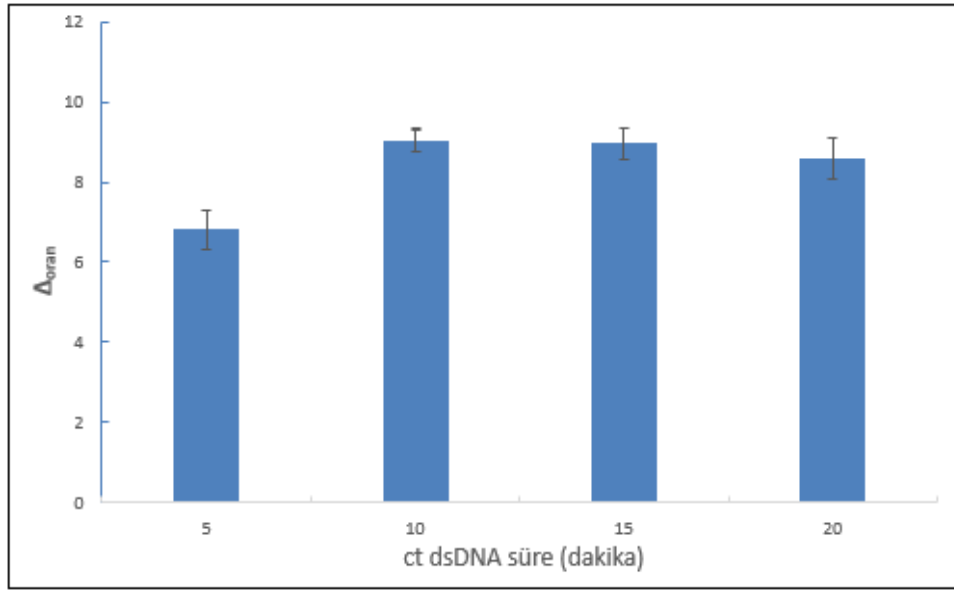
Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için Bölüm 3.6.1.1.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmpedimetrik ölçümler alındı. Yük taşıma direncinin (R_{ct}) immobilizasyon süresine göre bağlı değişimi (Δ_{oran}) oranı şu eşitliğe göre hesaplandı [75]:

$$\Delta_{oran} = \frac{a - b}{b} \quad (\text{Denklem 4.1})$$

a: DNA modifiye elektrot için R_{ct}

b: Çıplak elektrot için R_{ct}

Aktive edilmiş PGE elektrotları (çıplak PGE), 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki dsDNA çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı sürelerde etkileşim yapıldı. Etkileşim işleminden sonra yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra impedimetrik ölçüm alındı. Δ_{oran} değerlerinde oluşan değişimler incelenerek optimum dsDNA immobilizasyon süresi 10 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.16'da gösterildi:



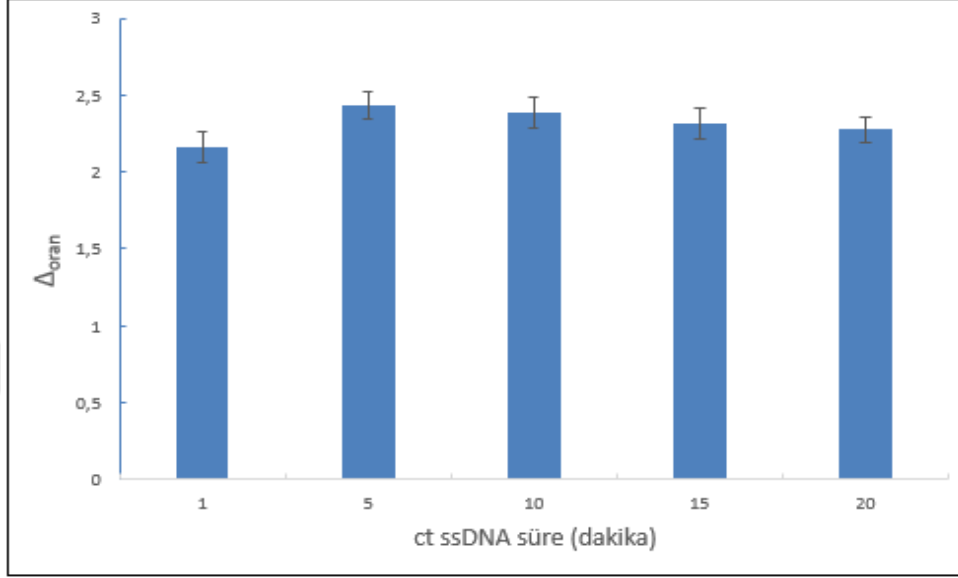
Şekil 4.16. dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ölçümlerinin ortalama Δ_{Oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{Oran} değerlerinin de arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum süre impedimetrik olarak tayin edilmiştir.

R_{ct} değerleri yük aktarım direnci olarak tanımlanmıştır. Redoks probunu içeren deney çözeltisinde, $\text{Fe}^{2+/3+}$ sisteminin indirgenme-yükseltgenme olayı esnasında elektrot yüzeyinden çözelti ortamına (veya tersi) yük transferi, elektrot yüzeyinin elektriksel yapısıyla doğrudan ilgilidir. Negatif yüklü fosfat iskelet yapısına sahip DNA'nın elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle birlikte elektrot yüzeyi kısmen negatif yüklenecek ve immobilizasyon süresi arttıkça elektrot yüzeyindeki negatif yük yoğunluğu da artacaktır. Sonuç olarak anyonik redoks probu ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) ile DNA arasındaki elektrostatik itme, yük aktarım direncini artıracak ve belirli bir etkileşim süresinden sonra da sabit kalacaktır.

Ct ssDNA'nın immobilizasyonunda optimum sürenin tayin edilmesinde yukarıda işlemler tekrar edildi. DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çıplak elektrot), 0,21 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{\text{ct}(\text{çıplak})}$] bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ssDNA

çözeltilerinde 1 dakikadan 20 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve aynı şekilde empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(ssDNA)}$] bulundu. Literatüre göre [75] her bir süre için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.17'de histogram olarak verildi:



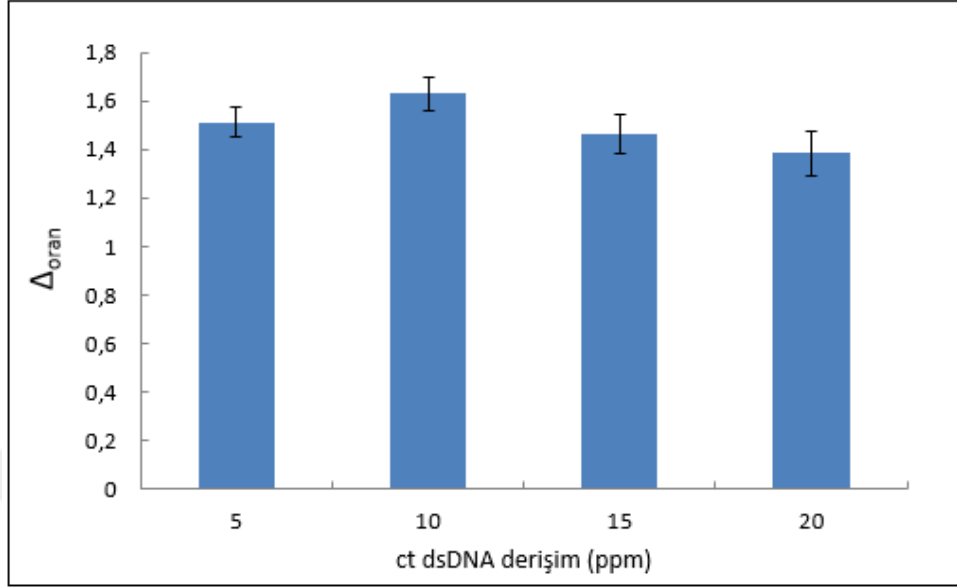
Şekil 4.17. ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ölçümlerinin ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum süre impedimetrik olarak tayin edilmiştir.

4.3.1.2 PGE yüzeyine ct ssDNA ve ct dsDNA'nın immobilizasyonunda en uygun etkileşim derişiminin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

Ct dsDNA için optimum immobilizasyon süresi 10 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA'nın optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çıplak elektrot), 0,21 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M [$Fe(CN)_6$]^{4-/3-} redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(çiplak)}$] bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 5 ppm – 20 ppm derişim aralığındaki dsDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi ve empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(dsDNA)}$] bulundu. Literatüre göre

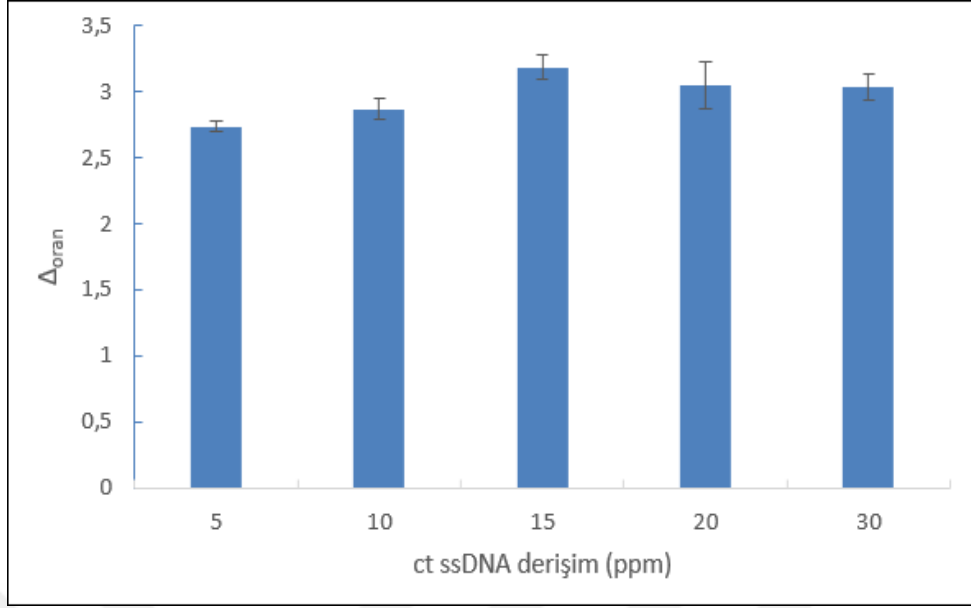
[75] her bir dsDNA derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.18'de histogram olarak verildi:



Şekil 4.18. dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin dsDNA adsorpsiyon süresine göre değişimi

Şekilden de anlaşılacağı gibi artan dsDNA derişimleri ile birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 ppm dsDNA derişiminden sonra sabit kaldığı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen kaplandığı anlaşılmış ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum derişim 10 ppm olarak tayin edilmiştir.

Ct ssDNA için optimum immobilizasyon süresi 5 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çiplak elektrot), 0,21 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{çiplak})]$ bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 5 ppm – 30 ppm derişim aralığındaki ssDNA çözeltilerinde 5 dakika bekletildi ve empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{ssDNA})]$ bulundu. Literatüre göre [75] her bir ssDNA derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.19'da histogram olarak verildi:



Şekil 4.19. ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin ssDNA adsorpsiyon süresine göre değişimi

Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ssDNA derişimleri ile birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 15 ppm ssDNA derişiminden sonra sabit kaldığı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen kaplandığı anlaşılmış ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum derişim 15 ppm olarak tayin edilmiştir.

4.3.2. SEF-DNA ile etkileşimine ilişkin bulgular ve tartışma

4.3.2.1. SEF-DNA etkileşiminde uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için Bölüm 3.6.1.1.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı.

EIS metodu kullanılarak ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum etkileşim süresi 10 dakika ve optimum dsDNA derişimi 10 ppm olarak bulunmuştu. Bulunan bu optimum değerler ile PGE yüzeyine ct dsDNA immobilize edilmiş 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki SEF çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı sürelerde etkileştirildi ve yıkama işlemi yapıldı. Bu işlemten sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde oluşan değişimler incelenerek SEF-dsDNA etkileşimi için optimum süre 15 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.20'de gösterildi. Δ_{oran} aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı [75]:

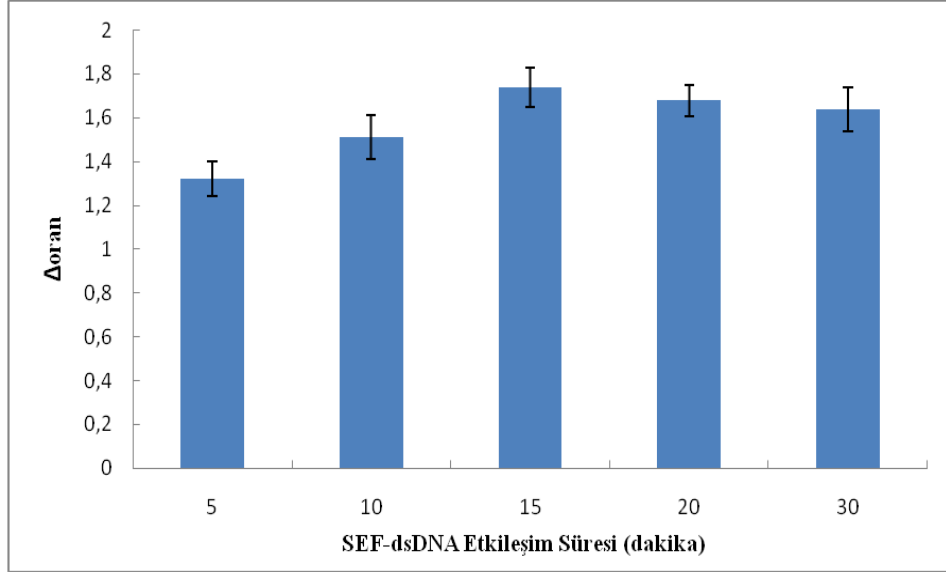
$$\Delta_{oran} = \frac{c-b}{a-b}$$

(Denklem 4.2)

a: DNA modifiye elektrot için Rct

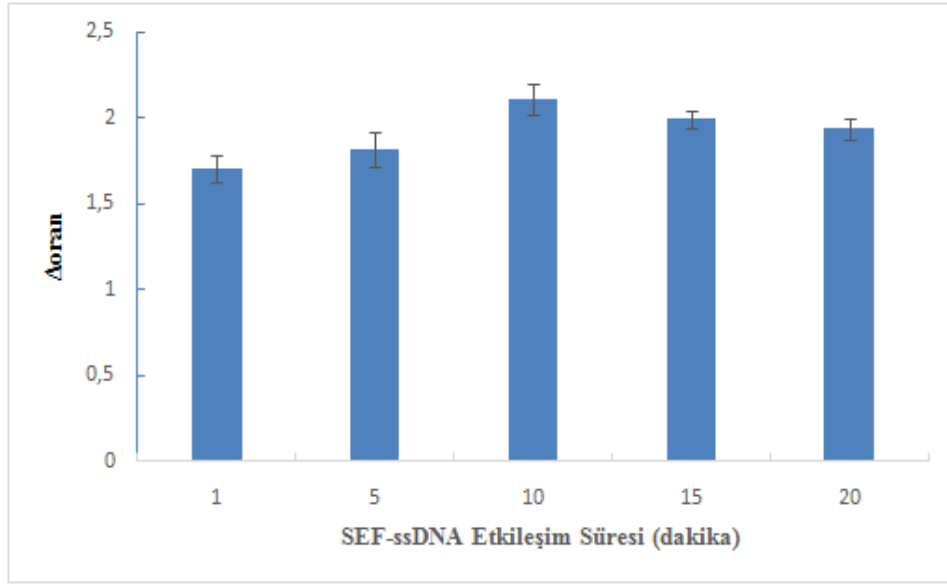
b: Çıplak elektrot için Rct

c: SEF etkileşiminden sonraki Rct



Şekil 4.20. 30 ppm sabit derişimdeki SEF'nin dsDNA ile PGE yüzeyine tutturulmasına ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

EIS metodu kullanılarak ct ssDNA'nın PGE yüzeyine yüzeyine immobilizasyonunda optimum etkileşim süresi 5 dakika ve optimum ssDNA derişimi 15 ppm olarak bulunmuştur. Bulduğumuz verileri kullanarak PGE yüzeyine ct ssDNA immobilize edilmiş 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki SEF çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile farklı sürelerde etkileştirildi ve yıkama işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde oluşan değişimler incelenerek SEF-ssDNA etkileşimi için optimum süre 15 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.21'de gösterildi.

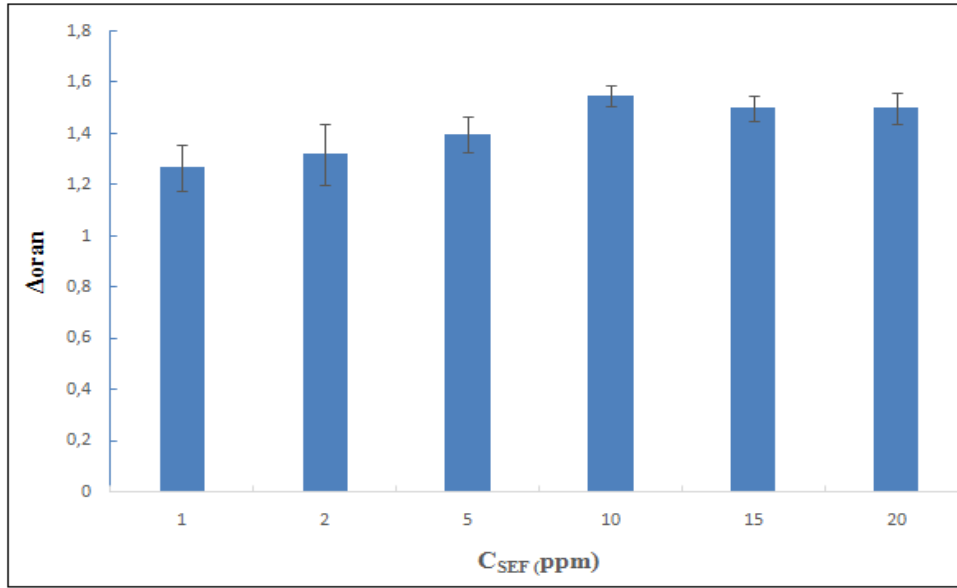


Şekil 4.21. 30 ppm sabit derişimdeki SEF'nin ssDNA ile PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

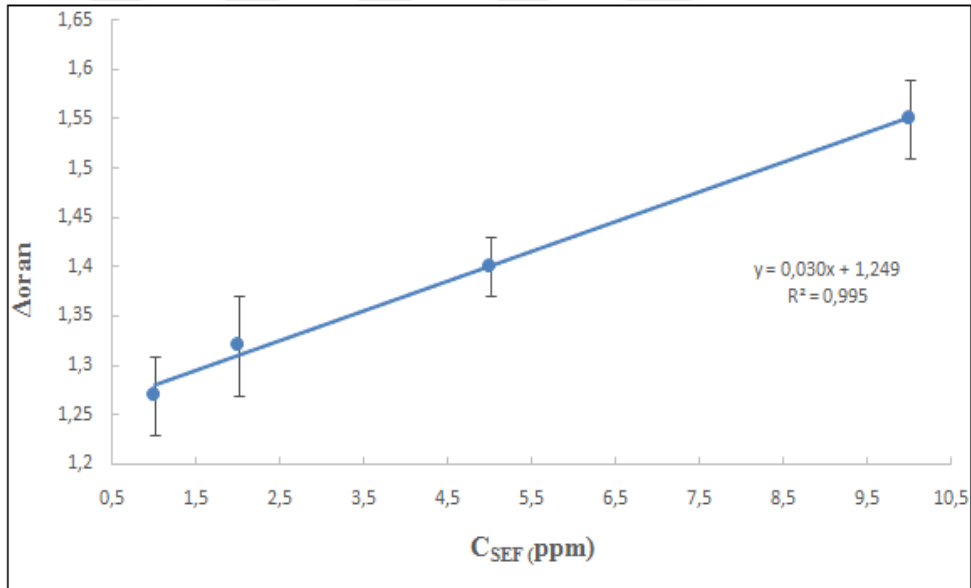
4.3.2.2. SEF-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular ve tartışma

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için Bölüm 3.6.1.1.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı.

Yüzeyine uygun koşullarda (10 dakika; 10 ppm) dsDNA immobilize edilen PGE, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki SEF çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile 15 dakika sabit sürede etkileştirildi ve yıkama işlemi yapıldı. Yapılan her bir işlemde sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde oluşan değişimler incelenerek dsDNA ile etkileşen optimum SEF derişimi 10 ppm olarak bulundu (Şekil 4.22). Δ_{oran} değerlerinin SEF derişimiyle değişiminden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.23), regresyon doğrusunun standart sapması ve eğiminden yararlanılarak en düşük tayin sınırı 1,09 ppm olarak hesaplandı.



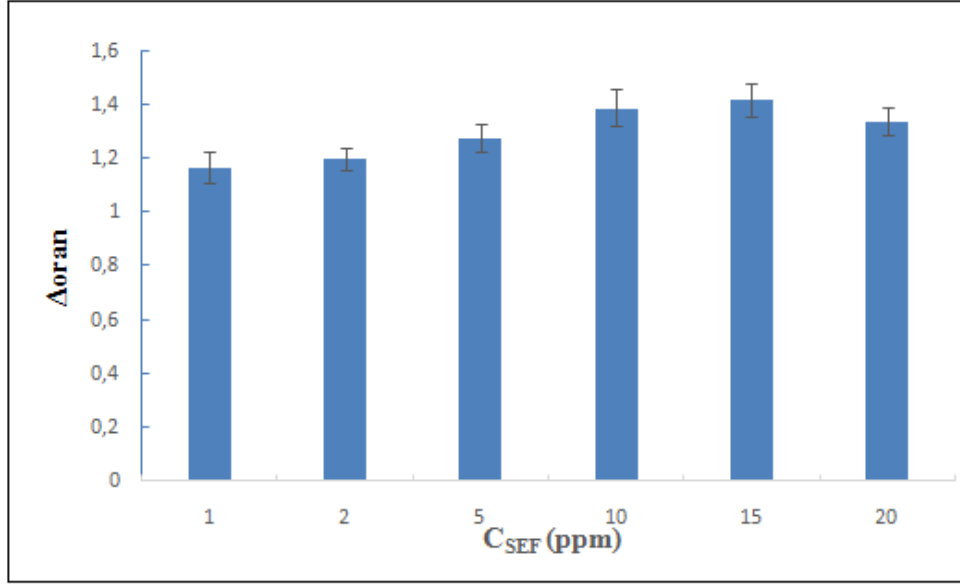
Şekil 4.22. 20 dakika sürede SEF'in dsDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi



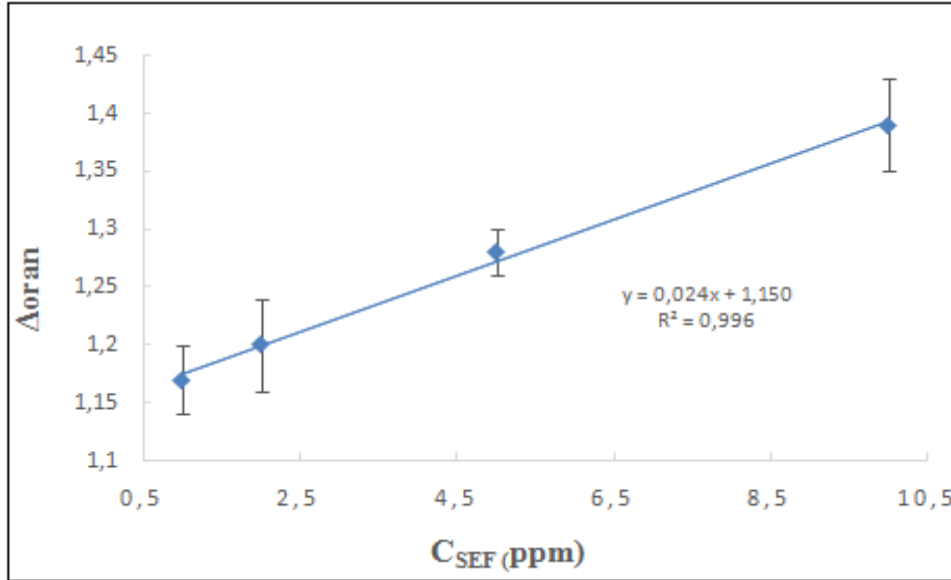
Şekil 4.23. İmpedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin SEF ile dsDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyon grafiği

Yüzeyine uygun koşullarda (5 dakika; 15 ppm) ssDNA immobilize edilen PGE, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki SEF çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile 15 dakika sabit sürede etkileştirildi ve yıkama işlemi yapıldı. Yapılan her bir işlemde sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ oran değerlerinde oluşan değişimler incelenerek ssDNA ile etkileşen optimum SEF derişimi 15 ppm olarak

bulundu (Şekil 4.24). Δ_{oran} değerlerinin SEF derişimiyle değişiminden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.25), regresyon doğrusunun standart sapması ve eğiminden yararlanılarak en düşük tayin sınırı 0,97 ppm olarak hesaplandı.



Şekil 4.24. 10 dakika sürede SEF'nin ssDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi



Şekil 4.25. İmpedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin SEF ile ssDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyon grafiği

İmpedimetrik ölçümlerden elde edilen deney sonuçları kendi içinde karşılaştırıldığında, SWV yöntemi ile elde edilen sonuçlara benzerlik gösterdiği görülmüştür. Şekil 4.22 ve Şekil 4.24 karşılaştırıldığında SEF'in DNA ile etkileşiminde artan derişim değerleri ile birlikte Δ oran değerlerindeki değişimin gerek dsDNA gerekse ssDNA için belirgin bir farklılık göstermediği yani her iki DNA tipinin SEF ile aynı şekilde etkileştiği görülmüştür. Şekil 4.23 ve Şekil 4.25 incelendiğinde kalibrasyon grafiklerinde görülen eğim değerlerinin ve elde edilen en düşük tayin sınırlarının da bir birine yakın olması SEF - DNA etkileşiminde her iki DNA türü için de bir birine benzer olduğu teyit edilmiştir.

SWV ve EIS yöntemlerinden elde edilen deney sonuçları karşılaştırıldığında ise, EIS yönteminde DNA immobilizasyonunun hem süre hem de derişim bakımından çok daha avantajlı olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki yöntemden bulunan en düşük tayin sınırları karşılaştırıldığında impedimetrik olarak tayin edilenlerin daha düşük sınır değerlerinde olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada bir sefalosporin antibiyotik olan seftazidimin (SEF) DNA ile etkileşim özellikleri dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), kare dalga voltametri (SWV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Tek kullanımlık kalem grafit elektrotların kullanıldığı çalışmada calf thymusdan izole edilen tek sarmal ve çift sarmal DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu SWV ve EIS teknikleri ile ayrı ayrı optimize edilmiş ve katı elektrot yüzeyinde SEF-DNA etkileşimi voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmiş ve bu tekniklerden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İmpedimetrik yöntemden elde edilen sonuçların daha duyarlı olduğu, SEF'in dsDNA ve ssDNA'ya afinitesinde önemli bir fark olmadığı ve SEF-DNA etkileşiminin elektrostatik olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma, SEF-DNA etkileşiminin voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmesi yönünden literatürde bir ilk olması ve yeni ilaç tasarımlarına ışık tutması bakımından önemlidir. Ayrıca diğer grafit tabanlı elektrotlarla kıyaslandığında maliyeti oldukça düşük olan tek kullanımlık kalem grafit elektrotlarla herhangi bir etiketleme yapmadan tekrarlanabilir, kararlılığı ve duyarlılığı yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Palecek, 2002. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, 56: 809819.
- [2] Palecek, E., 1988a. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 20: 179–194.
- [3] Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N., 1997. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chem.*, 347: 1-8.
- [4] Jin, B., Ji, B., Nakamura, T., 2004. Voltammetric study of interaction of $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ with DNA at gold nanoparticle self-assembly electrode. *Electrochim. Acta*, 50: 1049-1055.
- [5] Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De. Engl.*, 30: 516-539.
- [6] Turner APF, Karube I, Wilson GS (1987). Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford, 5-7.
- [7] Lowe CR (1984). Biosensors: Trends in Biotechnology. Elsevier, 2(3): 59–65.
- [8] 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, 1-6.
- [9] Erdem A, Ozsoz M (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interaction. *Electroan*, 14 (14), 965-974.
- [10] Brett, C. M. A, Brett. A. M.O. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, Oxford.
- [11] Jelen, F., Erdem A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and singlestranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, 55: 165167.

- [12] Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J.Am. Chem. Soc.*, 119: 9861-9870.
- [13] Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y.S., Giannoula, K., Mikkelsen, S.R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay, *Anal. Chem.*, 68: 1197-1200.
- [14] Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 109: 7528-7530
- [15] Nowicka AM, Zabost E, Donten M, Mazerska Z, Stojek Z(2007). Electroanalytical and spectroscopic procedures for examination of interactions between double stranded DNA and intercalating drugs. *Anal. Bioanal. Chem*, 389: 1931–1940
- [16] Brabec V, Vetterl V, Vrana O (1996). Electroanalysis of biomacromolecules. Experimental techniques in bioelectrochemistry, in: V. Brabec, D. Walz, G. Milazzo (Eds.), *Bioelectrochemistry: Principles and Practice*, 3, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 287–359
- [17] Doğan Topal, B (2011). Bazı antiviral ve antineoplastik ilaç etken maddelerinin DNA ile etkileşimi ve elektrokimyasal analizleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [18] Liu J, Hail ME, Lee MS, Abid S, Hangeland J, Zein N (1998) Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions. *Analyst*, 123: 1455-1459.
- [19] Palaska P, Aritzoglou E, Girousi S (2007). Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes. *Talanta*, 72: 1199-1206.
- [20] Congur G, Erdem A, Mese F (2015). Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes. *Bioelectrochemistry*, 102: 21-28.

- [21] Skoog DA, West DA, Holler FJ (1996). Analitik Kimyanın Temelleri, (Çev. E. Kılıç, F. Köseoğlu). BilimYayıncılık, Ankara, 303-495.
- [22] Anto, R. J., Sukumaran, K., Kuttan, G., Rao, M. N. A., Subbaraju, V. and Kuttan, R. (1995). Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds, *Cancer Letters*, 97: 33-37.
- [23] Brett, A.M. Oliveira, Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A., Cruz, M.L. (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137.
- [24] Brett, C. M. A., Brett, A. M. (1992). Electrochemistry, Oxford University Press, 3.baskı
- [25] Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
- [26] Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Tural, H., Gökçel, H. İ., SEFaş, F. N., (2006). Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, s. 131-206
- [27] Enstrümental Analiz, Yıldız, A., Genç, Ö. (1993)., Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384
- [28] Yıldız, A., Genç, Ö. and Bektaş, S., 1997, Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64,17, Ankara, 331-372 s.
- [29] Erdem A, Ozsoz M (2001a). Interaction of anticancer drug. Epirubicin with DNA, *Analytical ChimicaActa*, 437: 107-114.
- [30] Wang J, Rivas, G, Cai X, Shiraishi, H, Farias PAM, Dontha N, Luo D (1996). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. *AnalyticaChimicaActa*, 332: 139-144.
- [31] Erdem A, Ozsoz M (2001b). Voltammetry of anticancer drug. Mitoxantrone and DNA, *Turkish Journal of Chemistry*, 25(4): 469-475.

- [32] Wang J, Riva, G, Luo D, Cai X, Valera FS, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines. *Analytical Chemistry*, 68: 2251-2254.
- [33] Cai X, Rivas G, Farias PAM, Shiraishi H, Wang J, Palecek E (1996). Evaluation of Different Carbon Electrodes for Adsorptive Stripping Analysis of Nucleic acids. *Electroanalysis*, (8-9): 753-758
- [34] Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.
- [35] Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982). Electrochemistry of OsmiumNucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted doublestranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70.
- [36] Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M., Ribiero, J.A. (2007). Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9: 2167-2173.
- [37] Karadeniz H, Gulmez B, Erdem A, Jelen F, Ozsoz M, Palecek (2006). Echinomycin and cobalt-phenanthroline as redox indicators of DNA hybridization at gold electrodes. *Frontiers in Bioscience*, 11: 1870-1877.
- [38] Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., del Valle, M., Alegret, S. (2006). Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 114: 591-598
- [39] Skoog, D. A., West, D.A., Holler, F.J., *Analitik Kimyanın Temelleri, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu*, (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495
- [40] *Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler*, Tural, H., Gökçel, H. İ., SEFaş, F. N., (2006). Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, s. 131-206.

- [41] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. (Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri) 1. baskı. Bilim Yayıncılık Ltd.Şti, Ankara.
- [42] Skottrup, P.D., Nicolaisen, M., Justesen, A.F. (2008). Towards onsite pathogen detection using antibody-based sensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 24: 339-348.
- [43] Yalçın G (2007). Bazı Kimyasal Maddelerin DNA İle Etkileşmesinin Biyosensörler İle Algılanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), İzmir, 10.
- [44] Çolak N (2009). Düşük Molekül Ağırlıklı Maddelerin DNA Biyosensörleriyle Algılanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), 67 syf, İzmir.
- [45] Aladağ N (2008). Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Vitamin D reseptöründeki Polimorfizmlerin Saptanması. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (yüksek lisans Tezi), İzmir, 12.
- [46] Monk, P., 2002, Fundamentals of electroanalytical chemistry, Willey & Sons, England, 14s.
- [47] Macdonald JR (1992). Impedance Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*, 20: 289-305.
- [48] Prodromidis MI (2007). Impedimetric Biosensors and Immunosensors. *Pak. J. Anal Environ. Chem*, 8: 69 -71.
- [49] 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, 7s.
- [50] Chen, K.S., Chen, S.C., Lin, H.R., Yan, T.R., Tseng, C.C. (2007). A Novel Technique to Immobilize DNA on Surface of a Quartz Crystal Microbalance by Plasma Treatment and Graft Polymerization, *Materials Science and Engineering*, 27: 716–724.
- [51] Dervan, P. B., 1986, Design of sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232:464-471.

- [52] 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.
- [53] Pividori, M. I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.
- [54] Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Prof. Dr. İ. Dökmeçi (Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.
- [55] Wang J, Rivas G, Luo D, Cai X, Valera FS, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996). DNA Biosensor for the detection of Hydrazines. *Anal. Chem*, 68: 2251-2254.
- [56] Baker, E. and Qin, Y., 2006, Electrochemical sensors, *Analytical Chemistry*, 78, 3965–3984 pp.
- [57] Palecek E, Fojta M (2001). Electrochemists are developing fast and easy methods for determining nucleic acid sequences and DNA damage. *Analytical Chemistry*, 73: 74A-83A
- [58] Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E. 1999. Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 476: 71-80.
- [59] Mikkelsen S.R. (1996). Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8: 15-19.
- [60] Yardım Y. 2009 Elektrokimyasal DNA biyosensörlerin bazı kullanım alanlarının guanin ya da adenin sinyali üzerinden incelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi
- [61] Palecek, E., 1996. From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid modified electrodes. *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.
- [62] Levison PR, Dennis J.W, Jones KD, Philpott RW, Taylor SL, Grimm V (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications. *Clin. Chem*, 44: 2060-2061.

- [63] McGown LB, Joseph, MJ, PitnerJB, Vonk, GP ve Linn CP (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition. *Anal. Chem*, 67: 663 A-668 A.
- [64] Ozsoz M., Erdem A., Kara P., Kerman K., Ozkan D. (2002). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal, *Electroanalysis*, 15: 613-619.
- [65] McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P. ve Linn, C. P. (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A-668 A
- [66] Firedman, T., Brown, D. M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, 5: 615-623.
- [67] Levison PR, Dennis J.W, Jones KD, Philpott RW, Taylor SL, Grimm V (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications. *Clin. Chem*, 44: 2060-2061.
- [68] Erdem A, Ariksoysal DO, Karadeniz H, Kara P, Sengonul A, Sayiner AA, Ozsoz M (2005b). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. *Electrochem, Commun*, 7: 815-820.
- [69] Karadeniz H, Alparslan L, Erdem A, Karasulu E (2007). Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 322–326.
- [70] Erdem A (2007). A review: Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies. *Talanta*, 74: 318-325.
- [71] Erdem A, Eksin E, Muti M (2014). Chitosan–graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115: 205-211.
- [72] Yanli S, Xin L, Xueliang W, Zhangyu Y, Tao W (2018). An Electrochemical Sensor for Determination of Ceftazidime Based on Poly (crystal violet) Doped Platinum Nanoparticles Modified Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 13: 18591868.

- [73] Kurbanoglu S, Plata E, Ozkan SA, Uslu B (2016). Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 8–26.
- [74] Bonanni A, Esplandiu MJ, Pividori MI, Alegret S, Del Valle M (2006). Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. *Anal Bioanal Chem*, 385: 1195-1201
- [75] Mishra RK, Hayat A, Catanante G, Ocana C, Marty JL (2015). A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. *Analytica Chimica Acta*, 889: 106-112.
- [76] Erdem A, Congur G (2013). Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 61: 295-301.